

機関番号：23803
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：平成 21 年度～平成 22 年度
 課題番号：21780106
 研究課題名（和文） 抗腫瘍性抗生物質テトラヒドロイソキノリン類の全合成
 研究課題名（英文） Biosynthesis of natural antitumor agents and their rationally engineered analogs in *Escherichia coli*
 研究代表者
 渡辺 賢二 (WATANABE KENJI)
 静岡県立大学・薬学部・准教授
 研究者番号：50360938

研究成果の概要（和文）：抗腫瘍性抗生物質テトラヒドロイソキノリン類の全合成

研究成果の概要（英文）：Biosynthesis of natural antitumor agents and their rationally engineered analogs in *Escherichia coli*

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
平成 22 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：天然物化学

1. 研究開始当初の背景

現在医薬品として用いられている化合物の約半数は天然物誘導体であり、それらはリード化合物と呼ばれる天然物を改変し、さらに高生物活性が付与され、副作用が軽減された化合物である。リード化合物の中には、生物由来二次代謝産物として生産された複雑な構造を持つ天然物が多く含まれる。これら化合物の供給法に関しては現在以下の 3 種の方法が広く知られている。(1) エリスロマイシン、ペニシリンなど、それらが微生物由来である場合、培養によって化合物を得る培養法、(2) プロスタグランジンなど、有機合成化学による全合成、(3) リファマイシン、タキソールなど、培養法で得た化合物を部分構造と

して用い有機合成化学によって実際の医薬品へと導く半合成、である。しかし、これら化合物取得法には以下に示す問題点が存在する。上記 (1) に関しては、生産起源が培養困難な微生物である場合、あるいは目的化合物が極微量しか生産されない場合がある、(2) に関しては、採算性が低く、環境に対する負荷が大きい、(3) に関しては、生物起源の部分構造が大量に得られない場合、また望む医薬品への変換が困難な場合がある。そのため産業ニーズ・社会ニーズとして、目的化合物の大量生産および狙った誘導体を容易に生産できる方法の開発が強く求められている。

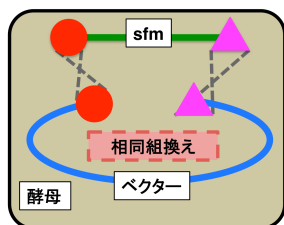
2. 研究の目的

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合成を目的とした。

3. 研究の方法

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 *S. cerevisiae* 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 *S. cerevisiae* へ導入する。以上の操作により、*S. cerevisiae* 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 *S. cerevisiae* 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。

4. 研究成果

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 *Saccharomyces cerevisiae* 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, M₁, M₂, M₃, O₂）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、ウエスタンブロット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 *in vivo* 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 500 mg 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 *in vitro* 系における目的化合物の生産も確認中である。*in vitro* 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。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Hirose, Y., Watanabe, K., Minami, A., Nakamura, T., Oguri, H., Oikawa, H. Involvement of common intermediate L-3-hydroxyknyurenine in the chromophore biosynthesis of quinomycin family antibiotics. *J. Antibiot.*, in press.
2. Saruwatari, T., Praseuth, A. P., Sato, M., Torikai, K., Noguchi, H., Watanabe, K. A comprehensive overview on genomically directed assembly of aromatic polyketides and macrolide lactones using fungal megasynthases. *J. Antibiot.*, in press.
3. 渡辺賢二, 大栗博毅, 及川英秋, 生合成マシナリーを用いた抗腫瘍性物質生産の試み, バイオサイエンスとインダストリー, バイオインダストリー協会, 69, 26-30, 2011.
4. Matsuura, Y., Shichijo, Y., Minami, A., Migita, A., Oguri, H., Watanabe, M., Tokiwano, T., Watanabe, K., Oikawa, H. Intriguing substrate tolerance of epoxide hydrolase Lsd19 involved in biosynthesis of the ionophore antibiotic lasalocid A. *Org. Lett.*, 12, 2226-2229, 2010.
5. Koketsu, K., Oguri, H., Watanabe, K., Oikawa, H. Reconstruction of the saframycin core scaffold defines dual Pictet-Spengler mechanisms. *Nature Chemical Biology*, 6, 408-410, 2010.
6. Chino, A., Watanabe, K., Moriya, M. Plasmid construction using recombination activity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One*, 5, e9652, 2010.
7. Pickens, L. B., Wang, P., Zhou, H., Kim, W., Watanabe, K., Gomi, S., Tang, Y. Sequence and analysis of the SF2575 gene cluster and characterization of key tailoring enzyme. *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 17677-17689, 2009.
8. Watanabe, K., Hotta, K., Nakaya, M., Praseuth, A. P., Wang, C. C. C., Inada, D., Takahashi, K., Fukushi, F., Oguri, H., Oikawa, H. *Escherichia coli* allows efficient modular incorporation of newly isolated quinomycin biosynthetic enzyme into echinomycin biosynthetic pathway for rational design and synthesis of potent antibiotic unnatural natural product. *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 9347-9353, 2009.
9. Watanabe, K., Hotta, K., Praseuth, A. P., Searcey, M., Wang, C. C. C., Oguri, H., Oikawa, H. Rationally Engineered Total Biosynthesis of a Synthetic Analog of a Natural Quinomycin Depsipeptide in *Escherichia coli*. *ChemBioChem*, 10, 1965-1968, 2009.
10. Bok, J. W., Chiang, Y. M., Szewczyk, E., Reyes-Domingez, Y., Davidson, A. D., Sanchez, J. F., Lo, H. C., Watanabe, K., Strauss, J., Oakley, B. R., Wang, C. C. C., Keller, N. P. Chromatin-level regulation of biosynthetic gene clusters. *Nature Chemical Biology*, 5, 462-464, 2009.
11. Migita, A., Watanabe, M., Hirose, Y., Watanabe, K., Tokiwano, T., Kinashi, H., Oikawa, H. Identification of a gene cluster of polyether antibiotic lasalocid from *Streptomyces lasaliensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 169-176, 2009.
12. Watanabe, K., Oguri, H., Oikawa, H. Enzymatic synthesis of molecular skeletons of complex antitumor antibiotics with non-ribosomal peptide synthetases. *Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan*, 67, 1152-1160, 2009.

