

平成 22 年 6 月 15 日現在

研究種目：特定領域研究 ゲノム 4 領域（応用ゲノム）

研究期間：2005 年～2009 年

課題番号：17019009

研究課題名（和文）放線菌ゲノム情報に基づく二次代謝産物の生産

研究課題名（英文）High efficient production of secondary metabolites on the basis of genomes of *Streptomyces*

研究代表者

北里大学・感染制御科学府・教授・池田 治生

研究者番号：90159632

研究成果の概要（和文）：

放線菌が有する多様な二次代謝酵素の反応機構の解明および改変を行い、パスウェイ工学、代謝工学、コンビナトリアル生合成法や人工的生合成遺伝子クラスターの一員として利用することにより、既知有用物質の増産はもとより、「非天然型」化合物の微生物生産を達成し、新規な生理活性や特性を有する医薬、工業原料の開発を目指す。この目的のために、エバーメクチン生産菌である *Streptomyces avermitilis* と *Nocardia farcinia* のゲノム情報およびストレプトマイシン生産菌 *Streptomyces griseus* のゲノム情報に基づき、二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターの抽出およびそれぞれの酵素の反応機構の解明、改変を行った。本研究では特に、化合物としてフラボノイド、ポリケタイドとテルペン類、酵素として P-450 を中心とした酸化還元酵素に力を注ぎ、非天然型フラボノイドの創製を達成した。一方ではパスウェイ工学、ゲノム工学の手法を用いて、安定的かつ大量な物質生産を行うために汎用性のある宿主の開発を行った。同時に、二次代謝生合成の調節と栄養増殖から二次代謝のための増殖へと切替わるグローバルな調節機構の解明を行った。

研究成果の概要（英文）：

The elucidation of the reaction mechanism of the various second metabolisms, which were observed in actinomycete microorganisms, was systematically examined. The results obtained in this study were applied to the improvement in pathway engineering, metabolic engineering, combinatorial biosynthesis and the creation of the artificial biosynthetic gene cluster for the production of new metabolites. Furthermore, the technology developed in this study was applied to improve the production level of not only known products but also unnatural products. Results would be useful for the development of new bioactive compounds in medical field and industrial materials. For the above purpose, we investigated and evaluated the detailed biosynthetic pathways and regulatory system(s) for their expression from the genome data of avermectin-producing *Streptomyces avermitilis*, *Nocardia farcinia* and streptomycin-producing *Streptomyces griseus*. We have also clarified the reaction mechanism of some biosynthesis gene clusters and novel reactions were identified (Baeyer-Villiger oxidation and new type of benzene ring formation). We also focused on

cytochrome P450, flavonoid, and type-III polyketide synthesis and new unnatural flavonoids were discovered by above technology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 17 年度	29,000,000	0	29,000,000
平成 18 年度	25,500,000	0	25,500,000
平成 19 年度	25,300,000	0	25,300,000
平成 20 年度	25,300,000	0	25,300,000
平成 21 年度	25,300,000	0	25,300,000
総計	130,400,000	0	130,400,000

研究分野：ゲノム 4 領域

科研費の分科・細目：応用ゲノム

キーワード：ゲノム、二次代謝産物、物質生産、放線菌

1. 研究開始当初の背景

放線菌の多様な二次代謝酵素の反応機構の解明および改変を行い、パスウェイ工学、代謝工学、コンビナトリアル合成法や人工的生成遺伝子クラスターの一員として利用することにより、既知有用物質の増産はもとより、「非天然型」化合物の微生物生産を達成し、安定的かつ大量な物質生産を行うために汎用性のある宿主を用いて新規な生理活性や特性を有する医薬、工業原料の開発を目指す。また、二次代謝の制御機構を解明し、その知見を非天然型を含む化合物の高効率生産に活かす。

ゲノム解析により、放線菌ゲノムには多くの二次代謝産物生産遺伝子（群）が眠っていることが明らかになった。遺伝子群の相同性から予想される二次代謝産物の生産に関わる酵素群の反応機構の解析を続けながら、特に生産遺伝子群を他の宿主にクローニングすることなく、ゲノムを直接操作することにより、眠っている生産性を活性化することを試みる。また、*S. avermitilis* を他の菌種の二次代謝産物の生産のための汎用宿主として改変をする。

