

「微生物機能を活用した環境調和型製造基盤技術開発」
「微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発」
事後評価報告書

平成23年10月

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
研究評価委員会

平成23年10月

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
理事長 古川 一夫 殿

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
研究評価委員会 委員長 西村 吉雄

NEDO技術委員・技術委員会等規程第32条の規定に基づき、別添のとおり
評価結果について報告します。

目 次

はじめに	1
分科会委員名簿	2
審議経過	3
評価概要	4
研究評価委員会におけるコメント	7
研究評価委員会委員名簿	8
第1章 評価	
1. プロジェクト全体に関する評価結果	1-1
1. 1 総論	
1. 2 各論	
2. 個別テーマに関する評価結果	1-29
2. 1 高性能宿主細胞創製技術の開発	
2. 2 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発	
2. 3 バイオリファイナリー技術の開発	
3. 評点結果	1-61
第2章 評価対象プロジェクト	
1. 事業原簿	2-1
2. 分科会における説明資料	2-2
参考資料1 評価の実施方法	参考資料 1-1
参考資料2 評価に係る被評価者意見	参考資料 2-1

はじめに

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構においては、被評価プロジェクトごとに当該技術の外部専門家、有識者等によって構成される研究評価分科会を研究評価委員会によって設置し、同分科会にて被評価対象プロジェクトの研究評価を行い、評価報告書案を策定の上、研究評価委員会において確定している。

本書は、「微生物機能を活用した環境調和型製造基盤技術開発／微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発」の事後評価報告書であり、第28回研究評価委員会において設置された「微生物機能を活用した環境調和型製造基盤技術開発／微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発」（事後評価）研究評価分科会において評価報告書案を策定し、第29回研究評価委員会（平成23年10月14日）に諮り、確定されたものである。

平成23年10月
独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
研究評価委員会

「微生物機能を活用した環境調和型製造基盤技術開発」

微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発」

事後評価分科会委員名簿

(平成23年4月現在)

	氏名	所属、役職
分科会長	ふくだ まさお 福田 雅夫	長岡技術科学大学 工学部 生物系 教授
分科会長 代理	きりむら こうたろう 桐村 光太郎	早稲田大学 理工学術院 先進理工学部 応用化学科 教授
委員	あだち ひろゆき 阿達 弘之	日本曹達株式会社 研究開発本部 小田原研究所 所長
	あべ けいえつ 阿部 敬悦*	東北大学大学院 農学研究科 生物産業創成科学専攻 教授
	きの くにし 木野 邦器	早稲田大学 理工学術院 先進理工学部 応用化学科 教授
	こやま やすじ 小山 泰二	公益財団法人 野田産業科学研究所 所長
	もりなが やすし 森永 康	日本大学 生物資源科学部 食品生命学科 教授

敬称略、五十音順

注*：実施者の一部と同一大学であるが、所属部署が異なるため（実施者：東北大学多元物質研究所、東北大学大学院工学研究科バイオ工学専攻）「NEDO 技術委員・技術評価委員規程(平成23年7月7日改正)」第34条（評価における利害関係者の排除）により、利害関係はないとする。

審議経過

● 第1回 分科会（平成23年4月21日）

公開セッション

1. 開会、分科会の設置、資料の確認
2. 分科会の公開について
3. 評価の実施方法と評価報告書の構成について
4. プロジェクトの概要説明

非公開セッション

5. プロジェクトの詳細説明
6. 全体を通しての質疑

公開セッション

7. まとめ・講評
8. 今後の予定
9. 閉会

● 第29回研究評価委員会（平成23年10月14日）

評価概要

1. 総論

1) 総合評価

本プロジェクトは、日本が強みを持つ微生物による有用物質生産における産業の技術蓄積・インフラストラクチャー・人的資源を基盤に、微生物機能にかかわるバイオ技術を利用して、環境調和型製造基盤技術の開発を目指すものであり、日本のバイオ技術の復権と国際競争力強化を通じて日本の経済力を高める公共性を備える NEDO の関与すべき事業である。当該分野で実績に優れたプロジェクトリーダーならびにサブリーダーの下、産・官・学のトップクラスの研究開発者が大規模に参加する強力な実施体制が組み立てられている。染色体縮小化技術、水／有機溶媒二相系反応場利用技術、共役複合酵素系を用いた生産技術、増殖非依存型バイオプロセスを用いた生産技術、膜利用発酵リアクターを用いた生産技術において世界最高水準あるいは世界をリードする成果を上げ、新たな技術領域を形成した。これらの生産技術は多様な物質生産に有効で汎用性があり、他の競合技術と比較して優位性があるとともに、新たな汎用技術として更なる展開が期待される。本プロジェクトの成果を出発点として新たなステージに進むことで大きな成果が期待でき、積極的な成果の情報開示と利用許諾ならびに後継プロジェクトの設置が強く望まれる。

しかし、各研究課題で実施された多様なテーマの成果を横断的に検証することで技術の汎用性と優れた内容をより明確に示せたと思われるが、課題間の連携が不十分で、実際の連携による相乗効果を十分には出せなかったきらいがある。また、実用化までの道筋を具体的に示せていないテーマもあったが、汎用性を持つ技術と固有な技術を整理し、それぞれの実用化に向けた一層の努力をお願いしたい。

2) 今後に対する提言

開発された技術を着実に実用化するだけでなく、国内の企業やアカデミアが広く利用できるようにして日本の発酵産業全体に成果が波及することを期待する。例えば、次なる参入希望者に対して可能性を示せるように、宿主細胞および酵素等のライブラリー整備、必要・不要遺伝子に関する遺伝子データベース、微生物の機能性向上にかかわる遺伝子欠失データベースの作成が期待される。

本プロジェクトの強力な展開により、新たなバイオ産業の可能性が拓けてきたと考えられる。グリーンイノベーション事業の一環として、新たなステージに進むことでさらに大きな成果が期待できるので、本プロジェクトの成果を核

にした後継プロジェクトの設定が強く望まれる。

2. 各論

1) 事業の位置付け・必要性について

環境負荷の少ない製造プロセスの開発は時代の要請に応えるものである。本プロジェクトは、リスクが高く、民間活動のみでは実施困難な課題と考えられ、それぞれの得意企業が参画し効率的に研究推進できる NEDO 主導のプロジェクトとして妥当である。

また、醸造・醗酵に始まる微生物利用産業は様々な独創的技術開発により国際競争力を維持してきたが、近年、その差が縮まりつつある。日本のバイオ技術の復権、国際競争力の観点、さらに省エネ、CO₂ 削減、バイオマスの利用促進の観点でも、事業目的は極めて妥当と判断される。

今後、成果が社会インフラとして定着するよう、開発者のプライオリティを尊重しつつもオールジャパンで成果を活用できる仕組みづくりが必要である。

2) 研究開発マネジメントについて

研究開発実施の事業体制・計画は、大規模なプロジェクトでありながら、いづれも現在の情勢を踏まえた戦略的な目標が設定されている。また、個別研究テーマごとに示された実施スケジュールは、設定した目標＝指標への合理的な道筋を提示しており、妥当である。プロジェクトマネージャーやサブリーダーは的確に業務をこなし、本プロジェクトでの研究推進や成果創出に貢献している。さらに、個々の研究テーマに関連をもつ有力な企業を実施者に加えており、実用化につながる体制を整え、研究開発委員会において各受託者における実用化の見通しについての議論を行うなど、実用化に向けて積極的な姿勢が維持された。

しかし、3つのグループでの研究開発は、それぞれに独立した展開と成果を挙げているが、他グループとの連携や協調性は十分にとられておらず、プロジェクト中間段階で全体的な構想や研究計画を再確認するなどして、最終的に社会への力強いアウトプットを示せるような一体化した連携研究として仕上がっていると更に良かった。

3) 研究開発成果について

成果は、有意義かつ独創性が高いものが多く、当初の目標を達成していると判断される。高性能宿主細胞創製技術では染色体の縮小化とその効果において、検討した大腸菌、枯草菌、分裂酵母のすべてにおいて、世界水準の独自性の高い成果を上げており、染色体の縮小が実際に大きな効果＝生産性向上をもたら

すことを世界で初めて示した。特に大腸菌においては、世界最高水準の生産性と多様な生産物における生産性向上が示されており、染色体縮小技術の汎用性が示された。微生物反応の多様化・高機能化技術の開発では有機溶媒耐性菌を水／有機溶媒二相系反応場で用いて(R)-マンデル酸と 4-クロロ-3-ヒドロキシアセト酪酸エチルの世界最高レベルの生産を達成し、水／有機溶媒二相系反応場の優位性を明確にした。バイオリファイナリー技術では、増殖非依存型バイオプロセスと膜利用発酵リアクターを利用した乳酸などの生産でそれぞれ世界をリードする成果を達成した。これらの生産技術は多様な物質生産に有効で汎用性があり、他の競合技術と比較して優位性をもつ新たな技術領域を形成しており、発酵生産における新たな汎用技術として展開が期待される。さらに、知的財産権等の取得も実用化計画に沿って適切に行われ、論文発表や学会等での成果発表も活発に行われた。

一方、成果の普及をどのように図るかは今後の課題である。大きな波及効果を生むには日本の国益と開発者のプライオリティを両立させるライセンス・ポリシーが必要である。日本が強みをもった分野の優位技術であるが故に、海外での知財戦略と情報発信をしっかりと行う必要がある。

4) 実用化の見通しについて

高性能宿主細胞創製技術では各宿主で高い生産性が、微生物反応の多様化・高機能化技術の開発では水／有機溶媒二相系反応場ならびに水酸化酵素の改良、共役反応複合酵素系の活用で多様な物質の高い生産性が、バイオリファイナリー技術でも乳酸などで優れた生産性を示しており、実用化イメージ・出口イメージは具体的かつ明白になっている。それぞれの生産技術は自社での活用以外に他社へのライセンスアウトやアカデミアとの共同研究が計画されている。また、開発された技術は汎用性・基幹性があることから、産業菌への適用や、化学プロセスとの補完的組み合わせなど、波及性も期待される。

しかし、プロジェクト終了後の各企業での具体的な取り組みが明確になっていないため、成果の社会への還元や実用化の見通しは確実でない。

今後、成果が実施企業にとどまることなく、ライセンスアウトのための積極的な情報発信や共同研究の拡大などを通じて、広く社会に還元される努力が必要である。

研究評価委員会におけるコメント

第29回研究評価委員会（平成23年10月14日開催）に諮り、本評価報告書は確定された。研究評価委員会からのコメントは特になし。

研究評価委員会

委員名簿（敬称略、五十音順）

職 位	氏 名	所 属、役 職
委員長	西村 吉雄	学校法人早稲田大学大学院 政治学研究科 （科学技術ジャーナリスト養成プログラム） 客員教授
委員長 代理	吉原 一紘	オミクロンナノテクノロジージャパン株式会社 最高顧問
委員	安宅 龍明	一般社団法人ナノテクノロジービジネス推進協議会 企画運営推進会議（オリンパス株式会社 未来創造研 究所） 副議長（コーディネーター）
	五十嵐 哲	工学院大学 応用化学科 教授
	伊東 弘一	学校法人早稲田大学 理工学術院総合研究所 客員教授（専任）
	稲葉 陽二	日本大学 法学部 教授
	尾形 仁士	三菱電機エンジニアリング株式会社 相談役
	小林 直人	学校法人早稲田大学 研究戦略センター 教授
	佐久間一郎	国立大学法人東京大学大学院 工学系研究科 精密機械工学専攻 教授
	佐藤 了平	大阪大学大学院 マテリアル生産科学専攻 （システムデザイン領域担当） 教授
	菅野 純夫	国立大学法人東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻 教授
	架谷 昌信	愛知工業大学 工学部機械学科 教授・総合技術研究所所長
	宮島 篤	国立大学法人東京大学 分子細胞生物学研究所 教授

第1章 評価

この章では、分科会の総意である評価結果を枠内に掲載している。なお、枠の下の「○」「●」「・」が付された箇条書きは、評価委員のコメントを原文のまま、参考として掲載したものである。

1. プロジェクト全体に関する評価結果

1. 1 総論

1) 総合評価

本プロジェクトは、日本が強みを持つ微生物による有用物質生産における産業の技術蓄積・インフラストラクチャー・人的資源を基盤に、微生物機能にかかわるバイオ技術を利用して、環境調和型製造基盤技術の開発を目指すものであり、日本のバイオ技術の復権と国際競争力強化を通じて日本の経済力を高める公共性を備える NEDO の関与すべき事業である。当該分野で実績に優れたプロジェクトリーダーならびにサブリーダーの下、産・官・学のトップクラスの研究開発者が大規模に参加する強力な実施体制が組み立てられている。染色体縮小化技術、水／有機溶媒二相系反応場利用技術、共役複合酵素系を用いた生産技術、増殖非依存型バイオプロセスを用いた生産技術、膜利用発酵リアクターを用いた生産技術において世界最高水準あるいは世界をリードする成果を上げ、新たな技術領域を形成した。これらの生産技術は多様な物質生産に有効で汎用性があり、他の競合技術と比較して優位性があるとともに、新たな汎用技術として更なる展開が期待される。本プロジェクトの成果を出発点として新たなステージに進むことで大きな成果が期待でき、積極的な成果の情報開示と利用許諾ならびに後継プロジェクトの設置が強く望まれる。

しかし、各研究課題で実施された多様なテーマの成果を横断的に検証することで技術の汎用性と優れた内容をより明確に示せたと思われるが、課題間の連携が不十分で、実際の連携による相乗効果を十分には出せなかったきらいがある。また、実用化までの道筋を具体的に示せていないテーマもあったが、汎用性を持つ技術と固有な技術を整理し、それぞれの実用化に向けた一層の努力をお願いしたい。

〈肯定的意見〉

- 化学工業においては、医薬品に代表されるような高純度のエナンチオマー製造や複雑な構造を持つ天然物の利用が進められており、またエネルギー源としてのバイオマスの活用等の要望が高まっている。本プロジェクトはこれらの課題を環境にやさしいバイオプロセスで解決していこうとするものであり、課題として設定した目標を効率よく達成できる成果があがっている。さらに多くの化学工業的課題に対応できる基盤技術が開発されている。
- バイオものづくりの新しい挑戦が行われ、多くの実用化に向けた進展が得られた。成果の中で直ちに実用化されるものはないが、本プロジェクトにより企業単独ではリスクな研究開発が実施可能になり、実用化に近いレベルにまで到達できたことを評価する。数値目標は、一部未達もあるものの概ね達

成された。波及効果に関しては今後本プロジェクトの開発技術をいかに普及できるかにかかっている。

- 微生物機能にかかわるバイオ技術を利用して環境調和型製造基盤技術の開発を目指すものでバイオ技術の生産性向上と高機能化を図るもので、環境安心イノベーションプログラムの目標達成に寄与することが明らかな事業で、日本のバイオ技術の復権と国際競争力強化を通じて日本の経済力を高める公共性を備える NEDO の関与すべき事業である。生産の場としての微生物細胞における物質生産の効率化に向けた戦略的な合理的な計画の下に、具体的に明確な定量的目標＝指標が設定されている。当該分野で実績に優れたプロジェクトリーダーならびにサブリーダーの下、技術力・事業化能力を備えた企業と有力な研究機関・大学が参加する強力な実施体制が組まれている。染色体縮小化技術、水／有機溶媒二相系反応場利用技術、共役複合酵素系を用いた生産技術、増殖非依存型バイオプロセスを用いた生産技術、膜利用発酵リアクターを用いた生産技術において世界最高水準あるいは世界をリードする成果を上げ、新たな技術領域を形成した。これらの生産技術は多様な物質生産に有効で汎用性があり、他の競合技術と比較して優位性があるとともに、新たな汎用技術として更なる展開が期待される。成果は適宜、特許出願・論文発表・外部発表され、権利の確保と成果の普及も進められている。今後、更なる研究やライセンスアウトなどにより、成果の実用化と普及が進むと期待される。
- 日本が強みを持つ微生物物質生産産業の技術蓄積・インフラストラクチャー・人的資源を基盤に、最新の学術的知見を導入あるいは発見しつつ、「環境安心イノベーションプログラム」「エネルギーイノベーションプログラム」の生物面での課題を反映した中核プロジェクトである点が重要である。日本の生物物質生産に関わる産・官・学のトップクラスの研究開発者が大規模に参集して、前期 5 年も含めると 10 年という長期にわたり研究開発投資が継続され、国際的に競争力のある生物物質生産のための新基幹技術が創成・蓄積されたことも大きな意義を持つ。微生物物質生産の能力を最大限に発揮するための新コンセプトとして、3つの研究開発課題を設定して多様な開発が進められ、多くの成果が論文ならびに特許として発信された。各研究課題で概ね当初の目標値を上回る成果を達成した。その成果の一部には 3～5 年後に実用化予定のものもあり、高く評価される。
- 3 グループそれぞれの研究は目標をほぼ達成し、その成果も優れたものと判断できる。研究のコンセプトならびにその手法も優れており、特に「高性能宿主細胞創製技術の開発」は世界をリードする革新的なものとなった。本成

果は、今後この領域の研究展開を考える上で汎用性のある基盤技術として位置づけられるもので、我が国の微生物利用関連技術と開発力の水準の高さを内外に知らせる結果になった。

- 全体として、バイオテクノロジーによる有用物質生産の領域で独創的かつ先導的な成果が得られており、将来のバイオ産業に資する優れた内容と高く評価できる。高性能宿主細胞の創製（ゲノム縮小化微生物細胞の作製）や微生物反応の多様化・高機能化技術の開発、バイオリファイナリー技術の開発の3テーマのそれぞれについて成功例が顕著に見られ、新規産業の創出に向けての意義のあるプロジェクトであったことが高く評価できる。国際競争力強化の面でも、日本発といえる独創的な成果が多く、知的所有権の確保とともに日本の知的存在感を強くアピールできる内容となっており、この点も高く評価できる。実際の産業化については、既に一部の成果をもとに製造と事業化が行われているが、今後数年間に実生産に向かう成果も多いことが容易に推測できる。したがって、新規産業技術の開発に成功したことも明らかで、事業化あるいは実用化の観点からも本プロジェクトの内容は高く評価できる。得られた良質な成果あるいは開発された技術が散逸しないように注意することが必要であり、これらを継承し発展させる仕組みが必要である。さらに付け加えれば、本プロジェクトの成果をさらに結集あるいは先鋭化させて世界最先端のバイオ産業の育成を図り、そこから得られる果実を収穫するための仕組みづくりも重要である。学問的な研究対象として興味深い成果も多く、実用面から得られたこれらの成果を科学的あるいは工学的に検討することによって、すなわち実用から生まれた成果を基礎的に（学術的に）解析することによって、新規産業の創出や新規技術の開発も可能となり、それらの基盤となる新規な知的財産の確保も期待できる。以上を総括すれば、本プロジェクトは「微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発」の名称にふさわしい多くの成果に彩られた意義深い内容に満ちており、当初の目標を優に達成したことは明らかで、極めて高く評価できる。本プロジェクトの成果を新たな出発点として、新たなステージに進むことでさらに大きな成果が期待できるため、後継プロジェクトの設定が強く望まれる。
- 個々の研究テーマは十分な成果をあげた。石油化学に依存した物質生産システムがバイオプロセスで置換される例を示すことができ、モノづくりにおける微生物の潜在能力を改めて認識させられた。今後も研究開発が継続され、汎用性のある技術となることを期待したい。
生物の染色体を縮小化することにより微生物の機能を高めるというユニークな取り組みや、従来合成化学的にしか生産できなかった化合物や植物だけが生産可能な二次代謝産物を微生物でも生産可能であることを示した成果

は評価できる。

〈問題点・改善すべき点〉

- それぞれの要素技術の独立性が高く、プロジェクトとしての総合力発揮という点ではやや物足りなさを感じる。日本のバイオインダストリーとしての競争力強化の視点から、今後情報公開や特許の実施許諾などを柔軟に行うべきである。
- 各課題で多様なプロジェクトが実施されたが、成果を集約するには至っていない部分もある。今後、多様な成果を集約して更なる展開に結びつけることを期待したい。
- 3 課題間の連携については中間評価で指摘されたが、3 つの課題各々の初期目標設定のレベルの高さ、リスク(困難さ)、それに伴って実施された各課題での研究開発業務の負荷の大きさが足かせになり、プロジェクト後半でも課題間の連携は議論の域を出ず、実際の連携による相乗効果を十分には出せなかった。各課題ではレベルの高い成果が出ていることから、今後の連携による新たな成果を期待する。
- 本プロジェクトに関しては、終了後の対応が極めて重要である。特筆すべき事項としては、東日本大震災による影響を受けて、2011 年 3 月開催予定の成果報告会を兼ねたシンポジウムが中止となったこと、さらに 2011 年春季の各種学会大会も中止となり本プロジェクト終了後の成果発表の機会が失われたことが挙げられる。特殊事情とは言え成果を発信する機会を失ったことは極めて大きな損失であり、これらを補償することも考慮しながら、本プロジェクト関連の成果の国内外に向けた発信が極めて重要である。国内の多くの研究者は、当該プロジェクトが実施されていること、あるいは個々の研究成果については知っていても、その全体像あるいは具体的な到達点については全く知らないのが現状である。さらに、海外の研究者あるいは研究機関では国内以下の認知度である。個々の研究あるいは事業化された内容もさることながら、「微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発」のプロジェクト全体としてのアピールが重要で、NEDO は事後の対応を誠実に行うべきである。一例として、簡単な成果内容のまとめを作成し、国内外の主要機関や研究者に配布するなどの試みが最低限なされるべきである。また、前述の成果報告会の機会も再度設けるべきである。このように、成果報告と各所への知の還元が必要であり、研究終了後に初めてできる「成果の発信」が期待される。
- それぞれのテーマは設定目標に対して十分な成果があがっている。しかし、実用化といった面ではすでにベンチスケールでの実証実験まで進んでいる

テーマもあるが、実用化まであと何%と具体化できないようなテーマもある。企業において開発段階をめざすあるいは開発テーマ厳しくスケジュール管理されている。追加評価においてはその流れを示し、状況をより明確にしてはどうか。いずれにしても、プロジェクトの一連の流れの中で企業化できるよう対象を明確にして一層の努力をお願いしたい。

- テーマ間での連携がとれているとはいいがたく、プロジェクト全体としての統一性が乏しい。たとえば、サブテーマ2で開発された生物変換プロセスが染色体を縮小した宿主や増殖非依存型プロセスを利用することによりコストダウンにつながるのかといった検討が行われていない。また、サブテーマ3では異なる微生物のシステムを用いてD-乳酸を生産しているが、連携しながら進めたほうがより効果的であった。
- グループの成果を横断的に検証することでそれぞれの技術の汎用性と優れた内容がより明確に示されたはずであるが、残念ながら、そのような試みがほとんどされていなかった。最終ステージの研究計画の段階で、一例でも良いので連携研究の具体的な立案と実施を組み入れておくべきであった。また、成果の公表に関しては論文発表や国際学会等での発表などを実施していたが、今後も本研究全体を総括したシンポジウムのような成果発表の場をいくつか考えた方が良い。成果が素晴らしいわりに、国外での認知度はいまひとつ低かった。
また、成果の社会への還元と共有化に関しての具体的な計画案が示されていなかった。プロジェクトに参画していない大学研究機関や企業の研究開発にも成果の開示と技術の利用許諾が積極的になされても良い。

〈その他の意見〉

- 当該分野の我が国の研究開発力は示された。これをモデルケースとして、今後、持続的社会的実現に向けた新生バイオ産業の発展とそれを支える技術開発研究を促進することが重要である。産学官が一体となった新たな研究体制の構築と研究投資が必要である。
- 本プロジェクトでは、3テーマごとの成果は良質であるが、「高性能宿主細胞の創製」、「微生物反応の多様化・高機能化技術の開発」、「バイオリファイナリー技術の開発」の3テーマで共通した目標が見られず、共同で行われた事業もない。それぞれの長所を互いに活用するような事業が行われ、共同作業により成果が提出されるべきであった。
- 設定された数値目標は、多くの場合公開された生産性指標を基準に設定されたものであるが、生産性指標は企業秘密であり正確な数値が公開されているとは言い難いため、このような数値目標設定が果たして妥当なものであった

のかは吟味が必要である。

- 報告書の量が多い。非公開資料も公開資料との重複が多く、大部分が発表済みの内容である。どの程度まで実用化に近づいているのか不明瞭なところがある。
- 微生物の多様性を高度に引き出し、活用しており非常に期待できる技術が開発されようとしているが、微生物細胞を操作するという点から安全性の確認をお願いしたい。
- 今回のプロジェクトでは、産業界からは既に生物物質生産で実績のある企業が参画して研究開発を進めてきた。企業の実力がある分、各企業の独立性も高い。プロジェクト実施中の研究連携が課題として指摘されたが、プロジェクトFS段階でプロジェクト終了後に目指す産業集積・産業内(企業間)連携による大規模インフラ投資のリスク分散などを政策的に議論する必要がある。本研究開発プロジェクトのように、長期に大きな投資を伴う研究開発プロジェクトでは、困難なことではあるが、新たな産業集積像を十分に検討して提示して欲しい。例えば石化代替品生産では大規模生産システムが必要となることから、個別の企業の成果や活動にとどまらない、生物系産業および他産業も含めた新たな産業集積が必要である。産業連携のあり方が示されれば、3分野の研究開発連携も実効を持つ。

2) 今後に対する提言

開発された技術を着実に実用化するだけでなく、国内の企業やアカデミアが広く利用できるようにして日本の発酵産業全体に成果が波及することを期待する。例えば、次なる参入希望者に対して可能性を示せるように、宿主細胞および酵素等のライブラリー整備、必要・不要遺伝子に関する遺伝子データベース、微生物の機能性向上にかかわる遺伝子欠失データベースの作成が期待される。

本プロジェクトの強力な展開により、新たなバイオ産業の可能性が拓けてきたと考えられる。グリーンイノベーション事業の一環として、新たなステージに進むことでさらに大きな成果が期待できるので、本プロジェクトの成果を核にした後継プロジェクトの設定が強く望まれる。

〈今後に対する提言〉

- ・ プロジェクト終了後そのまま放置しておくで技術の囲い込みが行われて汎用性が失われる可能性がある。形成された技術基盤について、開発者のプライオリティを尊重しつつも、オールジャパンで活用できるような仕組みづくりが必要である。
ゲノムミニマム化については遺伝子組換え宿主としての安全性レベルについて科学的な議論を進め、必要なエビデンスを取得することによって、従来の宿主より一段と規制が緩和された取り扱いが可能なように位置づけを検討すべきである。
- ・ 今回のプロジェクトで得られた素晴らしい成果を実用段階に展開する必要がある。これまでも研究投資がなされてきたが、本研究成果を発展的に継続する国主導型の継続的な研究助成は必須である。このままの状態ですると、これまで牽引してきた企業のアクティビティーも低下し、その結果成果の社会への還元も少なく、素晴らしい成果も埋もれてしまう危険性がある。あわせて、国内外への積極的な情報の発信と成果の共有化を推進することも必要である。
- ・ 以下に3項目に分けて記述する。

①後継プロジェクト設定の要望と期待

本プロジェクトの強力な展開により、むしろ新たなバイオ産業の可能性が拓けてきたものと考えられる。グリーンイノベーション事業の一環として、新たなステージに進むことでさらに大きな成果が期待できるので、本プロジェクトの成果を核にした後継プロジェクトの設定が強く望まれる。時機を逸することなく、早期に本プロジェクトの成果を集約し、優れた点をさらに発展させていくように後継プロジェクトを設定することが重要である。本プロジェクトにおいて展開されたテーマの中では、とくに「高性能宿主細胞の創

製」や「微生物反応の多様化・高機能化技術の開発」には多くの新規かつ重要な成果があり、研究の深化によりさらに高度なバイオ産業基盤技術となるべきものが含まれている。このような優れた成果の中から生み出された萌芽を大樹に育成することが重要で、後継プロジェクトの設定によりさらにスケールの大きい産業基盤技術の創製に向かうことが期待される。

②国策としての「有用物質生産のためのバイオ産業」育成の必要性

世界最先端のバイオ産業の育成を図り、そこから得られる果実を収穫するための仕組みづくりが重要である。米国におけるグリーンバイオテクノロジー（グリーンケミストリー）や欧州におけるホワイトバイオテクノロジーの推進などバイオテクノロジーの化学産業への活用は諸外国でも急務とされており、わが国の化学産業にも影響を及ぼすことは目に見えている。さらには、中国やインドをはじめとした東南アジア諸国でもグリーンバイオテクノロジー関連の国策プロジェクトが策定中と聞く。現時点では、「有用物質生産のためのバイオ産業」に関してわが国は先導的な立場にあるので、この優位性を維持し先進するための国策が必要である。本プロジェクトの成果を真に国益とし、次世代に向けた最先端の産業技術を確立するためには、本プロジェクト成果の実用化に際しての優遇措置や新産業育成への政策提言など国策としての後押しが望まれる。

③大震災後の東日本復興を目的とした本プロジェクト成果の活用

2011年3月11日に起こった東日本大震災とそれに伴う福島第一原子力発電所の事故により、日本のエネルギー事情は一変し、節電と省エネルギーの推進とともに自然エネルギー利用の方策が強く模索され始めている。有用物質生産についても今後は従来とは異なる方向性が求められる可能性が高く、バイオマス原料からの有用物質生産、とくにバイオテクノロジーを利用した製造技術が重要視されるはずである。本プロジェクトは、有用物質生産に関する「原料の転換」と「製造法の変革」なども視野に入れて実施されたため、バイオマス利用とともに環境負荷低減型のバイオ産業振興に資する成果を多く包含している。一方、東日本、とくに被災した地域に関しては農林水産業がさかんなことからバイオマスタウン構想なども浮上している。したがって、本プロジェクトの成果を有効に活用することによって、東日本復興事業への寄与が期待される。

- 容量、時間等効率面での問題がある従来のバイオプロセスを大きく変えていく可能性を持った成果であり、まずは着実に成果を実用化に結びつけることである。さらには次なる参入希望者に対して可能性を示せる宿主細胞、酵素等のライブラリー整備をお願いしたい。
- 本プロジェクトではバイオプロセスの可能性をさまざまな視点から示した

に過ぎず、実用化に向けてさらなる研究開発が必要である。現時点でコストが見合わないからといって、このような技術開発が今回のプロジェクトで終了すれば、いざ必要な時にゼロからスタートということになる。そのような無駄な投資に終わらないためにも継続的な取り組みが必要である。

個々のバイオプロセスごとに反応場となる微生物をスクリーニングするのは合理的でない。染色体の縮小は時間（人手）と資金が非常にかかるので、実用化のためには、汎用性のある宿主をどのような微生物を材料に、どのような機能性を持たせる必要があるかという議論が必要である。そのためには、本プロジェクトで作製した染色体縮小株などが広く使える場を積極的に提供するとよい。

- このような大規模のプロジェクトにおいては、各課題の基幹技術としての意義は十分にあるので、プロジェクト初期段階から実効の上がる連携企画を練る必要があった。今後は、本事業の成果を俯瞰するとともに、連携企画を厳選して新たなプロジェクトとして立ち上げることも検討してほしい。
- 開発された技術を着実に実用化するだけでなく、国内の企業やアカデミアが広く利用できるようにして日本の発酵産業全体に成果が波及することを期待する。

〈その他の意見〉

- サブテーマ1は必要不要遺伝子に関する共通・非共通の遺伝子データベースなどを作成し、微生物の機能性向上と遺伝子の欠失とにどのような相関関係があるのかなどのデータベースを作成することが、今後の類似研究に有効である。

化学反応をバイオプロセスで置き換えるためには、微生物・酵素の多様性がキーポイントである。遺伝子源の多様性として BVNC（難培養性微生物）が期待されており、本プロジェクトでもメタゲノムにおいて一定の成果が得られているので、今後も一層の取り組みが重要となる。また、生理活性物質の生産ではこれまで放線菌が主流であったが、さまざまな微生物ゲノムが解読された結果、カビ・キノコが非常に多数かつ多種類の二次代謝産物の合成にかかわる遺伝子を持っていることが明らかになりつつある。カビ・キノコのゲノム情報を産業に利用する動きは諸外国でも活発であり、カビ・キノコの利用をお家芸とするわが国においても本プロジェクトと同様な研究開発がカビ・キノコで実施される必要性が増している。

- iPS細胞を中心とする生命化学における期待感が大きく、多大は研究資金の投資がなされているが、一方で、我が国のバイオ産業の基盤をなし、世界をリードしてきた微生物機能利用技術への集中的な投資も必要である。持続的

社会の実現に向け、具体的かつ実践的な研究開発を推進すべきであり、産官学が一体となって革新的な技術の開発と産業化への展開を図ることが期待される。こうした取り組みの妥当性は、今回のプロジェクトで実証された。当該分野における我が国の研究力や技術開発力は高く、また、それを実証できる力とノウハウを持った企業は多く、世界トップレベルにある。このことは、国際学会での発表や扱っている研究テーマ、実用化された技術を見ても明らかである。問題は、欧米に比べ、国や企業による具体的な戦略立案がなされていないことと、その結果、研究への集中投資がなされていないことである。国や企業の強いリーダーシップによって、人、モノ、金がそろった効率的な研究システムの構築によって、個別の研究機関の研究力や開発力が横断的かつ相乗的に展開され、革新的な成果を生み出すことが期待される。世界標準化技術の構築にも貢献し、世界を牽引する存在になりえる。

少なくとも、今回のプロジェクトの成果を一過性のものに終わらせず、継続的に我が国のバイオ産業の活性化を図って欲しい。

また、大学に対する文科省の大型研究資金補助のような一過性のプロジェクトの場合、プロジェクト終了後に研究機関に十分な体力がない限り、研究開発力の維持は極めて厳しい。また、若手研究人材のフォローも十分ではない。良い成果を挙げた大型プロジェクトの場合、プロジェクト終了後も研究をサポートするシステムがあっても良い。そうした研究政策を新たに考えて欲しい。

・ ①作製された「高性能宿主細胞」の保管と提供

本プロジェクトの終了により成果を散逸させることなく、得られた成果を継承していく必要がある。とくに、「高性能宿主細胞の創製」で得られた各種のゲノム縮小化微生物細胞は産業的にも学問的にもわが国の財産として活用すべきものである。微生物保存機関など信頼の置ける機関でこれらの微生物細胞を保管し、日本の企業と研究者に優先して提供し、わが国の産業と学問の発展に資するべきである。

②本プロジェクトで得られた成果（知的財産）の総括と公開

本プロジェクトで得られた実用的あるいは学術的な成果（知的財産）については、その全体像とともに、整理した形で各個の成果（概要）が公開されることが望ましい。とくに重要なことは、年代を経てから（得られた成果が見過ごされることにより）知識あるいは技術の後戻りが起こらないようにすることである。学問的な研究対象として興味深い成果も多く、実用面から得られたこれらの成果を科学的あるいは工学的に検討することによって、技術的にも学術的にも新規な展開が期待できる成果も多い。一例として、「微生物反応の多様化・高機能化技術の開発」で得られた成果については、目的と

する化合物の生産量や収率が高く産業技術としての成功例が多いが、資料を読み込んでも「何故、優れた成果が得られたのか?」「どのような点が真のブレークスルーポイントだったのか?」が理解できないものも多い。以上より、本プロジェクトで得られた成果についての重要な点や特筆すべき点など、とくに成功に至る重要な要素技術や背景を明らかにして（解説を付して）公開して欲しい。

③本プロジェクト全体像の総括と国内外への発信

総合評価にも述べたが、個々の研究あるいは事業化された内容もさることながら、「微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発」のプロジェクト全体としてのアピールが重要で、NEDO 本体として事後の対応を誠実に行うべきである。一例として、簡単な成果内容のまとめを日本語版と英語版（例：両者とも A3 フルカラー印刷の見開き 1 枚程度で可、個々の内容については NEDO のホームページ等から資料収集できるようにすれば良い）で作成し、国内外の主要機関や研究者に配布するなどの試みが最低限なされるべきである。また、成果報告会を兼ねたシンポジウム開催の機会も再度設けるべきである。このように、成果報告と各所への知の還元が必要であり、研究終了後に初めてできる「成果の発信」が期待される。

- ・ 医薬品等の化学合成においては不斉合成技術も目覚ましい進歩をしている。近未来合成技術との対比も忘れずチェックしてほしい。

1. 2 各論

1) 事業の位置付け・必要性について

環境負荷の少ない製造プロセスの開発は時代の要請に応えるものである。本プロジェクトは、リスクが高く、民間活動のみでは実施困難な課題と考えられ、それぞれの得意企業が参画し効率的に研究推進できる NEDO 主導のプロジェクトとして妥当である。

また、醸造・醗酵に始まる微生物利用産業は様々な独創的技術開発により国際競争力を維持してきたが、近年、その差が縮まりつつある。日本のバイオ技術の復権、国際競争力の観点、さらに省エネ、CO₂ 削減、バイオマスの利用促進の観点でも、事業目的は極めて妥当と判断される。

今後、成果が社会インフラとして定着するよう、開発者のプライオリティを尊重しつつもオールジャパンで成果を活用できる仕組みづくりが必要である。

〈肯定的意見〉

- 環境負荷の少ない製造プロセスの開発は時代の要請に応えるものであり、我が国の強みである微生物物質生産技術の活用を図る本研究開発は、「環境安心イノベーションプログラム」の中核課題である。

本課題では、微生物の新機能を新たに開発するために、omics 技術・蛋白質工学・infotmatics・化学工学など先進的且つ学際的な要素技術を必要とし、開発リスクも高いことから民間のみでは対応が不可能であり、産官学の人材を結集して NEDO が主導する事業として実施することが妥当である。

米国、ヨーロッパなども環境調和型化成品生産の手法として高度な微生物機能の開発を目指した公的プロジェクトを大幅に強化しており、国際競争力の観点、石油および原子力の補完というエネルギー需給対応の観点でも、事業目的は妥当である。

- 物質生産における微生物利用は有用と考えるも、化学工業に生物ファクターが加わりさらに従来ない操作の導入等広い分野の研究、開発を一企業で進めることになり、リスクが高く新規参入を拒む要因となっている。それぞれの得意企業が参画し効率的に研究推進できる NEDO 主導のプロジェクトとして妥当である。

- (1)NEDOの事業としての妥当性

・微生物機能にかかわるバイオ技術を利用して環境調和型製造基盤技術の開発を目指すものであるが、三つの技術開発（①高性能宿主細胞創製技術、②微生物反応の多様化・高機能化技術、③バイオリファイナリー技術）を通じてバイオ技術の生産性向上と高機能化を図り、バイオ技術を活用した環境調和型有用物質製造産業の実現に寄与するもので、環境安心イノベーションプ

プログラムの目標達成に寄与することが明らかな事業である。

・特に高性能宿主細胞創製技術で顕著であるが、特定の商品製造を目標として技術開発を進める民間での研究活動ではカバーされ難くリスクの大きい基盤技術を開発対象としたこと、また、以前はアミノ酸発酵や抗生物質生産で世界をリードしていた日本のバイオ技術の復権と国際競争力強化を通じて日本の経済力を高める公共性を備えることから NEDO の関与が必要とされる事業である。

・本プロジェクトの当面の対象となる化学工業原料生産市場は 13～19 兆円の規模であり、更に市場規模 80 兆円程度と推定される医薬品製造やバイオマス利用への波及効果も期待される。5 年間の投下予算 51 億円に対して十分な波及効果を備えている。

(2)事業目的の妥当性

・循環型社会に向けて環境負荷の少ないバイオプロセスを積極的に活用した製造プロセスへの要望は強いが、化学プロセスを代替できる反応効率を備えたバイオプロセスの開発がネックとなっている。本プロジェクトはバイオプロセスの反応効率向上を目指す基盤技術を開発するもので、現在の技術開発動向を的確に掴んでいる。また、かつて世界をリードしたポテンシャルを備えた日本のバイオ産業を底上げし、環境安心イノベーションプログラムの目標達成に寄与する基盤技術の開発を対象としており、事業の目的は妥当である。

- 醸造・醗酵に始まる微生物利用産業は様々な独創的技術開発により国際競争力を維持してきたが、近年多くの微生物のゲノム解読が諸外国において国策ないしは巨大産業により進められており、その差が縮まりつつある。日本の優位性を維持するためにも、オールジャパンによる微生物育種技術のイノベーションが期待されており、推進力として NEDO の関与は重要である。
化学合成プロセスをバイオプロセスに置き換えることは省エネ、CO₂ 削減、バイオマスの利用促進、設備の縮小につながり、社会の要請にマッチしている。今後も継続し、発展させるべき課題である。
微生物利用技術の発展はエネルギー問題だけでなく、食品産業や環境問題など多岐にわたり波及効果が期待できることから公共性は極めて高い。
- リスクの高い試験研究であり、民間活動のみでは実施困難な課題と考えられ、NEDO 事業としての妥当性は高い。環境調和型循環産業システムの製造技術基盤が求められている社会的背景もあり、事業目的は妥当性が高い。
- 本プロジェクトにおいては、環境負荷低減型の技術開発が行われ、環境安心イノベーションプログラムの目的に即した成果が得られている。民間のみでは実施困難であった内容も多く、「高性能宿主細胞の創製（ゲノム縮小化微

生物細胞の作製)」などがまさにそれに合致するテーマであり、NEDO で実施されるべき内容である。対費用効果の面でも合理的であり、十分な成果が達成されている。以上より、当該事業に関して、NEDO の事業として妥当であり、高く評価できる。諸外国でもグリーンバイオテクノロジー（欧州ではホワイトバイオテクノロジー）の推進が急務とされており、本プロジェクトはそれを先導的に行った点でも高く評価される。また、国際競争力強化の観点からも時機を得た内容であり、事業目的は極めて妥当と判断される。

- バイオ分野での地盤沈下が懸念され、一部企業もこの分野から撤退する傾向にある中で、当該分野における研究開発や技術開発力において潜在的に高いレベルにあることを考えると、NEDO や国が事業として大きな投資をして、本研究を牽引する意義と必要性は高く、本事業は妥当である。

〈問題点・改善すべき点〉

- 本事業の大きな目標（課題）は良いが、あくまでもモデルケースとしての位置付けであり、当該分野の幅広い領域において、どのように汎用性を持たせるか、あるいは個別案件として位置づけるかは、国策として当該分野における産業発展をどのように考え、将来計画を立てるかに大きく依存しており、またそれに連動して企業の力強い取り組みと協力が必要不可欠である。
- 多種多様な個別研究テーマが実施され、大部分のテーマにおいて当初の数値目標に達しているものの、スクリーニングによる新規微生物や酵素の発見と変異という従来技術の延長線上にとどまり、イノベーションが達成されたいは言いがたい。
- ①今後の課題
本プロジェクトの成果が事業者以外に有効に活用されるべきで、作製された微生物細胞の保管と提供、成果内容の国内外への発信などが今後果たされるべきである。
- ②プロジェクト展開中の課題
本プロジェクトの中間評価などの時点で、NEDO あるいは本プロジェクト実施者から政策への提言などが積極的に発信されるべきであった。
- 多くの研究成果はあがっているが、水平方向の技術拡大から選択と集中による技術の着実なる実用化への方向付け、指示が必要である。
- 公共性が発揮されるかどうかは、今後の成果の開示と実施許諾の進め方に依存する。開発者のプライオリティを尊重しつつもオールジャパンで成果を活用できるような仕組みづくりを NEDO が主導すべきである。
- 本研究開発は、現行の化成品生産プロセスやエネルギー生産プロセスを、中長期的に環境調和型プロセスへの転換を図るための新技術を社会に提供す

ることを目的としている。その実用化が現在の実力のある個別企業により実施されることは異論のない。しかし、目指す生産プロセスによっては、その投資規模が従来の生物系企業の個別活動規模に比較して大きい分野もあり、実用化においては個別企業での実用化に留まらない新たな産業集積が必要である。企画段階から議論を行い、新たな産業集積の具体性を提示しておく必要がある。

〈その他の意見〉

- 本研究開発事業の研究開発投資が長期且つ大規模であることから、その成果が社会インフラとして定着するよう、本研究開発事業終了後にも他制度なども活用した本事業成果実用化に向けた政策的フォローを期待する。
- 当該分野における研究開発力の国際比較がもっと明確にされていれば、国としても集中投資の必要性をもっと具体的に感じたのではないか。実際に、国際学会での発表を見る限り、我が国が以前検討していたような研究テーマが多く、新規性の高い独創的なものは少ない。集中投資できるような将来を見据えた中長期戦略の立案と産学官の一体化した具体的な技術開発活動が、欧米に比べ劣っている。研究を牽引する政策・戦略面での対応が求められている。

2) 研究開発マネジメントについて

研究開発実施の事業体制・計画は、大規模なプロジェクトでありながら、いずれも現在の情勢を踏まえた戦略的な目標が設定されている。また、個別研究テーマごとに示された実施スケジュールは、設定した目標＝指標への合理的な道筋を提示しており、妥当である。プロジェクトマネージャーやサブリーダーは的確に業務をこなし、本プロジェクトでの研究推進や成果創出に貢献している。さらに、個々の研究テーマに関連をもつ有力な企業を実施者に加えており、実用化につながる体制を整え、研究開発委員会において各受託者における実用化の見通しについての議論を行うなど、実用化に向けて積極的な姿勢が維持された。

しかし、3つのグループでの研究開発は、それぞれに独立した展開と成果を挙げているが、他グループとの連携や協調性は十分にとられておらず、プロジェクト中間段階で全体的な構想や研究計画を再確認するなどして、最終的に社会への力強いアウトプットを示せるような一体化した連携研究として仕上がっていると更に良かった。

〈肯定的意見〉

- 大きな進展がみられ、研究開発計画は概ね妥当であった。一方、研究開発目標は定量性を重視して設定されたが、目標が達成されても直ちに実用化の見通しが得られていないのが現状であり、その妥当性には疑問が残る。事業体制としては技術力と事業化能力を備えた企業が実施者になっていて妥当性が高いが、成果の実用化に向けた戦略が必ずしも明解とは言えないアイテムが多い。
- 本プロジェクトを通じて多数の優良な成果が挙げられ、特許出願も活発に行われ、一部の成果は事業化されていることから、研究開発マネジメントについては成功していると判断される。すなわち、研究開発目標、研究開発計画、実施の事業体制の妥当性、実用化に向けたマネジメントは良好であり、妥当であった。
- (1)研究開発目標の妥当性
潜在的に高いポテンシャルを備えた日本のバイオ産業の力を活かした環境負荷の少ない化学プロセスを代替できる効率的製造技術の確立をめざし、生産の場＝微生物細胞における効率化（①高性能宿主細胞創製技術）、生産プロセスの効率化（②微生物反応の多様化・高機能化技術）、バイオマス利用技術の効率化（③バイオリファイナリー技術）を揃え、現在の情勢を踏まえた戦略的な目標が設定されている。
①高性能宿主細胞創製技術ではプロジェクト開始時世界最高値の2倍以上、

②微生物反応の多様化・高機能化技術では STY 数 g/L/h 以上 (既知物質) など、③バイオリファイナリー技術では 90%の糖化や $\text{STY}10\text{g/L/h}$ 以上 など、目標達成度を適切に判断できる具体的で明確な定量的目標＝指標が設定されている。

(2)研究開発計画の妥当性

①高性能宿主細胞創製技術では特異的遺伝子制御技術とユーティリティ機能増強を、②微生物反応の多様化・高機能化技術では反応場制御技術と酵素高機能化技術を、③バイオリファイナリー技術ではバイオマス糖化技術と高効率糖変換技術を取り上げており、それぞれが目標とする、高効率物質生産に特化した細胞創製、反応プロセスの効率化、バイオマス利用効率の向上を達成するのに必要な要素技術を適切に配している。また個別研究テーマごとに示された実施スケジュールは、設定した目標＝指標への合理的な道筋を提示しており、妥当である。

(3)研究開発実施の事業体制の妥当性

・協和発酵キリン・カネカ・明治製菓・地球環境産業技術研究機構・産業技術総合研究所・東京大学・京都大学・大阪大学など、微生物を利用した発酵生産における技術力・事業化能力を備えた企業と有力な研究機関・大学が参加する強力な実施体制が組まれている。

・バイオプロセスの利用で実績に優れる清水昌プロジェクトリーダーの下に、各担当分野で活躍中の穴澤・大竹・湯川サブリーダーを配した布陣で、成果を出すことのできる環境を整備し、実際に相応の成果を上げたことから事業体制は妥当であった。

・年1～2回の研究開発委員会と年1回の研究テーマごとの分科会を開催し、更に研究テーマを越えて分科会を共催する工夫や研究者レベルの合同研究開発委員会や PL・SPL クラスのテーマ検討会も開催しており、実施者間の連携を図る十分な体制が整っていた。

(4)研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性

個々の研究テーマに関連をもつ有力な企業を実施者に加えており、実用化につながる体制を整え、研究開発委員会において各受託者における実用化の見通しについての議論を行うなど、実用化に向けて積極的な姿勢が維持された。また、継続的な特許調査と情報提供、知財にかかわる調査と助言を実施し、特許の出願しにくい基盤技術でありながら 100 を超える特許出願をしており、知財マネジメントが適切に行われた。

(5)情勢変化への対応等

バイオマス関連 3 テーマの切り離し、マイクロアレイ解析システムなど最新技術の導入、研究の推進につながるゲノム解析や解析システムの追加導入な

ど、情勢変化への適切な対応が速やかに行われている。これらの対応の結果、研究の加速や生産性の向上につながった例が少なからずあり、情勢変化への対応が妥当な戦略・方針に沿って実施された。

- いずれもプロジェクトの趣旨に沿った研究開発目標を立案しており、それぞれの開発計画も妥当で、予定された成果は得られている。また、今後の研究展開可能性も示されており、実用化への取り組みも示されている。プロジェクトマネージャーやリーダーは的確に業務をこなし、本プロジェクトでの研究推進や成果創出に貢献している。
- いくつかの課題で実用化に向けてのスケジュールが作成されており、今後の進展が期待される。
- プロジェクト内での連携がうまくかつ効率的に進行していることが、各研究結果がそれぞれ生かされ総合的成果となっている点から読み取ることができる。
- 環境調和型社会—製造技術を目指して、伝統的に産官学共に我が国の強みである微生物分野の技術シーズ、産業インフラの活用を考慮し、最新の科学的知見・新技術を融合させて産業基盤技術開発に資源を集中させた戦略性は評価に値する。

研究開発実施の事業体制・計画は、大規模なプロジェクトでありながら、研究会・連絡会議なども適宜実施され良く管理されていた。

中間評価指摘事項への対応の努力も十分、認められる。

〈問題点・改善すべき点〉

- 第一期のプロジェクトを含め 10 年間にわたって取り組まれた課題も多いが、実際に事業化に至った例がないのは残念である。
多岐にわたる再委託先がそれぞれに成果を上げているものの、十分な連携が取れておらず、全体の成果として反映されていないものがある。
- (2)研究開発計画の妥当性
個別研究テーマごとの計画内容では年次計画まで詳細に記載されたものと実施項目と目標を大まかに記載されたものが混在しており、全体での統一性を損ない、研究スケジュールをつかみ難い不具合を生じている。
- プロジェクト実施期間中においても、石油価格・穀物価格の大きな変動もあったことから、研究開発当初の定量目標が、社会的・経済的動向などの外部要因により具体的に変更が生じたのか否か、生じた場合の対応についても、定量的な数値などもまとめて報告記載されるとよい。(研究会や分科会などでの調査報告や検討はあったことは理解しているが。)
- 本プロジェクトの中間評価では、各テーマの共同が少ないことが指摘されて

いるが、その後も各テーマの共同による成果は挙げられていない。したがって、情勢変化への対応の面では改善の余地があった。

- グループ内やグループを越えて実施者間の連携が十分に行えていたかどうかは良くわからないが、それぞれに得た知見や技術の横展開がなされていないため、その技術の汎用性や成熟度が確認できていない。3グループはその研究開発における位置付けが、基礎研究から実用研究への異なったステージにあり、実用研究に近くなるに従って、その成果の一般性は低くなっている。実用研究ステージに近い「バイオリファイナリー技術の開発」研究はその意味で関連の技術の取り込みや成果の汎用性（具体的な出口研究）をもっと検証すべきであった。

また、成果の実用化につなげる戦略が明確には示されておらず、その観点では「高性能宿主細胞創製技術の開発」研究は、基礎研究に徹しており、実用化計画を示す段階には至らなかった。一方、「微生物反応の多様化・高機能化技術の開発」研究は、主に我が国で開発された従来の特異的な微生物反応を総括した色合いが強く、新たなコンセプトに基づく革新的な成果創出には至っていない。

以上、3つのグループでの研究開発は、それぞれに独立した展開と成果を挙げているが、プロジェクト中間段階で全体的な構想や研究計画を再確認するなどして、最終的に社会への力強いアウトプットを示せるような一体化した連携研究として仕上がっていると更に良かった。

- 研究を進めていく中でいろいろな知見が得られ技術基盤は拡張していく。しかしながらその成果の中から選択と集中により着実なる実用化をめざす指示も必要である。
- 数値目標は達成度測定に必要なだが、数値の設定根拠が問題である。生産効率を数値目標とする場合、公開数値を基準にせざるを得ないが、生産効率は企業秘密であって、正確な値が公開されることはまずないと考えるべきで、本来目標たり得ないのではないか。このような数値目標よりも参画企業の実用化に向けての本気度を測定する指標を基本とする目標設定を検討すべきではないか。本プロジェクトのように実用化を目指す場合には、プロジェクトの成否を判断するには、もうしばらく時間が必要である。

〈その他の意見〉

- ・ 各グループともに、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向を踏まえつつ、進捗状況を常に把握して目標達成に努力していたが、個人主義的であり、他グループとの連携や協調性は十分にとられていなかった。その意味で、全体的なプロジェクトのバランスと社会へのアウトプットの観点に立った柔

軟な計画見直しや変更はなされていなかった。

- 各課題の目標設定値は明確であるが、その目標値と想定される実用化事業でのコスト競争力の関係が報告書で理解できると更に良い。

3) 研究開発成果について

成果は、有意義かつ独創性が高いものが多く、当初の目標を達成していると判断される。高性能宿主細胞創製技術では染色体の縮小化とその効果において、検討した大腸菌、枯草菌、分裂酵母のすべてにおいて、世界水準の独自性の高い成果を上げており、染色体の縮小が実際に大きな効果＝生産性向上をもたらすことを世界で初めて示した。特に大腸菌においては、世界最高水準の生産性と多様な生産物における生産性向上が示されており、染色体縮小技術の汎用性が示された。微生物反応の多様化・高機能化技術の開発では有機溶媒耐性菌を水／有機溶媒二相系反応場で用いて(R)-マンデル酸と 4-クロロ-3-ヒドロキシアセト酪酸エチルの世界最高レベルの生産を達成し、水／有機溶媒二相系反応場の優位性を明確にした。バイオリファイナリー技術では、増殖非依存型バイオプロセスと膜利用発酵リアクターを利用した乳酸などの生産でそれぞれ世界をリードする成果を達成した。これらの生産技術は多様な物質生産に有効で汎用性があり、他の競合技術と比較して優位性をもつ新たな技術領域を形成しており、発酵生産における新たな汎用技術として展開が期待される。さらに、知的財産権等の取得も実用化計画に沿って適切に行われ、論文発表や学会等での成果発表も活発に行われた。

一方、成果の普及をどのように図るかは今後の課題である。大きな波及効果を生むには日本の国益と開発者のプライオリティを両立させるライセンス・ポリシーが必要である。日本が強みをもった分野の優位技術であるが故に、海外での知財戦略と情報発信をしっかりと行う必要がある。

〈肯定的意見〉

- 研究はいずれも計画案に沿って目標を達成している。しかも、その成果の一部は革新的なものであり、新たな技術領域を拓き、我が国の当該分野の研究水準高さと研究開発力を世界へ力強く示すことができた。
- 当初の目標を概ね達成している。案件によっては大きく目標値を越えて達成した項目もある。
全体として、世界最高水準の成果を出している。
目的とする環境調和型物質生産分野において、独自性のあるコンセプトに基づいて国際競争力・汎用性のある新たな基盤技術を創出している。
成果報告・特許出願などの成果発信も十分行われている。
- (1)目標の達成度
 - ・高性能宿主細胞創製技術の開発では、大腸菌で染色体をほぼ限界となる 2.98 Mbp にまで縮小し、染色体縮小化大腸菌でのアルギニン生産や染色体縮小化分裂酵母でのトランスフェリン生産で事業開始時の世界最高値の 2

倍以上の生産性を達成した。

・微生物反応の多様化・高機能化技術の開発では、水／有機溶媒二相系反応場にて有機溶媒耐性菌を用いた(R)-マンデル酸や 4-クロロ-3-ヒドロキシアセト酪酸エチルの生産で数 g/L/h の目標を、共役複合酵素系を活用した L 体アミノ酸、キラルジオール類、キラルアミン類、キラルアクチノールやデオキシリボース 5-リン酸、4-ヒドロキシイソロイシン、共役リノール酸の生産で 50~100 g/L の目標を達成した。また、酵素改変によるビタミン D3 生産や遺伝子置換による非天然型抗生物質生産でも目標に至らないものの相応の成果を上げた。

・バイオリファイナリー技術では増殖非依存型バイオプロセスを利用した乳酸・キシリトール・アラニン・バリンの生産で、膜利用発酵リアクターを利用した乳酸の生産で目標とした STY10g/L/h を達成した。

・多様な研究課題を含んでいるが、多くのプロジェクトにおいて目標を達成している。目標未達成な場合も、目標達成近くに至っており、全体として目標はおおむね達成された。

(2)成果の意義

・高性能宿主細胞創製技術では染色体の縮小化とその効果において、特に大腸菌で世界最高水準の独自性の高い成果を上げており、染色体の縮小が実際に大きな効果＝生産性向上をもたらすことを世界で初めて示した。世界では合成 DNA 染色体をもつ最小ゲノム細菌が話題になっているが、物質生産には背景となる特異的な機能遺伝子が必要で、染色体縮小化技術が明白に優位性をもつ。微生物反応の多様化・高機能化技術の開発では有機溶媒耐性菌を水／有機溶媒二相系反応場で用いて(R)-マンデル酸と 4-クロロ-3-ヒドロキシアセト酪酸エチルの世界最高レベルの生産を達成し、水／有機溶媒二相系反応場の優位性を明確にした。また、共役複合酵素系を用いた多様なキラル化合物などの生産技術を開発し、世界をリードする成果を達成した。バイオリファイナリー技術では、増殖非依存型バイオプロセスと膜利用発酵リアクターを利用した乳酸などの生産でそれぞれ世界をリードする成果を達成した。新たな技術領域を形成した。これらの生産技術は多様な物質生産に有効で汎用性があり、他の競合技術と比較して優位性がある。発酵生産における新たな汎用技術として展開が期待される。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

・高性能宿主細胞創製技術では国外 2 件、PCT7 件を含む 39 件を、微生物反応の多様化・高機能化技術の開発では PCT7 件を含む 22 件を、バイオリファイナリー技術では国外 15 件・PCT9 件を含め 89 件を特許出願している。全体では国外 17 件・PCT23 件を含め 150 件を特許出願しており、知的財

