

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22108001

研究課題名（和文）生合成マシナリー研究の総括

研究課題名（英文）Biosynthetic machinery: Deciphering and regulating the system for creating structural diversity of bioactive metabolites

研究代表者

及川 英秋 (Oikawa, Hideaki)

北海道大学・理学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：00185175

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 41,400,000 円

研究成果の概要（和文）：“生物活性天然物の生合成酵素の集合体である生合成マシナリーの構築を円滑に進める”ために設定した3つの班の連携、領域の成果の効果的な発表、新たな領域の将来を担う若手研究者の育成を様々な手法で行った。具体的には、注目する天然物の生合成経路を調べるデータベースやゲノムデータから天然物の生合成遺伝子クラスターを同定するWebツールをA03班員による開発と無料公開；主にA02班員が持つ有用な技術や方法論の移転；若手研究者を主体とした国内や国際シンポジウムを企画・運営の支援；構成される3班を横断する共同研究の推進；領域活動の積極的な公表等が挙げられる。

研究成果の概要（英文）：To facilitate reconstitution of the biosynthetic machinery consisting of representative skeletal construction enzymes and widespread modification enzymes, organizing team encouraged collaboration of three individual groups, effective presentation of research results to public, and incubation of young researchers in various way. These included development of database for examining biosynthetic pathway of target product, and Web tool for identify target biosynthetic gene clusters from draft genome data; transferring useful expression systems; supporting organization of domestic and international symposium by young researchers; helping start of collaborative researches in project members.

研究分野：生物有機化学

キーワード：生合成 物質生産 二次代謝産物 抗生物質 抗腫瘍性物質 バイオインフォマティクス メタボローム ゲノム

1. 研究開始当初の背景

生物は何億年も進化の過程で自然淘汰というスクリーニングを通して、多様な生物活性を有する構造多様性に富んだ二次代謝産物(天然物)を進化させてきた。19世紀以降化学者は、天然物の化学構造を明らかにするため、合成により構造を確認してきており、ストリキニーネ、ビタミン B₁₂ など多くの官能基を有する複雑な天然物の合成は、チャレンジングなテーマであり、有機化学発展の一翼を担ってきた。しかしノーベル賞の対象となった優れた反応が数多く開発され有機合成の技術が格段に進化した現在でも、これら分子の合成は容易ではない。一方生物は酵素という優れた分子認識能を有する触媒を用い、たった一つの細胞という反応容器を使って、複雑な分子の多段階合成を収率良く達成している。酵素は活性部位において基質より生じた不安定な活性種や分子の特定の配座を安定化させるため、有機合成上困難な反応でも一分子一分子変換するナノサイズのマシンであり、生合成酵素の集合したシステムは生合成マシナリーとも呼ぶべき装置である。このシステムの理解が進めば、ペニシリンやバンコマイシンなどと同様に医薬品候補として多様な分子を創り出すことができるはずである。また、有機溶媒不要で、生命維持と同じエネルギー源を用いた化学変換法は、酵素によるアクリルアミドの工業生産のように地球温暖化対策に合致する環境に優しい物質生産法としても期待される。ここ20年間の生合成マシナリーに関する精力的な研究により塩基配列情報を利用した生合成遺伝子の同定が可能になると同時に生化学的理解が深まり、ほぼ6種に大別される基本骨格合成経路と修飾反応の組み合わせからなる多様性創出機構の概要が提出された。これまでゲノム上に存在する生物固有の天然物の設計図(生合成酵素遺伝子)は、単離・同定に多大な労力がかかったが、次世代シーケンス法の登場によりゲノム情報から容易に入手可能になった。機を同じくして微生物への多数の遺伝子導入法が提案され、生合成マシナリーの再構築による複雑な機能分子の合成は、現実のものとなりつつある。

2. 研究の目的

標的二次代謝産物の構造およびバイオフィンフォマティクスを駆使してゲノム上の設計図を解読し、論理的に反応経路や出発物質を推定する方法論を開発する。多段階の変換反応を解き明かしながら、既存の手法、新たに考案された遺伝子導入法を用いて代表的骨格合成酵素と典型的修飾酵素からなる生合成マシナリーを再構築して有用物質の生産を行うとともに、分子進化的に興味深いその多様性創出の機構を探る。