2. 研究の目的

抗菌、抗真菌、抗腫瘍薬あるいは免疫抑制薬等の医薬品の工業的生産に利用されている放線菌は、多種多様な二次代謝産物を生産し、我々の社会生活に多に貢献している。放線菌が有する多様な二次代謝酵素の反応機構の解明および改変を行い、パスウェイ工学、代謝工学、コンビナトリアル合成法や人工的生成遺伝子クラスターの一員として利用することにより、既知有用物質の増産はもとより、「非天然型」化合物の微生物生産を達成し、新規な生理活性や特性を有する医薬、工業原料の開発を目指す。この目的のために、抗寄生虫・抗昆虫薬エバームクチン生産菌である *Streptomyces avermitilis* のゲノム情報、および抗結核薬ストレプト

マイシン生産菌 *Streptomyces griseus* のゲノム情報さらに *Nocardia farcinica* のゲノム情報に基づき、二次代謝産物の生成遺伝子クラスターの抽出およびそれぞれの特異な酵素の反応機構の解明、改変を行う。本研究では特に、化合物としてフラボノイド、ポリケタイドとテルペン類、酵素としてシトクロム P450 を中心とした酸化還元酵素に力を注ぐ。一方ではパスウェイ工学、ゲノム工学の手法を用いて、安定的かつ大量な物質生産を行うために汎用性のある宿主の開発を目指す。同時に、二次代謝生成の調節と栄養増殖から二次代謝のための増殖へと切替わるグローバルな調節機構の解明を行い、その知見を有用物質生産の効率化のためにフィードバックする。

3. 研究の方法

① コンビナトリアル合成法による「非天然型」フラボノイドの発酵生産

前年までに植物が生産するフラボノイドの数種を発酵生産できたので、有機合成した CoA 化合物やカルボン酸の投与により、新規化合物の生産を目指す。一方では、酵母を利用し、効率の良いイソフラボン生産を目指す。

② シトクロム P450 を含む二次代謝酵素の反応機構の解明

コンビナトリアル合成法に用いる酵素として有用な type III ポリケタイド合成酵素を、真核、原核を問わず、微生物ゲノム中に検索し、その反応機構を探る。シトクロム P450 については、大腸菌で生産したタンパクと植物や他の微生物からの電子伝達系を組み合わせることで活性のある酵素を得る努力を続ける。

③ 物質生産のための汎用宿主の造成

S. avermitilis の染色体大規模欠失株について DNA 導入を効率的に達成させるため、制限欠失株の取得を行う。また、安定な外来遺伝子導入および維持を目的として溶原化ファージ由来の組み込み機構を利用した組み込み型

ベクターの開発を行う。

④ 二次代謝制御の解明

S. griseus のゲノムに基づいた DNA マイクロアレイを整備する。これを用い、A-ファクター制御カスケード内のいくつかの転写因子の標的遺伝子を網羅的に同定、解析を進める

4. 研究成果

① コンビナトリアル生合成法による「非天然型」フラボノイドの発酵生産

フラバノン、フラボン、フラボノール生産系に様々な基質を投与することで天然型 15 種非天然型 19 種のフラボノイドの生産に成功した。スチルベン、スチルベンメチルエステル生産系に様々な基質を投与することで天然型 7 種、非天然型 13 種のスチルベンの生産に成功した。クルクミノイド生産系に様々な基質を投与することで天然型 7 種、非天然型 17 種のクルクミノイドの生産に成功した。また、クルクミノイド生産系に様々な組み合わせで 2 種の基質を投与することで現在までに 50 種類以上の非対称クルクミノイドの生産に成功している。