産等の取扱は適切である。

(4)成果の普及

・高性能宿主細胞創製技術では査読付き 64 件を含む 73 件の論文を、微生物反応の多様化・高機能化技術の開発では査読付き 140 件を含む 173 件の論文を、バイオリファイナリー技術では査読付き 108 件を含む 162 件の論文を発表している。全体では査読付き 312 件を含む 408 件の論文を発表しており適切に成果発表をしている。

・高性能宿主細胞創製技術では 97 件、微生物反応の多様化・高機能化技術の開発では 283 件、バイオリファイナリー技術では 320 件と多くの外部発表をしており、成果の普及と一般への情報発信は適切に実施されている。

- 要素技術が未確立なテーマや、数値目標の未達部分もあるが、目標は概ね達成できており、全体の達成度は 90%程度である。世界最高水準で市場拡大につながる成果が多数ある。成果は汎用性があるが、活用されるかどうかは今後の情報開示やライセンス・ポリシーによる。特許出願件数がやや少ない個別テーマや論文発表の少ないサブテーマもあるが、知財の確保や論文発表は概ね適切に行われている。
- 本プロジェクトでは、当初の目標を達成していると判断される。本プロジェクトの成果は、有意義かつ独創性が高いものが多く、新規な技術開発に大きく寄与するものである。他の競合技術に比して優位性が高いものが多く、この点でも高く評価できる。特許出願も活発に行われ、一部の内容については事業化も進められている。また、知的財産権等の取得も実用化計画に沿って適切に行われた。論文発表や学会等での成果発表も活発に行われており、成果の普及も適切に行われた。以上より、研究開発成果に関しては極めて高く評価できる。
- ほとんどのテーマにおいて高度な目標設定であるが目標値は達成されており、早期実用化、化学工業への浸透が期待される成果と判断する。
- わが国の伝統を反映して、多彩な個別研究テーマが実施された。大部分のテーマにおいて当初の数値目標を達成し、多くの発表がなされた結果、わが国における微生物研究の活性化につながった。

〈問題点・改善すべき点〉

- 国際競争力の強化という趣旨を考慮すると、特許の国内出願数に比べ海外への出願数が少ない。
Venter らによる合成微生物に比較して染色体縮小株の作製は一般への認知度・話題性が低い。安全性や倫理性に対しては一般市民の関心度が高いので、安心安全な宿主による環境に優しいバイオプロセスの開発というプロジェ

クトの趣旨と成果が広く情報発信されることを期待したい。

- 成果の普及をどのように図るかは今後の課題である。大きな波及効果を生むには日本の国益と開発者のプライオリティを両立させるライセンス・ポリシーが必要である。日本が強みをもった分野の優位技術であるが故に、海外での知財戦略と情報発信をしっかりと行う必要がある。
- 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発やバイオリファイナリー技術においては関連の多様なプロジェクトが実施されたが、成果を集約するには至っていない部分も多い。今後、多様な成果を集約して更なる展開に結びつけられることを期待したい。
- 成果の国内外への積極的な発信がまだ十分ではない。知的財産権等の関連もあるが、明らかになった知見や開発された技術の開示や普及、それらを活用した具体的な実用化研究への展開を推進する方策を考える必要がある。
- 投入予算に対する効果を明確にするためにも実用化方向をきちんと打ち出して欲しい。
- 研究開始当初の3課題の目標の難度の高さに起因するのであろうが、個別課題の目標達成に集中した傾向があり、各課題成果の相互利用は検討の域を出なかった。個別課題の成果が優れているだけに、課題間での成果の相互利用により更なる成果の発展が見込めるので、今後の実用化実施段階での課題間成果の連携活用を期待する。

〈その他の意見〉

- ・ 費用対効果に関しては、具体的な情報解析がなされていない。グループ内でもグループ間でも研究費の使い方には差がある。本プロジェクトに関わらず、費用対効果に関する解析や評価は曖昧である。
 - ・ 出願特許の詳細はわからないが企業化を前提の技術であるため、技術保護を重要視した抜け落ちのないクレームをお願いしたい。
 - ・ 今後、是非、産業実用菌であるコリネ菌、放線菌、麹菌などに対して、本開発成果であるゲノム削除基幹技術・新規反応・バイオリファイナリー技術を適用する開発を進めてほしい。
- 震災等の影響でシンポジウムが中止になってしまったが、是非、新たなシンポジウムを多数企画して国際的な成果発信をすることを期待する。

4) 実用化の見通しについて

高性能宿主細胞創製技術では各宿主で高い生産性が、微生物反応の多様化・高機能化技術の開発では水／有機溶媒二相系反応場ならびに水酸化酵素の改良、共役反応複合酵素系の活用で多様な物質の高い生産性が、バイオリファイナリー技術でも乳酸などで優れた生産性を示しており、実用化イメージ・出口イメージは具体的かつ明白になっている。それぞれの生産技術は自社での活用以外に他社へのライセンスアウトやアカデミアとの共同研究が計画されている。また、開発された技術は汎用性・基幹性があることから、産業菌への適用や、化学プロセスとの補完的組み合わせなど、波及性も期待される。

しかし、プロジェクト終了後の各企業での具体的な取り組みが明確になっていないため、成果の社会への還元や実用化の見通しは確実でない。

今後、成果が実施企業にとどまることなく、ライセンスアウトのための積極的な情報発信や共同研究の拡大などを通じて、広く社会に還元される努力が必要である。

〈肯定的意見〉

- 明示された生産物質に対しては当初目標値をクリアしている課題が多いので、それらについては、実用化イメージは明確である。
大学・独法分担課題は高度の基盤技術開発、企業担当課題は実用化イメージを反映したもので、それらの連携が行われている。
開発された技術は汎用性・基幹性があることから、産業菌への適用や、化学プロセスとの補完的組み合わせなど、波及性も期待される。
- 個別研究課題ごとの目標設定は明確であり、目標に向けて着実な成果をあげた。多彩な研究テーマの実施はわが国における微生物研究を活性化するとともに、多くの人材育成に貢献した。
- ほとんどのテーマで実用化イメージは明確化されているが、いつ出口に到達できるかについては未だ不透明なアイテムが多い。
関連分野への波及効果は期待できるが、効果が発揮されるかどうかは、今後の情報開示や実施許諾のあり方による。
プロジェクトには多数の大学が参画したため、人材育成の促進効果はあった。
- 実用化も出口もそれぞれにイメージできるが、具体性はそれぞれに異なる。
むしろ
基礎研究に近い「高性能宿主細胞創製技術の開発」研究の方が、一般性のある独創的な成果であるため、解析を中心とするハイレベルな基礎研究への展開の可能性だけでなく、多くの実用化研究や技術へのイメージが付きやすい。
- 従来のバイオプロセスから進化させた本プロジェクトでの研究成果は、化学

工業界に十分インパクトを与える。今回の成果だけに終わらせることなく基盤技術をさらに拡張させ工業化プロセスの一選択肢として利用できるように進展させて欲しい。

○ (1)成果の実用化可能性

高性能宿主細胞創製技術では各宿主で高い生産性が、微生物反応の多様化・高機能化技術の開発では水／有機溶媒二相系反応場ならびに水酸化酵素の改良、共役反応複合酵素系の活用で多様な物質の高い生産性が、バイオリファイナリー技術でも乳酸菌などで優れた生産性を示しており、実用化イメージ・出口イメージは具体的かつ明白になっている。それぞれの生産技術は自社での活用以外に他社へのライセンスアウトやアカデミアとの共同研究が計画されており、研究が継続され成果の展開が進められると期待される。

(2)波及効果

高性能宿主細胞創製技術ではライセンスアウトの打診等もあり、当該宿主を用いた様々な物質生産への応用が期待できる。微生物反応の多様化・高機能化技術の開発では水／有機溶媒二相系反応場や共役反応複合酵素系の活用でインパクトの高い成果を出しており、これらの技術を活用した物質生産が拡大・加速される。バイオリファイナリー技術の増殖非依存型バイオプロセスやメンブレン利用高効率発酵システムの広い発酵生産において、特にセルロース系バイオマスを利用したバイオ燃料や有機材料の発酵生産を含めた活用が期待できる。またそれぞれの成果は新たな宿主や新たな物質の生産に展開が考えられ、更なる研究開発と応用につながる。一方、各課題において多様なプロジェクトを広範な研究チームが担当しており、当該分野の研究開発や人材育成等の促進につながった。この面からの今後の展開が期待される。

- 一部の成果については既に事業化が進められており、本プロジェクト終了後にも成果を基盤として事業化が予定されている内容が多い。本プロジェクトの成果は、バイオ産業における関連分野への波及効果も大で、先導的な役割を果たす成果となっていることも高く評価できる。以上より、実用化および波及効果の観点からも、本プロジェクトは高く評価できる。

〈問題点・改善すべき点〉

- 設定された数値目標が生産効率の指標であって、経済指標にまで掘り下げられていないので実用化に向けてどのステージにまで到達できているのかは判断が難しい。

また、物質生産で数値目標が掲げられているが、生産効率は企業秘密で公開されていないため、数値自体を正確に比較することは困難である。今後はこうした数値目標の設定に関しては検討を要する。

- 我が国の当該分野での研究レベルの高さを誇示することが出来たが、プロジェクト終了後の各企業での取り組みが明確になっていないため、成果の社会への還元や実用化もはっきりしていない。さらに、本プロジェクトで雇用されていた若手研究人材のフォローも十分ではない。大学に対する文科省の大型研究資金補助のような一過性のプロジェクトの場合、プロジェクト終了後に研究機関に十分な体力がない限り、研究開発力の維持は極めて厳しい。良い成果を挙げた大型プロジェクトの場合、プロジェクト終了後も研究をサポートするシステムがあっても良い。
- 成果が実施企業にとどまることなく、ライセンスアウトのための積極的な情報発信や共同研究の拡大などを通じて、広く社会に還元される努力が必要である。
- 企業であれば企業化に際しては明確なスケジュールやステップごとにクリアしなければならない関門、課題が提示されているはずである。これらを明示して実用化に向けて進めて欲しい。
- 個別企業の実用化にとどまらない、企業連携・産業間連携を併せて提案して欲しい。それにより国際的に競争力のある産業集積を期待する。

〈その他の意見〉

- ・ プロジェクトで得られた成果の継続的な研究や実用化へ向けての活用など方法論が明確でない。また、若手人材のフォローも十分でないため、「成果」のみならずプロジェクトで育成された「人材」の流出が懸念される。
- ・ 本プロジェクトの実施により、当該分野の研究開発や人材育成の促進が行われたと判断される。しかし、プロジェクト終了後に、成果の散逸が起こらないようにする手段については具体的な説明がなかった。また、研究技術の継承あるいは研究技術水準の維持がどのように実施されるのかについては不明である。知的財産や研究技術の継承は極めて重要であり、NEDO としても方策について考慮して欲しい。
- ・ 化学工業における有用技術として浸透させるためには、企業で研究に従事できる研究者の育成をお願いしたい。
- ・ 微生物ゲノム削除宿主創成は、基幹技術と位置づけられるので、産業実用菌（コリネ菌、放線菌、産業糸状菌等）への波及効果は確実にある。有機溶媒耐性菌による反応は、化学プロセスとの組み合わせも期待される。増殖非依存型プロセスでの知見は、コリネ菌以外の産業菌にも適用できる知見である。
- ・ 開発されたそれぞれの技術が広く利用されれば発酵工業における強い日本の復活につながる強い武器になる。自社での開発に専念するだけでなく、分

裂酵母宿主で菌株の分譲が検討されているように、早い段階で国内の企業やアカデミアが広く利用できるようになることを望む。

2. 個別テーマに関する評価結果

2. 1 高性能宿主細胞創製技術の開発

1) 成果に関する評価

大腸菌、枯草菌と分裂酵母を供試菌としてゲノム縮小化技術の開発や実際のゲノム縮小化細胞の作製により、染色体の縮小が実際に生産性向上をもたらすことを世界で初めて示した。本技術は微生物による有用物質生産の汎用性のある基盤技術として独創的で革新的なものであり、海外で行われている合成ゲノム的アプローチと比較して有用産業株を出発材料に出来る点において、優位にある。特に大腸菌では、一方的な縮小だけでなく、目的に応じて遺伝子を戻すチューニングにより目的産物の生産性を向上させるなど、達成された技術レベルは世界最高水準であり、新たな技術領域の開拓が期待される。

また、今回開発された宿主は国家的資産とも言えることから、知的財産権の確保を行いつつも、わが国の産業と学問の発展に資する努力を継続してほしい。

〈肯定的意見〉

○ 大腸菌に関してはゲノム削減の数値目標は達成できなかったが、その他の目標は概ね達成できた。枯草菌に関しても削減の数値目標は達成できなかったが、その他の目標は概ね達成した。分裂酵母については糖鎖付加などで未達部分もあるが、モデルタンパクについて大幅な生産効率の向上がみられた。以上のことから達成率は 90%程度である。達成された技術レベルは世界最高水準であり、新たな技術領域の開拓が期待されるが、既存プロセスの効率化が中心命題であるため新市場の創造には結び付きにくい。他の競合技術と比べ優位性が高いことが期待されるが、まだ発展途上の技術のため優劣を判断するのは時期尚早である。知財の確保ならびに成果の論文化は適切に行われている。

○ (1)目標の達成度

大腸菌では IS 等を含む染色体欠失縮小と生育に重要な変異回復による生育特性の改良の結果、染色体を 2.98 Mbp にまで縮小し、削除できない機能未知遺伝子を 3.1%に低減するとともに ATP 生産活性の向上を果たした。また、培養後期誘導型亜鉛応答性プロモーターの利用などによりアルギニン・ニコチアミン・乳酸で従来の記録を凌駕する生産性を示し、目標を概ね達成した。

枯草菌では最大 1.5 Mbp の染色体縮小を達成し、窒素代謝および炭素代謝の改変、細胞表層の改変、リボソーム専有化、分泌装置強化、溶菌抑制など酵素生産性向上をつなげる様々な技術を検討して、親株に比べて 2.5 倍のセルラーゼ生産を達成した。

分裂酵母では染色体末端削除の組み合わせと増殖支持遺伝子や合成致死遺伝子の回復により親株に近い増殖能をもつ 657.3 kbp 欠失染色体縮小株を得た。さらに重複遺伝子を利用した遺伝子安定導入系、hsp16 プロモーターを利用した遺伝子誘導発現系、PDI 遺伝子を利用した遺伝子高発現系などによりヒト成長ホルモンやトランスフェリンの 1.9~2.6 倍の生産を達成した。また、糖鎖合成系の解析によりヒト型コア構造をもつ糖鎖の生産を達成し、ヒト型糖鎖に近い糖鎖を造る酵母宿主の創製に道を拓いた。以上より、全体として目標をほぼ達成した。

(2)成果の意義

染色体の縮小自体とその効果において、大腸菌で世界最高水準の独自性の高い成果を上げており、染色体の縮小が実際に大きな効果＝生産性向上をもたらすことを世界で初めて示した。この成果は当該宿主における多様な物質生産に有効で汎用性があり、また、他の宿主にも染色体縮小を適用できることから新たな技術領域として展開が期待される。最近、合成 DNA 染色体をもつ最小ゲノム細菌が話題になったが、物質生産には背景となる特異的な代謝系や補助因子の遺伝子が必要で、染色体の縮小に優位性がある。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

大腸菌では NITE の成果を含めて国外 2 件、PCT2 件を含む 9 件を特許出願しており、枯草菌では PCT2 件を含む 21 件を特許出願している。また分裂酵母では PCT3 件を含む 9 件を特許出願しており、知的財産権等の取り扱いは適切に行われている。

(4)成果の普及

大腸菌では査読付き 8 件を含む 9 件の論文を、枯草菌では査読付き 20 件を含む 24 件の論文を、分裂酵母では査読付き 36 件を含む 40 件の論文を発表しており、成果公表は適切に行われている。また、大腸菌では NITE の成果を含めて 28 件を、枯草菌では 40 件を、分裂酵母では 29 件といずれも多く外部発表をしており、成果の普及・一般への情報発信を適切に行っている。

- 「高性能宿主細胞の創製」については、大腸菌、枯草菌と分裂酵母を供試菌としてゲノム縮小化技術の開発や実際のゲノム縮小化細胞の作製により、目標を達成した。大腸菌では、ゲノムの約 35%を削除したゲノム縮小化株が作成され、これらを宿主細胞としてアルギニンやニコチアミンの生産で従来の 2 倍以上の生産量を達成している。枯草菌では、ゲノムの約 1.5 Mbp を削除したゲノム縮小化株が作成され、これらを宿主細胞として従来の 2 倍以上のセルラーゼ生産量を達成している。分裂酵母ではゲノムの約 657Kbp を削除したゲノム縮小化株が作成され、遺伝子ターゲティング技術の開発や異種タンパク生産量が向上した新規宿主細胞も作製されている。ゲノムの縮

小化による物質生産能力の向上をテーマとして、国内外での実施例がない事業に果敢に挑戦したことは特筆に値する。産業技術に資する実用化に向けた成果を挙げたことで、その独創性と重要性、世界における優位性は高く評価できる。実用的にも学術的にも得られた成果は意義深く、極めて高く評価できる。新規な技術領域を開拓しつつ他を凌駕する成果となっている。知的財産権等の取得も積極的に、国内外で適切に行われた。論文発表や学会等での成果発表も活発に行われており、成果の普及も適切に行われた。以上より、本テーマの内容に関しては、極めて高く評価できる。付言すれば、企業あるいは大学等研究機関だけでは実施しえなかった本テーマの事業が NEDO のプロジェクトとして実施され、実り多い成果を挙げたことは高く評価される。

- モデル生物の知見を生かしつつ、物質生産にも対応できる宿主を設定し、ゲノムを縮小化して高効率な物質生産を目指すというコンセプトを世界に先駆けて提示した点は戦略的に評価できる。

研究開発実施を通じて、目標値をクリアし、ゲノム縮小化宿主の産業上の有用性、他の産業微生物への応用の可能性を提示した点も高く評価できる。

本技術は生物物質生産の汎用性のある基盤技術として、高水準にある。

物質生産の実用面では、海外で行われている合成ゲノム的アプローチに比較して、有用産業株を出発材料に出来る点において、現時点で優位である。

- 大腸菌、枯草菌、分裂酵母利用技術は不必要遺伝子削除に関する知見、技術の蓄積により目的に対応し細胞をコントロールできるようになったと成果から判断できる。この技術により細胞機能を効率的に活用することができており、基本性能として目標は十分達成された。

基本的技術およびテーマによっては対応、対象製造が具体化された形で特許が出願されており適切に取り組みされている。

- ゲノム縮小化という目標については十分な成果を上げた。特に大腸菌では、一方的な縮小だけでなく、目的に応じて遺伝子を戻すチューニングにより複数の目的産物の生産性を向上させるなど、本来の目的にふさわしい成果を上げた。染色体の縮小による ATP などのユーティリティ供給増強などは期待以上の成果である。また、機能未知遺伝子の機能解明など学術的な貢献度も高い。

- 期待以上の成果が得られた。しかも、本研究コンセプトならびにその方法論は従来研究にはない独創的で革新的なものである。世界に向けて我が国の当該分野の研究開発力の水準の高さを知らせることができた。

〈問題点・改善すべき点〉

- (1)目標の達成度

枯草菌において多様な遺伝子機能の検討を行っているが、それらを十分に有機的に結びつけば、更にレベルの高い成果が得られた可能性がある。

- 本プロジェクトでゲノム縮小の試みがされたのはすべてモデル微生物であり、実際に使用されている工業微生物においてもこのような試みが有効であるのかが、検討課題として残る。

出願された特許は当該微生物に限定されたものが多いので、参入障壁となりうるのか更なる検討が必要である。

- 宿主により得意とする生産物が異なることはあろうが、共通する有効なゲノム改変（例：ATP 浪費抑制）などは多くの異なる生物種で応用可能であろう。今回開発された宿主は国家的資産とも言えることから、企業毎の工業生産のノウハウも絡み企業間の調整は難しいであろうが、何らかの包括的・戦略的知的財産確保の検討を継続してほしい。
- 戦略や具体的な方法論は汎用性があるが、遺伝子レベルでの解析がまだ十分でないため、今回の成果が実際にどの程度他の微生物に波及できるものかは不明確である。その意味では、結果だけからでは本技術の汎用性は議論できない。
- 研究の方向が、汎用性と言うよりも水平的な可能性拡大に主眼が置かれており、より実用化に向けての選択と集中が必要である。
- ゲノムのミニマム化が目標になっているが、それはあくまでも手段であって、最終的な目標は物質生産の効率向上である。生産しようとする物質にもよるが、ゲノムを最少化することが必ずしも好ましくない場合もある。しかしながらミニマム化の過程で基礎的に重要な知見が得られているので、今後それを実用にどう活用するか柔軟に考えて取り組むべきである。
知財についてミニマム化コンセプトの先願があるとの説明があった。実施時に先願に抵触する可能性はないのか。抵触のリスクがあるのであればミニマム化にこだわるべきではない。
- 本プロジェクトは産業利用を目的として実施されたので、学術的な観点からの成果を望むのは的外れかもしれないが、以下に2点を指摘する。

①3種のゲノム縮小化株に関する比較と検証

大腸菌（グラム陰性細菌）と枯草菌（グラム陽性細菌）、分裂酵母（真核微生物）について異なる目的を掲げて研究開発が実施され、それぞれについてゲノム縮小化株が作製されている。しかし、3つの代表的な微生物を扱いながら、ゲノムの縮小化において共通して発見された事実や特異的な現象に関する検証が不十分で、これらについてのさらなる解析が望まれる。とくに、大腸菌と枯草菌に関する比較検証からは産業利用上有用な情報が得られるはずで、知的財産の確保の観点からも比較検証の実施は意義深い。

②代表的（あるいは特徴的）なゲノム縮小化株に関する諸性質の検証

作製された微生物細胞の表現型（性質）についての比較と検証は不十分である。とくに大腸菌細胞についてはさらなる学術的な検証が望まれる。単一の培地で生育状況を判断している点など、作製された各種微生物細胞の諸性質が十分に理解されているとは考えにくい。代表的（あるいは特徴的）な細胞を微生物学的あるいは細胞生物学的に詳細に比較することにより、従来は未知であった遺伝子の役割と表現型（性質）の関係が明らかになり、それらを基にして新たな視点からの有用物質（とくに代謝産物や酵素）の生産性向上が実現できる。

〈その他の意見〉

- ・ 大腸菌での染色体縮小が ATP 供給の増強につながったという成果が得られているが、本プロジェクトの中で ATP を直接利用する反応はグルタチオンのみである。種々の反応に応じたユーティリティを供給可能とするデザイン化染色体が実現することを期待する。
- ・ (1)目標の達成度
大腸菌では染色体の縮小目標の 2.8 Mbp に 6%程及ばなかったが、限界を見極めており目標が高すぎた。
- ・ (2)成果の意義
枯草菌や分裂酵母では親株の 2 倍以上の生産性を達成しているが、世界のレベルとの比較はされていない。また、大腸菌と同じ細菌である枯草菌宿主における独自性と利点を明白にすることも重要である。
- ・ 今回の成果は、その方法論もユニークである点、今後十分な解析研究が展開されることで、さらに画期的な成果の創出が見込まれる。いずれにしても、本研究は完成版ではなく、今後も引き続き研究を深化させる必要がある。それによって、さらなる大きな成果創出の可能性はある。
- ・ 物質生産で世界記録の 2 倍という数値目標が掲げられたが、生産効率は企業秘密で公開されない場合がほとんどである。したがって、数値自体を正確に比較することは困難なので、今後はこうした数値目標の設定に関しては検討を要する。
- ・ 作製された各種のゲノム縮小化微生物細胞は貴重な研究材料であり、わが国独自の貴重な財産である。微生物保存機関など信頼の置ける機関でこれらの微生物細胞を保管し、日本の企業と研究者に優先して提供し、わが国の産業と学問の発展に資するべきである。

2) 実用化の見通しに関する評価

大腸菌の 2 倍以上の生産性をはじめ各宿主で高い生産性が示され、それぞれの宿主においては、数種の有用物質の生産への適用性が検討されており、具体的な実用化イメージ・出口イメージは明白である。

また、染色体縮小化による微生物機能の高度化というコンセプトの国内外に対するインパクトは大きく、世界をリードする多くの可能性を秘めた革新的な成果である。今後の取り組みの中で実施例を増やして、本技術の有用性を実際に示して行く必要がある。

しかし、出口研究への展開には企業が積極的に本技術を取り込む姿勢が重要であり、企業サイドから、これら成果をどのように活用・展開するのか、明確な計画や考え方が、順次、示されることが望まれる。

実施企業のノウハウとして保有する部分と、国家的資産として共有すべき部分を、十分に検討してミニマムゲノム宿主の普及を図って欲しい。特に産業技術の普及にとって重要な企業間ライセンスの整備をお願いしたい。

〈肯定的意見〉

- モデル微生物での成果なので本プロジェクトの成果が直接実用化され得るか疑問は残るものの、出口のイメージは明確である。本プロジェクトの成果を活用した今後の研究開発に期待するところは大きい。

染色体縮小化による微生物機能の高度化というコンセプトは、国内外に対するインパクトは大きく、競争の激化より、一層の波及効果が期待できる。

- (1)成果の実用化可能性

大腸菌の世界記録の 2 倍以上の生産性をはじめ各宿主で高い生産性が示され、具体的な実用化イメージ・出口イメージを明白にしている。開発した宿主については自社での活用以外に他社へのライセンスアウトや共同研究が予定されている。分裂酵母では菌株分譲も考えられており、成果の展開が進められる。

(2)波及効果

当該宿主を用いた様々な物質生産において大きな波及効果が期待でき、すでにライセンスアウトの打診等がある。また他の宿主への展開も期待でき、更なる研究開発につながると期待される。

- 基礎研究の位置付けで、かつ独創的な研究であるため、実用化研究のイメージはしやすい。世界をリードする多くの可能性を秘めた革新的な成果である。また、関連分野研究への波及効果は大きい。
- 本事業テーマでは、事業そのものが目的でないため、「実用化」のとらえ方と評価にはむずかしさがある。作製された各種の微生物細胞については、数

種の有用物質の生産への適用性も検討されており、このような意味では明確な見通しがある。成果の波及効果も大きいと判断される。以上より、実用化および波及効果の観点からも、当該テーマは高く評価できる。

- 実施企業が社内・関連会社で継続的に実用化検討を進めるとのことであり、早期の実用例を世界に先駆けて出して欲しい。
- ゲノムミニマム化で ATP 供給能が大幅に向上するなど価値ある知見が得られており成果の実用化が期待される。しかし、ゲノムミニマム化が物質生産の効率化にとってのクリティカル技術であるというところまでは至っていないのではないか。今後の取り組みの中で実施例を増やして、本技術の有用性を示して行く必要がある。将来実施例が蓄積されてゲノムミニマム化の有用性が十分認知されるようになれば、関連分野への波及効果も大きくなり、期待できる。
- 大腸菌関連に関しては実用化目標が明確でありしかも具体的に検討が進められており、早期事業化が期待される。さらに他テーマにおいても基盤技術は十分と判断され、本プロジェクトの機会を逸することなく着実な計画の下進められる。

〈問題点・改善すべき点〉

- ミニマムゲノム宿主は、実施個別企業のノウハウとして保有する部分と、国家的資産として共有すべき部分を、十分に検討して普及を図って欲しい。特に企業間ライセンスは産業技術の普及にとって重要なので、その整備をお願いしたい。
- 枯草菌利用に関しては、ターゲットは掲げられているが具体性が今一步と判断されるため、実用化に向けてのステップを設定し研究を進めることが望まれる。分裂酵母技術に関しては、コンセプトはしっかりしているが、外部発表数のわりに実用化の具体性がやや不明瞭である。
- 従来から、微生物による有用タンパク質の生産性向上のために多くの努力が行われている。本プロジェクトにおける枯草菌と分裂酵母によるタンパク質生産性の向上は、特定遺伝子の欠失あるいは変異による。その成果を実際の生産株に導入して効果が得られたとのことであるが、学術的な解明を進め、広く情報発信していくことを期待したい。
- ゲノムミニマム化の学術的な意義は比較的明確だが、物質生産にとっての意義が必ずしも明確とは言えない。実用上は物質生産にとって有害なゲノムを除去することこそが重要ではないか。この点から、ミニマムゲノム株の知財としての有用性がどれほどあるのかは不明である。ミニマム化は先願もある

とのことなので、こだわることなく、むしろ物質生産の代謝系毎に有害遺伝子を削除した宿主ライブラリーを開発するなど実用化に向けた柔軟な取り組みが今後必要になる。

- 出口研究への展開は企業が積極的に本技術を取り込む姿勢が必要であるが明確になっていない。企業サイドとして、これら成果をどのように活用・展開するのか、明確な計画案や考え方が示されていない。

〈その他の意見〉

- ・ 本プロジェクトの成果のライセンスアウトや受託生産に関する具体的な報告がなかった。もしライセンスアウトが期待通りに進んでいないなら、その阻害要因を解明し、成果が広く利用されるようになることを期待する。
- ・ 関連分野への波及効果を期待できるが、とくに人材育成に関しては研究担当グループだけでなく、他企業や国としてのしっかりとした計画案で運用されることが望まれる。

3) 今後に対する提言

成果にかかわる基盤情報の開示により、本技術の有用性を、実用化をもって世に知らせ、コリネ菌・放線菌・糸状菌などの有用産業菌に、本研究開発成果が応用展開されて、発酵工業における強い日本の復活につながることを期待したい。

各種バイオ産業における理想的な宿主細胞の創製を世界に先駆けて行うことは国策としても極めて重要であり、今後も引き続き研究を深化させ、ゲノム削減を日本バイオものづくりに生かすための技術基盤と知財基盤の構築を進める必要がある。

〈今後に対する提言〉

- ・ 今回の成果は、その方法論もユニークである点、今後十分な解析研究が展開されることで、さらに画期的な成果の創出が見込まれる。いずれにしても、本研究は完成版ではなく、今後も引き続き研究を深化させる必要がある。それによって、さらなる大きな成果創出の可能性がある。そのために、担当研究機関でその技術を維持するだけでなく成果の公開を推進し、関連研究機関での本成果活用研究を進める必要がある。
- ・ ゲノム削除の過程で多くの興味深い現象が見出されている。しかし、生産対象となる物質毎の個別の事象にとどまっていたのでは基盤技術として応用展開することは難しい。今後の継続研究の過程で、削減するとなぜ良いのか、どこまで削減すべきなのか、代謝系毎に削減が望ましいもの、望ましくないものなど、原理を明らかにして体系化して行く必要がある。原理を追求する過程で基本的な知財も形成されてくる。ゲノム削減というコンセプトを日本の得意技であるバイオものづくりに生かすための技術基盤と知財基盤の構築は未だ道半ばである。今後体系化が可能なのか、あるいは体系化は不可能なのかを見極め、可能な場合にはしかるべき方策を講じる必要がある。
- ・ 我が国の有用産業菌であるコリネ菌・放線菌・産業糸状菌などに、本研究開発成果を応用展開することを期待する。
- ・ 「高性能宿主細胞の創製」については、研究開始時から注目されており、優良な成果を挙げたことは意義深い。一方、高性能宿主細胞の創製には期待感があり、後継プロジェクトの設定などによりさらなる研究の深化と継承が望まれる。本プロジェクトでは十分な成果を挙げ当初の目標を達成しているゆえに、今後展開すべき課題も明らかになった。最大の課題は、各種の有用化合物生産に「最高最適」な宿主が完成されたところまで到達したかどうか不明なことである。これについてはさらなる検証が必要である。可能なかぎり、作製された各種の宿主細胞（微生物細胞）のより広範な有用物質生産へ

の適用性の評価を行い、有用物質の生産量増大や生産時間短縮、あるいは生産に必要とされるエネルギーや生産コストの低減を評価、検証すべきである。また、さらなるゲノム縮小化や遺伝子削除を通して最小化ゲノム細胞（プロジェクト開始時の名称ではミニマムゲノム細胞）の創製を行うことも強く望まれる。どのような有用物質を生産することを目的とするのかによって最適な宿主細胞が異なることは容易に想像されるが、どのような場合にどのような性質が要求されるのか（逆に障害となるのか）は現状の生物化学あるいはコンピュータシミュレーションでは予想できない。一方、生物情報が単純化されたゲノム縮小化株であれば各種の影響評価は容易になるはずで、その長所を生かし、検証データを集積し解析することが最良の手段となる。これらを通じて、最良の環境負荷低減型の高性能宿主細胞の創製が可能になり、省エネルギー型バイオ製造基盤技術の開拓により環境調和型循環産業が確立できる。現時点では各種のゲノム縮小化株はわが国独自のものであるが、情報が開示されれば諸外国でも同様のゲノム縮小化株が作製され事業化に向けての取り組みが活発化する。欧州では微生物細胞のゲノム縮小化株に関するプロジェクトが立ち上がるので、当該分野での競争は熾烈になることが予想される。先鞭を付けたことで良しとするのではなく、これからも先頭を走り、大きな果実を収穫することが重要である。一方、このような事業は企業や研究機関のみで実施することは困難であり、本プロジェクトのように NEDO 等の支援がなければ実施は不可能である。各種バイオ産業における理想的な宿主細胞の創製を世界に先駆けて行うことは国策としても極めて重要であり、現在の優位性を生かしてさらなる展開を図ることが強く望まれる。

- 本技術の有用性を、実用化をもって世に知らせてほしい。さらには人材育成により発展させ化学工業界への浸透を期待したい。
- 染色体の縮小化には大変な手間と資金が必要である。今後他の微生物においても同様な試みが行われるときに、より簡便な操作で実施できるような情報提供が行われることを期待したい。
- 菌株の分譲は難しいにしても、成果にかかわる情報の開示により開発した宿主菌がなるべく早い段階で国内企業において広く利用できるようにし、発酵工業における強い日本の復活につながることを期待したい。

〈その他の意見〉

- 実施者が異なるためにあえて用語を区別したのであろうが、ゲノム縮小化株を表す場合に **designed genome factory** や **refined genome factory** などの造語が並行して使用されている。しかし、本テーマが当該研究領域の最先端

を行くものなので、後続の研究者のための用語の作成や統一も重要である。後続の研究者に混乱が生じないように、実施者には協議の上でゲノム縮小化株に関する共通の用語を使用することを要望する。

- 各研究機関で従事した研究者の効率的展開が図られているのかどうかは、不明。得られた知見や成果と同様、本プロジェクトで雇用された若手研究人材の再就職や転出先などフォローする体制を構築すべきである。

2. 2 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発

1) 成果に関する評価

多くの新たな反応を取り扱い、whole cell から in vitro 解析、シミュレーション技術も併用して酵素反応を詳細に解析し、新たな物質生産を検討して目標を順調に達成した。特に、複数酵素系による物質変換システムの開発や複雑な二次代謝産物の微生物による生産は、微生物利用における新領域を開くものとして高く評価できる。

酵素反応における副反応の抑制はバイオプロセスの実現にかかせない技術であり、分子シミュレーションによる高精度な予測が可能になれば、研究開発のスピードアップにつながり、産業に大きく貢献することが期待できる。

しかしながら、個々のテーマが単独で行われた印象が強く、全体としての統一感を欠き、テーマ間の連携による総合力発揮という点で物足りなさがある。

成果が出ていることから、長期的に取り組むべき重点課題については次のプロジェクト提言につなげてほしい。

〈肯定的意見〉

- 個別の研究テーマについて当初の目標を達成した。特に、複数酵素系による物質変換システムの開発や複雑な二次代謝産物の微生物による生産は、微生物利用における新領域を開くものとして高く評価できる。

酵素反応における副反応の抑制はバイオプロセスの実現にかかせない技術であり、分子シミュレーションによる高精度な予測が可能になれば、研究開発のスピードアップにつながり、産業に大きく貢献することが期待できる。

- (1)目標の達成度

- ・非水系反応場におけるバイオプロセスの構築においては、有機溶媒耐性菌 *Kocuria rhizophila* DC2201 株において遺伝子発現系を構築し、水/有機溶媒二相系反応場を用いて(R)-マンデル酸で 8.8 g/L/h、4-クロロ-3-ヒドロキシアセト酪酸エチルで 2.1 g/L/h の生産を実現し、数 g/L/h の目標をおおむね達成した。

- ・酸素添加酵素の高機能化・多様化技術および発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発においては、ビタミン D3 水酸化酵素において変異体ライブラリーのスクリーニングと変異点解析、変異の多重化により、ビタミン D2 について 11.5 倍、ビタミン D3 についても 21.6 倍の活性向上を実現した。更に副反応抑制変異により副反応物生成を 1.7% に低減した。またビタミン D3 水酸化酵素の結晶構造解析に成功し、変異酵素における活性向上の分子機構を明らかにした。さらに nisin を用いてビタミン D3 収量を 6 倍に高める反応効率の向上を実現した。ビタミン D3 の生

産性向上を 10 倍とした目標には及ばないが、十分な生産性向上を達成した。一方、有機溶媒耐性菌 *Rhodococcus opacus* B4 を用いて水／有機溶媒二相系反応場にて 510 g/L のベンジルアルコール生産などを実現し、さらに同菌が水／有機溶媒の界面ではたらくことや、有機溶媒耐性にミコール酸合成系や排出ポンプが関与することをプロテオーム解析を併用して明らかにし、目標をほぼ達成した。

- ・高効率酵素設計のための酵素反応シュミレーション技術においては、酵素-基質結合構造の予測を従来の 2.6 倍の精度で実現し、酵素改良に有効な変異部位を効果的に予測するとともに、反応構造の計算を従来の 3 倍の速度で達成するプログラムを開発し、目標を達成した。

- ・微生物複合酵素系の産業用触媒としての研究開発においては、複合酵素系や各遺伝子をもつ組換え体を用いて、L 体アミノ酸(100g/L)やキラルジオール類(100g/L)、キラルアミン類(50g/L)、キラルアクチノール(50g/L, 100%)の効率的生産を実現した。また、キラルβ-アミノ酸生産に有効な新規アミノ酸転移酵素、酵母解糖系と共役可能なアルドラーゼ、高度不飽和脂肪酸に関する不飽和化酵素、脂肪酸の二重結合水和化酵素、新規 L-イソロイシンジオキシゲナーゼなどを探索により取得した。さらに、FMN 依存酸化還元酵素系 L-パントイルラクトン脱水素酵素アクセサリータンパク質や superoxide dismutase による P450 水酸化酵素 BM-3 の活性化・安定化、高度不飽和脂肪酸の二重結合異性化や飽和化に関わる乳酸菌酵素系を解明し、ラッカーゼ・ペルオキシダーゼの賦活化メディエーター活性物質の探索と 2-ケトグルタル酸蓄積大腸菌の開発を達成した。一方、酵母解糖系とアルドラーゼの共役によるデオキシリボース 5-リン酸の生産(53g/L)、2-ケトグルタル酸蓄積大腸菌を用いた 4-ヒドロキシイソロイシンの生産(73g/L, 87%)、アルドラーゼ・アミノ基転移酵素の共役によるヒドロキシアミノ酸の生産(5 g/L)、乳酸菌共役化酵素系組換え体による共役リノール酸の生産(54g/L, 60%)、乳酸菌水和酵素を用いた水酸化脂肪酸の生産(30g/L, 90%)をそれぞれ実現した。多様な物質の生産にかかわる酵素系の開発と効率的生産を達成し、目標とした 50~100 g/L をおおむね達成した。

- ・放線菌の活用による新規二次代謝産物の開発においては、天然型抗生物質生合成遺伝子クラスターのケトレダクターゼ遺伝子をエピ型ケトレダクターゼ遺伝子と置換した後、エピ型ケトレダクターゼ遺伝子や遺伝子クラスター全体の多コピー化や菌株改良・培養条件改良などにより、非天然型抗生物質の効率的生産(175 mg/L/D)を実現し、最終目標(200 mg/L/D)をほぼ達成した。また、放線菌におけるストレプトマイシンとグリキサゾンの生合成、AfsR 関与の二次代謝、グルコース抑制にかかわる制御機構を解明し、

γ -ブチロラク톤の生合成経路を明らかにした。さらに、人工生合成遺伝子クラスターを導入した大腸菌を用いて、各種フラボノイド・フラボン・フラボノール、イソフラボン、レスベラトロール誘導体、クルクミノイド類の生産に成功し、*Azotobacter* やイネのポリケタイド合成酵素を明らかにし、4-ヒドロキシ-3-ニトロベンズアミドやフェロベルディンの生合成経路を解明した。

・各課題に多様なプロジェクトを含んでいるが、それぞれの課題でおおむね目標とする数 g/L/h あるいは $50\sim 100 \text{ g/L}$ を達成する成果を上げており、全体としておおむね目標を達成した。

(2) 成果の意義

有機溶媒耐性菌を水／有機溶媒二相系反応場で用いて(R)-マンデル酸で 211 g/L 、4-クロロ-3-ヒドロキシアセト酪酸エチルで 355 g/L の世界最高レベルの生産を達成した。また、水素酸化細菌での水素を駆動力にした共役系を水／有機溶媒二相系反応場で用いて(R)-4-クロロ-3-ヒドロキシアセト酪酸エチルで水系反応の 22 倍の生産を実現し、水／有機溶媒二相系反応場の優位性を明確にした。ビタミン D3 水酸化酵素の比活性を 20 倍以上に、ビタミン D3 収量を 6 倍に高める成果を上げ、世界で初めてグラム陽性菌の有機溶媒耐性機構を明らかにし、世界をリードできる成果を達成した。さらに L 体アミノ酸、キラルジオール類、キラルアミン類を含むキラル化合物やデオキシリボース 5-リン酸、4-ヒドロキシアミノ酸、共役リノール酸の効率的生産を実現する多様な共役複合酵素系とその素材となる酵素類を開発し、世界をリードする成果を達成した。特に水／有機溶媒二相系反応場の多様な物質の生産への活用と共役複合酵素系によるキラル化合物生産の展開が期待され、新たな技術領域を形成した。

(3) 知的財産権等の取得及び標準化の取組

PCT7 件を含む 22 件を特許出願しており、知的財産権等の取扱は適切に行われている。

(4) 成果の普及

査読付き 140 件を含む 173 件の論文を発表しており、適切に成果発表をしている。また、283 件の外部発表をしており、成果の普及・一般への情報発信を適切に行っている。

- 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発については、複合酵素系の制御、非水系反応場の制御、酵素の高機能化技術の開発が行われている。複合酵素系による有用物資の生産や新規反応場の開拓（例：有機溶媒中での有用物質生産）など多岐にわたる内容を含んでおり、それぞれに優れた成果を挙げており、目標を達成した。具体的には、数種の酵素を同一宿主細胞に導入し合

目的的な複合酵素系を作製し、非天然型アミノ酸やキラルジオール類などの生産を可能にしている。一部のキラル化合物については、100 g/L など高濃度の生産量を達成していることは特筆すべきであろう。非水系(有機溶媒中)の微生物反応により(R)-マンデル酸などの有用化合物の効率的生産を達成している。酵素の立体構造予測や酵素反応シミュレーションを利用した酵素添加酵素や P450 水酸化酵素の高機能化(例: ビタミン D 類の効率的生産)、新規二次代謝産物の生産、プロテオーム解析による代謝状態の解析などの成果も挙げられている。産業技術に資する成果を挙げたことは意義深く、その独創性と重要性、技術的な優位性は高く評価できる。知的財産権等の取得も積極的に行われ、国内外で適切に行われた。論文発表や学会等での成果発表も活発に行われており、成果の普及も適切に行われた。以上より、本テーマの内容に関しては、極めて高く評価できる。

- 多くの新たな反応を取り扱い、whole cell から in vitro 解析、シミュレーション技術も併用して酵素反応を詳細に解析し、新たな物質生産を検討して目標を順調に達成した。非水系反応場・複合酵素系機能発現制御、シミュレーション、非天然物生合成、生産プロセス検討など、探索・モデリングから製造プロセスの初期検討までをカバーした展開となっており、充実した内容となった。いずれも、世界水準の成果である。
各反応とも化成品製造・医薬品原料製造などで有効で、ケミカルプロセスとの相性の良い汎用性の高い新技術となっている。
成果発信も充実している。
- 微生物機能を効果的に活用するバイオプロセスの有効性を、新たな微生物機能(活性)の探索を組み合わせ実証しており、我が国の得意とする技術開発力を示す結果となった。新たな微生物機能の発掘は新規性が高く、成果そのものも実用的であり、優れた業績を挙げている。とくに化学品合成法における疎水的表層構造を有する微生物の利用や従来の化学合成に置き換えることを想定したプロセスの構築は、今後のグリーンバイオ研究を推進する上で興味深い成果を挙げている。
- バイオものづくりの新しい挑戦が行われた点を高く評価したい。生産性の数値目標は概ね達成できたが、一部不十分なものもある。目的物により難易度がことなるため目標値を一概に設定することには無理がある。数値目標をクリアすることよりも新しい技術基盤が構築できたかどうかが重要である。技術基盤構築の観点からは非常に先進的な試みが行われており、市場の拡大や創造につながる優位性ある成果が得られた。数値目標の未達部分もあるが、全体の達成度は 90%程度である。特許出願件数が少ない点が気になるが知財の確保ならびに成果の論文化は概ね適切に行われている。

- 蛋白レベルでの反応場解析と制御においては、研究分担が適切であり、それぞれのチームが力を発揮し、その統合により大きな進展へとつながり目標を達成している。複合酵素系の研究は発酵の基盤技術がうまく活用され更なる進展へと結びつけ高選択的な反応場を作り上げることができた。また、培養槽レベルでの研究は、微生物の多様性と化合物合成への応用がうまくマッチして今までのバイオプロセスの常識を変えるプロセスの可能性を築いたと考えており今後の進展に期待したい。

〈問題点・改善すべき点〉

- 成果が出ていることから、ここで短期～中期的に企業において実用化を目指す課題と、長期的に取り組むべき重点課題を十分に整理して、長期課題については次のプロジェクト提言につなげてほしい。たとえば有機溶媒耐性機構の解明とその機構の他の微生物への応用などは、今回の新技術の汎用化を目指した新たな長期課題として魅力的である。
- 開発されたバイオプロセスは、従来の微生物機能を発現させる特異的なプロセスを基盤としており、特段の新規性はない。複合酵素反応や微生物菌体利用プロセスとして、「高性能宿主細胞創製技術の開発」研究での成果を取り込んだ検討は、本研究の有効性をもっと強調できたのではないか。
- 成功例が多く、当初の目標を達成していることも明らかであるが、個々のテーマが単独で行われた印象が強く、全体としての統一感はない。一部の成果をもとに、テーマ間での共同的な研究が実施されれば、さらなる有意義な展開があったことが予想され、この点は残念である。
- それぞれ得意とするメーカーの研究であるため広く一般への普及に関して若干の疑問が残る。本プロジェクトで得られた技術をどのような形で普及していくのか示していくことも必要である。
- (3)知的財産権等の取得及び標準化の取組
多くの成果を出しながら国内特許が1ないし2件と少ない課題が一部ある。今後の特許化が望まれる。
- 使用されている要素技術が多岐にわたり、個々の技術の進展には大きく貢献したと考えられるが、サブグループ間の連携による総合力発揮という点で物足りなさがあり、プロジェクトとしては寄せ集めの感が否めない。競合相手にもなり得る企業がプロジェクトを組んでいるのでやむを得ない点もあるが、プロジェクトマネジメントの課題でもある。
- 本プロジェクトで達成された変換反応の多くは合成経路のワンステップを生体触媒に置き換えたにすぎず、スクリーニング・変異という従来技術の延長線にある。革新的な技術開発が行われたとは言いがたい

〈その他の意見〉

- 非水系の反応などは特徴のある成果であることから、大規模な化成品製造に向けて、化学プロセスと組み合わせた新たな生物産業集積モデルを組める可能性が高い。
- P450 の種類は細菌に比べカビ・キノコ類に非常に多いことが最近のゲノム解析から明らかになっている。たとえば、*Aspergillus oryzae* では 100 種類以上の P450 遺伝子が存在し、ほとんどの遺伝子の発現に成功している。シミュレーション技術にこのような成果を取り入れることができれば、バイオプロセスのより一層の多様化と高精度化が実現し、高付加価値物質の生産などへの波及効果が期待できる。
- (1)目標の達成度
各課題の中に多くのプロジェクトを含んでおり、多様な可能性に挑戦することを意図したと解釈される。水素酸化細菌 *Ralstonia eutropha* H16 株における水素を反応駆動力とした共役系での(R)-1,2-プロパンジオール生産など、一部のプロジェクトで目標に達していないものもあるが、各課題でそれぞれ目標を達成する目立った成果があり、全体として目標はおおむね達成された。
- 微生物反応の有機溶媒系での利用は、環境にやさしい微生物利用面とは切り離して、高選択的な一つの不斉触媒系として考えてもよく、更なる進展に多いに期待したい。
- 微生物機能を効果的に活用するバイオプロセスは実用性の高い技術であり、本成果を広く開示するとともに、出口研究の充実を図ることが重要である。この類の研究は、いかに有用性の高い化合物が出口として設定されるかであり、多くの関連企業や研究機関の連携が重要である。

2) 実用化の見通しに関する評価

マンデル酸の生産技術、水素酸化細菌を利用した生産技術、水酸化ビタミンD生産技術、キラル化合物生産技術、非天然型抗生物質生産技術等は、それぞれの担当企業で個々の物質生産における実用化が表明されており、各技術を活用した新たな物質生産への展開も考えられていることから、実用化イメージ・出口イメージは明確になっている。

また、個別のアイテムの生産効率の向上が目的になっているため当面の波及効果は小さいが、技術が体系化され、新しい技術分野へと発展することができれば波及効果も大きくなると期待される。

但し、本研究対象は反応特異性が高く、その方法論も特異的であり、他の基質に対しても応用できるかは課題である。

今後、コモディティケミカルでは本格的な実用化において生産規模と設備投資が障壁になることが多いので、実用化を戦略的に支援する政策提言に反映してほしい。

〈肯定的意見〉

○ (1)成果の実用化可能性

マンデル酸の生産技術、水素酸化細菌の利用した生産技術、水酸化ビタミンD生産技術、キラル化合物生産技術、非天然型抗生物質生産技術等は、それぞれの担当企業で個々の物質生産における実用化が表明されている。また、各技術を活用した新たな物質生産への展開も考えられており、実用化イメージ・出口イメージは明確になっており、引き続き研究開発が行われる見通しである。

(2)波及効果

水／有機溶媒二相系反応場ならびに共役反応複合酵素系の活用においてインパクトの高い成果を出しており、これらの技術を活用した物質生産が拡大・加速されると期待される。また、これらの技術の新たな発展も期待できる。一方、多様なプロジェクトを広範な研究チームが担当しており、当該分野の研究開発や人材育成等の促進につながったと考えられ、今後の展開が期待される。

- 我が国の得意とする研究分野であり、技術開発を推進し成果を挙げることで、ライブラリー化ができた。
- 参画企業が興味をもったターゲットに取り組んでいるので、出口イメージは明解であり、真に競争力のある技術レベルに到達していれば実用化の可能性は高い。当面は個別のアイテムの生産効率の向上が目的になっているため波及効果は小さいが、技術が体系化され、新しい技術分野へと発展することが

できれば波及効果も大きくなる。基盤的技術を多く含んでいるので、プロジェクトの実施が研究開発や人材育成に大きな波及効果をもっていた。

- 目標値を達成し、実用化のイメージは明確なので、コスト次第では実用化が近い物が多い。
- 本事業の成果の一部については事業化も進んでおり、それ以外の成果も数年間で事業化が予定されており、明確な見通しがある。成果の波及効果も大きいと判断される。以上より、実用化および波及効果の観点からも、当該テーマは高く評価できる。
- 研究自体がニーズ指向からの色合いが強いためその分実用化イメージ、出口イメージも非常に明確であり、実用化に関して大きな可能性を感じる。
- 実施企業が、3～5年での実用化をとらえているものもあり、先行事例として大いに期待している。

〈問題点・改善すべき点〉

- 全体的な研究方針は波及効果が期待できるが、具体的な研究テーマは各論的で、その方法論も一般化できるものではなく特異的である。したがって、目標が達成されれば良いが、うまくいかない場合は得られるものも少なく、他への波及効果や知見の蓄積はなされにくい。
- 本プロジェクトで設定された数値目標が妥当かどうかの判断が難しい。それよりも参画企業が自ら実用化する意思や今後も継続研究を行う意思をもっているかがプロジェクトの成否の判断材料となる。今回参画企業はいずれも事業化のプランを提示しているが、実現可能なアイテムからで良いので是非前倒しで実現して欲しい。
- コモデティークミカルの場合、研究開発段階で設定目標値を達成したとしても、実用化において生産規模と設備投資が障壁になることが多いので、それを見据えた企業戦略・業界戦略を抽出して、NEDO、JBAで議論して実用化に向けた政策提言に反映してほしい。特に産業集積のための長期のインフラ整備は、国際競争力に反映される点を考慮してほしい。
- 原油価格や為替変動などの外部要因にも影響されると思うが、合成反応の1段階をバイオプロセスに置き換えるという方法がコスト的に見合うのかという評価が不足している。
- 本研究対象は反応特異性が高いため、研究の汎用性を考えた場合の技術展開の可能性が懸念材料。基礎技術としての蓄積から他の基質に対しても応用できるかが課題である。

〈その他の意見〉

- 波及効果のある汎用性の高い技術が基盤にあるため、特定の企業だけで利用するのは本研究プロジェクトの成果が効果的に社会に還元できない。

3) 今後に対する提言

プロジェクトの成果は化学工業において非常に有用なツールになると考えられるが、応用範囲の拡大を継続的に検討することが必要で、プロジェクトの成果をどのように我が国の競争力強化につなげて行くかという視点で積極的に情報発信を行って欲しい。国益という視点から、特許等のライセンスに関しても国内企業に対してはできるだけ柔軟に考えて、技術の応用が幅付広く展開できるように心掛けて欲しい。

一方、本事業を通じて得られた成果を統合し、新たな産業利用の可能性を検討することが重要である。我が国の技術開発レベルであれば、目的化合物製造に対する新規バイオプロセスの構築は可能であり、食品、医薬品、化成品、農林水産関連物質など、関連分野との連携を深めるプログラムの立案が望まれる。

〈今後に対する提言〉

- ・ バイオプロセスの実用化には、複数の酵素反応を低コストかつ効率的に組み合わせることが必要である。そのためには、複数酵素系による物質変換システムや遺伝子クラスター法による発酵生産システムの開発に期待が持てる。シミュレーション技術は継続的な更新が行われなければすぐに陳腐化することが多い。そのようなリスクを回避するためのアフターケアが必要である。
- ・ 蛋白質レベルでの・・・に見られるようにそれぞれの研究機関が最大限力を発揮し、その成果がそれぞれの研究を高めていく。この関係は研究開発において理想的な進め方であり、各研究が細分化、専門化していく中でこれからの研究の進め方の一つである。今後も新たな研究テーマに取り入れてはどうか。
- ・ 各課題内でプロジェクトがめざす方向が一致しておらず、成果が集約されるまでに至っていない印象がある。今後、多様な成果が有機的に集約されて大きな展開に結ぶつくことを期待する。
- ・ 本事業を通じて得られた成果を統合し、新たな産業利用の可能性を検討することが重要である。一例として、高性能宿主細胞（大腸菌ゲノム縮小化株など）を宿主として利用した場合に、（本テーマで実施された）複合酵素反応が効率的に進行するのかどうかについては興味を持たれる。また、本テーマで検討された複合酵素反応や非水系酵素反応の中から特異的な酵素反応を選択し、酵素反応シミュレーション技術の適用、あるいは（バイオリファイナリー技術の開発で実施された）膜利用リアクターシステムや膜利用精製プロセスと統合することで、さらに高効率の有用物質生産が可能になるのかどうかについても興味を持たれる。
- ・ プロジェクトの成果をどのように我が国の競争力強化につなげて行くかという視点で参画機関は積極的に情報発信を行って欲しい。国益という視点か

ら、特許等のライセンスに関しても国内企業に対してはできるだけ柔軟に考えて、技術の応用が幅付広く展開できるよう心掛けて欲しい。

- 化学プロセスとの相性も良い技術群であることから、非生物系化学産業との情報交換で、本技術の応用範囲の拡大を継続的に検討することを期待する。
- 本研究コンセプトでの革新的な技術が多く開発されることが期待される。全体的な研究をどのようにデザインし、どのように効率的に目的活性を有する微生物酵素を探索するかが重要である。ゲノム情報を活用した酵素の探索など、新たな方法論の開発も必要であり、国としてもこのような研究を継続維持するような支援体制が望まれる。また、研究人材の育成も重要であり、計画的な取り組みが望まれる。「高性能宿主細胞創製技術の開発」研究の成果を連動させた革新的なバイオプロセスの開発が期待される。

〈その他の意見〉

- 微生物反応の高度選択性は、化合物合成において貴重な手法でありある程度制御できるようになってきた。化学工業において非常に有用なツールになると考えられ、もっと広く認知されるよう公表してほしい。
- 本技術開発は、出口研究との連携がとくに必須であり、新たな機能性化合物の創出や用途開発研究の推進が望まれる。我が国の技術開発レベルであれば、目的化合物製造に対する新規バイオプロセスの構築は可能である。食品、医薬品、化成品、農林水産関連物質など、関連分野との連携を深めるプログラムの立案が望まれる。
- 優れた成果が多いので、本事業担当者以外の研究者にも参考となるように、今後は成果をわかりやすい形で公表してほしい。一方、実用的に成功している事例が多いが、高い生産量が達成された要因や真のブレークスルーポイントが理解できないものも多い。成果公表の際には、本テーマの各研究で得られた成果についての重要な点や特筆すべき点などを整理した上での解説が必要である。とくに成功に至る重要な要素技術や背景を明らかにしてほしい。これらの知的財産をわが国の研究者が共有することで、実用面でも学術的にも検証が多方面で行われ、わが国全体での微生物反応の多様化・高機能化技術の向上が期待できる。

2. 3 バイオリファイナリー技術の開発

1) 成果に関する評価

ソフトバイオマス糖化技術・増殖非依存型バイオプロセス・トータルシステムの開発における成果は世界をリードするレベルにあり、発酵生産における新たな汎用技術に結び付くことが期待される。また、膜利用発酵プロセスや膜利用精製プロセスについては、膜利用バイオリクターを支援する技術として高く評価され、本事業を通じて、実生産に利用できることを示すデータが提示されており、成果の波及効果も大きいと判断される。

但し、それぞれの要素技術が独立に開発されており、要素技術の組み合わせによる優位性発揮にまでは至っていない。

バイオマス資源に乏しい我が国がバイオリファイナリーで活躍するには、諸外国が考え付かないユニークなプロセス技術の開発と総合力の発揮が求められる。本プロジェクトの成果は我が国が誇る優れたプロセス技術と考えられ、今後どう組み合わせるか総合力を発揮させるか継続的な検討が必要である。

