

**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	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 23 年度においては、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 23 年度においては、*S. griseus* における AdpA 制御ネットワークの全体像の解明、制御因子をコードする AdpA 標的遺伝子の機能解析、新規 ECF シグマ因子による制御系などの個別の制御系の解析を進めるとともに、*A. missouriensis* の運動性胞子の運動性や走化性に関する生化学的・遺伝学的解析や胞子嚢形成や発芽に関わる遺伝子発現制御機構の解析を行う。

2. 研究の実施状況

(A) 生合成

- ・ユニークな化学構造をもつ 3 つの化合物に関して、生合成遺伝子群を取得、注目すべき生合成遺伝子の機能を解析。
- ・放線菌ゲノムより 5 つのテルペン環化酵素遺伝子を見出し、その遺伝子産物の機能を解析。このうちの 3 つは、新規テルペンを合成する酵素であることが強く示唆された(1 つは証明済)。
- ・*S. griseus* の 27 種の P450 モノオキシゲナーゼについて、大腸菌発現系を用いて基質候補化合物群の変換試験を行い、3 種の酵素の触媒反応を明らかにした。また、これら 3 種の P450 モノオキシゲナーゼと *S. griseus* がもつ複数のレドックスパートナータンパク質との「相性」について重要な知見を得た。
- ・II 型ポリケチド合成酵素遺伝子を含む生合成遺伝子群 2 つについて、試験管内反応により重要酵素の機

能を解析。

(B) 遺伝子発現制御

【*S. griseus*】

- ・AdpA による制御ネットワークの全体像を解明。AdpA の標的遺伝子のうち、二次代謝や形態分化の制御に関与する4つの遺伝子を解析。
- ・個別の制御系の解析では、新規 ECF シグマ因子の解析を完了。形態分化の制御因子 BldM やグリキサゾン生合成制御に関する解析を実施。
- ・液体培養と固体培養の対数増殖期の菌糸における網羅的転写解析を実施。

【*A. missouriensis*】

- ・走化性に関するケモレセプターの細胞内局在を詳細に解析。
- ・運動孢子・発芽孢子のプロテオーム解析により見出したマルチドメイン型センサーヒスチジンキナーゼをコードする遺伝子の破壊株では、孢子嚢中で不適切な孢子発芽が起こることを示した。
- ・同様の手法で見出した BldD ホモログが不適切なタイミングでの孢子嚢形成を抑制する機能をもつことを示した。
- ・メタボローム解析等により、孢子運動のための貯蔵エネルギー源がトレハロースやグリコーゲンであることを示した。
- ・孢子嚢から孢子が泳ぎ出すシグナルとなっている物質を同定。

3. 研究発表等

雑誌論文 計 9 件	(掲載済み一査読有り) 計 8 件 (1) C. Nakano, S. Horinouchi, Y. Ohnishi. Characterization of a novel sesquiterpene cyclase involved in (+)-caryolan-1-ol biosynthesis in <i>Streptomyces griseus</i> . J. Biol. Chem. (2011) 286(32): 27980-27987. (2) C. Nakano, H.-K. Kim, Y. Ohnishi. Identification of the first bacterial monoterpene cyclase, a 1,8-cineole synthase, that catalyzes the direct conversion of geranyl diphosphate. (2011) ChemBiochem 12(13): 1988-1991. (3) T. Hayashi, Y. Kitamura, N. Funa, Y. Ohnishi, S. Horinouchi. Fatty acyl-AMP ligase involvement in the production of alkylresorcylic acid by a <i>Myxococcus xanthus</i> type III polyketide synthase. (2011) ChemBiochem 12(14): 2166-2176. (4) A. Higo, S. Horinouchi, Y. Ohnishi. Strict regulation of morphological differentiation and secondary metabolism by a positive feedback loop between two global regulators AdpA and BldA in <i>Streptomyces griseus</i> . (2011) Mol. Microbiol. 81(6): 1607-1622. (5) C. Nakano, F. Kudo, T. Eguchi, Y. Ohnishi. Genome mining reveals two novel bacterial sesquiterpene cyclases: (-)-germacradien-4-ol and (-)-epi- α -bisabolol synthases from <i>Streptomyces citricolor</i> . (2011) ChemBiochem 12(15): 2271-2275. (6) C. Nakano, H.-K. Kim, Y. Ohnishi. Identification and characterization of the linalool/nerolidol synthase from <i>Streptomyces clavuligerus</i> . (2011) ChemBiochem 12 (16): 2403-2407. (7) M. Izumikawa, R. Satou, K. Motohashi, A. Nagai, Y. Ohnishi, M. Takagi, K. Shin-ya. Naphthoquinone-like polyketide isolated from <i>Streptomyces</i> sp. RI-77 and its predicted biosynthetic pathway. (2011) J. Nat. Prod. , 74(12): 2588-2591. (8) C. Nakano, N. Funa, Y. Ohnishi, S. Horinouchi. The <i>O</i> -methyltransferase SrsB catalyzes the decarboxylative methylation of alkylresorcylic acid during phenolic lipid biosynthesis by <i>Streptomyces griseus</i> . (2012) J. Bacteriol. 194(6), 1544-1551. (掲載済み一査読無し) 計 0 件 (未掲載一査読有り) 計 1 件
-------------------	--