大腸菌内にスチルベン生合成系を再構成することによってアミノ酸であるチロシンよりレスベラトロール、フェニルアラニンよりピノシルビンの生産に成功した。また、この生産系にスチルベンメチル化酵素を加えることで、プレトスチルベンやピノスチルベンを含むスチルベンメチルエステルの生産に成功した。さらに大腸菌と出芽酵母を共培養することでチロシンから代表的なイソフラボンあるゲネステインの生産に成功した。大腸菌に「人工的生合成遺伝子クラスター」を導入することにより、多くの天然型および非天然型フラボノイドやイソフラボンの生産に成功した。この成果は、新しい微生物利用技術の方向性を示すモデルケースである。またこれまで植物の専売特許であったフラボノイド化合物を微生物による発酵生産ができるようになった意義は極めて大きい。

② シトクロム P450 を含む二次代謝酵素の反応機構の解明

III 型ポリケタイド合成酵素によって生成する化合物

S. griseus からのシトクロム P450 酵素が、芳香環に付いた-OH 基同士をアリルカップリングさせることを見出し、ゲノム上で隣にコードされた III 型ポリケタイド合成酵素 RppA とともに、5 分子のマロニル-CoA からペリレンキノン型メラニンの新規な生産系を構成することを証明した。III 型ポリケタイド合成酵素は、微生物と植物に広く分布する。放線菌 *S. griseus* のゲノム中にある III 型ポリケタイド合成酵素を含む生合成遺伝子クラスターを全解明し、アルキルレゾルシノール合成およびメチル化酵素を同定した。*Neurospora crassa* が有する III 型ポリケタイド合成酵素は、ペンタケタイドの芳香族カルボン酸の生成を触媒する新規酵素であることを明らかにした。また、イネの III 型ポリケタイド合成酵素の網羅的な解析の過程で、クルクミン (カレーの黄色色素; 別名「ウコン」) の合成を触媒する酵素を発見した。本酵素は①で述べたクルクミノイドの発酵生産に利用した。さらに、ウコン植物におけるクルクミンの生合成経路を解析し、イネとは異なり、2 種類の III 型ポリケタイド合成酵素が連続的に作用して、クルクミンが生合成されることを明らかにした。*Azotobacter*

vinelandii のフェノール性脂質 (アルキルレゾルシノールとアルキルピロン) の生合成に与る III 型ポリケタイド合成酵素の反応を詳細に解析し、新しい触媒機構を提唱できた。

ペンタレノラクトン

半世紀前に発見され、なおかつ多くの *Streptomyces* 属が生産することが知られているペンタレノラクトンの生合成の詳細はこれまで不明であった。*S. avermitilis* のゲノム解析からセスキテルペン合成酵素遺伝子と相同なテルペン合成酵素遺伝子を含む 14-kb の領域に、13 個の遺伝子 (*sav2990 - sav3002; pt1A - pt1L*) がクラスターを形成していることを見出した。同化合物の生合成過程には、めずらしい反応過程がいくつか存在することが示唆されており、詳細な解析を行った。生合成経路解明を行うにあたり、大腸菌で得たそれぞれの遺伝子産物の *in vitro* での反応解析、および同遺伝子群からそれぞれの遺伝子を in-frame で欠失した組み換え体の蓄積物の構造解析から全貌を明らかにした。なお、染色体遺伝子の欠失体の作製は不安定複製ベクターや整列コスミドからの PCR 増幅断片を利用する方法によって、極めて簡便かつ短期間に達成することが可能となった。遺伝子産物の反応解析と欠失株の蓄積する化合物の構造は矛盾無く一連の生合成経路を明らかにすることができた。テルペン合成酵素 (Pt1A) によりフェルネシル二リン酸からペンタレネン生成 (Pt1A)、シトクロム P450 (Pt1I) によるメチル基のカルボン酸化さらに 11 位の立体選択的な水酸化 (Pt1H) までの経路が明らかになり、さらにその次の段間の水酸基の酸化還元 (Pt1F) の段階を明らかにすることができた。これらのうち、Pt1H が触媒する水酸化反応は Fe^{2+} 、 α -ケトグルタル酸および O_2 存在下で進行する、めずらしいジオキシゲナーゼであった。さらに大腸菌で高発現させた本酵素の結晶化を試み、その結晶構造を解析することによって、水酸化の反応機構を詳細に推定することができた。また、*pt1F* および *pt1E* 欠失株からは新規な生合成中間体 1-デオキシ-11 β -ヒドロキシペンタレネン酸および 1-デオキシ-11-オキソペンタレネン酸を見出すことができた。一方、ペンタレノラクトン生成過程では 5 員環炭素骨格を 6 員環ラクトンに変換する Baeyer-Villiger 反応が進行していることが推定されていた。Pt1E は FMN および NADPH 存在化、1-デオキシ-11-オキソペンタレネン酸をネオペンタレノラクトン D に変換する Baeyer-Villiger 反応を触媒する酵素であることを明らかにした。本研究過程において、最終産物および *pt1D* 欠失株がこれまで報告されているペンタレノラクトン類とは異なる新規な構造を有することを明らかにすることができ、それぞれネオペンタレノラクトンおよびネオペンタレノラクトン D と命名した。