〈肯定的意見〉

- 従来の発酵プロセスにおける設備面や精製面等の問題点や効率の悪さに対し、これを解決できる可能性をもった技術の開発が進み、プロセス開発が確実に実用化に向かっている。非食用バイオマスの有効利用の可能性とあわせてグリーンケミストリー化の推進に期待が持てる研究成果である。
特許出願が多く技術の有用性、確実性の高さを感じ取ることができ知財権が十分に保護されている。
- 本テーマでは、バイオリファイナリー技術として D-乳酸、L-アラニン、L-バリン、キシリトールなどの生産が可能になり、当初の目標を達成している。ただし、増殖非依存型バイオプロセスの適用性の拡大の一助になったが、本事業だけで得られた成果として見れば大きなブレークスルーあるいは今後の進展に大きな長所となる成果があったとは判断しにくい。一方、膜利用発酵プロセスや膜利用精製プロセスについては、膜利用バイオリクターを支援する技術として高く評価される。本事業を通じて、実生産に利用できることを示すデータが提示されており、成果の波及効果も大きいと判断される。産業技術に資する、実用に資する成果を挙げたことは意義深く、その独創性と重要性、技術的な優位性は高く評価できる。本テーマ全体では、知的財産権等の取得も積極的に行われ、国内外で適切に行われた。論文発表や学会等での成果発表も活発に行われており、成果の普及も適切に行われた。
- プロジェクトリーダーの専門性が強く発揮されて成果を挙げたテーマである。バイオリファイナリー研究を牽引する研究機関による戦略的かつ計画的

な研究展開を推進し、国内外へ力強い発信がなされている。

- 多くの生産対象物質を扱い、設定された目標を達成している。特に中間評価以降、新たに加えたベンチスケール実証試験も行って工業化に向けたデータが出ており、評価できる。

コリネ菌による物質生産は日本発祥の生産技術であるが、近年、国際競争が激化している。その観点でも、本課題で創成された物質輸送・細胞内代謝・遺伝子発現制御・反応プロセス、メンブレン発酵法など多岐にわたる基幹技術は国際競争シーズとして価値がある。

成果発信も多数行われ、高く評価できる。

- コリネ型細菌の代謝経路の解明・代謝改変、混合糖の利用技術の開発など、論理的に育種を進め、多くのコモディティ化合物を高生産するという目標を達成した。論文の発表、学会での発表など広く行われており、学術的な貢献度も高い。

- (1)目標の達成度

ソフトバイオマス糖化技術・増殖非依存型バイオプロセス・トータルシステムの開発では人工セルロソーム構築においてはセルロソームタンパク質の解析、新規セルラーゼの解析、セルラーゼの分泌システム開発、リグニン含有古紙での糖化システム構築など幅広い要素技術につながる研究成果を得ている。また、増殖非依存型バイオプロセスの宿主であるコリネ型細菌における糖代謝系遺伝子を中心とした詳細な解析結果をもとに、糖利用能改良による生産性を向上させ、乳酸・キシリトール・アラニン・バリンの4種類の化合物について $STY10g/L/h$ 以上の高効率生成を達成した。さらに、5炭糖利用能を強化した増殖非依存型バイオプロセスにより古紙から乳酸の高効率生成を達成し、スケールアップでも同レベルの生成を実証した。これにより成果は目標値をほぼ達成した。メンブレン利用高効率発酵システムの開発では、開発した膜利用発酵リアクターを使用して新たに分離した乳酸菌による乳酸製造で $STY11g/L/h$ を達成し、新たに開発した乳酸製造用組換え酵母でも $STY10g/L/h$ を達成した。また、有機酸精製を効率化する高選択性分離膜を加えたパイロット膜利用発酵リアクターで高効率連続発酵を実証し、成果は目標値を完全に達成している。

- (2)成果の意義

ソフトバイオマス糖化技術・増殖非依存型バイオプロセス・トータルシステムの開発における成果は世界をリードするレベルにあり、発酵生産における新たな汎用技術に結び付くことが期待される。メンブレン利用高効率発酵システムとして開発した膜利用発酵リアクターで生産した乳酸は従来製品より高品質で、世界最高水準と言うことができ、他の競合技術と比較して優位

性がある。発酵生産における新たな汎用技術に結び付くことが期待される。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

ソフトバイオマス糖化技術・増殖非依存型バイオプロセス・トータルシステムの開発における特許出願は国外 15 件・PCT4 件を含め 42 件で予算等から考えると多くはないが、基礎的な研究内容が多いためである。膜利用高効率発酵システムの開発では、国内 42 件、PCT5 件と活発に特許出願を行った。以上より、全体として知的財産等の取扱は適切である。

(4)成果の普及

ソフトバイオマス糖化技術・増殖非依存型バイオプロセス・トータルシステムの開発における論文発表は査読付き 107 件、その他 54 件あり、非常に活発に実施されており、適切である。外部発表は 314 件と多く、成果の普及と一般への情報発信は適切に実施されている。

- ①増殖非依存型バイオプロセスについては、高 STY が可能なことが示され、非食料バイオマス糖化物からの生産に関しても大きな進歩が得られた。しかしながら、②バイオマス糖化は興味深い知見が得られたものの、まだ基礎研究の段階で要素技術が確立されたとは言い難く、非食料バイオマスからのプロセス全体としては未完成な状況にある。③膜利用高効率発酵システムについては、ターゲットを絞り込んだことが功を奏して非常に優位性の高いプロセスが完成したのではないか。以上により全体の達成度は 90%程度である。知財及び論文発表に関して、①は十分だが、③について特許出願は積極的に行われているものの論文や学会発表が少ない。今後情報公開と幅広い応用展開を期待したい。

〈問題点・改善すべき点〉

- コモデティーケミカルの場合、研究開発段階で設定目標値を達成したとしても、実用化において生産規模と設備投資が障壁になることが多いので、それを見据えた企業戦略・業界戦略を抽出して、NEDO、JBA で議論して実用化に向けた政策提言に反映させてほしい。特に産業集積のための長期のインフラ整備は、国際競争力に反映される点を考慮してほしい。
- (4)成果の普及
膜利用高効率発酵システムの開発において論文発表は査読付き 1 件と少なく、研究内容に対して適切とは言い難い。また、外部発表も 6 件と少なく、成果の普及や一般への情報発信は今後の課題である。
- それぞれの要素技術が独立に開発されており、要素技術の組み合わせによる優位性発揮にまでは至っていない。また、バイオリファイナリーには非食料バイオマスの糖化が大きなボトルネックとなるが、この要素技術については

基礎段階で未確立の状況に止まっている。今後は非食料バイオマスの糖化プロセスの革新に本プロジェクトで得られた知見が活用されることを切望する。

- 各企業とも多くの研究費を投入している研究テーマであり、それだけ期待されている技術の開発との位置付けである。バイオプロセスはほぼ完成の状況と判断されるが、製造プロセス全体を考えた場合の、前段階および後段階、特に廃棄物処理の問題等も考慮することが必要な時期である。
- バイオリファイナリー技術のテーマとして、「高性能宿主細胞創製技術」や「微生物反応の多様化・高機能化技術」のテーマで得られた優れた成果を採り入れ、本プロジェクト内での共同研究が計画されなかったことは大変残念である。上記内容に関するスケールアップや生産効率化を含めて実用に向けての適用性評価を行うべきであった。
- 2つのテーマにおいて、D-乳酸生産のために異なる微生物生産システムを開発しており、効率的に研究開発が進められたとは言いがたい。連携することにより開発のスピードアップが達成された。
- プロジェクトリーダーの専門性と研究機関の特性が強く発揮された成果であり、特徴的な微生物をもとにバイオマスからのバイオリファイナリー技術を開発しているが、他微生物への展開性が示されておらず特異的な成果であるイメージが強い。また、従来の休止菌体による有用物質生産プロセスと大きな違いはなく、その点の検証が行われれば、他の微生物利用にも波及効果のある成果であった。また、本技術で適用可能な出口として設定した化合物の種類には限度がある。バイオリファイナリーに関しての技術構築には、適用可能な範囲を明確にし、有機合成法との融合なども考慮したハイブリッド型バイオプロセスも検討した方が良い。

〈その他の意見〉

- ・ バイオマス資源に乏しい我が国がバイオリファイナリーで活躍するには、諸外国が考え付かないようなユニークなプロセス技術の開発と総合力の発揮が求められる。本プロジェクトの成果は我が国が誇るプロセス技術と考えられるので、今後どう組み合わせで総合力を発揮するか継続的な検討が必要である。
- ・ ソフトバイオマス糖化技術・増殖非依存型バイオプロセス・トータルシステムの開発における技術の完成には更に研究開発が必要とされ、成果の普及は今後の課題である。
- ・ 特異的な微生物資源をもとにした特徴的な技術であるため、プロセスとしての独自性は高い。バイオリファイナリーとして重要な糖質（カーボン資

源) の供給をどうするかも重要な課題である。国の政策として本技術を活かすインフラを整える必要がある。

2) 実用化の見通しに関する評価

研究成果はそれぞれ出口を明確にしたものであり、実用化への可能性は高い。また、資源循環型のバイオプロセスを強く意識した現代社会のニーズを満足する研究戦略として、国内外に受け入れやすい研究として仕上げられており、今後、連携企業を選抜して実用化を加速してほしい。

しかし、コスト競争力という観点からの解析がまだ不十分である。今後、解析を十分行って、その結果がプロセス改善にフィードバックされて、真に競争力あるプロセス技術へと発展していくことを期待する。

〈肯定的意見〉

- 研究成果はそれぞれ出口を明確にしたものであり、実用化への可能性は高い。また、資源循環型のバイオプロセスを強く意識した現代社会のニーズを満足する研究戦略として、国内外に受け入れやすい研究として仕上げられている。
- 増殖非依存型バイオプロセスに関しては、ライセンスアウトのために法律が整備され、既にいくつかの企業とパイロットスケールでの検討に入っているとのことであり、実用化の見通しは明るい。
膜利用技術は実施企業固有技術の応用なので、実用化イメージは明確である。また、多数の特許出願により参入障壁を造り、優位性を持って事業化を進めることが可能である。
- 増殖非依存型バイオプロセス及びメンブレン利用高効率発酵システムについては実用化イメージもかなり明確になっているが、バイオマス糖化はまだ実用化イメージは描けない段階である。非食料バイオマス糖化から製品化までの一貫したバイオプロセスが構築されれば波及効果も大きくなるので、今後も継続的な検討が望まれる。本プロジェクト自体は基盤的技術を多く含み、大学も参画しているので、研究開発や人材育成に大きな波及効果をもっていた。
- 目標値を達成した課題で、実用化に近いものがあるので、今後、連携企業を選抜して実用化を加速してほしい。先行事例としての実用化を期待する。
- (1)成果の実用化可能性
ソフトバイオマス糖化技術・増殖非依存型バイオプロセス・トータルシステムの開発における増殖非依存型バイオプロセスはバイオ燃料やポリマー原料となる有機材料の生産など実用化・出口イメージは明確であり、計画されたスケールアップを進める一方で企業での検討もされており、研究開発の見通しは確保されている。
メンブレン利用高効率発酵システムの開発では、従来製品を凌駕する品質の乳酸を高効率で生産する技術として実用化イメージ・出口イメージは明確で

あり、計画されたステップに沿った実績を上げており、研究開発が行われる見通しは確保されている。

(2)波及効果

ソフトバイオマス糖化技術・増殖非依存型バイオプロセス・トータルシステムの開発における増殖非依存型バイオプロセスは、特にセルロース系バイオマスを利用したバイオ燃料や有機材料の発酵生産において波及効果が期待できる。

メンブレン利用高効率発酵システムの開発では、高効率な生産を実現する技術として成果の普及や一般への情報発信により、さまざまな発酵生産分野において大きな波及効果が期待できる。

- 本テーマでは、バイオリファイナリー技術として D-乳酸、L-アラニン、L-バリン、キシリトールなどの生産が可能になっているが、当初の目標自体が事業そのものを目的としたものではなく、これらの化合物の生産に関しては実用化への見通しは不明である。

一方、膜利用発酵プロセスや膜利用精製プロセスについては、数種の有用物質の生産への適用性も検討されており、明確な見通しがある。成果の波及効果も大きい。

- ほとんどごみであったバイオマスから有用化学品の効率的生産にメドを付けた点、社会的にも非常にインパクトがあり期待される技術である。膜利用プロセスは、本プロジェクト全体の実用化を推進する可能性を秘めた技術であり、汎用性の研究推進に期待がかかる。

〈問題点・改善すべき点〉

- 増殖非依存型バイオプロセスは RITE 固有の技術を用いてソフトバイオマスからコモディティ化合物を生産するという実用化のイメージは明確である反面、出口が狭く、汎用性に欠ける。膜利用技術との連携によるコストダウンや二次代謝産物合成遺伝子クラスターの導入による高付加価値物質の生産など、関連分野への応用するためのさらなる技術開発を期待する。
- ソフトバイオマス糖化技術・増殖非依存型バイオプロセス・トータルシステムの開発における人工セルロソーム構築では要素技術が有機的に連携するに至っておらず実用化・出口イメージは明瞭でない。
- 従来の膜分離技術との違いを明確にし、本膜利用プロセスの汎用化を図って欲しい。

非食用バイオマスの利用においては、原料ボリュームが大きくなることが予想されることから、原料入手場所と工場立地の関係が問題になる可能性がある。実用化に際しての経済性を考慮した検討が必要である。

- バイオリファイナリー技術に関する本開発項目は、実用あるいは実生産に最も近いところにあるはずだが、当初の目標を達成しても実用あるいは製造に直結する成果とはなっていない。すなわち、当初の目標設定に何らかの問題があった。
- コスト競争力という観点からの解析がまだ不十分である。今後実用化に向けては避けられない問題なので解析を十分行って、その結果がプロセス改善にフィードバックされて、真に競争力あるプロセス技術へと発展していくことを期待する。
- 対象としたサブテーマが多岐にわたり、それらの多様な成果が実用化に要する時間がさまざまな段階にあることから、成果を短期的に実用化するもの、長期的に取り組むものに整理してほしい。その上で、実用化に向けて残された技術課題、環境要因(設備投資など)を抽出整理することで、追加支援や追加プロジェクトの在り方が見えるのではないか。
- 具体的な成果は出ているが、実用化ならびに出口として設定できるイメージに限界がある。その意味で波及効果はそれほど大きくなく、他関連技術との融合化や連携が期待される。

〈その他の意見〉

- ・ ソフトバイオマス糖化技術・増殖非依存型バイオプロセス・トータルシステムの開発における人工セルロソーム構築では幅広い要素技術における研究を展開しているが、全体として成果を統合するには至っていない。今後、成果を統合して大きな展開につながることを期待したい。
- ・ 今回示された成果は、これまで多くの検討がなされてきた研究課題や手法を効果的に連携させて構築したものであり、新規性や特段の革新性は認められないが、関連企業や研究機関の研究展開や戦略立案の参考になる。その意味で波及効果はある。従って、今後他研究機関との連携研究を促進することで本研究成果の実用化が推進されるであろう。

3) 今後に対する提言

ソフトバイオマス糖化技術・増殖非依存型バイオプロセス・トータルシステムの開発において開発した要素技術を有機的に連携させる研究により、世界トップに迫る大きな成果になる。膜利用発酵プロセスや膜利用精製プロセスは、今後の展開が期待できる成果が得られており、実際の工業生産では、スケールをどの程度まで増大させることが可能なかどうか、酵素生産などタンパク質の生産にも有効なのかどうか、など適用性の拡大に向けてのさらなる検討が望まれる。

21世紀の課題である資源循環型プロセスによる持続的社会の構築に大きく貢献すると考えられるバイオリファイナリー技術は、政策的な面からの支援が望まれる。本プロジェクトで開発された要素技術と他のプロジェクトの優れた要素技術を組み合わせ、オールジャパンで競争力のある技術体系を構築すべきであり、NEDOの主導的役割を期待したい。

〈今後に対する提言〉

- ・ コモデティーケミカルの実用化においては、設備投資規模が大きくなるので、個別企業のみならず産業界としての対応や、行政の政策的支援が必要となる。この点は、NEDO・JBA サイドでの支援検討をお願いしたい。
- ・ 非食料バイオマスの糖化技術としては他のプロジェクトでも様々な技術開発が行われている。非食料バイオマスから製品までの一貫したバイオリファイナリープロセスを目指すうえで、本プロジェクトで開発された要素技術と他のプロジェクトの優れた要素技術を組み合わせ、オールジャパンで競争力のある技術体系を構築すべく NEDO が主導的役割を果たすべきである。
- ・ ソフトバイオマス糖化技術・増殖非依存型バイオプロセス・トータルシステムの開発において開発した要素技術を有機的に連携させる研究により、世界トップに迫る大きな成果になる。
メンブレン利用高効率発酵システムの開発の成果として汎用性のある優秀な技術が開発されており、広く技術を普及させることが強く望まれる。
- ・ 非食用バイオマスの活用は、バイオマスの入手先と設備立地の現実的問題を考える必要があり経済性にどう対処していくかが問題の一つであるが、燃料問題は今後益々深刻化する。ゴミの資源化の一つの有力な手段と考える本プロセスの進展に多いに期待したい。
- ・ 膜利用発酵プロセスや膜利用精製プロセスについては、事業担当者の長所が生かされ、今後の展開が期待できる成果が得られている。実際の工業生産では、スケールをどの程度まで増大させることが可能なかどうか、酵素生産などタンパク質の生産にも有効なのかどうか、など適用性の拡大に向けての

さらなる検討が望まれる。また、パイロットプラントでの実証試験も有意義である。

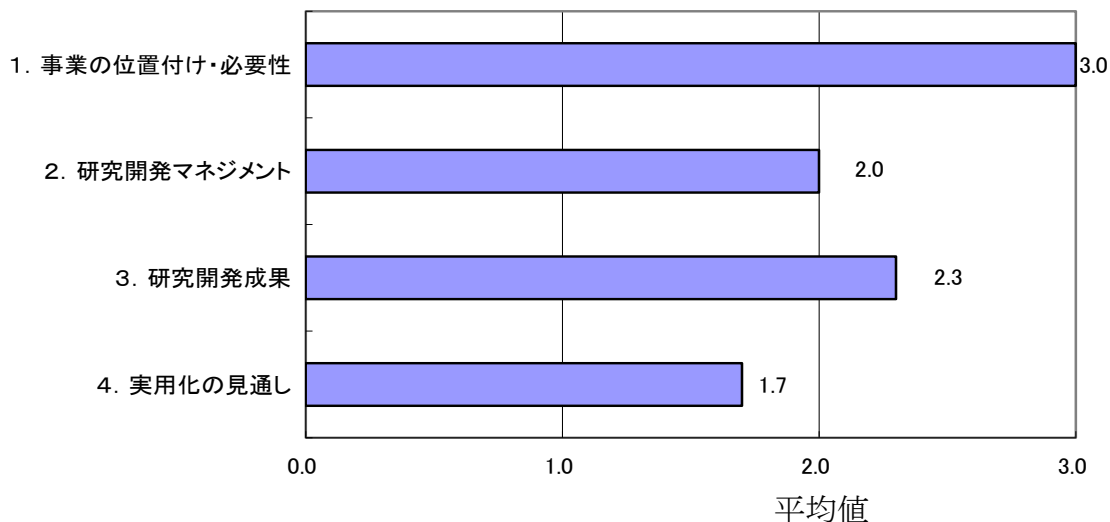
- 21 世紀の課題である資源循環型プロセスによる持続的社会の構築に大きく貢献すると考えられるバイオリファイナリー技術は、政策的な面からの支援を強く求めたい。今回の成果を元に、モノ作り技術に関連する企業や研究機関の強い連携が期待される。また、他の研究グループの成果をこの研究に展開し、その効果を検証することは重要である。
- バイオマスの糖化に関しては、市販の安価なセルラーゼを使用するとのことであるが、依然として高機能性セルラーゼの開発への期待は大きい。セルロソームの異種微生物での発現は興味深く、継続して検討して欲しい。

〈その他の意見〉

- 特定の微生物機能に注目した技術開発が主流であるため、一般化技術としての社会への還元に限界がある。また、対象となる出口化合物についても可能なものとそうでないものとを区別して、本戦略における技術開発目標を明確に設定することが重要である。それは波及効果をもたらすことになる。
- 非増殖型バイオプロセスに関しては、本テーマでは D-乳酸の生産などでコリネ型細菌のみの試験に留まっていた。一方、高性能宿主細胞創製技術の研究では大腸菌ゲノム縮小化株を宿主として D-乳酸の生産が試験されていた。これらの成果を共通基盤として、「非増殖型バイオプロセス」で「大腸菌ゲノム縮小化株を宿主とした D-乳酸の生産」を実施すれば、高効率の生産が可能になるのか興味を持たれる。本プロジェクト内でテーマの壁を越えた共同事業が進められる可能性があっただけに残念である。可能であればこのような共同研究が今後行われることを期待したい。

3. 評点結果

3. 1 プロジェクト全体



評価項目	平均値	素点 (注)							
1. 事業の位置付け・必要性について	3.0	A	A	A	A	A	A	A	A
2. 研究開発マネジメントについて	2.0	B	B	C	B	B	A	B	
3. 研究開発成果について	2.3	A	B	B	B	B	A	B	
4. 実用化の見通しについて	1.7	B	B	C	B	C	B	B	

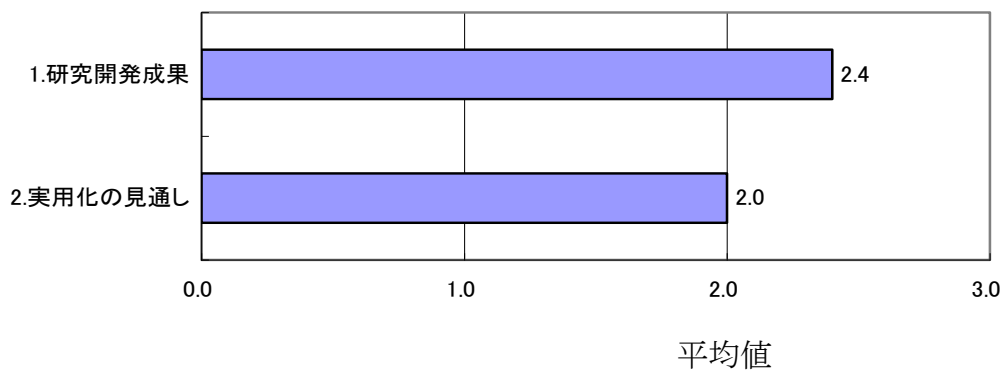
(注) A=3, B=2, C=1, D=0 として事務局が数値に換算し、平均値を算出。

〈判定基準〉

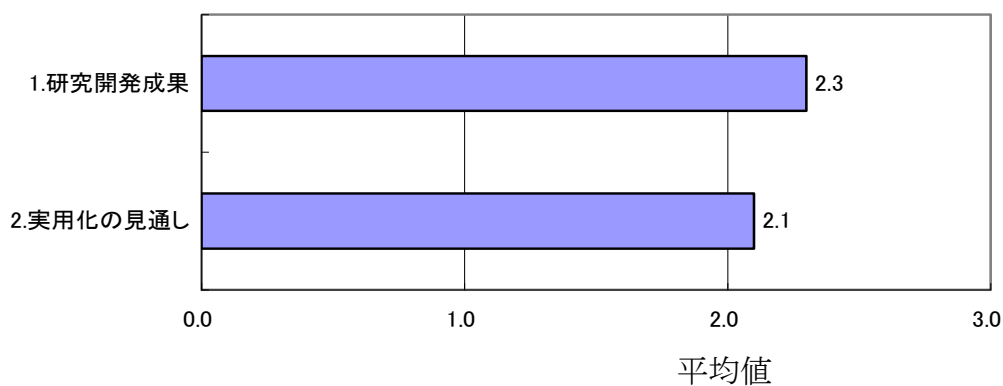
1. 事業の位置付け・必要性について	3. 研究開発成果について
・非常に重要 →A	・非常によい →A
・重要 →B	・よい →B
・概ね妥当 →C	・概ね妥当 →C
・妥当性がない、又は失われた →D	・妥当とはいえない →D
2. 研究開発マネジメントについて	4. 実用化の見通しについて
・非常によい →A	・明確 →A
・よい →B	・妥当 →B
・概ね適切 →C	・概ね妥当であるが、課題あり →C
・適切とはいえない →D	・見通しが不明 →D

3. 2 個別テーマ

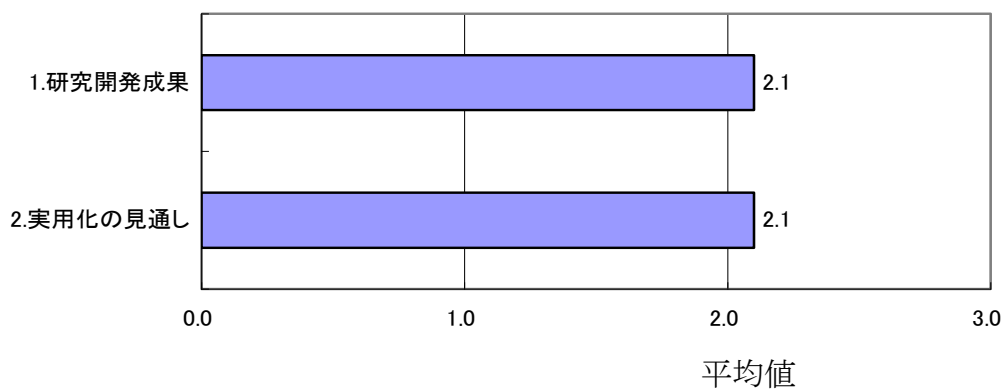
3. 2. 1 高性能宿主細胞創製技術の開発



3. 2. 2 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発



3. 2. 3 バイオリファイナリー技術の開発



個別テーマ名と評価項目	平均値	素点 (注)							
3. 2. 1 高性能宿主細胞創製技術の開発									
1. 研究開発成果について	2.4	A	A	B	B	B	A	B	
2. 実用化の見通しについて	2.0	A	B	C	B	C	A	B	
3. 2. 2 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発									
1. 研究開発成果について	2.3	B	B	B	B	B	A	A	
2. 実用化の見通しについて	2.1	A	B	C	B	B	A	B	
3. 2. 3 バイオリファイナリー技術の開発									
1. 研究開発成果について	2.1	B	B	B	B	A	B	B	
2. 実用化の見通しについて	2.1	B	B	A	B	B	B	B	

(注) A=3, B=2, C=1, D=0 として事務局が数値に換算し、平均値を算出。

〈判定基準〉

1. 研究開発成果について

- ・非常によい
- ・よい
- ・概ね適切
- ・適切とはいえない

2. 実用化の見通しについて

- A ・明確
- B ・妥当
- C ・概ね妥当であるが、課題あり
- D ・見通しが不明

第2章 評価対象プロジェクト

1. 事業原簿

次ページより、当該事業の事業原簿を示す。

「微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発」

事業原簿【公開】

担当部	独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 バイオテクノロジー・医療技術部
-----	--

—目次—

概要
プロジェクト用語集

I. 事業の位置付け・必要性について

1. NEDOの関与の必要性・制度への適合性…………… I - 1
 - 1.1 NEDOが関与することの意義…………… I - 1
 - 1.2 実施の効果(費用対効果)…………… I - 1
2. 事業の背景・目的・位置づけ…………… I - 1

II. 研究開発マネジメントについて

1. 事業の目標…………… II - 1
2. 事業の計画内容…………… II - 2
 - 2.1 研究開発の内容…………… II - 2
 - 2.2 研究開発の実施体制…………… II - 16
 - 2.3 研究の運営管理…………… II - 18
 - 2.4 究開発成果の実用化、事業化に向けたマネジメントの妥当性…………… II - 19
3. 情勢変化への対応…………… II - 19
4. 中間評価結果への対応…………… II - 20
5. 評価に関する事項…………… II - 27

III. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果…………… III - 1
2. 研究開発項目毎の成果…………… III - 14
 - 2.1 高性能宿主細胞創製技術の開発…………… III - 14
 - 2.2 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発…………… III - 100
 - 2.3 バイオリファイナリー技術の開発…………… III - 163
 - 2.4 総合調査研究…………… III - 220

IV. 実用化、事業化の見通しについて

1. 実用化、事業化の見通しについて…………… IV - 1

(添付資料)

- 添付資料 1 イノベーションプログラム基本計画…………… 添付資料 1
- 添付資料 2 プロジェクト基本計画…………… 添付資料 2
- 添付資料 3 技術戦略マップ(分野別技術ロードマップ)…………… 添付資料 3
- 添付資料 4 事前評価関連資料(事前評価書、パブリックコメント募集の結果)…………… 添付資料 4
- 添付資料 5 特許リスト…………… 添付資料 5
- 添付資料 6 論文リスト…………… 添付資料 6
- 添付資料 7 学会シンポジウム(口頭発表)リスト…………… 添付資料 7
- 添付資料 8 プレス発表等…………… 添付資料 8
- 添付資料 9 受賞リスト…………… 添付資料 9
- 添付資料 10 特許数・論文数・プレス発表数リスト…………… 添付資料 10

概要

		作成日	平成23年4月12日				
プログラム（又は施策）名	環境安心イノベーションプログラム						
プロジェクト名	微生物機能を活用した環境調和型製造基盤技術開発／微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発	プロジェクト番号	P06014				
担当推進部/担当者	バイオテクノロジー・医療技術開発部/渡辺章夫（平成18年4月～平成19年3月） バイオテクノロジー・医療技術開発部/大菅康一（平成19年4月～平成20年3月） バイオテクノロジー・医療技術開発部/吉田准一（平成20年4月～平成20年5月） バイオテクノロジー・医療技術開発部/田辺信吾（平成20年6月～平成21年3月） バイオテクノロジー・医療技術開発部/芝上基成（平成21年4月） バイオテクノロジー・医療技術開発部/林耕造（平成21年5月～平成22年3月） バイオテクノロジー・医療技術部/山下恭平（平成22年4月～平成23年4月）						
0. 事業の概要	近年、資源枯渇やCO ₂ 等排出物の環境への影響が懸念されている中、微生物機能を活用した有用物質の生産技術の開発が環境調和型循環産業システムにおける製造技術基盤として必要とされている。本プロジェクトでは、高性能宿主細胞の創製技術、微生物反応の多様化・高機能化技術、及びバイオリファイナリー技術（バイオマスを原料とした高効率生産技術）の開発を通し、バイオプロセスによって効率的に有用物質を生産するために必要な基盤技術を開発することを目的とする。本技術の確立により、エネルギー消費の低減、再生可能な資源であるバイオマスの利用等が達成され、環境調和型循環産業システムへの変革が期待される。						
I. 事業の位置付け・必要性について	本プロジェクトの技術開発は試行錯誤的でリスクの大きい面を持ち合わせているため、民間では開発費用を負担しきれない可能性がある。また、我が国の得意としてきたバイオ産業に欧米の参入の動きが進展しているため、国際競争力を確保し更に高めることが可能な基盤技術開発を国が促進する必要がある。						
II. 研究開発マネジメントについて							
事業の目標	（1）大部分が機能既知となるまでの遺伝子の多重削除により設計どおりに遺伝子改変の効果が引き出される微生物細胞開発及びその機能増強による高性能宿主細胞創製技術の開発 （2）複合酵素系や非水系などにおける反応場制御及び酵素の高機能化による微生物反応の多様化・高機能化技術の開発 （3）草本系ソフトバイオマスの効率的糖化及び高効率糖変換による基幹物質（化学品）の高効率生産体系であるバイオリファイナリー技術の開発、及び （1）（2）の（3）への技術集約によって、環境負荷の少ない微生物機能を活用した高度製造基盤技術を開発する。						
事業の計画内容	研究開発項目	H18fy	H19fy	H20fy	H21fy	H22fy	
	高性能宿主細胞創製						▶
	多様化・高機能化						▶
	バイオリファイナリー						▶
	総合調査研究						▶
開発予算実績額 （単位：百万円）	会計・勘定	H18fy	H19fy	H20fy	H21fy	H22fy	総額
	一般会計	0	0	0	0	0	0
	特別会計（需給）	1,645	1,235	917	892	402	5,091
	総予算額	1,645	1,235	917	892	402	5,091
開発体制	経済産業省 担当原課	産業技術環境局研究開発課、製造産業局生物化学産業課					
	プロジェクトリーダー	東レ株式会社 先端融合研究所 所長 専任理事 京都大学名誉教授 清水 昌					
	サブプロジェクトリーダー	財団法人バイオインダストリー協会 事業企画部長 穴澤秀治 大阪大学大学院工学研究科 大竹久夫 教授 財団法人地球環境産業技術研究機構 理事 湯川英明					
	委託先	（財）バイオインダストリー協会、協和発酵キリン（株）、花王（株）、旭硝子（株）、ダイセル化学工業（株）、メルシャン（株）、日本電気（株）、（株）カネカ、Meiji Seika ファルマ（株）、（独）製品評価技術基盤機構、（財）地球環境産業技術研究機構、東レ（株）、バイオ・エナジー（株）（H19まで）、（株）豊田中央研究所（H19まで）、月桂冠（株）（H19まで）、					

情勢変化への対応	バイオリファイナリー技術開発においては、新エネルギー技術部との連携を図り、実施内容を整理した。	
中間評価結果への対応	グループ間で有用な遺伝子と機能の情報を共有化し、プロジェクトとしての統合的な目標を設定し各グループを連携させるべく、研究者間レベルの合同研究開発委員会及び PL・SPL クラスのテーマ検討会を開催した。	
評価に関する事項	事前評価	平成17年度実施
	中間評価	平成20年8月4日 中間評価分科会 実施
	事後評価	平成23年4月21日 事後評価分科会実施

Ⅲ. 研究開発成果について

1. 事業全体

本事業の研究開発は計画どおり順調に進捗し、最終目標とする事項に対して達成できた。

2. 個別テーマ

(1) 高性能宿主細胞創製

①大腸菌 DGF の研究開発では、野生株と同等以上の生育特性を示す DGF-298 株(ゲノムの 35%削除)の作製に成功した。染色体縮小化株群の ATP 供給能力は、野生株に比べ大幅に向上した。実験的な評価から、残存する削除できない機能未知遺伝子の割合は、目標の 10%以下(3.1%程度)であると結論した。また 4 つの重要機能未知遺伝子の機能解明を完了した。タイリングアレイ解析から、有用プロモーター群を見出した。成果を総合的に活用し、複数の化合物について、既報値を超える生産株育種に成功した。

②枯草菌 RGF の研究開発では、枯草菌細胞において、有用酵素生産に不要な遺伝子領域を 1.5Mbp 削除した株を構築する事に成功した。また、有用酵素分泌生産に関わる制御が窒素および炭素代謝制御により可能である事の特徴とする特異的遺伝子発現制御技術の構築にも成功した。細胞膜・壁の人工改変による溶菌抑制、分泌装置の増強を特徴とするユートリティー機能増強技術の確立に成功した。これらの技術を創製枯草菌 RGF 株(924 株)に適用し、モデル酵素として採用したセルラーゼの生産性をプロジェクト開始時の世界最高値の 2.5 倍向上させる事に成功した。

③分裂酵母 IGF の研究開発では、野性株と増殖性能が遜色ない 657.3kbp の染色体大規模削除株を完成し、この株の異種タンパク質生産性向上をヒト成長ホルモンおよびヒトトランスフェリンをモデルとして確認するとともに、そのメカニズムを解析した。さらに多座組込・誘導発現・分泌強化・糖鎖改良に関する技術開発を終了し、合わせて異種タンパク質生産性向上例を示した。

④発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発(独立行政法人製品評価技術基盤機構)では、高性能宿主細胞 DGF について、網羅的・定量的プロテオーム解析を実施した。結果として、解析対象菌株の代謝変化や有機溶媒耐性機構の解明につながるタンパク質の発現状況を捉えることに成功した。これらの成果は、解析対象菌株の新規バイオプロセスの実現に向けた基礎的なデータとなる。

(2) 多様化・高機能化

①非水系反応場におけるバイオプロセスの構築では、有機溶媒耐性 *K. rhizophila* DC2201 株(以下 DC2201)の発現系の開発、外来酵素遺伝子の発現検討、有機溶媒-水二相系反応場における物質生産検討を実施した。DC2201 の宿主ベクター系を開発し、ニトリラーゼ、不斉還元酵素、補酵素再生系酵素遺伝子の発現に成功した。医薬品中間体として有用な (R)-マンデル酸(RMA)、(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチル(ECHB)の生産に関して検討を行ない、大腸菌と比較して飛躍的に生産性が上がり、蓄積量(RMA 211 g/L、ECHB 355 g/L)も世界最高レベルであった。

②酸素添加酵素の高機能化・多様化技術の研究開発では、進化工学的手法、酵素結晶解析情報による機能改変したビタミンD水酸化酵素遺伝子を育種最適化した放線菌宿主に導入することで現行プロセス変換菌の数倍の STY の向上を達成した。

③酵素反応シミュレーション技術の開発では、構築したシミュレーション技術により一連の酵素反応のメカニズムを解析することが可能になった。本プロジェクトでは、P450 VDH 系に対して基質結合過程、水酸化反応、反応生成物解離過程を含む一連の流れに対するシミュレーションを実施し、反応メカニズムに関する多くの知見を得た。メルシャン社保有の P450 において、新規基質に対する変異部位予測を行い、水酸化反応の副反応を 1/3 に低減することに成功。シミュレーション技術の有効性が示された。

④補酵素再生系を含む複合酵素系による生産プロセスの開発では、複数の酵素の組み合わせや、補酵素の再生系、補欠因子族等を複合して使用する産業用触媒の創製によって、非天然L体アミノ酸類、キラルアルコール類において 100g/Lレベルの、またキラルアミン類、リン酸化糖類、ヒドロキシアミノ酸類、共役脂肪酸類、水酸化脂肪酸類などにおいて 30~50g/Lレベルでの生産が可能な各種の酵素的生産プロセスを開発した。

⑤非天然型抗生物質生産の基盤技術となる人工遺伝子クラスター法の開発では、人工遺伝子クラスター法技術を用いて非天然型抗生物質Bの発酵生産に成功した。その後、種々の生産性向上検討を実施し、約 50 倍に生産性を向上させることができた。その際の生産速度は 175mg/L/D-培養液であり、最終目標をほぼ達成できた。

⑥発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発(独立行政法人製品評価技術基盤機構)では、有機溶媒耐性菌 *R. opacus* B4 株、*K. rhizophila* DC2201 株について、網羅的・定量的プロテオーム解析を実施した。結果として、解析対象菌株の代謝変化や有機溶媒耐性機構の解明につながるタンパク質の発現状況を捉えることに成功した。これらの成果は、解析対象菌株の新規バイオプロセスの実現に向けた基礎的なデータとなる。

(3) バイオリファイナリー

①好気性工業微生物(コリネ型細菌)による高機能セルラーゼ(人工セルロソーム)の生産に成功した。

②酵素再利用法による連続糖化システムを構築、リグニン含有古紙の糖化で糖化率 80%を維持したまま、長時間連続糖化を確認し、糖化酵素コスト大幅低減の可能性を示した。

③糖代謝速度向上、細胞内酸化還元バランスの調整、代謝遺伝子発現レベルの最適化などの要素技術を確立、各種化合物(D-乳酸、L-アラニン、キシリトール、バリン)の高効率生成(10 g/L/h 以上)を示した。

④バイオマス由来混合糖(グルコース、キシロース、アラビノース、マンノース、セロビオース)完全同時利用こいひいを確認し、D-乳酸、キシリトール、バリンの高効率生成を確認した。

⑤膜利用発酵プロセスのパイロットスケール試験装置を開発し、D-乳酸発酵で STY10g/L/h を達成。高純度 D-乳酸が得られる NF/RO 膜を用いた膜利用精製プロセス基本技術を確立した。

	投稿論文	「査読付き」312件、「その他」96件
	特許	「出願済」152件(うち国際出願15件、PCT出願26件)
	その他の外部発表 (プレス発表等)	701件
IV. 実用化、事業化の見通しについて	<p>(1) 高性能宿主細胞創製</p> <p>①大腸菌DGFの研究開発では、作製した染色体縮小化株群は自社での利用以外にも他社へのライセンスアウトを交渉中である。また更に活用範囲を広げるため、アカデミアのグループへの分与を計画中である。2～3年後には、実用化の具体的な事例が出てくるように普及活動に努めている。実用化の事例がでてくれば、そこから2年以内には事業化に結びつくものと考えている。</p> <p>②枯草菌 RGF の研究開発では、得られた高機能性宿主細胞を用いて、セルラーゼ、プロテアーゼなどの産業用酵素ならびに異種生物由来蛋白質の微生物工業生産技術を確立し、経済的生産性アップとコストダウンを実現する。また、得られた研究成果は国内外の学会発表及び論文発表として公開し、条件が合えば幅広くライセンスアウトし、実用化を加速する。</p> <p>③分裂酵母 IGF の研究開発では、旭硝子における異種タンパク質生産受託ビジネスへのIGF宿主ならびに技術の提供、および社外への積極的なライセンスアウトを行う。また公的・民間菌株分譲機関を活用し、宿主ならびに周辺ライブラリーを恒久的に保管・分譲し、かつ同様の技術移転機関を活用し、開発成果の普及を図る。</p> <p>④発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発(独立行政法人製品評価技術基盤機構)では、高性能宿主細胞 DGF は、代謝変化により、効率的な増殖を行うことで製薬分野における利用が推進される。</p> <p>(2) 多様化・高機能化</p> <p>①非水系反応場におけるバイオプロセスの構築では、有機溶媒耐性 <i>K. rhizophila</i> DC2201 に各種の反応を触媒する酵素遺伝子を導入することによって有機溶媒反応場で難水溶性化合物を原料にした医薬品中間体等の生産を3～5年後の実用化を目指して、検討して行く。</p> <p>②酸素添加酵素の高機能化・多様化技術の研究開発では、プロジェクトで達成した成果をビタミンD類水酸化体の製造に活用を検討するほか、独自に保有するP450水酸化酵素遺伝子ライブラリーを活用して、同様な開発手順で医薬としての新たな有用水酸化化合物の製造開発の展開を図ってゆく。</p> <p>③酵素反応シミュレーション技術の開発では、将来的には、製薬企業や化学関連企業に向けた解析サービスやコンサルティングが事業として有望であるが、まずは、弊社内での実用化を検討する。具体的には、自社内で事業化に向けて研究開発を行っている抗体や酵素を利用した分子センサの高度化に利用する。</p> <p>④補酵素再生系を含む複合酵素系による生産プロセスの開発では、非天然アミノ酸生産プロセス等の実用化レベルに達した生産プロセスについては、プロジェクト終了後数年以内での工業規模使用に向けて、製品の市場調査とコスト評価、及び技術導入時の経済的妥当性の検証を進め、必要に応じて製品化や設備取得に向けた工業化技術検討に移行する。</p> <p>⑤非天然型抗生物質生産の基盤技術となる人工遺伝子クラスター法の開発では、非天然型抗生物質Bの培養生産性についてはほぼ目標を達成し実用化可能なレベルにある。一方、実用化のためには、本物質が新規物質であるため培養液からの精製プロセスの開発が必要である。また、本物質は医薬品原体の合成中間体として利用されるため、合成工程への適用確認、得られた原薬の不純物プロファイル等の確認も必要である。</p> <p>⑥発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発(独立行政法人製品評価技術基盤機構)では、有機溶媒耐性株の非水系バイオプロセス中の酵素の発現状況が判明。物質変換可能な反応系が見いだされた。非水系バイオプロセスによる物質変換系が可能となった。</p> <p>(3) バイオリファイナリー</p> <p>①国内企業との共同により増殖非依存型バイオプロセスによる各種化学品・燃料の工業化研究を開始した。</p> <p>②本技術の実用化、事業化促進のため、有機酸以外の有用物質製造への適用実証、実用システム構築に重要な発酵・精製システムの運転技術開発、および汎用発酵システムとしての既存発酵システムとの優位性の明確化を行うことにより、高効率な微生物発酵プロセスの実用化・事業化に目処をつける。</p>	
V. 基本計画に関する事項	作成時期	平成18年1月、制定
	変更履歴	平成19年2月改訂、対象物質範囲拡大のため研究開発の目標の最終目標および達成目標の改定。 平成20年7月改訂、イノベーションプログラム基本計画の制定により、「(1)研究開発の目的」の記載を改訂

プロジェクト用語集

用語	用語の解説
A-factor	Streptomyces griseus からストレプトマイシン産生を制御する物質として発見されたもので、放線菌による抗生物質の生産を調節する低分子ホルモン研究の先駆けとなった物質
CASSCF 法	Complete Active Space Self Consistent Field。シュレーディンガー方程式の解法のひとつ。鉄などのスピンの複雑な反応系を高精度で扱えて強力だが、計算量が大規模である。
DFT 法	Density Functional Theory(密度汎関数法)。シュレーディンガー方程式の解法のひとつ。電子相関を取り込むエネルギー項に工夫があり、高い計算精度を比較的少ない計算量で達成できる。
error-prone PCR 法	エラープローン PCR 法の項に記載。
GFP 遺伝子	Green Fluorescent Protein(緑色蛍光タンパク質) 遺伝子
IS	インサーショナルシーケンス。長くても 2 kbp の転移する DNA 配列であり、染色体上の転移に必要なトランスポゼース(transposase) 遺伝子の両端にトランスポゼースが結合する配列を有している。栄養飢餓状態などで活性化し、複製して、染色体上の他の位置に挿入し、変異を引き起こす。
Latour 法	染色体上の特定の領域を、外来の配列を残存させずに削除する方法。特に長い領域を削除するときの効率が高い。分裂酵母において最初に開発されたが、糸状菌や担子菌での応用例が近年増えている。
LB 培地	トリプトン、酵母エキス、塩化ナトリウムを基本処方とする細菌用富栄養培地の一種
MD 法	Molecular Dynamics(分子動力学)。分子系を Newton の運動方程式に従って動かして熱的に揺らがせ、安定構造やダイナミクスを計算で調べる。通常は分子力学モデル(バネ・ビーズ)を使用する。
ORF	open reading frame。ゲノム上に存在するタンパク質の翻訳位置をいう。ゲノム上ではタンパク質の N 末端方向から翻訳される。タンパク質の N 末端からアミノ酸配列を解析することで、ゲノム上の翻訳開始位置を知ることができる。
PDI	Protein Disulfide Isomerase。適切な酸化還元剤存在下で、タンパク質のジスルフィド結合による架橋の組換えを促進する酵素。遺伝子組換えで生産されたタンパク質は、本来のジスルフィド結合が形成できずに不活性型になる場合が多いため、本酵素を用いてジスルフィド結合を正しくか

	け換えることで、タンパク質の高次構造形成と機能の発現が促進されると推定されている。
PTS	phosphoenolpyruvate-carboxylate phosphotransferase system。細菌に広く保存されている主要な糖類取り込み機構。解糖系の中間代謝物である phosphoenolpyruvate からのリン酸基転移と共役してグルコース、フルクトース、スクロースなどが取り込まれる。
SD 配列	Shine-Dalgarno sequence。原核生物の mRNA において、開始コドンの上流に見られる共通配列。5' 側に存在しリボソームの結合部位。ここにリボソームが結合することで、遺伝子の翻訳が進む。
アラニンスキャンニング	活性中心近傍のアミノ酸残基をアラニン残基に置換した変異体の活性を評価し、分子機能にとって重要な残基か否かを判断するツール。活性が低下した場合は活性発現に重要な残基であり、置換は好ましくないと推測できる。
イメージング質量分析計	TOF-SIMS。イオン照射により物質の表面から発生させた二次イオンの質量スペクトルから、材料表面の化学種が極微量 (ppm オーダー) の面分解能で得られる。表面の原子や分子を同定し、キャラクタリゼーションを行う。
エドマン分解法	プロテオーム解析に用いるタンパク質同定法の一つ。タンパク質を化学的に処理して N 末端方向から一つずつアミノ酸を生成させる。反応を繰り返すことでタンパク質のアミノ酸配列を測定する。
エラープローン PCR 法	試験管内で特定の遺伝子を進化させて高機能化を図る進化工学の手法の一つで、DNA ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の DNA 増幅時に複製の厳密度の低い条件を選択することにより塩基の変異を導入する方法
エンドスタチン	内因性の抗血管新生ペプチドで、内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成を阻害する。その構造は、XVIII 型コラーゲンの C 末端フラグメントである。
オペロン	複数の遺伝子からなる単一の転写単位。原核生物において、機能的に関連性がある複数の遺伝子が、単一の転写単位を構成することにより合理的な調節を可能にしている。
オリゴ糖	単糖類同士がグリコシド結合によって結合した化合物の中で、多糖類というほどは分子量が大きくないものを指す。
グローバルレギュレーター	複数の異なる代謝系・細胞機能遺伝子群の発現制御に関わる単一 (システム) の因子。
コンピテントセル	形質転換受容性細胞。外来 DNA を細胞内に取り込める状態の細胞。
コンビナトリアル生合成技術	生物の代謝産物の生合成に関与する酵素を組み合わせることにより、人工的にデザインされた新しい化合物を生合成させる技術
ジオキシゲナーゼ	分子状酸素を基質に二原子の酸素をもう一方の基質に化合させる反応

	を触媒する酵素。 α -ケトグルタル酸を補因子とするものがある。
シグマ因子	遺伝子転写開始信号(プロモーター)を認識し RNA 合成を開始させるのに必要なタンパク質因子。同一生物種で様々なタイプのプロモーターを認識する複数の種類のシグマ因子が存在し、それぞれが RNA ポリメラーゼと結合して特定の遺伝子転写調節に関わる。
シトクロムP450モノオキシゲナーゼ	様々な有機化合物に一原子酸素を添加することによる水酸化やエポキシ化等の反応を触媒するヘム酵素群。微生物から植物、高等生物まで広く分布し、天然物、ホルモン合成、薬物代謝、解毒等にかかわる。酵素種や機能に広範な多様性をもつことで産業利用上でも注目されている。高コレステロール血症治療薬プラバスタチンは放線菌の本酵素による水酸化プロセスを経て生産されている。
シャペロン	タンパク質の立体構造形成(フォールディング)が困難な環境下で、タンパク質のフォールディングを援助する一連のタンパク質の総称。原核生物では、主に GroE システムと DnaK システムが知られている。
ショットガン法	プロテオーム解析に用いるタンパク質処理の一つ。混合タンパク質を消化酵素で分解し、含有するタンパク質に固有のペプチドを生成させる。後で生成したペプチド断片を分離し、アミノ酸配列を測定してタンパク質を同定する。
スーパーオキシドジスムターゼ	スーパーオキシドアニオンと水素イオンを反応させ三重項酸素と過酸化水素を生成する反応を触媒する酵素。活性の中心の金属によって、Cu/Zn-, Fe-, Mn-SOD がある。
ステレオコンプレックス PLA	ポリ L-乳酸とポリ D-乳酸を混合し、結晶化した樹脂。ポリ L-乳酸あるいはポリ D-乳酸単独より融点を 50°C 程度向上することができ、PLA の課題とされる耐熱性を改善することができる。
ステレオブロック PLA	PLA1分子中に L-乳酸セグメントと D-乳酸セグメントをブロック状に配置した共重合体。ステレオコンプレックス同様、L 体あるいは D 体単独の PLA と比較して耐熱性を向上することができる。
セルラーゼ	セルロースなどの β -1,4-グルカンの β -1,4-グルコピラノイド結合を加水分解する酵素。植物、菌類、細菌など生物界に広く存在する。衣料用洗剤添加、バイオマス糖化、繊維処理などに有用である。Endo 型のエンドグルカナーゼや Exo 型のセロビオハイドラーゼなどが含まれる。
セルロース	分子式 $(C_6H_{10}O_5)_n$ で表される炭水化物(多糖類)である。植物細胞の細胞壁および繊維の主成分で、天然の植物質の 1/3 を占め、地球上で最も多く存在する炭水化物である。自然状態においてはヘミセルロースやリグニンと結合して存在する。
セルロソーム	セルラーゼ、キシラナーゼ等、多種類の多糖分解酵素と骨格タンパク質

	との高次構造複合体。絶対嫌気性細菌の <i>Clostridium</i> 属細菌等の細胞表層に見出され、高いセルロース分解活性を示す。
タイリングアレイ	タイリングアレイとは、解読済みのゲノムデータから等間隔に(タイル状に)抜き出した塩基配列を検出用プローブとして搭載した DNA チップのことである。タイリングアレイを用いた転写解析では、原理的にはゲノムから転写されたすべての RNA を検出することが可能である。
タイリングアレイ	ゲノム塩基配列情報をもとに、高密度に設計されたプローブを用い作製されたマイクロアレイ。転写解析では、転写単位の同定や未知の遺伝子、低分子 RNA の探索を行うこともできる。また、転写因子など DNA 結合タンパク質の結合部位の特定にも用いることができる。
トキシン-アンチトキシン	活性化すると細胞活動を阻害するトキシンタンパクと、そのインヒビタータンパク(アンチトキシン)からなるタンパクペアである。ストレス状態下で、アンチトキシン不活化によるトキシンタンパク活性化がおきて、細胞を死滅させることも報告されている。通常二つのタンパクをコードする遺伝子はオペロンを形成している。大腸菌には少なくとも 8 つのトキシン-アンチトキシン遺伝子ペアが存在している。
ドッキング法	化合物と標的タンパク質の複合体構造が不明や曖昧な場合に、化合物の大凡の配座を予測する計算手法。エネルギー的安定性や類縁タンパク質の複合体情報を活用する。
トランスクリプトーム	生物の細胞中に存在する全ての RNA の総体を指す。実際には DNA マイクロアレイを用いることによって、様々な条件下における転写された個々の RNA の動態の解析を示す。
トランスポゾンTf2	トランスポゾンは転位性の遺伝因子として知られており、真核生物のゲノムのかかなりの部分を占めている。分裂酵母の染色体上に 13 個存在している Tf2 と呼ばれるトランスポゾンは、CENP-B 相同体によって構成される核内構造の働きで、その機能が停止させられている。
ナノろ過膜	1nm前後のサイズをもつ分子の除去に用いる分離膜。限外ろ過膜と逆浸透膜の中間に位置し、分離対象は分子量数百までの低分子有機物質、マグネシウム、蒸発残留物などである。
ビタミンD水酸化酵素(Vdh)	<i>Pseudonocardia autotrophica</i> から精製された酵素で、ビタミンD3の1 α 位および25位を水酸化して活性化ビタミンD3を生成する。反応に空気酸素と電子伝達系を必須とするシトクロムP450モノオキシゲナーゼの一種
ヒト血清トランスフェリン(hTF)	鉄と結合する分子量 75,000 の糖タンパク質。血清中に存在する分子の1/3が鉄と結合している。鉄は1分子に2個と結合する。ジスルフィド結合が20か所、N-結合型糖鎖付加部位が2か所、分子内に存在する。
ヒト成長ホルモン(hG)	下垂体前葉で生産される成長促進作用を持つペプチドホルモン。191ア

H)	ミノ酸よりなり、分子量 22,000。2 か所のジスルフィド結合が存在する。血中濃度は 5ng/ml 以下、半減期 20 分。糖鎖修飾はされない。
プロテオーム解析	生物や細胞に発現している全てのタンパク質の集合をプロテオーム (proteome) という。細胞に含まれるタンパク質を網羅的に発現状況や性質を研究することをプロテオーム解析という。プロテオミクス (proteomics) ということもある。
プロモーター	プロモーターとは、転写開始に関与する DNA 上の特定領域のことで、バクテリアでは遺伝子の 5' 上流側に近接して存在する。この領域に RNA ポリメラーゼが結合し、転写が開始される。またプロモーター周辺には転写強度やタイミングを制御するレギュレーターとの結合領域が存在することも多い。
ペプチドマス・フィンガープリント法	プロテオーム解析に用いるタンパク質同定法の一つ。タンパク質を消化酵素で分解すると、アミノ酸配列の特定の部位で分解され、タンパク質に固有のペプチドが生成することを利用してタンパク質を同定する。
メタゲノム手法	微生物を分離・培養することなく、土壌や活性汚泥、海水などの環境サンプルから多種多様な微生物ゲノムの混合 DNA を抽出し、DNA ライブラリーを作製して、酵素活性や特定の遺伝子配列を指標に目的の遺伝子を分離する手法
メタボローム	細胞・組織・器官・個体の代謝産物を網羅的に測定し、個々の代謝物の動態を調べる。これら代謝産物はタンパク質、RNA などを介してネットワークを形成する。このネットワークの総体をバイオインフォマティクスの手法を用い研究を行う。
モバイルエレメント	染色体上への挿入や、脱離を行う DNA 配列のことを示す。溶原化ファージやインサーショナルシーケンス (IS)、トランスポゾンなどが含まれる。モバイルエレメントが活性化すると、染色体への組込み、染色体からの離脱などが生じて、遺伝形質が不安定化する。
ラセミ体	光学活性化合物の2種類の鏡像異性体 (エナンチオマー) が等モル混合した状態の化合物をいう。光学活性化合物のもつ性質である旋光性を示さない。
リパーゼ	トリグリセリドを分解する加水分解酵素。油脂の改変や衣料用洗剤添加で使用される他、エステル合成や光学分割剤に使用される。
リボスイッチ	mRNA の 2 次構造変化により転写調整を行う制御機構構造のひとつ。主に、mRNA の 5' UTR に位置し、直接リガンドと結合して遺伝子の転写終結や翻訳を制御する。
亜臨界水	水の温度・圧力を 374°C、22MPa 以上まで上げると、水 (液体) でも水蒸気 (気体) でもない状態となる。この点を水の臨界点といい、臨界点より上

	の領域を超臨界水と呼ぶ。臨界点よりもやや低い近傍の領域を亜臨界水と呼ぶ。
遺伝子クラスター	機能の関連した遺伝子が遺伝子群として染色体上で隣接して存在する場合、このような遺伝子群のことを遺伝子クラスターと呼ぶ。特に、抗生物質の生合成に関わる遺伝子群はクラスターを形成していることが多い。
逆浸透膜	濃厚溶液側に浸透圧以上の圧力を加えることにより、溶媒だけを希薄溶液側に移動させ、溶媒と溶質を分離するために使用する分離膜。分離対象は分子量数十から数百程度の低分子量物質やイオンである。
共役リノール酸	リノール酸の異性体のうち、炭素－炭素間の二重結合が2個共役した形の部分構造をもつ不飽和脂肪酸で、反芻動物の消化管内で微生物が産生する。抗癌効果、抗肥満効果、免疫賦活作用などがあるとされている。
光学活性	右手と左手の関係のように成分は同じなのに対称的な構造を持つ2種類の化合物のうち、一方の化合物(エナンチオマー)をいう。アミノ酸や糖などの生体成分の多くは光学活性であり、各々のエナンチオマーの生体内における性質は異なる場合が多い。
進化工学的手法	タンパク質(ここでは酵素)の機能向上を目的として、それをコードする遺伝子に対し、1.多数のランダム変異体の調製、2.簡便な機能アッセイ、3.所望の機能をもつ変異点の同定といった一連の操作を繰り返し、さらに有効変異の最適化、統合の結果、高機能化タンパク質を獲得する実験的手法
進化分子工学	変異、選択淘汰、増幅の3つの単位操作を繰り返すことで、生物進化(自然淘汰)を試験管内で人為的に加速させる手法であり、変異タンパク質ライブラリーから目的の機能を有する個体のみを効率的に選抜する方法
増殖非依存型バイオプロセス	RITE 提案の新規プロセス。菌体を反応槽に高密度充填し無通気で反応させることで、細胞増殖非依存的に糖変換を行う。コリネ型細菌が還元条件下で増殖を停止しながら高い糖代謝活性を維持する性質を利用している。
糖化	糖の高分子ポリマー(例えば、セルロース)を酵素(セルラーゼ)や化学薬品(酸)で分解し、グルコースなどの単糖あるいはオリゴ糖にまで分解すること。
発酵阻害物質	セルロース系バイオマス酵素糖化の前処理過程で、過分解により生じるアルデヒド類、フェノール類、有機酸などで、発酵プロセスを阻害する物質。該バイオマス利用技術開発の大きな障壁となっている。
反応場	触媒(ここでは酵素)を用いて基質物質から目的の生産物に変換する反応において酵素、基質、生産物の局在、アクセス・反応様式、濃度、機能因子、促進因子等からなる反応制御因子が作用する場の総称を言う。反

