

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25年度)**

本様式の内容は一般に公表されません

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

抗インフルエンザウイルス活性物質 *wickerol* に関しては、前年度までに、その生産菌である *Trichoderma atroviride* のドラフトゲノムシーケンスデータから *wickerol* の生合成に関与する生合成遺伝子を見出した。その後、異種生物による *wickerol* の生産を目指していたが、現在までの所、*wickerol* の異種生産には至っていない。本年度は、ベクターの変更や異種生物を変更するなどの条件検討を行うことで、*wickerol* の異種生産系の構築を目指す。抗結核菌活性物質 *caprazamycin* に関しては、前年度までに、生合成遺伝子クラスターの取得と生合成酵素の一部機能の解明に成功するとともに、機能未知生合成遺伝子の破壊株が蓄積する中間体の構造を一部明らかにすることができた。最終年度は、これまでに作製できたその他の破壊株が蓄積する中間体を同定することで、*caprazamycin* 生合成経路の全容を解明する。さらには、引き続き、*Wickerol* や *caprazamycin* のみならず、これまでに放線菌などの微生物のドラフトシーケンスデータから見出した有用物質(オーキシン様物質、ポリケチド系化合物、ホスホン酸化合物)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* に関しては、発現ベクターの変更、シャペロンベクターとの共存、宿主大腸菌の変更、変異の導入、麹菌 *Aspergillus oryzae* 宿主の利用など、あらゆる手段を尽くして *wickerol* 合成テルペン環化酵素の候補遺伝子の絞り込みを続けたが、結局いずれの候補遺伝子も *wickerol* の合成能を示さないことが分かった。このことは、*wickerol* 合成テルペン環化酵素が通常の相同性検索だけでは取得し得ない新奇なアミノ酸配列をもつことが強く示唆された。項目(2)抗結核菌活性物質 *caprazamycin* に関しては、これまでに作製した各種 *caprazamycin* 生合成遺伝子の破壊株の培養条件を検討し、それらが蓄積する中間体のを各種クロマトグラフィーで精製した。次いで、質量分析や核磁気共鳴装置解析を行ったところ、真の生合成中間体は、最終産物の *caprazamycin* には存在しないリン酸基が付加したままの構造を有しており、*caprazamycin* の生合成がリン酸化体のまま進行することが判明した。現在、*caprazamycin* 生合成経路のほぼ全容を明らかにしつつある。また、各種 *caprazamycin* 生合成遺伝子のコードするタンパク質を大腸菌で発現させて可溶性酵素として精製することに成功した。項目(3)これまでに35株の微生物のドラフトゲノムシーケンス解析を行った。その結果を最大限活用して、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、50年間未同定だった新規なテルペ

様式19 別紙1

ン環化酵素を発見するとともに、コンポストから単離された新規な好熱菌から、新規な3種の生物活性物質を同定することができた。また、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。

3. 研究発表等

雑 誌 論 文 計 8 件	(掲載済み一査読有り) 計 7 件 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> . 2013. 288: 9946-56. http://www.jbc.org/content/288/14/9946.long 2. 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 3. 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 4. 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 5. 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 6. 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 7. 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 Diphosphate Synthase Superfamily. <i>Journal of the American Chemical Society</i> . 2014. 136: 4837-40. http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja500270m
	(掲載済み一査読無し) 計 0 件
	(未掲載) 計 1 件 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). <i>The Journal of Antibiotics</i> . (accepted)

様式19 別紙1

<p>会議発表表</p> <p>計29件</p>	<p>専門家向け 計 29 件</p> <p><u>11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、「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 2. 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 3. 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 4. 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 5. 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) 6. 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 7. 白石太郎、西山真、葛山智久、「スクレオニド系新規化合物 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 8. 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 9. 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 10. 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 11. 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 12. 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 13. 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 14. 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 15. バクジンスー、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 16. 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 17. インタンティムールマイシヤラ、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 18. 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 19. 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 20. 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 21. 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 22. バクジンスー、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 23. 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 24. 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」、
--------------------------	--

様式19 別紙1

	<p>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>25. 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>26. 白石太郎、西山真、葛山智久、「ヌクレオシド系抗生物質 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>27. 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>28. 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>29. 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 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>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/biotec-res-ctr/saiboukinou/research/index.html</p>
<p>国民との科学・技術対話の実</p>	<p>1. 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。</p> <p>2. 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。</p>

様式19 別紙1

施 状 況	
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	

4. その他特記事項

当該プログラムの研究課題を共同で実施してくれていた博士課程の学生が、その実力を認められ、平成26年4月1日より、私の研究グループの助教に就任した。

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	132,000,000	120,008,000	11,992,000	0	0
間接経費	39,600,000	36,002,400	3,597,600	0	0
合計	171,600,000	156,010,400	15,589,600	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	0	11,992,000	0	11,992,000	11,992,000	0	0
間接経費	6,435,150	3,597,600	0	10,032,750	10,032,750	0	0
合計	6,435,150	15,589,600	0	22,024,750	22,024,750	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	7,416,808	振とう培養装置、試薬類等、プラスチック容器等
旅費	1,582,299	成果発表(国内10回、国外1回)、情報収集3回
謝金・人件費等	2,228,335	特定研究員1名x3ヶ月、研究補助員1名x9ヶ月
その他	764,558	英文校正、シーケンス解析、学会参加費
直接経費計	11,992,000	
間接経費計	10,032,750	
合計	22,024,750	

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	G・BR-200	1	1,971,396	1,971,396	2013/4/26	東京大学
				0		
				0		