2-メチルイソボルネオール

古くからセスキテルペン化合物であるゲオスミンとモノテルペン化合物の 2-メチルイソボルネオールは“土臭さ”あるいは湖水などの“異臭”物質と知られていたが、それらの生合成に関しては長い間不明であった。ゲオスミンの生合成に関しては我々によって既に明らかにされたが、2-メチルイソボルネオールに関しては不明であった。2-メチルイソボルネオールはゲオスミンと同様に放線菌のみならず *Cyanobacteria*, *Myxobacteria*

さらには糸状菌などからも生成される化合物である。テルペン化合物は植物・菌類などから数多く見出されており、それらの初発のテルペン合成酵素遺伝子も数多く単離されている。一方、微生物由来のテルペン合成酵素は発見が少なく、また、植物・菌類由来の酵素との相同性が低いため、相同性検索で見出すことは不可能であった。そこで機能ドメインを検索する新たな方法でいくつかの候補遺伝子を選び、それらの遺伝子を有する菌株からの 2-メチルイソボルネオールの生成、当該遺伝子の異種放線菌における発現による 2-メチルイソボルネオールの生成、さらには大腸菌で得た酵素を用いた試験管内での反応によって 2-メチルイソボルネオールの生成を計画した。その結果、2-メチルイソボルネオールはグラニルニリン酸から直接合成されるのではなく、グラニルニリン酸が S-アデノシル-L-メチオニンによってメチル化を受けた、2-メチルグラニルニリン酸を環化、水和して生成することを明らかにした。なお、原核細胞生物由来のモノテルペン合成酵素および遺伝子としては初めての例であった。

ノコバクチン

Nocardia farcinica が生産する生物活性物質であるノコバクチンの生合成遺伝子のうち、生合成のスターターとなるサリチル酸の生合成遺伝子 (*nfa6190*) を *S. avermitilis* の大規模欠失株に導入し、サリチル酸の生産に成功した。一方、*Nocardia* 属では遺伝子導入ならびにクローニングベクターが開発されていないため、遺伝子導入ならびに遺伝子破壊の系の系が行えない。そこで *N. farcinica* で利用可能なクローニングベクターの開発および形質転換法の検討を行った。*N. farcinica* はエレクトロポレーションによって、大腸菌で調製した DNA を直接導入することを見出した。クローニングベクターは *Mycobacterium* 属などで利用されているベクタープラスミドを改変し、カナマイシン・ネオマイシン耐性遺伝子で選択可能な比較的低コピー数のベクタープラスミドを開発し、さらに変異導入により高コピー化したベクターも開発した。*Nocardia* 属の形質転換は報告が無いので、近縁種の *Mycobacterium* 属、*Corynebacterium* 属および *Rhodococcus* 属を参考に検討した結果、大腸菌で調製したベクタープラスミドを直接エレクトロポレーションすることによって、形質転換することに成功した。これら、ベクタープラスミドと形質転換法の開発によって *Nocardia* 属としては初めて遺伝子破壊に成功した。ゲノム解析で発見された *nbtA-H* と *nbtS-T* クラスターのうち *nbtA* (thioesterase)、*nbtE* (NRPS) および *nbtS* (salicylate synthase) の破壊を行い、これらのクラスターがノコバクチン生合成を支配していることを明らかにした。さらに $\Delta nbtE$ に蓄積された中間体の構造から、ノコバクチンの生合成経路をほぼ解明できた。*N. farcinica* ゲノムに存在する二次代謝産物生産に関わると推定される、4つの遺伝子クラスターのプロモーターを誘導型に置換し制御可能とした。

