

3. 国際共同研究

【採択時公表】

3- (1) 全体概要

本欄には、本事業を実施することにより、到達目標へどのように繋げていくのかを、2. に記載した実施体制等を含めて、全体的な概念を図等を使って分かりやすく示した上で、以下に続く3- (2) 研究目的及び到達目標、3- (3) 研究計画・方法の各項目について全体的な概要を簡潔にまとめて記述してください。(図と記述で1頁以内)
 なお、本欄(3- (1))は採択された場合、採択後本会 HP 等で公表される予定です。

【研究目的及び到達目標】

本研究の目的は、糸状菌 *Chaetomium globosum* が生産する二次代謝産物 **chaetoglobosin A** および **Sch210972**、同じく糸状菌である *Aspergillus clavatus* が生産する **cytochalasin E** 生合成における鍵反応である Diels-Alder 反応を触媒する酵素 **Diels-Alderase** の存在およびその反応機構を世界で初めて詳細に明らかにすることである (図 1)。

【研究計画・方法】

本研究では糸状菌 *C. globosum* 用いる。また、目的とする化合物は chaetoglobosin A および Sch210972 であり、これらの生合成遺伝子クラスターは全て *C. globosum* のゲノム上にコードされており、Diels-Alder 反応を触媒する酵素も含まれていると考えられる。研究の流れを下に示す (図 2)。

はじめに、生合成遺伝子破壊株から生合成中間体を単離し、これらの構造を決定することで chaetoglobosin A および Sch210972 の生合成経路を解明する。次に推定 Diels-Alderase である酵素遺伝子 CHGG_01241 (chaetoglobosin A 生合成) および酵素遺伝子 CHGG_02368 (Sch210972 生合成) の破壊株から Diels-Alder 環化前駆体を単離した後、その構造を明らかにする。続いて、それぞれ遺伝子が大腸菌で異種発現させ精製した後、*in vitro* 反応により環化反応を直接的に確認する。また精製した両タンパク質の結晶化を試み、X 線結晶構造解析により反応機構の詳細について解析し、これらが正真正銘の Diels-Alderase であることを計算化学による合理的な検証を加え立証する。上記図 1 に示した通り chaetoglobosin A はポリケタイド構造とペプチド構造を部分構造として持つハイブリッド化合物であり、isoindolone 部分のシクロヘキセン環が生合成上、Diels-Alder 反応によって構築されることが示唆されている。Hertweck らは RNA サイレncing 法により *Penicillium expansum* における chaetoglobosin A の生合成遺伝子クラスターを同定した (Hertweck, C., et al., JACS, 2007)。Tang らは chaetoglobosin A の類縁化合物である cytochalasin E (図 1) の生合成遺伝子クラスターを同定し、そのクラスター中に存在する ccsF という機能不明な酵素遺伝子が Diels-Alderase をコードしている可能性を示唆した (Tang, Y., et al., Metab. Eng., 2011)。申請者の研究グループでは、すでに *C. globosum* の形質転換を高頻度な相同組換えによって行えるシステムを確立しており (Watanabe, K., et al., JACS, 2013)、このシステムを活用し遺伝子破壊実験によりこれら化合物の生合成経路のみならず、予想 Diels-Alderase の獲得および機能解明を達成する。

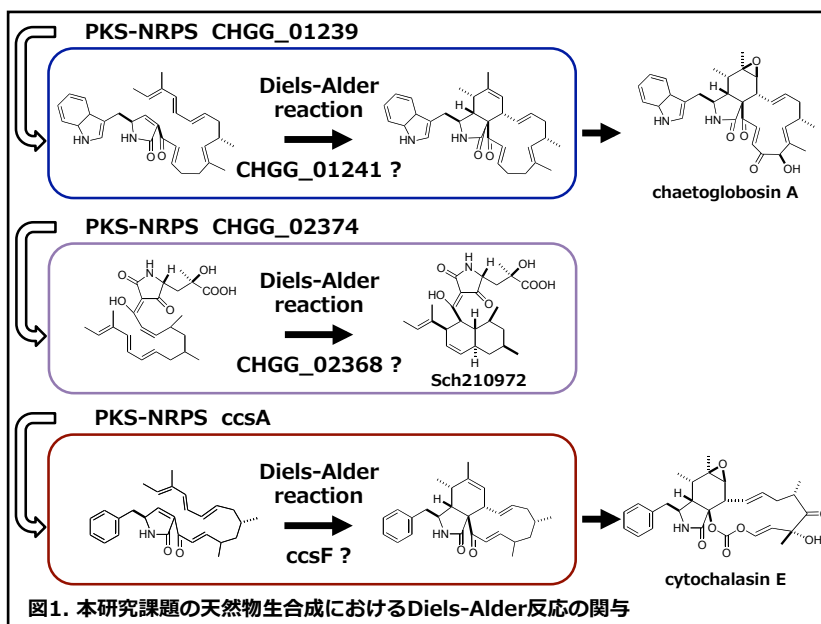


図1. 本研究課題の天然物生合成におけるDiels-Alder反応の関与

(Sch210972 生合成) の破壊株から Diels-Alder 環化前駆体を単離した後、その構造を明らかにする。続いて、それぞれ遺伝子が大腸菌で異種発現させ精製した後、*in vitro* 反応により環化反応を直接的に確認する。また精製した両タンパク質の結晶化を試み、X 線結晶構造解析により反応機構の詳細について解析し、これらが正真正銘の Diels-Alderase であることを計算化学による合理的な検証を加え立証する。上記図 1 に示した通り chaetoglobosin A はポリケタイド構造とペプチド構造を部分構造として持つハイブリッド化合物であり、isoindolone 部分のシクロヘキセン環が生合成上、Diels-Alder 反応によって構築されることが示唆されている。Hertweck らは RNA サイレncing 法により *Penicillium expansum* における chaetoglobosin A の生合成遺伝子クラスターを同定した (Hertweck, C., et al., JACS, 2007)。Tang らは chaetoglobosin A の類縁化合物である cytochalasin E (図 1) の生合成遺伝子クラスターを同定し、そのクラスター中に存在する ccsF という機能不明な酵素遺伝子が Diels-Alderase をコードしている可能性を示唆した (Tang, Y., et al., Metab. Eng., 2011)。申請者の研究グループでは、すでに *C. globosum* の形質転換を高頻度な相同組換えによって行えるシステムを確立しており (Watanabe, K., et al., JACS, 2013)、このシステムを活用し遺伝子破壊実験によりこれら化合物の生合成経路のみならず、予想 Diels-Alderase の獲得および機能解明を達成する。

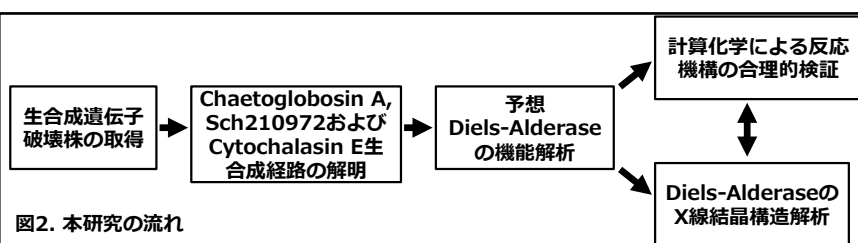


図2. 本研究の流れ

※本ページは増やせません。

(平成26年度公募)