	応槽、細胞、タンパク質レベルでの観点がある。
補酵素	酵素の蛋白質部分(アポ酵素)と可逆的に結合して酵素の作用発現に寄与する補欠分子族のこと。ふつうアポ酵素のみあるいは補酵素のみでは活性をもたないが、両者が結合すると複合体を形成し酵素作用を示すようになる。
無細胞タンパク質合成	cell-free protein synthesis system。生細胞を用いずに、細胞内の転写・翻訳に関わる因子を利用して試験管内でタンパク質合成を行う方法

I. 事業の位置付け・必要性について

1. NEDO の関与の必要性・制度への適合性

1.1 NEDO が関与することの意義

微生物を利用した物質生産技術は伝統的に我が国の得意としてきた領域であるが、米国では微生物のゲノム解析等を精力的に進めており、欧州では White biotechnology として環境負荷の少ない生物を利用した工業プロセスを活用する動きが進展している。そこで、本分野の国際的な優位性を確保し更に高めるために、ゲノム情報等の最新の知見を適用した基盤技術の開発を強化・発展させる必要がある。

本事業の技術開発は複雑かつ基盤的であるが故に、試行錯誤的でリスクの大きい面を持ち合わせているため、民間企業等単独では実施することが困難である。従って、NEDO が積極的に関与する必要があると考えられる。

1.2 実施の効果(費用対効果)

本事業により得られる高度製造基盤技術により、バイオプロセスを利用した化学品や医薬原料など有用物質の生産の拡大やエネルギー消費の低減、再生可能資源であるバイオマス利用など、環境調和型循環産業システムへの変革が期待でき、実現した場合の波及効果は製造産業全般に及ぶ。

研究開発項目毎の予算配分は以下の通りである。

表 1.2.1 研究開発項目毎の予算実績（単位：百万円）

研究開発項目	H18fy	H19fy	H20fy	H21fy	H22fy	計
高性能宿主細胞創製技術	304	275	188	182	82	1,031
多様化・高機能化技術	430	340	279	251	113	1,413
バイオリファイナリー技術	879	594	429	439	198	2,539
総合調査研究	32	27	21	20	9	109
計	1,645	1,235	917	892	402	5,091

2. 事業の背景・目的・位置付け

2.1 事業の背景・目的

微生物を利用した工業原料等有用物質の製造プロセスは、一般に原油に由来しない原料を使用し、廃棄物も少ないといった特徴を有している。このため、近年、資源枯渇や CO₂等排出物の環境への影響が懸念されている中、微生物機能を活用した有用物質の生産(バイオプロセス)技術の開発が環境調和型循環産業システムにおける製造技術基盤として必要とされている。こうした中で政府は、次項に記す通り、生物機能を活用した物質生産の発展の重要性を示している。他方、微生物を利用するバイオプロセス技術については、我が国は伝統的に強みを有するもの

の、米国では微生物のゲノム解析等を精力的に進めており、欧州では White biotechnology として環境負荷の少ない生物プロセスを活用する動きが進展している。このため、我が国の強みを一層強化するとともに、微生物機能を活用した有用物質の製造技術基盤の開発を強化・発展させる必要がある。

このような背景の下、本事業では、高性能宿主細胞の創製技術、微生物反応の多様化・高機能化技術やバイオマスを原料とした高効率生産技術(バイオリファイナリー技術)の開発を通し、バイオプロセスによって効率的に有用物質を生産するために必要な基盤技術を開発することを目的とする。

本技術の確立により、エネルギー消費の低減、再生可能な資源であるバイオマスの利用等が達成され環境調和型循環産業システムへの変革が期待される。

2.2 科学技術基本計画および分野別推進戦略

ライフサイエンス分野は、第2期科学技術基本計画(2001年3月閣議決定)および第3期科学技術基本計画(2006年3月閣議決定)において、国家的・社会的課題に対応した研究開発の重点推進分野とされている。

第2期分野別推進戦略(2001年9月総合科学技術会議)においては「生物機能を高度に活用した物質生産・環境対応技術開発」が重点領域に位置付けられ、バイオプロセスによる有用物質生産技術の競争力強化のためには、ゲノム情報やバイオインフォマティクス等のゲノム関連技術を活用し、生物の持つ多様な機能を高度に活用する必要があると謳われている。また、第3期分野別推進戦略(2006年3月総合科学技術会議)においても、戦略重点科学技術のひとつとして「生物機能活用による物質生産・環境改善科学技術」が選定されている。

2.3 生物機能活用型循環産業システム創造プログラム／環境安心イノベーションプログラム

経済産業省では、研究開発プロジェクトを政策目標ごとに分類し、成果の市場化に必要な関連施策(規制改革、標準化等)と一体的に推進することを目指して、平成13年度より「研究開発プログラム」制度を導入している。

そのひとつである「生物機能活用型循環産業システム創造プログラム」は、工業プロセスや環境関連分野へのバイオテクノロジーの利用を促進することにより、生物機能を活用した高度ものづくり社会の構築を図りつつ、廃棄物、汚染物質等の生分解・処理技術の高度化を通して、環境に調和した循環型産業システムの創造を図るものである。

本事業は上記プログラムの一環として、微生物機能を活用した環境負荷の少ない高度製造基盤技術を開発するものとして立案された。

なお、17件策定されていた研究開発プログラムは、平成20年4月に再編され7件となった。これに伴い、上記プログラムは「地球温暖化防止新技術プログラム」、「3Rプログラム」および「化学物質総合評価管理プログラム」と統合され、「環境安心イノベーションプログラム」と改称された。

また、本事業はエネルギー需給構造の高度化への寄与という観点から、総合エネルギー効率

の向上や新エネルギーの開発等を掲げた「エネルギーイノベーションプログラム」にも再掲されている。

II. 研究開発マネジメントについて

1. 事業の目標

1.1 事業全体の目標

(最終目標)

高性能宿主細胞創製技術については、大部分が機能既知となるまでの遺伝子の多重削除により、設計どおりに遺伝子改変の効果が引き出されるように恒常性維持機能を低減させた微生物細胞への特異的遺伝子発現制御機能付与及び補酵素供給等のユートイリティー（主要代謝系補助）機能増強によって、プロジェクト開始時における世界最高値の2倍以上の生産性を達成する。

微生物反応の多様化・高機能化技術については、複合酵素系や非水系などにおける反応場制御技術の開発と、遺伝子改変等による酵素の高機能化技術の開発を行い、既にバイオプロセスにより生産できることが知られている物質については STY (Space/Time/Yield: 反応容器の時間あたりの生産量) 数 g/L/h 以上、バイオプロセスによって生産できることが知られていない物質についてはその10分の1以上（医薬品等の高付加価値品については実用化に十分な STY の数倍以上）の生産を行うことにより、バイオプロセスの実用化適用範囲を拡大する。

バイオリファイナリー技術については、草本系のソフトバイオマスについて、原料濃度 10% にて 1 日で 90% の糖化を行える技術を開発する。また、糖から新たに6種の基幹物質を STY10g/L/h 以上で継続的に生産することのできる技術を開発する。これにより実用的に利用可能なバイオマスを原料として高効率で糖化し、各種化成品等生産のための基幹物質を、生成した糖から高効率で生産するバイオプロセス体系を開発・構築する。

これらの研究開発によって、環境負荷の少ない微生物機能を活用した高度製造基盤技術を開発する。

(中間目標)

平成 20 年度末までに、以下のことの達成を目標とする。

高性能宿主細胞創製技術については、物質生産性の向上するゲノム改変例を示す。微生物反応の多様化・高機能化技術については、実用化に向けた手法を確立し、その実証例を示す。バイオリファイナリー技術については、糖化効率達成に向けての見通しを示し、糖からの STY10g/L/h 以上で3種の基幹物質を継続的に生産する新規な実例を示す。

2. 事業の計画内容

2.1 研究開発の内容

上記目標を達成するために、以下の研究開発項目について、研究開発計画に基づき研究開発を実施する。

2.1.1 高性能宿主細胞創製技術の開発

遺伝子の大部分が機能既知となるまでの遺伝子の多重削除により、遺伝子強化・削減の効果が設計どおりに最大限に引き出されるように生物のもつ恒常性維持機能を低減させ、さらに、遺伝子発現制御機能付与及び補酵素供給等のユーティリティー機能増強によって物質生産に最適化された高性能宿主を創製する。

(1) 特異的遺伝子発現制御技術

システムバイオロジー技術の利用や遺伝子機能解明等に基づき、増殖から物質生産への切り替えや代謝フラックスの切り替え等の生産性向上に寄与する特異的遺伝子の発現制御技術を開発する。

(2) ユーティリティー機能増強技術

補酵素供給機能増強やオルガネラ機能増強など、物質生合成速度向上につながる機能を付与した宿主細胞を開発する。

2.1.2 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発

バイオプロセスの実用化適用範囲と有用性拡大のための微生物反応の多様化・高機能化として以下の研究を行う。

(1) 反応場制御技術の開発

取り扱い・制御の難しさから実用化の遅れている複合酵素系や、化成品の生産には適しているが酵素反応の難しかった非水系などの反応場について新規酵素のスクリーニング・人為的複合酵素系構成等の制御技術の開発を行い、バイオプロセスの適用範囲の拡大を行う。

(2) 酵素の高機能化技術の開発

極限微生物の遺伝子や進化工学の利用等の酵素の高機能化にとって重要と考えられる技術により、酵素の基質特異性の改変や耐熱性の獲得・向上等を行い、酵素の活性、効率、安定性等における高機能化を行う。

2.1.3 バイオリファイナリー技術の開発

実用的に利用可能なバイオマス为原料とし、それから生産される糖、さらに糖から各種化成品等に至る過程にある基幹物質を、主にバイオプロセスで生産する総合的生産体系を開発・構築するために以下の研究を行う。

(1) バイオマス糖化技術の開発

リグニン含量の少ない草本系のソフトバイオマス等のバイオプロセスによる糖化技術を確立す

る。

(2) 高効率糖変換技術の開発

バイオマスから生産される糖を原料に、各種化成品等を製造するための一連の基幹物質（C3からC6の有機酸等）を生産することが可能で、且つ STY が高い実用的な総合的バイオプロセス技術の開発を、増殖非依存型バイオプロセスの利用などにより行う。

2. 1. 4 個別研究テーマの計画内容の詳細

2. 1. 4. 1 高性能宿主細胞創製技術の開発

以下の研究開発を実施する。

①大腸菌DGF (Designed Genome Factory) の研究開発 (協和発酵キリン株式会社)

②枯草菌RGF (Refined Genome Factory) の研究開発 (花王株式会社)

③分裂酵母高性能宿主細胞創製技術の研究開発 (旭硝子株式会社)

④発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発

(独立行政法人製品評価技術基盤機構)

①大腸菌DGFの研究開発 (協和発酵キリン株式会社)

平成13～17年度まで実施された「生物機能を活用した生産プロセスの基盤技術開発」においては、大腸菌K-12株を出発材料として、不要・有害遺伝子の削除を中心とした染色体の大規模加工を行い、より機能性の高まった宿主細胞(ゲノム縮小MGF株)を作製した。本研究開発では、MGF株を出発材料としてさらなる染色体大規模加工を行い、より高性能な宿主細胞を作製することを目的とする。具体的な目標としては、野生株とほぼ同等の生育特性を示し、かつ2.8 Mbp長以下の染色体を持つ株を構築する。遺伝子機能解析を進め、縮小化染色体上の排除不可能な機能未知遺伝子の割合が全遺伝子の10%程度にまで減らす。染色体縮小化株の加工・改良を進め、ユーティリティー供給機能を強化する。また物質性生産系の精密な発現制御が行えるシステムを構築する。これらを統合化して、プロジェクト開始時の世界最高値の2倍以上の物質生産性が発揮できる技術開発を行う。

②枯草菌RGFの研究開発 (花王株式会社)

枯草菌細胞において、細胞増殖とタンパク質分泌生産に関わる基本遺伝子セットを有し、タンパク質分泌生産に関わる制御がプロモーター改変や低分子RNA等により可能であることを特徴とする特異的遺伝子発現制御技術、並びに細胞膜・壁の人工改変、翻訳装置の専有化、分泌装置の増強および集約化、代謝活動の持続及び細胞溶解阻止を特徴とするユーティリティー機能増強技術を確立する。これらの技術を創製枯草菌 MGF 株に適用し、工業酵素及び異種生物由来タンパク質についてプロジェクト開始時における世界最高値の2倍以上の生産性を達成する。

(1) 遺伝子機能解析(ゲノム縮小化技術/オミックス解析技術)

「生物機能を活用した生産プロセスの基盤技術研究」の成果を踏まえ、次世代型高機能宿主

の構築に向け、これまでに創製した宿主および研究成果を基盤として、さらに生育および物質生産に必要な基本的な遺伝子セットを残しつつ物質生産に不要な代謝や制御に関連する遺伝子を削除した枯草菌の創成を目指す。ゲノム縮小株のトランスクリプトーム、メタボローム動態の解析を行い、物質生産に最適な代謝系のデザインを行う。

(a) リパーゼ生産系の検討

H18 年度はリパーゼ評価系を構築し、取得変異株による生産性評価を行い、不要遺伝子と有用遺伝子の峻別を行う。H19 年度はリパーゼ生産性に必須な遺伝子の強化および不要遺伝子の削除に着手し、生産性向上の可能性を検証する。

(b) ゲノムの縮小化及びメタボローム、トランスクリプトーム解析

H18 年度はこれまでの研究成果を引き継ぎ、1~1.5Mbp 削除株創製のための削除技術の構築を目指す。H19 年度は構築した株を用いてトランスクリプトーム、メタボローム解析技術の構築を進める。H20 年度は 1~1.5Mbp 削除株を構築し、H21 年度は構築した株を用いてトランスクリプトーム、メタボローム解析を行う。H22 年度はオミックス解析技術を駆使して、大規模削除株の酵素高生産化メカニズムを明らかにすることを目指す。

(2) 特異的遺伝子発現制御(遺伝子制御技術/代謝最適化技術)

枯草菌の生産反応効率の改善を目指し、細胞の各種プロセスおよびパスウェイに關与する遺伝子の単一オペロンへの再配置を検討する。また、物質生産を人為的に制御する事を目指し、生育およびタンパク質生産に関連する遺伝子発現のスイッチングを人工的に制御できる様にデザインを行う。

(a) 遺伝子的人為的制御システムの検討

H18 年度は孢子形成シグナル伝達系における制御系の解析を行う。H19 年度は各種プロセス、パスウェイに関する遺伝子の単一オペロン化を目指す。H20 年度はプロモーターライブラリーを構築し、遺伝子の発現時期や強弱による制御システムの構築を目指す。H21 年度はプロモーターライブラリーによる制御システムを用いた酵素高生産化技術の確立を目指す。H22 年度は構築した技術のゲノム縮小化株への統合を目指す。

(b) MGF 株の生理機能評価及び物質生産効率の向上を目指した株のデザイン

H18 年度は MGF874 株の生理機能解析を行い、構築株の問題点や課題を明確にする。H19 年度はシグマ因子に対応したプロモーター構築や改変を行い、孢子形成中~後期での生産性向上の可能性を検証する。H20 年度は窒素代謝効率の向上を目指し、代謝経路のデザインを行い、生産性向上の可能性を検証する。H21 年度は糖代謝効率の向上を目指し、代謝経路のデザインを行い、生産性向上の可能性を検証する。H22 年度は構築した技術のゲノム縮小化株への統合を目指す。

(c) タンパク質生産を制御する遺伝子発現スイッチングのデザイン

H18 年度はリボスイッチおよび低分子 RNA を中心に人工的に制御可能なアテニューエーター構築の検索およびメカニズムの解析を検討する。H19 年度はシグナルとなる物質の検索および解析を行う。その上で、シグナル物質に特異的なスイッチングプロモーターのデザインを行い、より効率

的な物質生産の制御機構を目指す。H20年度はシグナルとなる物質の検索および解析から得られた情報をもとに、特異的なスイッチングプロモーターのデザインを試みる。H21年度はデザインしたスイッチングプロモーターを用いた酵素高生産化技術の確立を目指す。H22年度は構築した技術のゲノム縮小化株への統合を目指す。

(3) ユーティリティ機能増強(高生産化技術)

枯草菌の代謝活動の持続化を目指し、細胞膜安定化技術およびヌクレアーゼ解析技術の構築に着手する。更に、タンパク質の分泌性向上を目指し、細胞壁組成の改変や転写・翻訳・分泌装置の改変および強化等を検討する。また、異種生物由来タンパク質の分泌生産律速に関与する遺伝子群の解析とシャペロンの強化等に着手する。

(a) 枯草菌の代謝活動の持続化の評価解析

H18年度はこれまで取得した変異株ライブラリーにおける枯草菌の代謝活動の持続化の評価を行う。H19年度は得られた知見から、代謝活動の持続化を引き起こす因子を明らかにし、生産系に結びつける。H20年度は代謝の持続化を引き起こす因子を明確にし、定常期以降の生産に結びつける。

(b) 細胞膜・壁の人工改変技術の構築

H18年度は細胞膜及び壁の構築に関連する遺伝子の強化及び削除と酵素生産性評価を行う。H19年度は18年度の知見を基に細胞膜・壁の人工改変技術の構築を目指す。H20年度は細胞表層電荷の人工改変技術の構築を目指す。H21年度は細胞表層電荷の人工改変によるセルラーゼ・アミラーゼ・プロテアーゼの各種酵素の生産性向上の可能性を検討する。H22年度は、各種細胞膜脂質合成関連遺伝子欠失によるセルラーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼの生産性向上の可能性を検討する。

(c) プラスミド DNA の安定化

H18年度はヌクレアーゼのザイモグラム技術を構築する。H19年度は構築した技術を用いてヌクレアーゼ欠損によるプラスミド DNA の分解抑制を検証する。H20年度は構築した技術をゲノムサイズ縮小株に導入し、ヌクレアーゼ欠損によるプラスミド DNA の分解抑制を検証する。

(d) 転写・翻訳・分泌装置の改変及び強化による酵素及び異種生物由来タンパク質高生産化技術の構築

H18年度は、異種生物由来タンパク質の生産性向上の見られたゲノム縮小株を用いて酵素及び異種生物由来タンパク質の分泌生産律速因子(遺伝子群)の解析を行う。さらに、シャペロン因子及び翻訳と共役した分泌タンパク質分泌装置因子の増強および改変した評価用株を作成し、酵素および異種生物由来タンパク質の分泌生産性を検討する。H19年度は、H18年度の知見を元にシャペロン因子を含む分泌装置の増強、改変ならびに集約化した株を作成し、菌体外分泌の分泌効率の向上化を目指す。さらに、枯草菌ゲノム上に存在する10個のrRNAオペロンの一つを標的タンパク質生産用に改変し、リボソームを専有化する事による分泌効率の向上化を検討する。H20年度は、H19年度の知見を元にシャペロン装置ならびに分泌装置(SRP-Sec系およびTat系分泌輸送経路)の増強および改良を行い、蛋白質の菌体外分泌効率の向上化を目指す。さら

に、翻訳装置の標的酵素生産用への専有化を目指し、rRNAオペロンの一つを標的タンパク質生産用に改変する事で分泌効率の向上化を目指す。また、翻訳装置の定常期以降における安定化を目指す。H21年度はタンパク質分泌輸送装置構成因子(Ffh)に変異を導入し、セルラーゼ生産性向上の可能性を検討する。H22年度は、上記で構築した技術を用いヒト由来タンパク質の生産性向上検討を行う。

(4) ゲノム縮小株への高生産化技術の統合

ゲノム縮小株に、種々開発した酵素高生産化技術を統合し、セルラーゼ生産性を開発当初の2倍以上に向上した枯草菌 RGF の創製を目指す。

H21年度は枯草菌全ゲノムから 1.3Mb 以上の遺伝子領域を削除したゲノム縮小株をベースに、分泌装置 (*secY*) の高発現化およびアルギニン分解関連オペロン (*rocDEF*) 復帰技術を統合した株を開発し、セルラー生産性が向上するか検討する。H22年度は、開発した種々の酵素高生産化技術を更に統合し、セルラーゼ生産量を開発当初の2倍以上を目指す。

③ 分裂酵母高性能宿主細胞創製技術の研究開発 (旭硝子株式会社)

高度に染色体を縮小した分裂酵母を宿主細胞として造成し、翻訳後修飾が活性発現や安定性に重要な蛋白質や生産に多段階反応を必要とする物質を効率的に生産させることを目的とする。そのために次の研究開発を行う。「特異的遺伝子発現制御技術の開発」として、同時に複数箇所に導入可能な形質転換法の開発と外部信号による制御可能な複数の特異的配列の特定を行い、ヒト成長ホルモンや翻訳後修飾が活性発現や安定性に重要な蛋白質ならびに乳酸や生産に多段階反応を必要とする工業材料原料の物質生産性が向上することを示す。また「ユーティリティー機能増強技術の開発」として、分裂酵母全遺伝子の網羅的解析を行い、エネルギー供給系としての細胞内ミトコンドリア含有量の調節・異種蛋白質生産時の構造維持に必要な分子シャペロン群・異種蛋白質の活性発現や安定性に重要な翻訳後糖鎖修飾・分泌生産能や生産物の比活性に影響する小胞体内品質管理のそれぞれに関わる主要遺伝子の絞り込みとその増強を行う。

最終目標として、遺伝子の大部分が機能既知となるまでの遺伝子多重削除により恒常性維持機能を低減させた分裂酵母宿主細胞に対する外来遺伝子機能安定導入・遺伝子発現制御機能付与などの特異的遺伝子発現制御技術開発やエネルギー供給系・分子シャペロン群・翻訳後修飾系・小胞体内品質管理に関するユーティリティー機能増強技術開発により、翻訳後修飾が活性発現や安定性に重要な蛋白質や生産に多段階反応を必要とする物質の生産性がプロジェクト開始時における世界最高値の2倍以上の生産性を達成する。

④ 発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発 (独立行政法人製品評価技術基盤機構)

高性能宿主細胞創製技術の開発に必要な基盤技術を収集するため、協和発酵キリン株式会社が開発した大腸菌 DGF 中で、MGF-01 株及びその親株である *Escherichia coli* K-12 W3110

株(以下、「*E. coli* K-12 W3110 株」という。)を対象として、網羅的プロテオーム解析を実施した。大腸菌ゲノムに存在する遺伝子の約 40%が機能未知であり、その多くはゲノムから削除しても大腸菌の生育に影響を及ぼさないと推定されている。しかし、MGF-01 株にも生育に必須でありながら機能未知遺伝子が残存しており、高性能化のためには、残存遺伝子の更なる削除、残存機能未知遺伝子の機能解明、MGF-01 株と *E. coli* K-12 W3110 株との代謝の比較が必要である。本事業では、網羅的プロテオーム解析により(1) MGF-01 株及び *E. coli* K-12 W3110 株の培養条件の検討、(2)ショットガン法による網羅的プロテオーム解析、(3)ペプチドマスマーフィンガープリント法による網羅的プロテオーム解析、(4)エドマン分解法による機能未知遺伝子翻訳開始位置の決定、(5)データ解析及び提供を実施する。

2. 1. 4. 2 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発

以下の研究開発を実施する。

- ①非水系反応場におけるバイオプロセスの構築(ダイセル化学工業株式会社)
- ②酸素添加酵素の高機能化・多様化技術の研究開発(メルシャン株式会社)
- ③高効率酵素設計のための酵素反応シミュレーション技術の研究開発(日本電気株式会社)
- ④微生物複合酵素系の産業用触媒としての研究開発(株式会社カネカ)
- ⑤放線菌の活用による新規二次代謝産物の開発(明治製菓株式会社)
- ⑥発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発

(独立行政法人製品評価技術基盤機構)

①非水系反応場におけるバイオプロセスの構築(ダイセル化学工業株式会社)

本事業では、化石資源非依存型、低環境負荷型の化学品製造プロセスを構築して行くために、これまで実用化が困難であった非水系反応場に利用可能なバイオプロセスの実現を目的として、(1)非水系生体触媒細胞デザイン技術、(2)複合反応システムデザイン技術に関する研究開発を実施する。(1)に関しては「生物機能を活用した生産プロセスの基盤技術開発」プロジェクトにおいて見出された有機溶媒耐性微生物である *K. rhizophila* DC2201 株(以下 DC 2201)等を利用して、疎水性物質の変換が可能な実用的生体触媒を作成する。そのためにダイセル化学工業が宿主ベクター系の開発を行うとともに、DC2201 等への水素酸化能付与に関する研究を東京大学と、水素利用細菌を宿主とした微生物触媒の開発を茨城大学と共同実施する。(2)に関しては、芳香族化合物等の疎水性物質の変換に有用な水酸化酵素、酸素添加酵素、炭素-炭素結合酵素、還元酵素、エネルギー再生酵素等を岐阜大学、独立行政法人 産業技術総合研究所(以下 産業技術総合研究所)と共同実施体制で収集する。また、岐阜大学、兵庫県立大学と酵素の有機溶媒耐性機構の解明を共同実施する。酵素のコンポーネント等の機能解析を行い、反応とエネルギー再生を組み合わせた複合反応システムを構築して、(1)で作成した非水系生体触媒細胞においてそれらの効率の発現を検討する。当該技術の有用性・汎用性を実証するため、有機溶媒を用いた非水系反応場で、医薬品、ポリマー原料となる芳香族酸、脂肪族アルコール等の生

成反応を実施する。

②酸素添加酵素の高機能化・多様化技術の研究開発(メルシャン株式会社)

本研究でメルシャンは *Pseudonocardia autotrophica* 由来のビタミン D3 水酸化 P450 酵素 (Vdh) の高機能化のため、進化工学的手法を用いて比活性が向上し副反応が抑制された改変 Vdh を取得する。さらに Vdh の機能最適化の結果、構築された酵素の能力を実証するために、バイオプロセスへの利用が想定される大腸菌や *P. autotrophica* などを宿主としたビタミン D (VD) 類の水酸化変換試験を実施する。一方で共同実施機関である産総研は Vdh と基質 (VD など) の複合体結晶構造解析を実施し、Vdh の基質認識メカニズムを原子レベルで明らかにする。

大阪大学では非水環境下での物質生産系の研究において、難水溶性基質の利用効率を高めるため、有機溶媒耐性細菌である *Rhodococcus opacus* B4 を用いた溶媒共存下での物質生産に取り組む。この時、定性・定量が容易な呈色反応(ベンゼンジオキシゲナーゼによるインジゴ生産)をモデルに、これらパラメーターの最適化や非水系で利用可能な補酵素再生系の導入などを行い、パーセントオーダーすなわち 10 g/l 以上の生産量を目指す。また、細胞内反応場制御因子解明のため、ゲノム中の約 4,000 の ORF に対し、それぞれを個別にノックアウトした1遺伝子破壊大腸菌ライブラリーを宿主に用いることで、P450 などの酸素添加反応の反応場に影響を及ぼす因子(遺伝子)を網羅的に探索する。得られた候補遺伝子は発現強化あるいは多重遺伝子破壊操作を行うことで酸素添加酵素にとって理想的な宿主微生物の構築を試みる。さらに大阪大学は広島大学と連携して *Rhodococcus opacus* B4 の親油性・有機溶媒耐性機構の解明を行う。トランスポゾンを利用した *R. opacus* B4 に対する変異導入とスクリーニングにより、親油性を失ったネガティブミュータントの取得を目指す。また、染色体加工技術を利用した解析から、有機溶媒耐性に重要な役割を果たしている遺伝子の探索を行い、親油性・耐性の分子機構の解明を行う。

③高効率酵素設計のための酵素反応シミュレーション技術の研究開発(日本電気株式会社)

高効率酵素や多様化酵素等目的に即した人工酵素を効率よく設計するための指針を与える世帯分子シミュレーション技術の開発と、本プロジェクトのメルシャン社の実施する P450 の高機能化への適用による開発手法の有効性実証を目的として、以下の研究開発を大阪大学、独立行政法人産業技術総合研究所及び茨城大学と共同実施する。

効率的な人工酵素を設計するために、QM/MM 法等のシミュレーションに基づいて酵素の反応機構を理論的に解明する基盤技術を構築する。CASSCF/MM 法と CASSCF-DFT 法に対して、エネルギー計算用プログラムを開発し、プロタイプ分子に対しての基本的動作を確認する。また、化学反応中間体・遷移状態の分子を取り扱うための関数系・アミノ酸配列の解析による構造活性相関の手法も援用しての自由エネルギー計算手法の検討を行う。P450 に関しては、最重要なヘム単体の電子状態を主として1点計算し、鉄原子の電荷・スピン状態に応じて変化する電子状態を計算・解析する。同時に力場作成用の基礎データを得る。P450 のアミノ酸置換対の複合体モデリング(結合配座の探索)や変異体評価を行う。基質と酵素の相互作用を独自のエネルギー成分

分割法によって解析する手法を開発し、副反応を抑制する変異予測を行う。モデル系に対して P450 の反応遷移状態を Broken Symmetry 計算等の手法により解析し部位選択性を解明する。共鳴ラマン分光測定により酵素の構造転移を解明していく。メルシャン社保有の P450 において、新規基質に対する変異予測を行い、構築したシミュレーション技術の有効性実証する。

④微生物複合酵素系の産業用触媒としての研究開発(株式会社カネカ)

有用物質生産プロセスに用いる複合酵素系微生物触媒の開発を目標とする。平成 18 年度～20 年度は、高機能性複合酵素系の探索を中心とした研究開発を行なう。プロセスの構築に必要な情報を収集し、必要な酵素群を取得して、その機能解明及び高機能化検討を実施する。さらに、これら酵素群の使用によるプロセスの実現性を評価し、その実例を示す。平成 21 年度～22 年度は、ファインケミカル生産に有用な複合酵素系の機能発現制御技術の開発、及び反応場と生産プロセスの構築をめざした研究開発を展開する。すなわち、複合酵素系を微生物菌体内で実現するための遺伝子発現系を確立し、工業プロセスで使用可能な微生物を育種し、これを用いる生産プロセスを構築する。

具体的な研究対象としては、酵素的立体反転反応による光学活性化合物生産プロセスの開発をめざす。また、これを含む他の複合酵素系開発(アミノ基転移反応、オレフィン還元反応、水酸化反応、炭素-炭素結合反応、転移反応、ラジカル重合反応、二重結合転移・飽和化・不飽和化反応など)については、京都大学農学研究科と共同実施する。また、平成 19 年度には、ファインケミカル生産に加えて、コモディティケミカル生産プロセスの開発に向けた研究計画を追加した。

⑤放線菌の活用による新規二次代謝産物の開発(明治製菓株式会社)

放線菌の有する二次代謝産物生合成に関する遺伝子の機能の解析及び改変を行い、代謝工学や人工的生合成遺伝子クラスターの手法の技術を活用して、微生物を利用したプロセスで「非天然型」抗生物質の鍵化合物を生産させることを目的とする。

本研究開発においては、放線菌が生産する生理活性物質に焦点を当て、これを母核とする有用な「非天然型」生理活性物質の微生物による生産技術を検討する。一方では、放線菌が有する二次代謝酵素遺伝子を人工的生合成遺伝子クラスターの構成員として利用し、従来微生物では生産不可能であった化合物の生産を目指す。このような生産技術を開発することにより、環境調和型・資源循環型社会の構築に向け、従来の化学的プロセスから環境に優しいバイオプロセスへの転換を達成する。

本研究開発は東京大学大学院農学生命科学研究科 大西康夫教授(平成 21 年 7 月までは堀之内末治教授)と共同で実施する。明治製菓株式会社では「非天然型」生理活性物質生産菌の育種及び製造技術の開発を、モデル化合物として「非天然型」抗生物質 B を用いて実施する。中間目標として、二次代謝産物の生合成改変技術の確立を目指し、「非天然型」抗生物質 B の微生物による発酵生産を達成する。更に、最終目標として、微生物による非天然型二次代謝産物の量産化技術の確立を目指し、発酵による「非天然型」抗生物質 B の生産性を 200～300mg/L/D-培

養液にまで向上させる。一方、東京大学では、「非天然型」生理活性物質生産に必要な人工遺伝子クラスター法に関する基盤技術開発を実施するとともに、「非天然型」生理活性物質の量産化に活用できる基盤技術開発のため、二次代謝産物生合成の制御に関する研究開発を実施する。

⑥発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発(独立行政法人製品評価技術基盤機構)

バイオプロセスに用いる微生物反応の多様化・高機能化技術の中で、非水系バイオプロセスを実現するためには、有機溶媒耐性菌(以下、「OSR 株」という。)の有機溶媒重層培養時の挙動や有機溶媒耐性機構を明らかにする必要がある。OSR 株の有機溶媒耐性機構は、油脂成分であるミコール酸を大量に含有する細胞膜の特殊な細胞膜構造や薬剤排出機構が関係していると考えられていが現状では解明されていない。また、非水系バイオプロセスにおいてOSR株がどのような挙動を示すのか、物質生産にどのような影響があるのかも解明されていない。

本事業では、非水系バイオプロセスを実現するために必要な有機溶媒耐性菌 *Rhodococcus opacus* B4 株(以下、「*R. opacus* B4 株」という。)、*Kocuria rhizophila* DC2201 株(以下、「*K. rhizophila* DC2201 株」という。)について、(1)OSR 株の培養条件の検討、(2)ショットガン法による網羅的プロテオーム解析、(3)ペプチドマスーフインガープリント法による網羅的プロテオーム解析、(4)エンドマン分解法による有機溶媒耐性重要遺伝子の翻訳開始位置の決定、(5)膜タンパク質のプロテオーム解析技術の開発、(6)データ解析及び提供を実施する。

2. 1. 4. 3 バイオリファイナリー技術の開発

以下の研究開発を実施する。

- ①ソフトバイオマス糖化技術の開発・増殖非依存型バイオプロセスの開発・トータルシステムの開発(財団法人地球環境産業技術研究機構)
- ②メンブレン利用高効率発酵システムによる有機酸製造基盤技術の開発(東レ株式会社)

①ソフトバイオマス糖化技術の開発・増殖非依存型バイオプロセスの開発・トータルシステムの開発(財団法人地球環境産業技術研究機構)

バイオリファイナリー技術開発は、ソフトバイオマスから糖を調製する糖化技術と糖から基幹物質を製造する糖変換技術に大別し得る。本研究開発では、これらの技術及び双方を連結したトータルシステムの開発を実施する。

(1)ソフトバイオマス糖化技術の開発

【対象とするソフトバイオマス資源】

コーンストーバーと古紙を対象とする。その理由は、資源的性質としてリグニン含量がほぼ同等であることによる。(Bioresource Technology 96:673-686 (2005))。また、コーンストーバーは、ソフトバイオマス資源として『国際標準資源』、すなわち、米国 DOE 傘下の研究機関はじめ欧米各国の

研究機関で糖化技術の検討に最も広く使用されている“資源”であり、糖化技術の国際的なデータ比較が可能となる。さらに実用化の観点からも、アジア地区でのソフトバイオマス資源実用化に最も可能性の高い資源として期待されている。一方、古紙は“国内産資源”であり、回収システムが確立しており逆有償も含めて経済性が発揮しうる“ソフトバイオマス資源”である。

本研究開発で対象とする古紙は、“一般的な古紙”(新聞紙 ダンボール等)ではなく、企業で使用した「事務書類(ノーカーボン紙、感熱紙を含む)」であり、オフィス機密古紙と称せられる。ノーカーボン紙、感熱紙を混合していることから、技術的にもこれらからのリサイクルはきわめて困難である。さらに、2005年4月に施行された個人情報保護法により企業内での使用済書類紙はその処理量の増加が見込まれるので、糖化資源として最適である。(現状はほぼ全量焼却処理されており、資源化への期待はきわめて大きい。

【酵素糖化技術】

ソフトバイオマスの糖化工程は酵素による処理が key となる。しかしながらコーンストーバー、古紙に対し直接酵素処理を行うことは、酵素が作用する表面積が少ないこと等から実質的ではなく該ソフトバイオマスに対する前処理が必要となる。“前処理の狙い”として酵素によるセルロース類への作用が効率よく行われる状態、すなわち、ソフトバイオマスの表面積(酵素によるアタックを受ける面積)を増加させる微裁断が有効である。次に、高次構造リグニンによる、酵素によるセルロース類へのアタックへの阻害を軽減させるため、微裁断されたソフトバイオマスの膨潤化が有効である。ハードバイオマスと比べてリグニン含量の少ないソフトバイオマス(コーンストーバー、古紙;リグニン含量は10-15%程度、Bioresource Technology 96:673-686 (2005))は、製紙工業で実用化技術として開発されている微細裁断工程、続く膨潤工程(水熱処理等)の既存技術をベースとし最適条件の設定により、酵素糖化に適応可能な状態とし得る。

酵素糖化はセルロソーム機能を利用する。セルロソームはセルラーゼと蛋白質の高次構造複合体で、絶対嫌気性 *Clostridium* 属細菌 (*Clostridium cellulovorans* 等数種の菌)が細胞表層に生成し、*Trichoderma reesei* 等が生産するセルラーゼに比べて、蛋白質あたり数十倍高いセルラーゼ分解活性を有することが知られている。しかしながら、セルロソーム生成微生物である絶対嫌気性 *Clostridium* 属細菌は極端に増殖が遅いことから、経済性あるセルロソーム製造は不可能とされ、バイオマス糖化への利用研究において対象とされてこなかった。

しかしながら我々はセルロソーム機能解析、セルロソーム形成に関わる分子生物学的解析等を実施し、セルロソーム機能を工業微生物(枯草菌)に導入することに成功した。この知見をベースに経済性を有するコストにてセルロソームを製造するための基盤技術開発を行う。

一方、我々はリグニンを含まない上質古紙を対象として酵素再利用による連続糖化法を確立し、酵素使用量の大幅削減によるコストダウンが可能となることを示した。この技術をリグニン含有古紙に応用することで古紙原料からの混合糖製造に関する早期工業化に向け開発を行う。酵素再利用システムにおける反応条件の最適化とあわせて、セルロソームを含めた各種追加酵素添加による糖化促進を検討する。

本研究開発では、酵素糖化に用いるセルロソームに関して、遺伝子／酵素群の構造及び発現メカニズムの解析、人工セルロソームの構築と工業微生物(コリネ型細菌等)による高生産技術の開発等を行い、コーンストーパー及び古紙等のソフトバイオマス高効率糖化プロセス確立のための基盤技術開発に目処を得ることを目標とする。

(2) 増殖非依存型バイオプロセスの開発

現在、米国におけるバイオリファイナリーの糖変換技術では、主として発酵法を基礎として研究開発が行われている。しかしながら、発酵法は微生物の増殖に依存した生産法であるため、増殖の場と時間が必要であり、化学反応と比較して生産性が低く、設備費が高いため固定費が極めて大きくなる等の欠点を有している。本研究開発で用いるコリネ型細菌は、特殊条件下(還元状態)では、増殖は停止するものの主要な代謝系は維持され機能する性質を持っている(コリネ型細菌以外の微生物では同様な現象は報告されていない)。さらに、増殖非依存条件下では通常の増殖状態よりも、細胞あたりの代謝活性が高く、より高い物質生産能力を有することも報告されている。この増殖非依存型プロセスの構築により、欧米に対して日本独自の高度経済性を有するバイオリファイナリーを実現するための技術を開発する。

増殖非依存型バイオプロセスの開発は、(a) 増殖抑制条件下における細胞機能の統合的解明、(b) 基幹物質生産細胞の創製、(c) 糖からの各基幹物質製造プロセスの確立 の3つの研究項目より構成されている。

(a) 増殖抑制下における細胞機能の統合的解明

発酵法をプロセスの観点から考えると、最も究極的な形態は微生物細胞の増殖を停止させ、代謝経路のみを回転させた微生物細胞を物質生産に用いることである。この理想的なバイオプロセスでは、①目的物質生成に必要な微生物を高密度に反応器に充填して「触媒」として用い、②該反応装置に原料糖類を添加し、連続的に物質生成をさせることができる。ところがこのようなプロセスはこれまでまったくの夢物語とされ、「分裂を停止した微生物細胞の代謝活性のみを利用することはできない」と考えられていた。しかしながら、最近、増殖を停止した状態でも物質生産が可能な微生物が見出された。本プロジェクトで用いるコリネ型細菌は、ある特殊な条件下(還元状態)では、増殖は停止するものの主要な代謝系は維持され機能する性質を持っている(コリネ型細菌以外の微生物では同様な現象は報告されていない)。さらに、この非増殖条件下では通常の増殖状態よりも、細胞あたりの代謝活性が高く、より高い物質生産能力を有することも報告されている。この還元状態での物質代謝の統合的な全容解明を行うため、糖の取り込みと生産物の排出、糖代謝、酸化還元状態、生体内物質の寿命、細胞複製等の細胞機能について、コリネ型細菌(R株)の全ゲノム解析情報に基づき、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析、メタボローム解析等の網羅的解析技術を駆使して解析を行う。これらの知見をバイオリファイナリーによる基幹物質生産のための代謝工学的改変の基盤情報として活用する。

(b) 基幹物質生産細胞の創製

基幹化合物生成細胞の創製には、上記(a)で実施した「増殖抑制下における細胞機能の統合的解明」に基づいて、糖を原料とした基幹物質代謝系を最適に設計および改変を行う。

中央代謝系についてはグローバルレギュレーターの調節やプロモーターの改変等により制御し、代謝系の最適な組み合わせを設計してエネルギー獲得系の効率化を図る。個々の基幹物質代謝経路に関しては、細胞内酸化還元状態を最適化する代謝系を設計し改変することにより、糖からの目的生産物の生産効率を最大化する。また、誘導/強力プロモーター等により発現制御した高機能酵素遺伝子を導入し、一方で不要となる副生成物代謝経路を抑制し、生産物の排出系を強化することにより生成細胞の生産性を全体的に向上させる。また、代謝系の改変や酵素機能強化に必要な遺伝子は、メタゲノム法等により広範囲な遺伝子資源より探索し、DNA シャッフリング等の手法により活性や基質特異性をさらに改善する。以上、これまでに蓄積してきたゲノム工学や染色体工学手法を駆使して高生産性バイオリファイナリー基幹物質生成細胞を創製する。

(c) 糖からの各基幹物質製造プロセスの確立

増殖非依存型バイオプロセスの開発は、上記(b)で創製した基幹物質生産細胞を順次用いて行う。これまで研究実績のあるコリネ型細菌の野生型代謝機能を利用した増殖非依存型バイオプロセスを基盤として、基幹物質生成細胞を用いてまず大量菌体触媒調製法を確立し、増殖非依存条件下で各基幹物質生産に適応した高効率物質生産のための最適基礎反応条件、高濃度菌体反応条件及び大容量反応条件等を設定する。また、増殖非依存型バイオプロセスの反応液は無機塩培地と糖だけであり反応後も副生成物が少ないことから、目的生産物の分離・精製には「膜」の利用が最適である。日本には「膜」分離・精製技術の先進企業が多く、効率的かつ経済性のある増殖非依存型バイオプロセスを実現するため、このプロセスに最適な高機能分離膜を選択し分離精製の評価を行う。

本研究開発では、増殖抑制条件下におけるコリネ型細菌の細胞機能の統合的解明により、ソフトバイオマスからの各種基幹物質高効率生産に必要な基盤要素技術を確立し、増殖非依存型バイオプロセスにより 10 g/L/h 以上の生産性を示すことを目標とする。

(3) トータルシステムの開発

米国を中心とするバイオリファイナリーの早期実用化への動きは目まぐるしい程である。日本におけるバイオリファイナリーの早期産業化には本プロジェクトのごとく集中研究体制にて基盤技術の早期確立が肝要なことは無論であるが、より一層の早期実用化へは該技術体系に関する工業化基礎データの効率的な取得蓄積が必須である。

本研究開発の 2 つの主研究項目、ソフトバイオマスの糖化および増殖非依存型バイオプロセスに関するトータルシステムとして工業化基礎データの取得を研究第 2 年度よりプラスコスケールに

て開始する(研究期間後半からは詳細な物質収支把握可能な規模の小型装置による検討を実施する)。両工程の相互関連事項として、例えば、一般的に糖化工程で発生する所謂“発酵阻害物質”による、基幹物質生産への影響を把握する。これらの検討により、研究開発の全期間終了を待つことなしに、期間内において、基盤技術確立を終えた基幹物質に関する工業化研究を本研究開発の“枠外”として、企業にての実施を可能とする。

(4) ベンチプラントによる実証試験

増殖非依存型バイオプロセスの早期工業化を目指して、スケールアップ時の反応条件の最適化を検討する。

②メンブレン利用高効率発酵システムによる有機酸製造基盤技術の開発(東レ株式会社)

バイオマスを原料とした高効率な有用物質の生産技術において、高性能分離膜を高度に利用したバイオリクターシステムによって、発酵プロセスおよび生産物の分離・精製プロセスの大幅な効率化を図るものである。すなわち、高性能高分子分離膜およびその関連技術と代謝制御発酵技術を融合させ、反応容器の時間当たりの生産量であるSTYが、10g/L/h以上で、かつ、工業生産規模で、実用的な膜利用発酵リアクターの開発を行い、遺伝子組換え、代謝工学などにより、各種有機酸を高収率で生産する有機酸製造用組換え微生物を創出し、上記バイオリクターシステムに適用することによって、高STYを維持した長期間連続発酵基盤技術を開発する。

また、発酵生産された有機酸を含む発酵液からの有機酸の精製には多くの精製分離工程、および濃縮工程が必要で、生産コスト高の要因となっている。よって、有機酸の精製を飛躍的に効率化する高選択性分離膜(ナノろ過膜(NF膜)、逆浸透膜(RO膜)など)を組み込んだダウンストリーム研究開発に取り組む。研究開発は、ベンチスケールでの精製検討を進め、有機酸の膜利用精製基本技術を確立する。

2.1.4.4 総合調査研究(財団法人バイオインダストリー協会)

プロジェクトリーダーの指導の下、研究開発委員会開催、関連技術情報・特許周辺情報等の調査、各委託先への技術提供等による研究支援・方向性調整等を行なう。

本プロジェクトの一体的かつ円滑な推進及び、研究成果の検討による適切な研究の方向性の調整、研究者間の情報交換・意見交換による効率的な研究の推進等を目的として、外部の有識者に委嘱した研究開発委員を交えた、本プロジェクトの全実施機関による「研究開発委員会(本委員会及び分科会)」を設置し、本委員会を年1回程度、各研究開発項目実施関係者での分科会を年1~2回程度開催する。財団法人バイオインダストリー協会を代表委託先とする連名契約の研究体及び、(独)製品評価技術基盤機構(NITE)、(財)地球環境産業技術研究機構(RITE)及びその再委託先、株式会社東レが研究開発委員会の参加メンバーである。研究開発の進捗に併せて適宜研究打ち合わせを開催し研究計画を検討する他、関連技術情報、特許周辺情報等の調査を行い連名契約の研究体のメンバーに提供する。

(1) プロジェクト全体運営関連諸事項の検討

PL、SPLとの意見交換を行いながら、本プロジェクト全体および、各研究開発項目についての運営・研究計画・研究方針等について検討する。

(2) プロジェクト各研究開発項目グループ間における情報交換と成果の相互利用の検討

年1回程度の本プロジェクト全実施機関と研究開発委員からなる研究開発委員会(本委員会)の開催等により研究開発結果の発表と議論・検討、研究の体制・方向性・運営方針等についての検討、調整を行う。また、各研究開発項目グループ間および研究開発項目グループ内の各研究テーマ間での連携を促進し、効率的な研究開発の進展を図る。必要に応じて、下記(4)で行った調査の結果を報告する。

(3) プロジェクト個別テーマの進捗状況把握と検討、研究内容の調整と方向付けの検討

研究開発委員会での検討の他に、年1~2回程度、各研究題目内のそれぞれのテーマについて研究従事者による研究開発委員会分科会を開催し、適宜研究開発委員を交えて個別研究テーマについての詳細な進捗状況の報告・検討を行い、研究内容を調整し方向付けする。また、研究者同士の情報交換を図る。その他、研究開発の進行に当たり、必要に応じて会議を開催し、円滑かつ迅速な問題解決、方針の策定、情報整理に努める。

(4) プロジェクト関連技術情報の調査及びその他関連情報の交換による情報の共有化

有益な技術情報等の調査を文献調査等により行うほか、大規模な情報調査を外部調査機関等を活用して平成18年度は2件程度、19年度は1件程度、20年度は1件程度、21年度は1件程度、22年度は1件程度行い、本プロジェクトの関係者に提供して研究開発の推進に資する。また、適宜、研究開発に重要な情報の交換を媒介し、研究者間の情報共有化を図る。さらに、特許の確保を促進するため、特許周辺情報の調査を行う。

(5) 代表委託先としての検査

代表委託先として、平成18年度、19年度は協和発酵キリン株式会社、花王株式会社、旭硝子株式会社、ダイセル化学工業株式会社、メルシャン株式会社、日本電気株式会社、株式会社カネカ、明治製菓株式会社、バイオ・エナジー株式会社、株式会社豊田中央研究所、月桂冠株式会社の検査を、平成20年度、21年度、22年度は協和発酵キリン株式会社、花王株式会社、旭硝子株式会社、ダイセル化学工業株式会社、メルシャン株式会社、日本電気株式会社、株式会社カネカ、明治製菓株式会社の検査を実施する。

2.2 研究開発の実施体制

2.2.1 実施体制

本事業は公募によって選定された 15 機関への委託事業として開始された(「実施体制図」参照)。

そのうちバイオ燃料生産技術として推進すべきと判断されたテーマの委託先 3 社については、平成 20 年度に別事業「バイオマスエネルギー先導技術研究開発／加速的先導技術」の委託先として整理し、本事業での委託は終了した(「3. 情勢変化への対応」参照)。

また、旭硝子(株)の共同実施先であった香川大学については、共同研究内容を統括していた研究員が九州大学へと移籍したため、平成 20 年度より九州大学への共同実施に変更した。

2.2.2 プロジェクトリーダー

なお、マネジメント強化の一環として、NEDO は以下の通り高い技術的知見を有する専門家にプロジェクトリーダー(PL)およびサブプロジェクトリーダー(SPL)を委嘱し、PL・SPL はNEDOと協力して進捗管理や各委託先への指導・助言を行った。

・プロジェクトリーダー

東レ株式会社 専任理事 先端融合研究所長

京都学園大学法人事務局調査企画部・京都大学名誉教授

清水 昌

・サブプロジェクトリーダー

<高性能宿主細胞創製技術>

財団法人バイオインダストリー協会 事業企画部長

穴澤 秀治

<微生物反応の多様化・高機能化技術>

国立大学法人大阪大学大学院工学研究科 教授

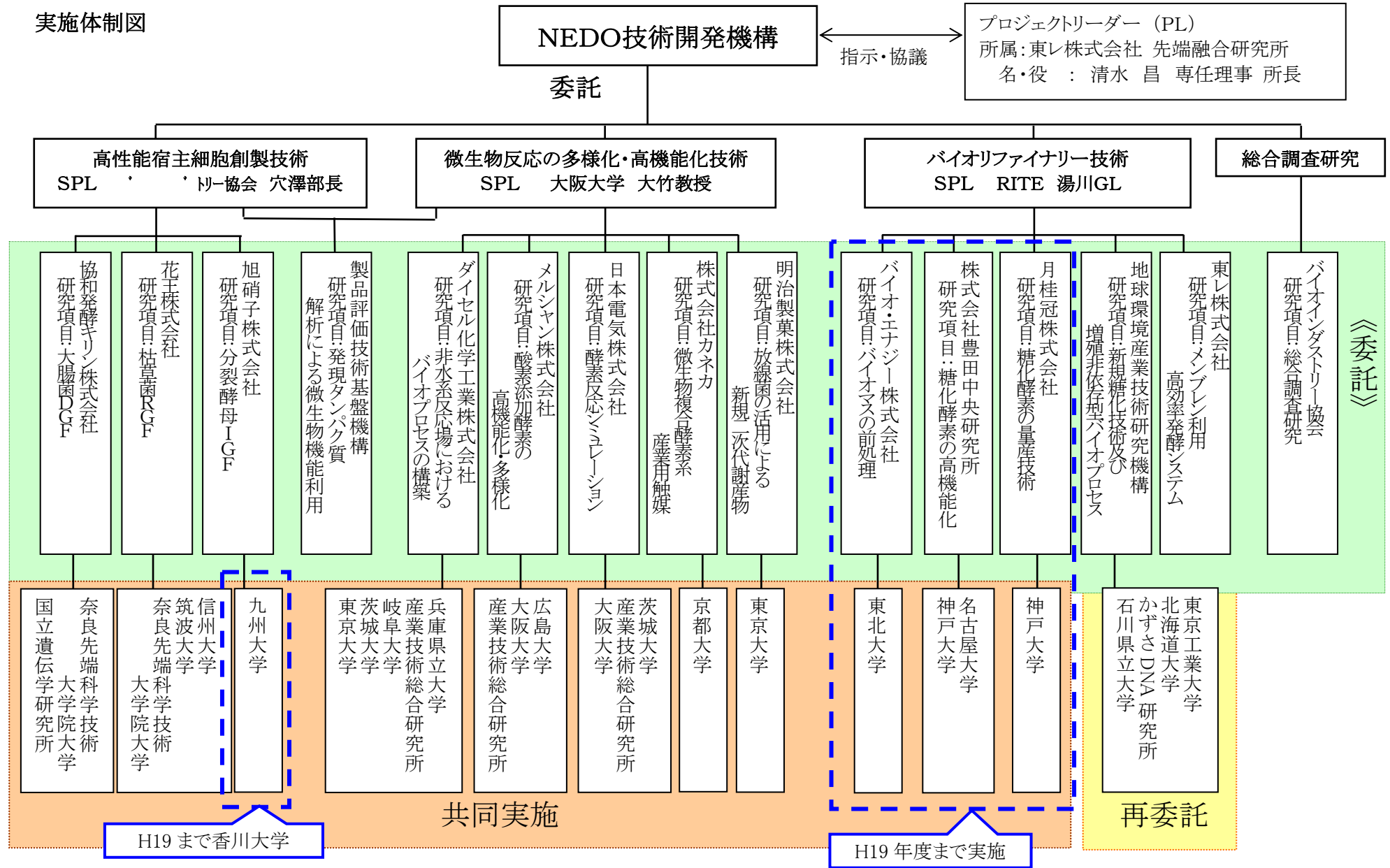
大竹 久夫

<バイオリファイナリー技術>

財団法人地球環境産業技術研究機構 理事 バイオ研究グループ グループリーダー

湯川 英明

実施体制図



2.3 研究の運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有するNEDO バイオテクノロジー・医療技術部(バイオ・医療部)は、経済産業省及び研究開発責任者と密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本事業の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施した。

具体的には、研究開発委員会を開催し、進捗報告を受けて情報共有を行うと同時に外部有識者の意見を運営管理に反映させた。これまでに開催した研究開発委員会は以下の通り。

- 第1回 平成18年6月5日(月)
- 第2回 平成19年2月28日(水)
- 第3回 平成19年6月29日(金)
- 第4回 平成20年2月26日(火)
- 第5回 平成20年7月14日(月)
- 第6回 平成21年3月2日(月)
- 第7回 平成21年7月31日(金)
- 第8回 平成22年3月1日(月)
- 第9回 平成23年1月31日(月)

上記に加え、研究テーマ毎の分科会をそれぞれ毎年1回開催し、進捗状況や研究計画についてより詳細に議論した。また、年に2～3回NEDO 技術開発機構による経理検査を実施し、予算の行状況の管理を行った。

研究開発委員会における登録委員

名	所属・役
清水 昌	東レ株式会社 専任理事 先端融合研究所長
穴澤 秀治	京都学園大学法人事務局調査企画部・京都大学名誉教授(フクオカ 外リーダ)
大竹 久夫	財団法人バイオインダストリー協会事業企画部長(フクオカ 外リーダ)
湯川 英明	大阪大学大学院工学研究科教授(フクオカ 外リーダ)
野 久	(財)地球環境産業技術研究機構 理事 研究グループリーダー(フクオカ 外リーダ)
太田 明	富山県立大学工学部生物工学科 教授
勝 瞭一	東京大学大学院農学生命科学研究科 教授
工藤 俊章	東北大学名誉教授
小長谷明彦	長崎大学水産学部海産物質科学講座 教授
中島 紫	東京工業大学総合理工学研究科 教授
森川 正章	明治大学農学部教授
辺 隆司	北海道大学大学院地球環境科学研究科 教授
大島 桂典	京都大学生存研究所 副所長 教授
家山 一夫	東レ経営研究所 特別研究員 日立造 株式会社 事業・製品開発本部開発プロジェクト部 部長

2.4 研究開発成果の実用化、事業化に向けたマネジメントの妥当性

研究開発委員会において各受託者の実用化の見通しについて発表させ、それに対してプロジェクトリーダー、サブリーダー、外部委員が意見を述べた。知財 についても、バイオリファイナリーおよびバイオプロセスに関する特許調査を継続して行い、委員会等で出願状況の報告と確認を行い、積極的な知的財産 取得を促進した。市場調査、海外での研究状況の調査を行い助言を与えた。

3. 情勢変化への対応

3.1 事業全般

本事業が開始された平成 18 年度以降、食料と競合しないバイオマス燃料の生産技術に対する社会的な要望が急速に高まった。そこで、NEDO 新エネルギー部(新エネ部)では既存の事業を拡充し、平成 20 年度より新たに「バイオマスエネルギー先導技術研究開発/加速的先導技術」を開始した。バイオリファイナリー技術は本事業で目標とする化成品製造だけでなく、バイオマス燃料生産にも適用可能な共通基盤技術である。そこで、本事業のバイオリファイナリー技術のうち実施者が希望したテーマについて外部有識者を交えた 査を行い、より早期にバイオマス燃料生産技術としての実用化を目指して推進すべきと判断された3テーマ「バイオマスの前処理(バイオエナジー)」「糖化酵素の高機能化(豊田中央研究所)」「糖化酵素の量産技術(月桂冠)」については、「バイオマスエネルギー先導技術研究開発/加速的先導技術」のテーマとして委託することとし、本事業での委託は終了した。

3.2 個別事業

2007(H19)年に協和発酵キリンが Affimetrix 社製 GeneChip マイクロアレイ解析システムの導入を追加で行った。マイクロアレイ解析システムを導入したことにより、転写解析のスピードがアップして、溶菌関連遺伝子の同定という成果につながった。

