

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25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25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、3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸由来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、self-sufficient型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25年度においては、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孢子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

本年度の主要な研究成果を以下に記す。

(A) 生合成研究

- ・非リボゾーム型ペプチド化合物 JBIR-34/35 に関して、メチルオキサゾリン環の生合成機構を世界に先駆けて明らかにするとともに、全生合成経路をほぼ解明した。
- ・3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸由来の化合物 cremeomycin に関して、生合成遺伝子群の解析が大きく進展した。
- ・*Streptomyces* 属放線菌の新規P450モノオキシゲナーゼが、これまでに報告のない極めてユニークな反応を触媒することを明らかにした。また、本酵素を有用物質生産に応用するための検討を行った。

様式19 別紙1

(B) 遺伝子発現制御

【*S. griseus*】

- ・グリシンリボスイッチによるグリシン分解酵素遺伝子の転写制御に関する解析を完了し論文発表した。
- ・グリキサゾン過剰生産自然変異株のゲノム解析から見出した、二次代謝と形態分化に関与する膜タンパク質に関する解析を進め、保存性の高い膜貫通領域がその活性に重要であることを示した。

【*A. missouriensis*】

- ・胞子嚢中での不適切な胞子発芽の抑制に関与する、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) に関して、各遺伝子破壊株および野生株の経時的トランスクリプトーム解析を行い、両制御因子の機能解明への大きな足掛かりを得た。
- ・トラッキング顕微鏡を用いた解析により、運動性胞子の運動について詳細な解析を行った。また、この系を走化性解析に応用することを検討した。
- ・胞子嚢開裂がプロテアーゼ阻害剤や翻訳・転写阻害剤によって阻害されることを明らかにした。
- ・胞子嚢形成時に特異的に転写活性化される遺伝子群の網羅的遺伝子破壊実験を開始した。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 6 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 5 件</p> <p>(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>. ChemBiochem, 14 (8), 1006-1013. (May, 2013)</p> <p>(2) M. D. Yao, J. Ohtsuka, K. Nagata, K.-I. Miyazono, Y. Zhi, Y. Ohnishi, M. Tanokura*. □Complex structure of the DNA-binding domain of AdpA, the global transcription factor in <i>Streptomyces griseus</i>, and a target duplex DNA reveals the structural basis of its tolerant DNA sequence specificity. J. Biol. Chem., 288 (43), 31019-31029. (Oct, 2013)</p> <p>(3) R. Satou, A. Miyanaga, H. Ozawa, N. Funa, Y. Katsuyama, K.-I. Miyazono, M. Tanokura, Y. Ohnishi*, S. Horinouchi. □Structural basis for cyclization specificity of two <i>Azotobacter</i> type III polyketide synthases: a single amino acid substitution reverses their cyclization specificity. J. Biol. Chem., 288 (47), 34146-34157. (Nov, 2013)</p> <p>(4) T. Makino, Y. Katsuyama, T. Otomatsu, N. Misawa, Y. Ohnishi*. □Regio- and stereo-specific hydroxylation of various steroids at the 16α position of the D-ring by the <i>Streptomyces griseus</i> cytochrome P450 CYP154C3. Appl. Environ. Microbiol., 80 (4), 1371-1379. (Feb, 2014)</p> <p>(5) R. Satou, M. Izumikawa, Y. Katsuyama, M. Matsui, M. Takagi, K. Shin-ya*, Y. Ohnishi*. □Isolation, structural elucidation and biosynthesis of 3-hydroxy-6-dimethylallylindolin-2-one, a novel prenylated indole derivative from <i>Actinoplanes missouriensis</i>. J. Antibiot., 67 (3), 231-236. (Mar, 2014)</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 1 件 査読有り</p> <p>(6) T. Tezuka, Y. Ohnishi*. Two glycine riboswitches activate the glycine cleavage system essential for glycine detoxification in <i>Streptomyces griseus</i>. J. Bacteriol., 196 (7), 1369-1376. (Apr, 2014)</p>
<p>会議発表 計 24 件</p>	<p>専門家向け 計 22 件</p> <p>(1) First China-Europe Symposium “The Biology of Actinomycete Antibiotic Production” (Beijing, China) □“Regulation of grixazone biosynthesis in <i>Streptomyces griseus</i>” □Yasuo Ohnishi (口頭発表) (2013 年 4 月 10 日)</p> <p>(2) 第 1 3 回東京大学生命科学シンポジウム ポスターセッション (東京) 「希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> の二成分制御系レスポンスレギュレーター TcrA 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、大西康夫 (2013 年 6 月 8 日)</p>

