

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) 実績報告書

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. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

2. 収支の状況

(単位:円)

	交付決定額	交付を受けた額	利息等収入額	収入額合計	執行額	未執行額	既返還額
直接経費	132,000,000	132,000,000	0	132,000,000	132,000,000	0	0
間接経費	39,600,000	39,600,000	0	39,600,000	39,600,000	0	0
合計	171,600,000	171,600,000	0	171,600,000	171,600,000	0	0

3. 執行額内訳

(単位:円)

費目	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	合計
物品費	549,683	86,361,281	13,556,143	7,416,808	107,883,915
旅費	0	2,888,710	3,322,510	1,582,299	7,793,519
謝金・人件費等	0	298,500	0	2,228,335	2,526,835
その他	20,317	7,453,509	5,557,347	764,558	13,795,731
直接経費計	570,000	97,002,000	22,436,000	11,992,000	132,000,000
間接経費計	0	29,271,600	295,650	10,032,750	39,600,000
合計	570,000	126,273,600	22,731,650	22,024,750	171,600,000

4. 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
タンパク質用クロマトグラフィー	GEヘルスケア社製 AKT APrime 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フィー質量分析装置	AB SCIEX TripleTOF 5600 System	1	74,130,000	74,130,000	2011/8/10	東京大学
タンパク質用クロマトグラフィー	GEヘルスケア社製 AKT APrime plus	1	1,842,750	1,842,750	2011/12/26	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
振とう培養装置	BR-43FH-MR	1	831,600	831,600	2012/8/24	東京大学
振とう培養装置	G・BR-200	1	1,971,396	1,971,396	2013/1/25	東京大学
ゲル撮影装置	AE-6932 GLESCP-1	1	931,665	931,665	2013/1/25	東京大学
振とう培養装置	G・BR-200	1	1,971,396	1,971,396	2013/4/26	東京大学

5. 研究成果の概要

微生物の生産する有用物質の生合成に関わる遺伝子の機能を解析し、遺伝子ノックアウトなどの代謝工学の手法を用いて代謝物プロファイルを人為的に改変し、新たな抗結核剤の合成中間体であるカプラゾールの新しい生産法を開発した。同様の方法論は、微生物の生産する様々な生物活性物質の誘導体の創製に応用できることから本研究の意義は大きい。また、将来の基盤として産学連携に生かすことが期待できる新たな代謝経路を解明した。さらには、今後のグリーン・イノベーションやライフ・イノベーション研究の基盤となりうる菌体ゲノムシーケンスを解析してデータベースとして整備した。

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) 研究成果報告書

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名 (下段英語表記)	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
	Production of anti-influenza agents and antituberculosis agents by using metabolically engineered microorganisms
研究機関・部局・ 職名 (下段英語表記)	東京大学・生物生産工学研究センター・准教授
	The University of Tokyo, Biotechnology Research Center, Associate Professor
氏名 (下段英語表記)	葛山智久
	Tomohisa Kuzuyama

研究成果の概要

(和文): 微生物の生産する有用物質の生合成に関わる遺伝子の機能を解析し、遺伝子ノックアウトなどの代謝工学の手法を用いて代謝物プロファイルを人為的に改変し、新たな抗結核剤の合成中間体であるカプラゾールの新しい生産法を開発した。同様の方法論は、微生物の生産する様々な生物活性物質の誘導体の創製に応用できることから本研究の意義は大きい。また、将来の基盤として産学連携に生かすことが期待できる新たな代謝経路を解明した。さらには、今後のグリーン・イノベーションやライフ・イノベーション研究の基盤となりうる菌体ゲノムシーケンスを解析してデータベースとして整備した。

(英文): We analyzed the functions of the biosynthetic genes for the useful microbial products and altered their metabolic profiles by using the genetic engineering techniques such as gene knockouts. These experiments enabled us to develop a new method for caprazol production, which is an important intermediate of a new antituberculous agent. Because we can apply similar methodology to the production for derivatives of various bioactive natural products, the significance of this study is big. In addition, we elucidated the new metabolic pathways that we would be able to use in university-industry research collaboration in future. Besides, we analyzed the bacterial genome sequences that would be the base of the future studies for green innovation

and life innovation and we prepared them as a genome database.

1. 執行金額 171,600,000 円

(うち、直接経費 132,000,000 円、間接経費 39,600,000 円)

2. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

3. 研究目的

現在日本で認可されているインフルエンザ治療薬は、M2 チャネル阻害剤であるアマンタジン塩酸塩(シンメトレル)と、ノイラミニダーゼ阻害剤であるリン酸オセルタミビル(タミフル)およびザナミビル(リレンザ)の3化合物である。しかしながら、アマンタジン塩酸塩はその耐性ウイルスの出現頻度の高さから現在米国では使用が中止されている。また最も利用されているタミフルについても、その耐性ウイルスの出現が報告され始め、同様な作用機構であるリレンザも耐性ウイルスの出現が危ぶまれている。また最近の高病原性トリインフルエンザの発生や2009年の新型インフルエンザA/H1N1の世界的流行から見て、作用機構の異なる何種類かの新たな治療薬を開発することは急務である。現在のインフルエンザ治療薬開発は、タミフルのようなノイラミニダーゼ阻害をターゲットとしたものが主流である。しかし、ノイラミニダーゼ阻害剤についても耐性ウイルスが出現している以上、新たな作用機構を持った治療薬が望ましいことは明らかである。