③ 二次代謝制御の解明

これまで *Streptomyces* 属では *S. avermitilis* および *S. coelicolor* A3(2) の 2 菌株のゲノム解析が完了している。工業微生物としては *S. avermitilis* に次いでストレプトマイシン生産菌 *S. griseus* のゲノム解析を行った。従来のシーケンサーを用いてゲノム配列の決定

を行った結果、*S. griseus* は全長 8,545,929 bp、GC 含量 72.2% からなる線状ゲノムを有することを明らかにした(プラスミドは保有しない)。線状ゲノムの両末端は 132,910 bp からなる逆向き相同配列を有していた。*S. griseus* のゲノムは、これまで報告された *S. avermitilis* および *S. coelicolor* A3(2) と同様に線状構造であるが、末端の相同配列は最も長い。また、染色体末端のおよそ 96 bp の配列は上記の 2 株およびこれまで報告された *Streptomyces* 属の染色体および線状プラスミドの末端配列とは異なること、さらに染色体末端に結合しているタンパク質 Tpg およびその結合に関与するタンパク質 Tap の配列が、これまで報告されている Tpg や Tap とは異なることを明らかにした。染色体末端の逆向き相同配列の長さは本菌の遺伝的不安定性と密接な関係があるものと推察された。ゲノム上には 7,138 個のタンパク質をコードする遺伝子を見出したが、これまで報告された二次代謝産物生合成遺伝子群との比較によって、*S. griseus* にはストレプトマイシン生合成遺伝子群を含めて少なくとも 34 個の二次代謝産物生合成遺伝子群を保有することを明らかにした。一方、ブラシリカルジン、ブラシノライド、ノカルジオラクトンなど多様な二次代謝産物を生産する *Nocardia terpenica* のゲノムを次世代シーケンサーで解析し、約 1,800 コンティグ (計 5 Mb) を得た。得られたコンティグは配列既知であるブラシリカルジン生合成遺伝子群を完全に網羅しており、さらにゲノムの 90% 以上を網羅していると推定され、多くのポリケタイド合成酵素遺伝子や非リボソーム性ペプチド合成酵素遺伝子も見出された。次世代シーケンサーによるゲノムスキニングは短時間かつ低コストで可能であることから、この分野における有用性が確かめられた。

S. griseus では、ストレプトマイシンをはじめとする多くの二次代謝産物の生産や形態分化が低分子自己調節物質 A-ファクターによって誘導される。我々はこれまでに A-ファクター制御の分子機構を明らかにしてきた。A-ファクターは A-ファクターレセプタータンパク質 (ArpA) を *adpA* プロモーターから解離させることで、グローバルな転写活性化因子 AdpA の生産を誘導する。AdpA は二次代謝産物生合成や形態分化に必要な数多くの遺伝子群 (AdpA レギュロン) の転写を活性化する。つまり、A-ファクターシグナルは AdpA を介して増幅され多くの遺伝子に伝達されるという遺伝子発現カスケードが存在している。本研究では、ゲノム情報を利用し、この A-ファクター制御カスケードの全貌の解明を目指した。従来の解析より、AdpA によって発現誘導される菌体外分泌プロテアーゼが形態分化に関与していることが示唆されていたため、他の分泌タンパク質についてもゲノム情報から解析し、5 種のプロテアーゼおよびセリンプロテアーゼ阻害タンパク質 (SSI) が AdpA レギュロンの構成員であることを明らかにした。また、組換え SSI を細胞外から加えることによって形態分化が阻害されることから、菌体外分泌プロテアーゼ群が形態分化に関与することが強く示唆された。さらに、菌体外分泌タンパク質のプロテオーム解析を行い、多くの加水分解酵素が AdpA によって生産誘導されることを明らかにするとともに、新たな AdpA レギュロンを十数個見出した。一方、転写活性化因子 AdpA の自己転写抑制機

