

課題番号	GS006
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成 24 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	放線菌の潜在能力の発掘・活用による有用物質の微生物生産に向けた基盤研究
研究機関・ 部局・職名	東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
氏名	大西 康夫

1. 当該年度の研究目的

本研究課題では、医薬品や高分子原料などの有用物質の微生物生産におけるグリーンイノベーション、つまり化学プロセスのバイオ化や新規化合物の微生物創製に関する革新的シーズの創出を目的に、「(A) ユニークな反応を触媒できる生合成酵素の取得と物質生産への応用」と「(B) 放線菌の物質生産能を活用するための遺伝子発現制御システムの解明」を2本柱として、放線菌の潜在能力を発掘・活用するための基盤研究を行う。(A)では、ユニークな化学構造をもつ化合物の生合成研究およびゲノム情報を利用した酵素の探索という2つのアプローチから新規反応を触媒する酵素の取得を目指す。平成24年度においては、前年度に引き続いて、ベンザスタチン類、ポリケチド化合物、非リボゾーム型ペプチド化合物等の二次代謝産物の生合成遺伝子群の取得・解析、およびテルペン環化酵素、P450モノオキシゲナーゼ等の酵素の機能解析を行う。(B)では、代表的な *Streptomyces* 属放線菌である *Streptomyces griseus* および希少放線菌としてユニークな性質を有する *Actinoplanes missouriensis* の2つの種の放線菌を対象とし、グローバルな制御因子による制御ネットワークの全体像の把握および個別のユニークな遺伝子発現制御機構の解明を目指す。平成24年度においては、新規 ECF シグマ因子による主要シグマ因子の遺伝子発現制御、グリキサゾン生合成遺伝子群制御における新規制御タンパク質の機能解析など、*S. griseus* における個別の制御系の解析をさらに進めるとともに、*A. missouriensis* の運動性胞子の運動性や走化性に関する生化学的・遺伝学的解析や孢子嚢形成や発芽に関わる遺伝子発現制御機構の解析を引き続き行う。

2. 研究の実施状況

主な研究結果を以下に記す。

(A) 生合成研究

- ・ユニークな化学構造をもつ4つの新規化合物に関して、種々の実験より、その生合成経路・酵素を大筋で明らかにした。
- ・放線菌ゲノムより見出した新規なセスキテルペンを合成する酵素について、その触媒機能の詳細を解明した。
- ・*S. griseus* の27種のP450モノオキシゲナーゼについて、新たな系で基質スクリーニングを行ったが、すでに触媒反応を明らかにした3つ以外の酵素については、変換反応を見いだせなかった。一方、別の放線菌由来の3種のP450モノオキシゲナーゼについて解析を開始し、そのうちの1つが極めてユニークな反

応を触媒することを明らかにした。

(B) 遺伝子発現制御

【*S. griseus*】

・個別の制御系の解析では、新規 ECF シグマ因子による主要シグマ遺伝子の制御に関する解析を完了し論文発表した。また、グリキサゾン生合成における抗転写活性化因子 GriU の機能解析を進め、GriU が転写活性化因子 GriR の RNA ポリメラーゼリクルート能の阻害していることを示す結果を得た。一方、グリキサゾン過剰生産自然変異株のゲノム解析を足掛かりにして、二次代謝と形態分化に關与する新規遺伝子を同定した。