このような状況下、wickerolは真菌である*Trichoderma atroviride* FKI-3737の生産する抗インフルエンザウイルス活性物質として単離構造決定された。wickerolは、これまでに類を見ない6-5-6-6員環構造を持つ新しいジテルペン骨格を持ち、優れた抗インフルエンザウイルス活性を示すことが報告されている。しかしながら、wickerolは低極性で水への溶解性が低く動物活性評価(特にマウスへの経鼻投与)が困難である。そのためより高極性の誘導体が必要であるが、wickerolは構造が複雑なうえ官能基が少ないため有機合成による誘導体創製には限界がある。また生産菌FKI-3737のwickerol生産性も高いものではない。したがって、有機合成とは異なる方法論によるwickerolの大量取得や水溶性の向上した誘導体創製が求められている。

細菌感染症の化学療法において、感染症の原因となる細菌が薬剤耐性になることは重大な問題である。特に抗酸菌の感染症の化学療法において用いられるリファンピシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、バイオマイシン、カプレオマイシン、サイクロセリン等に対して、耐性を有する抗酸菌が出現して社会的問題となっている。そのため、従来使用されている既知の抗菌性抗生物質とは異なり、新規な化学構造を有し且つ高い抗菌作用などの優れた性質を示す新規な合成化合物および新規な抗生物質の発見または創製をすることが強く望まれている。

このような状況下、caprazamycinは放線菌である*Streptomyces* sp MK730-62F2の生産する抗結核菌活性物質として単離構造決定された。caprazamycinの属するヌクレオシド系抗生物質は、ウラシルを共通の構造に持ち、N-アセチルグルコサミン、様々な鎖長の脂肪酸、7員環ジアゼパノン、リ

様式21

ン酸基、5-アミノリボース、2-アミノジアルドース、2,3-ジアミノ酪酸、アミノ酸などで構成される構造多様な化合物群である。これまでに3種のヌクレオシド系化合物の生合成遺伝子クラスターが昨年から相次いで報告されたが、共通構造を持つにも拘らず共通の生合成酵素は見出されていない。このことは、本化合物群のための生合成酵素そのものが多様性に富んでいることを示している。caprazamycinの分解物である caprazol または caprazen の 1'''-アミド誘導体またはエステル誘導体は高い抗結核菌活性を示すことが報告されている。しかし、現在 caprazol や caprazen を得るためには、煩雑な方法で精製した caprazamycin を化学的に加水分解する方法または多段階からなる化学合成しかない。

本研究課題では、wickerol 類と caprazamycin 類が微生物の中でどのように生合成されるのかを分子レベルで明らかにし、次に、その仕組みを人為的に改変することで、より優れた活性を示す新しい wickerol 誘導体と caprazamycin 誘導体を生産する手法の開発を目的としている。そのために、以下の4項目を実施する。

(1) wickerol の生合成遺伝子クラスターをクローニングし、個々の生合成酵素反応を検討するとともに結晶構造解析を行うことで、複雑な炭素骨格を一挙に構築するテルペン環化酵素の反応機構を解明する。取り扱いがより容易な放線菌で wickerol の生合成遺伝子クラスターを再構築して wickerol の安定供給を目指す。その際、下記(4)で述べる本研究課題で解読される微生物ゲノム中のシトクロム P450 などの酸化酵素との共発現を検討して、水酸化されたより高極性 wickerol 誘導体を放線菌などの異種微生物で生産する。これらの誘導体は、抗インフルエンザウイルス剤のリード化合物となりうる。

(2) caprazamycin 生合成遺伝子クラスターは取得済みであるので、個々の生合成酵素反応を検討することで、caprazamycin 生合成経路を確定する。次いで、生合成酵素遺伝子の論理的改変や遺伝子の欠失や導入によって caprazol または caprazen の *in vivo* 生産系を構築する。生産される caprazol または caprazen の誘導体については容易な化学合成法が確立しており、これらの誘導体は、抗結核剤のリード化合物となりうる。

(3) 放線菌はシトクロム P450 などの酸化酵素や構造多様性に関与する酵素遺伝子の宝庫である。日本はこれまで多くの微生物資源を開拓し世界の中でその優位性を保ってきた。この強みを生かし、これまでの微生物資源を遺伝子資源に昇華して蓄積し、30 種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完了する。ゲノム配列から予測される二次代謝産物の精製と構造決定についても可能な限り行う。また、これまでゲノム解析が行われた例のない新規な好熱菌についても、ゲノムの解析のみならず、これらの好熱菌の生産する二次代謝産物の精製と構造解析を行う。二次代謝産物の構造を正確に解析することで、遺伝子の機能推定のアノテーションがより正確なデータとなる。