- (3) 【同上】「希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の遊走胞子走化性アッセイの構築」 ○木村知宏、手塚武揚、張文スン、大西康夫 (2013年6月8日)
- (4) 2013年度 日本放線菌学会大会 (広島)
「Glycine cleavage system 構成遺伝子群の転写を活性化するグリシンリボスイッチはグリシン存在下での *Streptomyces griseus* の生育に必須である」 ○手塚武揚、大西康夫 (ポスター発表) (2013年9月5日)
- (5) 【同上】「放線菌 *Streptomyces* sp. JE-08 由来 JBIR-70 の生合成経路に関する解析」 ○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 (ポスター発表) (2013年9月5日)
- (6) 【同上】「希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* 運動性胞子のトラッキング顕微鏡観察」 ○木村知宏、手塚武揚、中村周吾、奥寛雅、大西康夫 (口頭発表 + ポスター発表) (2013年9月6日)
- (7) 【同上】「ジアゾ基含有化合物 cremeomycin の生合成研究」 ○菅井佳宣、勝山陽平、大西康夫 (口頭発表) (2013年9月6日)
- (8) 【同上】「非リボソームペプチド JBIR-34, JBIR-35 の生合成」 ○勝山陽平、アデリンムリアンディ、曾根薫、泉川美穂、守屋智博、小曾根郁子、橋本絢子、高木基樹、新家一男、大西康夫 (ポスター発表) (2013年9月6日)
- (9) 【同上】「*Actinoplanes missouriensis* の胞子特異的タンパク質 hybrid histidine kinase HhkA の解析」 ○毛利佳弘、小西健司、藤田梓、手塚武揚、平田愛子、藤田信之、早川正幸、大西康夫 (ポスター発表) (2013年9月6日)
- (10) 平成25年度 グラム陽性菌ゲノム機能会議 (筑波)
「Glycine cleavage system 構成遺伝子群の転写を活性化するグリシンリボスイッチはグリシン存在下での *Streptomyces griseus* の生育に必須である」 ○手塚武揚、大西康夫 (口頭発表) (2013年9月7日)
- (11) JBA 発酵と代謝研究会シンポジウム「放線菌によるヒト・動物医薬と農薬への貢献 (探索と選抜、機能解析から新規開拓へ)」 (東京)
「希少放線菌の分子生物学事始め」 大西康夫 (2013年9月11日)
- (12) 1st European Conference on Natural Products (Frankfurt, Germany)
□“Biosynthesis of JBIR-34, 35, nonribosomal peptides containing unusual methyloxazoline group” □○ Yohei Katsuyama, Adeline Muliandi, Miho Izumikawa, Tomohiro Moriya, Ikuko Kozone, Junko Hashimoto, Motoki Takagi, Kazuo Shin-ya, Yasuo Ohnishi (ポスター発表) (2013年9月23日)
- (13) Enzyme Engineering XXII: Emerging Topics in Enzyme Engineering (An ECI Conference Series) (Toyama)
□“Coupled binuclear copper enzymes involved in the secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces*” □Yasuo Ohnishi (口頭発表) (2013年9月25日)
- (14) 第12回 微生物研究会 (東京)
「希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子囊からの運動性胞子の泳ぎ出しは翻訳を阻害する抗生物質とプロテアーゼ阻害剤により阻害される」 手塚武揚、○安田理沙、大西康夫 (ポスター発表) (2013年10月5日)
- (15) 【同上】「自然変異株のゲノム解析から発見した *Streptomyces griseus* の二次代謝に影響を与える遺伝子 *SGR1728* の機能解析」 手塚武揚、○平松秀基、中村一成、志波優、吉川博文、大西康夫 (ポスター発表) (2013年10月5日)
- (16) 第8回日本ゲノム微生物学会 (東京)
「*Streptomyces griseus* 由来 small RNA の過剰発現は異種 *Streptomyces* 属放線菌の増殖の低下、形態分化の抑制二次代謝の活性化を引き起こす」 ○手塚武揚、大西康夫 (ポスター発表) (2014年3月9日)
- (17) 2014年度 日本農芸化学会大会 (東京)
「Glycine cleavage system 構成遺伝子群の転写を活性化するグリシンリボスイッチはグリシン存在下での *Streptomyces griseus* の生育に必須である」 ○手塚武揚、大西康夫 (口頭発表) (2014年3月28日)
- (18) 【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 TcrA のターゲット遺伝子探索」 ○毛利佳弘、手塚武揚、大西康夫 (口頭発表) (2014年3月28日)
- (19) 【同上】「*Streptomyces* sp. RI-77 由来フラノナフトキノンを骨格を持つポリケタイド JBIR-76, 77 の生合成」 ○曾根薫、佐藤龍太郎、勝山陽平、泉川美穂、新家一男、大西康夫 (口頭発表) (2014年3月28日)
- (20) 【同上】「希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子囊開裂時に翻訳されるタンパク質及び胞子囊構成成分のプロテオーム解析」 手塚武揚、○安田理沙、大西康夫 (口頭発表) (2014年3月28日)
- (21) 【同上】「*Streptomyces griseus* の黄色色素生産を制御する機能未知タンパク質 SGR1728 に関す