【*A. missouriensis*】

・孢子囊中での不適切な孢子発芽の抑制に關与するマルチドメイン型センサーヒスチジンキナーゼ (HhkA) およびべん毛遺伝子クラスターにコードされる二成分制御系応答制御因子 (TcrA) について、リン酸リレーの可能性を多方面から探究したが、これを示す結果は得られなかった。一方、TcrA がべん毛遺伝子群の、ある転写単位のプロモーター上流に結合することを試験管内実験で示した。  
 ・変異株の解析を足掛かりにして、発芽孢子のべん毛の回転を停止させる機能をもつ遺伝子を同定していたが、この遺伝子の過剰発現により、孢子の運動性が完全に失われることを明らかにした。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 8 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 6 件                  (1) A. Higo, H. Hara, S. Horinouchi, Y. Ohnishi*. Genome-wide distribution of AdpA, a global regulator for secondary metabolism and morphological differentiation in <i>Streptomyces</i>, revealed the extent and complexity of the AdpA regulatory network. <i>DNA Res.</i>, 19 (3), 259-273. (Jun, 2012)                  (2) J. W. Ginsbach, M. T. Kieber-Emmons, R. Nomoto, A. Noguchi, Y. Ohnishi*, E. I. Solomon*. Structure/function correlations among coupled binuclear copper proteins through spectroscopic and reactivity studies of NspF. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i>, 109 (27), 10793-10797. (Jul, 2012)                  (3) R. Nomoto, T. Tezuka, K.-I. Miyazono, M. Tanokura, S. Horinouchi, Y. Ohnishi*. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of SGR6054, a <i>Streptomyces</i> homologue of the mycobacterial integration host factor mIHF. <i>Acta Crystallogr. Sect. F</i>, 68 (Pt 9), 1085-1088. (Aug, 2012)                  (4) C. Nakano, T. Tezuka, S. Horinouchi, Y. Ohnishi*. Identification of the SGR6065 gene product as a sesquiterpene cyclase involved in (+)-epicubenol biosynthesis in <i>Streptomyces griseus</i>. <i>J. Antibiot.</i>, 65 (11), 551-558. (Nov, 2012)                  (5) G. Akanuma, H. Nanamiya, Y. Mouri, M. Ishizuka, Y. Ohnishi*. Proteomic analysis of the <i>Streptomyces griseus</i> ribosomal fraction. <i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i>, 76 (12), 2267-2274. (Dec, 2012)                  (6) H. Otani, A. Higo, H. Nanamiya, S. Horinouchi, Y. Ohnishi*. An alternative sigma factor governs the principal sigma factor in <i>Streptomyces griseus</i>. <i>Mol. Microbiol.</i>, 87 (6), 1223-1236. (Mar, 2013)</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 1 件                  (1) Y. Katsuyama, Y. Ohnishi*. Type III polyketide synthases in microorganisms. <i>Methods Enzymol.</i>, 515, 359-377. (Oct, 2012)</p> <p>(未掲載) 計 1 件                  (1) T. Awakawa, Y. Sugai, K. Otsutomo, S. Ren, S. Masuda, Y. Katsuyama, S. Horinouchi, Y. Ohnishi*. 4-Hydroxy-3-methyl-6-(1-methyl-2-oxoalkyl)pyran-2-one synthesis by a type III polyketide synthase from <i>Rhodospirillum centenum</i>. <i>Chembiochem</i> [accepted for publication on Mar, 2013]</p>
<p>会議発表 計 27 件</p>	<p>専門家向け 計 27 件                  (1) 6th Japan-Finland Biotechnology Symposium (Sendai)                  □"Analysis of <i>Streptomyces griseus</i> transcriptome using a next generation sequencer" □Takeaki Tezuka, Yasuo Ohnishi (口頭発表) (2012年6月6日)                  (2) The International Conference of Natural Product Biosynthesis (8th US-Japan Seminar) (Awaji Shima)</p>