(4) 本研究課題で生産される wickerol 誘導体と caprazamycin 誘導体の活性評価を行い、より優れた誘導体を創製する。

4. 研究計画・方法

(1) wickerol の生合成遺伝子クラスターを生産菌 *Trichoderma atroviride* FKI-3737 からクローニングし、個々の生合成酵素反応を検討する。鍵酵素であるテルペン環化酵素の X 線結晶構造解析を行うことで、複雑な炭素骨格を一挙に構築するテルペン環化酵素の反応機構を解明する。放線菌で wickerol の生合成遺伝子クラスターを再構築して wickerol の異種生産を目指す。その際、下記(3)で述べる本研究課題で解読される微生物ゲノム中のシトクロム P450 などの酸化酵素との共発現を検討して、水酸化されたより高い極性の wickerol 誘導体を放線菌などの異種微生物で生産する。培養条件の検討も行い、大量調製に備える。

(2) caprazamycin 生合成酵素反応を検討することで、caprazamycin 生合成経路を確定する。次いで、*Streptomyces* sp MK730-62F2 の生合成酵素遺伝子の論理的改変や遺伝子の欠失や導入によって caprazol または caprazen の発酵生産系を構築する。培養条件の検討も行い、大量調製に備える。

(3) 30種程度の微生物ゲノムを精製してドラフトシーケンシングを外注する。シーケンス解析結果を受領後、アノテーション作業を行う。ゲノム配列から予測される二次代謝産物の精製と構造決定についても可能な限り行う。また、これまでゲノム解析が行われた例のない新規な好熱菌についても、ゲノム解析のみならず、これらの好熱菌の生産する二次代謝産物の精製と構造解析も行い、生物活性についても試験する。

(4) 本研究課題で生産される wickerol 誘導体と caprazamycin 誘導体の生物活性評価を行う。

国民との科学・技術対話については、高校生レベルの生徒を対象に、講義中心の授業や当該研究課題に関連した簡単な実験を見せるまたは体験してもらい実技授業を計画する。このため、本課題の実施者が所属する日本放線菌学会に協力を要請する。本学会はこれまでに高校生を対象とした模擬授業を行った実績がある。本研究プログラムで採択されている類似の研究課題の研究者と連絡を取り、研究に関する意見交換のみならず、科学・技術対話のための集会を合同で開催することも視野に入れている。平成23年度以降、各年度に一回ずつは行う。大学の関係者と相談の上、オープンキャンパス時に、大学の学生実験室を利用して、より高度な実験を体験してもらうことも考える。

5. 研究成果・波及効果

(1) wickerol 生産菌の *Trichoderma atroviride* FKI-3737 から wickerol 生産に必須な wickerol 合成テルペン環化酵素遺伝子の候補を複数得ることができたが、予期せず wickerol 合成能を示さなかった。wickerol 合成テルペン環化酵素は、これまでの配列とはまったく異なる新奇な配列をもつテルペン環化酵素である可能性を示す知見を得ることができた。また、麹カビである *Aspergillus oryzae* で *T. atroviride* FKI-3737 の遺伝子を発現させることに成功した。この成果は、*Trichoderma* 属真菌の生産する生物活性物質の探索研究や大量調製に有効な手段を提供するものとして波及効果は大きい。

様式21

(2) 遺伝子破壊による代謝改変によって caprazol 生産改変体を作成し、その生産条件と精製方法を検討することで、抗結核菌薬の合成中間体である caprazol の効率的な生産と精製方法を確立することができた。本方法は、他の生物活性物質の生産法の構築にも応用できると考えられるため、本研究の意義は大きい。他にも caprazamycin 生合成遺伝子破壊株を作製することに成功し、caprazamycin や caprazol とは異なる誘導体の生産も確認することができた。caprazamycin の生合成経路の全容を分子レベルでほぼ明らかにしつつある。この研究成果はヌクレオシド系抗生物質生合成の新しい学理の構築に繋がるものである。

(3) 当初の予定を上回り、放線菌を中心に35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うことができた。その結果、3つの新規ジテルペン環化酵素の発見と、トリプトファンの新規な代謝経路の発見、コンポストから発見された新規な好熱菌から新規な3種の生物活性物質の同定、50年間同定されていなかった新規なテルペン環化酵素の発見が可能となり、5つの論文発表を行うことができた。さらには、通常、高温条件を必要とするディールスアルダー反応を水溶液中、室温で触媒することのできる新たな生体触媒も発見した。ホスホン酸化合物の新奇な生合成マシナリーの同定にも成功した。メバロン酸の発酵生産に有効な遺伝子については特許を取得した。本プロジェクトで解析された微生物ゲノムのドラフトシーケンスは、データベースとして整備され、貴重な遺伝子資源として今後のグリーン・イノベーションやライフ・イノベーション研究の基盤になる。

