

|      |       |
|------|-------|
| 課題番号 | LS028 |
|------|-------|

**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 23 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

|            |                                        |
|------------|----------------------------------------|
| 研究課題名      | 生合成工学を駆使した抗インフルエンザウイルス活性物質と抗結核菌活性物質の生産 |
| 研究機関・部局・職名 | 東京大学・生物生産工学研究センター・准教授                  |
| 氏名         | 葛山智久                                   |

1. 当該年度の研究目的

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(1) 抗インフルエンザウイルス活性物質 <b>wickerol</b> の生合成遺伝子クラスターのクローニング<br/>wickerol 生産菌の <i>Trichoderma atroviride</i> FKI-3737 から wickerol 生産に必須な wickerol 生合成遺伝子群の取得を行う。</p> <p>(2) 抗結核菌活性物質 <b>caprazamycin</b> 生合成遺伝子遺伝子の機能解析<br/>caprazamycin 生産菌 <i>Streptomyces</i> sp MK730-62F2 のゲノムを改変することで、caprazol または caprazen を生産する組換え体を作成するため、その形質転換のための条件検討と、caprazamycin 生合成遺伝子 (caprazamycin 生合成に関与するエステル化酵素) の機能を解析する。</p> <p>(3) 微生物ゲノムのドラフトシーケンスとアノテーション<br/>放線菌やこれまでゲノム解析が行われた例がない新種の好熱菌を中心に15株程度の微生物ゲノムのドラフトシーケンスとアノテーションを行う。</p> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

2. 研究の実施状況

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(1) 抗インフルエンザウイルス活性物質 <b>wickerol</b> の生合成遺伝子クラスターのクローニング<br/>wickerol 生産菌の <i>Trichoderma atroviride</i> FKI-3737 のドラフトゲノムシーケンス解析を行った。そのゲノムのサイズは約 37 Mb であった。次いで、そのゲノム配列から wickerol 生産に必須な wickerol 生合成遺伝子 (ジテルペン環化酵素遺伝子) の候補を5つ得ることができ、それら5つの遺伝子の機能解析を試験管内反応を利用することで開始した。</p> <p>(2) 抗結核菌活性物質 <b>caprazamycin</b> 生合成遺伝子遺伝子の機能解析<br/>caprazamycin 生産菌 <i>Streptomyces</i> sp MK730-62F2 のゲノム配列から、caprazamycin の生合成に関与する遺伝子群を同定するとともに、本生産菌の形質転換系の方法を確立した。次いで、MK730-62F2 のゲノム配列の中から、caprazamycin 生合成酵素に関与すると考えられるエステル化酵素遺伝子を同定し、さらにその遺伝子を破壊することに成功した。その破壊株は、目的の caprazol を生産していることが確認できた。</p> <p>(3) 微生物ゲノムのドラフトシーケンスとアノテーション<br/>当初の予定通り、放線菌やこれまでゲノム解析が行われた例がない新種の好熱菌を中心に15株の微生物ゲノムのドラフトシーケンスとアノテーションを行った。また、これらのゲノム配列を精査することで、新規と考えられる生物活性物質の生合成遺伝子群を見出した。さらには、これらの微生物のコスミドライブラリーを作製し、異種放線菌に導入することで、抗菌活性や除草活性を示す複数の有用化合物の異種生産を確認することができた。</p> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