2007(H19)年に花王がリボソーム機能改変および評価を追加で行った。枯草菌は 10 個の rRNA(rrn オペロン)を有するが、2 コピーにまで削除しても細胞増殖およびセルラーゼ生産性は野生株に対して 80%程度を維持する事が判った。また、枯草菌の rRNA オペロンの改変によりセルラーゼ生産性が 20%向上できた。

2008(H20)年にメルシャンが微生物ゲノムドラフト配列解析有用遺伝子評価試験を追加で行った。ゲノム配列データが得られたことで、2 年間を見込んでいたビタミンD水酸化変換を効率化する遺伝子を 1 年以内に同定できた。この結果、水酸化ビタミンDの生産性を 3-4 倍に増加させることができた。

2007(H19)にカネカがキャピラリー電気泳動装置、蒸発光散乱検出システムの導入を行った。キャピラリー電気泳動装置及び蒸発光散乱検出システムを導入したことにより、複合酵素系を用いる光学活性アミン生産プロセスの開発スピードが加速され、実用化レベルの技術開発につながった。

2006(H18)年、RITEが連続糖化試験装置、糖化解析システムの導入を追加で行った。高効率糖化プロセスの開発として、酵素再利用による連続糖化システムを構築し、リグニン含有古紙の糖化では糖化率80%を維持したまま、400時間超の連続糖化を確認した。

2007(H19)年、RITEが芳香族化合物分析・解析システムの導入を追加で行った。芳香族化合物生産の基盤技術の構築のため、キーとなる芳香族化合物中間体の生産株を構築し、当該代謝経路改変に必要な関連遺伝子に関する知見を得た。

2008(H20)年、RITEがベンチスケール試験システムの導入などを追加で行った。増殖非依存型バイオプロセスの工業化に必須な基盤要素技術の実証のため、該プロセスのスケールアップを検討し、フラスコスケールレベルと同等以上の生産性が得られた。

2008(H20)年、東レが微生物連続培養追加装置、運転データ計測記録装置等の導入を行った。微生物連続培養装置の追加仕様を施した追加装置、詳細な運転データ取得可能な記録装置を導入できたことで、メンブレン利用発酵リアクターの試験が効率的に行えるようになり、検討加速につながった。

4. 中間評価結果への対応

4.1 プロジェクト全体に関する評価に対する対応

4.1.1 中間評価および指 事項

4.1.1.1 総合評価

本プロジェクトは、我が国が伝統的に得意としてきた領域での微生物機能を活用した有用物質生産技術の研究開発であり、環境保全、バイオ燃料、資源の利活用の観点から意義深い。また、昨今のゲノム解読、生物学的知見や遺伝子操作技術・分析技術などの著しい進展を背景に、国際的に優位性を有する画期的なバイオプロセスの開発を目指している点で高く評価できる。さらに、得られた成果はレベルが高く中間目標をほぼ達成しており、化学工業やバイオ産業に関連する成果が多く実用化への期待も大きい。しかし、各個別テーマ及び各サブテーマの開発内容については、今後の最終目標の達成に向けて焦点を絞る必要もある。一方、個別テーマを担当しているグループごとに目標を達成しようとする傾向がみられるが、グループ間の連携を強化すべきである。【1】実用化へ向けての壁は決して低くはないであろうが、今後の研究開発の一層の進展によって、新たな産業の基盤技術となるものが多数、出てくることを期待する。

4.1.1.2 今後に対する提言

プロジェクト内の3グループの連携を更に進めることで、野の広いプロジェクトとしてより大きな波及効果が期待できる。また、革新的な物質生産・変換用微生物の創製技術の開発を、大腸菌・枯草菌・分裂酵母・有機溶媒耐性菌・増殖非依存型反応細胞の菌株間で遺伝子とその機能情報を共用し、画期的な宿主細胞を創製する方向に進めて しい。開発した宿主に開発したプロセスや酵素システムを応用するなど、プロジェクトの成果を統合する戦略が望まれる。【2】また、高機

能宿主株や非水系反応場となる溶媒耐性宿主菌、増殖非依存型バイオプロセス、膜利用発酵システムなどの成果の実用化を促すため、複数の具体的かつ魅力的な実例を提示して しい。【3】

4. 1. 1. 3 事業の位置付け・必要性について

バイオプロセスにかかわる多様な基盤技術の開発を進め、バイオプロセスのパラダイムシフトを目指す意義の大きいプロジェクトである。世界に ったバイオテクノロジー分野での我が国のアクティビティを活かして日本を支えるバイオ産業の復 を図ることは国家戦略の一部でもあり、リスクの高い技術開発を含むため NEDO の関与は妥当である。また、環境負荷を低減するグリーンプロセスや省エネルギープロセスの推進、バイオマスなどの資源有効利用を含む環境調和型産業システムを時代が求めている中で、本プロジェクトの目的は、バイオテクノロジー戦略大 に沿っており、現在の社会情勢、技術動向に照らし合わせて妥当である。今後も、米国の を考えると、日本としてはいっそうの力を込めねばならないプロジェクトである。【4】

4. 1. 1. 4 研究開発マネジメントについて

プロジェクトリーダーのもとに多岐にわたるバイオプロセスの開発に向けて、学際的な大型研究プロジェクトを構築し、3グループで共同研究を実施していることは妥当である。また、伝統的に産官学共に我が国の強みである微生物分野の技術シーズと、蓄積された産業インフラの積極的利用を考慮し、最新の技術シーズを融合させた基盤技術開発に資源を集中させた戦略性は評価できる。さらに、バイオマス燃料に関するテーマについては実用化に向けて「バイオマスエネルギー先導技術研究開発／加速的先導技術」に移行するなど、社会情勢に機 かつ適切に対応している。多 分野の研究者からなる大きなプロジェクトであるため、各グループ間の一層の連携を図ることが必要である。【5】また、目標の達成度は、研究開始時の生産性(生産効率・収率)に比べて何倍と示されている場合が多く、実用化するために必要な生産性と比べていない。実用化するための目標値に対して、どの程度進捗したかの達成度(%)として示すべきである。【6】

4. 1. 1. 5 研究開発成果について

中間目標は概ね順調に達成され、学術的にも重要な知見が論文として発表されている。最終目標に向けた道 も適切に示され、妥当なものとなっている。また、ゲノムの削除による宿主創製や有機溶媒一相培養系開発、増殖非依存型バイオプロセスなどのシステム構築や、水素酸化細菌や複合酵素系での生産システムなどで世界をリードするとともに、新たな技術領域の展開につながる意義のある成果が得られている。成果の汎用性、独自性及び重要性に関しては、十分に整理されていない。【7】世界における汎用性等を更に整理するとともに、その成果の適用範囲に関しても可能な限り明確にすることが望ましい。知的財産については、世界的な戦いになっている今、企業の枠を超えて、日本の知的財産と呼べるような成果が上がり、それが広く、日本の科学技術の進展につながることを期待する。また、実施者ごとの特許出願状況は成果として見えているが、グループ間や各グループ内での包括的・戦略的な特許出願も成果として見えると良いであろう。

[8]**4.1.1.6 実用化の見通しについて**

既に利用されているアミノ酸や有機酸、産業用酵素、生理活性タンパク質、合成原料、ビタミン誘導体、二次代謝産物、バイオ燃料やコハク酸の効率的生産技術は、そのまま実用化につながると期待される。高機能宿主株や非水系反応場となる溶媒耐性宿主菌、増殖非依存型バイオプロセス、膜利用発酵システムなどの成果は多様な物質生産に利益をもたらす可能性があり、実用化が期待される。また、画期的な生産性を備えた高機能宿主や生産技術が生まれれば、化学工業やバイオ産業だけでなく、その製品を使用する自動車や家電を含む機械や電気などの関連産業への波及効果大きい。生産性や効率などに関する目標は設定されているが、実用化するために必要な達成(数値)目標が設定されていないので、実用化・出口イメージはやや不明確である。

[9] 今後、高機能宿主株や非水系反応場となる溶媒耐性宿主菌、増殖非依存型バイオプロセス、膜利用発酵システムなどの成果の実用化には、魅力的な実例を提示することが重要である。**[10]**

4.1.2 中間評価および指 事項への対応

[1] グループ間で有用な遺伝子と機能の情報を共有化し、プロジェクトとしての統合的な目標を設定し各グループを連携させるべく、研究者間レベルの合同研究開発委員会及び PL・SPL クラスのテーマ検討会を開催した。

[2] 生育向上や物質生産に有用な遺伝子情報はプロジェクト内での共有化を初めに行い、連携をはかった。

[3] 発酵、酵素変換の双方で宿主細胞ゲノムの大幅改良で有効な遺伝子情報の活用を検討した。他の菌種、植物、動物細胞までにも成果が適応できる可能性がある場合、その研究、特許戦略を検討する場を設け、順次、特許、論文等で報告を行った。

[4] 米国の技術に対抗するため、日本独自の技術の開発を推進し、本プロセスの汎用性を示していく計画を立てた。特許戦略については**[3]**の再掲。

[5] **[1]**の再掲。

[6] 研究成果の達成度を測る 度、方法を検討する場を設け、実用化に近い技術に関しては、実用化レベルの基準を設定し、その達成度を数値化した。

[7] 開発技術の分類と適応可能範囲を整理した資料を作成した。

[8] **[3]**の再掲。

[9] **[6]**の再掲。

[10] **[3]**の再掲。

4.2 個別テーマ毎に関する評価に対する対応**4.2.1 高性能宿主細胞創製技術の開発****4.2.1.1 中間評価における指 事項**

(成果)

全体としては十分に目標値をクリアしている。特に、遺伝子多重削除などによる高機能性宿主細胞の創製は独創的である。また、成果は世界をリードするレベルに達しており、ゲノム解析の先行していた大腸菌・枯草菌・分裂酵母において、大規模ゲノム改変により、従来に無い物質生産改善のための新たな可能性を提示した点が評価できる。遺伝子多重削除による高機能性宿主細胞の創製技術については、技術の適用範囲を明確にする必要がある。プロテオーム解析も重要であるが、技術の適用範囲と効果の関連性究明に注力してほしい。【11】今回の大規模改変に用いた微生物のみならず、従来の工業菌種であるコリネ型細菌や放線菌、「微生物反応の多様化・高機能化」グループにより見出された新規微生物種にも応用可能な原理・原 が見出されることを期待する。【12】

(実用化)

大腸菌、枯草菌、分裂酵母の各宿主において生産性の向上が具体的に示されており、代謝や分泌などの基礎的な細胞機能に由来する効率の向上が示唆されていることから、多様なターゲットに応用できると推測され、実用化の見通しは明るい。それぞれの実施者でターゲットが異なっているので、それぞれについて実用化するために必要な数値目標を明示する必要がある。また、その数値目標に対する達成度を示してほしい。【13】特に、実用化に近い技術の達成度は、実用レベルを目指した目標値に対して相対値で表す方がわかり易い。

(今後に対する提言)

プロジェクト後半の研究開発では、基盤技術として更に深化すべき研究領域と、実用化を目指した応用技術開発領域の区別とを明確にすることで、応用技術の波及・実用化の加速が期待される。生産性向上に力点をおいて、欠失遺伝子の相補や単一遺伝子／オペロンの欠失などの手法を積極的に用いることも考慮して良いであろう。【14】発酵工業への波及効果の観点から、より多くの高付加価値の物質生産ターゲット(有用物質)に加え、大なる生産量となる有用物質を明示することが望ましい。【15】

4. 2. 1. 2 中間評価指 事項への対応

【11】【7】の再掲。

【12】「微生物反応の多様化・高機能化」グループと連携を取りつつ有用な情報はプロジェクト内で共有化し、見出した成果は、論文等で報告した。

【13】【6】の再掲。

【14】基本技術を再整理し、プロジェクト内の他応用研究に活用できないか確認しながら Pj を推進した。

【15】高付加価値品の効率良い生産を目指す研究と、D-乳酸や L-アラニンなど光学活性を有するコモデティー物質生産のコストダウンに向けた研究を整理しながら方向を絞り込んだ。

4. 2. 2 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発

4. 2. 2. 1 中間評価における指 事項

(成果)

個々の要素技術開発にかかわる中間目標が明確でないため、各プロジェクトの中間目標に対する達成度は計れないが、全体としては目標を十分に達成していると考えられる。有機溶媒一相培養系での生産は、これまでに例のない世界をリードする成果であり、従来から検討されている水-有機溶媒二相系を超える新たな領域を展開できる可能性が期待される。また、溶媒耐性菌を用いた生産システムや非天然型抗生物質生産システム、補酵素再生複合酵素系は、様々な物質生産に応用できる汎用性を備えており、実例の提示における今後の展開が期待される。最終的に非水系生体触媒細胞で多様な疎水性物質変換酵素を発現させて評価することを目指しているが、開発中の疎水性物質変換酵素を開発中の非水系生体触媒細胞で発現させるための動きは、まだ一部に留まっている。【16】 高効率酵素設計のための酵素反応シミュレーション技術は、酵素 P450 及び関連分子の機能解析への応用だけでなく他の酵素反応への応用も期待される。

【17】

(実用化)

ビタミン D 誘導体や光学活性アミノ酸・アルコール類、新規二次代謝産物、酵素反応シミュレーションプログラムは産物そのものを製品として、水酸化細菌での光学活性化合物生産、ビタミン D 水酸化酵素などの酵素 P450 による物質生産、複合酵素系による物質生産、新規二次代謝産物の開発はこれらの生産システムとして、実用化の可能性が極めて高い。また、関連の物質変換系は化学工業で広く用いられているため、成果の技術的・経済的波及効果は大きくなり、当該分野における研究開発や人材育成の促進につながると期待される。中間評価段階での達成度は最終目標値に対する割合等で示されているものの、その最終目標値が実用化レベルであるか明確になっていない。特に、実用化に近い技術のレベルは、実用レベルを 100 として相対値で表す方がわかり易い。【18】 直近の石化製品の価格上昇などの環境要因を見直せば、コスト的に実用化可能な時期の前 しゃ、製造可能化合物種の拡大の可能性もあり、検討を望む。【19】

(今後に対する提言)

サブテーマ a~e のそれぞれの開発内容が、若干広がりすぎており、最終目標の達成に向けて、それぞれ可能な限り、焦点を絞る必要がある。例えば、有機溶媒耐性機構の解明を含めて生体触媒の非水系の反応場制御技術の開発に絞ることも検討して しい。非水系の反応を扱う観点から有機溶媒耐性菌を見出し、その有機溶媒耐性機構を明らかにしつつあるが、その機構解明により有機溶媒耐性を他菌種にも付与するなどの汎用性のある技術として成熟させることを期待する。【20】

4.2.2.2 中間評価指 事項への対応

【16】開発中の疎水性物質変換酵素を開発中の非水系生体触媒細胞で発現させるため、R-2-クロロマンデル酸、エチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸やバニリン酸などの生産に取り組んだ。

【17】開発中の酵素反応シミュレーション技術には、汎用性があり他の酵素反応への応用も可能である。

【18】【6】の再掲。

【19】開発候補となる石化製品の価格動向と本手法での適応可能価格範囲を想定したシミュレーションデータを作成している。

【20】非水系の反応場制御技術の開発により注力するため、有機溶媒耐性細菌である *K. rhizophila* DC2201 株および *R. opacus* B-4 株に焦点を絞り、耐性機構解明と利用技術についてグループ間での連携を強め取組む計画である。

4. 2. 3 バイオリファイナリー技術の開発

4. 2. 3. 1 中間評価における指 事項

(成果)

成果は現在、注目を集めているバイオ燃料生産に直結する意義の大きいものであり、広く利用されることが期待される。また、コリネ細菌の増殖非依存型バイオプロセスは極めて高い生産性を、世界をリードする技術となる可能性が高い。なお、いずれの成果も中間目標をほぼクリアしている。ソフトバイオマス糖化技術の開発については、糖化プロセスの中で酵素処理前の省エネルギー型の前処理プロセスの確立が必要である。【21】 バイオマスリファイナリーに関するプロジェクトは、他の府省等でも実施されており、他のプロジェクトと差別化する必要がある。【22】

(実用化)

コリネ型細菌を用いた増殖非依存条件下での乳酸発酵生産や L-アラニン生産などについては、実用化の可能性が高く、膜分離プロセスと併用することにより更なる生産性向上を期待したい。また、未利用バイオマスからのバイオ燃料生産は、食 資源との競合で生じた問題をかかえる現在の世界情勢から、強く実用化が求められており、本プロジェクトで生産性が上がれば実用化は間近であろう。糖化と発酵プロセスを含めた機能的なプロセスの構築には、各サブグループの連携強化が望まれる。【23】また、実用化に近い技術のレベルは、実用レベルを 100 として相対値で表す方がわかり易い。【24】コリネ型細菌を利用する生産プロセスについては、コリネ型細菌利用の歴史のある我が国では生産インフラ・技術者等の関連資源が蓄積されており、国内資源の有効利用を期待する。

(今後に対する提言)

増殖非依存型バイオプロセスと膜利用発酵システムのいずれも高い性能を示す優れたシステムであり、両者が融合することで新たな成果が出る可能性もある。両者の融合を検討することが望まれる。【25】汎用化学品(石化代替品)の大規模生産が前提となることから、スケールアップやダウンストリーム開発では、工学的要素が多くなる。今回は、膜分離技術開発が先行して取り上げられているが、技術移転・実用化の加速を図るために、生物・工学両面の研究体制を更に充実させることが有効であろう。【26】セルラーゼ及びヘミセルラーゼ活性は一般的に黄 菌よりも黒 菌の方が高い。黄 菌のゲノムデータベースを利用する研究であることは理解できるが、ソフトバイオ

マスの利用の観点からすると黒 菌の利用についても検討の 地がある。dのサブテーマについては、古紙処理大規模プラントに採用されるなど、実用化の見通しが高く、基盤技術からの発展が期待される。【27】

4. 2. 3. 2 中間評価指 事項への対応

【21】前処理技術は、既存技術(水熱処理法)をベースとし最適条件の設定により省エネ実用化技術の確立が可能となるよう計画済みであった。

【22】セルロソーム機能を利用した革新的糖化技術の開発と増殖非依存型プロセスによる基幹物質生産技術は、国内外で他にはない日本独自の技術であり差別化できている。

【23】今後、増殖非依存型バイオプロセスと膜システムの技術融合などで、合同によるサブプロジェクト委員会を開催しグループ内の連携を強化した。

【24】【6】の再掲。

【25】【23】の再掲。

【26】増殖非依存型バイオプロセスについても、大規模生産を前提としたスケールアップによるデータを取得する計画した。【1】の一部再掲。

【27】JBA グループ 3 社による糖化技術は、実用化に近い技術として、20年度より、新たな NEDO 実用化プロジェクトに移行させた。

5. 評価に関する事項

過去に実施した評価は次に記す中間評価(1回)である。

- ① 評価の実施時期:平成 20 年度
- ② 評価手法:外部評価
- ③ 評価事務局:研究評価部
- ④ 評価項目・基準:「標準的評価項目・評価基準」(中間評価分科会資料 3-3)
- ⑤ 評価委員(敬称略)

分科会長 中西 一弘 岡山大学 大学院自然科学研究科 機能分子化学専 教授

分科会長代理 福田 夫 長岡技術科学大学 生物系教授

委員 部 敬 東北大学 大学院農学研究科 応用生命科学専 准教授

委員 太田 一良 宮崎大学 農学部 応用生物科学科教授

委員 片山 秀策 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 バイオマス研究
センター センター長

委員 谷口 正之 新 大学 自然科学系(工学部)教授

委員 吉川 学 株式会社毎日新聞社 科学環境部副部長

Ⅲ. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果

本事業の研究開発は計画どおり順調に進捗し、最終目標とする事項に対してほぼ達成できた。

高性能宿主細胞創製技術の開発においては、大腸菌 DGF の研究開発(協和発酵キリン)で、野生株と同等以上の生育特性を示す DGF-298 株(ゲノムの 35%削除)の作製に成功した。染色体縮小化株群の ATP 供給能力は、野生株に比べ大幅に向上した。実験的な評価から、残存する削除できない機能未知遺伝子の割合は、目標の 10%以下(3.1%程度)であると結論した。また 4 つの重要機能未知遺伝子の機能解明を完了した。タイリングアレイ解析から、有用プロモーター群を見出した。成果を総合的に活用し、複数の化合物について、既報値を超える生産株育種に成功した。

枯草菌 RGF の研究開発(花王)で、枯草菌細胞において有用酵素生産に不要な遺伝子領域を 1.5Mbp 削除した株を構築する事に成功した。また、有用酵素分泌生産に関わる制御が窒素および炭素代謝制御により可能であることを特徴とする特異的遺伝子発現制御技術の構築にも成功した。細胞膜・壁の人工改変による溶菌抑制、分泌装置の増強を特徴とするユーティリティー機能増強技術の確立に成功した。これらの技術を創製枯草菌 RGF 株(924 株)に適用し、モデル酵素として採用したセルラーゼの生産性をプロジェクト開始時の世界最高値の 2.5 倍向上させる事に成功した。

分裂酵母高性能宿主細胞創製技術の研究開発(旭硝子)で、野生株と増殖性能が遜色ない 657.3kbp の染色体大規模削除株を完成し、この株の異種タンパク質生産性向上をヒト成長ホルモンおよびヒトトランスフェリンをモデルとして確認するとともに、そのメカニズムを解析した。さらに多座組込・誘導発現・分泌強化・糖鎖改良に関する技術開発を終了し、合わせて異種タンパク質生産性向上例を示した。

微生物反応の多様化・高機能化技術の開発においては、非水系反応場におけるバイオプロセスの構築(ダイセル化学)で、有機溶媒耐性 *K. rhizophila* DC2201 株(以下 DC 2201)の発現系の開発、外来酵素遺伝子の発現検討、有機溶媒-水二相系反応場における物質生産検討を実施した。DC2201 の宿主ベクター系を開発し、ニトリラーゼ、不斉還元酵素、補酵素再生系酵素遺伝子の発現に成功した。医薬品中間体として有用な (R)-マンデル酸(RMA)、(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチル(ECHB)の生産に関して検討を行ない、大腸菌と比較して飛躍的に生産性が上がり、蓄積量(RMA 211 g/L、ECHB 355 g/L)も世界最高レベルであった。

酸素添加酵素の高機能化・多様化技術の研究開発(メルシャン)で、進化工学的手法、酵素結晶解析情報による機能改変したビタミンD水酸化酵素遺伝子を育種最適化した放線菌宿主に導入することで現行プロセス変換菌の数倍の STY の向上を達成した。

高効率酵素設計のための酵素反応シミュレーション技術の研究開発(日本電気)で、構築した

シミュレーション技術により一連の酵素反応のメカニズムを解析することが可能になった。本プロジェクトでは、P450 VDH 系に対して基質結合過程、水酸化反応、反応生成物解離過程を含む一連の流れに対するシミュレーションを実施し、反応メカニズムに関する多くの知見を得た。メルシャン社保有の P450 において、新規基質に対する変異部位予測を行い、水酸化反応の副反応を 1/3 に低減することに成功。シミュレーション技術の有効性が示された。

微生物複合酵素系の産業用触媒としての研究開発(カネカ)で、複数の酵素の組み合わせや、補酵素の再生系、補欠因子族等を複合して使用する産業用触媒の創製によって、非天然L体アミノ酸類、キラルアルコール類において 100g/Lレベルの、またキラルアミン類、リン酸化糖類、ヒドロキシアミノ酸類、共役脂肪酸類、水酸化脂肪酸類などにおいて 30~50g/Lレベルでの生産が可能な各種の酵素的生産プロセスを開発した。

放線菌の活用による新規二次代謝産物の開発(明治製菓)で、人工遺伝子クラスター法技術を用いて非天然型抗生物質Bの発酵生産に成功した。その後、種々の生産性向上検討を実施し、約 50 倍に生産性を向上させることができた。その際の生産速度は 175mg/L/D-培養液であり、最終目標をほぼ達成できた。

発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発(独立行政法人製品評価技術基盤機構)では、高性能宿主細胞 DGF、微生物反応の多様化・高機能化技術の開発に利用する有機溶媒耐性菌 *R. opacus* B4 株、*K. rhizophila* DC2201 株について、網羅的・定量的プロテオーム解析を実施した。結果として、解析対象菌株の代謝変化や有機溶媒耐性機構の解明につながるタンパク質の発現状況を捉えることに成功した。これらの成果は、解析対象菌株の新規バイオプロセスの実現に向けた基礎的なデータとなる。

バイオリファイナリー技術の開発においては、ソフトバイオマス糖化技術の開発・増殖非依存型バイオプロセスの開発・トータルシステムの開発(地球環境産業技術研究機構)で、好気性工業微生物(コリネ型細菌)による高機能セルラーゼ(人工セルロソーム)の生産に成功した。酵素再利用法による連続糖化システムを構築、リグニン含有古紙の糖化で糖化率 80%を維持したまま、長時間連続糖化を確認し、糖化酵素コスト大幅低減の可能性を示した。糖代謝速度向上、細胞内酸化還元バランスの調整、代謝遺伝子発現レベルの最適化などの要素技術を確認、各種化合物(D-乳酸、L-アラニン、キシリトール、バリン)の高効率生成(10 g/L/h 以上)を示した。バイオマス由来混合糖(グルコース、キシロース、アラビノース、マンノース、セロビオース)完全同時利用技術を確認、D-乳酸、キシリトール、バリンの高効率生成を確認した。

メンブレン利用高効率発酵システムによる有機酸製造基盤技術の開発(東レ)で、膜利用発酵プロセスのパイロットスケール試験装置を開発した。パイロットスケール装置において D-乳酸発酵で STY10g/L/h を達成した。高純度 D-乳酸が得られる NF/RO 膜を用いた膜利用精製プロセス基本技術を確認した。

全体の成果

目 標	研究開発成果	達成度
<p>①高性能宿主細胞創製技術 遺伝子の大部分が機能既知となるまでの遺伝子の多重削除により恒常性維持機能を低減させた宿主細胞に対しての宿主としての機能付与(代謝フラックス制御・物質生産への切り替え・補酵素供給機能増強等)により、プロジェクト開始時における世界最高値の2倍以上の生産性を達成する。</p> <p>②微生物反応の多様化・高機能化技術 既に微生物反応により生成されることが基礎研究で知られている物質についてはSTY (Space/Time/Yield: 反応容器の時間あたりの生産量)数g/L/h 以上、知られていない物質についてはその10分の1以上(医薬品等の高付加価値品については実用化に十分なSTY の数倍以上)の生産を行う。</p> <p>③バイオリファイナリー技術 バイオマス糖化技術においては、草本系のソフトバイオマスについて、原料濃度10%にて1 日で90%の糖化を行える技術を開発する。また、高効率糖変換技術においては、糖から新たに6種の基幹物質をSTY10 g/L/h 以上で継続的に生産することのできる技術を開発する。これら技術の開発により、総合的生産体系を開発・構築する。</p>	<p>①以下の物質に関して目標を達成 アルギニン生産3.9倍 セルラーゼ生産2.5倍 ヒト成長ホルモン(hGH) 2.6倍</p> <p>②以下の物質に関して目標を達成した。 (R)-マンデル酸(RMA)8.8g/L/h (S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸 2.1g/L/h ビタミンD 従来STYの3倍 非天然L体アミノ酸類 100g/L/h 非天然抗生物質 7.3mg/L/h</p> <p>③糖化率80%を維持したまま、400時間超の連続糖化を達成 選択と集中により以下の物質でSTY10g/L/hを達成した。 D-乳酸 10g/L/以上 L-アラニン 10.3g/L/h キシリトール 10g/L/h以上 バリン 10g/L/h 以上</p>	<p>①達成</p> <p>②達成</p> <p>③達成</p>

特許、論文、外部発表等の件数(プロジェクト計)

区分	特許出願			論文		その他外部発表(プレス発表等)
	国内	外国	PCT※出願	査読付き	その他	
H18FY	16	0	1	42	12	138
H19FY	30	0	1	73	29	172
H20FY	26	3	7	55	14	154
H21FY	22	12	11	69	14	117
H22FY	17	0	6	73	27	120
計	111	15	26	312	96	701

1. 1 高性能宿主細胞創製技術の開発

1-①大腸菌DGF (Designed Genome Factory)の研究開発(協和発酵キリン株式会社)

目 標	研究開発成果	達成度
<p>下記個別テーマを統合的に活用し、プロジェクト開始時における世界最高値の2倍以上の生産性を達成する。</p> <p>(1) 遺伝子機能解明 縮小化染色体上の排除不可能な機能未知遺伝子の割合が全遺伝子の 10%程度にまで減らす。</p> <p>(2) 染色体遺伝子構成のデファイン化 IS、トキシン遺伝子を完全に排除し、染色体長を 2.8 Mbp 以下にする。</p> <p>(3) 宿主細胞の機能解析と改良 染色体縮小化株の生育特性、ユーティリティー供給機能を改良する。</p> <p>(4) 遺伝子発現制御技術の開発と応用 発現制御系のコレクションを行い、物質生産系へ応用し、世界最高値の2倍以上の生産性を達成する。</p>	<p>アルギニン生産 3.29 g/L/h、ニコチアナミン生産 1.2 g/L を実証した。</p> <p>(1) 3.1%</p> <p>(2) IS、トキシン遺伝子はすべて削除、染色体長は 2.98 Mbp までに縮小化</p> <p>(3) S化、<i>proVXW</i> 復帰により生育特性を改良、ATP 供給活性の増大</p> <p>(4) 亜鉛応答型プロモーター群の収集とアルギニン生産での実証</p>	<p>達成</p> <p>(1) 達成</p> <p>(2) IS、トキシン遺伝子の排除は達成、染色体縮小化に関しては 180 kbp の未達成</p> <p>(3) 達成</p> <p>(4) 達成</p>

1-②枯草菌RGF (Refined Genome Factory) の研究開発 (花王株式会社)

目 標	研究開発成果	達成度
(1) 枯草菌ゲノム改良技術の構築	(1) 枯草菌ゲノムを効率良く強化・削除する技術を構築	(1) 達成
(2) 不要遺伝子が削除された縮小株の構築 1.3~1.5Mbp 削除株	(2) 1.5Mbp 削除株の構築に成功	(2) 達成
(3) 酵素生産性を MGB874 株の2倍以上に向上	(3) セルラーゼ生産性を MGB874 株の2.5倍に向上	(3) 達成
(4) プロモーター改変等による蛋白質分泌生産に関わる制御技術の構築	(4) プロモーター改変等により窒素代謝、および、炭素代謝の人為的制御技術を構築し、増殖と酵素生産の制御に成功	(4) 達成
(5) 代謝活動の持続などによる高機能化	(5) 緊縮応答に関わる遺伝子の多重欠失によりセルラーゼ生産性を MGB874 株に比べて 20%向上	(5) 達成
(6) 細胞膜・壁の人工改変	(6) 細胞表層のアニオン性ポリマー組成の改変、および、細胞膜脂質改変による酵素生産強化に成功	(6) 達成
(7) ゲノム縮小株への技術統合による生産性向上	(7) ゲノム縮小株に、分泌装置強化、代謝制御を統合し、セルラーゼ生産性を MGB874 株の2.5倍に向上	(7) 達成
(8) 異種蛋白質(インターフェロン)の高生産化技術の構築に成功した	(8) 異種蛋白質(インターフェロン)の高生産化技術の構築に成功	(8) 達成
(9) 有用酵素生産に特化したリボソーム専有化技術の構築	(9) 有用酵素生産に特化したリボソーム専有化株の構築	(9) 達成
(10) 分泌装置の強化・改良技術の構築	(10) Sec 系分泌装置の強化・改良による酵素高生産化に成功	(10) 達成
(11) 溶菌抑制技術の構築	(11) 新規溶菌抑制技術の構築に成功	(11) 達成

1-③分裂酵母高性能宿主細胞創製技術の研究開発(旭硝子株式会社)

目 標	研究開発成果	達成度
<p>(1) 特異的遺伝子発現制御技術 外来遺伝子機能安定導入技術開発</p> <p>遺伝子発現制御機能付与技術開発</p>	<p>(1) 外来遺伝子組込みに最適な遺伝子座を特定、最大 5 コピーの発現ユニットを一度に組込むことが可能であることを見出した。 熱ならびに多様なストレスによって外来遺伝子の発現が誘導される系を確立、培養後期に特異的に発現するプロモーターの取得に成功した。</p>	<p>(1) 達成</p>
<p>(2) ユーティリティー機能増強技術開発 エネルギー供給系の解明と最適化技術開発</p> <p>分子シャペロン群の解明と最適化技術開発</p> <p>小胞体ストレスの検出・回避技術開発</p> <p>翻訳後修飾系の制御技術開発</p>	<p>(2) 窒素飢餓応答やアミノ酸代謝変動に起因するタンパク質生合成系の活性化を、オミックス解析から確認した。 複数の薬剤添加や Pdi1・Hsp16 の過剰生産によって分泌生産量が上昇することを見出した。 ERAD 軽減変異株において分泌生産量が上昇することを見出した。 O-結合型糖鎖構造最小化(omh1 破壊株)・N-結合型糖鎖構造最小化(gms1och1・alg3och1 破壊株)・ガラクトース付加完全削除・外来マンノシダーゼ発現系が実現した。</p>	<p>(2) おおむね達成</p> <p>(バイアンテナ型糖鎖付加タンパク質の効率的な生産に関しては未達のため研究開発を継続)</p>
<p>(3) 異種蛋白質やその生産系を利用した低分子化合物の生産性がプロジェクト開始時における世界最高値の 2 倍以上の生産性を達成する。</p>	<p>(3) 野生株と同等の増殖性能を示す大規模削除株が得られ、異種タンパク質生産性が 1.9 倍から 2.6 倍に向上したことが、ヒト成長ホルモンならびにトランスフェリンにおいて示された。</p>	<p>(3) 達成</p>

1-④発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発

(独立行政法人製品評価技術基盤機構)

目 標	研究開発成果	達成度
<p>(1) 培養 MGF-01 株及び <i>E. coli</i> K-12 W3110 株の培養条件の検討</p>	<p>(1) MGF-01 株の培養を行い、<i>E. coli</i> K-12 W3110 株に比べ高性能増殖の過程を捉えることに成功した。</p>	<p>(1) 達成</p>
<p>(2) 網羅的プロテオーム解析 <i>E. coli</i> K-12 W3110 株の総遺伝子数 4,388 の 35%以上を検出</p>	<p>(2) <i>E. coli</i> K-12 W3110 株 1,641 検出 (38.3%) MGF-01 株 1,385 検出 (31.6%)</p>	<p>(2) 達成</p>
<p>(3) データ解析及び提供 プロテオーム解析データを協和発酵に対し迅速に提供</p>	<p>(3) MGF-01 株の代謝解析を行い、協和発酵にプロテオーム解析データを提供した。</p>	<p>(3) 達成</p>

1. 2 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発

2-①非水系反応場におけるバイオプロセスの構築(ダイセル化学工業株式会社)

目 標	研究開発成果	達成度
<p>(1)非水系生体触媒細胞デザイン技術開発 「生物機能を活用した生産プロセスの基盤技術開発」プロジェクトにおいて見出された有機溶媒耐性微生物である <i>Micrococcus</i> sp. DC2201 株(以下 DC 2201 株)等を利用して、疎水性物質の変換が可能な実用的生体触媒を作成する。そのためにダイセル化学工業が宿主ベクター系の開発を行うとともに、DC2201 株等への水素酸化能付与に関する研究を東京大学と、水素利用細菌を宿主とした微生物触媒の開発を茨城大学と共同実施する。</p>	<p>(1) 1)有機溶媒耐性 <i>K. rhizophila</i> DC2201 株(以下、DC2201)のプラスミドベクターによる基本的な形質転換系を構築することが出来た。 2)DC2201 を用いて医薬品中間体として有用な (R)-マンデル酸(RMA)、(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチル(ECHB)生産に関して検討を行い、大腸菌と比較して飛躍的に生産性が上がり、それらの蓄積量(RMA 211 g/L(水相)、ECHB 355 g/L(酢酸ブチル相))も世界最高レベルであった。STY は RMA が 8.8 g/L/h、ECHB が 2.1g/L/h であり、当初の目標を達成した。 3)水素酸化細菌宿主として <i>Ralstonia eutropha</i> H16 株および <i>Rhodococcus opacus</i> MR11 株を使用し、ヒドロゲナーゼと不斉還元酵素の共発現、共役系によって、(R)-1,2-プロパンジオールと(R)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチル生産を実現した。 4)有機溶媒耐性株と大腸菌に NAD 還元型ヒドロゲナーゼを発現させ、物質生産に資することを目標に研究を進め、大腸菌に NAD 還元型ヒドロゲナーゼの発現が確認された。</p>	<p>(1) 達成</p>
<p>(2)複合反応システムデザイン技術開発 芳香族化合物等の疎水性物質の変換に有用な水酸化酵素、酸素添加酵素、炭素-炭素結合酵素、還元酵素、エネルギー再生酵素等を岐阜大学、独立行政法人 産業技術総合研究所(以下 産業技術総合研究所)と共同実施体制で収集する。また、岐阜大学、兵庫県立大学と酵素の有機溶媒耐性機構の解明を共同実施する。酵素のコンポーネント等の機能解析を行ない、反応とエネルギー再生を組み合わせた複合反応システムを構築して、(1)で作成した非水系生体触媒細胞においてそれらの効率的発現を検討する。当該技術の有用性・汎用性を実証するため、有機溶媒、超臨界流体等を用いた非水系反応場で、ポリマー原料となる芳香族酸、脂肪族アルコール、アダマンタン類酸化物等の生成反応を実施する。中間・最終目標及び実用化・成果普及プランについては以下の通りとする。</p>	<p>(2) 1)<i>Arthrobacter</i> F73 のニトリラーゼを取り上げ、ランダム変異導入による有機溶媒耐性が向上した強化変異体の取得を行なった。その構造特性を明らかにするために、野生型ニトリラーゼを高純度で精製した。 2)難水溶性の基質であるアダマンタンおよびイソイゲノールに作用する微生物酵素の探索を実施し、見出したイソイゲノールの変換には有機溶媒耐性宿主が適することを示した。 3)脱炭酸酵素の炭酸固定活性を活用した有用カルボン酸の酵素合成を目指し、超臨界二酸化炭素条件下で機能する酵素の探索を進め、<i>Bacillus</i> 属細菌に高温域で安定に活性を示す菌株を見いだした。 4)メタゲノム的手法を用いて、排水から採取した新規な芳香族水酸化酵素の機能を評価し、DC2201 への導入を検討した。 5)有機溶媒耐性ニトリラーゼを精製し、その性状を調査したが、精製後、時間経過に伴ってさらに大きな凝集状態に移って行く傾向も見られることがわかった。 6)2,6-dihydroxybenzoate decarboxylase の結晶化および結晶構造解析に成功した。</p>	<p>(2) 達成</p>

2-②酸素添加酵素の高機能化・多様化技術の研究開発(メルシャン株式会社)

目 標	研究開発成果	達成度
<p>(1)酸素添加酵素任意デザイン化技術の開発 (メルシャン) 1)ビタミン D およびステロイド骨格を有する化合物に対して任意の部位を水酸化しうる P450 をデザインし、取得実証すること</p> <p>2)最適宿主と最適プロセスの開発により、活性型ビタミン D の収率も含めた生産性を従来技術の 10 倍とすること</p> <p>(2)酸素添加酵素の結晶構造解析技術の研究開発 (産総研) 酵素・基質複合体構造解析技術の開発</p> <p>(3)Whole cell catalyst における酵素反応場の解析・制御技術の開発 (大阪大学) 反応律速因子の任意制御技術開発</p> <p>(4)マルチコンポーネント酸化酵素系の反応場制御基盤技術の開発 (広島大学) 酸素添加反応に最適な菌株構築技術の開発</p>	<p>(1) 1)副反応を低減したビタミン D3水酸化酵素を創製した。26 位水酸化副反応制御を達成したことで任意の部位の水酸化制御の可能性を示せた。</p> <p>2)ビタミンD3変換系において酵素機能改変、宿主改良により従来変換株の生産性は数倍向上した。</p> <p>(2) 野生型 Vdh と高活性型変位体 Vdh-K1 について基質フリーならびに基質との複合体それぞれの構造解析に成功した。この構造情報を元に機能改変型酵素の作製に貢献した。</p> <p>(3) 酸素添加反応に影響を及ぼしうる反応場構成因子を細胞内外の各レベルで同定・検証した。細胞内反応場構成因子として大腸菌をモデルに 3 つの遺伝子を同定した。一方、細胞外レベルでの反応場構成因子として、細胞の表層疎水度に着目し、有機溶媒存在下での微生物変換反応におけるそれらの影響を定量化した。リアクタースケールでのパラメーター操作により疎水性細菌を用いた物質生産システムの最適化に成功した。</p> <p>(4) Vdh の Red/Ox パートナーを特定し酸素添加反応の至適化を可能にした。 ミコール酸合成系、排出ポンプが <i>R. opacus</i> B4 株の有機溶媒耐性に関わることを発見。耐性機構を明らかにした。</p>	<p>(1) 1) ほぼ達成 方針変更して酵素改変によるビタミン D の水酸化反応制御に集中して研究した(このためステロイド化合物に対しては未達成)。</p> <p>2) 一部達成(達成度 80%) <i>P. autotrophica</i>による変換系では最終到達点の 10 倍の生産性向上には至らなかったが、工業生産菌からの改善であることを考慮すれば画期的である。促進因子重複活用でさらに生産性向上が期待できる。</p> <p>(2) 達成</p> <p>(3) ほぼ達成</p> <p>(4) ほぼ達成 Red/Ox パートナー挙動解析は 2011 年 8 月達成見込み</p>

2-③高効率酵素設計のための酵素反応シミュレーション技術の研究開発(日本電気株式会社)

目 標	研究開発成果	達成度
(1) 酵素-基質ドッキング構造予測技術の開発	(1) 精度70%(従来の2.6倍)	(1) 達成
(2) 酵素改変部位予測技術の開発	(2) P450 の新規基質に対する変異予測ヒット率57%(ランダム変異に対して58倍)。副反応は最大で1/3に抑制。	(2) 達成
(3) 量子化学計算 CAS 法の高速計算プログラムの開発	(3) 計算速度3倍。P450 の反応活性種と推測されている compound I の2種の構造(perferryl-oxo種と ferryl-oxo 種)を計算し、水酸化過程の反応メカニズムの新たな仮説提案	(3) 達成

2-④微生物複合酵素系の産業用触媒としての研究開発(株式会社カネカ)

目 標	研究開発成果	達成度
<p>有用物質生産プロセスに用いる複合酵素系微生物触媒の開発を目標とする。研究対象としては、酵素的立体反転反応による光学活性化合物生産プロセスの開発及び他の複合酵素系プロセスの開発(アミノ基転移反応、オレフィン還元反応、水酸化反応、炭素-炭素結合反応、転移反応、ラジカル重合反応、二重結合転移・飽和化・不飽和化反応など)である。プロセスの生産性としては、蓄積濃度で50-100g/L(2-5g/L/h程度)をめざす。</p> <p>(1)高機能性 Multi-component 酵素系による光学活性アミノ酸生産プロセスの開発</p> <p>(2)高機能性 Multi-component 酵素系による光学活性アルコール生産プロセスの開発</p> <p>(3)高機能性 Multi-component 酵素系の探索・機能解析</p> <p>(4)Multi-component 酵素系の機能発現制御技術の開発</p> <p>(5)最適反応場・プロセスの構築</p>	<p>プロジェクト前半は、主にプロセスの構築に必要な情報を収集し、必要な酵素群を取得して、その機能解明及び高機能化検討を実施し、これら酵素群の使用によるプロセスの実現性を評価し、その実例を示した。後半では、ファインケミカル生産に有用な複合酵素系の機能発現制御技術の開発、及び反応場と生産プロセスの構築に関する研究開発を行なった。</p> <p>(1)4酵素からなる複合酵素系による L 体の非天然アミノ酸の安価生産プロセスを開発した(100g/L)。</p> <p>(2)1)4 酵素からなる複合酵素系によるキラルジオール類の安価生産プロセスを開発した(100g/L)。 2)アミノ基転移と酸化還元酵素からなるキラルアミン類の生産プロセスを開発した(50g/L)。</p> <p>(3)1)β-アミノ酸生産に有用な新規なアミノ基転移酵素を発見し、その性質を調べた。 2)酵母解糖系と共役可能なアルドラーゼ活性菌を取得した。4-ヒドロキシアミノ酸生産に有用なアルドラーゼ類を探索し、有用な酵素群を発見した。 3)高度不飽和脂肪酸に関する不飽和化活性菌を発見した。脂肪酸の二重結合水和化活性を発見した。 4)ヒドロキシイソロイシン生産に有用な 2-ケトグルタル酸依存性の新規ジオキシゲナーゼを発見した。</p> <p>(4)1)FMN 依存酸化還元酵素系の解析を行なった。 2)パチルスのシクロム P450 水酸化酵素の活性化因子を探索し、スーパーオキシドディスムターゼが有効であることを発見した。 3)乳酸菌による高度不飽和脂肪酸の分子内二重結合異性異化メカニズムを解明した。 4)ラッカーゼ・ペルオキシダーゼの活性賦活化メディエーター活性を各種物質中に発見した。 5)ジオキシゲナーゼの補酵素である 2-ケトグルタル酸を効率よく供給する大腸菌を育種した。</p> <p>(5)1)アクチノールを生産する 4 酵素からなる酸化還元複合酵素系プロセスを開発した(100g/L)。 2)パン酵母解糖系の高エネルギー化合物供給系と酵素的アルドール縮合反応からなるリン酸化糖類の生産プロセスを開発した(50g/L)。 3)ジオキシゲナーゼ機能化大腸菌を用いてヒドロキシイソロイシン生産プロセスを開発した(70g/L)。 4)アルドラーゼ・アミノ基転移酵素共役系によるヒドロキシアミノ酸生産プロセスを開発した(5g/L)。 5)乳酸菌の共役化酵素群発現大腸菌を用いて共役脂肪酸生産プロセスを開発した(50mg/ml)。 6)乳酸菌の水和複合酵素系を用いるキラル水酸化脂肪酸生産プロセスを開発した(25g/L)。</p>	<p>(1)達成</p> <p>(2)達成</p> <p>(3)達成</p> <p>(4)達成</p> <p>(5)達成</p>

2-⑤放線菌の活用による新規二次代謝産物の開発(明治製菓株式会社)

目 標	研究開発成果	達成度
(1)非天然型抗生物質Bの培養生産性 200~300mg/L/D	(1)非天然型抗生物質Bの培養生産性 175mg/L/D	(1) ほぼ達成

2-⑥発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発

(独立行政法人製品評価技術基盤機構)

目 標	研究開発成果	達成度
(1) <i>R. opacus</i> B4 株の培養 <i>R. opacus</i> B4株及び有機溶媒耐性劣化株 の培養条件の検討	(1) 非水系バイオプロセスを考慮した有機溶媒接触 方法を検討し、 <i>R. opacus</i> B4 株及び有機溶媒耐 性欠損株の培養菌体を採集した。	(1) 達成
(2) <i>K. rhizophila</i> DC2201 株の培養条件の検 討	(2) 非水系バイオプロセスを考慮した有機溶媒接触 方法を検討し、 <i>K. rhizophila</i> DC2201 株の培養菌 体を採集した。	(2) 達成
(3) 網羅的プロテオーム解析 非水系バイオプロセスを考慮した有機溶媒 耐性菌の網羅的プロテオーム解析を実施	(3) <i>R. opacus</i> B4 株 1,966 検出 (23.5%) 有機溶媒耐性劣化株 2,541 検出 (30.4%) <i>K. rhizophila</i> DC2201 株 1,446 検出 (61.4%)	(3) 達成
(4) 膜タンパク質のプロテオーム解析技術 の開発 膜タンパク質のプロテオーム解析技術の 開発に着手する。	(4) 多次元法及び前処理法を改良し、解析に必要な 膜タンパク質の検出に成功した。	(4) 達成
(5) データ解析及び提供 プロテオーム解析データを共同実施先に対 し迅速に提供	(5) 有機溶媒耐性菌の代謝解析を行い。共同実施先 の大阪大学、広島大学、ダイセル化学にプロテ オーム解析データを提供した。	(5) 達成

1.3 バイオリファイナリー技術の開発

3-①ソフトバイオマス糖化技術の開発・増殖非依存型バイオプロセスの開発・トータルシステムの開発(財団法人地球環境産業技術研究機構)

目 標	研究開発成果	達成度
(1)ソフトバイオマス糖化技術の開発 セルロソーム機能を利用した高効率糖化プロセスの基盤技術の確立	(1) ソフトバイオマスの分解に最適化されたミニセルロソームを構築 コリネ型細菌による人工セルロソームの生成を確認 コリネ型細菌の高効率分泌シグナルと分泌能向上変異株を取得 耐熱性セルラーゼの特性・構造を解明 メタゲノム的手法により新規セルラーゼを取得 などの要素技術を確立 酵素再利用法により、リグニン含有古紙を糖化率80%で400時間超の連続糖化	(1) 達成
(2)増殖非依存型バイオプロセスの開発 ホスト菌(コリネ型細菌)の細胞機能の統合的解明による生産性向上の基盤要素技術の確立	(2) 糖取り込み系、中央代謝系、各種物質輸送代謝系、細胞複製に関わる遺伝子の機能・制御機構を解明 解糖系酵素発現量の改変による生産性の大幅向上を確認 糖消費速度が向上する遺伝子改変株を取得 補酵素再生系の改変による生産性の大幅向上を確認 糖取り込み系の改変による糖利用能の大幅向上・拡大を達成 高感度・精度メタボローム解析手法を確立 などの要素技術を確立	(2) 達成
各種化合物の高効率生成システムの確立 (STY 10 g/L/h 以上)	D-乳酸、L-アラニン、キシリトール、パリンについて 10 g/L/h 以上の高効率生成を確認	達成
(3)トータルシステムの開発 ソフトバイオマスからの基幹物質生産について基礎データ取得	(3) 増殖非依存型バイオプロセスの発酵阻害物質耐性を確認 C6, C5 混合糖(グルコース、キシロース、アラビノース、セロビオース、マンノース)の完全同時利用技術を確立 古紙からD-乳酸の高効率生成を確認	(3) 達成
(4)ベンチプラントによる実証試験 増殖非依存型バイオプロセスのスケールアップ時の反応条件の最適化	(4) 10 Lスケールで、フラスコスケールレベルと同等以上の生産性を確認	(4) 達成

3-②メンブレン利用高効率発酵システムによる有機酸製造基盤技術の開発(東レ株式会社)

目 標	研究開発成果	達成度
(1)膜利用革新的発酵リアクターの開発 ピルビン酸またはD-乳酸を対象としたS TY(Space/Time/Yield)10g/L/h以上 の生産性を持つ膜利用革新的発酵リアク ターの基本プロセスの決定とパイロット設 備へのスケールアップ実証	(1) パイロットスケールにおいてD-乳酸 STY が 11. 2g/L/hr で、800時間の連続発酵を達成	(1) 達成
(2)D-乳酸製造用組換え酵母の創出 高光学純度 D-乳酸製造用酵母を創出	(2) D-乳酸光学純度99. 9%e. e. 、対糖収率90% のD-乳酸発酵酵母を開発した。	(2) 達成
(3)高選択性分離膜を組み込んだ精製プロセ スの開発 精製プロセス基盤技術確立とベンチスケ ールスケールアップ	(3) NF/RO膜を用いた高効率D-乳酸精製プロセ ス基盤技術を確立、ベンチスケールで実証した。	(3) 達成

1. 4 総合調査研究(財団法人バイオインダストリー協会)

目 標	研究開発成果	達成度
総合調査研究 (1)研究開発委員会等開催 本委員会 9回 分科会 15回 研究計画検討会 4回	(1) 9回 15回 4回	(1) 達成 達成 達成
(2)研究技術動向調査等報告 6報以上	(2) 10報	(2) 達成

2. 研究開発項目毎の成果

2.1 高性能宿主細胞創製技術の開発

2.1.1 大腸菌 DGF の研究開発 (協和発酵キリン株式会社)

2.1.1.1 染色体遺伝子構成のシンプル化

染色体縮小化株 MGF-02 (62 領域、1.16 Mbp を欠失) を出発菌株として、更に染色体の縮小化を進めることとした。詳細は後述するが、K-12 株がもともと保有している代謝上の変異点 2 点を同時に野生型に復帰させると (S 化) 菌株の生育がより安定化する。そこでまず MGF-02 株の S 化株を作製し、この MGF-02S 株から不要遺伝子の削除を進めた。特に染色体上の様々な場所に飛び込む性質を持ち遺伝型の不安定化をもたらす IS 配列の除去を中心に染色体加工を進めた。また MGF-02 株で既に欠失している 096 領域 (*proVXW* を含む) は浸透圧耐性ならびに初期成育に重要な役割を持つことが判明し (後述)、096 領域の復帰を行った。最終的に、合計 92 領域を欠失させ、野生型株染色体 (4.65 Mbp) の 36% にあたる領域を除去した。作製した株の染色体総延長は 2.98 Mbp となり、本染色体縮小化株を DGF-298 株と称する。本菌株は野生型株が保有する 51 個の IS 配列をすべて除去したのになっている。野生型染色体から DGF-298 株に至る、代表的な染色体縮小化株を図 1 にまとめた。また DGF-298 株の染色体構造の模式図を図 2 に示した。DGF-298 株は M9 最小培地で生育することが可能であり、野生型株よりも生育の立ち上がり早い。本菌株のゲノムシーケンシングを実施し、変異点の解析も終了した。

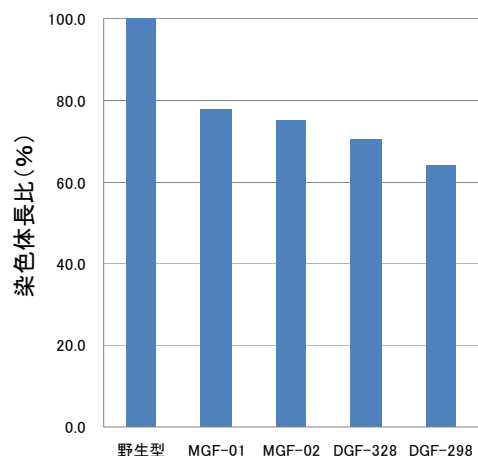


図 1. 代表的な菌株の染色体長

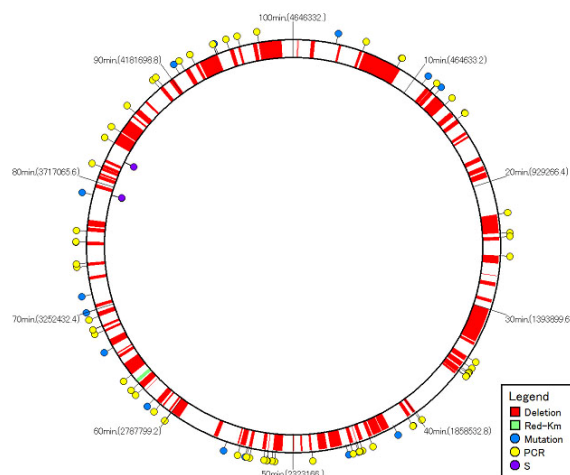


図 2. DGF-298 株の染色体構造模式図

大腸菌染色体を円で表し、頂点にゲノム配列 (AC_000091) の塩基番号 1 番を置いた。赤いボックスは染色体縮小化にともない削除した領域を表し、黄緑色のボックスは Red 組換え系が置換的に挿入されている部分を示した。円周の外側のピンは点変異部位を表し、黄色は染色体加工時の手法に由来するもの、水色は自発的な変異点を示す。内側の紫のピンは、S 化で導入した機能遺伝子の位置で、下が *pyrE* 遺伝子座、上が *ilvG* 遺伝子座を表す。

プロジェクト開始当初での最新データベース(Riley M, and et al. (2006) *Nucleic Acids Res.* 34:1-9)で、染色体縮小株の親株であるW3110株、MGF-02株、ならびにDGF-298株が持つ遺伝子群の機能分類を行った。その結果を表1に示す。機能推定さえもできない機能未知遺伝子群はW3110株で619遺伝子存在するとされていた(表1、Partial informationとUnknown functionの総和)。DGF-298株ではこのカテゴリーの遺伝子の41%を削除して、残りは365遺伝子となっている。またISなどのモバイルエレメントを積極的に排除しており、野生株で321遺伝子あったもの(表1、Phage/IS in commonとPhage/IS in common, predictedの総和)を94%排除し、DGF-298株では19遺伝子までに減少させている。またこのデータベースでは機能に関してエビデンスのある遺伝子と無い遺伝子を分類している。その数字を利用すると、W3110株ではエビデンスの無い遺伝子の割合が45.7%あったものが、DGF-298株では38.3%にまで減少した。

表1:染色体縮小化株に残存する遺伝子の機能分類

	W3110	MGF-02	DGF-298
Enzyme	1092	944	858
Enzyme, predicted	391	279	233
Transporter	343	247	213
Transporter, predicted	254	159	133
Regulator	242	183	148
Regulator, predicted	164	103	83
Membrane	43	36	32
Membrane, predicted	211	155	131
Factor	149	130	111
Factor, predicted	61	50	46
Structural component	88	71	60
Structural component, predicted	37	35	28
Carrier	77	66	63
Carrier, predicted	42	30	28
RNA	156	144	137
Lipoprotein	46	38	31
Cell process	56	50	49
Leader peptide	11	11	10
Pseudogenes in common	74	30	17
Site (OriC)	1	1	1
Phage/IS in common	311	77	15
Phage/IS in common, predicted	10	6	4
Partial information	147	101	92
Unknown function	472	327	273
Total	4478	3273	2796
With evidence	2433	1965	1725
Without evidence	2045	1308	1071
Without evidence/Total	45.7%	40.0%	38.3%

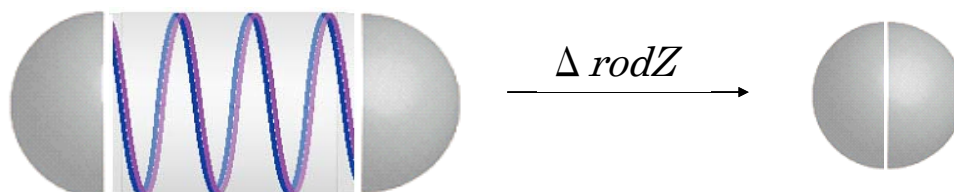
2. 1. 1. 2 遺伝子機能解明

KO ライブラリー(一遺伝子破壊株ライブラリー)の各菌株の BIOLOG 試験結果から、破壊すると代謝プロファイルが大きく変化する機能未知遺伝子 65 個を選抜した(表2)。この中で *yfgA* と *ybgT* の2つの遺伝子は、MGF-01WS 株(MGF-01 株の改良株で、S 化されている)を親株とした場合、破壊することができず、必須性が高い遺伝子であることが示唆された。2つの遺伝子のうち、*yfgA* については、共同研究先の国立遺伝学研究所仁木研究室の解析により、大腸菌細胞の桿菌形態を維持するために必要な遺伝子であることが判明した(*yfgA*=*rodZ*、図3)。野生株で *rodZ* を破壊すると、大腸菌が球菌化すると同時に、TCA 関連有機酸の資化能力が大幅に低下する。この結果は、菌体のシリンダー部分がなくなると代謝へ大きな影響がでることを示唆している。