(4) 共同研究先の微生物化学研究所により、caprazamycin 誘導体として CPZEN-45 が最も強力な抗結核菌活性を示すことが明らかにされた。一方で、本プロジェクトで代謝改変により生産された新たな caprazamycin 誘導体はいずれも抗菌活性を示さないことが判明した。共同研究先の北里大学では、wickerol における水酸基の導入位置によっては抗インフルエンザウイルス活性が低下することが明らかにされた。これらの結果は、今後の新たな誘導体作製の参考データとして有効である。

国民との科学・技術対話については、予定通り、高校生レベルの生徒を対象に、講義中心の授業や当該研究課題に関連した簡単な実験を体験してもらった実技授業を計7回実施した。また、日本科学未来館で開催された「サイエンスアゴラ」にて出展し、主婦を含む一般の参加者に対して微生物のつくる有用化合物の説明と今後の展開について対話することができた。

6. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計 11 件
計 12 件	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dairi Tohru, Kuzuyama Tomohisa, Nishiyama Makoto, Fujii Isao. 2011. Convergent strategies in biosynthesis. <i>Natural Product Reports</i>. 28: 1054-1086. 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. 3. Isogai Shota, Nishiyama Makoto, Kuzuyama Tomohisa. Identification of 8-amino-2,5,7-trihydroxynaphthalene-1,4-dione, a novel intermediate in the biosynthesis of <i>Streptomyces meroterpenoids</i>. <i>Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters</i>. 2012. Sep 15;22(18):5823-6. 4. Meguro Ayuko, Tomita Takeo, Nishiyama Makoto, Kuzuyama Tomohisa. Identification and characterization of bacterial diterpene cyclases that synthesize the cembrane skeleton. <i>Chembiochem</i>. 2013 Feb 11;14(3):316-21. http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbic.201200651/abstract;jsessionid=3ED8503E592E0C767F430A26A9332E7A.d02t04 5. Ozaki Taro, Nishiyama Makoto, Kuzuyama Tomohisa. Novel tryptophan metabolism by a potential gene cluster that is widely distributed among actinomycetes. <i>Journal of Biological Chemistry</i>. 2013. 288: 9946-56. http://www.jbc.org/content/288/14/9946.long 6. Ouchi Takuya, Tomita Takeo, Horie Akira, Yoshida Ayako, Takahashi Kento, Nishida Hiromi, Lassak Kerstin, Taka Hikari, Mineki Reiko, Fujimura Tsutomu, Kosono Saori, Nishiyama Chiharu, Masui Ryoji, Kuramitsu Seiki, Albers Sonja Verena, Kuzuyama Tomohisa, Nishiyama Makoto. Lysine and arginine biosyntheses mediated by a common carrier protein in <i>Sulfolobus</i>. <i>Nature Chemical Biology</i>. 2013. 9: 277-83. http://www.nature.com/nchembio/journal/v9/n4/full/nchembio.1200.html 7. Kitagawa Wataru, Ozaki Taro, Nishioka Taiki, Yasutake Yoshiaki, Hata Miyako, Nishiyama Makoto, Kuzuyama Tomohisa, Tamura Tomohiko. Cloning and heterologous expression of the aurachin RE biosynthesis gene cluster afford a new cytochrome P450 for quinoline N-hydroxylation. <i>Chembiochem</i>. 2013. 14: 1085-93. http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbic.201300167/abstract;jsessionid=02F2A8550457A2067AC5DD080CEAF33C.f02t02 8. Kanemaru Yuko, Hasebe Fumihito, Tomita Takeo, Kuzuyama Tomohisa, Nishiyama Makoto. Two ATP-binding cassette transporters involved in (S)-2-aminoethyl-cysteine uptake in <i>thermus thermophilus</i>. <i>Journal of Bacteriology</i>. 2013. 195: 3845-53. http://jb.asm.org/content/195/17/3845.long 9. Yasutake Yoshiaki, Kitagawa Wataru, Hata Miyako, Nishioka Taiki, Ozaki Taro, Nishiyama Makoto, Kuzuyama Tomohisa, Tamura Tomohiko. Structure of the quinoline N-hydroxylating cytochrome P450 RauA, an essential enzyme that confers antibiotic activity on aurachin alkaloids. <i>FEBS Letters</i>. 2014. 588: 105-10. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579313008508 10. Park Jin Soo, Kagaya Noritaka, Hashimoto Junko, Izumikawa Miho, Yabe Shuhei, Shin-Ya Kazuo, Nishiyama Makoto, Kuzuyama Tomohisa. Identification and biosynthesis of new acyloins from the thermophilic bacterium <i>Thermosporothrix hazakensis</i> SK20-1(T). <i>Chembiochem</i>. 2014. 15: 527-32. http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbic.201300690/abstract 11. Ozaki Taro, Zhao Ping, Shinada Tetsuro, Nishiyama Makoto, Kuzuyama Tomohisa. Cyclolavandulyl Skeleton Biosynthesis via Both Condensation and Cyclization Catalyzed by an Unprecedented Member of the cis-Isoprenyl