3. 研究発表等

|                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>雑誌論文<br/>計 2 件</p>  | <p>(掲載済み一査読有り) 計 2 件<br/>           1. Dairi Tohru, Kuzuyama Tomohisa, Nishiyama Makoto, Fujii Isao. 2011. Convergent strategies in biosynthesis. <i>Nat. Prod. Rep.</i> 28: 1054-1086.<br/><br/>           2. Kuzuyama Tomohisa, Seto Haruo. 2012. Two distinct pathways for essential metabolic precursors for isoprenoid biosynthesis. <i>Proceeding of Japan Academy, Series B, Physical and Biological Sciences.</i> 88: 41-52.<br/><br/>           (掲載済み一査読無し) 計 0 件<br/><br/>           (未掲載) 計 0 件</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <p>会議発表<br/>計 16 件</p> | <p>専門家向け 計 16 件<br/>           1. 葛山智久、微生物テルペノイドの生合成マシナリー、北里大学生命科学研究所、6/24、KMC フロンティアセミナー、北里大学<br/>           2. Tomohisa Kuzuyama, Structural basis for the regio- and stereo-specific diterpene cyclization cascade in cyclooctatin biosynthesis, 9/7, IUMS symposium, IUMS<br/>           3. Tomohisa Kuzuyama, Novel acetoacetyl-coenzyme A synthesizing enzyme of the thiolase superfamily involved in the mevalonate pathway, Sapporo Convention Center, 9/8, IUMS conference, IUMS<br/>           4. Taro Ozaki, Makoto Nishiyama, Tomohisa Kuzuyama. Functional characterization of Streptomyces ABBA prenyltransferases involved in the biosyntheses of novobiocin and prenylated indoles, Sapporo Convention Center, 9/8, IUMS meeting, IUMS<br/>           5. Ayuko Meguro, Makoto Nishiyama, Tomohisa Kuzuyama. Functional characterization of diterpene cyclases found in Streptomyces genomes, Sapporo Convention Center, 9/8, IUMS conference, IUMS<br/>           6. 葛山智久、微生物の多様なイソプレノイド生合成機構、高知大学農学部、9/14、高知大学セミナー、高知大学<br/>           7. Tomohisa Kuzuyama, Novel acetoacetyl-coenzyme A synthesizing enzyme for terpenoid production, Sant Feliu de Guixols, Spain, 10/4, ESF-EMBO Symposium on Synthetic Biology of Antibiotic Production<br/>           8. 葛山智久、放線菌由来ジテルペン環化酵素の結晶構造と反応機構、宇奈月国際会館セレネ、11/11、北陸三県合同バイオテクノロジーシンポジウム、富山県立大学<br/>           9. Tomohisa Kuzuyama, Structure and Mechanism of the Diterpene Cyclase CotB2 from Cyclooctatin-producing Streptomyces melanosporofaciens, Puerto Vallarta, Mexico, 12/15, ISBA<br/>           10. 目黒亜由子、西山真、葛山智久、放線菌由来新規ジテルペン環化酵素の機能解析、東京大学農学部、12/3、新学術領域「生合成マシナリー」第3回公開シンポジウム<br/>           11. 目黒亜由子、西山真、葛山智久、放線菌由来ジテルペン環化酵素の環化反応メカニズムの解析、東工大理工学部、12/28、新学術領域「生合成マシナリー」若手勉強会<br/>           12. Noboru Hiro, Masayuki Igarashi, Tomohisa Kuzuyama, Makoto Nishiyama. Functional analysis of Cpz23 in the biosynthesis of a nucleoside antibiotic caprazamycin、京都女子大、3/23、日本農芸化学会 2012 年度大会<br/>           13. Taro Ozaki, Tomohisa Kuzuyama, Makoto Nishiyama. Identification of N-prenyltransferase in lavanducyanin biosynthesis、京都女子大、3/23、日本農芸化学会 2012 年度大会<br/>           14. Ayuko Meguro, Haruo Ikeda, Satoshi Omura, Tomohisa Kuzuyama, Makoto Nishiyama. Functional characterization of diterpene cyclases found in Streptomyces genomes、京都女子大、3/23、日本農芸化学会 2012 年度大会<br/>           15. Taro Shiraishi, Tomohisa Kuzuyama, Makoto Nishiyama. Identification of the biosynthetic gene cluster of a nucleoside antibiotic A-94964 produced by Streptomyces sp. SANK60404、京都女子大、3/23、日本農芸化学会 2012 年度大会<br/>           16. Takuya Hashimoto, Atsushi Numata, Haruo Ikeda, Tomohisa Kuzuyama, Makoto Nishiyama. Identification of tailoring enzyme genes for 16-membered macrolide bafilomycin biosynthesis; 京都女子大、3/23、日本農芸化学会 2012 年度大会<br/><br/>           一般向け 計 0 件</p> |