構を解明し、3箇所結合部位によって DNA ループを形成することで RNA ポリメラーゼの接近を妨げることを明らかにした。A-ファクター制御に関わる役者として、A-ファクター合成の鍵となる AfsA の反応機構を解析した。大腸菌で生産した組換え AfsA は β -オキシ脂肪酸 ACP 体の β -ケトアシル基をジヒドロキシアセトンリン酸に転移する反応を触媒できた。さらに、その生成物が還元・脱リン酸化されて A-ファクターを生成することを明らかにした。また、*afsA* のすぐ下流にコードされる還元酵素 (BprA) がこの還元反応に関与することも明らかにした。

ゲノム情報を積極的に利用した解析の 1 つとして、DNA マイクロアレイ解析を行うため、ゲノム上に見出された約 600 個の転写因子遺伝子のみからなる DNA マイクロアレイを作製し、パイロット的な解析を行ったのち、全 ORF に対応した DNA マイクロアレイを作製した。これを用いて、(1) A-ファクター合成酵素欠損株に A-ファクターを加えた際に引き起こされる遺伝子発現の経時変化の追跡、(2) 固体培地および液体培地における野生株と *adpA* 破壊株の転写の比較、(3) 他の複数の A-ファクター制御カスケード関連制御遺伝子 (*adsA*, *bldM*, *amfR* など) 破壊株と野生株の転写比較などの解析を行い、A-ファクター制御カスケードの全体像を明らかにするとともに、今後の解析の新たな標的遺伝子候補を多数得ることができた。一方、ゲノム情報をもとに、small non-coding RNA を予測し、転写解析によって通常の培養条件下で発現する 12 の small non-coding RNA を同定した。それぞれについて遺伝子破壊による形質の変化を解析したが、その機能について明確な結論を得られなかった。また、*S. griseus* のゲノム上に存在する二次代謝遺伝子群の転写調節因子をコードすると推定された遺伝子を強制発現し、系全体を過剰発現させることによって、眠っている系を呼び起こそうとしている。いくつかの遺伝子群について、その転写を誘導することはできたが、生産物の同定には至っていない。

5. 主な発表論文等

1. Nett, M., Ikeda, H., Bradley S. Moore, B. S.: Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes *Nat. Prod. Rep.* 26, 1362-1384 (2009)
2. Jiang, J., Tetzlaff, C.N., Yakamatsu, S., Iwatsuki, M., Komatsu, M., Ikeda, H. and Cane, D.E.: Genome mining in *Streptomyces avermitilis*: A biochemical Baeyer-Villiger reaction and discovery of a new branch of the pentalenolactone family tree. *Biochemistry.* 48, 6431-6440 (2009).
3. Morita, K., Yamamoto, T., Fusada, N., Komatsu, M., Ikeda, H., Hirano, N. and Takahashi, H.: The site-specific recombination system of actinophage TGI. *FEMS Microbiol. Lett.* 297, 234-240 (2009)
4. Tanaka, Y., Komatsu, M., Okamoto, S., Tokuyama, S., Kaji, A., Ikeda, H. and Ochi, K.: Antibiotic Overproduction by *rpsL* and *rsmG* Mutants of Various Actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4919-4922 (2009)
5. Kitani, K., Ikeda, H., Sakamoto, T., Noguchi, S. and Nihira, T.: Characterization of a regulatory gene, *aveR*, for the biosynthesis of avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 1089-1096 (2009)
6. Xu, L-H., Fushinobu S., Ikeda, H., Wakagi, T. and Shoun, H.: Crystal Structures of Cytochrome P450 105P1 from *Streptomyces avermitilis*: Conformational Flexibility and Histidine Ligation State. *J. Bacteriol.* 191, 1211-1219 (2009)
7. Akanuma, G., Hara, H., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S.: Dynamic changes in the extracellular proteome caused by absence of a pleiotropic regulator AdpA in *Streptomyces griseus*. *Mol. Microbiol.* 73, 898-912 (2009)
8. Marushima, K., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S.: CebR as a master regulator for cellulose/cellooligosaccharide catabolism affects morphological development in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 191, 5930-5940 (2009)
9. Katsuyama, Y., Kita, T., and Horinouchi, S.: Identification and characterization of multiple curcumin synthases from the herb *Curcuma longa*. *FEBS Lett.* 583, 2799-2803 (2009)
10. Miyanaga, A., and Horinouchi, S.: Enzymatic synthesis of bis-5-alkylresorcinols by resorcinol-producing type III polyketide synthases. *J. Antibiot.* 62, 371-376 (2009)
11. Awakawa, T., Yokota, K., Funa, N., Doi, F., Mori, N., Watanabe, H., and Horinouchi, S.: Physically discrete beta-lactamase-type thioesterase catalyzes product release in atrochryson synthesis by iterative type I polyketide synthase. *Chem. Biol.* 16, 613-623 (2009)
12. Tezuka, T., Hara, H., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S.: Identification and gene disruption of small noncoding RNAs in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 191, 4896-4904 (2009)
13. Nakano, C., Ozawa, H., Akanuma, G., Funa, N., and Horinouchi, S.: Biosynthesis of aliphatic polyketides by type III polyketide synthase and methyltransferase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 191, 4916-4923 (2009)
14. Hara, H., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S.: DNA microarray analysis of global gene regulation by A-factor in *Streptomyces griseus*. *Microbiology* 155, 2197-2210 (2009)
15. Horinouchi, S.: Combinatorial biosynthesis of plant medicinal polyketides by microorganisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13, 197-204 (2009)
16. Katsuyama, Y., Kita, T., Funa, N., Horinouchi, S.: Curcuminoid biosynthesis by two type III polyketide synthases in the herb *Curcuma longa*. *J. Biol. Chem.* 284, 11160-11170 (2009)
17. Machida, K., Arisawa, A., Takeda, S., Tsuchida,