3. 研究の方法

本研究領域は、有機化学、生物情報学、微

生物遺伝学などの幅広い分野にまたがる計画研究および公募研究班員の連携によって構成される。従って、研究班員間の密接な連携と有機的かつ補完的な共同研究を組織することができれば、飛躍的な成果が期待できる。総括班は、これらの連携強化のために、計画研究代表者と評価委員によって構成し、公募班員も含めた班員間の密接な連絡と共同研究促進の体制整備に努める。各研究項目の有機的な連携が実現するように、各項目の計画研究代表者9名で総括班を構成し、研究項目間の緊密な研究協力体制の構築を促すとともに、領域全体の運営のため、領域代表および各班の班長が企画調整にあたり、事務連絡、広報の役割をそれぞれが担う。さらに、計画研究の企画立案および公募研究のテーマの概略を作成する。公募研究については各研究項目に若手研究者を中心に萌芽的研究および異分野融合的研究を積極的に取り上げる。また、なるべく早い時期に計画班および関連の研究者を招いて、シンポジウムを開催し、領域の目的を広く伝えることにする。

ゲノム解析、メタボローム解析データや、生合成マシナリーに関するデータベース、解析プログラムの無償でのウェブ発信を通して、最先端の情報を共有することにより、各研究項目の間での緊密な共同研究を推進する。具体的には年1~2回の全体シンポジウムの際の研究会議に加えて、web上に開設するフォーラムによる実験技術情報の交換などにより、本研究の効率的な推進を図る。フォーラムの運営には担当の総括班員を配置する。得られた研究成果は、公開シンポジウムや国際シンポジウムなどで、若手にも発表する機会を積極的に与えるなど広く国内外に発信する。また、従来、生合成遺伝子の取得等、酵素による物質生産には研究手法の面で大きな障害があったが、研究環境の変容により本申請には新規参入者が増加することが期待される。この状況をふまえ、フォーラムおよびデータベースの利用法を充実させ、意欲有る若手研究者が、容易に研究に着手できる環境づくりを行う。計画研究については2年度末までの成果を中間的にとりまとめ、研究計画の見直しを行う。公募研究について、一定の成果をあげ今後の発展が見込まれる者の他は基本的に2年度に入れ替えることとし、2年度とほぼ同規模で新規の公募研究を採択する。最終年度の5年度目は、計画研究に関しては、生合成マシナリーの構築と構造多様性創出に関する成果を重視した研究を推進する。

4. 研究成果

目的とする“生物活性天然物の生合成酵素の集合体である生合成マシナリーの構築を円滑に進める”ために設定した3つの班の連携、領域の成果の効果的な発表、新たな領域の将

来を担う若手研究者の育成を様々な手法で行った。

まず注目する二次代謝産物（主に植物）の生合成経路を調べる目的で、生物種/酵素/酵素反応データを集積したデータベース Motorcycle DBは、A03班員の金谷らによって開発された。そして2年目から無料で公開され、主に3班の班員を中心にゲノムデータベースと膨大なメタボロームデータを利用した植物由来天然物の生合成経路の解明に使われた。またドラフトゲノムデータから効率よく天然物の生合成遺伝子クラスターを同定するWebツール2ndFindも、A03班員の石川らによって開発された。3年目に一般に公開され、比較的短時間でcontig単位のクラスター解析が可能であり、班員で微生物を扱う小さな研究室では重宝にされている。さらにAugustusを搭載することでintronを含む真核生物のゲノムデータが扱えるようになり、多くの班員にのみならず、世界的に多くの研究者に利用されている。