	<p>Diphosphate Synthase Superfamily. Journal of the American Chemical Society. 2014. 136: 4837-40. http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja500270m</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 1 件</p> <p>1. Park Jin Soo, Yabe Shuhei, Shin-Ya Kazuo, Nishiyama Makoto, Kuzuyama Tomohisa. New 2-(1'<i>H</i>-indole-3'-carbonyl)-thiazoles derived from the thermophilic bacterium <i>Thermosporothrix hazakensis</i> SK20-1(T). The Journal of Antibiotics. (accepted)</p>
<p>会議発表</p> <p>計 70 件</p>	<p>専門家向け 計 70 件</p> <p><u>52番の第23回イソプレノイド研究会例会を主催した。</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 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 2. Tomohisa Kuzuyama, Structural basis for the regio- and stereo-specific diterpene cyclization cascade in cyclooctatin biosynthesis, 9/7, IUMS symposium, IUMS 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 4. Taro Ozaki, Functional characterization of <i>Streptomyces</i> ABBA prenyltransferases involved in the biosyntheses of novobiocin and prenylated indoles, Sapporo Convention Center, 9/8, IUMS meeting, IUMS 5. Ayuko Meguro, Functional characterization of diterpene cyclases found in <i>Streptomyces</i> genomes, Sapporo Convention Center, 9/8, IUMS conference, IUMS 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 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 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 9. Tomohisa Kuzuyama, Structure and Mechanism of the Diterpene Cyclase CotB2 from Cyclooctatin-producing <i>Streptomyces melanosporofaciens</i>, Puerto Vallarta, Mexico, 12/15, ISBA 10. 目黒垂由子、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 11. 目黒垂由子、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」勉強会 12. Noboru Hiro, 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 13. Taro Ozaki, 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 14. Ayuko Meguro, Functional characterization of diterpene cyclases found in <i>Streptomyces</i> genomes, 京都女子大、3/23、日本農芸化学会 2012 年度大会 15. Taro Shiraishi, Identification of the biosynthetic gene cluster of a nucleoside antibiotic A-94964 produced by <i>Streptomyces</i> sp. SANK60404, 京都女子大、3/23、日本農芸化学会 2012 年度大会 16. Takuya Hashimoto, 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 17. 葛山智久、「微生物の多様なテルペノイド生合成機構」、大阪市、平成 24 年 5 月 8 日、