表 2:破壊すると代謝プロファイルが大きく変化する機能未知遺伝子リスト

JW0104 (ppdD)	JW1221 (ychJ)	JW1664 (ydhY)	JW2420 (yfeT)	JW2879 (ygfA)	JW5001 (htgA)	JW5494 (hybB)
JW0126 (yadE)	JW1246 (yciB)	JW1680 (ydiM)	JW2451 (yffH)	JW3201 (yhcM)	JW5004 (caiE)	JW5528 (yrrA)
JW0144 (hrpB)	JW1272 (yciM)	JW1716 (yniC)	JW2478 (yfgO)	JW3357 (yrfC)	JW5049 (ykiB)	JW5539 (yhcB)
JW0380 (yaiA)	JW1333 (abgR)	JW1747 (ynjF)	JW2500 (yfgA)	JW3430 (yhhF)	JW5123 (ycbV)	JW5832 (yedQ)
JW0394 (yajB)	JW1336 (ydaN)	JW1822 (yebS)	JW2538 (yfhA)	JW3586 (yibN)	JW5152 (yceP)	JW5911 (yniD)
JW0667 (ybfM)	JW1445 (yncC)	JW1835 (yebE)	JW2559 (yfiC)	JW3690 (yieE)	JW5199 (yciX)	
JW0724 (ybgT)	JW1492 (ydeM)	JW1842 (yebK)	JW2635 (ygaF)	JW3983 (yjbD)	JW5203 (ymjB)	
JW0725 (ybgE)	JW1587 (ynfL)	JW1958 (yeeI)	JW2759 (gudX)	JW4101 (yjeH)	JW5287 (ynjE)	
JW0726 (ybgC)	JW1588 (ynfM)	JW2092 (yohL)	JW2864 (ygfX)	JW4116 (poxA)	JW5309 (yecM)	
JW1052 (mdtH)	JW1631 (ydhA)	JW2319 (yfcJ)	JW2865 (ygfY)	JW4134 (yjeT)	JW5473 (ygfB)	

MGF-01SW 株を親株として、各遺伝子の破壊を個別に行ったところ、黄緑のマーカーで示した *yfgA* と *ybgT* については破壊することができなかった。

図 3. *rodZ* (*yfgA*) を欠失させた株の形態変化模式図

大腸菌菌体を灰色で模式的に表した。左側の桿菌図で、螺旋を形成している粒子が RodZ 蛋白質である。*rodZ* 欠損株は、シリンダー部分が形成されず、球菌となる(Shiomi D., and et al. (2008) *EMBO J.* 27:3081-3091)。

欠失統合化検討の中から、機能既知アミノトランスフェラーゼ遺伝子 *avtA* と同時に破壊すると栄養要求性を示す機能未知遺伝子2つ、*yfbQ*、*yfdZ* を見いだした。これら3つの遺伝子破壊株は、アラニン要求性を示すことが判明した。この結果から、*yfbQ*、*yfdZ* 遺伝子はアラニン合成を司るアミノトランスフェラーゼをコードすると結論した。最近になり、米国のグループから論文が発表され、我々の結論と同様、両遺伝子が glutamic-pyruvic transaminase をコードし、アラニン合成に係る遺伝子であることが示された(Kim S. H., and et al. (2010) *J. Bacteriol.* 192:5304-5311)。その論文では、*yfbQ*=*alaA*、*yfdZ*=*alaC* と名づけられた。アラニン合成に係る3遺伝子のうち、染色体縮小化 DGF-298 株では *yfbQ* のみが保持されている。

国立遺伝学研究所仁木研究室において、機能未知遺伝子欠損株 1188 株を対象とし、DNA 複製の制御に関与する機能未知遺伝子のスクリーニングを行った。その中で、栄養要求性に起因して見かけの DNA 複製制御異常を示した $\Delta yhhK$ 株を見出した。*in vivo* 実験から *yhhK* はパントテン酸合成に係る遺伝子であることが判明した。*in vitro* 実験からは、YhhK はパントテン酸合成酵素の一つ PanD (L-aspartate- α -decarboxylase) の切断、活性化に係る因子であることが判明した (図4)。

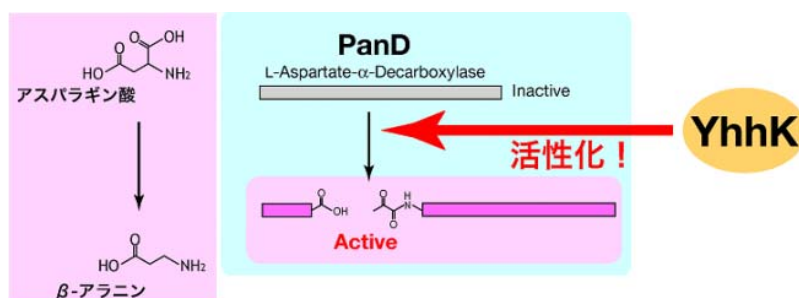


図 4. YhhK の機能

アスパラギン酸をβ-アラニンに変換する脱炭酸酵素 (L-Aspartate- α -decarboxylase) は、不活性型酵素として翻訳されるが、YhhK に依存した N 末端部位の切断により、活性体へと変換される。

プロジェクト開始当時に欠失可能と考えられた遺伝子以外で、論文報告が見られない機能未知遺伝子群を選抜したところ 897 遺伝子が見出された。これらの遺伝子に対応する KO ライブラリー株の BIOLOG 試験結果を解析し、遺伝子破壊により資化力が低下する化合物数に基づいてカテゴリー分けした結果が表3である。資化力が劣化する化合物数が 2 以上になる機能未知遺伝子破壊株は 65 株あり、それらで破壊された遺伝子群は先に示した表 2 に記載した。これら 65 遺伝子を MGF-01WS 株にて破壊し(2 遺伝子は破壊できず)、その破壊株の生育を検証したところ、7 株にて生育の悪化が見られた(表3)。この結果から、生育に悪影響が出る遺伝子破壊の割合は、このカテゴリーでは $9/65=14\%$ であった。一方、資化力が劣化する化合物数が1のカテゴリーから70株を選抜し、MGF-01WS 株にて破壊し、その破壊株の生育を検証したところ、3 株で生育の悪化が見られた(表3)。この結果から、生育に悪影響が出る遺伝子破壊の割合は、このカテゴリーでは $3/70=4.3\%$ であった。資化力が劣化する化合物数が0または1のカテゴリーで、この割合が適用できるとすれば、このカテゴリー中で生育悪化を引き起こす可能性がある遺伝子の数は $792 \times 4.3\% = 34$ 遺伝子、と計算された。ここまでの結果を総合すると、897 ある機能未知遺伝子のうち、削除できないものは 83 遺伝子程度と推定される(表3)。DGF-298 株は 2796 遺伝子 (RNA を除くと 2659 遺伝子) から構成されており、削除できない機能未知遺伝子 83 という数字は、全体 (2659) の 3.1% である。これらの結果から、DGF-298 株の遺伝子構成は、削除できない機能未知遺伝子が 10% 以下に低減されていることが示唆された。削除可能性と既存情報をまとめたアノテーション表を現在作成中であり(国立遺伝学研究所との共同研究)、成果報告書に添付する予定である。

表 3: バイオログ試験結果に基づいた機能未知遺伝子破壊株分類

Biolog資化劣化 化合物数	株数	生育悪化株数、内訳
0	675	34 <i>ybaM, ydiJ, yohD</i> (総数は推定)
1	117	
2	42	5 <i>ygfY, ybgC, ygfA, yhhF, poxA</i>
3	12	1 <i>yhcB</i>
4	4	0
5	2	0
6	3	2 <i>yhcM, ybgT</i>
11	2	1 <i>yfgA</i>
No KO strain	40	40
Total	897	83

2. 1. 1. 3 宿主細胞の機能解析と改良

大腸菌 K-12 株がもともと保有している代謝上の変異点が 2 点知られていた。一つは *ilvG* に存在するフレームシフト変異であり、この変異のために K-12 株は最小培地ではバリン感受性を示す (Andersen D. C., and et al. (2001) *Biotechnol. Bioeng.* 75:212-218)。このバリン感受性はイソロイシンの添加で相補されるために、K-12 株のジャーフェーマンターの培養ではイソロイシンを添加し、培養を安定させる方法がよく用いられている。もう一つは *rph* 遺伝子のフレームシフト変異であり、下流の *pyrE* の発現を低下させるので、K-12 株は部分的なウラシル要求性を示す (Soupene E., and et al. (2003) *J. Bacteriol.* 185:5611-5626)。この 2 つの変異を同時に野生型に復帰させる (S 化) と菌株の生育が向上することがわかった。*ilvG* 変異の復帰は初期生育を安定化させ、*rph* (*pyrE*) 変異の復帰は培養後半での生育が増進する効果があった。MGF-01 株から MGF-02 株を

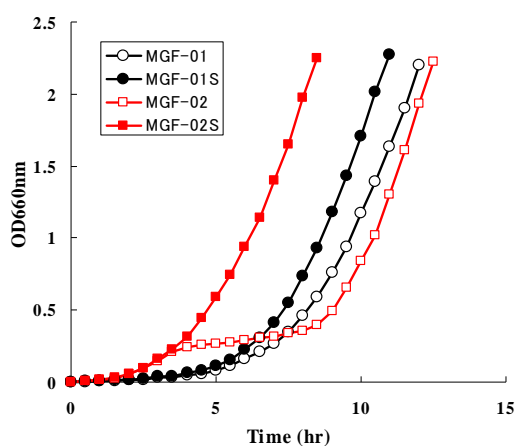


図 5. S 化による初期成育改善

MGF-01 株 (○)、MGF-01S 株 (●)、MGF-02 株 (□)、MGF-02S 株 (■) の生育経時変化を 660nm の濁度を自動濁度測定装置で計測した結果を示す。用いた培地は M9 最小培地で、37℃にて振盪培養した。

作製する工程では、グリシン分解系の活性化因子をコードする *gcvA* を欠失させ、K-12 株が保有する比較的強力なグリシン分解系を弱体化している。グリシン分解系を弱めることで、M9 最小培地を用いた培養試験での MGF-02 株の初期生育立ち上がりは早くなるがすぐに停滞期に入る (図5)。MGF-02 株を S 化することで、停滞期がなくなる事が判明した (図5)。このようにして作製した S 化 MGF-02 株を MGF-02S 株と命名し、更なる染色体縮小化の出発材料とした。先に記載した DGF-298 株も MGF-02S 株由来であり、S 化を継承している株である。

大腸菌は比較的溶菌し易い菌であり、長期間の培養が難しい。そこでトキシン遺伝子(発現すると細胞を自ら破壊する遺伝子群)の排除による細胞の長寿命化の可能性を検討した。野生株から6組のトキシン-アンチトキシン遺伝子(*mazEF*, *chpBS*, *hipBA*, *yefM-yoeB*, *relBE*, *dinJ-ycfQ*)を欠失させ、長期間培養での細胞の生存性を、フローサイトメーターを用いる手法にて計測したところ、*hipAB* を欠失させることで細胞の生存性が上昇することが判明した。メカニズム解析を行ったところ、*hipAB* 欠失は酸化ストレスが引き金になる細胞死を遅延させる効果があることがわかった(Kawano H., and et al. (2009) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73:117-123)。DGF-298株では上記6組のトキシン-アンチトキシンを欠失させている(例外的に *mazEF* についてはトキシン遺伝子 *mazE* のみ欠失させている)。

高塩濃度(5.0% NaCl)培地での培養結果から、これまでに作製してきたゲノム縮小化株は浸透圧耐性能が低下していることが判明した[野生株(耐性) > MGF-01株、MGF-02株 > DGF-326株]。原因となる遺伝子欠損を解析したところ、MGF-01株作製過程で欠失させた096領域[JW2652(*proI*)~JW2658(*ygaH*)]が浸透圧耐性能獲得に重要であることがわかった。096領域を復帰すると、浸透圧耐性能能力が向上すると同時に、各種培養での成育開始が早くなるという効果がある。そこで染色体縮小化工程の最終段階近くで、096領域は復帰させ、最終株であるDGF-298株は096領域を保持している。

MGF-02株への染色体縮小化においては、モバイルエレメントの積極的な排除を行っているが、MGF-02S株にはまだ17個のISが残存していた。ISは飢餓状態などで、飛火し、染色体上の様々な場所に挿入され、その数を増やしてゆく性質がある。ISが残存していると、遺伝型が安定化せず、高率な変異株出現の原因となる。そこでISの完全除去を行った。共同研究先の奈良先端大学におけるタイリングアレイCGH解析により、ISの残存を高感度に検出することができる。CGH解析結果を元に、ISの排除を進め、DGF-298株ではIS完全除去に成功した。またDGF-328株は設計上ISを完全除去した株であったが、CGH解析の結果、IS3とIS150が残存していることが判明した。これはDGF-328作製時に用いたP1ファージ由来で、欠失した411C領域[IS3が二つ、IS150が一つ存在、JW3528(*insK*)~JW3509(*dppF*)]が復帰した株が混じっていたためであった。DGF-328株から411C領域を欠失させた株DGF-326株(IS完全除去株)は、初期成育の悪化が見られた。そこで411C領域内の生育に重要と考えられる遺伝子群[JW5940(*bisC*)~JWR0080(*proK*)]のみをDGF-326株で復帰させ、IS完全削除株であるDGF-327株を作製した。このDGF-327株については、ゲノムリシーケンシングを実施し、IS完全削除株であることを確認すると同時に、変異点を同定した。

生育と細胞内のATP供給とは密接にかかわっているとされており、生育を損なわないように不要遺伝子を排除していった場合には、より無駄が低減し、ATP供給力が向上した菌株が作製されるものとの仮説を立てた。そこで染色体の縮小化においては、生育面で問題が発生しないことを条件に欠失する領域を定め、実際に欠失して生育上の問題がないことを確認しながら染色体加工を進めていった。生育に問題を生じさせる欠失については、染色体縮小化のデザインから外した。このようにして作製した一連の染色体縮小化株のATP供給能力をルシフェラーゼ法(Hara K. Y.,

and Mori H. (2006) *J. Biomol. Screen.* 11:310-317)を用いて測定した結果を図6に示す。染色体縮小化に伴い、細胞あたりの ATP 供給能力が高まっていることが判明した。

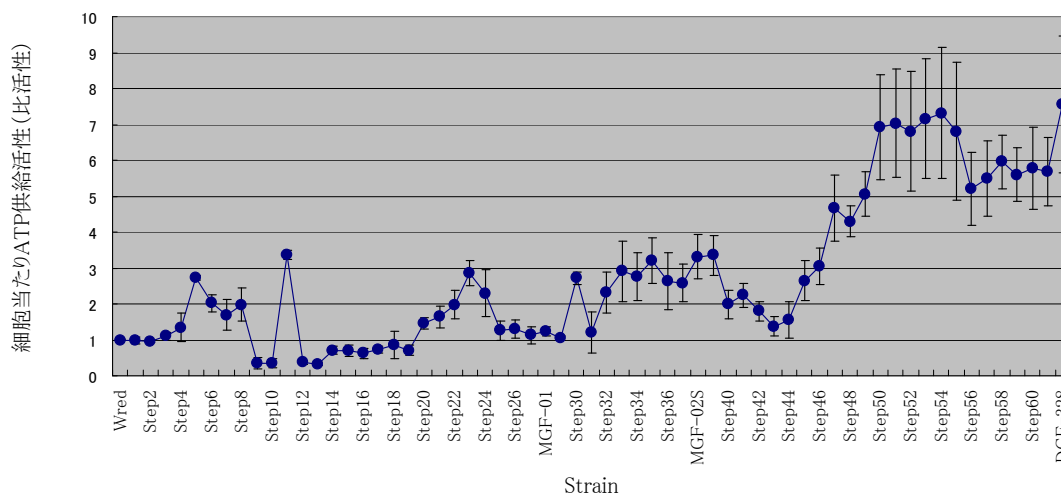


図 6. 染色体縮小化株の ATP 供給活性

野生型株 (W3110red 株) から DGF-328 株に至るまでの段階的な染色体縮小化株について、その ATP 供給活性を測定した。4 回の測定結果の平均値をプロットし、標準偏差をエラーバーとして示した。

2. 1. 1. 4 高度な遺伝子発現制御に使用可能なプロモーターの探索・開発

奈良先端大学との共同研究を進めた精度の高い転写解析可能なタイリングアレイを用いて、プロモーターの探索・評価を行った。小笠原研究室にて設計された新型タイリングアレイ (Genechip, AS 型タイリングアレイ) は、ゲノム両鎖について、約 32 塩基の均一な間隔で、25-mer のオリゴヌクレオチドプローブセットを、計 240,000 セット配置した、大腸菌 K-12 株用カスタムタイリングアレイであり、Affymetrix 社に依頼して作製した。設計に際し、ゲノム配列として W3110 株のシーケンス情報を使用し、affymetrix 社から提供された、ゲノム両鎖に対する、タイリングアレイフォーマットによりタイリングアレイの設計は行われている。本タイリングアレイのプローブ位置の最終的な確認は、インシリコクローニング社から提供されているタイリングアレイ解析に特化した表示ソフトである、IMC ソフトウェアを用いて行い、特定の領域にプローブの欠損等が集中した結果、極端にカバー率の低い領域ができていた等、設計時において判断可能な、実験実施上、重大な問題につながる設計上の問題がないことは確認済みである。

実用的なプロモーターの探索のために野生株 W3110 の S 化株 (W3110S) を、2L ジャーファーマンターにて高密度に培養し、経時的にサンプルを取得し発現解析を行った。有用プロモーターを探索し、Off→On 型プロモーター (培養途中ではじめて ON になる) および恒常的に発現しているプロモーターのリストを作成した。Off→On 型の発現をしている遺伝子群の中で On 時の発現が強く誘導されるものとして、Curli 合成関連の *csdB*、Zn の取り込みに関わる *yodA*、*znuA* を見だし、各

遺伝子のプロモーター (*P_{csg}*, *P_{yodA}*, *P_{znuA}*) について、アルギニンの生産系で評価を開始した。アルギニン生合成の鍵酵素である *argA* のフィードバック阻害を解除する変異を導入した *argA** をクロラムフェニコール耐性遺伝子と共に、染色体上の *argR* (アルギニン分解系の転写抑制、アルギニン合成系の転写活性に関与し、破壊するとアルギニンの生産が増大する) の位置に置換的に挿入した株 (この操作で *argR* は破壊される) を作製した。トリプトファンプロモーター (*P_{trp}*) と *yodA* プロモーター (*P_{yodA}*) を使用した場合の濁度とアルギニン生産量の経時変化を図7に示した。*P_{trp}* を使用した場合は、培養初期からアルギニン合成が始まり、その結果菌体増殖が低く抑えられる。一方で、*P_{yodA}* を使用した場合には、培養初期に *argA** の発現が抑えられるため、アルギニン生産が行われず菌体量が増加する。その結果、培養途中でアルギニン生産が開始する時点では、菌体量増加による生産速度の向上が確認された。このときアルギニンの生産速度の最大値は 3.29 g/l/h であり、*Corynebacterium* 属細菌を用いたアルギニン発酵の論文値 0.85 g/l/h を大きく上回った。

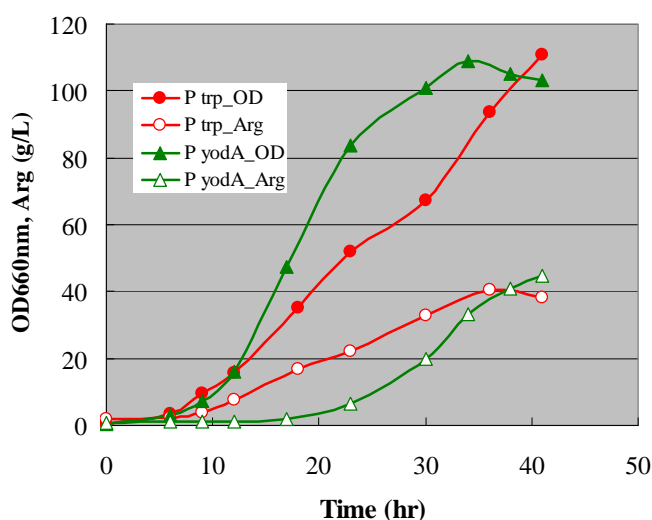


図 7. 生育連動型プロモーターを用いたアルギニン生産例

野生型株 W3110 を宿主として用いた。*P_{trp}* あるいは *P_{yodA}* を用いて *argA** を発現させることで、アルギニンを生産させた。*P_{trp}* を用いた場合の OD 値 (●) ならびにアルギニン蓄積量 (○)、*P_{yodA}* を用いた場合の OD 値 (▲) ならびにアルギニン蓄積量 (△) の変化を経時的に示した。

前記の *P_{yodA}* 以外にも様々な亜鉛応答型プロモーターが知られていたため、それらを収集し、 β ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lacZ*) をレポーターとして、亜鉛添加による制御性を検証した。初発亜鉛添加なし培地で培養を開始し、培養途中で亜鉛を添加した結果を図8にまとめた。亜鉛で抑制がかかる代表的なプロモーターとしては *P_{yodA}* があつた。逆に亜鉛で誘導がかかる代表的なプロモーターは *P_{zntA}* があつた。亜鉛の添加によりこれらプロモーターを制御することで、様々なプロファイルで遺伝子群の発現制御が可能となる。

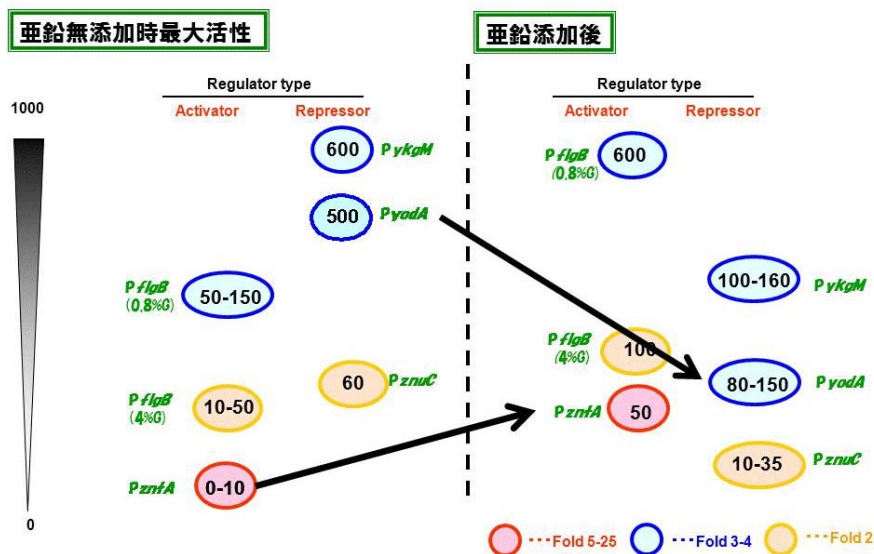


図 8. 亜鉛応答型プロモーター類の制御性

lacZ をレポーター遺伝子として用いて、各種亜鉛応答型プロモーターの亜鉛制御性を検証した。図の縦軸方向は、*LacZ* 活性のミラーユニットに相当し、上に位置するほど強く発現していることを示す。亜鉛無添加培養初期段階の各プロモーターからの *LacZ* 活性を、図左側に楕円の位置で表している。培養開始後 12 時間目に終濃度が 400 μM になるように硫酸亜鉛を添加し、*LacZ* 活性を測定した結果を右側の楕円位置で示した。*PflagB*、*PzntA* は亜鉛により発現誘導がかかるプロモーターであり、*PykgM*、*PyodA* と *PznuC* は亜鉛添加により発現抑制がかかるプロモーターである。各プロモーター発現強度の変化量(誘導時/抑制時)の大きさにより、発現強度を示す楕円を色分けしている。変化量が、5 以上、4~3、2 以下で分類し、それぞれ赤、青、黄色で色分けした。

2. 1. 1. 5 物質生産への応用

染色体縮小化株による ATP 供給が物質生産に結びつくかを検証するため、染色体縮小化株菌体を ATP 供給源とする静止菌体反応を行った。グルタチオン (GLT) は抗酸化作用を示す生体成分である。グルタチオン合成酵素を発現する菌体との共役反応にて、ATP 依存的なアミノ酸縮合反応を行わせグルタチオンを酵素的に合成させた(図9)。使用した ATP 供給菌の菌体湿重量あたりのグルタチオン生産性を図9に示す。野生型株ではグルタチオン生産がほとんど進行しない。染色体縮小化株を ATP 供給源として用いた反応においては、グルタチオン生産反応が進行し、染色体縮小化株から ATP 供給が行われ、物質生産に使われるようになったことが証明された(図 10)。

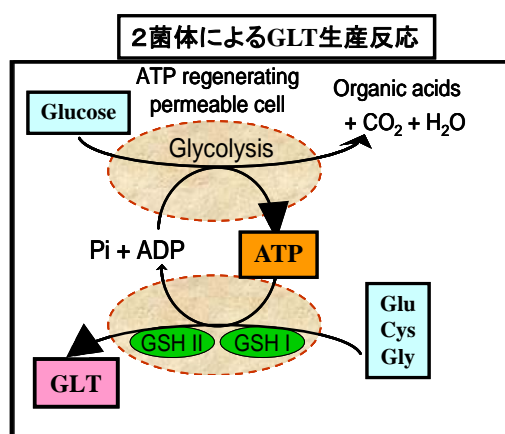


図 9. 菌体反応による GLT 生産模式図

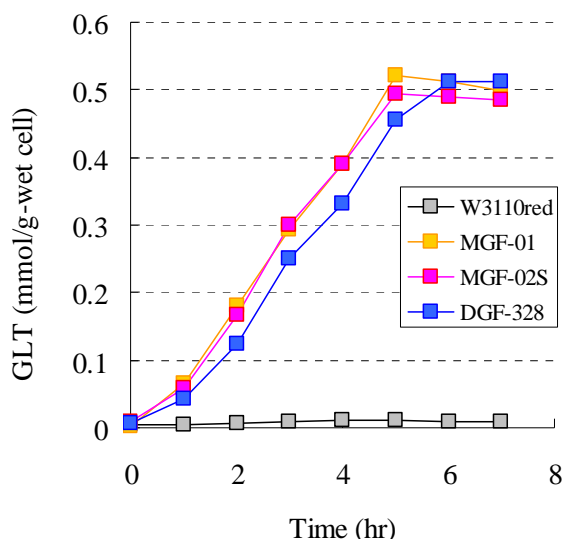


図 10. 野生株と染色体縮小化株による GLT 生産

図9に記載の方法にて、遠心濃縮した菌体を用いた GLT 生産反応を行った。野生株 (W3110red)、■;MGF-01 株、■;MGF-02S 株、■;DGF-328 株、■を ATP 供給菌として用いた反応経時変化を示す。

次に、大腸菌ではまだ生産例のない物質の生産に染色体縮小化株を応用した。ニコチアナミンは、植物が分泌する鉄のキレーター的一种である。ニコチアナミンは 3 分子の S-アデノシルメチオンから酵素的に合成される化合物である (図 11)。S-アデノシルメチオン (SAM) は、メチオンと ATP が縮合して作られる化合物であり (図 11)、ATP 供給力の高い染色体縮小化株では、SAM の効率的な供給を経て、ニコチアナミンの高生産に繋がるものと期待して実験を行った。イロイヌナズナの cDNA からクローン化したニコチアナミン合成酵素遺伝子 (*NAS3*) と大腸菌のメチオン合成系遺伝子の一つ (*metK*) をプラスミド上に載せて (pQE-NAS3 ならびに pSTV-*metK*) 大腸菌に導入し、ニコチアナミンが生産できるかを検証した。野生株と MGF-01 株を用いた検討を行ったが、ともに 2.0 mM 程度のニコチアナミンを生産するのみであった。MGF-01 株は、野生株に比べ生育がよいものの、プラスミドの保持率が悪かった。検討の過程で、ニコチアナミン高生産変異株が MGF-01 株より分離できた。この変

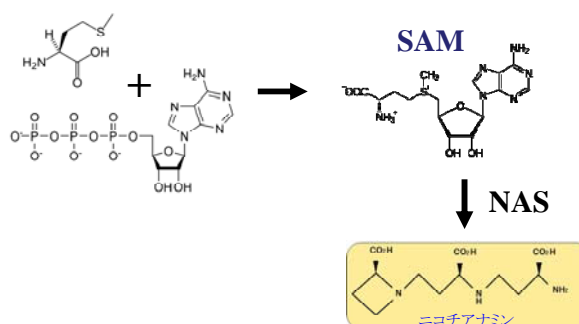


図 11. ニコチアナミン生合成経路

異株から一旦プラスミドを脱落させた株を作製し(MGF-01M 株)、もう一度プラスミドを再導入した。本形質転換株は、MGF-01 株の生育特性を維持し、野生株並みにプラスミドを保持できる株であった。MGF-01M 株を用いたジャー培養では、4.0 mM (1.2 g/L) のニコチアナミンが生産された(図 12)。これは発酵法によるニコチアナミン生産の世界トップレコードである。このように染色体縮小化株を親株とした変異株を用いることで、高効率な物質生産系を構築することが可能であることが示された。またこの結果は、生育、ATP 供給面で優れる染色体縮小株が、物質生産宿主として優れていることを示唆する結果であった。

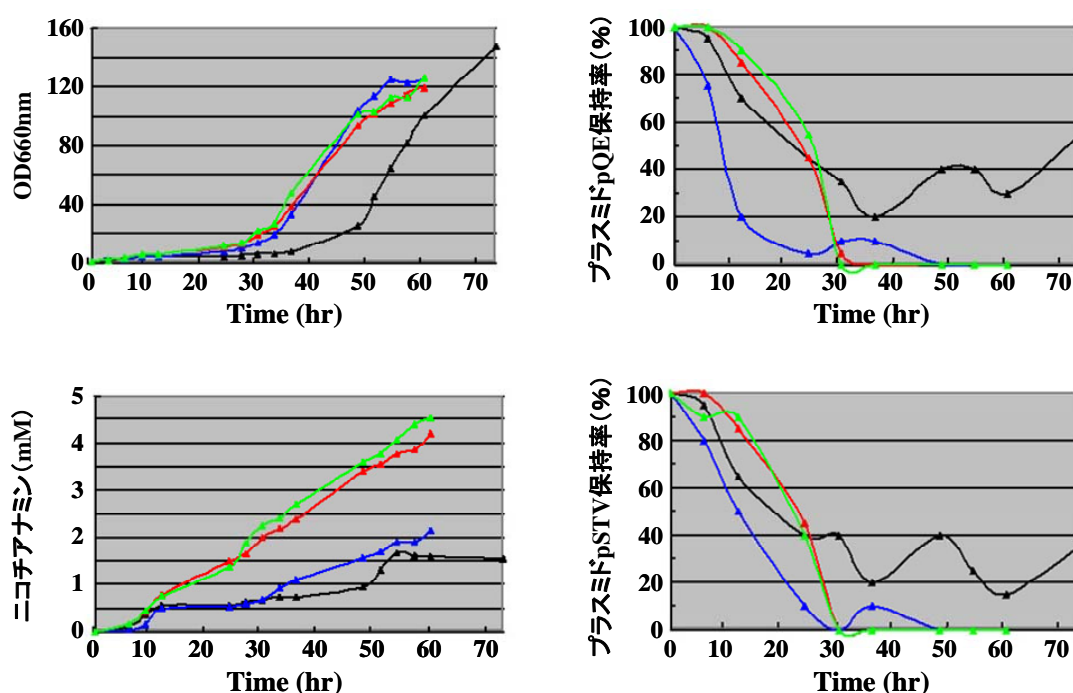


図 12. MGF-01M 株によるニコチアナミン生産

pQE-NAS3 ならびに pSTV-metK にて形質転換した組換え大腸菌を 2L ジャーファーメンターにて培養し、ニコチアナミンの生産経時変化を定量した。使用した宿主は以下の通り、野生株 (W3110)、▲; MGF-01 株、▲; MGF-01M 株、▲ ならびに ▲。▲印の培養では、メチオニンを連続フィードしている。

D-乳酸はポリマー原料として注目されている化合物である。ポリマー原料としては、高光学純度の D-乳酸が要求されており、様々な発酵菌の研究開発が進められている。大腸菌のユビキノン合成系を欠損させることにより、好氣的に高光学純度の D-乳酸を生産することが可能となる。特に *ubiB* 欠損株は D-乳酸生産速度が速く、注目した。W3110 株から MGF-01 株にいたる染色体縮小化株群で *ubiB* 欠損株を作製し、その D-乳酸生産能力を検証したところ、9 工程の染色体縮小化を行った S9 株が最も高い生産性を示し、MGF-01 株は野生株よりも低い生産性を示した(表 5)。生産性低下の原因となる欠失を同定したところ、既述の 096 領域 [JW2652 (*proV*)~JW2658 (*ygaH*)] の欠失が生産性を低下させる主要因であることが判明した。その他にも 036、074、075、077 領域も

欠失すると D-乳酸生産に悪影響を与えることが判明し、これらの領域を復帰させた株 MGF-01L5 Δ ubiB 株を作製し、D-乳酸生産検討に用いた。D-乳酸増産のための代謝系のボトルネックを鋭意検討したところ、グルコース取り込み系遺伝子 (*ptsG*) とピルビン酸脱水素酵素遺伝子 (*ldhA*)、すなわち乳酸発酵代謝系の入口と出口の酵素遺伝子を同時強化することで、大幅に D-乳酸生産性を高めることに成功した。プラスミド pMGtAt は、*ptsG* と *ldhA* を同時発現強化するもので、本プラスミドを導入することで、各 *ubiB* 欠損株の D-乳酸生産速度は向上し、酵母エキスを 0.5% 添加している培地を用いると、80 g/L の D-乳酸を 24 時間で生産できるようになる。このプラスミドを保持している野生型 Δ ubiB 株と、MGF-01L5 Δ ubiB 株とでは、生産性に大きな差は無い。MGF-01L5 Δ ubiB (pMGtAt) 株での D-乳酸生産の最大速度は 4.5 g/L/hr であり、高光学純度 D-乳酸の生産速度としてはプロジェクト開始当時の WR の 2 倍の値であった。

表 4: 各種菌株の乳酸生産性

評価株	D-乳酸 (g/L at 48hr)
W3110 Δ ubiB	60.8
S9 Δ ubiB	72.7
MGF-01 Δ ubiB	58.8
MGF-01 Δ ubiB Δ 096::wt	63.2
MGF-01L5 Δ ubiB	74.9

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

区分	特許出願			論文		その他外部発表 (プレス発表等)
	国内	外国	PCT [※] 出願	査読付き	その他	
H18FY	0件	0件	0件	0件	1件	9件
H19FY	0件	0件	0件	3件	0件	3件
H20FY	1件	0件	1件	1件	0件	6件
H21FY	1件	2件	1件	4件	0件	3件
H22FY	2件	0件	0件	0件	0件	3件

(※ Patent Cooperation Treaty : 特許協力条約)

2. 1. 2 枯草菌RGFの研究開発(花王株式会社)

本研究開発は、タンパク質分泌生産効率が既存の微生物レベルを超える高性能宿主微生物(RGF:Refined Genome Factory)を創製することが目的である。本研究では(1)遺伝子機能解析、(2)特異的遺伝子発現制御、(3)ユーティリティー機能増強、(4)ゲノム縮小株への高生産化技術の統合、の4つの研究項目に注力する。これら(1)(2)(3)(4)で得られた情報と技術を駆使して最終的にタンパク質の分泌生産性が大幅に向上した枯草菌RGFの創製を目指し、各項目に関して以下に記す成果が得られた。

2. 1. 2. 1 平成18年－22年度成果

(1) 遺伝子機能解析(ゲノム縮小化技術/代謝最適化技術)

次世代型高機能宿主の構築に向け、これまでに創製した宿主および研究成果を基盤として、さらに生育および物質生産に必要な基本的な遺伝子セットを残しつつ物質生産に不要な代謝や制御に関連する遺伝子を削除した枯草菌の作製を目指し、ゲノム縮小株のトランスクリプトーム、メタボローム動態の解析研究を進めた。これまでに枯草菌から不要遺伝子領域を874kbp削除したゲノム縮小株を得ており、本株はタンパク質の分泌効率や培養後半での代謝活性が向上していた。しかしながら、本株はLB培地において細胞の異常伸長を呈したことから、更なる削除(目標:1.5Mbp削除)には不適合であると判断された。そこでMGB874株に生じた形態異常の原因となった遺伝子変異を特定し、正常配列に戻す事で、正常増殖を示したRGF874株を構築した。更に、本株を用いて富栄養培地、最小培地での転写プロファイルを経時的に測定し、得られたデータを基に新たに削除する領域(53領域、1091遺伝子、約1Mbp)を抽出した。不要領域の効率的な削除手法を開発し、53領域の単独削除株を構築し、増殖および生産性評価を行った。その結果、RGF874株と比べて120%以上生産性が向上する領域を7領域、生産性に変動が無い領域として26領域、生産が低下する領域として16領域を峻別した。MGB874株から上記削除領域の内、27領域を削除したゲノム縮小株(RGF1334株)を創成した。本株はMGB874株に比べて培養後半で高いセルラーゼ生産能を有しており、培養5日目で生産性が1.2倍に向上した。

RGF1334株からさらに10領域を削除し、野生株のゲノムDNAの1.5M欠失したRGF1501株を作製したが、セルラーゼ生産性は逆に低下した。

また、RGF1334の特徴として、定常期のリボゾームプロファイルを解析し、活性型のリボゾームが存在することでタンパク質合成が亢進していることを示した。細胞周期に関しては、削除されていたDnaA Boxを戻すことにより、染色体複製開始異常を完全に回復することができた。さらに染色体の30%を縮小した菌株の染色体複製・細胞分裂の解析により、染色体複製開始・細胞分裂のタイミングについての理解が可能となった。

新たな酵素生産技術の開発を目指し、リパーゼ(LipA)評価系及びプラスミド発現系を構築し、更に宿主機能改善により本株のスタート時に対して約10倍に生産性が向上できた。また、ストレス応答プロテアーゼである*htrA*と*htrB*の多重削除や*bpr*と*vpr*を欠失させる事でリパーゼ生産性が

120%に向上する事を見出した。

(2) 特異的遺伝子発現制御(遺伝子制御技術/代謝最適化技術)

タンパク質分泌生産に関わる遺伝子群の効率的発現制御に対して、オペロン化による一括制御技術の開発を目指した結果、分泌装置に関連する遺伝子を単一オペロンに集約化する事でセルラーゼ生産性が120%に向上できた。更に、抗体を用いたウエスタン解析法を用いて、集約化された遺伝子のタンパク質発現量を評価した結果、親株に比べて2-3倍量の発現が認められた。また、分泌装置関連遺伝子の集約化と同時にゲノム側の同遺伝子を全て削除し、分泌装置が機能している事を確認した。

酵素生産に特化した代謝パスウェイのデザインを目的として、枯草菌MGB874株、MGB874(*rocR*復帰)、MGB874(Δ *rocG*)、MGB874(*rocR*復帰 Δ *rocG*)と野生株(168株)のタイリングアレイによる転写解析を行い、増殖と酵素生産がグルタミン代謝系(GS-GOGAT経路)で制御できる事、更に窒素効率の向上に寄与できる事を明らかにした。また、バリン代謝関連遺伝子(*ywaA*, *ybgE*, *bcd*)の欠失およびアルギニン分解関連オペロン(*rocDEF*)の復帰で酵素生産性をそれぞれ1.2倍以上向上でき、窒素効率が改善された。

細胞内の動態解析による有用タンパク質生産に特化した代謝経路のデザインを行う事を目的に、枯草菌 MGF874 株と野生株(168株)のメタボローム解析を行った。その結果、グルタミン酸の蓄積量が MGB874 株で野生株の2倍以上存在しており、グルタミン酸制御に関与する *rocG* 遺伝子の制御が鍵であると考えた。そこで、*rocG* 欠失株を構築する事で細胞内のグルタミン酸量を増加させることができると考え、欠失株を構築し評価を行った。しかし、グルタミン酸が高蓄積し細胞増殖は増加する一方で、酵素生産性は低下することが判った。解析の結果、培養20時間で培養液中のアンモニア枯渇が起こっていることが判明したため、*rocG* 欠失株のアンモニア代謝制御系の改良を目的に、アンモニア流加系培養による評価を行った。その結果、アンモニア流加により MGB874 株の1.5倍にまで生産量が向上できた。更に、細胞内のアンモニア制御系遺伝子の改良により、最終的に MGB874 株の1.7倍にまで生産量を向上させる事に成功した。

また、*rocG* の低レベルの発現が酵素生産に重要であることから、IPTG で制御可能な Pspac プロモーターを利用し、*rocG* の転写を制御することで、酵素生産量の更なる向上を目指した。その結果、IPTG を添加するにつれて酵素生産量は増加し、最適条件下で MGB874 株の1.2倍のセルラーゼ生産量を示した。そこで、IPTG 添加条件を模倣した *rocG* 制御が可能なプロモーターをプロモーターライブラリーから選抜し、*rocG* 遺伝子の制御に供したところ、1.2倍のセルラーゼ生産量を確認できた。

更なる酵素生産量向上のため、窒素代謝に加え炭素代謝制御技術の構築を行った。酵素生産に最適な炭素消費速度に制御するため、主要マルトーストランスポーターである MalP トランスポーターの発現量を誘導物質(キシロース)の添加により制御可能な株の構築した。様々な糖消費速度条件下におけるセルラーゼ生産量を測定した結果、malP が緩やかに発現している場合に MGB874 株と比較して約2倍の酵素生産に成功した。

(3) ユーティリティ機能増強(高生産化技術)

MGB874 株はプラスミドコピー数が野生株に比べて増加するが、培養後半で急激に減少する。そこで、ヌクレアーゼ遺伝子の欠失株を構築し評価を行ったところ、菌体量を増やさずにセルラーゼ生産性が野生株に比べて 150%に向上する遺伝子、及び菌体量と共にセルラーゼ生産が向上した二つのタイプを見出した。

枯草菌は 10 個の rRNA(*rnn* オペロン)を有しているが、2 コピーにまで削除しても細胞増殖およびセルラーゼ生産性は野生株に対して 80%程度を維持することが分かった。また、枯草菌の rRNA オペロンの改変によりセルラーゼ生産性が 20%向上した。さらに、遺伝子削除によるリボソームの改変によっても、セルラーゼ生産性が最大 20%向上した。

菌体外タンパク質輸送における主要膜透過装置を構成する因子である *secA* の C 末端側に存在する不用領域の削除によりセルラーゼの生産性が 115%に向上した。

枯草菌のタンパク質分泌輸送装置(*secA*)を改変することで、ヒト型インターフェロン α タンパク質が 2 倍の生産量を示した。また、枯草菌の持つ 2 つの Tat システムを、それぞれ高発現した結果、ヒト型インターフェロン α タンパク質の生産性が約 2 倍向上した。

細胞表層の電荷制御技術の構築を目指し、プロテアーゼ 9 重欠失株(Dpr9)をベースに、細胞壁の電荷(テイクロン酸およびリポテイコ酸)に関与する遺伝子を人為的発現制御できる株を構築した。この株において、浸透圧の調節は Dpr9 と同程度の能力を有することが判明した。テイクロン酸高発現株においてセルラーゼ生産量が約 1.3 倍に向上したが、アミラーゼの生産量は変わらなかった。一方、リポテイコ酸高発現株ではアミラーゼ生産量が顕著に低下したのに対し、セルラーゼの生産量は変わらなかった。

各種細胞膜脂質合成関連遺伝子欠失を 10 株構築し、セルラーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼの生産性を検討した結果、いくつかの欠失株で酵素生産性向上し、酵素の種類により生産に適した膜脂質組成が異なる可能性が示唆された。

(4) ゲノム縮小株への高生産化技術の統合

枯草菌全ゲノムから 1.3Mb 以上の遺伝子領域を削除したゲノム縮小株をベースに、分泌装置(*secY*)の高発現化技術を統合した結果、MGB874 株に対してセルラーゼ生産量を 1.2 倍以上向上させることに成功したが、アルギニン分解関連オペロン(*rocDEF*)復帰の統合効果のないことも判明した。

最適な統合株として検討した結果、925kbp を削除したゲノム縮小株(RGF925)に、アミノ酸代謝関連遺伝子改変(*rocG* 欠失とアンモニア流加系培養)・分泌装置改良(*secY* 強化)の個別技術を集約した結果、MGB874 株に対してセルラーゼ生産性が 2.5 倍向上し、初期の目標である 2 倍向上を達成した。

2. 1. 2. 2 共同研究 遺伝子機能解析及びユーティリティ機能増強

(1) 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科 小笠原 直毅 教授

(a) 遺伝子機能解析研究(ゲノム縮小化技術/代謝最適化技術)

枯草菌ゲノム削除株(MGB874 株)の増殖異常の原因を正常に戻した菌株(RGF874 株)を用いて富栄養培地、最小培地での転写プロファイルを経時的に測定し、得られたデータを基に新たに削除する領域を抽出した。RGF874 株を基株として、新削除領域の単独欠失株を 49 株取得し、富栄養培地での細胞増殖、細胞形態について確認を行った。さらに、これら 49 株のセルラーゼ生産性について考慮した結果、33 領域の削除が今後の連続的な削除の候補として選抜することができた。

また、RGF874 株の生産性向上の要因として、定常期におけるタンパク質翻訳効率の向上が確認され、その原因として定常期特異的に形成される不活性化された 100S リボゾームの減少が確認され、このことが定常期における酵素生産の持続に大きな要因として働いていると考えられた。

MGB874 株から上記削除領域の内、27 領域を削除したゲノム縮小株(RGF1334 株)を創成した。本株は MGB874 株に比べて培養後半で高いセルラーゼ生産能を有しており、培養 5 日目で生産性が 1.2 倍に向上した。RGF1334 株から、さらに 10 領域を削除し、野生株のゲノム DNA の 1.5M 欠失した RGF1501 株を作製した。しかし、RGF1334 以降ゲノム縮小を続けるとセルラーゼ生産性には負の効果が見られたため、RGF1334 株について、ゲノムシーケンシング、転写マップ作製、メタボローム解析などのオミックス解析、タンパク質合成能、細胞周期の解析を行った。

メタボロームに関しては、効率的に解析するためのソフトウェアとして AMDORAP を開発し、LC-LTQ-Orbitrap を用いてゲノム縮小株の細胞内代謝物を解析・同定した。その結果、削除株の特徴を明らかにすることができた。さらに、トランスクリプトームデータから細胞内代謝物変化の原因遺伝子を同定し、トランスクリプトームとメタボロームデータの関連性を見出すことに成功した。

Solexa シーケンサーを用いたゲノムシーケンシングより、RGF1334 株の全ゲノムシーケンシングを明らかにし、20 か所あまりの SNP と 2 か所の塩基挿入・削除を確認した。

また、RGF1334 の特徴として、定常期のリボゾームプロファイルを解析し、活性型のリボゾームが存在することでタンパク質合成が亢進していることを示した。細胞周期に関しては、削除されていた DnaA Box を戻すことにより、染色体複製開始異常を完全に回復することができた。さらに染色体の 30% を縮小した菌株の染色体複製・細胞分裂の解析により、染色体複製開始・細胞分裂のタイミングについての理解が可能となった。

(b) 特異的遺伝子発現制御研究(遺伝子制御技術/代謝最適化技術)

増殖に伴う転写プロファイルをもとに個々の遺伝子の発現時期の特定を行った。例として、ゲノム削除株では 2 成分制御系 PhoPR 制御遺伝子ほか特異的に転写の上昇が確認される遺伝子群が多数発見され、これらの制御系下の制御領域は使用可能と考えられた。

タイピングアレイを用いたトランスクリプトーム解析、転写因子 σA と RNA ポリメラーゼ β サブユニットの ChIP-chip 解析により、詳細な転写マップを完成させた。作成した転写マップを用いて、培地条件、細胞増殖のフェイズに依存したプロモーターを新たに同定し、遺伝子発現制御のための情

報の収集を行うことができた。

また、抗生物質に反応する枯草菌 2 成分制御系 *liaRS* を用いて、発現制御系の構築を行った。この技術により非常に低濃度の抗生物質の添加によって強力な転写の誘導を行い、実際に発現制御に応用することができることが示された。

(2) 筑波大学・生命環境科学研究科 中村 幸治 准教授

(a) 遺伝子機能解析研究 (ゲノム縮小化技術 / 代謝最適化技術)

タンパク質の翻訳制御が可能な低分子 RNA として同定した BS101 とターゲットとなるタンパク質の翻訳制御を調整する領域をもちいて、LacZ タンパク質の発現調節が可能であることを示した。また、タイリングアレイを用いた遺伝子間領域の転写解析により、新規低分子 RNA の検索を行った。その結果、複数の転写物より低分子 RNA 候補を選抜した。

タイリングアレイの遺伝子発現解析データより、遺伝子間領域から孢子形成時に特異的に発現している低分子 RNA を同定し、細胞増殖時に高発現することで生育に阻害が見られることを見出した。この特性は、発現制御に応用できるものと期待された。

(b) ユーティリティ機能増強 (高生産化技術)

枯草菌におけるタンパク質シャペロン装置をオペロン化したシャペロン強化株を作成し、ヒト・インターフェロン α タンパク質の生産性が 200%、インターフェロン β は 180%、エンドスタチンは 120% にそれぞれ向上した。また、評価結果より、生産物によって必要とするシャペロン因子が異なる傾向が見られ、インターフェロン β に関しては、DnaK/J の強化が生産性向上に効果があったと予想された。

SecA は、分泌タンパク質を細胞内から細胞外に押し出す機能を持つ。SecA の C 末端側に存在する CTL 領域は、多くの種間で相同性が非常に低く、機能性も見出されていない領域であった。また、CTL 下流に存在する Sec-C ドメインは、大腸菌 SecB 結合領域の相同領域であるが、枯草菌には SecB が存在しない為、不要な領域と考えられた。そこで、本領域を削除した株を作成し、インターフェロン α の生産性評価を行ったところ、野生株に比べ 2 倍以上生産量が増加した。

枯草菌のタンパク質分泌輸送装置の一つである Tat システムを利用した分泌タンパク質生産について検討を行なった。枯草菌の持つ 2 つの Tat システムを、それぞれ高発現プロモーターによって発現させる強化株を作成し、本株を用いてヒト型インターフェロン α タンパク質の生産性評価を行った結果、約 2 倍の生産性を示した。さらに、枯草菌のタンパク質分泌輸送装置構成因子 (Ffh) に変異を導入し、セルラーゼ生産向上株を選別した結果、野生型 Ffh に比べてセルラーゼ生産性を 60% 以上向上させる Ffh 変異株を取得した。

また、プロテオーム解析の結果、ゲノム縮小株において、宿主由来の菌体外分泌タンパク質量が減少していたことから、物質生産時の夾雑物を減少させることが可能となった。特に、ゲノム縮小株をもとに作成したプロテアーゼ欠失株においても、夾雑物は少なく、異種タンパク質の生産に有効であることが見出された。また、菌体外分泌に使用するシグナル配列と Pro 配列の改良によりヒト型インターフェロン α タンパク質の生産量を 5 倍増加させることを可能にした。

(3)信州大学・繊維学部応用生物科学科細胞工学 関口 順一 教授

(a)ユーティリティ機能増強(高生産化技術)

溶菌防止技術について2通りの技術を確立した。細胞壁溶解酵素活性阻害タンパク質 YoeB の発現強化およびペプチドグリカン糖鎖の脱アセチル化酵素 YjeA の発現強化における細胞壁構造の改変により、それぞれ溶菌を防止する上で人為的な操作が可能となった。

CTC(5-Cyano-2,3-ditoly-2H-tetrazolium chloride)による細胞呼吸活性を指標に MGB874 株の代謝活動の持続性を評価したところ、培養後期の代謝活動の持続化が観察されたことを「生物機能を活用した生産プロセスの基盤技術研究」において報告している。本プロジェクトで創製された RGF874 株もまた MGB874 株と同様に培養後期の代謝活動が維持されていることを確認した。また代謝活動の持続に関わる因子を明確にする為、マイクロプレートリーダーを用いた CTC 染色性の簡易評価方法を構築した。この評価方法を利用し、代謝活動の持続に関わる因子を探索した。現在までに、スポア形成が阻害される *phrA* および *phrE* それぞれの単独変異株、またスポア形成関連の σ^H 、 σ^F 、 σ^E 、 σ^G および σ^K の各種シグマ変異株において、培養後期の代謝活動の持続化が観察された。一方、スポア形成初期に機能する転写制御因子である Spo0A の変異株では培養後期の代謝活動は低下していた。これらのことから Spo0A がリン酸化(活性化)され且つスポア形成が遅延している状態が、培養後期の代謝活動の持続性に関わることが示唆された。

細胞内 ATP 量を指標とした宿主細胞の代謝活動持続評価を行った。ATP は生体のエネルギー代謝、恒常性の維持など細胞内の重要な反応に欠かせない物質として知られている。培養後期には野生株の細胞内 ATP 量は減少していくが、MGB874 および RGF874 株では野生株の 1.5-2 倍高いことが明らかとなり、培養後期の代謝活動の持続化が示唆された。

細胞表層の電荷制御技術の構築を目指し、プロテアーゼ 9 重欠失株をベースとし、tagF(テイコ酸合成関連遺伝子)の発現量を IPTG 濃度により人為的に発現制御できる株(Dpr9/PtagF)を構築した。Dpr9/PtagF 株を IPTG 非存在下で培養した時のテイコ酸量は Dpr9 と比較して約 20-30% 減少しているが、浸透圧の調節は Dpr9 と同程度の能力を有し、さらに細胞壁溶解酵素活性が低下し、Dpr9 の溶菌しやすい性質を回避できる利点を持つことが示された。

表層の電荷に関わるアニオン性ポリマー因子(テイコ酸およびテイクロン酸)を高発現させた組成改変株を構築し、各種酵素生産量を評価した。その結果、テイクロン酸高発現株においてセルラーゼ生産量が約 1.3 倍に向上したが、アミラーゼの生産量は変わらなかった。一方、リポテイコ酸高発現株ではアミラーゼ生産量が顕著に低下したのに対し、セルラーゼの生産量は変わらなかった。また、細胞表層の電荷の変化を確認するため、常法に従い各菌株の細胞壁中のテイコ酸およびテイクロン酸の解析を行った結果、テイクロン酸高発現株におけるテイクロン酸量は野生株の約 4 倍にまで増加しており、高発現システムが機能していることを確認できた。一方、本株のテイコ酸量は減少傾向が認められ、テイクロン酸の高発現が、テイコ酸量に影響を及ぼすことが示唆された。

各種細胞膜脂質合成関連遺伝子欠失を 10 株構築し、セルラーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼの

生産性を検討した結果、いくつかの欠失株で酵素生産性向上し、酵素の種類により生産に適した膜脂質組成が異なる可能性が示唆された。

セルラーゼでは、リジルホスファチジルグリセロール(LPG)合成酵素 MprF、カルジオリピン(CL)合成酵素 YwnE および YwjE、グリコリピド(GL)合成酵素 UgtP のそれぞれ単独遺伝子欠失株(Δ mprF、 Δ ywnE、 Δ ywjE)でセルラーゼの生産性が1.2倍以上向上した。さらにCL合成酵素二重欠失株(Δ ywnE Δ ywjE)において相乗効果が認められた。アミラーゼでは Δ mprF株で約1.4倍向上し、 Δ mprF Δ ywnE株で2倍近く向上した。プロテアーゼでは Δ ugtP株で約1.2倍、 Δ mprF Δ ywnE Δ ugtP および Δ mprF Δ ywnE Δ ugtP Δ pssA-psd(PssA;ホスファチジルセリン(PS)合成酵素、psd;ホスファチジリエタノールアミン(PE)合成酵素)株で1.3倍以上向上した。

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

区分 年度	特許出願			論文		その他外部発表（プレス発表等）
	国内	外国	PCT [※] 出願	査読付き	その他	
H18FY	0件	0件	0件	0件	0件	6件（プレス発表1件）
H19FY	9件	0件	1件	5件	2件	11件（うち国際学会4件）
H20FY	5件	0件	1件	1件	0件	9件（プレス発表1件）
H21FY	3件	0件	0件	2件	1件	7件（うち国際学会4件）
H22FY	2件	0件	0件	12件	1件	7件（うち国際学会2件、プレス発表1

(※ Patent Cooperation Treaty : 特許協力条約)

2. 1. 3 分裂酵母高性能宿主細胞創製技術の研究開発(旭硝子株式会社)

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) とともに、分子細胞生物学の分野で、特に細胞周期・細胞形態・染色体構造・情報伝達の研究に盛んに用いられているモデル真核微生物である。*S. pombe* の染色体塩基配列の決定は、2002年2月に英国サンガー研究所の Wood らによって、真核生物における第6番目のものとして報告された。セントロメア・テロメアおよび6箇所のギャップを除いた合計12,534,388bpが決定され、総遺伝子数は当初4,824-4,940と推定された。*S. cerevisiae* と比較して、ゲノムの大きさがそれほど変わらないのに関わらず遺伝子が約1,000個少なく、約4,900遺伝子というのは、これまでに全塩基配列が決定されたモデル真核生物の中で最小の遺伝子数であり、重複遺伝子が少ないため、遺伝子の機能を解析する上では良い酵母となっている。このように *S. pombe* は *S. cerevisiae* に比べて遺伝子重複が少ないという特徴を持ち、また、ORF中には約43%の遺伝子にイントロンが存在し、*S. cerevisiae* や *Candida albicans* などと比較するとイントロンが約10倍多いことも明らかになっている。

外来遺伝子発現のための宿主という観点からも、分裂酵母は出芽酵母と比較して優れた特性を持っている。例えばタンパク質の翻訳後修飾において、酵母は真核微生物であるために大腸菌や枯草菌とは異なり、糖タンパク質糖鎖を合成する能力がある。この真核細胞としての宿主の利点を活かすためには、高等生物由来の糖タンパク質を分裂酵母で分泌生産することが期待される。しかしながらその糖鎖構造は高等動物由来のものと分裂酵母由来のものでは大きく異なっている。分裂酵母はその糖鎖構成成分に、出芽酵母とは異なるガラクトースを含み、高等動物に近い糖鎖構造を有している。このようにそのまま高等動物の発現用宿主として用いるには課題があり、分裂酵母特有の糖鎖生合成系を高等動物型、より好ましくはヒト型に改良することが必要である。

異種タンパク質の生産系は大腸菌から動植物細胞、無細胞系に至るまで多く存在する。近年では動物体・植物体・昆虫体そのものを宿主とした研究開発も進んでいる。酵母は真核単細胞生物であり、その遺伝子操作や大量培養が簡便であることから、異種タンパク質生産のよい宿主とされている。例えば *Pichia pastoris* というメタノール資化性酵母で異種タンパク質生産に関しては多くの実績例がある。分裂酵母においても、特に近年では旭硝子や、九州大学／香川大学との共同による研究開発成果が多く生まれており、分裂酵母で良い生産系を確立することができれば、日本発のオリジナル技術としてわが国の産業にとってもプラスになることが期待できる。そこで本研究では、菌体内および分泌型での生産性を簡便に測定できるモデルタンパク質として緑色蛍光タンパク質(GFP)およびヒト成長ホルモン(hGH)を、真核微生物の利点を生かした高等動物由来の糖鎖付加モデルタンパク質としてヒトトランスフェリン(hTF)を選び、研究開発を行った。

