

研究区分	教員特別研究推進 地域振興
------	---------------

研究テーマ	近位依存性ビオチン標識法を活用した難発見二次代謝遺伝子の探索法の開発				
研究組織	代表者	所属・職名	薬学部・講師	氏名	岸本 真治
	研究分担者	所属・職名	徳島大学先端酵素学研究所 ・教授	氏名	小迫 英尊
		所属・職名	愛媛大学プロテオサイエンス センター・特定助教	氏名	山中 聡士
		所属・職名	愛媛大学プロテオサイエンス センター・教授	氏名	澤崎 達也
	発表者	所属・職名	薬学部・講師	氏名	岸本 真治

講演題目	近位依存性ビオチン標識法を活用した難発見二次代謝遺伝子の探索法の開発
研究の目的、成果及び今後の展望	<p>糸状菌は多様な二次代謝を行っており、ペニシリンやロバスタチンを代表とした薬や生理活性物質が多く見出されている。これら二次代謝物の生合成を担う遺伝子は一般的にゲノム中で同じ領域に存在して生合成遺伝子クラスター（BGC）を形成しており、近年のゲノム解読・解析技術の向上とともに多くのBGCが発見されてきた。しかし、世界中で研究が進むにつれて一つのBGCでは生合成が説明できない二次代謝物も多く発見された。一つのBGCで生合成が完結する場合は生合成経路の解析が容易である一方で、BGC外の遺伝子が必要とされる場合は当該遺伝子の発見が容易ではないため生合成経路の解析が困難になる。それゆえにこのようなBGC外の生合成遺伝子が発見するための方法が求められている。我々は生体内においてタンパク質の多くが関連タンパク質と相互作用していることに着目し、糸状菌内において二次代謝酵素の相互作用タンパク質を網羅的に解析することでBGC外の遺伝子にコードされた二次代謝酵素を発見できると考え、その方法を開発することを目指した。</p> <p>相互作用タンパク質の検出手段として着目したのが近位依存性ビオチン標識法である。本方法は近年開発された選択性の高いビオチン化酵素であるAirIDを目的タンパク質に融合させて発現させ、近傍に存在する（＝相互作用する）タンパク質をビオチン標識することで検出する方法である。様々な生物種で適用されつつあったが糸状菌での実施例がなかったため、まず糸状菌での条件検討を行った。様々なタンパク質との相互作用が報告されているGrxDというタンパク質であるALT_3599にAirIDを融合させた融合タンパク質を糸状菌 <i>Aspergillus lentulus</i> 中で発現させ、集菌後に菌体を破碎してバッファー中で懸濁させることで粗タンパク質を取得した。これをトリプシン消化してストレプトアビジンカラムで精製しビオチン標識ペプチドを解析した結果、既報の相互作用タンパク質を複数検出することに成功した。このことから <i>A. lentulus</i> においても近位依存性ビオチン標識法が適用可能なことが明らかとなった。続いて二次代謝酵素の相互作用タンパク質が検出可能か調べるべく、ALT_3599-AirID 融合タンパク質を発現させビオチン標識タンパク質を網羅的に検出した。するとALT_3599-AirID 融合タンパク質の発現時には検出されなかったタンパク質が検出された。本タンパク質の機能について現在検討を進めている。</p>