

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20310122

研究課題名（和文） 産業微生物物質生産・変換における包括的解析基盤の確立

研究課題名（英文） Development of the comprehensive system for useful secondary metabolism and bioconversion of useful compounds

研究代表者

池田 治生 (IKEDA HARUO)

北里大学・大学院感染制御科学府・教授

研究者番号：90159632

研究成果の概要（和文）：

抗生物質などの微生物二次代謝産物の生成過程における種々の解析は、生合成経路の解明や生合成遺伝子群の発現調節機構の理解など、基礎的な研究のみならず、それらの成果を工業的な安定かつ大量生産への達成といった応用研究に発展させることが期待できる。しかしながら、多くの *Streptomyces* 属の菌株では DNA の導入さえも困難な場合があり、その生合成遺伝子群の評価ができない場合が多々ある。これらの問題を回避するためには対象とする二次代謝産物生合成遺伝子群を物質生産に適した汎用宿主に導入して解析できる系の構築が、これまで望まれていた。本研究ではこれらのことを踏まえ、実際の医薬品生産に利用されている *S. avermitilis* を物質生産に特化した染色体改変を行い、異種微生物由来の有用な二次代謝産物の生産系を確立しその有用性を実証した。

研究成果の概要（英文）：

Genetic analysis of production process in secondary metabolites reveals their biosynthetic pathways and their regulatory networks for gene expression. These results reflect on not only basic research but also application to the industrial production process. But almost *Streptomyces* microorganisms that produce valuable secondary metabolites including antibiotics cannot be applied to molecular genetic approaches (DNA transformation, gene targeting and so on). In this study, we have developed a versatile host for the production of exogenous secondary metabolites using efficient heterologous gene expression system. An industrial anthelmintic antibiotic, avermectin, producer *S. avermitilis* was used as this model and its chromosome has been engineered for heterologous expression of gene cluster for secondary metabolite biosynthesis. The results indicate that the versatile host constructed is useful for the heterologous expression of many gene clusters for secondary metabolite biosynthesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	6,500,000	1,950,000	8,450,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・産業微生物ゲノム

キーワード：産業微生物ゲノム、物質生産、染色体再構成、二次代謝産物

1. 研究開始当初の背景

我が国は、これまで微生物機能の産業利用

に関して極めて高い技術水準を維持してきており、これらの成果が我々の社会生活に還元されているものが多い。特にアミノ酸や核酸などの食品や微生物二次代謝産物の医薬品利用に関する我が国の技術的水準は世界をリードしていると言っても過言ではない。これらの産業微生物に関してもグルタミン酸・リジン生産菌を皮切りに放線菌、乳酸菌や麹菌など相次いでゲノム解析が報告されはじめた。これまで産業微生物の育成は積極的な変異株の収集を主に行ってきたおり、それらに関しての詳細な遺伝的解析が行われなかったため有用遺伝子を積極的に利用、改変するといった系統的な展開が困難であった。しかしながら、遺伝学的な情報が乏しい菌株においても、そのゲノム解析情報が得られることによって、迅速に遺伝子発現制御系ならびに代謝系を改変設計し、短期間にその微生物の機能の改良を達成することが期待できる。また、この技術には遺伝子解析系のみならず遺伝子導入ならびに遺伝子改変技術が整備されていることが必須であり、その技術的基盤が開発されていない場合、ゲノム上の遺伝子の有用性を実証および判断することができない。これまで産業微生物は有用物質生産あるいは変換といった表現形質の変化をとらえるのみで、遺伝子導入・改変といった分子基盤的な研究は極めて乏しいのが現状である。また、大腸菌や枯草菌で開発された遺伝子導入、および改変技術がそのまま産業微生物に適用できる例はきわめて少ない。このような状況下、我々がゲノム解析を行った (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:12215, 2001, *Nat. Biotechnol.* **21**:526, 2003) 抗寄生虫および抗昆虫活性を有する抗生物質エバナーメクチンの工業的生産菌 *Streptomyces avermitilis* (*Antimicrob. Agents Chemother.* **15**:361, 1979) を用いて、自身の生産する二次代謝産物のみならず他の放線菌の二次代謝産物に関する物質生産および物質変換を包括的に解析可能なシステムの構築を目指す。ゲノム情報から本菌の染色体の再構成を施し、物質生産・変換のための最適、最小ゲノムを有する宿主の構築、ならびにこれまでの遺伝子導入とは異なりなおかつ物質生産・変換に有用な染色体組込み型ベクターの開発、さらには *Streptomyces* 属では報告例の少ない誘導発現プロモーターをゲノム情報から検索し、新たな異種遺伝子発現系の開発を計画した。

