

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24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

項目（1）抗インフルエンザウイルス活性物質 wickerol の生産菌である *Trichoderma atroviride* のドラフトゲノムシーケンスから見いだした diterpene cyclase について大腸菌または真菌である *Aspergillus oryzae* で発現させて精製した組換え酵素の詳細な反応機構について、種々のラベル化基質を利用して解明するとともに、本酵素の X 線結晶解析のため、良好な結晶の調製条件を探索する。また、*A. oryzae* などを用いた異種菌での wickerol の大量生産系を開発する。項目（2）抗結核菌活性物質 caprazamycin に関しては、昨年度作製に成功した caprazol 生産菌から caprazol を大量に精製するための方法を確立する。ついで、別の機能未知な caprazamycin 生合成遺伝子の破壊株が蓄積する中間体の大量調製と構造を明らかにし、さらには、該中間体の誘導体を複数合成し、caprazamycin と同等またはそれ以上の抗結核菌活性を示す誘導体を開発する。項目（3）15 株程度の放線菌のドラフトゲノムシーケンシングとアノテーションを行い、Wickerol や caprazamycin のみならず、その他の化成品や医薬品原料の生産に将来資することを見込んで、そのゲノムシーケンスから生産されると予想される有用物質の生合成マシナリーを明らかにする。

2. 研究の実施状況

項目（1）抗インフルエンザウイルス活性物質 wickerol の生産菌である *Trichoderma atroviride* のドラフトゲノムシーケンスから見いだした diterpene cyclase の機能を解析すべく、5 種の酵素を精製し調製を試みたが、様々な条件を検討したにも関わらず大腸菌での調製が難航し、さらに *Aspergillus oryzae* を用いた方法に切り替えたものの、形質転換の効率を改善できず当該年度においては機能解明には至らなかった。項目（2）昨年度作製に成功した caprazol 生産菌を用いて caprazol を大量に調製するための培地と精製方法を確立することができた。さらには、新たに機能未知な caprazamycin 生合成遺伝子の破壊株を作製することに成功した。これらの破壊株が蓄積する中間体の生産条件と各種クロマトグラフィーを用いた精製方法を検討することにより、それら中間体の化学構造を各種スペクトル解析を駆使することにより決定することができた。これらの構造はいずれも、caprazol とは異なっており新規化合物であることが判明した。項目（3）20 株の放線菌のドラフトゲノムシーケンス解析を行った。その結果を活用して、抗生物質をはじめとする多様な有用化合物を生産し産業上重要な微生物である放線菌から、アミノ酸の一種であるトリプトファンの新しい代謝経路

様式19 別紙1

を発見した。また、この代謝経路によってニトリル基を持った新しいインドール誘導体が生産されることも明らかにした。その他にも、新しいテルペンを生産するための遺伝子や特異なアミノ基転移酵素遺伝子の同定にも成功した。これらの発見についてはいずれも科学論文として発表済みである。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 3 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 2 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Isogai Shota, Nishiyama Makoto, Kuzuyama Tomohisa. Identification of 8-amino-2,5,7-trihydroxynaphthalene-1,4-dione, a novel intermediate in the biosynthesis of Streptomyces meroterpenoids. <i>Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters</i>. 2012. Sep 15;22(18):5823-6. 2. 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 <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 1 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 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>. Epub 2013. Feb 19. doi: 10.1074/jbc.M112.436451.
<p>会議発表 計 25 件</p>	<p>専門家向け 計 25 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 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、大阪市立大学大学院理学研究科 2. 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 3. 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」 4. 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 5. 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 6. 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 7. 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 8. 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 9. 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 10. 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.

様式19 別紙1

	<p>SANK60404」、Nottingham 大学 (英国)、平成 24 年 9 月 19-21 日、Directing Biosynthesis III, Royal Society of Chemistry</p> <ol style="list-style-type: none"> 11. 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 12. 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 13. 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 14. 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 15. 林健文, 西山真, 葛山智久, 「Saccharothrix 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 16. 白石太郎, 西山真, 葛山智久, 「新規スクレオシド系抗生物質 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 17. 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 18. 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 19. 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 20. 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 21. 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プレニルジリ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 22. 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 23. 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 24. 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 25. 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>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 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>http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/biotec-res-ctr/saiboukinou/</p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>1. 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。</p>

様式19 別紙1

	<p>2. 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。</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

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ず

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	132,000,000	97,572,000	22,436,000	11,992,000	0
間接経費	39,600,000	29,271,600	6,730,800	3,597,600	0
合計	171,600,000	126,843,600	29,166,800	15,589,600	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	0	22,436,000	0	22,436,000	22,436,000	0	0
間接経費	0	6,730,800	0	6,730,800	295,650	6,435,150	0
合計	0	29,166,800	0	29,166,800	22,731,650	6,435,150	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	13,556,143	振とう培養装置、ゲル撮影装置、冷凍庫、試薬類
旅費	3,322,510	研究成果発表旅費(英国ノッチンガム大学等)4名
謝金・人件費等	0	
その他	5,557,347	英文校正、シーケンス解析、学会参加費
直接経費計	22,436,000	
間接経費計	295,650	
合計	22,731,650	

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
振とう培養装置	BR-43FH・M R	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-6932GLE SCP-1	1	931,665	931,665	2013/1/25	東京大学