

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：10101

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2016～2020

課題番号：16H06448

研究課題名(和文) 難培養微生物を起源とする希少医薬品資源の量産

研究課題名(英文) Production of rare bioactive natural products originating from uncultured bacteria

研究代表者

脇本 敏幸 (WAKIMOTO, Toshiyuki)

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：70363900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 55,400,000円

研究成果の概要(和文)：海綿動物Discodermia calyxより単離構造決定されたcalyculin Aは、各種がん細胞に対して強力な細胞毒性を示す主要代謝産物である。そのためcalyculin Aを高濃度で含む海綿動物がその毒性に侵されない理由は長年不明であった。本研究ではcalyculin A生合成における毒性回避機構を明らかにした。低毒性なphosphocalyculin Aを前駆体として生合成すると同時に、活性化酵素であるCaIをペリプラズム領域に発現し、両者の区画化を実現するとともに、組織傷害を引き金とした活性化を可能にしている。本研究成果は毒性物質の異種生産系の確立において重要な知見を与える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海綿動物からは、これまでに多様な生物活性物質が単離報告されてきた。その中には、特異的かつ極めて低濃度で強力な活性を示す化合物が複数見出されており、それらは医薬品や生化学試薬の開発において重要な天然資源である。しかし海綿動物自体が稀少生物であることから、量的供給が難しく、その代謝物の医薬品開発を目指す上で大きな壁となっている。海綿を起源とする二次代謝産物を実験室下で異種生産した報告例はこれまでにほとんどないため、本研究は稀少な生物資源である海綿動物由来生物活性物質の生合成機構を解明する。本研究で得られる成果は、海綿及びその共生微生物に由来する医薬品資源の異種生産系の確立につながる。

研究成果の概要(英文)：Marine sponges often contain potent cytotoxic compounds, which usually target molecules that are likely to be shared with the sponge itself. This fact in turn evokes the principle question of how marine sponges avoid self-toxicity. We previously identified an intriguing mechanism to prevent self-toxicity by the phosphorylation of the highly toxic calyculin A in the sponge holobiont, which is catalyzed by the phosphotransferase CaIQ of a producer symbiont, "Candidatus Entotheonella" sp. However, the activating mechanism to dephosphorylate the stored phosphocalyculin A remains elusive. Here we show that the phosphatase specific to phosphocalyculin A is CaIL, which is also encoded in the calyculin biosynthetic gene cluster. CaIL represents a new clade and unprecedentedly coordinates the heteronuclear metals Cu and Zn. The CaIL is localized in the periplasmic space of the sponge symbiont, where it is ready for the on-demand production of calyculin A in response to sponge tissue disruption.

研究分野：天然物化学

キーワード：海綿動物 ポリケタイド 細胞毒性物質

## 1. 研究開始当初の背景

近年、遺伝子の網羅的な解析により、地球上に生息する多種多様な微生物の中で培養可能なものは1%~0.1%と極めて少ないことが明らかになってきた。既に、培養可能な放線菌やカビから、これまで多くの天然医薬品が見出されてきた事を考慮すると、99%以上に及ぶ未培養微生物は未開拓かつ重要な生物資源として位置づけられる。この未利用かつ莫大な生物資源を有効に活用するためには、入手可能な遺伝子資源を基盤とする手法の開発が不可欠である。同手法を物質生産技術に結びつけるためには天然物骨格を生合成する機構の詳細を明らかにする必要がある。