## 2. 研究の目的

物質生産および物質変換を包括的に検証できるシステムの構築のため、宿主自身の生産物の生合成系や主要な物質変換系を停止させ、導入する物質生産に関与する異種遺伝子(群)によって展開される生合成および制御ネットワークを確実にモニター可能な状態を実現させるため以下に示す基盤技術を確

立させる。(1)ゲノム情報を基盤とした染色体再構成による主要2次代謝産物生合成遺伝子群が欠失した大規模欠失株の構築。(2)溶原化ファージの組み込み機構を利用した染色体組込み型ベクターの開発。(3)ゲノム情報を基盤とした誘導可能なプロモーターの検索およびその実験的検証。物質生産に関わる有用遺伝子の評価系を構築にあたり、汎用性のある宿主の設計を考慮に入れる。即ち、宿主自身多くの二次代謝産物生合成遺伝子群を保有しており、これらの遺伝子(群)が検討したい異種の二次代謝産物の生合成や調節に関わる遺伝子と干渉し、前駆体供給やエネルギー生成系の遺伝子(群)の発現への影響が問題となる。また、異種生合成遺伝子群導入による物質生成の解析では宿主の生成する二次代謝産物の混在が解析を困難にする。したがって、*S. avermitilis* の前駆体やエネルギー生成系の遺伝子(群)を欠失せずに、主生産物 (avermectin, oligomycin, filipin) の生合成遺伝子群をすべて欠失させるような染色体再構成欠失株を構築する。染色体再構成物質生産系には異種遺伝子(群)を安定に細胞内に維持することが必須ではあるが、自律複製するプラスミドベクターには安定性および物質生産過程に多くの問題を含んでいる事例がいくつかある。一方、溶原化ファージを利用した染色体組込み型ベクターは一度染色体に組み込まれることによって選択圧無しに安定に染色体に留まり、脱落することは殆どない。二次代謝産物生合成遺伝子群のような40-kbにも及ぶ遺伝子群の安定維持には極めて有用ではなるが、これまで2種のファージ由来組込み型ベクターのみが報告されており(*Gene* **116**:43, 1992, *J. Bacteriol.* **185**:5320, 2003)、更なる組込みベクターの開発が必用である。新たな溶原化ファージの取得とその組込み遺伝子の探索によってより有効なベクターの開発につながる。遺伝子発現には遺伝子本来のプロモーターによる発現のみならず人為的な発現系による解析も有効な手段となることが多い。*Streptomyces* 属では誘導可能なプロモーターは僅か2種のみ(*J. Bacteriol.* **171**:1459, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**:14031, 2004)利用されているに留まり、新たな誘導可能なプロモーターの探索が期待されている。ゲノム解析から誘導型と推定されるいくつかのプロモーター領域が確認されており、これらを実験的に確認し、その有効性を検証する。

## 3. 研究の方法

本研究は物質生産および変換のための包括的な解析基盤を構築するため以下の3つの課題に分けて検討していく。(1)ゲノム情報を基盤とした染色体再構成による主要2次代謝産物生合成遺伝子群が欠失した大規模欠失株の構築。(2)溶原化ファージの組み込み機

構を利用した染色体組込み型ベクターの開発。(3) ゲノム情報を基盤とした高発現および誘導可能なプロモーターの検索およびその実験的検証。(1)については *S. avermitilis* のゲノム情報から生育に必須な遺伝子、前駆体およびエネルギー生成系の遺伝子を生物情報学的に解析し、欠失させる領域をいくつか設定し、大規模欠失を行っていく。(2)についてはこれまで他の研究で探索したアクチノファージのライブラリー約 30 種から順次、溶原化ファージのスクリーニングを進め、染色体組込み領域の特定を行う。(3)に関しては *S. avermitilis* のゲノム情報を種々の解析アプリケーションによってシミュレーションし、高発現あるいは誘導発現可能と推定される領域を順次スクリーニングしていくとともに、*S. avermitilis* で極微量あるいは全く生産が確認されていない二次代謝産物生合成遺伝子群あるいは異種の二次代謝産物生合成遺伝子群の発現をこれらのプロモーターを用いてその有用性を確認する。