	<p>大阪市立大学大学院理学研究科</p> <p>18. 葛山智久、「微生物の多様なテルペノイド生合成機構」、静岡市、平成24年5月15日、静岡県立大学食品栄養科学部</p> <p>19. 葛山智久、「Mechanism and Structure of Streptomyces Diterpene Cyclase」、淡路市、平成24年6月19日、科研費新学術領域「生合成マシナリー」</p> <p>20. 葛山智久、「天然有機化合物の構造決定および生合成研究」、阿蘇市、平成24年7月5日、第47回天然物化学談話会</p> <p>21. 葛山智久、「微生物の多様なテルペノイド生合成機構の解明」、荒川区、平成24年7月31日、ADEKA ライフサイエンス材料研究所研究発表会</p> <p>22. 葛山智久、「Exploration of secondary metabolites of <i>Thermosporothrix hazakensis</i>」、宮城県柴田郡村田町、平成24年8月20日、県南衛生工業研究発表会</p> <p>23. 本吉祐大、山田佑樹、池田治生、西山真、葛山智久、「放線菌由来のジテルペン環化酵素の探索と機能解析」、平成24年9月29日、第22回ドリコールおよびイソプレノイド研究会</p> <p>24. Tomohisa Kuzuyama、「Characterization and Structure of Streptomyces ABBA Prenyltransferases」、Groningen 大学 (オランダ)、平成24年9月17日、Groningen 大学生合成研究セミナー</p> <p>25. Shota Isogai, Makoto Nishiyama, Tomohisa Kuzuyama、「The identification of 8-amino-2,5,7-trihydroxynaphthalene-1,4-dione, a novel intermediate in the biosynthesis of Streptomyces meroterpenoids」、Nottingham 大学 (英国)、平成24年9月19-21日、Directing Biosynthesis III, Royal Society of Chemistry</p> <p>26. Ayuko Meguro, Takeo Tomita, Makoto Nishiyama, Tomohisa Kuzuyama、「Novel multiple-product diterpene synthases for synthesising the cembrane skeleton that were mined in the genome of Streptomyces sp. SANK60404」、Nottingham 大学 (英国)、平成24年9月19-21日、Directing Biosynthesis III, Royal Society of Chemistry</p> <p>27. Taro Ozaki, Makoto Nishiyama, Tomohisa Kuzuyama、「The characterisation of a cryptic gene cluster for a novel prenylated indole that is widely distributed among actinomycetes」、Nottingham 大学 (英国)、平成24年9月19-21日、Directing Biosynthesis III, Royal Society of Chemistry</p> <p>28. Tomohisa Kuzuyama、「Two Distinct Biosynthetic Pathways of Isoprene Units」、Saarland 大学 (ドイツ)、平成24年9月24日、Saarland 大学生合成研究セミナー</p> <p>29. 葛山智久、「微生物の多様なテルペノイド生合成機構」、新潟市、平成24年9月28日、新潟大学農学部植物・微生物科学研究センターセミナー</p> <p>30. 橋本拓哉、橋本絢子、新家一男、池田治生、西山真、葛山智久、「BAC を利用した 17 員環マクロサイクリック化合物 versipelostatin の異種生産」、仙台市、平成25年3月26日、日本農芸化学会2013年度大会</p> <p>31. 林健文、西山真、葛山智久、「<i>Saccharothrix</i> sp. ST-888 が生産する除草剤 phosphonothrixin の生合成遺伝子のクローニング」、仙台市、平成25年3月26日、日本農芸化学会2013年度大会</p> <p>32. 白石太郎、西山真、葛山智久、「新規スクレオニド系抗生物質 A-94964 生合成遺伝子クラスターの機能解析」、仙台市、平成25年3月26日、日本農芸化学会2013年度大会</p> <p>33. 目黒亜由子、富田武郎、西山真、葛山智久、「放線菌由来ジテルペン環化酵素 CotB2 の反応機構」、仙台市、平成25年3月26日、日本農芸化学会2013年度大会</p> <p>34. 中尾智世、志波優、吉川博文、瀬戸治男、大村智、西山真、葛山智久、仙台市、「フェナジノマイシン生合成遺伝子クラスターのクローニング」、平成25年3月26日、日本農芸化学会2013年度大会</p> <p>35. Wei-li Thong, Makoto Nishiyama, Tomohisa Kuzuyama、「リファンピシン耐性を誘導された放線菌によって生産される新規化合物の単離と構造決定」、仙台市、平成25年3月26日、日本農芸化学会2013年度大会</p> <p>36. 本吉祐大、山田佑樹、池田治生、西山真、葛山智久、「バクテリア由来のジテルペン環化酵素の探索と機能解析」、仙台市、平成25年3月26日、日本農芸化学会2013年度大会</p> <p>37. 尾崎太郎、趙平、葛山智久、西山真、「ラバンドシアニン生合成における新奇ブレニルジン酸合成酵素の同定と機能解析」、仙台市、平成25年3月26日、日本農芸化学会2013年度大会</p>
--	---