まず分裂酵母染色体大規模削除株の作製と異種タンパク質生産の向上(2. 1. 3. 1)として、エネルギー供給系の解明と最適化技術開発を含めた、本テーマの主眼である分裂酵母染色体大規模削除株の作製と、それを用いた異種タンパク質生産性の向上例について示す。次に分裂酵母染色体大規模削除株の作製にともなう個別の技術開発例として、外来遺伝子機能安定導入(2. 1. 3. 2)、遺伝子発現制御機能付与(2. 1. 3. 3)、分子シャペロン群の解明と最適化技術開発と小

胞体ストレスの検出・回避技術開発を統合した異種タンパク質分泌生産向上(2. 1. 3. 4)、ゴルジ装置における翻訳後修飾系の制御(2. 1. 3. 5)に関して記載する。

2. 1. 3. 1 分裂酵母染色体大規模削除株の作製

近年、微生物のゲノムをダイナミックに改変して有用な細胞を創り上げる合成生物学が脚光を浴び始めている。様々なツールを導入するための宿主細胞として、物質生産に不要な代謝エネルギーの浪費を削減したシンプルな細胞の構築が望まれている。分裂酵母は高等動物の遺伝子機能をよく相補し、特にヒトに由来するタンパク質の生産に利用することができる有用な異種タンパク質生産宿主株のひとつである。そこで、不要な代謝エネルギーの浪費を抑えた分裂酵母物質生産宿主株を構築するため、染色体をダイナミックに改変することを試みた。分裂酵母には約 4,900 個の遺伝子があり、その 21.6%が必須遺伝子である。これらの必須遺伝子は3本の染色体上に散在しており、大規模な非必須遺伝子クラスター領域はほとんど無い。しかしながら、第1、第2染色体末端には 120kbp から 210kbp に及ぶ広い非必須遺伝子クラスター領域が存在する。そこで我々は、第1、第2染色体末端を染色体削除のターゲットとし、実際に Latour 法を用いて大規模削除が可能であることを証明した。さらに細胞の安定性も重視しながら様々な検討を行った結果、最大染色体削除サイズ 657.3kbp (全ゲノムの 4.7%)、最大遺伝子削除数 219 遺伝子の染色体大規模削除株を得ることが出来た。さらに、モデルタンパク質として緑色蛍光タンパク質 (EGFP、菌体内発現)、ヒト成長ホルモン (hGH、分泌発現)、ヒトトランスフェリン (hTF、分泌発現) を用いて染色体大規模削除株の異種タンパク質の発現能力が向上していることを確認した。さらに物質生産能力が向上した現象について、オミックス解析などを用いて要因の解明に取り組んだ。以下に本研究結果の詳細について報告する。

(1) 染色体大規模削除株の構築

分裂酵母の染色体は、長さが 5.7Mbp、4.6Mbp、3.5Mbp の 3 本の線状 DNA で構成され(図 1)、全ゲノム配列はデータベース (<http://www.genedb.org/genedb/pombe/>) に公開されている。本プロジェクトの開始当初、出芽酵母のような一遺伝子破壊株ライブラリーによる必須遺伝子情報は公のデータベースには公開されていなかった。そこで、分裂酵母と出芽酵母の相同遺伝子情報を参考に染色体上の必須遺伝子の分布を推測した。分裂酵母の必須遺伝子は染色体上に満遍なく散在しており、100kbp 以上の大領域を一度に削除できる領域は第 1 染色体と第 2 染色体末端以外ほとんどないことが推測された(表 1)。近年、Kim ら(2010)によって分裂酵母一遺伝子破壊ライブラリーの構築による必須遺伝子情報が公開された。この論文においても第 1 染色体、第 2 染色体末端領域にはほとんど必須遺伝子が存在しないと報告されたが、第 1 染色体左腕の SPAC1F8.07c (*pdc2*) と第 2 染色体左腕の SPBC1348.06c、*alr2* は必須遺伝子であるとアノテーションされていた(図 2)。しかしながら、我々の Latour 法を用いた大規模削除解析では、これら 3 つの遺伝子は削除することが出来たため、第 1、第 2 染色体各末端の最末端にある必須遺伝子はそれぞれ *trs33*、*sec16*、*zas1*、*usp109* であることが判明した。

表 1 必須遺伝子マップから大規模削除が可能と推測された非必須遺伝子領域

No.	Regions	Involved genes	ORFs	Size (kb)	Deletant
1	BLT	estimated <i>tlh</i> - SPBC1198.03c	68	211.7	IGF525
2	ALT	SPAC212.11(<i>tlh1</i>)- SPAC13G6.04(<i>tim8</i>)	72	179.7	IGF719
3	ART	SPAC29B12.08 - estimated <i>tlh</i>	52	155.4	IGF524
4	BRT	SPBC1289.13 - SPBCPT2R1.08c(<i>tlh2</i>)	41	121.6	IGF526
5	AGL	SPAC513.02 - SPAPB1A11.04c	26	76.7	MGF338
6	PDA	SPAC26F1.03 (<i>pda1</i>)- SPAC19D5.04(<i>ptr1</i>)	11	38.6	finished
7	MFM	SPBC947.06c - SPBPJ4664.03(<i>mfm3</i>)	9	37.6	finished
8	CLT	SPCP20C8.01c - SPCC757.15	12	32.0	not tried
9	AMT	SPCC1739.14(<i>npp106</i>) - SPCC576.04	10	27.7	MGF392
10	CRT	SPCP1E11.10 - SPCC569.01c	11	26.9	not tried
11	GHT	SPCC1235.11 - SPCC548.05c	9	25.5	IGF573
12	PKU	SPCC576.16c(<i>wtf22</i>) - SPCC126.04c(<i>sgf73</i>)	6	14.7	MGF457
13	DEC	SPBC1271.11 - SPBC1271.06c(<i>mug96</i>)	6	15.0	finished

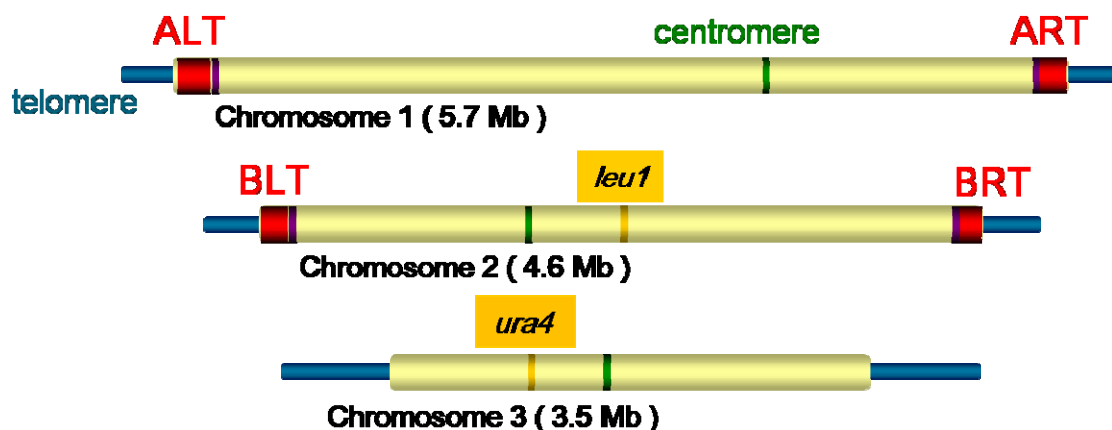


図1 分裂酵母染色体

分裂酵母の3本の染色体をデータベースの情報を元に模式化した。赤く示した領域は削除のターゲット領域である。

■ essential gene ■ non-essential gene ■ deletion region

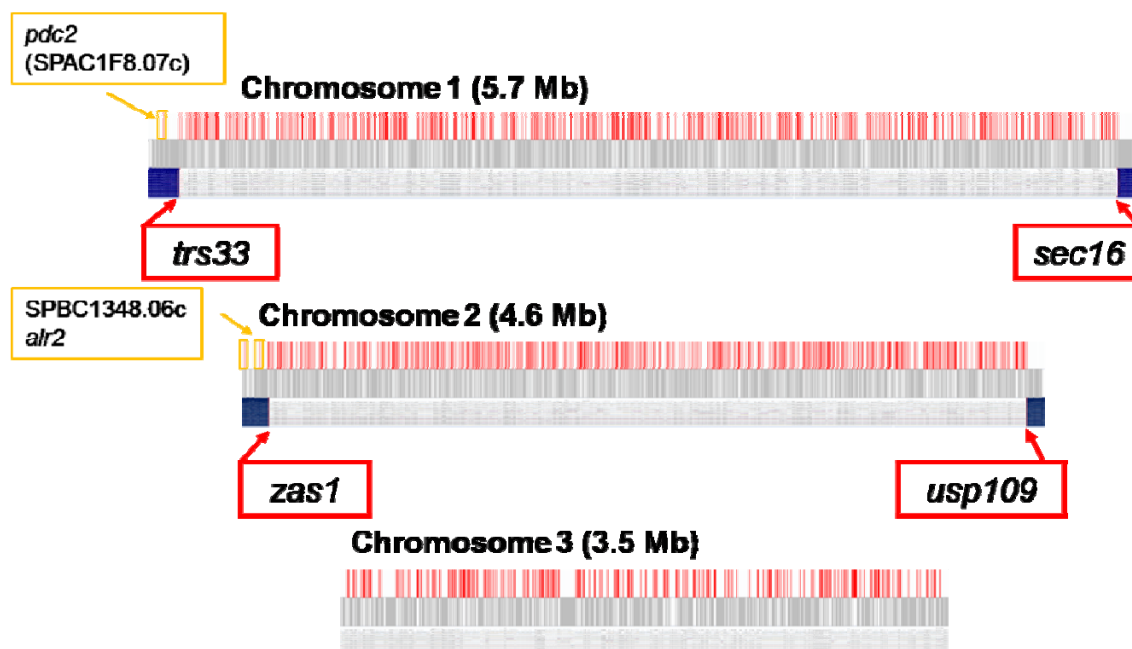


図2 分裂酵母必須遺伝子マップ

2010年に発表された必須遺伝子情報をもとに必須遺伝子の分布を模式化した。赤は必須遺伝子、グレーは非必須遺伝子、濃紺は本研究で削除した領域を示す。また、赤で囲んだ遺伝子は各末端における最末端の必須遺伝子、オレンジで囲んだ遺伝子はKimらの論文では必須遺伝子とされたが、Latour法を用いた大規模削除で削除することが出来た遺伝子を示す。

各末端の必須遺伝子が決定したので、第1染色体、第2染色体末端の100kbpを超える非必須遺伝子クラスター領域をターゲットとした染色体大規模削除を試みた。大規模削除に用いる Latour 法は、削除領域の片側の遺伝子配列をもう一方の片側に挿入し、相同組換えにより内部の領域をループアウトさせる方法である。しかしながら、第2染色体右腕を除く3か所の染色体末端のテロメアまでの領域は、ゲノムプロジェクトによる配列決定が完了していない部位であった。そこで我々は、各染色体末端の未解読領域近傍の塩基配列の相同性が非常に高いため、おそらく未解読領域も相同性が高い塩基配列を有していると推測した(図3)。テロメアまで解読が完了していた第2染色体右腕の塩基配列をもとに、未解読領域の塩基配列を推測して相同組換え用のDNA断片を作製した。その結果、塩基配列解読が完了していない染色体末端領域においても染色体大規模削除株を構築することに成功した。

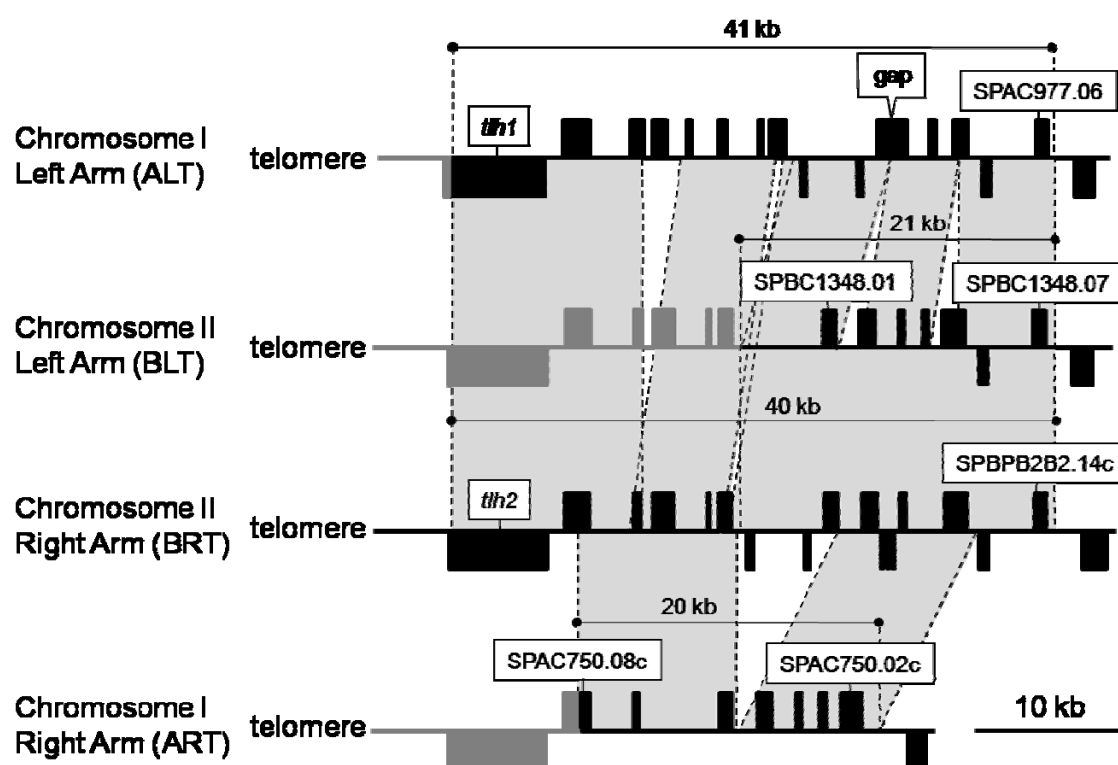


図3 染色体末端重複領域

第1染色体、第2染色体の右腕と左腕両末端を模式的に示した。黒い四角は遺伝子を表しており、上向きに示した遺伝子は5'→3'、下向きに示した遺伝子は3'→5'の向きである。各染色体末端のグレーのゾーンで繋がれた領域は、塩基配列レベルでの相同性が98%以上の領域である。グレーの四角は、テロメアまで配列が決定されている第2染色体右腕より推測した遺伝子を示している。

(2) 染色体大規模削除株の増殖

染色体大規模削除株の第 1 段階の評価として最大比増殖速度 (μ_{max}) を測定し、増殖能の確認を行った。第 1 染色体右腕削除株 (Δ ART (155.4kbp)、IGF524)、第 2 染色体右腕削除株 (Δ BRT (121.6kbp)、IGF526) は親株と同程度の増殖能を維持していた (図 4)。第 1 染色体左腕 (ALT) 削除株は非必須遺伝子クラスター領域全長を削除することが非常に困難であったため、この領域内を *tlh1*-SPAC977.09c 間 (Δ 46.8kbp、IGF522) と SPAC977.11-*gpi7* 間 (Δ 121.8kbp、IGF523) に分けて削除した。その結果、IGF522 はほぼ親株と同等の増殖速度を維持していたが、IGF523 の増殖速度は親株比 4 割程度と著しく低下した。第 2 染色体左腕削除株 (Δ BLT (211.7kbp)、IGF525) は、親株の 8 割程度の増殖速度を維持していた。

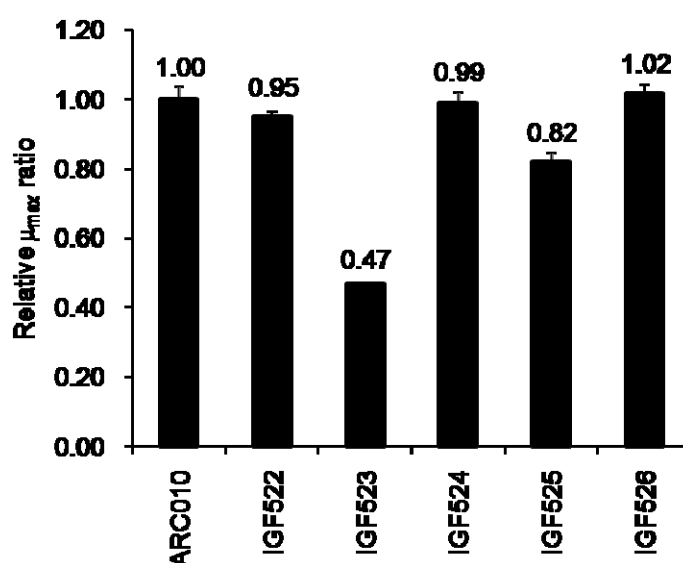


図 4. 染色体大規模削除株の最大比増殖速度 (μ_{max})

YES (pH5.0) 培地にて OD_{660} を測定した値から μ_{max} を算出し、親株 ARC010 と比較した相対比を示した。ARC010 : 親株、IGF522 : Δ ALT (Δ *tlh1*-SPAC977.09)、IGF523 : Δ ALT (Δ SPAC977.11-*gpi7*)、IGF524 : Δ ART、IGF525 : Δ BLT、IGF526 : Δ BRT。

染色体大規模削除株の増殖能を改善するため、ALT、BLT 削除領域内で増殖速度に影響する遺伝子の選抜を試みた。まず、ALT 削除領域内の増殖速度維持に必要な遺伝子の探索を行った。本プロジェクト外の実験結果より、IGF523 株の削除領域内に存在する SPAC1F8.07c (*pdc2*) を削除すると増殖効率が低下することが分かっていたので、ALT を削除する際に *pdc2* を *ura4* 座へ挿入し、ALT の非必須遺伝子クラスター領域全長の削除を行った。完成した ALT 削除株 IGF719 の増殖速度は親株比 0.83 倍まで改善した (図 5)。さらに増殖能を改善するため、*pdc2* 以外の増殖速度維持に必要な遺伝子を探索した。ALT 削除領域を分割した削除株を構築して増殖速度を測定したところ、ALT-2 までは増殖速度を維持していたが、それ以上削除領域を拡大すると増殖速度の低下が観察された (図 6A、B)。この結果より、*gmh1*、SPAC5H10.12c、*gmh2* は増殖速度には影響せず、

残りの *rad8*, *rps101*, *gpi7*, *tim8* のいずれかが増殖速度の維持に必要であることが示唆された。続いて IGF622 (ALT ($\Delta t h 1-g p i 7$), *ura4* 遺伝子座に *pd c 2* 復帰済み) へ *rad8*, *rps101*, *gpi7* を復帰することで増殖速度が回復するか確認を行った。IGF622 の *leu1* 遺伝子座へ各遺伝子を復帰して培養試験を行ったところ、*rps101* 復帰株で増殖速度の回復が観察された (図 6C)。これらの結果より、増殖速度を維持した削除株における ALT の削除領域は *t h 1* から *g m h 2* までが適当であると判断し IGF718 を構築した。IGF718 の増殖速度は親株と同等まで回復し、ALT 削除株の増殖速度を改善することが出来た (図 5)。

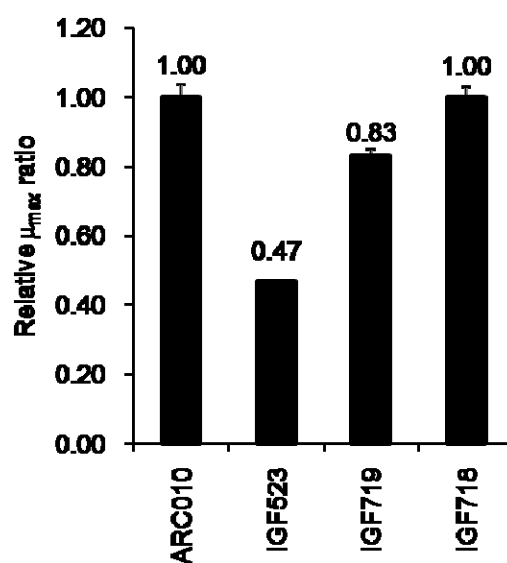


図 5 第 1 染色体左腕 (ALT) 大規模削除株の最大比増殖速度 (μ_{max}) の改善

YES (pH5.0) 培地にて OD_{660} を測定した値から μ_{max} を算出し、親株 ARC010 と比較した相対比を示した。
 ARC010 : 親株、IGF523 : $\Delta SPAC977.11-g p i 7$ 、IGF719 : $\Delta SPAC977.11-t i m 8$ (*ura4* 遺伝子座へ *pd c 2* 復帰)、
 IGF718 : $\Delta SPAC977.11-g m h 2$ (*ura4* 遺伝子座へ *pd c 2* 復帰)。

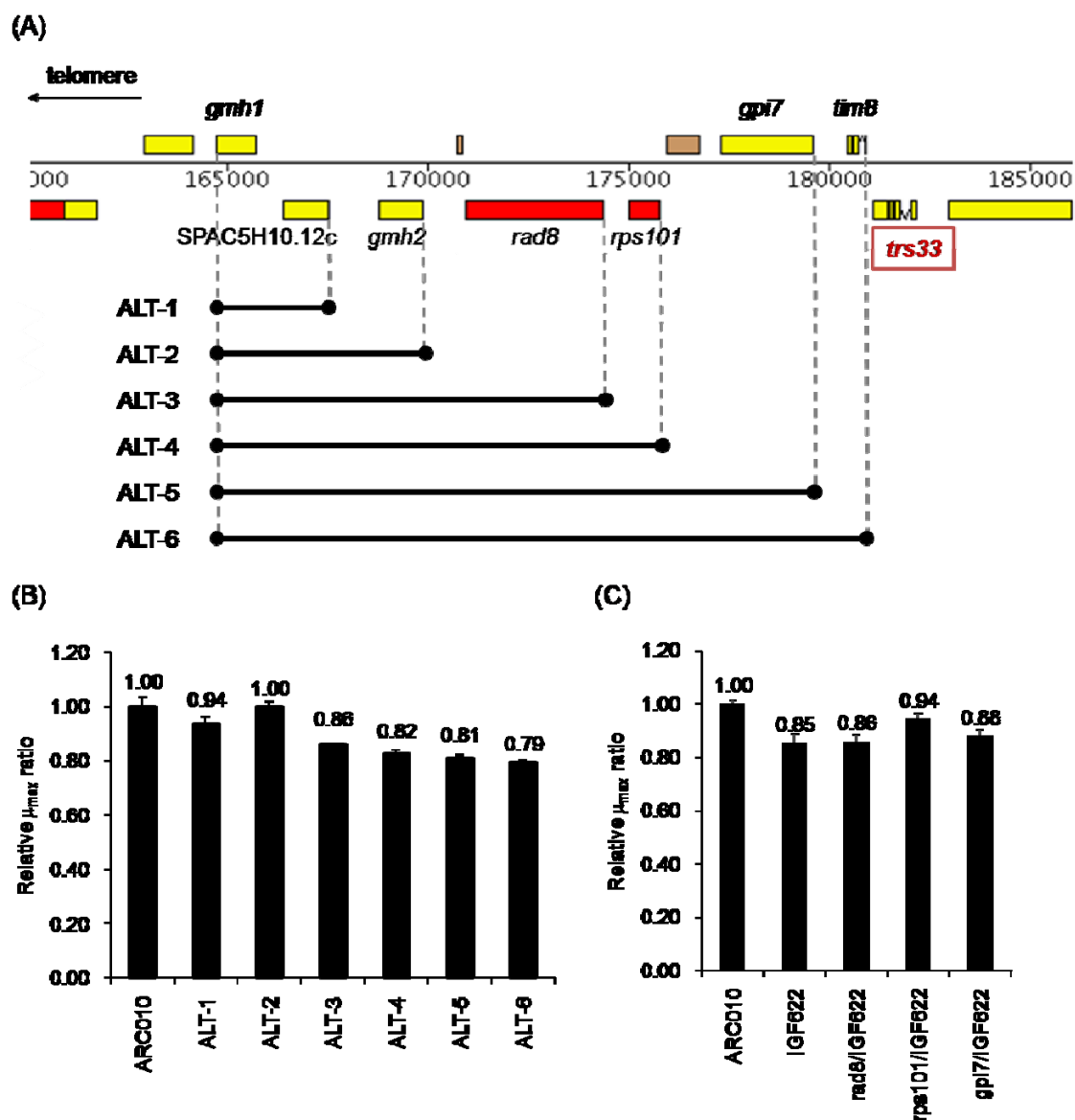


図6 ALT 削除領域における部分的な削除株の最大比増殖速度 (μ_{max})

(A) 第1染色体左腕最末端の必須遺伝子 *trs33* 近傍において部分的な削除株を構築した。両端の黒丸を結ぶ黒線は、各削除株 (ALT-1 から ALT-6) の削除領域を示している。(B) YES (pH5.0) 培地にて OD_{660} を測定した値から μ_{max} を算出し、親株 ARC010 と比較した相対比を示した。(C) YES (pH5.0) 培地にて OD_{660} を測定した値から μ_{max} を算出し、親株 ARC010 と比較した相対比を示した。IGF622: $\Delta t/h1-gpi7$ (*ura4* 遺伝子座に *pdc2* を復帰)、*rad8*/IGF622, *rps101*/IGF622, *gpi7*/IGF622: IGF622 の *leu1* 遺伝子座に *rad8*, *rps101*, *gpi7* をそれぞれ復帰。

続いて BLT 削除領域内における増殖速度の維持に必要な遺伝子の探索を行った。IGF525 に *ura4* を復帰してウラシル非要求性になった IGF629 は、IGF525 と比較して大幅に増殖速度が回復することから、*ura4* が関与する代謝系に増殖速度改善の手がかりがあると推測された(図 7)。*ura4* はピリミジン塩基の材料となる UMP 生合成過程において、*de novo* 合成経路の最終段階を触媒するオロチジン 5'-リン酸脱炭酸酵素をコードしている。BLT 削除株では *ura4* 復帰による *de novo* 合成経路を正常化によって増殖速度が回復するため、BLT 削除領域内には *de novo* 合成経路を補完する salvage 合成経路に含まれる遺伝子があり、削除してしまったことによって UMP の生合成が十分に行われず増殖速度が低下してしまったと考えられた。そこで BLT 領域内の遺伝子を調べたところ、SPBC1683.05 と SPBC1683.06c が salvage 合成経路に関与していることが推測された(図 8)。これらの 2 遺伝子をそれぞれ IGF525 の *leu1* 遺伝子座へ復帰すると、SPBC1683.05 復帰株大幅な回復を示した(図 7)。SPBC1683.05 は、アミノ酸レベルでの相同性からウラシルまたはウリジントランスポーターであるとアノテーションされている。そのため、BLT 削除株ではウラシルトランスポーターの欠損による UMP 合成量の低下に伴い増殖速度が低下したと考えられた。

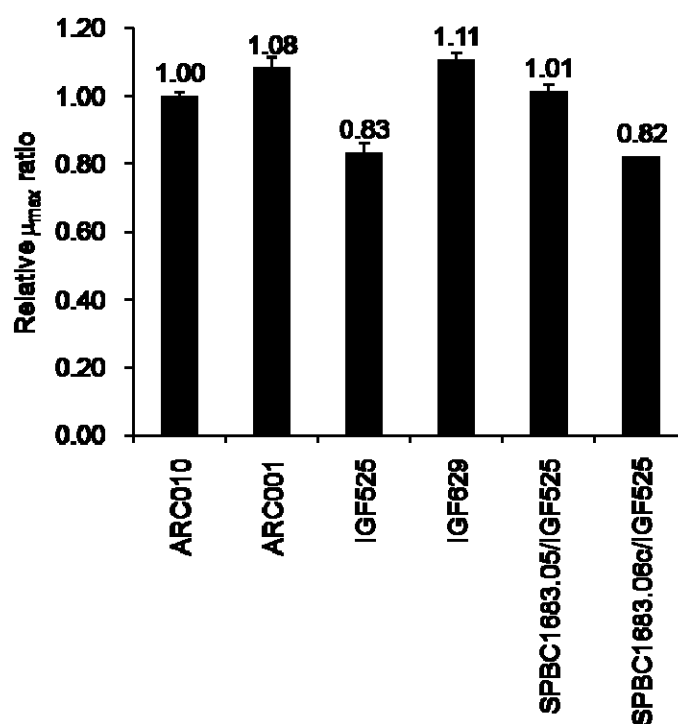


図 7 UMP 生合成遺伝子復帰による BLT 削除株の最大比増殖速度 (μ_{max}) の改善

YES (pH5.0) 培地にて OD_{660} を測定した値から μ_{max} を算出し、親株 ARC010 と比較した相対比を示した。ARC010: 親株 (*ura4*-D18)、ARC001: 親株、IGF525: Δ BLT, *ura4*-D18、IGF629: Δ BLT, *ura4*、SPBC1683.05/IGF525、SPBC1683.06c/IGF525: IGF525 の *leu1* 遺伝子座へ SPBC1683.05 と SPBC1693.06c をそれぞれ復帰。

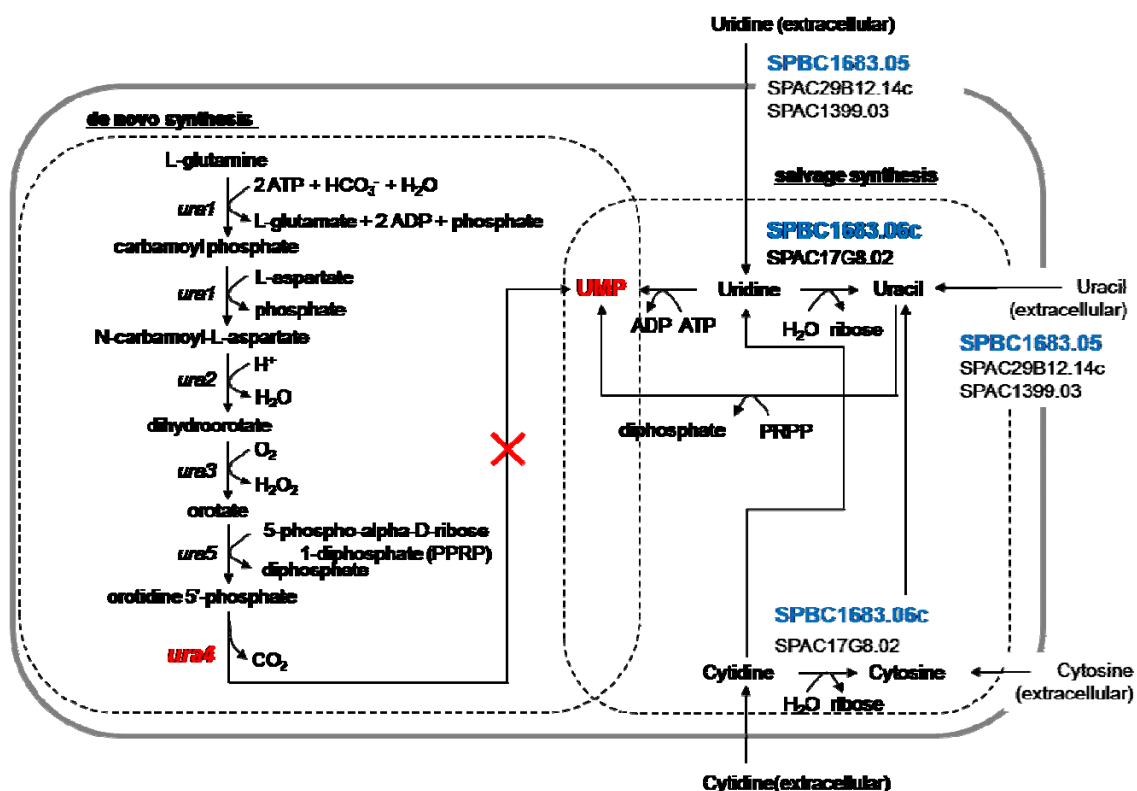


図 8 UMP 合成経路

ura4-D18 株では orotidine 5'-phosphate から UMP が生合成されないため、細胞外からウラシル、またはウリジンを取込み UMP を生合成する salvage 経路が機能しないと生育することが出来ない。

以上の結果より、分裂酵母の第 1 染色体、第 2 染色体の末端には最も端にある必須遺伝子として *trs33*(ALT)、*sec16*(ART)、*zas1*(BLT)、*usp109*(BRT) が存在し、最末端遺伝子からこれらの必須遺伝子までの 100kbp から 200kbp の非必須遺伝子クラスター領域を削除することが可能であることが明らかとなった。しかしながら、増殖速度を維持するためには、*pdc2*(ALT) が必要であり、さらに *ura4* 遺伝子が欠失した株では SPBC1683.05 (BLT) が必要であることが判明した。これらの結果を踏まえ、分裂酵母染色体大規模削除株の最終モデルとして、*tlh1-gmh2*(ALT、 Δ 168.4kbp)、SPAC29B12.08-estimated *tlh* (ART、 Δ 155.4kbp)、estimated *tlh*-SPBC1198.03c (BLT、 Δ 211.7kb)、SPBC1289.13-*tlh2*(BRT、 Δ 121.6kbp) の各大規模削除領域を統合し、さらに *ura4* 遺伝子座へ *pdc2* 遺伝子を復帰した(場合によっては SPBC1683.05 も復帰) 657.3kbp 削除株を構築することに決定した(図 9)。

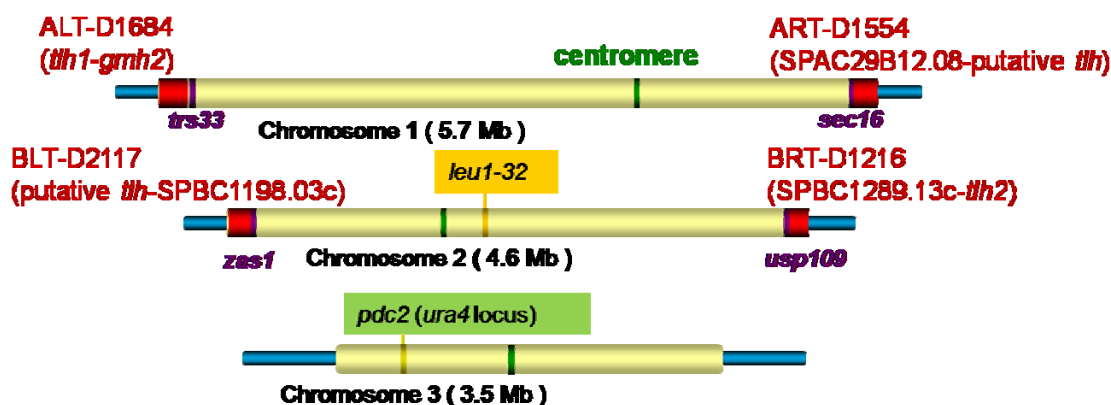


図9 染色体大規模削除株最終モデル

決定した各染色体末端削除領域を赤で示し、詳細を赤字で示した。ALT 削除株を構築する際に増殖速度を維持するため、*ura4* と SPCC330.06c の間に *pdc2* 遺伝子を移動した。また、物質生産を行う際には第 2 染色体の *leu1* と *top2* の間に発現カセットを挿入することにした。

(3) 染色体削除領域の統合

染色体末端 4 領域を様々に組み合わせ 2 領域以上の削除を統合した 11 種類の大規模削除統合株を構築した(表 2)。ALT 削除株の増殖速度改善と並行して行っていたため、ALT 削除領域が改善前の *tlh1-gpi7* がベースとなる統合株を先に構築し、その後に増殖速度改善株として *tlh1-gmh2* の ALT 削除株を組み合わせた統合株を構築した。最も削除サイズが大きい 4 領域削除統合株を構築する際、3 領域削除株 IGF534 (Δ ART BLT BRT) の ALT 削除を試みたが、なかなか削除株を得ることができなかった。その原因として、分裂酵母の第 1、第 2 遺伝子末端は非常に相同性が高いため(図 3)、4 領域目を削除すると合成致死が生じているのではないかと考えられた。そこで、ALT 削除領域内の部分的な DNA 断片を pSL2 染色体組込みベクターへクローニングし、ALT 削除用 Latour 断片を保持する IGF534 の *leu1* 遺伝子座へ挿入して ALT 領域の削除を再度試みた(図 10)。その結果、SPAC977.11、SPAC977.12、SPAC977.13c、SPAC977.14c 含む DNA 断片を復帰した株で 4 領域削除統合株を得ることが出来た。SPAC977.11 は BLT、SPAC977.12 は ART、BLT にそれぞれ相同遺伝子が存在する。これらのどの遺伝子が合成致死の原因となっているか調べるため、単独で *leu1* 遺伝子座へ挿入し IGF534 の ALT 削除を試みた。SPAC977.13c は pseudogene のため除外し、3 つの遺伝子について解析を行った。1 遺伝子ずつ挿入して削除を試みた結果、SPAC977.11 を挿入した株で容易に 4 領域削除株を得ることが出来た(表 3)。合成致死候補遺伝子が SPAC977.11 である可能性があるところまで絞り込んだが、他の 3 領域削除株の 4 領域目の削除においても同様の傾向が得られるか確認を行った。IGF650 (Δ ALT ART BLT)、IGF651 (Δ ALT ART BRT)、IGF652 (Δ ALT BLT BRT) の *leu1* 遺伝子座へ SPAC977.11 を挿入し、各 4 領域目の削除試験を行った結果、IGF650、IGF652 では SPAC977.11 の有無に関係なく 4 領域削除株は高確率で得られ、SPAC977.11 は特に 4 領域目の削除には必要ないことが分かった(表 4)。しかしながら、IGF651 では IGF534 と同様に SPAC977.11 を復帰していない株で、4 領域目の

削除効率が減少していた。IGF651 の 4 領域目の削除のターゲットは BLT 領域であり、BLT には SPAC977.11 の相同遺伝子である SPBPB8B6.06c が存在していた。以上の結果より、SPAC977.11 と SPBPB8B6.06c を両方削除しても合成致死は生じないが、Latour 法で削除する際の相同組換え効率に何らかの影響を与えていることが示唆された。以上より 4 領域削除統合株 IGF690 ($\Delta 665.6$ kbp) の獲得に成功し、そして増殖改善の検討結果を踏まえた最終モデルに沿った IGF740 ($\Delta 657.3$ kbp) が完成した。

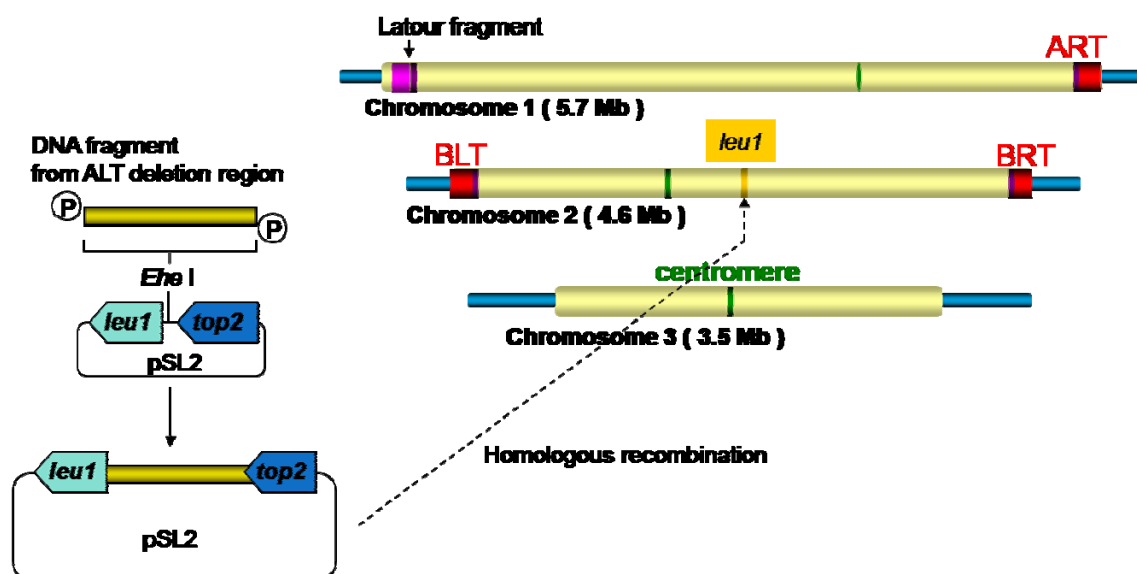


図 10 IGF534 の ALT 領域削除時に生じる合成致死要因遺伝子の探索

ALT 削除領域内を部分的に pSL2 ベクターへクローニングし、ALT 削除用の Latour 断片を染色体上に保持する IGF534 の *leu1* 遺伝子座へ相同組換えによって挿入した。

表 2 分裂酵母染色体大規模削除統合株リスト

Deletion regions		ALT (<i>tlh1-gpi7</i>)			ALT (<i>tlh1-gmh2</i>)*		
		<i>ura4</i> -D18	<i>ura4</i> ⁺	Deletion size	<i>ura4</i> -D18	<i>ura4</i> ⁺	Deletion size
1 region	ALT	IGF622	IGF637	176.8 kb	IGF718	IGF724	168.4 kb
	ART	IGF524	IGF628	155.4 kb	-	-	-
	BLT	IGF525	IGF629	211.7 kb	-	-	-
	BRT	IGF526	IGF630	121.6 kb	-	-	-
2 regions	BLT BRT	IGF530	IGF631	333.4 kb	-	-	-
	ART BRT	IGF531	IGF632	277.1 kb	-	-	-
	ART BLT	IGF532	IGF633	367.2 kb	-	-	-
	ALT ART	IGF638	IGF647	332.2 kb	IGF738	IGF755	323.9 kb
	ALT BLT	IGF639	IGF648	388.5 kb	IGF739	IGF756	380.2 kb
	ALT BRT	IGF640	IGF649	298.4 kb	under construction	under construction	290.1 kb
3 regions	ART BLT BRT	IGF534	IGF634	488.8 kb	-	-	-
	ALT ART BLT	IGF650	IGF658	543.9 kb	IGF722	IGF728	535.6 kb
	ALT ART BRT	IGF651	IGF659	453.8 kb	IGF720	IGF726	445.5 kb
	ALT BLT BRT	IGF652	IGF660	510.2 kb	IGF763	under construction	501.8 kb
4 regions	ALT ART BLT BRT	IGF690	IGF693	665.6 kb	IGF740	IGF742	657.3 kb

* *tlh1-gpi7*間を削除した ALT 削除株シリーズを構築したのち、増殖速度を改善するために *tlh1-gmh2*間を削除した ALT 削除増殖改善株を構築した。

表 3 ALT 領域内における合成致死候補遺伝子と候補遺伝子復帰株の削除効率

Gene ID	Product	Locus of homologous gene	Deletion ratio (Deletant/total) ^a
SPAC977.11	CRCB domain protein	BLT	48/48 (100%)
SPAC977.12	L-asparaginase	ART, BLT	3/48 (6%)
SPAC977.13c	hydrolase, pseudogene	-	not tested
SPAC977.14c	aldo/keto reductase	-	2/48 (4%)

^a各遺伝子を IGF534 株の *leu1* 遺伝子座へ復帰した後、Latour 法による ALT 削除効率を示した。各遺伝子復帰株 48 コロニーについて PCR チェックを行い、ALT 領域の削除を確認した。() 内は削除株獲得確率。

表 4 SPAC977.11 復帰による 4 領域削除株の取得率

Target region of deletion	Deletion ratio		
	SPAC977.11 inserted to <i>leu1</i> locus	no inserted gene	
IGF650	BRT	58 %	70 %
IGF651	BLT	88 %	19 %
IGF652	ART	85 %	94 %

(4) 染色体大規模削除統合株の特性

削除領域を統合した染色体大規模削除株の特性を調べるため、まず最大比増殖速度 (μ_{max}) と最終到達濁度を測定した(図 11)。染色体削除の際に Latour 断片を挿入するマーカー遺伝子として *ura4* を用いており、FOA 処理にて *ura4* と共に削除領域をループアウトさせていたのだが、分裂酵母は *ura4* 株の方がより増殖が安定するため、増殖効率の解析には *ura4* 株を用いた。染色体末端削除の統合を進めるにつれて最大比増殖速度、最終到達濁度共に減少傾向にあり、4 領域削除株 IGF693 株では最大比増殖速度が親株比 0.78、最終到達濁度は親株が $OD_{660}=23$ に対して 19 まで低下してしまった(図 11A,B)。特に ALT を削除すると低下する傾向にあった。しかし、ALT 削除領域の改良を行うと、IGF637 の最大比増殖速度が親株比の 0.79、最終到達濁度が $OD_{660}=20$ であるのに対し、改良後の IGF724 の最大比増殖速度は 0.96、最終到達濁度は $OD_{660}=27$ まで向上した。同様に 4 領域削除株でも IGF693 の最大比増殖速度が 0.79、最終到達濁度が $OD_{660}=19$ であるのに対し、改良後の IGF742 では最大比増殖速度は親株比 0.82、最終到達濁度が $OD_{660}=22$ まで回復した(図 11C,D)。

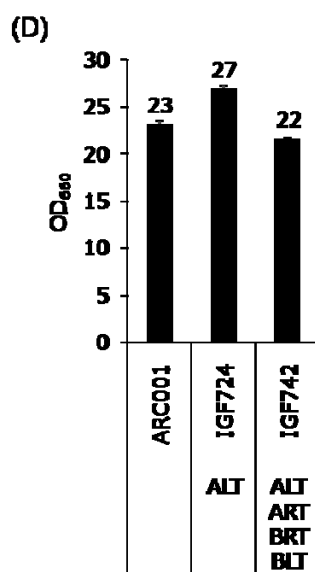
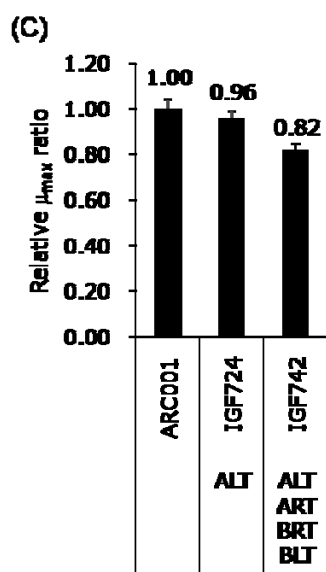
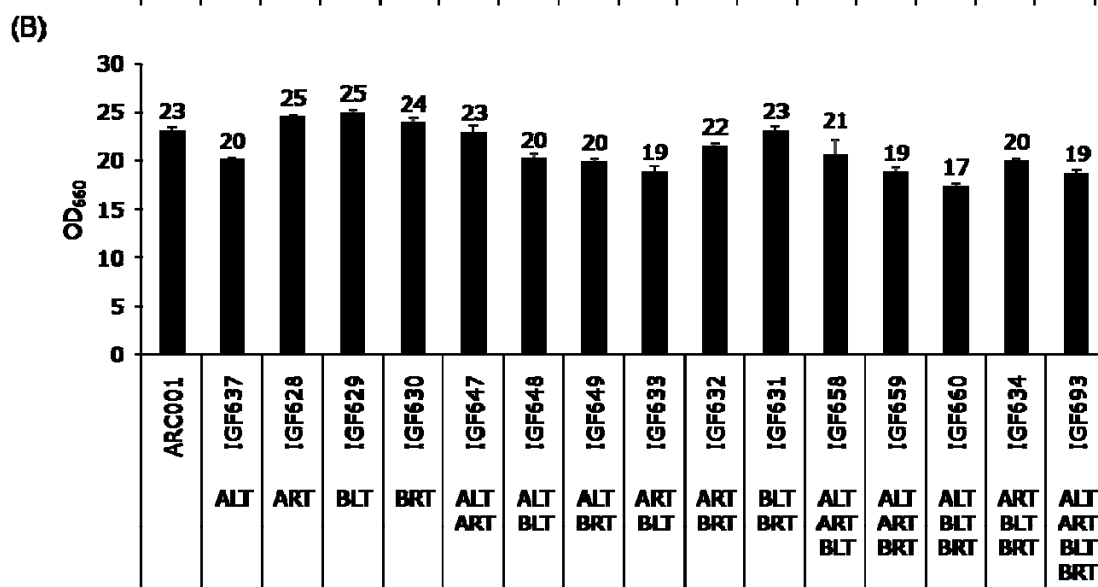
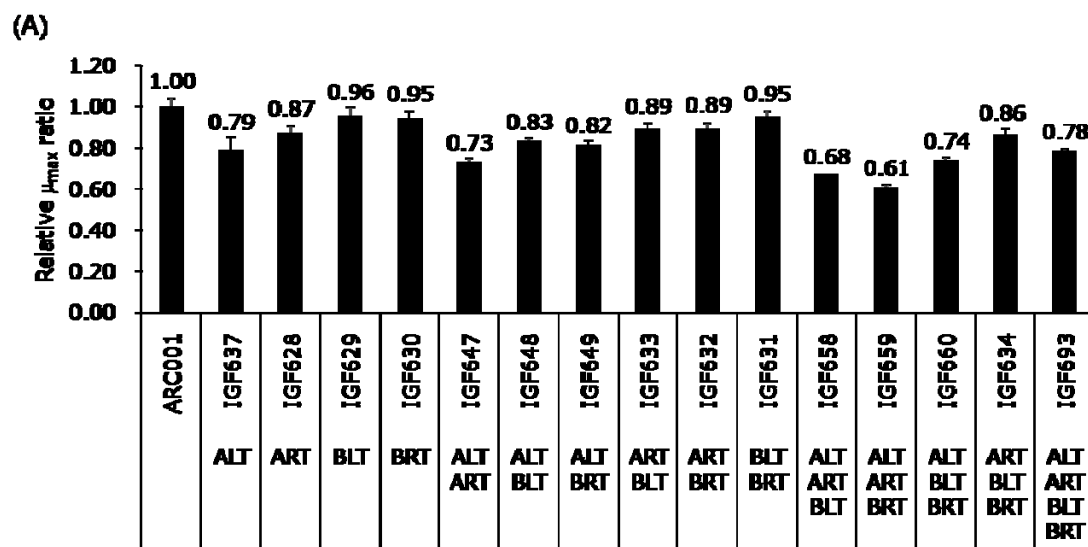


図 11. 染色体大規模削除株の最大比増殖速度 (μ_{max}) と最終到達濁度 (OD_{660})

(A) 各削除領域統合株の最大比増殖速度を示した。ALT 削除領域については増殖改善前(ALT $\Delta t/hl-gpi7$)である。YES (pH5.0) 培地にて OD_{660} を測定した値から μ_{max} を算出し、親株 ARC001 と比較した相対比を示した。(B) (A) で示した削除領域統合株の最終到達濁度を示した。(C) 増殖改善のため ALT 削除領域を $t/hl-gmh2$ に変更した削除領域統合株の最大比増殖速度を示した。培養条件は (A) と同様である。(D) (C) で示した削除領域統合株の最終到達濁度を示した。

次に細胞分裂と染色体分配が正常に行われているか確認するため顕微鏡観察を行った。YES (pH5.0) 培地、32°C で $OD_{660} \approx 5.0$ の対数増殖期でサンプリングした 1 領域削除株と 4 領域削除統合株について観察した(図 12)。どの株も細胞形態、染色体分配の様子に異常はなかったが、IGF742 では細胞が若干小さくなる傾向があった。分裂酵母では培地中の窒素源が少ないことによる栄養飢餓ストレスで細胞が小さくなるという報告がされている。そこで、これらの株のアミノ酸取込み能について調べた。まず、ロイシン要求性を持つ染色体大規模削除株を EMM+Leu 培地にスポットしたところ、IGF724、IGF628、IGF742 株で増殖の遅延が観察された(図 13)。IGF628 の削除領域である ART 領域には、アミノ酸トランスポーターである *isp5* と SPAC869.10 (*put4*) が含まれており、ロイシンの取込みに関与していると推測されている。そのため、ART 削除株では EMM+Leu 培地中のロイシンの取込み効率が低下し増殖が遅延したと考えられた。IGF724 にも同様の傾向が観察された。IGF724 の削除領域である ALT 領域にはロイシン取込み機能を持つアミノ酸トランスポーターの報告や *isp5*、*put4* などの相同遺伝子も存在しないが、同様の機能を持つトランスポーターが存在することが推測された。しかしながら、YES 培地では IGF628、IGF724、IGF742 とともに目立った増殖の遅延は観察されなかった。2008 年に公開された分裂酵母のゲノムワイドなトランスクリプトーム解析によると、*isp5*、*put4* 共に YE 培地よりも主に最少培地や窒素飢餓状態で発現が誘導されているため、窒素源が豊富な栄養培地では他のロイシン取込み機能を持つアミノ酸トランスポーターが働いているのではないかと推測した。続いて、アミノ酸類似体を用いた試験では IGF628、IGF742 でカナバニン、チアリジン耐性が観察され、また IGF742 のみにおいてエチオニン耐性が観察された。これらのアミノ酸類似体が細胞内へ取込まれると、正常なタンパク質が合成できないため細胞は増殖出来なくなるが、アミノ酸取込み機能が低下している株では培地中のアミノ酸類似体も取込むことが出来ないため耐性を示す。IGF628 株の削除領域である ART 領域には、アルギニンやリシンなどの主要な塩基性アミノ酸トランスポーターである *cat1* が存在している。そのため、IGF628 と IGF742 ではアルギニン、リシンの取込能力が低下し、カナバニン、チアリジンに対して耐性を示したと推測された。また、カナバニン耐性試験では IGF628 よりも削除領域を統合した IGF742 の方が強い耐性が出ているので、ART 削除領域以外にもアルギニン取込み機能を持つアミノ酸トランスポーターの存在が示唆された。さらに、IGF742 株はエチオニン耐性も示していることから、削除領域内にマイナーなメチオニン取込み機能を持つアミノ酸トランスポーターがいくつか存在し、それらを多重に削除したことによって現れた表現型ではないかと考えられた。

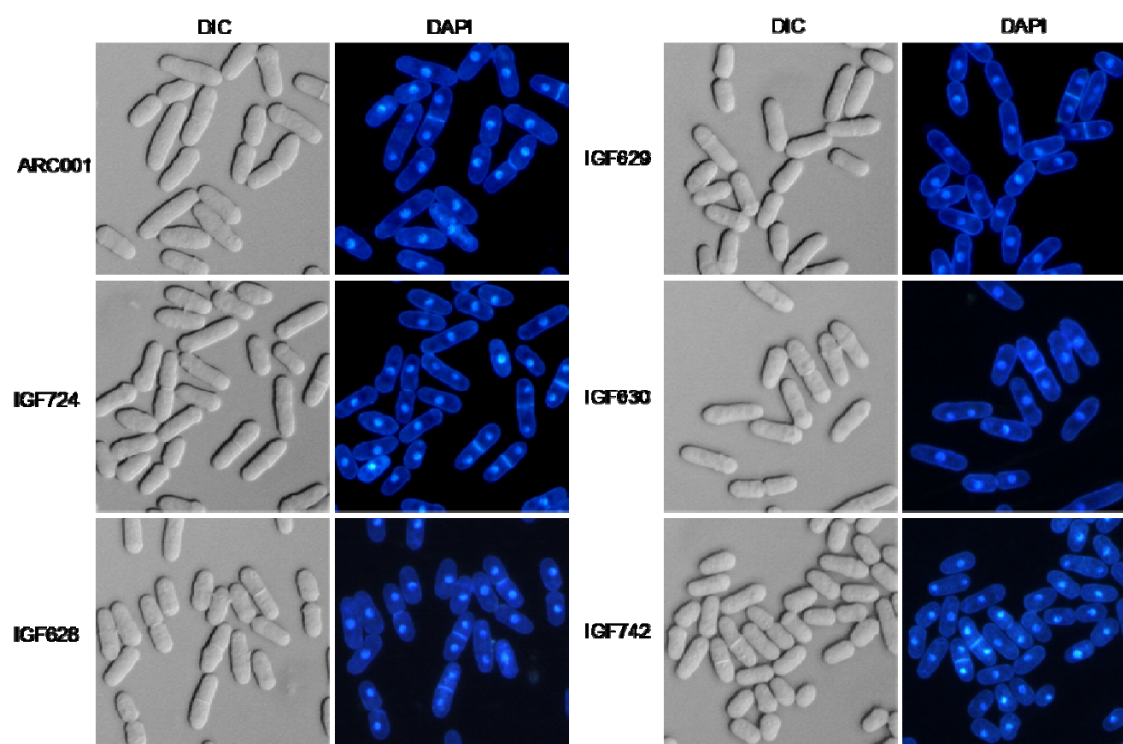


図 12 染色体大規模削除株の細胞分裂と染色体分配の観察

YES (pH5.0), 32°Cで対数増殖期中期まで培養した細胞形態の顕微鏡観察を行った。DIC は細胞の微分干渉像、DAPI は染色体の状態を示している。(ARC001, 親株; IGF724, Δ ALT; IGF628, Δ ART; IGF629, Δ BLT; IGF630, Δ BRT; IGF742, Δ ALT ART BLT BRT)

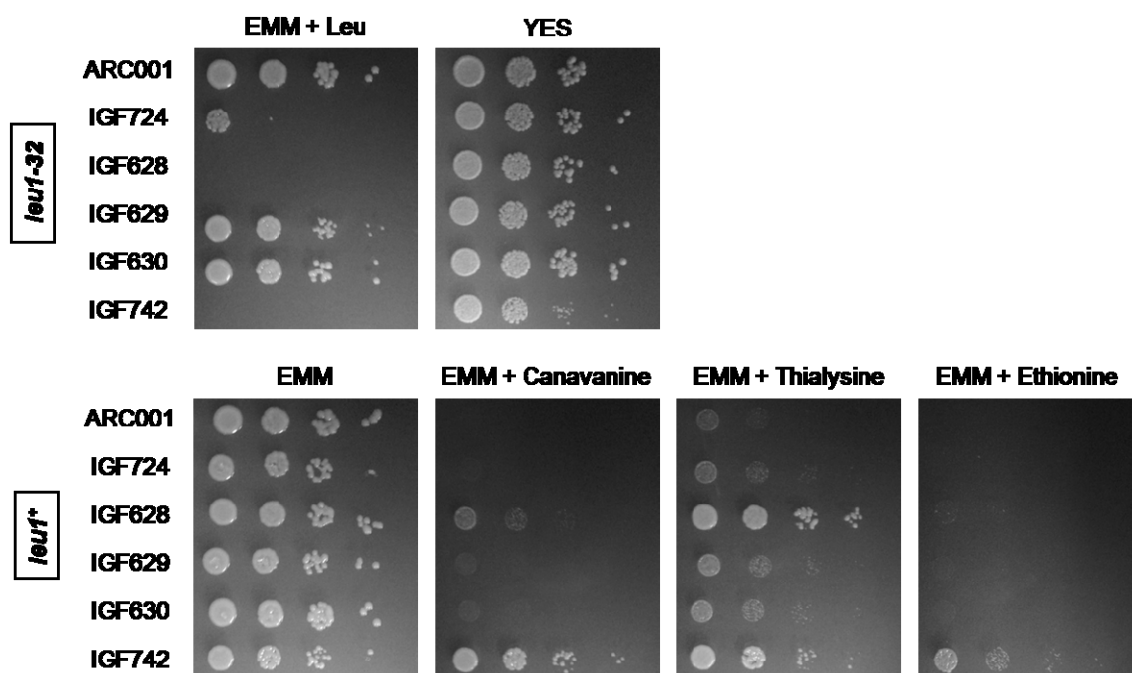


図 13 アミノ酸取込み試験

各染色体大規模削除株のアミノ酸取込み能の解析を行った。(Leu, ロイシン, 250 mg/L; Canavanine, アルギニン類似体, 60 mg/L; Thialysine, リシン類似体, 200 mg/L; Ethionine, メチオニン類似体, 30 mg/L)