#### 4. 研究成果

##### (1) ゲノム情報を基盤とした大規模欠失株の構築

*Streptomyces* 属細菌は原核細胞生物にもかかわらず、その染色体は環状ではなく真核細胞生物と同じく、線状構造を有しており、染色体末端にはアデノウイルスなどと同様に特異なタンパク質が結合している。これまでゲノム解析が完了した *Streptomyces* 属の染色体は複製開始点(*oriC*)が線状染色体のほぼ中央に位置し、染色体両末端からそれぞれおよそ 1 Mb ずつ、合計 2 Mb の生育に必須な遺伝子が存在しない菌株特異的な領域が配置している。一方、染色体の中央部分のおよそ 6~6.5 Mb には *Actinomycetales* 目に共通する遺伝子が配置している。*S. avermitilis* のゲノムは *oriC* が染色体中心から右側におよそ 780 kb 離れて配置しており、菌株特異的な領域は左側に 2 Mb、右側に 0.5 Mb と非対称に配置している。左側の 2 Mb の領域には主生産物を含む二次代謝産物の生合成遺伝子群が多数存在している。したがって、染色体左末端から 2 Mb の領域は必須遺伝子が配置していないので、ほとんどを欠失させても生育には影響を及ぼさず、さらには主生産物のほとんどの生成を停止させることが可能であると考えられた。二つの領域 *sav6* と *sav1205* を含む断片を用い 7,733 bp から 1,494,899 bp の領域を相同的組み換えで大規模欠失を試みた。通常相同的組み換えとは異なり極めて組み換え効率は低く、かつ期待される部分以外の領域で組み換わってしまったクローンが多数出現した。最終的に二つの正しい欠失を生じた組み換え体 SUKA2 を得ることができた。相同的組み換えによる欠失と平行して、Cre/*loxP* を用いた部位特異的な組み換えによる大規模欠

失も試みた。染色体の 7,9454 bp と 1,595,564 bp の領域に相同的組み換えによって、*loxP* がそれぞれ同方向に配置するように導入した。部位特異的な組み換え酵素の遺伝子 *cre* を、本研究で見出した *S. avermitilis* のキシロース代謝オペロンの誘導型プロモーターに連結したプラスミドを上記の *loxP* を二つ配置した組み換え体に導入後、キシロース存在化で培養し *cre* を誘導発現させた。Cre による部位特異的な組み換えは相同的組み換えに比べ極めて効率良く、かつ目的領域およそ 1.516 Mb を正確に欠失させることができ SUKA3 を得た。さらに残る主生産物などの生合成遺伝子群等を順次欠失させ、一連の大規模欠失体を作製した。これらのうち SUKA17 株(7,352,064-bp)のゲノムは、野生株の 81.46%であるにもかかわらず、形態分化や生育には全く影響が無く、むしろ野生株よりも旺盛な形態分化が観察された。

全ての大規模欠失株は *S. avermitilis* の主生産物を全く生産しない、また SUKA15, 16 および 17 株は、放線菌に特有のテルペン化合物の生成も停止している。このような状態に異種二次代謝産物生合成遺伝子群を導入し、安定に発現すれば異種二次代謝産物の生成が開始されることが期待できる

##### (2) 溶原化ファージの組み込み機構を利用した染色体組込み型ベクターの開発

ファージには感染後、宿主を単に溶菌せしめてしまうものと、宿主の染色体に組み込まれ溶原化が成立するファージがある。後者の溶原化の機構は宿主の染色体の *attB* 部位とファージゲノム上の *attP* 間でファージゲノム上の *int* の遺伝子産物である組み換え酵素によって部位特異的な組み換えを生じ、ファージゲノムが宿主染色体に導入される。この機構を利用することによって、外来遺伝子断片を安定に宿主染色体に導入することが可能である。研究室に保存されていた 30 種のファージについて、溶原化あるいは溶菌ファージであるかを調べ、4 種の溶原化ファージを得た。また、溶原化ファージとして単離されているが、*attP* および *int* 領域が不明なファージ TG1 について検討を行った。4 種のファージおよび TG1 から溶原菌を作製し、サザンハイブリダイゼーションによって  $\phi$ K38-1 および TG1 が利用できることを見出し、さらにそれらの塩基配列を決定し、*attP* および *int* 領域を特定した。これまで保有するファージ  $\phi$ C31,  $\phi$ BT1 および R4 と本研究で得られた上記、2 種のファージの *attP* と *int* を取り出し染色体組み込み型ベクターを作製した。また、これらのベクターを基に構成型、および誘導型プロモーターを連結した発現用ベクター、さらには *cos* 領域を組み込んだコスミドベクターと大腸菌の F 因子の複製領域を付加した BAC ベクターを作製した。作製した全てのベクター

