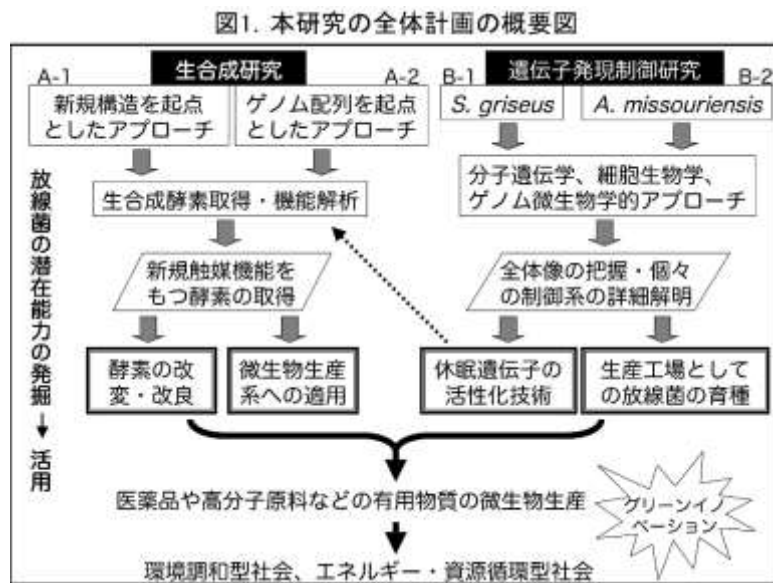


最先端・次世代研究開発支援プログラム
事後評価書

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

【研究目的】

味噌・醤油・清酒などの発酵食品製造の長い歴史をもつ我が国は、高い微生物利用技術を有しており、アミノ酸発酵や核酸発酵という独自の発酵産業を生み出すとともに、新規抗生物質の発見や製造に関しても、世界に追いつき世界をリードしてきた。しかしながら、近年、地球温暖化・環境破壊を防止する



ため新たな微生物利用技術が世界中で模索されており、微生物利用技術に関する我が国の優位性が脅かされつつある。さまざまな方面で次世代微生物利用技術を創出していくことは我が国の重要な課題の1つである。

本研究課題担当者は、これまで医薬品や高分子原料などの有用物質の微生物生産に関わる基礎・応用研究を行ってきたが、この研究が次世代微生物利用技術の大きな柱になると確信している。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・イノベーションを創出するため、抗生物質をはじめとした多種多様な生理活性物質の代表的な生産菌であり物質生産に応用できる有用酵素の宝庫である放線菌に標的を絞って研究を行う。具体的には、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に資することを目的に、「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「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（図1参照）。

研究開始時点において次の具体的な研究目標を設定した。生合成研究において、「新規構造を起点としたアプローチ」では、期間内に新規な生合成酵素を最低10個は取得・解析する。また、「ゲノム配列を起点としたアプローチ」では、すでに解析中のものを含めて、60個程度の生合成酵素遺伝子の機能解析に取り組み、最低10個につ

いて、その触媒反応を明らかにする。一方、遺伝子発現制御研究において、「*S. griseus*を対象とした研究」では、個々の制御系の解析として、(i) グローバル転写因子 AdpA の新規標的遺伝子の機能解明、(ii) Wb1A や BldM などの制御因子による遺伝子発現制御機構の解明、(iii) 抗転写活性化因子を介したグリキサゾン生合成遺伝子群の発現調節機構の解明、(iv) 新規 ECF シグマ因子によるグローバルな遺伝子発現制御機構の解明、を行う。また、全体像の把握という方向からは、(v) RNAseq による網羅的な転写開始点およびオペロン構造解析を行い、その結果より新たな研究を開始する。一方、「*A. missouriensis*を対象とした研究」では、(i) 運動性胞子のべん毛・走化性に関する遺伝子群の機能とその発現制御機構の解明、(ii) 胞子嚢から胞子が泳ぎだす際の分子機構の解明、(iii) 胞子出芽に重要な遺伝子の同定、(iv) 運動性胞子内でのエネルギー代謝様式の解明、を行う。