海綿動物からは、これまでに多様な生物活性物質が単離報告されてきた。その中には、特異的かつ極めて低濃度で強力な活性を示す化合物が複数見出されており、医薬品や生化学試薬の開発において重要な天然資源である。しかしながら、これらの有効利用を目指す場合、海綿動物自体が稀少生物資源であるため、十分な量の化合物を供給することが難しく、海綿由来生物活性物質が臨床応用に至った例は未だ僅かである。この状況を打開するには難培養微生物資源の有効利用方法の確立に活路を見出す必要がある。我々の研究グループは、伊豆半島沿岸に生息する海綿 *Discodermia calyx* について、主要二次代謝産物の生合成遺伝子を取得し、それに基づく遺伝子解析およびシングルセル解析を行った。その結果、共生微生物 *Candidatus Entotheonella* sp. が生物活性物質の生産を担っていることを明らかにしている。このバクテリアは、16S rRNA 解析において、他の既知バクテリアと相同性を示さないことから、新門 *Tectomicrobia* 門として提唱されており、現段階で実験室下での培養は成功していない。二次代謝産物の生産能に秀でた難培養性微生物として位置づけられる *Entotheonella* 属バクテリアの可培養化や遺伝子資源の利用方法は、稀少生物資源に由来する海綿由来生物活性物質の大量安定供給法の確立に繋がり、将来の天然医薬品開発に大きく寄与すると考えられる。

## 2. 研究の目的

海綿動物 *Discodermia calyx* より単離構造決定された calyculin A は、各種がん細胞に対して強力な細胞毒性を示す主要代謝産物である。その作用機序は真核生物に普遍的に保存されているタンパク質脱リン酸化酵素 1 および 2A を特異的に阻害する。そのため calyculin A を高濃度で含む海綿動物がその毒性に侵されない理由は長年不明であった。2014 年に所属研究室では、メタゲノムマイニング法により全長約 150 kb に及ぶ PKS (polyketide synthase)-NRPS (nonribosomal peptide synthetases) hybrid 型の calyculin 生合成遺伝子クラスターの単離に成功した。さらに遺伝子クラスターにコードされているリン酸基転移酵素 CalQ が calyculin A をリン酸化し、弱毒性 phosphocalyculin A へと変換することを見出した。この反応は、生産菌 *Entotheonella* の宿主海綿動物における calyculin A に対する耐性機構を示唆している。一方で、phosphocalyculin A を脱リン酸化し、calyculin A へと変換する毒性発現機構が不明であった。海綿組織の損傷が代謝物のプロファイルに変化を及ぼす可能性を検討した結果、主代謝物は組織傷害依存的に phosphocalyculin A から calyculin A へと変換されていた。すなわち、海綿 *D. calyx* には組織損傷に応じて高濃度のプロトキシンが瞬時に脱リン酸化され、細胞毒性が 1,000 倍強い化学防御物質へと生物変換される活性化機構が備わっていることが明らかになった。しかし、その組織傷害に応じた活性化機構は不明であり、中でも鍵となる phosphocalyculin A の活性化を担う脱リン酸化酵素は未同定であった。そこで本研究では phosphocalyculin A を活性化する脱リン酸化酵素を同定し、その機能を解析することで活性制御を伴う生合成機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

一般的にアミノグリコシド系抗生物質におけるリン酸化/脱リン酸化を介した活性制御に関わる酵素は、その生合成遺伝子クラスターにセットで存在することが知られている。そこで初めに calyculin のリン酸基転移酵素 CalQ の下流にコードされている機能未知の脱リン酸化酵素と配列相同性を示す CalL に着目し、組換えタンパク質 CalL の *in vitro* 機能解析を試みた。しかし、いずれの反応条件においても phosphocalyculin A 脱リン酸化活性は認められなかった。そのため生産菌以外の海綿や他の共生微生物が脱リン酸化酵素の生産者である可能性を否定できなかった。そこで次に海綿 *D. calyx* の粗酵素抽出液より、海綿組織において活性化を担う phosphocalyculin 脱リン酸化酵素の精製・同定を試みた。

