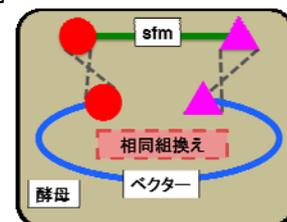


研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		ものづくりを指向した高機能性生体触媒の創製			
研究テーマ (欧文) AZ		Discovering biological catalysts for generation of new chemical diversity			
研究氏 代 表 名 者	カナ CC	姓)ワタナベ	名)ケンジ	研究期間 B	2010 ~ 2011 年
	漢字 CB	渡辺	賢二	報告年度 YR	2012 年
	ローマ字 CZ	Watanabe	Kenji	研究機関名	静岡県立大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		静岡県立大学 大学院薬学研究科 薬学専攻・准教授			
<p>概要 EA (600字~800字程度にまとめてください。)</p> <p><b>【研究の目的】</b> 本研究では、酵母を発現宿主とし有用天然物を高収量で生産できるモデル合成システムの構築および、抗腫瘍活性物質テトラヒドロイソキノリン類を目的化合物として、それら生合成遺伝子を酵母へ導入し化合物の大量生成を目的とした。</p> <p><b>【研究の方法】</b> 目的の生合成遺伝子である非リボソーム依存性ペプチド合成酵素 (NRPS) 遺伝子は、一般に巨大であり、化合物の炭素骨格を修飾するための酵素遺伝子の発現も必要となることが予測される。従って、生合成に必要な読み枠の数も複数となり発現ベクターの構築が困難となることが予想される。そこで、我々は主に <i>S. cerevisiae</i> を用い、既に確立されている相同組換えによる発現ベクター構築法によって目的の合成システムを構築する。 本法は、酵母の相同組換えの能力を活用する(下図)。まず、目的遺伝子を組込む先のベクターと相同的な領域を持つプライマー(それぞれ図中丸印、三角印)を用い、PCRによって組込む先のベクターと相同的な領域を両端に持つDNA断片(図中 挿入断片)を調製する。次に、組込む先のベクターを制限酵素により切断し(図中 ベクター)、DNA断片とともに <i>S. cerevisiae</i> へ導入する。以上の操作により、<i>S. cerevisiae</i> 細胞内において、リコンビナーゼが相同組換えを引き起こし、目的の発現ベクターが構築される。これは、PCRによって得られたゲノム断片を <i>S. cerevisiae</i> 菌体内で容易に目的の生合成経路へと再構築させる方法であり、数種類の発現ベクターを用いることで、複数の読み枠も同時に発現できると考えられる。</p> <p><b>【研究成果】</b> はじめにテトラヒドロイソキノリン類の代表的な化合物であるサフラマイシンの合成を試みた。サフラマイシン全生合成遺伝子は放線菌から単離され、全長約50kbと巨大なクラスター構造をとることが明らかにされている。酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> を宿主とした合成システムを構築するため、目的化合物のテトラヒドロイソキノリン骨格を生合成すると予測される、分子量約150kDaの3個のNRPSと修飾酵素遺伝子の合計8個の生合成遺伝子群(sfmA, B, C, D, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, O<sub>2</sub>)を双方向プロモーターによる発現誘導が可能な4種の発現ベクターに導入することとした。そこで、GAL1-10プロモーターを有する、それぞれ異なる4種のアミノ酸選択マーカーを持つ4種類の発現ベクターを作成した。さらに、NRPSを効率的にホロ化するためにホスホパンテテニル基転位酵素遺伝子(sfp)を宿主染色体上へ導入した。酵母染色体に導入したsfpおよびプラスミド上の8個の生合成遺伝子を発現させた後、ウエスタンブロッティングによって酵素へ翻訳されていることを確認した。現在、得られた形質転換酵母を培養し <i>in vivo</i> 系において目的化合物の合成を試みている。 また、テトラヒドロイソキノリン類の生合成において共通の開始単位となるチロシン誘導体を500mg有機合成することに成功した。大腸菌発現によって得た精製酵素を用い、上記の開始単位を基質として <i>in vitro</i> 系における目的化合物の生産も確認中である。<i>in vitro</i> 合成系によって得られる反応機構に関する詳細な知見を活用することで、様々な非天然型の誘導体を合成することが期待されている。</p>					
キーワード FA		生合成	酵素	天然有機化合物	ケミカルバイオロジー



(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>	Practical synthesis of DOPA derivative for biosynthetic production of potent antitumor natural products, saframycins and ecteinascidin 743.							
	著者名 <sup>GA</sup>	Torikai, K., Saruwatari, T., Kitano, T., Sano, T., Nakane, A., Noguchi, H., <b>Watanabe, K.</b>	雑誌名 <sup>GC</sup>	<i>Letters In Organic Chemistry</i>					
	ページ <sup>GF</sup>	686-689	発行年 <sup>GE</sup>	2	0	1	1	巻号 <sup>GD</sup>	8
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>		発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>								
	著者名 <sup>GA</sup>		雑誌名 <sup>GC</sup>						
	ページ <sup>GF</sup>		発行年 <sup>GE</sup>					巻号 <sup>GD</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	

#### 欧文概要 EZ

【目的】テトラヒドロイソキノリン骨格を持つサフラマイシンは放線菌より単離された抗腫瘍性生物活性物質である。サフラマイシン生合成遺伝子クラスターに存在する3種のNRPSの一つであるSfmCにより脂肪酸ジペプチド還元体およびチロシン誘導体を基質として多段階反応が進行し、一挙に複雑なペプチド骨格が構築されることが示された<sup>1)</sup>。今回、残り2種のNRPS遺伝子の役割について大腸菌異種発現系を用いた酵素機能解析を試みた。

【方法および結果】サフラマイシン全生合成遺伝子は放線菌から単離され、全長約50kbと巨大なクラスター構造をとることが明らかにされた。そのクラスターの中にはテトラヒドロイソキノリン骨格構築を担う3つのNRPS (*sfmA*, *sfmB*, *sfmC*) の存在が示された<sup>2)</sup>。そこで *sfmA* および *sfmB* に関して大腸菌発現プラスミドを構築し、*sfp* 遺伝子が染色体上に導入された大腸菌 BAP1 を用いて発現誘導した。得られた組換え酵素を用いて、myristic acid、myristoyl-CoA、L-alanine、glycine 及び有機合成した myristoyl-alanine の *N*-acetylcysteamine 誘導体を基質として ATP 存在下、酵素反応を試みた。その結果、SfmA は myristoyl-alanine を SfmB は myristoyl-alanyl-glycine をそれぞれ合成することが明らかとなった。サフラマイシン骨格合成に必要な脂肪酸ジペプチドが SfmA および SfmB によって合成されることが証明された。現在、3種のNRPS酵素によるプレサフラマイシンの合成およびその誘導体合成に関して検討中である。

#### 【文献】

- 1) Koketsu, K. *et al. Nat. Chem. Biol.* **2010**, 6, 408-410.
- 2) Li, L. *et al. J. Bacteriol.* **2008**, 190, 251-263.