【総合評価】

○	特に優れた成果が得られている
	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

【所見】

① 総合所見

放線菌を対象にして有用物質生産を最終ターゲットに、①ユニークな部分構造を持つ化合物の目的部分の生合成酵素の取得と、②潜在している生合成能力を顕在化させるための遺伝子制御システムの解明、の二つのプロセスでの展開を行う。放線菌の潜在能力の発掘と利活用を目指し、そこに革新的な視点と独創的な視点を見出すべく多彩な研究が展開され、全体としてはほぼ計画に沿って展開され、所期の目的を達成し、優れた成果を上げている。当初、研究内容が広範囲にわたり、まとまりに欠けることが懸念されたが、いずれの課題についても極めて精力的に取り組み先進的な成果を多数あげている。例えば、生合成に関する研究では、CYP102 が極めてユニークな反応を触媒できることを明らかにし、企業との共同出願に向けて準備を進めるとともに、新規性の高いジアゾ基合成酵素の同定を同定するなど特筆すべき成果を上げるなど、*S. griseus* 研究では二次代謝・形態形成に関わる遺伝子発現制御機構の理解を大幅に深化させた。

S. missouriensis の研究は、運動性胞子の研究を中心に展開され、新たな分子生物学的成果に加えて、生理活性物質を生産する放線菌の世界を拡大する重要な知見の蓄積が進んでいる。「希少放線菌の分子生物学」という新たな研究領域の開発にも接近している。著名な放線菌や希少放線菌を対象に、この分野での優位性を誇示するに足る多くの、重要な知見が得られている。基礎、応用両面での新たな研究分野の創生につながるものであり、ブレークスルーと言える研究成果である。単なる珍しい微生物ではなく、有用二次代謝産物のソースとしての可能性が指摘されてきた産業上重要になり得る微生物であるため、その意義は大きい。

本研究は、次の放線菌研究の在り方、延いては次世代の応用微生物学の方向性を示す

上でも大きな成果を上げたと評価できる。

本研究課題は、グリーン・イノベーションにつながるシーズの発掘に重点を置いて展開された基盤研究であり、直接的な社会・経済への波及効果を現時点で述べることは難しい。しかしながら、研究課題担当者は、産業への貢献ということも十分意識して研究を展開しており、今後も応用につながる研究を意識していくことで、本研究プロジェクトで得られた成果を、学問の発展に加え、社会に還元していく方向での努力も続けてゆくものと期待される。

② 目的の達成状況

・ 所期の目的が

(全て達成された ・ 一部達成された ・ 達成されなかった)

新規構造を起点としたアプローチによる生合成研究では、7種類の化合物の生合成遺伝子クラスターの取得に成功し、生合成酵素の機能解析を行ってきた。その中で非常に興味深い反応を触媒することが強く示唆されている酵素を10個以上取得している。In vitro 解析の結果を待たなければいけないものもあるが、当初計画は十分達成できているといえる。

ゲノム配列を起点としたアプローチによる生合成研究では、テルペン環化酵素 14 分子種、P450 モノオキシゲナーゼ 30 分子種に加え、II 型ポリケチド合成酵素 (PKS) 関連の酵素遺伝子約 10 個について、ゲノムマイニング的研究を行った。そのうち、テルペン環化酵素 10 種、P450 モノオキシゲナーゼ 4 種の触媒反応を明らかにしている。新規な反応を触媒するテルペン環化酵素を 1 種、極めてユニークな反応を触媒できる P450 モノオキシゲナーゼを 1 種取得できており、当初目標以上の進展であるといえる。*S. griseus* を対象とした遺伝子発現制御研究では、(i) グローバル転写因子 AdpA の新規標的遺伝子の機能解明、(ii) WblA や BldM などの制御因子による遺伝子発現制御機構の解明、(iii) 抗転写活性化因子を介したグリキサゾン生合成遺伝子群の発現調節機構の解明、(iv) 新規 ECF シグマ因子によるグローバルな遺伝子発現制御機構の解明、を行った。また、全体像の把握という方向からは、(v) RNAseq による網羅的な転写開始点およびオペロン構造解析を行う 5 項目の研究がほぼ完了しており、さらに、いくつかの個別の制御系の研究 (グリキサゾン制御に関わる新規膜タンパク質の同定、グリシンリボスイッチによるグリシン代謝系の制御、放線菌の核様体関連タンパク質 sIHF の機能解析など) が進んでおり、当初計画以上の進展であるといえる。