は数種の *Streptomyces* 属放線菌の染色体に組み込むことが可能であるとともに導入後はベクターマーカーの選択圧無しに脱落することなく宿主染色体上に維持することができた。

### (3) ゲノム情報を基盤とした高発現および誘導可能なプロモーターの検索

*S. avermitilis* の転写プロファイルを確認するため、DNA マイクロアレイによる解析を行ったところ、特にリボソームを構成するタンパク質の遺伝子の発現量が、培養初期より後期にかけて高いことが判った。これらの内、*rpsL-rpsG-fusA1* と *rpsJ-rplC-rplD-rplW-rplB-rpsS-rplV-rpsC-rplP-rpmC-rpsQ-rplN-rplX-rplE-rpsN1* のオペロンの発現量が最も高かったので *rpsL* および *rpsJ* の上流のプロモーターを得た。一方、各種炭素源による誘導発現の有無を同じく DNA マイクロアレイで検討したところ、*xylA* の発現がキシロース添加によって有意に上昇することが、また *sav7190-sav7189-iolG2* のオペロンの発現が *myo*-イノシトール添加によって上昇することが明らかとなったため、*xylA* および *sav7190* のプロモーターを得た。

これらのプロモーターの評価については(1)の課題で *Streptomyces* 内での *Cre/loxP* による部位特異的な組換えにおける *cre* 遺伝子の発現を検討した。当初、小断片(2~5-kb)を用いた、*Cre/loxP* の部位特異的な組換えは、比較的高発現が確認されている erythromycin 生産菌 *Saccharopolyspora erythraea* の erythromycin 耐性遺伝子 *ermE* の構成的プロモーターをプロモーターを利用することで効率良く *cre* 遺伝子を発現させることが確認された。しかしながら 1.5-Mb にもおよぶ大規模欠失は、同構成的プロモーターを利用した系では部位特異的な組換えには至らなかった。そこで *ermE* プロモーターと同程度あるいはそれ以上の発現量が観察された誘導型 *xylA* プロモーターを用い、効率良く *Cre/loxP* による部位特異的な組換えを達成することができ、*xylA* プロモーターの誘導型発現系が有効であることを明らかにした。

### (4) 異種生合成遺伝子群の発現および休眠遺伝子の強制発現による物質生産

一方、本研究は(1)の課題で作製した汎用宿主を用い、(2)の課題で開発した染色体組み込みベクターを利用して異種微生物あるいは異種生物由来の二次代謝産物生合成遺伝子群の発現による物質生産を検討することが大きな課題である。この過程で発現に問題がある場合、(3)の課題で得たプロモーターを組み合わせることが可能であるため、異種二次代謝産物生合成遺伝子群導入による発現を検討した。本研究では当初予定していた、pladienolide, streptomycin, cephamycin C に加え、ribostamycin, kasugamycin, tetracycline,

echinomycin の生合成遺伝子群のクローン化を試みた。なお、すべての遺伝子群は(2)の課題で作製した染色体組み込み型コスミドおよび BAC ベクターでクローン化した。特に pladienolide の生合成は I 型ポリケチド合成酵素が関与しており、全長およそ 80-kb の DNA 断片を染色体組み込みベクターでクローン化できた。クローン化したそれぞれの生合成遺伝子群は(1)の課題で作製した、*S. avermitilis* SUKA5 あるいは SUKA17 株に導入し、その生産物を解析した。これらの内、streptomycin, cephamycin C の生産量は、それぞれの生産株 *S. griseus* および *S. clavuligerus* よりも多く、汎用宿主としての有用性が確認された。一方、pladienolide 生合成遺伝子群を導入した形質転換体では pladienolide の生成は確認出来なかった。詳細を確認したところ、生合成遺伝子群の調節遺伝子 *pldR* が全く発現していないことが判明したため、(3)の課題で得た、数種の高発現プロモーターを用い、*pldR* の強制的な発現を試み、著量の pladienolide の生産を確認することができた。生合成遺伝子群の発現調節は、遺伝子群内の調節遺伝子によって制御されていることは、既に多くの事象が確認されているが、それらの調節遺伝子をさらに上位で制御している制御系に関してはほとんど解明されていない。したがって、宿主にそのような上位の制御系を保有していない場合は、代謝産物の生成は期待できない。しかしながら、本研究のように、生合成遺伝子群内の調節遺伝子の強制発現によって回避できることが確認された。