班員が持つ有用な技術や方法論の移転も積極的に行った。A03班員の明石らは、植物の天然物の骨格合成後の修飾に関与する酵素遺伝子の解析に、“機能発現スクリーニング”という有用な研究手法を駆使しているが、これを班員に広く伝えるため、A01班員の鮎氏がボランティアで実験操作をビデオ撮影しDVDの形で希望者に提供した。また不要天然物の生合成遺伝子クラスターを除いた汎用宿主である放線菌*S. avermitilis* SUKA株は、A02班員池田らが長年かけて改良を続けているもので、最近およそ80–100 kbの巨大な断片の導入などに成功し、有用物質の生産に使われ始めている。4年目には、この最新の技術に関する講習会を北里大学で開催して、必要となる宿主ベクター系の無料配布した。このほか、今後増々使用頻度が高まることが予想される技術に、任意の長さのDNAを末端配列の相同性を利用して酵母内で組み上げるgap-repair cloning法がある。この方法論は、生合成遺伝子を多数組み込んで適切な宿主に導入することで、天然物を生産することができ、海外では次第に一般化しつつある。本手法を自在に扱って研究しているA02班員の守屋央朗氏に、技術移転の講習会を岡山大学で開催した。班員が開発したベクターの全塩基配列を総括班の費用で解析して、希望者に配布するなど技術移転を促進をすべく活動を行った。最近、こうした活動が実り、A03班員と共同で天然物生合成遺伝子の網羅的発現データを取得、解析し、A02班員から提供された発現系を利

用、得られた設計図情報を基にA01班員が、生合成経路を決定しながら、物質生産を行うという共同研究が達成された。

若手の育成に関しては、従来首都圏の研究者が中心になって開催してきた勉強会を、全国規模の研究者が参加する生合成マシナリー若手シンポジウムに発展させ、年二回のペースで開催した。このほかに、国内の若手研究者が主体とした国際シンポジウムを企画し、海外若手研究者を招請して開催するなど、若手研究者間の交流が大きく進んだ。このほか主に領域メンバー所属の大学院生の海外学会での発表の支援や班員が中心となって開催する小集会への補助などへの支援も行ってきた。

生合成マシナリーという領域の研究概念の普及を図るため、さらに領域メンバーの最新成果の発表の場として、公開シンポジウムを8回開催した。全班員が参加する公開シンポジウムと同時に開催する班会議や懇親会では、班員相互の意見交換や互いの得意な研究分野を相補する共同研究の打ち合わせの場としても有効に機能した。ほかにも領域メンバーの成果発表や海外の最先端の研究に触れる機会を増やすため、総括班全体あるいは総括班員が主体となって、国際シンポジウムを合計6回、国内シンポジウムを6回開催した。特に領域が進める研究期間の中間となる3年目には、世界から著名な研究者を招き、国際シンポジウムを行なった。領域メンバーによる発表を通し、成果を国外研究者に発信できた。地域密着型セミナー（札幌、首都圏）も合計16回開催して、領域の宣伝を行った。

領域活動を広く知っていただくため、領域の個々の行事の内容や研究者の紹介を掲載したNewsLetterを年二回発行した。また領域のホームページには、研究概要、研究組織、研究内容といった領域に関する情報のほか、領域の行事(班会議、公開シンポジウムや国際シンポジウム、企画講演会などの案内)を随時アップデートするとともに領域活動を通じて発表された研究成果を公開した。またニュースレターや受賞・新聞掲載などの情報の紹介や有用なサイト、領域で開発したあるいは開発中のWebツールやデータベースへのリンクも設けた。領域内構成員間の情報交換の場として、バイオ・マシナリーフォーラムを設け、データベースのアップデート情報、DNA解析コストの比較、研究のtipsなどの情報提供に利用した。

アウトリーチ活動としては、日本最大級のサイエンスコミュニケーションイベント（サイエンスアゴラ、東京）への3年連続の参加に

より、世代を問わない形で、領域の目指すもの、その波及効果などを紹介した。また各地の班員が一般講演会、中高生への出前講義、大学主催の研究室公開で本領域の活動を積極的に公表していた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13件)

C. W. Liu, K. Tagami, A. Minami, T. Matsumoto, J. C. Frisvad, H. Suzuki, J. Ishikawa, K. Gomi, and H. Oikawa, Reconstitution of biosynthetic machinery for highly elaborated indole diterpene penitrem. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 5748-5752 (2015). 査読有

M. Noike, T. Matsui, K. Ooya, I. Sasaki, S. Ohtaki, Y. Hamano, C. Maruyama, J. Ishikawa, Y. Satoh, H. Ito, H. Morita, and T. Dairi, A Peptide Ligase and the Ribosome Cooperate to Synthesize the Peptide Pheganomycin. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 71-76 (2015). 査読有