A. missouriensis を対象とした遺伝子発現制御研究でも、(i) 運動性胞子のべん毛・走化性に関する遺伝子群の機能とその発現制御機構の解明、(ii) 胞子嚢から胞子が泳ぎだす際の分子機構の解明、(iii) 胞子出芽に重要な遺伝子の同定、(iv) 運動性胞子内でのエネルギー代謝様式の解明、の研究が着実に進展している。分子レベルでの機能解明が必要であるが、新しい「役者」の同定に成功しており、希少放線菌の分子生物学の新しい流れを明確に打ち出すことができた。ほぼすべての目標を達成していると評価できる。

③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が
(■ある ・ □ない)

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が
(■創出された ・ □創出されなかった)

・当初の目的の他に得られた成果が (□ある ・ ■ない)

新規構造を起点としたアプローチによる生合成研究

図2に示した7つの化合物の生合成遺伝子クラスターの取得に成功した。

特徴的な tetrahydroquinoline 骨格あるいは indole 骨格を有する benzastatin 類に関しては、生合成遺伝子を組み合わせることで異種発現することによって、全く未知であった生合成経路および各ステップに関連する酵素をほぼ明らかにした。多置換インド

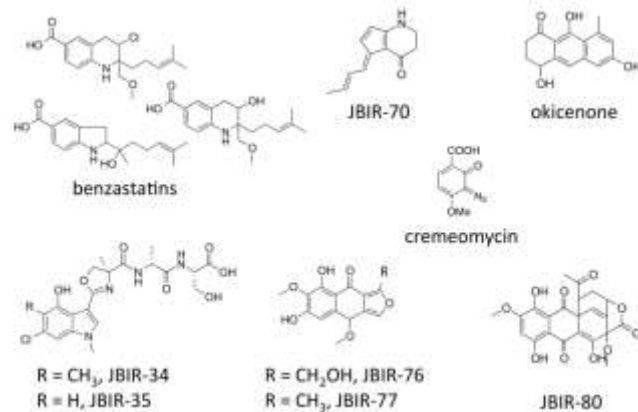
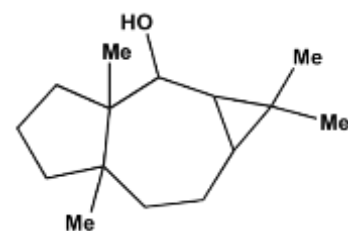


図2. 生合成研究の対象化合物

ール環を含むペプチド化合物 JBIR34/35 については、遺伝子破壊により、生合成経路・酵素をほぼ明らかにした (論文発表)。D-alanine から α -methyl-L-serine を合成する新規酵素 FmoH については、in vitro 酵素反応により、その活性を確認した。in vitro での基質特異性アッセイにより、 α -methyl-L-serine を取り込む NRPS、FmoA3 がこのアミノ酸を基質として好むことを示した。I 型 PKS で合成される含窒素ポリケチドである JBIR-70 についても、遺伝子破壊により、生合成経路がほぼ明らかになった。新規イソフラノナフトキノン JBIR-76/77、三環性ポリケチド okicenone、複雑な環構造を有するポリケチド JBIR-80 については、遺伝子破壊によって重要なステップを触媒する酵素の絞り込みが完了し、生合成経路を推定することができている。また、3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸由来の化合物 クレメオマイシン についても、その生合成経路の大部分が解明できた。ジアゾ基合成酵素の同定は特筆すべき成果であり、新規性が極めて高い。以上の解析において、非常に興味深い反応を触媒することが強く示唆されている酵素を 10 個以上取得した。

ゲノム配列を起点としたアプローチによる生合成研究

テルペン環化酵素 14 分子種、P450 モノオキシゲナーゼ 30 分子種に加え、II 型ポリケチド合成酵素 (PKS) 関連の酵素遺伝子約 10 個について、ゲノムマイニング的研究を行った。そのうち、テルペン環化酵素 10 種、P450 モノオキシゲナーゼ 4 種の触媒反応を明らかにした (論文発表)。全く新規なセスキテルペン (図3) の合成を触媒する