これまでの *Streptomyces* 属のゲノム解析結果から、多数の生合成遺伝子群が染色体に配置していること、またそれらの多くは休眠状態であることが明らかとなっている。これらの休眠遺伝子を活性化することによって、新たな新規化合物の発見につながることを期待できる。*S. avermitilis* の染色体には 37 種の生合成遺伝子群が確認されているが、現在までに確認された化合物はわずか 15 種にすぎない。(1)の課題で作製した SUKA17 株は内在性のテルペン化合物を一切生成しないため、野生株が保有する、機能不明な 3 つのテルペン合成酵素遺伝子(群)を(3)の課題で得たプロモーターを用い解析を行った。

Sesquiterpene 合成酵素と推定された遺伝子 *sav3032* はシトクロム P450 CYP170A2 の遺伝子 *sav3031* と転写カップリングしている。発現解析の結果、*sav3032* は発現していないことが明らかとなったため、*sav3032-sav3031* を含む断片をクローン化、*sav3032* のプロモーター領域を(3)で得た *rpsJ* あるいは *rpsL* のプロモーターと交換するとともに CYP170A2 の反応効率を上げるため、フェレドキシ還元酵素およびフェレドキシンの遺伝子、*fprD(sav5675)* および *fdxD(sav3129)* を下流に

配置し、人工オペロンとして SUKA 株で発現させた。形質転換体からは少量の *epi*-isozizaene, albaflavenol および albaflavenone が、主生産物として 4 $\beta$ ,5 $\beta$ -epoxy-2-*epi*-zizaan-6 $\beta$ -ol が単離された。なお、後者の化合物はこれまで知られていない新規な化合物であった。また、生成量は *rpsJ* プロモーターを使用したときのほうが良好であった。

同じく sesquiterpene 合成酵素と推定された遺伝子 *sav76* は発現解析において全く、発現していないことが明らかとなった。前述の *sav3032* の発現と同じく、*rpsJ* プロモーターと交換するとともに、セスキテルペンの前駆体である farnesyl-diphosphate(FPP)の供給を期待するため FPP 合成酵素の遺伝子 *ptlB(sav2997)* を下流に配置した人工オペロンとなるように配置した。SUKA17 株の形質転換体からはアルコール体 2 種およびその一方の酸化体と思われる成分を検出した。アルコール体のうちのひとつは植物から蓄積が報告されている *viridiflorol* と同定し、もう一つは新規化合物であることが判明し、*avermitilol* と命名した。また、酸化体と推定された化合物は *avermitilol* のアルコールが SUKA17 の保有する酸化還元酵素によって酸化され、カルボニルとなった新規化合物、*avermitinone* であることが明らかとなった。

*S. avermitilis* のもう一つの sesquiterpene 生合成遺伝子群は、これまでの強制発現系を利用し、新規骨格を有する neopentalenolactone 類の生成に関与することを明らかにしてきた。pentalenolactone および neopentalenolactone の生合成過程の反応には環拡大反応によって 6 員環ラク톤の形成が達成されると推定されていた。また、それぞれの化合物の構造上の相違点はこの環拡大反応の酸素原子の導入の配向性の差異によるものと推定されていた。この環拡大反応は Baeyer-Villiger 酸化反応であり、これまで生物種からの Baeyer-Villiger 反応を触媒する酵素の報告は極めて少なく、さらに生理的な基質が明らかとなっている例は無い。そこで、このような詳細な遺伝子機能解析に大規模欠失株が有効に利用できることを実証するため、Baeyer-Villiger 反応を触媒すると思われる PtlE および近縁種で pentalenolactone を生産する 2 菌株より PenE および PntE の反応を解析した。*ermE* プロモーターで発現させた *ptl* 遺伝子群(*ptlD* インフレーム欠失を施した)は neopentalenolactone D を生成し、さらに *ptlE* を欠失(インフレーム)させたものは pentalenolactone および neopentalenolactone に共通な中間体と思われる 11-oxo-1-deoxypentalenic acid を生成する。この欠失体に *penE* あるいは *pntE* を *ermE* プロモーターで強制発現させることによって