Y. Yamada, T. Kuzuyama, M. Komatsu, K. Shin-ya, S. Omura, D.E. Cane, H. Ikeda, Terpene synthases are widely distributed in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **112**, 857-862 (2015). 査読有

M. C. Wilson, (13 persons), T. Wakimoto, (3 persons), I. Abe, S. Matsunaga, J. Kalinowski, H. Takeyama, and J. Piel, An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire, *Nature.* **506**, 58-62 (2014). 査読有

T. Wakimoto, Y. Egami, Y. Nakashima, Y. Wakimoto, T. Mori, T. Awakawa, T. Ito, H. Kenmoku, Y. Asakawa, J. Piel and I. Abe, Calyculin biogenesis from a pyrophosphate protoxin produced by a sponge symbiont. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 648-U193 (2014). 査読有

F. Kudo, S. Hoshi, T. Kawashima, T. Kamachi, and T. Eguchi, Characterization of a Radical S-Adenosyl-L-methionine Epimerase, NeoN, in the Last Step of Neomycin B Biosynthesis, *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 13909-13915 (2014). 査読有

K. Yonekura-Sakakibara, R. Nakabayashi, S. Sugawara, T. Tohge, T. Ito, M. Koyanagi, M. Kitajima, H. Takayama and K. Saito, A flavonoid 3-O-glucoside: 2

''-O-glucosyltransferase responsible for terminal modification of pollen-specific flavonols in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **79**, 769-782 (2014). 査読有
M. Komatsu, K. Komatsu, H. Koiwai, Y. Yamada, I. Kozone, M. Izumikawa, J. Hashimoto, M. Takagi, S. Omura, K. Shin-ya, D.E. Cane, H. Ikeda, Engineered *Streptomyces avermitilis* Host for Heterologous Expression of Biosynthetic Gene Cluster for Secondary Metabolites. *ACS. Synth. Biol.* **2**, 284-396 (2013). 査読有
S. Ikeda, T. Abe, Y. Nakamura, N. Kibinge, A. Hirai, A. Morita, Nakatani, N. Ono, T. Ikemura, K. Nakamura, M. Altaf-UI-Amin, S. Kanaya, Systematization of the protein sequence diversity in enzymes related to secondary metabolic pathways in plants, in the context of big data biology inspired by the KNApSACK motorcycle database. *Plant. Cell. Physiol.* **54**, 711-727 (2013). 査読有
S. Bunsupa, K. Katayama, E. Ikeura, A. Oikawa, K. Toyooka, K. Saito, and M. Yamazaki, Lysine decarboxylase catalyzes the first step of quinolizidine alkaloid biosynthesis and coevolved with alkaloid production in Leguminosae. *Plant. Cell.* **24**, 1202-1216 (2012). 査読有
K. Hotta, X. Chen, R. S. Paton, A. Minami, H. Li, K. Swaminathan, I. I. Mathews, K. Watanabe, H. Oikawa, *K. N. Houk, and *C. Y. Kim, Enzymatic catalysis of anti-Baldwin ring closure in polyether biosynthesis. *Nature.* **483**, 355-359 (2012). 査読有
Y. Shinohara, F. Kudo and T. Eguchi, A Natural Protecting Group Strategy To Carry an Amino Acid Starter Unit in the Biosynthesis of Macrolactam Polyketide Antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 18134-18137 (2011). 査読有
E. Okamura, T. Tomita, R. Sawa, M. Nishiyama, and T. Kuzuyama, Unprecedented acetoacetyl-coenzyme A synthesizing enzyme of the thiolase superfamily involved in the mevalonate pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 11265-11270 (2010). 査読有

[学会発表](計 10件)

H. Oikawa, "Total Biosynthesis of Fungal Bioactive Natural Products", *Directing Biosynthesis IV*, Mar. 25-27, 2015, John Innes Centre, Norwich, UK

I. Abe, "Biosynthetic studies on fungal meroterpenoids derived from 3,5-dimethylorsellinic acid", *Gordon Research Conference on Marine Natural Products*, Mar. 2-7, 2014, Ventura, CA, USA