13. Watanabe, K., Oguri, H., Oikawa, H. Genetic indoctrination of *Escherichia coli* for innovative drug discovery by way of heterologous expression of the echinomycin biosynthetic pathway. *Current Opinion in Chemical Biology*, 13, 189-196, 2009.

〔学会発表〕（計 13 件）

1. 猿渡隆佳, 生合成遺伝子の発現による抗腫瘍活性物質サフラマイシンの効率的合成, 日本薬学会, 静岡市, 2011 年 3 月 29 日.
2. 石川格靖, スプライソソーム非依存型ゲノム DNA の発現によるポリケチド系天然物の新規探索法, 日本薬学会, 静岡市, 2011 年 3 月 29 日.
3. 大熊貴士, 酵母を宿主としたポリケチド合成システムの構築, 日本薬学会, 静岡市, 2011 年 3 月 29 日.
4. 猿渡隆佳, 生合成遺伝子の発現による抗腫瘍活性物質サフラマイシンの効率的合成, 日本農芸化学会, 京都市, 2011 年 3 月 27 日.
5. 石川格靖, スプライソソーム非依存型ゲノム DNA の発現によるポリケチド系天然物の新規探索法, 日本農芸化学会, 京都市, 2011 年 3 月 27 日.
6. 小林竜太, 酵母を宿主としたポリケチド合成システムの構築, 日本農芸化学会, 京都市, 2011 年 3 月 27 日.
7. 猿渡隆佳, スプライソソーム非依存型ゲノム DNA の発現によるポリケチド系天然物の新規探索法, 日本薬学会東海支部会, 静岡市, 2010 年 11 月 28 日.
8. 渡辺賢二「生合成遺伝子の発現による抗腫瘍性生理活性物質サフラマイシンの効率的合成」アステラス病態研究会, 経団連会館, 東京, 10/16/2010.
9. 渡辺賢二「天然物合成を指向した生合成遺伝子の異種発現によるシンセティックバイ

オロジーの確立」バイオインダストリー協会, パシフィコ横浜, 横浜, 9/29/2010.

10. 渡辺賢二, 合理的設計に基づく改変生合成遺伝子群を用いた非天然型生物活性環状デブシペプチドの合成, 生体触媒化学シンポジウム, 静岡市, 2010 年 9 月 24 日.
11. 猿渡隆佳, スプライソソーム非依存型ゲノム DNA の発現によるポリケチド系天然物の新規探索法, 生体触媒化学シンポジウム, 静岡市, 2010 年 9 月 24 日.
12. Kenji Watanabe, "Rational Design of Natural Products through Controlled Biosynthesis" 5th Japan-Korea Young Scientists Meeting on Bioorganic and Natural Products Chemistry, Shizuoka, JAPAN, 08/27-29/2009.
13. Kenji Watanabe, "Rational Design of Natural Products through Controlled Biosynthesis" Society for Industrial Microbiology, Annual meeting and exhibition 2009, Westin Harbour Castle Hotel, Toronto, ON, Canada, 07/26-30/2009.

〔図書〕（計 2 件）

1. 渡辺賢二, 大栗博毅, 及川英秋, 生合成酵素による天然物の全合成—抗腫瘍性物質エキノマイシンの合成を中心に—, 天然物全合成の最新動向; 北泰行監修; シーエムシー出版, 260-275, 2009.
2. Watanabe, K., Praseuth, A. P., Praseuth, M. B., Hotta, K. Assembling nonribosomal peptide gene cluster in a heterologous host. Complex enzymes: overview and peptides, edited by David Hopwood. *Methods in Enzymology*, 458, 379-99, 2009.

(d) 特許

〔産業財産権〕
○出願状況（計 1 件）

名称：カビ類ポリケチド合成遺伝子の酵母で
の異種発現

発明者：渡辺賢二、守屋央朗

権利者：静岡県立大学、岡山大学

種類：特許

番号：特願 2010-181279

出願年月日：平成 22 年 8 月 13 日

国内外の別：国内

○取得状況（計◇件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www015.upp.so-net.ne.jp/kenji55-lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 賢二 (WATANABE KENJI)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：50360938

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：