様式19 別紙1

	<p>る解析」手塚武揚、○平松秀基、中村一成、志波優、吉川博文、大西康夫（口頭発表）（2014年3月28日）</p> <p>(22) 【同上】「放線菌 <i>Streptomyces</i> における <i>afsS</i> 遺伝子座の機能解析」辛利弥、大西康夫（口頭発表）（2014年3月29日）</p> <p>一般向け 計2件</p> <p>(1) NC-CARP 産学連携コンソーシアム第1回バイオリファイナリー研究会（東京） 「有用低分子化合物を生産する微生物を創る」 大西康夫（2013年6月23日）</p> <p>(2) 第961回生物科学セミナー（東京大学大学院理学系研究科）（東京） 「微生物を用いた有用物質生産を目指して」大西康夫（2013年10月2日）</p>
図書 計1件	<p>(1) T. Tezuka, Y. Ohnishi. □Chapter 16 (pp. 179-190): Microbial Hormones as a Master Switch for Secondary Metabolism in <i>Streptomyces</i>. □Microbial Production From Genome Design to Cell Engineering, Editors: H. Anazawa and S. Shimizu, Springer, 306 pages. (2014)</p>
産業財産権 出願・取得状況 計0件	<p>（取得済み）計0件</p> <p>（出願中）計0件</p>
Webページ (URL)	なし
国民との科学・技術対話の実施状況	<p>(1) 高校生へのショートレクチャーと研究室見学会 2013年8月6日 大阪府立天王寺高校の生徒43名に「微生物を生産工場とした有用物質生産」に関するショートレクチャーを実施した後、研究室見学会を行った。</p> <p>(2) 高校生への講義配信 2013年12月9日 東京大学文学部朝日講座「境界線をめぐる旅-ヒト・家族・社会から領土・国家・宇宙まで」において、「人類に役立つ微生物たち いろいろな境界線から微生物を語る」と題した講義を行った。この講義は協定を結んだ高校(10校程度)にリアルタイムで配信された。</p>
新聞・一般雑誌等掲載 計1件	<p>科学新聞2014年1月1日(6)「第10回日本学術振興会賞に25氏」 「細胞分化制御機構研究を進展・大西康夫」</p>
その他	なし

4. その他特記事項

2014年2月 日本学術振興会賞受賞 「放線菌の遺伝子発現制御機構と二次代謝産物生合成に関する研究」

実施状況報告書(平成25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	100,920,000	25,080,000	0	0
間接経費	37,800,000	30,276,000	7,524,000	0	0
合計	163,800,000	131,196,000	32,604,000	0	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	3,474,026	25,080,000	0	28,554,026	28,554,026	0	0
間接経費	20,461,500	7,524,000	0	27,985,500	27,985,500	0	0
合計	23,935,526	32,604,000	0	56,539,526	56,539,526	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	17,176,943	実験試薬、プラスチック器具等
旅費	986,460	研究成果発表旅費(1st China-Europe Symposium "The Biology of Actinomycete Antibiotic Production"等)
謝金・人件費等	7,215,919	博士課程研究員人件費
その他	3,174,704	スポット解析(DNAシーケンス)、英文校閲など
直接経費計	28,554,026	
間接経費計	27,985,500	
合計	56,539,526	

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
クリーンベンチ	十慈 NS-8BS	1	719,250	719,250	2013/4/15	東京大学
超音波ホモジナイ ザー	ワケンビーテック Q500	1	687,120	687,120	2013/8/7	東京大学
高速液体クロマトグ ラフイー	島津製作所 HPLCシステム	1	2,445,476	2,445,476	2013/12/9	東京大学