様式19 別紙1

|                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 図書                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 計0件                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 産業財産権<br>出願・取得状<br>況     | (取得済み) 計0件<br><br>(出願中) 計0件                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 計0件                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Webページ<br>(URL)          | <a href="http://libcds1.lib.a.u-tokyo.ac.jp/infolib/meta_pub/CsvSearch.cgi">http://libcds1.lib.a.u-tokyo.ac.jp/infolib/meta_pub/CsvSearch.cgi</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 国民との科<br>学・技術対話<br>の実施状況 | <ol style="list-style-type: none"> <li>平成23年7月8日、東大農学部中島ホールで、「微生物は単なる「分解者」なのか?」と題して、東京都立戸山高校2年生、70名に対して、普段の生活や身の回りにおける微生物の生態とはたらきについて模擬授業を行い、質疑応答を行った。その後、10名の希望者については、東京大学生物生産工学研究センター内の細胞機能工学研究室に移動して、微生物由来の酵素を使ったクロスカップリング反応の実習を体験してもらい、その実習内容について解説した。</li> <li>平成23年10月21日、東大農学部中島ホールで、「微生物は単なる「分解者」なのか?」と題して、私立関東第一高校1年生、70名に対して、普段の生活や身の回りにおける微生物の生態とはたらきについて模擬授業を行った。次に、東京大学生物生産工学研究センターに移動してもらい研究室内の実験材料の微生物や機器について説明し、質疑応答を行った。</li> <li>平成23年12月の約一ヶ月間、東京大学本部棟で、「微生物由来の抗結核菌剤と抗インフルエンザウイルス剤」の化学構造モデルを展示して、最先端・次世代研究開発支援プログラムで推進中の研究内容の概要を紹介した。</li> <li>平成24年1月25日、埼玉県立杉戸農業高校で、同高校2年生、20名に対して、土壌中に生育している微生物から放線菌を探して顕微鏡で観察するという微生物実験を体験してもらい、放線菌の働きについて説明し質疑応答を行った。26日には、埼玉県立杉戸農業高校2年生、30名に対して、「大学教員という仕事」と題して、大学教員の仕事と、普段の生活において微生物由来の酵素が如何に役立っているかを概説して質疑応答を行った。</li> <li>平成24年3月26日、東大農学部弥生講堂で、「微生物の世界へようこそ」と題して、富山県立富山高校1年生、125名に対して、普段の生活や身の回りにおける微生物の生態とはたらきと最新の微生物酵素の研究内容について概説し、質疑応答を行った。</li> </ol> |
| 新聞・一般雑<br>誌等掲載<br>計0件    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| その他                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

4. その他特記事項

## 実施状況報告書(平成23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す

## 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<br>(前年度迄の<br>累計) | ③当該年度受<br>領額 | ④(=①-②-<br>③)未受領額 | 既返還額(前<br>年度迄の累<br>計) |
|------|-------------|------------------------|--------------|-------------------|-----------------------|
| 直接経費 | 132,000,000 | 97,572,000             | 0            | 34,428,000        | 0                     |
| 間接経費 | 39,600,000  | 29,271,600             | 0            | 10,328,400        | 0                     |
| 合計   | 171,600,000 | 126,843,600            | 0            | 44,756,400        | 0                     |

## 2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

|      | ①前年度未執<br>行額 | ②当該年度受<br>領額 | ③当該年度受<br>取利息等額<br>(未収利息を除<br>く) | ④(=①+②+<br>③)当該年度<br>合計収入 | ⑤当該年度執<br>行額 | ⑥(=④-⑤)<br>当該年度未執<br>行額 | 当該年度返還<br>額 |
|------|--------------|--------------|----------------------------------|---------------------------|--------------|-------------------------|-------------|
| 直接経費 | 97,002,000   | 0            | 0                                | 97,002,000                | 97,002,000   | 0                       | 0           |
| 間接経費 | 29,271,600   | 0            | 0                                | 29,271,600                | 29,271,600   | 0                       | 0           |
| 合計   | 126,273,600  | 0            | 0                                | 126,273,600               | 126,273,600  | 0                       | 0           |

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

|         | 金額          | 備考                        |
|---------|-------------|---------------------------|
| 物品費     | 86,361,281  | 高速液体クロマトグラフィー質量分析装置、実験試薬等 |
| 旅費      | 2,888,710   | 研究成果発表・情報収集旅費(欧米等)        |
| 謝金・人件費等 | 298,500     | 指導謝金、講義謝金、短時間教職員人件費       |
| その他     | 7,453,509   | ゲノム解析料、会議登録料等             |
| 直接経費計   | 97,002,000  |                           |
| 間接経費計   | 29,271,600  |                           |
| 合計      | 126,273,600 |                           |

## 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<br>等                         | 数量 | 単価<br>(単位:円) | 金額<br>(単位:円) | 納入<br>年月日  | 設置研究機関<br>名 |
|-------------------------|--------------------------------------|----|--------------|--------------|------------|-------------|
| タンパク質用クロマト<br>グラフィー     | GEヘルスケア社製<br>AKTAPrime plus          | 1  | 1,842,750    | 1,842,750    | 2011/6/29  | 東京大学        |
| 高速液体クロマトグラ<br>フィー質量分析装置 | AB SCIEX<br>TripleTOF 5600<br>System | 1  | 74,130,000   | 74,130,000   | 2011/8/10  | 東京大学        |
| メディカルチャンバー              | A-750EF3                             | 1  | 622,650      | 622,650      | 2011/12/1  | 東京大学        |
| タンパク質用クロマト<br>グラフィー     | GEヘルスケア社製<br>AKTAPrime plus          | 1  | 1,842,750    | 1,842,750    | 2011/12/26 | 東京大学        |