- "Structural and biochemical insight into the mechanism for decarboxylative condensation of beta-keto acid catalyzed by curcumin synthase" □Yohei Katsuyama, Ken-ichi Miyazono, Masaru Tanokura, Yasuo Ohnishi, Sueharu Horinouchi (ポスター発表) (2012年6月18日)
- (3) 【同上】 "Biosynthesis of ferroverdin in *Streptomyces* sp. WK-5344" □Yasuo Ohnishi (口頭発表) (2012年6月21日)
- (4) 2012 International Symposium of the Korean Society for Microbiology and Biotechnology (Busan, Korea)  
□"An alternative sigma factor governs the principal sigma factor throughout growth in *Streptomyces griseus*"  
□Yasuo Ohnishi (口頭発表) (2012年6月27日)
- (5) 理研 第39回「ケミカルバイオロジー研究領域」勉強会 (和光)  
「微生物ホルモンのケミカルバイオロジー」 大西康夫 (2012年7月18日)
- (6) 2012年度 日本放線菌学会大会 (東京)  
「新規ナフトキノン化合物 JBIR-85 の単離、構造決定および生合成に関する研究」 泉川美穂、本橋慶一郎、佐藤龍太郎、永井文、大西康夫、高木基樹、新家一男 (ポスター発表) (2012年9月7日)
- (7) 【同上】 「光合成細菌由来 III 型ポリケタイド合成酵素の in vitro 反応生成物の構造解析」 ○菅井佳宣、淡川孝義、勝山陽平、大西康夫 (ポスター発表) (2012年9月7日)
- (8) 【同上】 「*Streptomyces coelicolor* A3(2) の二次代謝制御因子 AfsR における被リン酸化部位の解析」 辛利弥、田中晶子、堀之内末治、大西康夫 (口頭発表) (2012年9月7日)
- (9) 【同上】 「*Streptomyces* sp. RI-18 由来 benzastatin 類の生合成酵素の解析」 ○林 貴之、高木基樹、新家一男、大西康夫 (口頭発表) (2012年9月7日)
- (10) 【同上】 「*Streptomyces griseus* におけるストレプトマイシン分泌装置 StrVW の機能解析」 七宮英晃、毛利佳弘、大西康夫 (口頭発表) (2012年9月7日)
- (11) 第11回 微生物研究会 (東京)  
「*Streptomyces coelicolor* A3(2) の二次代謝制御因子 AfsR における被リン酸化部位の解析」 辛利弥、田中晶子、堀之内末治、大西康夫 (ポスター発表) (2012年9月22日)
- (12) 【同上】 「*Streptomyces griseus* におけるストレプトマイシン分泌装置 StrVW の機能解析」 七宮英晃、毛利佳弘、大西康夫 (ポスター発表) (2012)
- (13) 日本ゲノム微生物学会 若手の会 (静岡)  
「*Streptomyces coelicolor* A3(2) の二次代謝制御因子 AfsR における被リン酸化部位の解析」 辛利弥、田中晶子、堀之内末治、大西康夫 (口頭発表) (2012年9月27日)
- (14) 酵素工学研究会 第68回講演会 (東京)  
「シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ CYP154C3 を利用した 16 $\alpha$ -ヒドロキシステロイドの合成」 牧野拓也、音松俊彦、原田尚志、三沢典彦、大西康夫 (ポスター発表) (2012年10月5日)
- (15) 13th Swiss-Japanese Conference on Biotechnology and Bioprocess Engineering (Walzenhausen, Switzerland)  
□"Biosynthetic pathway for ferroverdin A, an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein, in *Streptomyces* sp. WK-5344" □Yasuo Ohnishi (口頭発表) (2012年11月6日)
- (16) 大村智先生・別府輝彦先生の文化功労者顕彰を祝賀する記念シンポジウム (東京)  
「ストレプトマイシン生産菌の黄色色素に導かれて」 大西康夫 (口頭発表) (2013年3月4日)
- (17) 第7回 日本ゲノム微生物学会年会 (長浜)  
「希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の遊走胞子走化性アッセイ系の構築」 手塚武揚、木村知宏、Moon-Sun Jang、大西康夫 (ポスター発表) (2013年3月9日)
- (18) 2013年度 日本農芸化学学会大会 (仙台)  
「希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* が生産する芳香族ポリケチドの単離と構造決定」 勝山陽平、佐藤啓、大西康夫 (口頭発表) (2013年3月25日)
- (19) 【同上】 「*Streptomyces griseus* では grixazone 生合成遺伝子群によって viridomycin A も生合成される」 勝山陽平、胡 韋、中村一成、大西康夫 (口頭発表) (2013年3月25日)
- (20) 【同上】 「放線菌 *Streptomyces* sp. JE-08 由来 JBIR-70 の生合成遺伝子クラスターの同定」 大野翔登、勝山陽平、泉川美穂、林貴之、高木基樹、新家一男、大西康夫 (口頭発表) (2013年3月25日)
- (21) 【同上】 「放線菌の転写調節因子 AdpA と DNA の相互作用および立体構造解析」 姚 明東、大塚淳、宮園健一、永田宏次、堀之内末治、大西康夫、田之倉優 (口頭発表) (2013年3月25日)
- (22) 【同上】 「放線菌 *Streptomyces griseus* 由来非特異的 DNA 結合タンパク質 SGR6054 の機能解析」 手塚武揚、野本竜平、木村知宏、山本祐梨子、宮川拓也、宮園健一、田之倉優、堀之内末治、大西康夫 (口頭発表) (2013年3月25日)
- (23) 【同上】 「希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の二成分制御系レスポンスレギュレーター TerA の機能解析」 毛利佳弘、張 文スン、小西健司、手塚武揚、平田愛子、藤田信之、早川正幸、大