	<p>38. 工藤慧, 西山真, 葛山智久、「HDAC 阻害剤 trichostatin A 生合成遺伝子のクローニング」、仙台市、平成 25 年 3 月 26 日、日本農芸化学会 2013 年度大会</p> <p>39. 長谷部文人、富田武郎、高ひかり、藤村務、西山千春、葛山智久、西山真、「放線菌におけるアミノ酸キャリアタンパク質を介した二次代謝産物生合成」、仙台市、平成 25 年 3 月 26 日、日本農芸化学会 2013 年度大会</p> <p>40. 松田研一、長谷部文人、富田武郎、志波優、吉川博文、新家一男、葛山智久、西山真、仙台市、「新規アミノ酸キャリアタンパク質を用いて生合成される天然化合物の探索」、仙台市、平成 25 年 3 月 26 日、日本農芸化学会 2013 年度大会</p> <p>41. 葛山 智久、「放線菌由来ジテルペン環化酵素の反応機構と構造」、仙台市、平成 25 年 3 月 27 日、日本農芸化学会 2013 年度大会</p> <p>42. 葛山智久、「テルペノイドの基本単位生合成経路—メチルエリスリトールリン酸経路は如何にして解明されたか?」、東広島市、平成 25 年 4 月 19 日、広島大学大学院先端物質科学研究科特別講演会</p> <p>43. Tomohisa Kuzuyama、「NOVEL TRYPTOPHAN METABOLISM BY A POTENTIAL GENE CLUSTER THAT IS WIDELY DISTRIBUTED AMONG ACTINOMYCETES」、メキシコ カンクン市、平成 25 年 6 月 21 日—7 月 1 日、12th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms</p> <p>44. 白石太郎、西山真、葛山智久、「微生物の多様なテルペノイド生合成機構」、大津市、平成 25 年 7 月 3 日—4 日、第 48 回天然物化学談話会</p> <p>45. 橋本拓哉、西山真、葛山智久、「Mechanism and Structure of Streptomyces Diterpene Cyclase」、大津市、平成 25 年 7 月 3 日—4 日、第 48 回天然物化学談話会</p> <p>46. 橋本拓哉、橋本絢子、新家一男、池田治生、西山真、葛山智久、「Heterologous production of the 17-membered macrocyclic compound versipelostatin using BAC vector」、東京、平成 25 年 8 月 3 日、新学術領域「生合成マシナリー」第5回若手シンポジウム(第9回生合成勉強会)</p> <p>47. トンウェイリー、西山真、葛山智久、「Identification of novel compounds produced by actinomycetes with rifampicin-induced rpoB mutation」、広島市、平成 25 年 9 月 4 日—6 日、2013 年度日本放線菌学会大会</p> <p>48. 白石太郎、西山真、葛山智久、「スクレオンド系新規化合物 A-94964 の生合成研究」、広島市、平成 25 年 9 月 4 日—6 日、2013 年度日本放線菌学会大会</p> <p>49. 橋本拓哉、橋本絢子、新家一男、池田治生、西山真、葛山智久、「17 員環マクロサイクリック化合物 versipelostatin 生合成遺伝子クラスターの同定」、広島市、平成 25 年 9 月 4 日—6 日、2013 年度日本放線菌学会大会</p> <p>50. 林健文、西山真、葛山智久、「Saccharothrix sp. ST-888 が生産する C-P 化合物 phosphonothrixin の生合成に関する研究」、広島市、平成 25 年 9 月 4 日—6 日、2013 年度日本放線菌学会大会</p> <p>51. 工藤慧、新家一男、西山真、葛山智久、「HDAC 阻害剤トリコスタチン A の生合成に関する研究」、広島市、平成 25 年 9 月 4 日—6 日、2013 年度日本放線菌学会大会</p> <p>52. 小林正弥、尾崎太郎、新家一男、西山真、葛山智久、「放線菌の生産するプレニルカルバゾール類縁体の生合成研究」、東京、平成 25 年 9 月 14 日、第23回イソプレノイド研究会例会</p> <p>53. 葛山智久、「放線菌ゲノムに潜む生合成マシナリーの活用に向けて」、富山市、平成 25 年 11 月 27 日、富山県立大学生物工学科講義「ゲノム工学」特別セミナー</p> <p>54. 葛山智久、「放線菌ゲノムに潜む生合成マシナリーの活用に向けて」、愛媛市、平成 25 年 11 月 29 日、愛媛大学プロテオサイエンスセンター特別セミナー</p> <p>55. チョウスーヒ、キムスンヨン、富田武郎、西山真、葛山智久、「Structural and biochemical studies of Fom1 enzyme involved in the biosynthesis of fosfomycin in Streptomyces wedmorensis」、済州島、平成 26 年 2 月 9 日—10 日、第 7 回日韓ケミカルバイオロジーシンポジウム</p> <p>56. パクジンスー、新家一男、西山真、葛山智久、「Identification and Biosynthesis of New Acyloins from the Thermophilic Bacterium Thermosporothrix hazakensis SK20-1T」、済州島、平成 26 年 2 月 9 日—10 日、第 7 回日韓ケミカルバイオロジーシンポジウム</p> <p>57. 葛山智久、「Diversity of terpenoid biosynthesis」、東京、平成 26 年 3 月 2 日—3 日、US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products for Young Researchers</p>
--	--

	<p>58. インタニティームルマイシヤラ、尾崎太郎、西山真、葛山智久、「Chemoenzymatic synthesis of prenylated indoles by SCO7467」、東京、平成 26 年 3 月 2 日-3 日、US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products for Young Researchers</p> <p>59. 尾崎太郎、西山真、葛山智久、「Novel tryptophan metabolism in actinomycetes」、東京、平成 26 年 3 月 2 日-3 日、US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products for Young Researchers</p> <p>60. 白石太郎、西山真、葛山智久、「Biosynthesis of the nucleoside antibiotic A-94964」、東京、平成 26 年 3 月 2 日-3 日、US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products for Young Researchers</p> <p>61. トンウェイリー、西山真、葛山智久、「Identification of novel compounds produced by actinomycetes with rifampicin-induced rpoB gene mutation」、東京、平成 26 年 3 月 2 日-3 日、US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products for Young Researchers</p> <p>62. 吉田彩子、富田武郎、古園さおり、葛山智久、西山真、「Structural studies on lysine biosynthesis using a novel carrier protein LysW」、東京、平成 26 年 3 月 2 日-3 日、US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products for Young Researchers</p> <p>63. パクジンスー、新家一男、西山真、葛山智久、「Bioinformatics analysis for secondary metabolites of Thermosporothrix hazakensis」、棟強、平成 26 年 3 月 7 日-9 日、第 8 回日本ゲノム微生物学会年会</p> <p>64. 工藤慧、新家一男、西山真、葛山智久、「ゲノム情報を利用した HDAC 阻害剤 Trichostatin A の生合成遺伝子クラスターの同定」、東京、平成 26 年 3 月 7 日-9 日、第 8 回日本ゲノム微生物学会年会</p> <p>65. 小林正弥、尾崎太郎、新家一男、西山真、葛山智久、「放線菌由来プレニルカルバゾール類縁体生合成遺伝子の同定」、東京、平成 26 年 3 月 7 日-9 日、第 8 回日本ゲノム微生物学会年会</p> <p>66. 秋山渚、富田武郎、葛山智久、西山真、「超好熱・好酸性古細菌 <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> におけるアミノ酸生合成経路の調節機構の解析」、東京、平成 26 年 3 月 28 日-30 日、日本農芸化学会 2014 年度大会</p> <p>67. 白石太郎、西山真、葛山智久、「スクレオンド系抗生物質 A-94964 生合成におけるウリジン骨格形成機構」、東京、平成 26 年 3 月 28 日-30 日、日本農芸化学会 2014 年度大会</p> <p>68. 小林正弥、尾崎太郎、新家一男、西山真、葛山智久、「放線菌の生産するプレニルカルバゾール類縁体の生合成研究」、東京、平成 26 年 3 月 28 日-30 日、日本農芸化学会 2014 年度大会</p> <p>69. 長谷部文人、富田武郎、高ひかり、藤村務、西山千春、葛山智久、西山真、「アミノ酸キャリアタンパク質を介して生合成される新規アミノ酸とその代謝産物の同定」、東京、平成 26 年 3 月 28 日-30 日、日本農芸化学会 2014 年度大会</p> <p>70. 松田研一、長谷部文人、富田武郎、志波優、吉川博文、新家一男、葛山智久、西山真、「アミノ基結合型キャリアタンパク質を指標とした新規天然化合物の探索」、東京、平成 26 年 3 月 28 日-30 日、日本農芸化学会 2014 年度大会</p> <p>一般向け 計 0 件</p>
<p>図書</p> <p>計 0 件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状況</p> <p>計 2 件</p>	<p>(取得済み) 計 1 件</p> <p>【発明の名称】 新規なアセトアセチルCoA合成酵素、それをコードするDNA配列、当該酵素の製造方法および当該酵素を利用したメバロン酸の製造方法</p> <p>【発明者】 葛山智久</p> <p>【特許番号】 特許第4986547号</p> <p>【登録日】平成24年5月11日</p> <p>【特許権者】株式会社ADEKA</p>