## 4. 研究成果

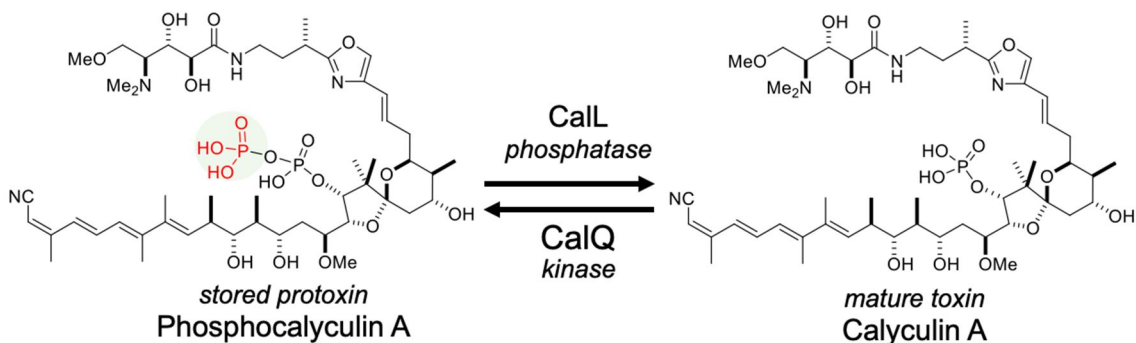
Phosphocalyculin 脱リン酸化活性を分離の指標に、海綿 *D. calyx* の粗酵素液より各種カラムクロマトグラフィーを用いて精製し、最終的に活性画分を得た。その活性画分を二次元電気泳動により分析した結果、脱リン酸化酵素の物理化学的特徴は分子量約 45 kDa かつ等電点 pI 8-10 の塩基性タンパク質であることが明らかになった。本特徴をもとに calyculin 生合成遺伝子クラスターに着目すると、海綿より精製した脱リン酸化酵素の特徴は CalL の特徴 (43 kDa, pI 9.01) と酷似していた。Phosphocalyculin 脱リン酸化酵素は CalL であると予想し、天然由来酵素をトリプシン消化後、得られたペプチド断片のアミノ酸配列を LC-MS/MS により解析した。その結果、天

然由来脱リン酸化酵素から CalL と同一のアミノ酸配列断片が検出された。さらに、当初 CalL の読み枠 open reading frame (ORF) の N 末端と予想したアミノ酸残基よりも上流のアミノ酸配列に相当するペプチド断片も検出されたことから、CalL の ORF の開始コドンはより上流に存在することが推察された。そこで遺伝子 *calL* の上流領域の塩基配列の再解析を行ったところ、N 末端側に 66 残基伸長可能な CalL の ORF を見出した。これらの結果から、海綿 *D. calyx* より精製した phosphocalyculin 特異的脱リン酸化酵素は、N 末端側に伸長した新たな ORF の CalL であることが示唆された。

次に新たに見出した ORF の CalL が phosphocalyculin 脱リン酸化酵素として機能する可能性を検討するために、大腸菌を用いた異種宿主発現により調製した組換え酵素 CalL の in vitro 酵素反応を試みた。その結果、新たに見出した ORF の組換え酵素 CalL において phosphocalyculin A 脱リン酸化活性が認められ、その定常状態速度論的パラメーターの値も天然由来の酵素の値と良い一致を示した。以上の結果から、phosphocalyculin 脱リン酸化酵素は calyculin 生合成遺伝子クラスターにコードされる CalL であることが明らかになった。

CalL は機能既知の脱リン酸化酵素との配列相同性が低く、その生化学的特徴は不明であった。各種脱リン酸化酵素との系統樹解析および脱リン酸化酵素阻害剤との感受性実験の結果、CalL はどの機能既知の脱リン酸化酵素グループからも独立した新たな酵素グループに属しており、purple acid phosphatase (PAP) と類似した生化学的特徴を有することが予想された。実際に CalL の至適反応条件や金属結合残基を欠損させた変異体の in vitro 機能解析を検証した結果、CalL は哺乳類または細菌由来の PAP と同様にモノマーとして存在し、CalL の至適 pH や金属結合残基は PAP のそれらと同一性を示した。一方で様々な基質のモノ・ジ・トリリン酸エステル基に対して加水分解活性を示す PAP の寛容な基質特異性とは異なり、CalL の基質特異性は高く、リン酸モノエステル基を加水分解せず phosphocalyculins のピロリン酸エステル基を選択的に脱リン酸化する酵素であることを示した。また CalL の活性中心金属を同定するために誘導結合プラズマ質量分析 ICP-MS とキレート比色定量分析を行った結果、PAP の活性中心に保存されているヘテロ二核金属 [Fe-M] (M = Fe, Mn, Zn) と異なり、CalL はこれまで脱リン酸化酵素において報告のないヘテロ二核金属 Cu-Zn を有する酵素であることが明らかになった。