pentalenolactone D を生成することを確認した。これらの結果から、PtlE は PenE と PntE とは異なる配向性の Baeyer-Villiger 反応を触媒することが推定された。さらに大腸菌で PtlE, PenE および PntE の組換え酵素を作製し、*in vitro* の反応を行い、それぞれの酵素の Baeyer-Villiger 反応ならびにその配向性を確認することができた。これらの結果は、アミノ酸レベルではきわめて相同性が高いにもかかわらず、反応の配向性が全く異なる初めての例である。また、Baeyer-Villiger 反応を触媒する酵素で、生理的な基質が明らかとなった初めての例でもある。

以上のように、本研究によって *S. avermitilis* をモデルに物質生産に特化した染色体の再構成を達成し、さらに異種二次代謝産物生合成遺伝子群を効率良く、かつ安定に導入する系を構築することができた。また、構築した系を用いて、実際に異種の二次代謝産物生合成遺伝子群を導入することによって、それらの二次代謝産物を十分な生産量で得ることもできた。また、生合成遺伝子群の導入によって発現が認められなかったものについても、制御遺伝子を強制的に発現させることによって解決すること可能であることを実証した。さらに休眠遺伝子を強制的に発現させることによって、新規な骨格の化合物の単離まで達成することが出来たことは特筆すべきことである。このような、物質生産を目的に合成生物学的な方法論によって物質生産系を作製した例は国内外ではいまだ報告例が無い。本邦初の次世代生産技術系として今後の利用、さらなる改良が期待できる成果と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件) すべて査読有の論文

1. Seo, M-J, Zhu, D, Endo, S, Ikeda, H, Cane, D.E. Genome mining in *Streptomyces*. Elucidation of the role of Baeyer-Villiger monooxygenases and non-heme iron-dependent dehydrogenase/oxygenases in the final steps of the biosynthesis of pentalenolactone and neopentalenolactone. *Biochemistry* **50**, 1739-1754, 2011.
2. Zhu, D, Seo, M-J, Ikeda, H, Cane, D.E. Genome mining in *Streptomyces*. Discovery of an unprecedented P450-catalyzed oxidative rearrangement that is the final step in the biosynthesis of pentalenolactone. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 2128-2131, 2011.
3. Takamatsu, S, Lin, X, Nara, A, Komatsu, M, Cane, D.E, Ikeda, H. Characterization of a silent sesquiterpenoid biosynthetic pathway in *Streptomyces avermitilis* controlling *epi*-isozizaene and albaflavenone biosynthesis and isolation of a new oxidized *epi*-isozizaene metabolite. *Microb. Biotechnol.* **4**, 184-191, 2011.
4. Giglio, S, Chou, W.K.W, Ikeda, H, Cane, D.E, Monis, T. Biosynthesis of 2-methylisoborneol in *Cyanobacteria*. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 992-998 (2011).
5. Takamatsu, S, Lin, X, Fushinobu, S, Shoun, H, Komatsu, M, Cane, D.E, Ikeda, H. Pentalenic acid is