J. Ishikawa, and Y. Hoshino, "2ndFind: a web-based support tool to find secondary metabolite biosynthetic gene cluster", *17th International Symposium on the Biology of Actinomycetes*, Oct. 8-12, 2014, Kusadasi, Turkey

H. Ikeda, "Second version of versatile hosts for heterologous expression of biosynthetic gene(s) for secondary metabolites", *1st European Conference on Natural Products: Research and Applications*, Sep. 22-25, 2013, Frankfurt, Germany

K. Saito, "Metabolomics-based functional genomics in plants", *Molecular Life Sciences 2013 International Symposium of the Germany Society for Biochemistry and Molecular Biology*, Oct. 3-6, 2013, Frankfurt, Germany

K. Gomi, "Multiple gene expression system by means of Cre/loxP-mediated marker recycling with mutated loxP sites in *Aspergillus oryzae*", *9th International Aspergillus meeting (Asperfest9)*, Mar. 29-30, 2012, Marburg, Germany

S. Kanaya, "KNAPSAcK Family Databases connect biological activities of metabolites and plants with microorganisms", *XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*, Jul. 29-Aug. 2, 2012, Kyoto International Conference Center, Kyoto

H. Oikawa, "Biosynthesis of Peptide and Polyether Antibiotics", *Cross-Disciplinary Expansions in Marine Bioorganic Chemistry, 7th US-Japan Seminar on Marine Natural Products*, Dec. 11-16, 2011, Laguna Garden Hotel, Naha, Japan

T. Dairi, "An alternative menaquinone biosynthetic pathway: an attractive target for drug discovery to *Helicobacter pylori*", *The Third International Conference on Cofactors 03 (ICC-03)*, July, 10-15, 2011, The University of Turku, Turku, Finland

K. Saito, "Lysine/ornithine decarboxylase – An enzyme catalyzing the first step of quinolizidine alkaloid biosynthesis in legume plants", *12th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins*, August 1-5, 2011, Beijing, China.

〔図書〕(計 4 件)

Matsuda, Y., and Abe, I., Chapter 13 Meroterpenoids. *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites*, pp. 289-301, Springer, (2014).

Asano, T., Saito, K., Yamazaki, M., Camptothecin Production and Biosynthesis in Plant Cell Cultures. *50 Years of Phytochemistry Research*, Vol. 43, pp.43-54, Springer, Heidelberg(2013).

Minami, A. and Oikawa, H., The Diels-Alderase never ending story. *Biomimetic Organic Synthesis*, Vol. 2, pp.751-786, Wiley-VCH, New York (2011).

Okazaki, Y., Oikawa, A., Kusano, M., Matsuda, F. and Saito, K., *Metabolomics in Plant Biotechnology. Plant Metabolism and Biotechnology*, pp.373-388, Wiley, (2011).

〔産業財産権〕
出願状況(計 2 件)

名称: 微生物を用いたマイコスポリン様アミノ酸を生産する方法

発明者: 池田治生

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2014-099647

出願年月日: 2014 年 5 月 13 日

国内外の別: 国内

名称: 新規テルペノイド化合物およびその製造方法

発明者: 池田治生

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2013-168230

出願年月日: 2013 年 8 月 13 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://machinery.sci.hokudai.ac.jp/machinery/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

及川 英秋 (OIKAWA, Hideaki)
北海道大学・大学院理学研究院・教授
研究者番号：00185175

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

江口 正 (EGUCHI, Tadashi)
東京工業大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：60201365

阿部 郁朗 (ABE, Ikuro)
東京大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：40305496

葛山 智久 (KUZUYAMA, Tomohisa)
東京大学・生物生産工学研究センター・
准教授
研究者番号：30280952

大利 徹 (DAIRI, Tohru)
北海道大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：70264679

池田 治生 (IKEDA, Haruo)
北里大学・感染制御科学府・教授
研究者番号：90159632

五味 勝也 (GOMI, Katsuya)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：60302197

斉藤 和季 (SAITO, Kazuki)
千葉大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：00146705

金谷 重彦 (KANAYA, Shigehiko)
奈良先端科学技術大学院大学・
情報科学研究科・教授
研究者番号：90224584

石川 淳 (ISHIKAWA, Jun)
国立感染症研究所・生物活性物質部・室長
研究者番号：40202957