次に海綿の組織傷害後からプロトキシンが活性化に至るまでの経路を検証した。陸上植物において傷害直後にプロトキシンを活性化する機構には、予め活性化酵素とプロトキシンがそれぞれ細胞小器官などへ蓄積・区画化されていることが重要であることが知られている。そこで酵素の区画化に関する知見を得るために CalL のアミノ酸配列を解析した結果、菌体内においてペリプラズムへの酵素輸送に重要なシグナル配列が CalL の N 末端側に保存されていた。実際に天然由来 CalL の LC-MS/MS データを精査したところ、酵素をペリプラズムへ放出する signal peptidase I の開裂によって生じるペプチド断片が検出された。さらに大腸菌における組換え酵素 CalL の同在を検証した結果、ペリプラズム酵素の抽出画分に CalL の存在が認められ、LC-MS/MS 解析においても組換え CalL の N 末端配列が天然酵素と同一であった。以上のことから、CalL は生産菌のペリプラズムへ輸送されることが明らかになった。



次に phosphocalyculin 脱リン酸化反応が *Entotheonella* 細胞内で進行する可能性を検証するために、細胞内の遊離モノリン酸の濃度変化をマラカイトグリーン試薬で染色し顕微鏡下で観察した。比較対象として、組織傷害に応じて代謝物変化が認められない近縁種 *D. kiiensis* 由来の *Entotheonella* 細胞を用いた。その結果 *D. calyx* の生産菌特異的に細胞が濃い緑色に染色されたことから、脱リン酸化反応は生産菌の細胞内で生じることが示唆された。