様式19 別紙1

	<p>(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. (2012) □DNA Res. (in press)</p>
<p>会議発表 計 26 件</p>	<p>専門家向け 計 25 件</p> <p>(1) 日本ゲノム微生物学会ワークショップ「ゲノムで繋がる微生物研究の新展開」(仙台 8/20-21) 大西康夫「微生物ゲノムシーケンスを活用した新規生合成酵素の取得」</p> <p>(2) 平成 23 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議(福山 8/25-26) 石垣祐二、赤沼元気、古園(松田)さおり、吉田稔、堀之内末治、大西康夫「放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> におけるリジンアセチル化タンパク質の同定とその生理的機能の解析」</p> <p>(3) 2011 年度 日本放線菌学会大会(IUMS2011)(札幌 9/7-9) Akiyoshi Higo, Sueharu Horinouchi, Yasuo Ohnishi “Strict regulation of morphological and physiological differentiation by a positive feedback loop between two global regulators AdpA and bldA in <i>Streptomyces griseus</i>”</p> <p>(4) 【同上】Takayoshi Awakawa, Nobuyuki Fujita, Masayuki Hayakawa, Yasuo Ohnishi, Sueharu Horinouchi “Characterization of biosynthesis gene cluster for alkyl-<i>O</i>-dehydrogeranyl-methoxyhydroquinones in <i>Actinoplanes missouriensis</i>”</p> <p>(5) 日本ゲノム微生物学会 若手の会(静岡 9/29-30) 中村一成、橋本憲人、堀之内末治、大西康夫「放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> の黄色色素生産に関わる新規な抗転写活性化因子の解析」</p> <p>(6) 第 21 回ドリコールおよびイソプレノイド研究会例会(松江 11/4) 仲野千秋、堀之内末治、大西康夫「放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> 由来の新規セスキテルペン環化酵素の機能解析」</p> <p>(7) 第 55 回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会 (TEAC2011)(筑波 11/19-21) 仲野千秋、堀之内末治、大西康夫「<i>Streptomyces griseus</i> 由来の新規セスキテルペン環化酵素の機能解析」</p> <p>(8) 16th International Symposium on the Biology of Actinomycetes (Puerto Vallarta, Mexico, 12/11-15) Yasuo Ohnishi “Novel regulatory circuits for the morphological and physiological differentiation in <i>Streptomyces griseus</i>”</p> <p>(9) 【同上】Hiroshi Otani, Akiyoshi Higo, Sueharu Horinouchi, Yasuo Ohnishi “An alternative sigma factor governs the principal sigma factor in <i>Streptomyces griseus</i>”</p> <p>(10) 【同上】Akiyoshi Higo, Sueharu Horinouchi, Yasuo Ohnishi “A positive feedback loop between two global regulators AdpA and BldA in <i>Streptomyces griseus</i>”</p> <p>(11) 【同上】Yuji Ishigaki, Genki Akanuma, Saori Kosono-Matsuda, Minoru Yoshida, Sueharu Horinouchi, Yasuo Ohnishi “Identification of lysine-acetylated proteins in <i>Streptomyces griseus</i> and analysis of their physiological functions”</p> <p>(12) 第 6 回 日本ゲノム微生物学会年会(東京 3/10-12) 大谷啓志、大西康夫「なぜ放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> の主要シグマ因子は ECF シグマ因子に制御されるのか」</p> <p>(13) 【同上】肥後明佳、堀之内末治、大西康夫「転写因子 AdpA と tRNA BldA からなるフィードバックループによる <i>Streptomyces</i> 属放線菌の遺伝子発現制御」</p> <p>(14) 2012 年度 日本農芸化学学会大会(京都 3/22-25)一般講演 辻本舞、吉田彩子、富田武郎、大西康夫、葛山智久、西山真「<i>Streptomyces murayamaensis</i> 由来の二次代謝産物生合成に関わるアスパラギン酸キナーゼ(NspJ)の機能解析」</p> <p>(15) 【同上】山本祐梨子、平野節、肥後明佳、堀之内末治、大西康夫「放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> の気中菌糸表層タンパク質遺伝子群の転写調節機構に関する研究」</p> <p>(16) 【同上】大谷啓志、大西康夫「放線菌の定常期への移行と主要シグマ因子発現制御の調節」</p> <p>(17) 【同上】手塚武揚、大西康夫「次世代シーケンサーによる放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> の転写産物の網羅的同定」</p> <p>(18) 【同上】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「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」</p> <p>(19) 【同上】仲野千秋、金孝キョン、大西康夫「放線菌 <i>Streptomyces clavuligerus</i> 由来の linalool/nerolidol 合成酵素の機能解析」</p> <p>(20) 【同上】林貴之、高木基樹、新家一男、大西康夫「<i>Streptomyces</i> sp. RI-18 由来ベンザスタチン類の生合成研究」</p> <p>(21) 【同上】牧野拓也、大野翔登、音松俊彦、原田尚志、三沢典彦、大西康夫「放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> 由来シトクローム P450 の網羅的機能解析」</p>