テルペン環化酵素 (TC1) を 1 種取得できた。

また、P450 モノオキシゲナーゼの 1 つ (SC12 株由来の CYP102) が極めてユニークな反応を触媒できることを明ら

かにし、企業との共同出願に向けて準備を進めている。

S. griseus 由来 P450 に関する一連の研究において、P450 と電子伝達タンパク質とその還元酵素の間の「相性」についての知見が得られたことは、大きな成果である。

図 3. 新規テルペン

S. griseus を対象とした遺伝子発現制御研究

これまでに、AdpA 結合部位の ChIP-seq 解析や *adpA* 破壊株と野生株の比較トランスクリプトーム解析を詳細に検証し、AdpA レギュロンの全体像やグローバル転写制御因子 AdpA の特性について明らかにした (論文発表)。また、AdpA の標的遺伝子の解析では、特殊な遺伝子の発現制御に関与する tRNA をコードする *bldA* の解析を完了し、AdpA と BldA からなる正のフィードバックループが本菌の二次代謝・形態分化の制御に極めて重要であることを示すことができた (論文発表)。さらに、形態分化に関わる制御因子 Wb1A、二次代謝に関わる RNA 結合タンパク質 SGR3226 および形態分化に関わる分子機能不明のタンパク質 SGR2148 をコードする遺伝子が AdpA の直接の標的遺伝子であることを証明するとともに、その機能解析を完了した (論文投稿準備中)。一方、主要シグマ因子を制御する新規 ECF シグマ因子の解析を完了した (論文発表)。制御因子 BldM については、標的 DNA との結合を詳細に調べたが、その制御様式については不明な点が残されている。グリキサゾン合成の制御機構では、抗転写活性化因子 GriU の機能解析を中心に *in vivo*、*in vitro* の両面で研究を進めてきた。また、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 (RNAseq) を行い、新しい研究課題 (多数の遺伝子を制御する未知シグマ因子の同定など) につながっている。さらに、グリキサゾン過剰生産自然変異株のゲノム解読により、二次代謝と形態分化に影響を与える新規遺伝子 (膜タンパク質をコード) を同定することに成功し、その分子機能について解析を行った。

A. *missouriensis* を対象とした遺伝子発現制御研究

走化性に関するケモレセプター (21 種類) については、蛍光タンパク質との融合による細胞内局在解析を行い、複数のケモレセプターが細胞膜上のランダムな位置に数個のクラスターを形成することを明らかにした。また、ケモレセプター遺伝子破壊株を多数作製した。べん毛遺伝子クラスター近傍に存在する OmpR 型のアクチベーターをコードする *tcrA* の遺伝子破壊株では、孢子嚢中で不適切な孢子の発芽が起こっていることを透過型電子顕微鏡観察で明らかにした。一方、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 (HhkA) をコードする遺伝子を破壊した株でも、同様の表現型が観察された。mRNAseq 解析により、孢子嚢形成時に引き起こされる遺伝子発現を網羅的に解析するとともに、*tcrA* 破壊株、*hhkA* 破壊株との比較トランスクリプトーム解析も行い、TcrA、HhkA の制御下にある遺伝子に関して重要な情報が得られた。一方、プロテオーム解析により見出した DNA 結合タンパク質 (BldD ホモログ) に関する解析も行い、本タンパク質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グローバルな転写因子であることを明らかにした。また、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唆する結果が得られ、孢子嚢中の休眠孢子の糖染色 (透過型電子顕微鏡) によって、糖の蓄積が確認できた。さらに、孢子嚢から孢子が泳ぎ出すシグナルになっている物質に関して探索し、ヒスチジンがこの機能を有していることを明らかにした。また、運動性孢子の出芽にともない、

べん毛の回転が止まることを明らかにしたが、べん毛回転の停止に関する遺伝子を同定することに成功し、この遺伝子の過剰発現により胞子の運動性が完全に失われることを明らかにした。トラッキング顕微鏡を用いて、胞子運動の詳細も解析した。

先進性・優位性、ブレークスルーと呼べる成果

本研究で得られた成果は、基礎、応用両面での新たな研究分野の創生につながるものであり、上記のように新規性・優位性の高いものが多く含まれ、ブレークスルーと言える研究成果である。*S. missouriensis*の研究は、単なる珍しい微生物ではなく、有用二次代謝産物のソースとしての可能性が指摘されてきた産業上重要になり得る微生物であるため、その意義は大きい。

一方、微生物による物質生産という観点からすると、先進性、優位性の真の評価は実用上どれだけインパクトを与えるかにある。これら研究が真にブレークスルー果たしたと言えるか否かは、実用段階の価値にある。本研究の価値を決める上で、研究成果の産学連携による実用化推進は大きな意味を持つと考えるが、その取り組みも積極的に進めている点も高く評価したい。

本研究においては、多くの重要な成果が挙げられているが、当初から目的としていた範囲内にあり、目的以外の成果とはし難い。

④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が

(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が

(見込まれる ・ 見込まれない)