以上の結果から、平時の *Entotheonella* 細菌内において CalL と phosphocalyculin A がそれぞれペリプラズムと細胞質に区画化・蓄積されており、そこへ外敵により細菌膜に傷が生じると CalL とプロトキシンが瞬時に反応し、活性化された calyculin A が毒性を示すことで化学防御が発動する巧妙な機構を明らかにした。本研究成果によって calyculin A 生合成の最終段階の機構が明らかになった。特に毒性を回避するために phosphocalyculin A を前駆体として生合成すると同時に、活性化酵素である CalL をペリプラズム領域に発現し、両者の区画化を実現するとともに、組織傷害を引き金とした活性化を可能にしている。本研究成果は毒性物質の異種生産系の確立において重要な知見を与える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計29件（うち査読付論文 28件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsuda Kenichi, Fujita Kei, Wakimoto Toshiyuki	4. 巻 48
2. 論文標題 PenA, a penicillin-binding protein-type thioesterase specialized for small peptide cyclization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jimb/kuab023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Rumengan Inneke F. M., Roring Vera I. Y., Haedar Jabal R., Siby Mayse S., Luntungan Aldian H., Kolondam Beivy J., Uria Agustinus R., Wakimoto Toshiyuki	4. 巻 84
2. 論文標題 Ascidian-associated photosymbionts from Manado, Indonesia: secondary metabolites, bioactivity simulation, and biosynthetic insight	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Symbiosis	6. 最初と最後の頁 71 ~ 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13199-021-00766-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 松田研一、脇本敏幸	4. 巻 -
2. 論文標題 新規ペプチド環化酵素PBP-type TEの発見と機能解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ファインケミカル	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuranaga Takefumi, Matsuda Kenichi, Takaoka Masachika, Tachikawa Chisato, Sano Ayae, Itoh Kosei, Enomoto Ayumu, Fujita Kei, Abe Ikuro, Wakimoto Toshiyuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Total Synthesis and Structural Revision of Kasumigamide, and Identification of a New Analogue	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 3329 ~ 3332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.202000409	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuda Kenichi, Zhai Rui, Mori Takahiro, Kobayashi Masakazu, Sano Ayae, Abe Ikuro, Wakimoto Toshiyuki	4. 巻 3
2. 論文標題 Heterochiral coupling in non-ribosomal peptide macrolactamization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Catalysis	6. 最初と最後の頁 507 ~ 515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41929-020-0456-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jomori Takahiro, Shiroyama Shuji, Ise Yuji, Kohtsuka Hisanori, Matsuda Kenichi, Kuranaga Takefumi, Wakimoto Toshiyuki	4. 巻 73
2. 論文標題 Scrobiculosides A and B from the deep-sea sponge Pachastrella scrobiculosa	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 814 ~ 819
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-019-01315-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuda Kenichi, Kuranaga Takefumi, Sano Ayae, Ninomiya Akihiro, Takada Kentaro, Wakimoto Toshiyuki	4. 巻 67
2. 論文標題 The Revised Structure of the Cyclic Octapeptide Surugamide A	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 476 ~ 480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c19-00002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuda Kenichi, Kuranaga Takefumi, Wakimoto Toshiyuki	4. 巻 77
2. 論文標題 A New Cyclase Family Catalyzing Head-to-Tail Macrolactamization of Non-ribosomal Peptides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan	6. 最初と最後の頁 1106 ~ 1115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5059/yukigoseikyokaishi.77.1106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwao Yasunori, Ishida Hitoshi, Kimura Shin-ichiro, Wakimoto Toshiyuki, Kondo Hiromu, Itai Shigeru, Noguchi Shuji	4. 巻 67
2. 論文標題 Crystal Structures of Flavone C-Glycosides from Oolong Tea Leaves: Chafuroside A Dihydrate and Chafuroside B Monohydrate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 935 ~ 939
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c19-00166	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松田研一、倉永健史、脇本敏幸	4. 巻 55
2. 論文標題 ペニシリン結合タンパク質によるペプチド環化	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 650-654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.55.7_650	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松田研一、脇本敏幸	4. 巻 77
2. 論文標題 バクテリアが有する新たな非リボソームペプチド環化酵素	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 306-307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuda Kenichi, Kobayashi Masakazu, Kuranaga Takefumi, Takada Kentaro, Ikeda Haruo, Matsunaga Shigeki, Wakimoto Toshiyuki	4. 巻 17
2. 論文標題 SurE is a trans-acting thioesterase cyclizing two distinct non-ribosomal peptides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 1058 ~ 1061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8OB02867B	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uria Agustinus R., Piel Joern, Wakimoto Toshiyuki	4. 巻 604
2. 論文標題 Biosynthetic Insights of Calyculin- and Misakinolide-Type Compounds in “ Candidatus Entotheonella sp.”	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods in Enzymology	6. 最初と最後の頁 287 ~ 330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.mie.2018.02.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsuda Kenichi, Tomita Takeo, Shin-ya Kazuo, Wakimoto Toshiyuki, Kuzuyama Tomohisa, Nishiyama Makoto	4. 巻 140
2. 論文標題 Discovery of Unprecedented Hydrazine-Forming Machinery in Bacteria	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 9083 ~ 9086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.8b05354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuranaga Takefumi, Matsuda Kenichi, Sano Ayae, Kobayashi Masakazu, Ninomiya Akihiro, Takada Kentaro, Matsunaga Shigeki, Wakimoto Toshiyuki	4. 巻 57
2. 論文標題 Total Synthesis of the Nonribosomal Peptide Surugamide B and Identification of a New Offloading Cyclase Family	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 9447 ~ 9451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201805541	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuranaga Takefumi, Fukuba Atsuki, Ninomiya Akihiro, Takada Kentaro, Matsunaga Shigeki, Wakimoto Toshiyuki	4. 巻 66
2. 論文標題 Diastereoselective Total Synthesis and Structural Confirmation of Surugamide F	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 637 ~ 641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c18-00072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Unno Yuka, Yamamoto Hirona, Takatsuki Shuto, Sato Yoshinori, Kuranaga Takefumi, Yazawa Kazunaga, Ono Yasuo, Wakimoto Toshiyuki	4. 巻 1863
2. 論文標題 Palmitoyl lactic acid induces adipogenesis and a brown fat-like phenotype in 3T3-L1 preadipocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 772 ~ 782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbailip.2018.04.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takai Akira, Eto Masumi, Hirano Katsuya, Takeya Kosuke, Wakimoto Toshiyuki, Watanabe Masaru	4. 巻 68
2. 論文標題 Protein phosphatases 1 and 2A and their naturally occurring inhibitors: current topics in smooth muscle physiology and chemical biology	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 1 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-017-0556-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kuranaga Takefumi, Enomoto Ayumu, Tan Hui, Fujita Kazuto, Wakimoto Toshiyuki	4. 巻 19
2. 論文標題 Total Synthesis of Theonellapeptolide Id	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 1366 ~ 1369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.7b00249	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wakimoto Toshiyuki	4. 巻 17
2. 論文標題 Toward the Dark Matter of Natural Products	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Chemical Record	6. 最初と最後の頁 1124 ~ 1134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/tcr.201700009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -



1. 著者名 Zhang Lihan, Hashimoto Takuya, Qin Bin, Hashimoto Junko, Kozone Ikuko, Kawahara Teppei, Okada Masahiro, Awakawa Takayoshi, Ito Takuya, Asakawa Yoshinori, Ueki Masashi, Takahashi Shunji, Osada Hiroyuki, Wakimoto Toshiyuki, Ikeda Haruo, Shin-ya Kazuo, Abe Ikuro	4. 巻 56
2. 論文標題 Characterization of Giant Modular PKSs Provides Insight into Genetic Mechanism for Structural Diversification of Aminopolyol Polyketides	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 1740 ~ 1745
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201611371	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakashima Yu, Egami Yoko, Kimura Miki, Wakimoto Toshiyuki, Abe Ikuro	4. 巻 11
2. 論文標題 Metagenomic Analysis of the Sponge Discodermia Reveals the Production of the Cyanobacterial Natural Product Kasumigamide by 'Entotheonella'	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0164468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0164468	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tan Karen Co, Wakimoto Toshiyuki, Abe Ikuro	4. 巻 79
2. 論文標題 Sulfoureido Lipopeptides from the Marine Sponge Discodermia kiiensis	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 2418 ~ 2422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.6b00586	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhang Lihan, Hoshino Shotaro, Awakawa Takayoshi, Wakimoto Toshiyuki, Abe Ikuro	4. 巻 17
2. 論文標題 Structural Diversification of Lyngbyatoxin A by Host-Dependent Heterologous Expression of the <i>leABC</i> Biosynthetic Gene Cluster	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 1407 ~ 1411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201600229	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ninomiya Akihiro, Katsuyama Yohei, Kuranaga Takefumi, Miyazaki Masayuki, Nogi Yuichi, Okada Shigeru, Wakimoto Toshiyuki, Ohnishi Yasuo, Matsunaga Shigeki, Takada Kentaro	4. 巻 17
2. 論文標題 Biosynthetic Gene Cluster for Surugamide A Encompasses an Unrelated Decapeptide, Surugamide F	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 1709 ~ 1712
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201600350	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kan Toshiyuki, Yamashita Megumi, Shimizu Keita, Koizumi Yasuaki, Wakimoto Toshiyuki, Hamashima Yoshitaka, Asakawa Tomohiro, Inai Makoto	4. 巻 27
2. 論文標題 Concise Synthesis of Anserine: Efficient Solvent Tuning in Asymmetric Hydrogenation Reaction	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Synlett	6. 最初と最後の頁 2734 ~ 2736
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/s-0035-1562796	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asakawa Tomohiro, Kawabe Yusuke, Yoshida Atsushi, Aihara Yoshiyuki, Manabe Tamiko, Hirose Yoshitsugu, Sakurada Asuka, Inai Makoto, Hamashima Yoshitaka, Furuta Takumi, Wakimoto Toshiyuki, Kan Toshiyuki	4. 巻 69
2. 論文標題 Syntheses of methylated catechins and theaflavins using 2-nitrobenzenesulfonyl group to protect and deactivate phenol	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 299 ~ 312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ja.2016.14	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wakimoto Toshiyuki, Egami Yoko, Abe Ikuro	4. 巻 33
2. 論文標題 Calyculin: Nature's way of making the sponge-derived cytotoxin	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Natural Product Reports	6. 最初と最後の頁 751 ~ 760
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C5NP00123D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 江上蓉子, 脇本敏幸, 阿部郁朗	4. 巻 33
2. 論文標題 海綿共生微生物による生物活性物質の生産	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 バイオインダストリー	6. 最初と最後の頁 11-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計25件 (うち招待講演 25件 / うち国際学会 14件)