- T., Aritoku, Y., Yoshida, M. and Ikeda, H.: Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide antitumor macrolide, pladienolide, in *Streptomyces platensis* Mer-11107. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 2946-2952 (2008)
18. Komatsu, M., Tsuda, M., Omura, S., Oikawa, H. and Ikeda, H.: Identification and functional analysis of genes controlling biosynthesis of 2-methylisoborneol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 74224-7427 (2008)
19. Hirano, S., Tanaka, K., Ohnishi, Y. and Horinouchi, S.: Conditionally positive effect of the TetR-family transcriptional regulator AtrA on streptomycin production by *Streptomyces griseus*. *Microbiology* **154**, 905-914 (2008)
20. Funabashi, M., Funai, N. and Horinouchi, S.: Phenolic lipids synthesized by type III polyketide synthase confer penicillin resistance on *Streptomyces griseus*. *J. Biol. Chem.* **283**, 13983-13991 (2008)
21. Miyanaga, A., Funai, N., Awakawa, T. and Horinouchi, S.: Direct transfer of starter substrates from type I fatty acid synthase to type III polyketide synthases in phenolic lipid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 871-876 (2008)
22. Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M. and Horinouchi, S.: Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol.* **190**, 4050-4060 (2008)
23. Suzuki, H., Marushima, K., Ohnishi, Y. and Horinouchi, S.: A novel pair of terminal protein and telomere-associated protein for replication of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 2973-2980 (2008)
24. Katsuyama, Y., Matsuzawa, M., Funai, N. and Horinouchi, S.: Production of curcuminoids by *Escherichia coli* containing an artificial biosynthesis pathway. *Microbiology* **154**, 2620-2628 (2008)

その他 43 報

〔雑誌論文〕 (計 67 件)

ホームページ等

<http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp>

<http://nocardia.nih.go.jp/>

<http://streptomyces.nih.go.jp/griseus/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 治生 (北里大学)

研究者番号 : 90159632

(2) 研究分担者

鮎 信学 (東京大学・大学院農学生命科学)

研究者番号 : 70361574

(3) 研究分担者

石川 淳 (国立感染症研究所)

研究者番号 : 40202957

(4) 研究分担者

堀之内 未治 (東京大学・大学院農学生命科学 : 平成 21 年死去)

研究者番号 : 80143410