	<p>(出願中) 計1件 【発明の名称】新規微生物及びカブラゾールの製造方法 【出願番号】特願2012-13149 【出願日】平成24年1月25日 【出願人】公益財団法人微生物化学研究会 【発明者】葛山智久、五十嵐雅之</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>新しいトリプトファン代謝経路を放線菌から発見、東京大学大学院農学生命科学研究科 研究成果、http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2013/20130411-2.html</p> <p>研究概要、東京大学生物生産工学研究センター細胞機能工学研究部門、http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/biotech-res-ctr/saiboukinou/research/index.html</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 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。 2. 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。 3. 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。(参加者数不明) 4. 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。 5. 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。 6. 平成24年11月10日、日本科学未来館で開催された「サイエンスアゴラ」にて、科研費の新学術領域「生合成マシナリー」と合同で研究成果を展示するとともに、一般参加者(約30名)に対して研究内容と今後の展開について対話した。11月10日と11日の2日間で本展示には150名超えの参加者があった。 7. 平成25年3月29日、富山県立富山高校1年生、12名に対して、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で、天然有機化合物(リモネン)を材料に使った実習と、本助成金で購入した最先端分析装置の見学を体験してもらい、その実習内容について解説した。また、当研究室の学生らと対話を通して交流してもらった。 8. 平成25年7月24日、富山県立富山中部高校1年生、10名に対して、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で、本助成金で購入した最先端分析装置の見学を体験してもらい、研究内容について解説した。また、当研究室の学生らと対話を通して交流してもらった。 9. 平成25年9月13-20日、東大の教養学部生向け研究室体験活動プログラム、大学1年生1名を担当、「微生物バイオテクノロジー」と題した講義と実験(放線菌を培養して生物活性物質をクロマトグラフィーで単離して、最終的に本助成金で購入した質量分析計で同定する)を体験してもらった。

様式21

新聞・一般雑誌等掲載計1件	1. 平成25年9月30日、東京大学農学部的一般向け広報誌「弥生」、5ページ、「放線菌に秘められた機能を拓く」と題した中学生レベル向けの解説文を執筆。インターネット版： http://www.a.u-tokyo.ac.jp/pr-yayoi/57.pdf
その他	特になし

7. その他特記事項

私の共同研究者であった日本学術振興会外国人特別研究員が、平成25年4月1日より、静岡県立大学の助教に就任した。また、当該プログラムの研究課題を実施してくれていた当該研究室の博士課程の学生が、その実力を認められ、1名は平成25年4月1日より東京大学大学院農学生命科学研究科の特任助教に、もう1名は平成26年4月1日より、東京大学生物生産工学研究センターの私の研究グループの助教に就任した。

「長谷部文人、富田武郎、高ひかり、藤村務、西山千春、葛山智久、西山真、「アミノ酸キャリアタンパク質を介して生合成される新規アミノ酸とその代謝産物の同定」、東京、平成26年3月28日-30日、日本農芸化学会2014年度大会」の発表が、大会トピックス賞を受賞した。