- a shunt metabolite in the biosynthesis of the pentalenolactone family of metabolites: Hydroxylation of 1-deoxypentalenic acid mediated by CYP105D7 (SAV\_7469) of *Streptomyces avermitilis*. *J. Antibiot.* **64**, 65-71 (2011).
6. Ichikawa, N. Oguchi, A. Ikeda, H. Ishikawa, J. Kitani, S. Watanabe, Y. Nakamura, S. Katano, Y. Kishi, E. Sasagawa, M. Ankai, A. Fukui, S. Hashimoto, Y. Kamata, S. Otoguro, M. Nihira, T. Horinouchi, S. Ohnishi, Y. Hayakawa, M. Kuzuyama, T. Arisawa, A. Nomoto, F. Miura, H. Takahashi, Y. Fijita, N. Genome sequence of *Kitasatospora setae* NBRC 14216<sup>T</sup>: An evolutionary snapshot of the family *Streptomycetaceae*. *DNA Res.* **17**, 393-406 (2010).
  7. Lin, X. Fushinobu, S. Takamatsu, S. Wakagi, T. Ikeda, H. Shoun, H. Regio- and stereospecificity of filipin hydroxylation sites revealed by crystal structure of cytochrome P450 105P1 and 105D6 from *Streptomyces avermitilis*. *J. Biol. Chem.* **285**, 16844-16853 (2010).
  8. Chou, W.K.W. Fanizza, I. Uchiyama, T. Komatsu, M. Ikeda, H. Cane, D.E. Genome mining in *Streptomyces avermitilis*: Cloning and characterization of SAV\_76, the synthase for a new sesquiterpene, avermitilol. *J. Am. Chem. Soc.* **132**: 8850-8851 (2010).
  9. Komatsu, M. Uchiyama, Takuma, Cane, D.E. Omura, S. Ikeda, H. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 2646-2651 (2010).
  10. Ueki, M. Suzuki, R. Takamatsu, S. Takagi, H. Uramoto, M. Ikeda, H. Osada, H. Nocardamin production by *Streptomyces avermitilis*. *Actinomycetol.* **23**, 34-39 (2009).
  11. Nett, M. Ikeda, H. Moore, B.S. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat. Prod. Rep.* **26**, 1362-1384 (2009).
  12. Jiang, J. Tetzlaff, C.N. Takamatsu, S. Iwatsuki, M. Komatsu, M. Ikeda, H. 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).
  13. Morita, K. Yamamoto, T. Fusada, N. Komatsu, M. Ikeda, H. Hirano, N. Takahashi, H. The site-specific recombination system of actinophage TG1. *FEMS Microbiol. Lett.* **297**, 234-240 (2009).
  14. Morita, K. Yamamoto, T. Fusada, N. Komatsu, M. Ikeda, H. Hirano, N. Takahashi, H. *In vitro* characterization of the site-specific recombination system based on actinophage TG1 integrase. *Mol. Genet. Genome.* **282**, 607-616 (2009).
  15. Tanaka, Y. Komatsu, M. Okamoto, S. Tokuyama, S. Kaji, A. Ikeda, H. Ochi, K. Antibiotic overproduction by *rpsL* and *rsmG* mutants of various actinomycetes. *Appl. Env. Microbiol.* **75**, 4919-4922 (2009).
  16. Kitani, S. Ikeda, H. Sakamoto, T. Noguchi, S. Nihira, T. Characterization of a regulatory gene, *aveR*, for the biosynthesis of avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**, 1089-1096 (2009).
  17. Lin, X. Fushinobu S. Ikeda H. Wakagi T. Shoun H. Crystal structures of cytochrome P450 105P1 from *Streptomyces avermitilis*: conformational flexibility and histidine ligand state. *J. Bacteriol.* **191**, 1211-1219. (2009).
  18. Komatsu, M. Tsuda, M. Omura, S. Oikawa, H. Ikeda, H. Identification and functional analysis of genes controlling biosynthesis of 2-methylisborneol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 7422-7427 (2008).
  19. Machida, K. Arisawa, A. Takeda, S. Tsuchida, T. Aritoku, Y. Yoshida, M. 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).
- [学会発表] (計 50 件)
1. 池田 治生. 物質生産のための *Streptomyces avermitilis* のゲノム改変. 2010 年度日本放線菌学会大会. 2010.9.2, 東京
  2. Ikeda, H., Komatsu, M., Uchiyama, T. Optimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. 11<sup>th</sup> International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. 2010.6.29, Melbourne, Australia.
  3. Ochi, K., Tanaka, Y., Komatsu, M., Hosaka, H., Ikeda, H. Waking up bacterial sleeping genes: a new method to elicit bacterial capabilities. 11<sup>th</sup> International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. 2010.6.29, Melbourne, Australia.
  4. Komatsu, M., Tanaka, Y., Ochi, K., Ikeda, H. Characterization of *relA* mutant of industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. 11<sup>th</sup> International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. 2010.6.29, Melbourne, Australia.
- その他 平成 23 年度 11 件、平成 22 年度 21 件、平成 20 年度 14 件
- [その他]  
ホームページ  
<http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp/>
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
池田 治生(IKEDA HARUO)  
北里大学・大学院感染制御科学府・教授  
研究者番号：90159632
- (2)研究分担者  
高松 智(TAKAMATSU SATOSHI)  
平成 21 年度まで  
北里大学・大学院感染制御科学府・講師(現・  
日本大学・薬学部・准教授)  
研究者番号：30236351  
小松 護(KOMATSU MAMORU)  
北里大学・大学院感染制御科学府・助教  
研究者番号：40414057
- (3)連携研究者  
なし