様式19 別紙1

	<p>(22)【同上】野本竜平、大澤絢子、新藤一敏、松井美里、泉川美穂、金昭ヨシ、高木基樹、新家一男、大西康夫「希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> が生産するカロテノイドの構造決定」</p> <p>(23)【同上】小西健司、藤田信之、早川正幸、大西康夫「希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> の BldD ホモログの機能解析」</p> <p>(24)【同上】乙供かな依、斎藤菜摘、曾我朋義、藤田信之、早川正幸、大西康夫「希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> の運動性胞子におけるエネルギー代謝の解析」</p> <p>(25) 2012 年度 日本農芸化学会大会シンポジウム「多様な生物に見られるユニークな代謝と酵素：機能・進化解析と応用への展望」(京都 3/25) 大西康夫「3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸を前駆体とする放線菌二次代謝産物の生合成経路の解明」</p> <p>一般向け 計 1 件 (1) 第 43 回三省堂サイエンスカフェ(東京 11/26) 大西康夫「微生物を生産工場とした新しい『ものづくり』」</p>
図書 計 0 件	
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)	
国民との科学・技術対話の実施状況	<p>(1) サイエンスカフェ 三省堂サイエンスカフェ(共催:財団法人農芸化学研究奨励会、日本学術会議農芸化学分科会)、11/26、三省堂書店神保町本店 2 階 UCC カフェコンフォート、対象者:一般、約 25 名 「微生物を生産工場とした新しい『ものづくり』」と題した講演を行い、微生物がもつ大きな可能性について解説した。また、参加者からのいろいろな質問に答えた。</p> <p>(2) 市民向け講座における微生物の顕微鏡観察体験 日本学士院第 4 回学びのスズメシリーズ講演会(「見えない巨人—微生物—」別府輝彦東大名誉教授)、12/10、日本学士院(東京・上野)、対象者:中高生、約 100 名 講演後の顕微鏡観察体験に協力した。光学顕微鏡による枯草菌胞子およびグラム染色した細菌標本の観察、実体顕微鏡によるコウジカビの観察を中高生に体験してもらい、手伝いの大学院生らが「微生物の世界」を解説した。</p>
新聞・一般雑誌等掲載 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 (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	0	60,570,000	0
間接経費	37,800,000	19,629,000	0	18,171,000	0
合計	163,800,000	85,059,000	0	78,741,000	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	62,072,739	0	0	62,072,739	47,626,239	14,446,500	0
間接経費	19,629,000	0	0	19,629,000	0	19,629,000	0
合計	81,701,739	0	0	81,701,739	47,626,239	34,075,500	0

3. 当該年度の執行額内訳 (単位:円)

	金額	備考
物品費	23,496,874	実験試薬、プラスチック器具等
旅費	1,982,210	研究成果発表旅費(16th International Symposium on the Biology of Actinomycetes等)
謝金・人件費等	17,559,999	博士研究員人件費、事務補佐員人件費
その他	4,587,156	スポット解析(DNAシーケンス)、学会誌投稿料など
直接経費計	47,626,239	
間接経費計	0	
合計	47,626,239	

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		