1. 発表者名 Wakimoto Toshiyuki
2. 発表標題 Discovery and functional analysis of a new peptide cyclase, PBP-type TE
3. 学会等名 1st GSD/GI-CoRE国際シンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 脇本敏幸
2. 発表標題 海洋生物活性天然物の生合成に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会第141年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 脇本敏幸
2. 発表標題 新規ペプチド環化酵素PBP-type TEの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 脇本敏幸
2. 発表標題 非リボソームペプチド新規環化酵素の発見
3. 学会等名 第51回若手ペプチド夏の勉強会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 脇本敏幸
2. 発表標題 難培養微生物を起源とする希少医薬品資源の量産
3. 学会等名 生物合成系の再設計による複雑骨格機能分子の革新的創成科学、第6回公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wakimoto Toshiyuki
2. 発表標題 Chemical defense mechanism in a Japanese marine sponge, Discodermia calyx
3. 学会等名 Blue Pharmacy: from Sources to Clinical Reality（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wakimoto Toshiyuki
2. 発表標題 A new off-loading cyclase in non-ribosomal peptide biosynthesis
3. 学会等名 3rd International Conference on Natural Product Discovery and Development in the Genomic Era（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 脇本敏幸
2. 発表標題 カリクリン生合成過程に内在する活性制御機構
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toshiyuki Wakimoto
2. 発表標題 A new off-loading enzyme in non-ribosomal peptide biosynthesis
3. 学会等名 2nd China-Japan Joint Symposium on Natural Product Biosynthesis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshiyuki Wakimoto
2. 発表標題 Marine Sponge-derived Metagenomes/uncultured Bacteria - a Rich Source of Novel Natural Product Biosynthetic Genes
3. 学会等名 International Seminar on Natural Products Medicines 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshiyuki Wakimoto
2. 発表標題 Unusual Processes of PKS and NRPS Assembly Lines in Marine Bacteria
3. 学会等名 1st German-Japanese Joint Symposium on the Biosynthesis of Natural Products (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 脇本敏幸
2. 発表標題 生合成遺伝子から見出した新規天然物と難培養微生物
3. 学会等名 新化学技術推進協会ライフサイエンス技術部会講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 脇本敏幸
2. 発表標題 難培養微生物を起源とする希少医薬品資源の量産
3. 学会等名 生物合成系の再設計による複雑骨格機能分子の革新的創成科学、第2回公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 脇本敏幸
2. 発表標題 メタゲノムマイニングによる海綿由来新規天然物の探索
3. 学会等名 日本薬学会第138会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 脇本敏幸
2. 発表標題 メタゲノムマイニングによる海綿由来新規天然物の探索
3. 学会等名 理研シンポジウム、高磁場・高感度NMR利活用促進のための天然物分野における日中連携シンポジウム2017（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Wakimoto Toshiyuki
2. 発表標題 Marine sponge-derived metagenomes/uncultured bacteria - a rich source of novel natural product biosynthetic genes
3. 学会等名 South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, China (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Wakimoto Toshiyuki
2. 発表標題 Marine sponge-derived metagenomes/uncultured bacteria - a rich source of novel natural product biosynthetic genes
3. 学会等名 Jinan University, College of Pharmacy, China (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Wakimoto Toshiyuki
2. 発表標題 Marine sponge-derived metagenomes/uncultured bacteria - a rich source of novel natural product biosynthetic genes
3. 学会等名 International Conference on Marine Biodiversity and Biotechnology, Jakarta, Indonesia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Wakimoto Toshiyuki
2. 発表標題 Marine sponge-derived metagenomes/uncultured bacteria - a rich source of novel natural product biosynthetic genes
3. 学会等名 1st China-Japan Joint Symposium on Natural Product Biosynthesis, Shanghai, China (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Wakimoto Toshiyuki
2. 発表標題 Activated Chemical Defense of Japanese Marine Sponge Discodermia calyx
3. 学会等名 ISCE/APACE, Kyoto, Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Wakimoto Toshiyuki
2. 発表標題 Marine sponge-derived metagenomes/uncultured bacteria - a rich source of novel natural product biosynthetic genes
3. 学会等名 9th US-Japan Seminar on Natural Product Biosynthesis, UCLA Lake Arrowhead Conference Center, California, USA (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Toshiyuki Wakimoto
2. 発表標題 Toward the dark matter of marine natural products
3. 学会等名 International Symposium on Marine Natural Products (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Toshiyuki Wakimoto
2. 発表標題 A Bacterial Symbiont in Japanese Marine Sponges Produces Biologically Active Metabolites
3. 学会等名 The 3rd Myanmar-Japan International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年