放線菌の潜在能力を発掘・活用するための「基盤研究」として、「研究成果の先進性や優位性及び特記事項」に記述した通り、大きな成果があがっている。本研究で得られた成果は、先端的な科学の潮流を意識した優れた成果であり、放線菌のみならず、微生物全般の関連研究分野の発展に大きな貢献が期待できる。

生合成研究： 国内外で二次代謝産物生合成に関する研究は盛んに行われている。本研究プロジェクトでは、産総研が発見したユニークな化学構造をもつ化合物（論文未発表のものも含む）を標的とすることによって、オリジナリティーの高い研究を展開しており、新規性の高い成果が得られている。一方、テルペン環化酵素やP450のゲノムマイニング研究では、当初の期待通り、「反応のタイプは予想できるが、その基質特異性や反応特異性が新奇な酵素」を取得することに成功している。このように、本研究では、「新規構造」と「ゲノム配列」をそれぞれ起点とした2つのアプローチが、いずれも有効であることをあらためて示すことができた。大きな研究分野を新しく作るというところまではいかないまでも、関連研究分野の発展に対する貢献は極めて大きいと考えられる。

遺伝子発現制御研究： *S. griseus*の研究は、モデル放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)を対象にした研究と双璧をなすものとして、以前から高く評価されてきた。本研究プロジェクトにおいて、これまでの研究を深化させることができたことの意義は大きい。新規性が高いと考えられる酵素を複数同定しており、新規有用低分子の生産につながる可能性のある成果を挙げていると言える。近年、この研究分野

においても中国の研究者が台頭してきている。平成 25 年の 4 月には、本研究分野をリードする欧州の研究者を北京に集め、「放線菌の抗生物質生産の生物学に関する第一回中国・欧州シンポジウム」が開催され、日本と韓国から各 1 名が特別に招待されたが、研究代表者はこの特別招待講演者に選ばれ、本研究成果の 1 つについて講演した。今後も着実に研究を進め、プレゼンスを示し続けることが重要である。

一方、*A. missouriensis* の研究では、「希少放線菌の分子生物学」という新しい研究分野を切りひらいている。希少放線菌は生理活性物質の新たな探索源として注目を集めており、本研究は基礎生物学上重要であるだけでなく、応用研究面からも、今後、注目を集めていくものと期待している。

環境調和型社会、エネルギー・資源循環型社会といった我が国が(そして世界が)目指すべき社会の構築において、微生物利用技術の有用性は明らかである。例えば、化成品製造過程の化学合成反応のバイオプロセスへの転換や、石油由来であった原料化合物を発酵生産により供給することによって、省エネルギー・低炭素化に大きく貢献することができる。さらに、組換え微生物を用いることで、天然には存在しない化合物を創製することも可能になるが、これは新規医薬品の開発や機能性高分子の開発につながる可能性がある。

⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが (行われた ・ 行われなかった)

ユニークな構造を持つ有機化合物の、化学合成法では難しい(環境面、エネルギー消費面等からの判断)部分を、生合成出来る酵素群の把握、活用と、微生物の持つ顕在化していない機能(特に生合成能)を顕在化する目的と、その実現のためのプロセスは適切であった。同時並行で独立した複数のテーマを遂行し、所期の目的を果たした研究展開のマネジメントは極めて適切であったと言える。研究開始時に、「この研究は総花的で重心がない」と云う指摘がなされた。この指摘に対する対応と研究の再構築もこの課題の成果を得つつ適切にマネジメントされたと考えられ、十分な研究成果が得られている。研究計画、研究実施体制、研究に対するマネジメントも優れている。敢えて言うならば、グリーン・イノベーション進展の一環としての研究であれば、当然実用化が最終目的になるが、基礎的研究の成果を実用化に繋げるステップが現時点ではまだ固まっていない部分がある。研究内容から、一部については知的財産権の取得も視野に入っていると考えられるが、現時点では企業との連携を優先させていると見受けられる。

助成金の活用については、適切に行われている。

成果の公表については、下記の通り積極的に行っている。また、国民との科学・技術対話についても、おおむね適切に行われている。

雑誌論文：合計 21 件(掲載済、査読有 20 件、査読無 1 件)

会議発表：合計 93 件(専門家向け 90 件、一般向け 1 件)

図書：合計 2 件

新聞・一般雑誌等掲載：1 件

知的財産権：0 件

国民との科学・技術対話：合件 6 件

その他の発信：研究室、所属機関のホームページで研究内容を発信している。