様式19 別紙1

	<p>西康夫（口頭発表）（2013年3月25日）</p> <p>(24) 【同上】「放線菌 <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)におけるリン酸化模倣変異型 AfsR の機能解析」 辛 利弥、大西康夫（口頭発表）（2013年3月25日）</p> <p>(25) 【同上】「自然変異株のゲノム解析に基づいた放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> の二次代謝に影響を与える遺伝子の探索」 中村一成、志波優、手塚武揚、吉川博文、大西康夫（口頭発表）（2013年3月27日）</p> <p>(26) 【同上】「放線菌ゲノムアノテーションプラットフォームの構築とリファレンス情報の統合」 藤澤貴智、照井敬子、桧原直子、山田佐知子、石井英治、加藤香奈、手塚武揚、大西康夫、神沼英里、岡本忍、黒川顕、中村保一（口頭発表）（2013年3月27日）</p> <p>(27) 【同上】「組換え微生物を利用した新規物質創製」 勝山 陽平、大西 康夫（口頭発表）（2013年3月27日）</p> <p>一般向け 計0件</p>
<p>図 書</p> <p>計1件</p>	<p>(1) 手塚武揚、大西康夫 放線菌の二次代謝産物生産を誘導する微生物ホルモン 『微生物を活用した新世代の有用物質生産技術』 CMC 出版（2012年9月）</p>
<p>産業財産権 出願・取得状 況</p> <p>計0件</p>	<p>（取得済み）計0件</p> <p>（出願中）計0件</p>
<p>Webページ （URL）</p>	
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>(1) 高校での特別講義 2012年11月10日 初芝富田林高等学校（大阪府）において、特別講義『微生物を生産工場とした新しい「ものづくり」』を実施した。参加学生：約30名</p> <p>(2) 中学生・高校生の研究室訪問 2012年6月2日 初芝富田林高等学校・中学校の生徒（中学3年生、高校1、2年生）43名に対して、模擬授業を行うとともに、研究室見学会を開催した。</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計0件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

特になし。

実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されません

1. 助成金の受領状況(累計) (単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の累計)	③当該年度受領額	④(=①-②-③)未受領額	既返還額(前年度迄の累計)
直接経費	126,000,000	65,430,000	35,490,000	25,080,000	0
間接経費	37,800,000	19,629,000	10,647,000	7,524,000	0
合計	163,800,000	85,059,000	46,137,000	32,604,000	0

2. 当該年度の収支状況 (単位:円)

	①前年度未執行額	②当該年度受領額	③当該年度受取利息等額 (未収利息を除く)	④(=①+②+③)当該年度合計収入	⑤当該年度執行額	⑥(=④-⑤)当該年度未執行額	当該年度返還額
直接経費	14,446,500	35,490,000	0	49,936,500	46,462,474	3,474,026	0
間接経費	19,629,000	10,647,000		30,276,000	9,814,500	20,461,500	
合計	34,075,500	46,137,000	0	80,212,500	56,276,974	23,935,526	0

3. 当該年度の執行額内訳 (単位:円)

	金額	備考
物品費	21,270,082	実験試薬、プラスチック器具等
旅費	1,218,750	研究成果発表旅費(13th Swiss Japanese Conference on Biotechnology and Bioprocess Engineering等)
謝金・人件費等	21,714,112	博士課程研究員人件費、事務補佐員人件費
その他	2,259,530	スポット解析(DNAシーケンス)、英文校閲など
直接経費計	46,462,474	
間接経費計	9,814,500	
合計	56,276,974	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関名
				0		
				0		
				0		