1. 発表者名 脇本敏幸
2. 発表標題 海綿動物由来生物活性物質の探索と生合成研究
3. 学会等名 若手研究者のための有機化学札幌セミナー（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Toshiyuki Wakimoto
2. 発表標題 Marine sponge-derived metagenomes/uncultured bacteria - a rich source of novel natural product biosynthetic genes
3. 学会等名 Czech-Japan Joint Workshop（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 海老塚 豊、森田 博史、阿部 郁朗、脇本 敏幸、他	4. 発行年 2021年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 306
3. 書名 パートナー天然物化学(改訂第4版)	

1. 著者名 竹谷 孝一、木内 文之、小松 かつ子、脇本 敏幸、他	4. 発行年 2021年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 458
3. 書名 パートナー生薬学(改訂第4版)	

1. 著者名 脇本敏幸	4. 発行年 2016年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 p61-66
3. 書名 「天然物の化学－魅力と展望－」上村大輔編	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ペプチド類の大環状化酵素	発明者 脇本敏幸、倉永健史、松田研一	権利者 北海道大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願PCT/JP2019/017707	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 ペプチド類の大環状化酵素	発明者 脇本敏幸、倉永健史、松田研一	権利者 北海道大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-50797	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

北海道大学大学院薬学研究院天然物化学研究室 <a href="http://www.pharm.hokudai.ac.jp/tennen/index.html">http://www.pharm.hokudai.ac.jp/tennen/index.html</a> 北海道大学プレスリリース <a href="https://www.hokudai.ac.jp/news/180618_pr.pdf">https://www.hokudai.ac.jp/news/180618_pr.pdf</a>
---

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------