真核生物の染色体は直線状であり、その末端にはテロメアが存在する。テロメアは染色体の安定分配に必要な領域であり、テロメアが欠損した分裂酵母では染色体末端どうしの異常な融合が報告されている。構築した染色体大規模削除株の削除領域は第 1、第 2 染色体末端部位であるが、染色体最末端に位置する遺伝子から必須遺伝子手前の遺伝子までを削除しているため、テロメアは残されている。しかしながら、テロメアのヘテロクロマチン形成に必要なタンパク質の結合部位が染色体大規模削除株の削除領域内に含まれていた。ヘテロクロマチン形成タンパク質の結合部位を削除したことが、染色体大規模削除株のテロメアの安定性に影響していないか確認するため、約 100 世代継代培養した親株 ARC001 と 4 領域削除株である IGF742 株のテロメアの長さを比較した。制限酵素 *EcoRI* で完全に消化した染色体 DNA を電気移動し、テロメアリピート配列をプローブに用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、IGF742 のテロメアの長さは親株とほとんど同じであり、染色体末端削除はテロメア長にほとんど影響していないことを確認した(図 14)。

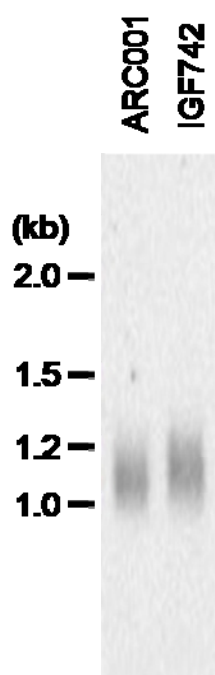


図 14 染色体大規模削除株のテロメア長の確認

YES (pH5.0) 培地、32°C で約 100 世代培養した分裂酵母（親株 ARC001 と 4 領域削除株 IGF742）の染色体 DNA を抽出し、サザンブロット解析によりテロメア長を確認した。

以上の結果より、最も削除サイズが大きい IGF742 は、増殖速度、細胞形態、染色体分配はほぼ正常であったが、いくつかのアミノ酸取込み能が低下している特性を持つことが明らかとなった。

(5) 染色体大規模削除株における物質生産効率

染色体大規模削除株における異種タンパク質生産能の解析を行った。モデルタンパク質として緑色蛍光タンパク質 (EGFP、細胞内蓄積タンパク質)、ヒト成長ホルモン (hGH、細胞外分泌タンパク質)、ヒトトランスフェリン (hTF、糖鎖付加・細胞外分泌タンパク質) を用い、各遺伝子は分裂酵母で構成的に発現する hCMV (ヒトサイトメガロウイルス) プロモーターとリポコルチンターミネーターの間に配置して第 2 染色体上の *leu1* 遺伝子座へ挿入した (図 9)。

まず EGFP 発現株を EMM 培地にて 32°C で振盪培養し、タンパク質の生産が盛んな対数増殖期にて EGFP の蛍光値を経時的に測定した (図 15)。1 領域削除株ではほとんど効果が見られず、削除領域を統合していくにつれて EGFP 発現効率の上昇が観察され、4 領域削除株 IGF742 が最も高い値を示した。

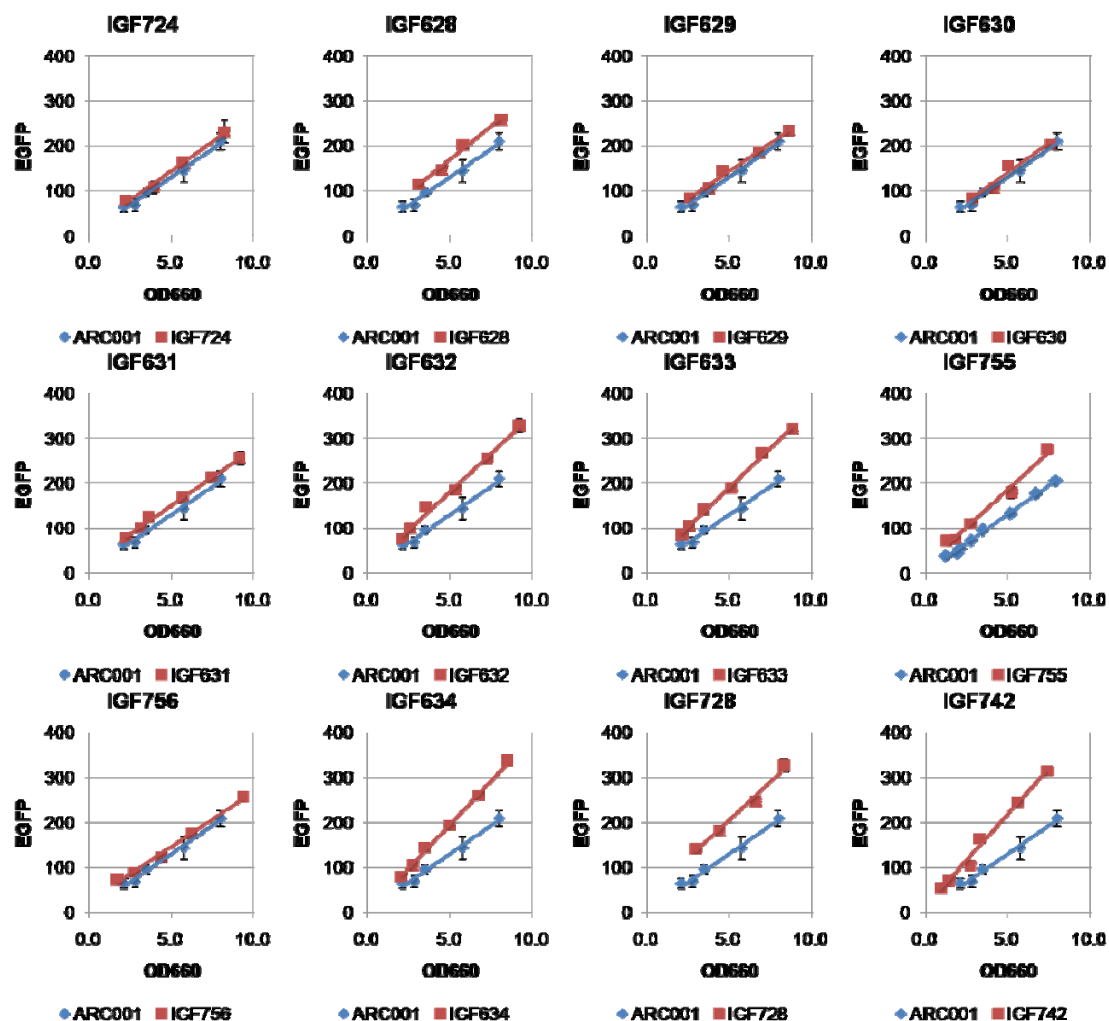


図 15 染色体大規模削除株における EGFP 発現解析

EMM 培地で培養した株の EGFP 蛍光値を経時測定した。各グラフのひし形は親株 ARC001、四角は各染色体大規模削除株を示した。(ARC001, Parent; IGF724, Δ ALT; IGF628, Δ ART; IGF629, Δ BLT; IGF630, Δ BRT; IGF631, Δ BLT BRT; IGF632, Δ ART BRT; IGF633, Δ ART BLT; IGF755, Δ ALT ART; IGF756, Δ ALT BLT; IGF634, Δ ART BLT BRT; IGF728, Δ ALT ART BLT; IGF742, Δ ALT ART BLT BRT)

続いて分泌発現解析を行った。まず hGH 発現株を YPD (MES pH6.0) 培地、32°C で培養し、培養開始より 2 日から 6 日経過した定常期の培養液上清をサンプリングした。各培養上清に分泌された hGH を測定するため TCA 濃縮を行い、SDS-PAGE 解析を行った。そして CBB で染色したバンドの濃度勾配によって hGH 含量を推測した(図 16)。解析の結果、1 領域削除株から分泌発現効率が向上しており、菌体濁度あたりの分泌発現効率が最も上昇した株は IGF658 (Δ ALT ART BLT) であった。

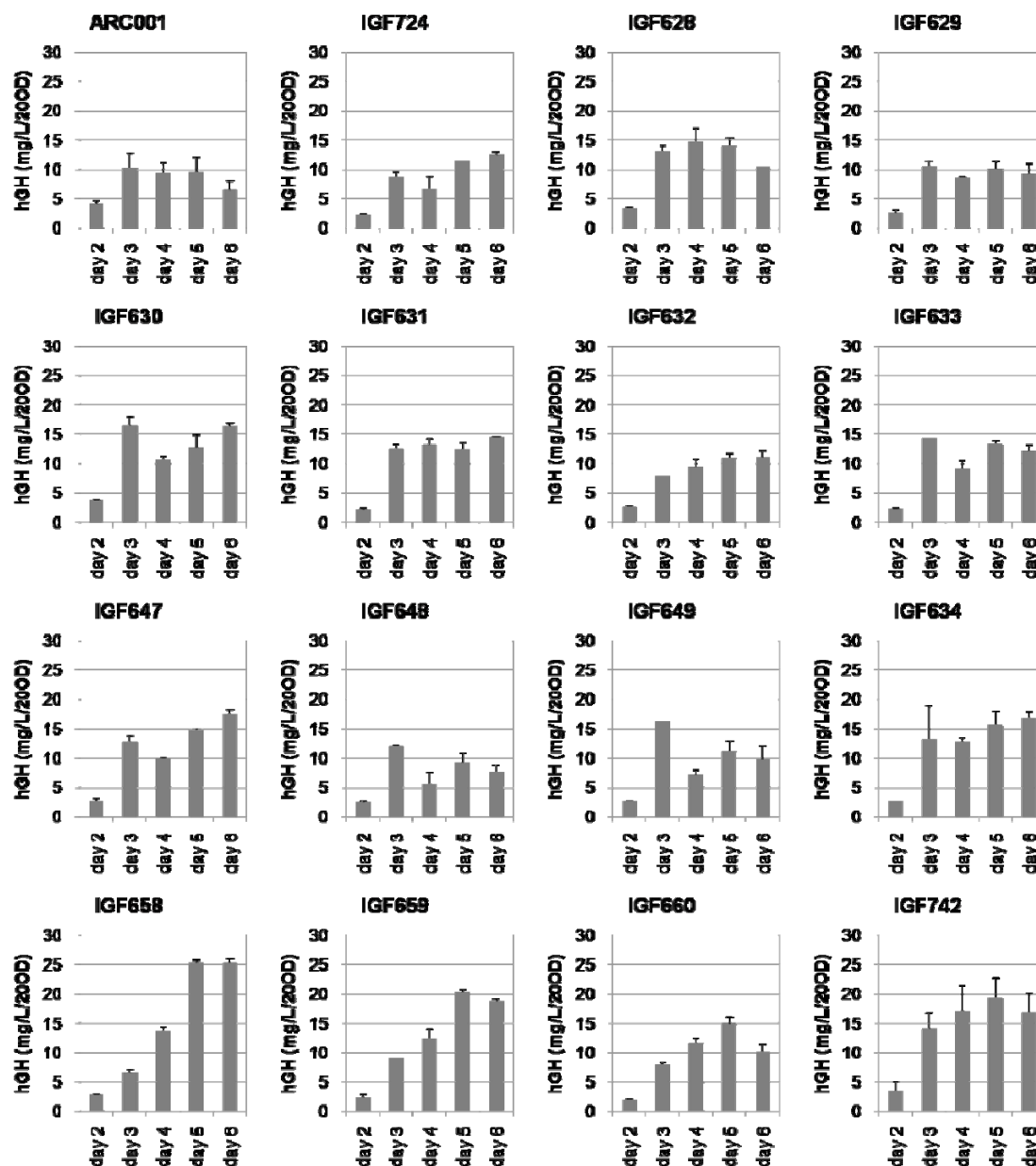


図 16 染色体大規模削除株における hGH 分泌発現解析

YPD (MES pH6.0) 培地で培養し、24 時間毎に培養上清のサンプリングを行った。各培養上清液を TCA 濃縮し、電気泳動後にバンド濃度による hGH の測定を行った。各測定値をサンプリングした際の細胞密度 ($OD_{660}=20$ に換算) により補正しその値をグラフに示した。(ARC001, Parent; IGF724, Δ ALT; IGF628, Δ ART; IGF629, Δ BLT; IGF630, Δ BRT; IGF631, Δ BLT BRT; IGF632, Δ ART BRT; IGF633, Δ ART BLT; IGF647, Δ ALT ART; IGF648, Δ ALT BLT; IGF649, Δ ALT BRT; IGF634, Δ ART BLT BRT; IGF658, Δ ALT ART BLT; IGF659, Δ ALT ART BRT; IGF660, Δ ALT BLT BRT; IGF742, Δ ALT ART BLT BRT)

次にhTFの分泌発現解析を行った。hGH分泌発現解析に用いた同様の培地で、培養開始より2日から10日経過した定常期の培養上清をサンプリングした。培養液中に分泌されたhTFをELISA法にて定量し、親株ARC001と比較した(図17)。hTF分泌発現においても1領域削除株からhTF分泌量は増加し、菌体濁度あたりの分泌量が最も向上した株はIGF728(Δ ALT ART BLT)であった。

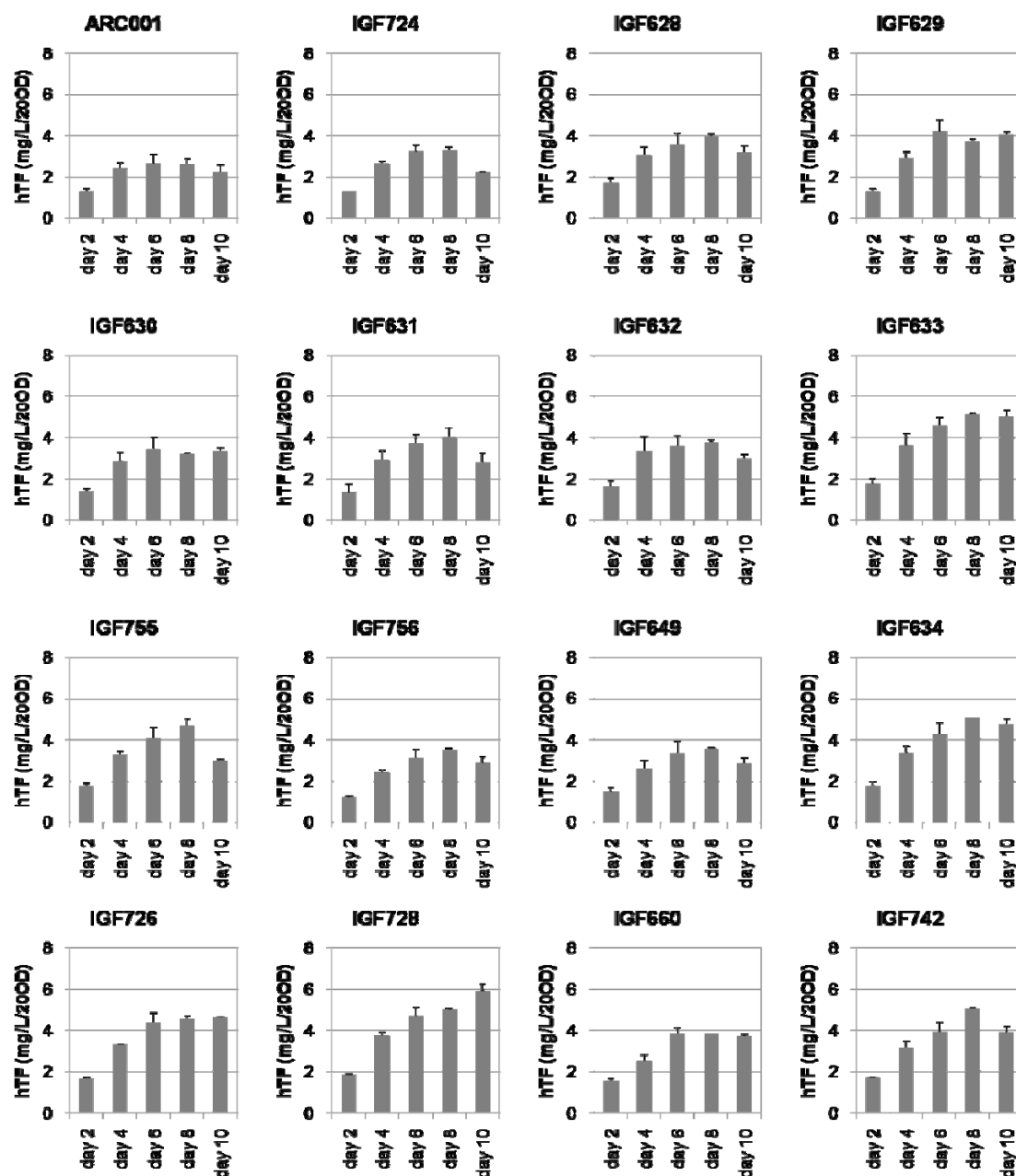


図17 染色体大規模削除株におけるhTF分泌発現解析

YPD (MES pH6.0) 培地で培養し、24時間毎に培養上清のサンプリングを行った。各培養液上清中に含まれるhTF量をELISA法により定量しグラフに示した。各測定値をサンプリングした際の細胞密度($OD_{660}=20$)

に換算)により補正しその値をグラフに示した。(ARC001, Parent; IGF724, Δ ALT; IGF628, Δ ART; IGF629, Δ BLT; IGF630, Δ BRT; IGF631, Δ BLT BRT; IGF632, Δ ART BRT; IGF633, Δ ART BLT; IGF755, Δ ALT ART; IGF756, Δ ALT BLT; IGF634, Δ ART BLT BRT; IGF726, Δ ALT ART BRT; IGF728, Δ ALT ART BLT; IGF742, Δ ALT ART BLT BRT)

図 18 に各モデルタンパク質生産効率に対する染色体削除効果を親株に対する相対値で示した。EGFP 発現では 4 領域削除株 IGF742 で 1.8 倍、hGH 分泌発現では IGF658 で 3.3 倍、hTF 分泌発現では IGF728 で 2.0 倍と効率が上昇していた。

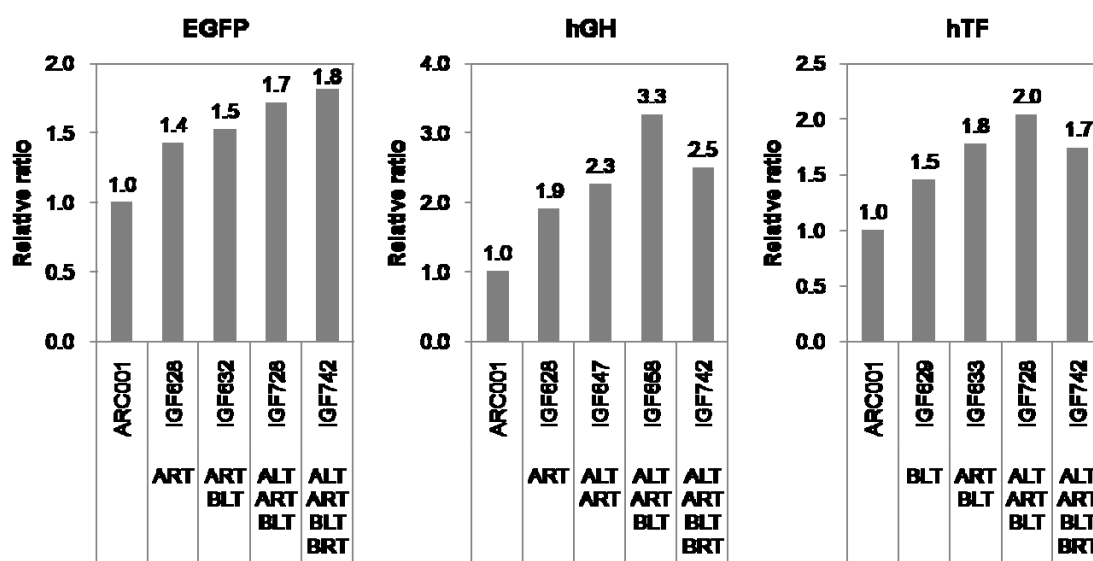


図 18 物質生産効率相対比

各発現タンパク質における染色体削除効果を相対比で示した。EGFP は経時測定した蛍光値から近似式を算出し、 $OD_{660}=5$ の時の EGFP 蛍光値を比較した。hGH、hTF は各株で最も高い生産値を比較した。

(6) オミックス解析による物質生産効率向上要因の推定

染色体大規模削除株において物質生産効率が上昇する要因を探るため、染色体削除による遺伝子発現傾向の変化を解析した。4 領域削除株である IGF742 と、各遺伝子の変動がどの削除領域から由来しているのか確認するために 1 領域削除株である IGF724 (Δ ALT)、IGF628 (Δ ART)、IGF629 (Δ BLT)、IGF630 (Δ BRT) について cDNA マイクロアレイ解析を行い、親株 ARC001 の遺伝子発現傾向と比較した(図 19)。その結果、IGF742 では窒素飢餓で発現が誘導される減数分裂制御因子である *mei2* や接合フェロモンである *mfm1* や *mfm3* の転写量が増加していたため、染色体大規模削除株は窒素源がまだ培地中に残っている対数増殖期において窒素飢餓を感じていることが推測された。同様の傾向が ART 単独削除株である IGF628 でも観察されたため、この窒素飢餓傾向は ART 領域削除に起因していた。IGF628 はアミノ酸トランスポーターの削除によりアミノ酸取込み能が低下している。そのため窒素飢餓傾向が生じているのではないかと考えられた。さらに、KEGG データベースを用いて cDNA マイクロアレイ結果を代謝マップにマ

ッピングしたところ、アンモニアからグルタミン酸を生合成する遺伝子の転写量が増加していた。グルタミン酸はアミノ酸生合成において最も基本的なアミノ酸である。そのため、異種タンパク質の生産量向上に何らかの影響を与えている可能性が推測された。しかしながら、細胞内のアミノ酸量は厳密に制御されているため、グルタミン酸生合成経路周辺遺伝子の発現上昇は培地中のアミノ酸取込み量の低下に起因しているとも考えられる。そこで、培地を YPD 培地から EMM 培地に変更し、培地中の窒素源はアンモニアだけにして同様の解析を行った。培地を EMM 培地に変更しても、窒素飢餓で発現が誘導される *mei2* や *mfm1*、*mfm3* の発現量が増加していた(図 20)。また、今回はアンモニウムトランスポーターである *amt1* の発現量も増加していた。EMM 培地でのマイクロアレイ結果を代謝マップにマッピングしたところ、やはり YPD 培地の時と同様にアンモニアからグルタミン酸を生合成する遺伝子、TCA サイクルのオキシグルタル酸からグルタミン酸を生合成する遺伝子、そしてグルタミン酸からグルタミンを生合成する遺伝子とグルタミン酸生合成周辺遺伝子の発現が増加していた。さらに、IGF634 (Δ ART BLT BRT) のメタボローム解析では、アミノ酸の前駆体となる物質が親株と比較して増加していたことから、染色体大規模削除株ではアミノ酸生合成系に何らかの変化が生じているのではないかと推測された。



図 19 YPD 培地におけるトランスクリプトーム解析

YPD 培地で対数増殖期まで培養した染色体大規模削除株の遺伝子の発現傾向を親株 ARC001 と比較し、発現量比をヒートマップで示した。各染色体大規模削除株 (IGF724, ΔALT; IGF628, ΔART; IGF629, ΔBLT; IGF630, ΔBRT; IGF742, ΔALT ART BLT BRT) の cDNA マイクロアレイ解析を 2 回ずつ行った。各遺伝子の発現量比を log₂ 比で示し、IGF742 において log₂ 比 ±1.5 以上の変動があった遺伝子をピックアップし、ジーンオントロジーのバイオリジカルプロセスに基づいて分類した。2 個以上遺伝子が含まれるカテゴリー一名を遺伝子名の左に示した。緑色は発現量が増加した遺伝子、マゼンタは発現量が低下した遺伝子を示している。

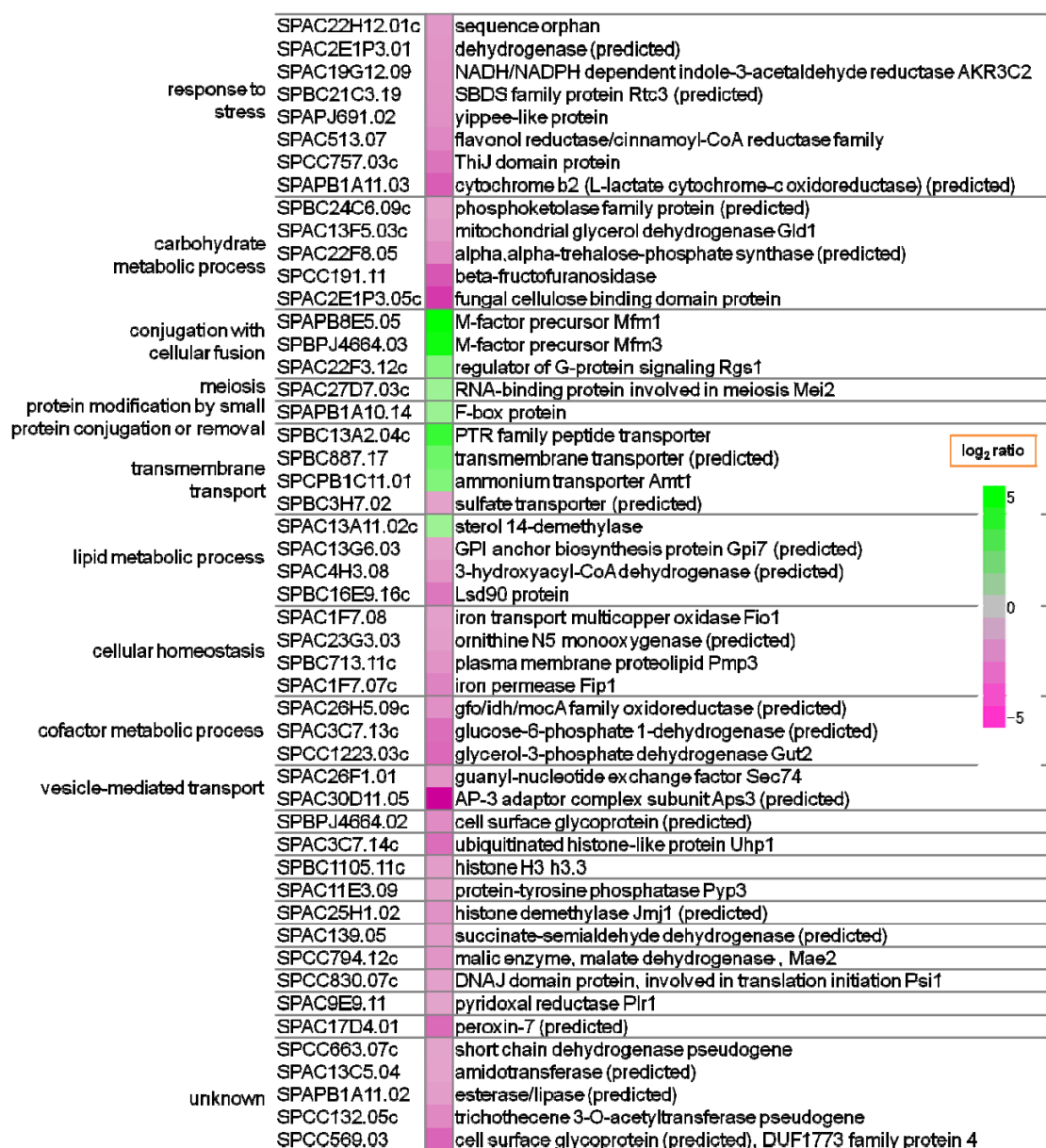


図 20 EMM 培地におけるトランスクリプトーム解析

EMM 培地で対数増殖期まで培養した IGF742 の遺伝子発現傾向を親株と比較し、発現量比をヒートマップで示した。各遺伝子の発現量比を \log_2 比で示し、 ± 1.5 以上の変動があった遺伝子をピックアップしてジェノントロジーのバイオリジカルプロセスに基づいて分類した。2 個以上遺伝子が含まれるカテゴリー名を遺伝子名の左に示した。緑色は発現量が増加した遺伝子、マゼンタは発現量が低下した遺伝子を示している。

結語

分裂酵母 IGF では可能な限り分裂酵母のゲノムサイズを縮小化するため、データベースによる相同検索や一遺伝子破壊株情報より大規模に削除できる領域の詳細な決定を行った。第 1 染色

体、第 2 染色体の両末端の 4 つの領域に広範囲におよぶ非必須遺伝子クラスターが存在することが推測されていたため、まず各領域の最も末端にある必須遺伝子を特定した。各末端の必須遺伝子は *trs33*(ALT)、*sec16*(ART)、*zas1*(BLT)、*usp109*(BRT) であることが Latour 法により明らかとなった。一遺伝子破壊株ライブラリーでは非必須遺伝子が必須遺伝子として判定された理由として、第 1 に遺伝子削除により増殖能が著しく低下するために削除株を得ることが困難であった、そして第 2 に染色体の部位により相同組換え効率が低いため削除株を得ることが困難であったことが考えられた。本研究で用いられた Latour 法による大規模削除でも増殖能低下要因となる遺伝子 *pdc2* の削除は非常に困難であったが、その他の必須遺伝子とされていた 2 つの遺伝子 SPBC1348.06c と *alr2* については問題なく削除することが出来た。染色体の相同組換え効率が低い部位を含む程度大きな領域を削除できる本方法は、染色体構造の改変のみならず、遺伝子の機能解析においても有利な方法であるといえる。

分裂酵母 MGF より IGF へ発展させるにあたり、まず MGF 株で問題となっていた削除サイズの拡大に伴う増殖速度の低下や細胞の形態異常などの問題を解決する必要があった。上述で特定した非必須遺伝子クラスター領域を単独で削除した各 IGF 株の中では、ALT 削除株と BLT 削除株に生育の遅延が生じていた。これらの領域の中の増殖速度に影響する遺伝子の選定を行ったところ、*pdc2*、SPBC1683.05 を削除すると増殖速度に影響することが判明した。大規模削除を行う際に、これらの遺伝子を *ura4* 座に移転して残すことによって、増殖速度低下の問題を解決することが出来た。これらの結果より、増殖速度、細胞形態などほぼ安定に維持した染色体大規模削除株 IGF742 (Δ 657.3 kbp) が完成した。

増殖能を改善した染色体大規模削除株では、異種タンパク質生産効率が向上していた。タンパク質生産能だけを評価した EGFP 発現解析では IGF742 が約 1.8 倍、さらに分泌効率も合わせて評価した hGH 分泌発現解析では IGF658 が約 3.3 倍、hTF 分泌発現解析では IGF728 が約 2.0 倍に効率が上昇していた。これらの発現効率が上昇した理由については現在解析中であるが、オミックス解析からアミノ酸合成の基礎となるグルタミン酸合成周辺の活性化が要因のひとつであることが推測された。トランスクリプトーム解析では、窒素飢餓で誘導される接合フェロモン因子や減数分裂調節因子の発現が上昇していたことも特徴的であった。さらに最少培地 EMM ではアンモニウムトランスポーターの発現も上昇していた。このことから、染色体大規模削除株では窒素源取り込み系にも変化が生じていることが推測された。実際に、削除領域中にはいくつかのアミノ酸トランスポーター遺伝子が存在しているため、アミノ酸取り込み効率の減少も要因のひとつであるのかもしれない。今後、異種タンパク質高生産株としてより改良していくためにもオミックス的手法などを用いてさらに解析を掘り下げ、要因を解明する必要がある。

以上より、組換えタンパク質生産宿主細胞の土台として異種タンパク質生産効率の上昇した染色体大規模削除株 IGF742 が完成した。さらに異種タンパク質生産効率や分泌効率を向上させるために、MGF で作製した組換えタンパク質生産宿主細胞のひとつであるプロテアーゼ八重削除株との削除領域の統合や、液胞輸送系の弱化や小胞体分子シャペロンの強化などの機能統合、さらに品質向上のための HCP(宿主細胞由来タンパク質)低減や糖鎖エンジニアリングなども検

討することが望まれる。しかしながら、これらの機能統合は全ての組換えタンパク質において有効であるとは限らず、組換えタンパク質ごとに最適な条件を選別する必要がある。本プロジェクトで構築した染色体大規模削除株を土台とし、組換えタンパク質ごとに最適な機能統合を加えることで、さらに効率的に物質生産性の高い生物プロセスに繋がることが期待される。

2.1.3.2 外来遺伝子機能安定導入

外来の多数の有用形質を宿主細胞に効率的に付与することを可能とする染色体改変技術の開発を目的とし、染色体上に多数の外来遺伝子発現ユニットを安定に保持することが可能である技術開発を行なった。その結果、外来遺伝子を組込むことに最適な遺伝子座を特定するとともに、さらに複数の外来遺伝子発現ユニットを一度に組込むことが可能であることを見出した。

分裂酵母ではすでに、特定の遺伝子座に発現カセットを多重に組み込む技術が開発されている。緑色蛍光タンパク質 (GFP) のように、宿主細胞の生育にほとんど影響を及ぼさないタンパク質をコードする遺伝子の場合、導入した発現カセットは 50 世代を超えて安定である。しかしながらタンパク質の種類によっては、長期継代培養時に相同組換えによると思われる発現カセットの脱落に起因する生産量の低下が生じる場合がある。このため発現カセットを一箇所に多数ではなく、多くの箇所に同時に組み込むことによって物質生産の継代安定性を担保するという、外来の遺伝子機能を安定に染色体に導入する技術の開発を目指している。

分裂酵母の染色体には、発現カセットを一度に多くの箇所に同時に組み込むことに適した、高度に保存された配列の重複がある。セントロメアや複製開始起点に多い AT-rich な配列以外にも、LTR や *tf2* というトランスポゾンに由来するもの、さらには染色体末端領域 (サブテロメア領域) に 4 コピー程度が染色体上に重複している遺伝子が存在する。なかでも *tf2* は、13 個の配列が 99% 以上の相同性で染色体全体に散在している (図 2.1.3.2-1)。このため、この遺伝子座に組込むことが可能なベクターを作製し (図 2.1.3.2-2)、形質転換の結果、同時に多コピー導入可能であることを、特異的なプライマーセットを用いて確認することに成功した (図 2.1.3.2-3)。

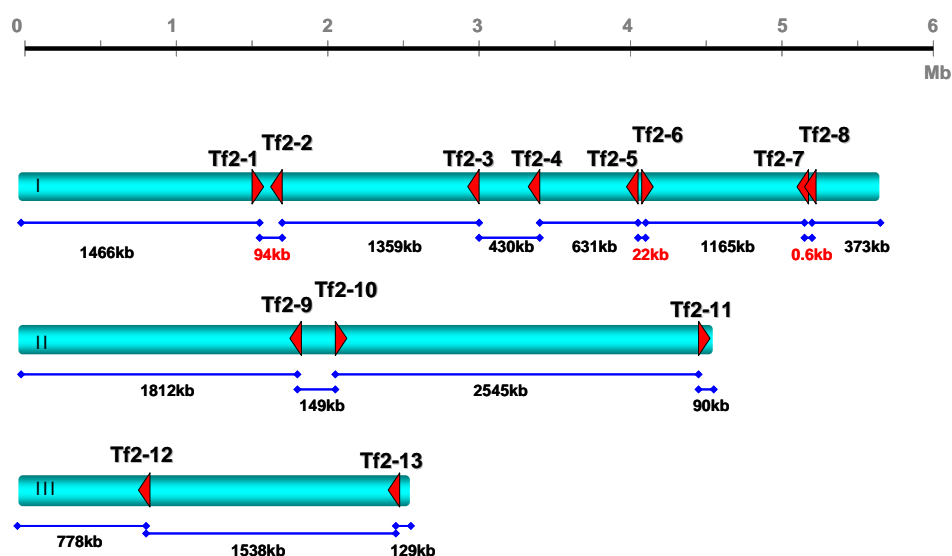


図 2.1.3.2-1 Tf2 遺伝子の染色体上の分布

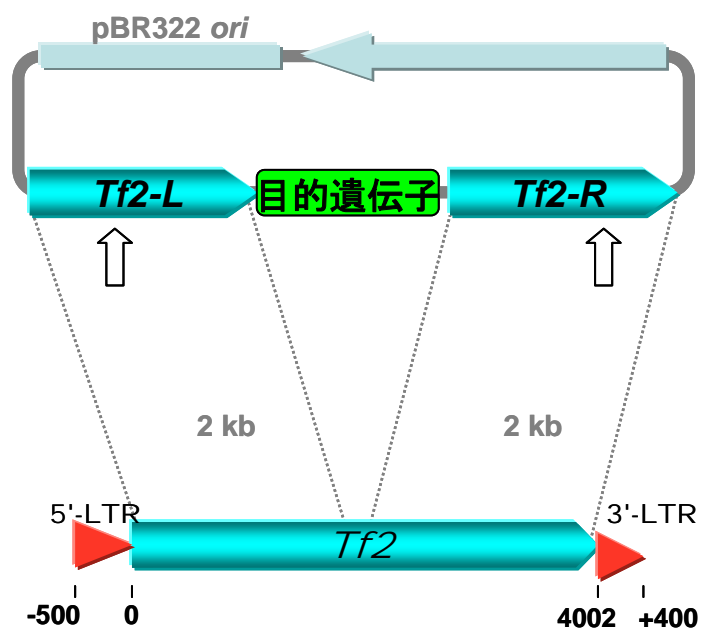


図 2.1.3.2-2 多座組込型発現ベクター

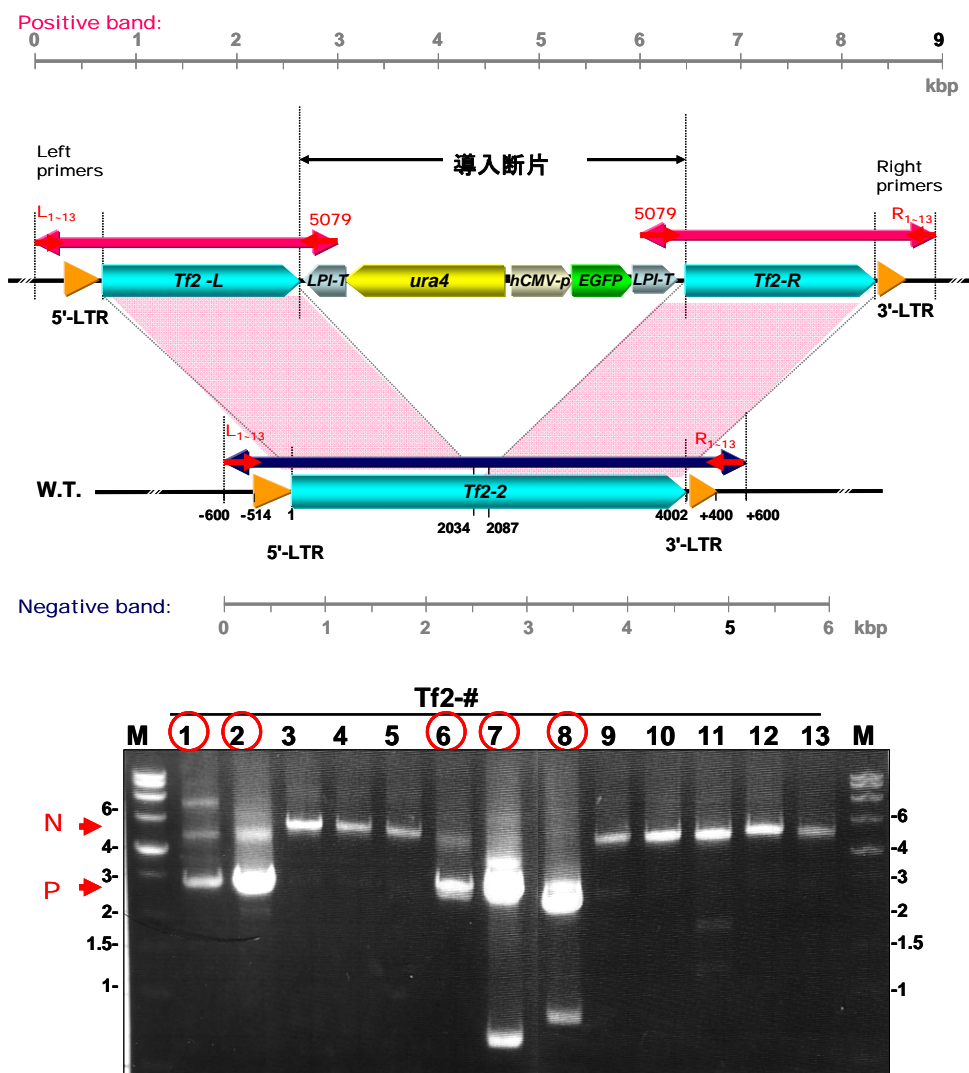


図 2. 1. 3. 2-3 多座組込遺伝子座および組込コピー数の確認

本成果は特願 2009-015472 として特許出願し、広く成果の公表ならびに普及に努めた。

2. 1. 3. 3 遺伝子発現制御機能付与

外来の有用形質を効率的に発現することを可能とする遺伝子発現制御技術の開発を目的とし、薬剤添加による誘導型プロモーターや外部信号による制御が可能なプロモーターの取得と、その配列を最適化する技術開発に取り組んだ。分裂酵母ではすでに、誘導型発現が可能なプロモーターが複数取得されている。これらを用いて、モノアミノキシダーゼのように、宿主細胞の生育に影響を及ぼし、構成的な発現では十分量の生産物が得られないものでも、生産が可能になっている。しかしながらタンパク質の種類によってはさらに強い発現制御、すなわち増殖と生産の完全な分離を必要とする場合がある。このため、薬剤を添加することなどの化学信号や、外来の物理学的な信号によって初めて遺伝子発現が始まり、添加しない場合は全く転写が行われないプロモーターならびにその補助因子を取得し、より汎用性の高い物質生産が可能になる技術の開発を目指している。その結果、熱ならびに多様なストレスによって外来遺伝子の発現が誘導される系を確立した(図 2.1.3.3-1)。

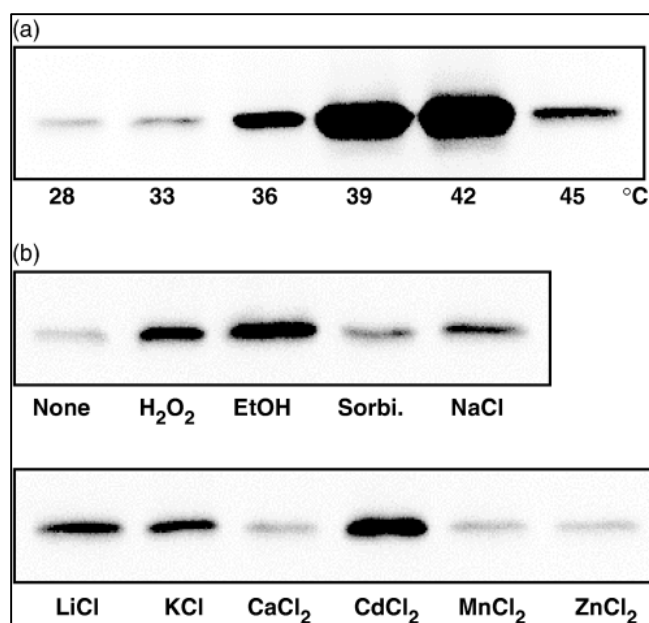
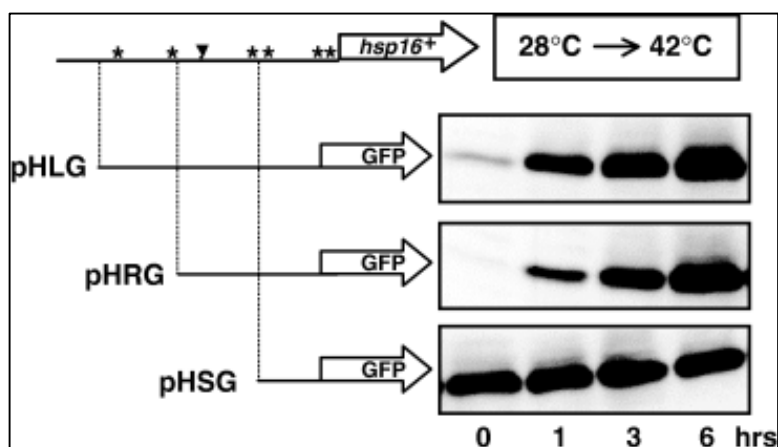


図 2.1.3.3-1 hsp16 プロモーターを用いた温度遷移および各種ストレスによる転写誘導

本成果は特願 2007-533214 として特許出願し、広く成果の公表ならびに普及に努めた。

2.1.3.4 異種タンパク質分泌生産向上

異種タンパク質の大量生産を行う場合、効率のよい発現が求められる。われわれはヒトトランスフェリン (hTF) をモデルタンパク質とし、分裂酵母における分泌生産性の向上を目的とした。hTF は約 80kDa の可溶性タンパク質であるが 2 箇所の N-結合型糖鎖修飾部位を持つため、分裂酵母で発現させると N 型糖鎖の付加により約 110~120kDa 程度の分子量を示す。また本タンパク質の N 末端領域には細胞外への分泌シグナルを保持しているため、細胞外に分泌される。そのため、本タンパク質の培地中への分泌量を最大化するために、培養条件の検討を行った。

まず、染色体組込型 hTF 構成分泌発現ベクター pTL2OSTFN-CF-4XL を構築し、酢酸リチウム法によって Idiris らが構築したプロテアーゼ多重破壊株である MGF433(A8) 株を形質転換した。最小培地 MM 上でのロイシン要求性の回復によって形質転換体を選択し、複数のクローンを獲得し、hTF 生産実験を行い生産が確認されたクローンを以下の実験に使用した。培地の違いに依存した hTF 生産量の違いを検討するために、分裂酵母の培養で汎用されている培地である YPD・MM・YES 培地を用い、48 時間それぞれの培地で培養したのち培養上清を回収し、ウェスタン解析により解析した。その結果、YPD と MM 培地においてよく分泌生産されていた(図 2.1.3.4-1)。さらにこの 2 つの培地に 2% のカザミノ酸(CAA)を添加したところ、ともに同程度生産量の増加が見られ、カザミノ酸無添加に比べて約 5 倍以上向上させることが可能となった。hTF を今後産業的に大量発現する際のコスト面等を考慮し、このあとの培養条件等の検討は、安価な MM 最少培地を基本培地として実験を行うこととした。

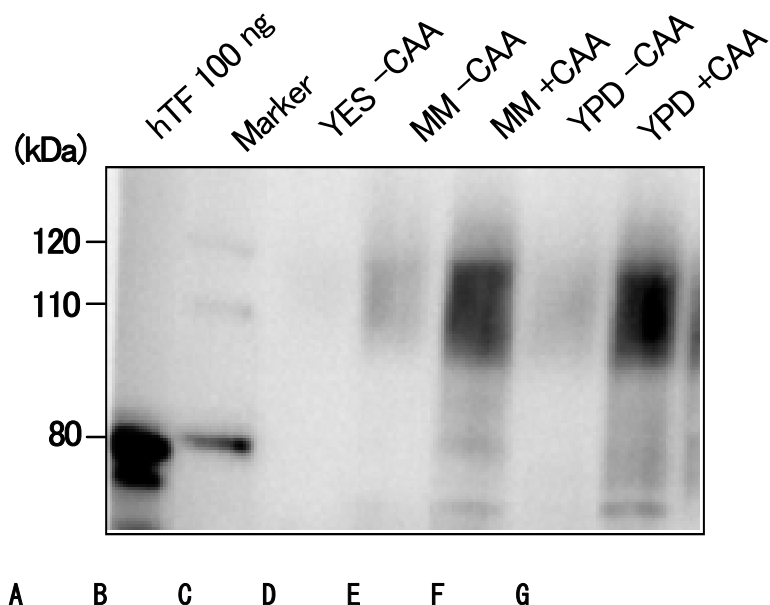


図 2.1.3.4-1 hTF 分泌生産に対する培地組成の影響

左から市販品 100ng (レーン A)ならびに分裂酵母で生産した hTF (レーン B)の SDS-PAGE(ウエスタン検出)。48 時間培養後、各培養上清をアセトン沈殿し、1レーンあたり培地 0.5 ml 相当を泳動した。栄養培地 YES 及び YPD と MM 最少培地にカザミノ産(CAA)を添加した場合としなかった場合についてウエスタン解析を行った。

さらに培地に添加することで hTF の生産を向上させることが出来る物質のスクリーニングを行った。MM 培地に 2%の CAA を添加した培地をベースとし、これにデキストラン硫酸ナトリウム、Tween20、デオキシコール酸、TritonX-100、SDS、ポリエチレングリコール分子量 8000 平均(PEG 8000)を添加した。48 時間それぞれの培地で培養したのち培養上清を回収し、ウエスタン解析により解析したところ、デキストラン硫酸ナトリウムを 0.002~0.01%添加した場合がもっとも高い生産向上能を示し、無添加に比べて約 3 倍以上の生産向上を示した(図 2.1.3.4-2)。

これらの結果から、MM培地に2%カザミノ酸とデキストラン硫酸ナトリウムを0.002~0.01%添加することで相乗効果により無添加の場合に比較して15倍以上の生産向上を可能にした。

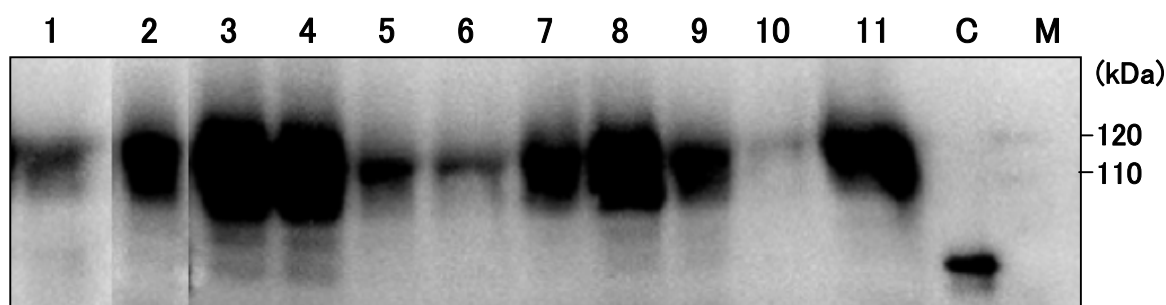


図 2.1.3.4-2 hTF 分泌生産に対する添加物の影響

市販品(C)ならびに分裂酵母で生産したhTFのSDS-PAGE(ウエスタン検出)。1:基本培地(CAA添加なし)、2:基本培地(CAA添加)、3:デキストラン硫酸ナトリウム 0.01%、4:デキストラン硫酸ナトリウム 0.002%、5:Tween20 0.01%、6:Tween20 0.002%、7:デオキシコール酸 0.01%、8:デオキシコール酸 0.002%、9:TritonX-100 0.002%、10:PEG8000 1%、11:PEG8000 0.1%、C:市販品 hTF 100ng、M:分子量マーカ。2-11は培地にCAA2%含む。48時間培養後、各培養上清をアセトン沈殿し、1レーンあたり培地0.5ml相当を泳動した。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、分子シャペロンである protein disulfide isomerase Pdi1 タンパク質と、糖鎖付加されない変異 hTF ではあるが、これらを共発現させることで hTF の分泌生産が向上することが報告されている。そこでこのような効果が分裂酵母においても見られるか検討を行った。分裂酵母のゲノムデータベースを用いて検索したところ、分裂酵母には *PDII* 遺伝子のホモログが SPAC1F5.02、SPAC17H9.14c、SPBC3D6.13c、SPAC959.05c、SPCC1840.08c の5種類存在することが明らかになった。そこでこれらの遺伝子を hTF 発現株において共発現することを試みた。

分裂酵母のゲノムから PCR 法によりそれぞれの遺伝子を増幅し多コピー高発現型ベクター pREP1 にクローニングし、それぞれの発現ベクター pREP-SPAC1F5.02、pREP-SPAC17H9.14c、pREP-PBC3D6.13c、pREP-SPAC959.05c、pREP-SPCC1840.08c を作製した。それぞれの発現ベクターを酢酸リチウム法によって上記で作製した hTF 発現 A8 株に形質転換を行った。最少培地 MM 上でのウラシル要求性の回復によって形質転換体を選択し、複数のクローンを獲得した。これらの株を基本培地で48時間培養した後、培養上清を回収しウエスタン解析により解析した結果、hTF と SPAC959.05c、SPCC1840.08c 共発現株においては hTF の生産向上は見られなかったが、hTF と SPAC17H9.14c、PBC3D6.13c 共発現株においては顕著な生産向上が見られた(図 2.1.3.4-3A)。また hTF と SPAC1F5.02 共発現株においては、糖鎖付加型の hTF を示す 120kDa 付近の hTF の生産向上には影響を与えなかったが、約 80kDa の hTF の発現が観察された。培養上清に対し、N型糖鎖を特異的分解する peptide:N-glycosidase である EndoHf で処理したところ 120kDa 付近の hTF は消失し、SPAC1F5.02 共発現株によって生じた約 80kDa の hTF と同位置に移行したところから、この約 80kDa の hTF は糖鎖の付加されていない hTF であることが示唆さ

れた(図 2.1.3.4-3B)。つまり hTF と SPAC1F5.02 共発現株により糖鎖付加されない hTF の生産が可能になるという意外な結果が得られた。また基本培地において、hTF と SPAC17H9.14c、PBC3D6.13c 共発現株の生産向上能はデキストラン硫酸ナトリウムを 0.002~0.01% 添加した場合よりも約 3 倍以上高いことが示唆された(図 2.1.3.4-3C)。

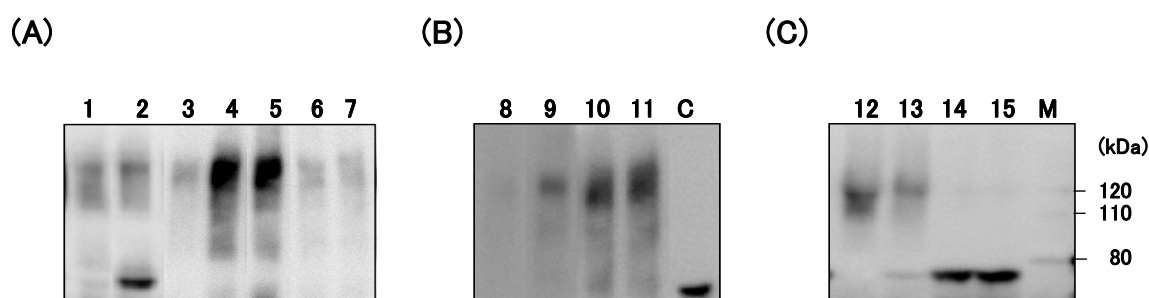


図 2.1.3.4-3 hTF 生産に対する分裂酵母 PDI ホモログの共発現の影響

(A) MM 培地(カザミノ酸なし)にて各 PDI ホモログと hTF を共発現させたもの。(B) デキストラン硫酸ナトリウム添加時との比較。(C) endoH 処理による hTF のバンドシフト。1、7、8、12: PDI ホモログの共発現なし、2、13: SPAC1F5.02 共発現、3: SPAC959.05c 共発現、4、10: SPAC17H9.14c 共発現、5、11: SPBC3D6.13c 共発現、6: SPCC1840.08c 共発現、9: デキストラン硫酸ナトリウム 0.01% 添加、14: 12 のサンプルを endoH 処理したもの、15: 13 のサンプルを endoH 処理したもの、C: 市販品 hTF 100ng、M: 分子量マーカー。48 時間培養後、各培養上清をアセトン沈殿し、1 レーンあたり培地 0.5 ml 相当を泳動した。

共発現により生産向上を示した SPAC17H9.14c、PBC3D6.13c と SPAC1F5.02 の細胞内局在を検討するため、それぞれの遺伝子に緑色蛍光タンパク質をコードする GFP 遺伝子融合させ、それぞれの融合遺伝子を多コピー発現ベクター、pREP41 にクローニングし、酢酸リチウム法によって ARC039 株を形質転換をした。最少培地 MM 上でのロイシン要求性の回復によって形質転換体を選択して複数のクローンを獲得し、GFP の蛍光が確認されたクローンに対し蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、それぞれの GFP 融合タンパク質は ER に局在することが明らかとなり、本タンパク質群は ER において機能していることが示唆された(図 2.1.3.4-4)。



図 2.1.3.4-4 3種のPDIホモログの細胞内局在

各遺伝子のN-末端にGFPを連結して発現させ、蛍光顕微鏡により観察したところ、ERに局在していることが明らかとなった。

SPAC17H9.14c、SPBC3D6.13c と SPAC1F5.02 それぞれと hTF 共発現した株において、hTF の分泌生産量の経時変化を検討した。それぞれの共発現株に対し、基本培地にカザミノ酸 2%とデキストラン硫酸ナトリウム 0.01%を添加した培地と hTF のみの発現株についてはこれに加えて無添加の培地とデキストラン硫酸ナトリウム 0.01%のみを加えた培地において生育速度とウエスタン解析により hTF 分泌生産量の時変化を解析した。その結果 SPAC1F5.02 共発現株は、成長も早く、120 時間培養後には hTF のみの発現株に比べ高い細胞密度になった(図 2.1.3.4-5A)。このことは SPAC1F5.02 が発現することで hTF 生産のストレスを和らげていることが示唆される。また SPBC3D6.13c 共発現株では成長の遅延が見られるが、最終的な細胞密度は hTF のみの発現株と同一になった。hTF の分泌生産量を見ると無添加やデキストラン硫酸ナトリウム 0.01%のみを加えた培地では hTF の発現は 24 時間が最大でありその後減少していることが明らかとなった(図 2.1.3.4-5B)。しかしデキストラン硫酸ナトリウム 0.01%のみを添加したものは若干生産量も多く、培養時間経過による hTF の減衰も弱くなっていた。興味深いことに SPBC3D6.13c 共発現株においては、hTF の生産に遅延が見られるがほかの共発現株や hTF のみの発現株と異なり、120 時間後まで hTF の分泌生産量の増加が観察された。これらの結果から、基本培地にカザミノ酸 2%とデキストラン硫酸ナトリウム 0.01%を添加した培地でさらに SPAC17H9.14c もしくは SPBC3D6.13c を共発現することにより、基本培地での hTF 生産よりも約 45 倍以上の分泌生産の向上を与えることが可能であると考えられる。

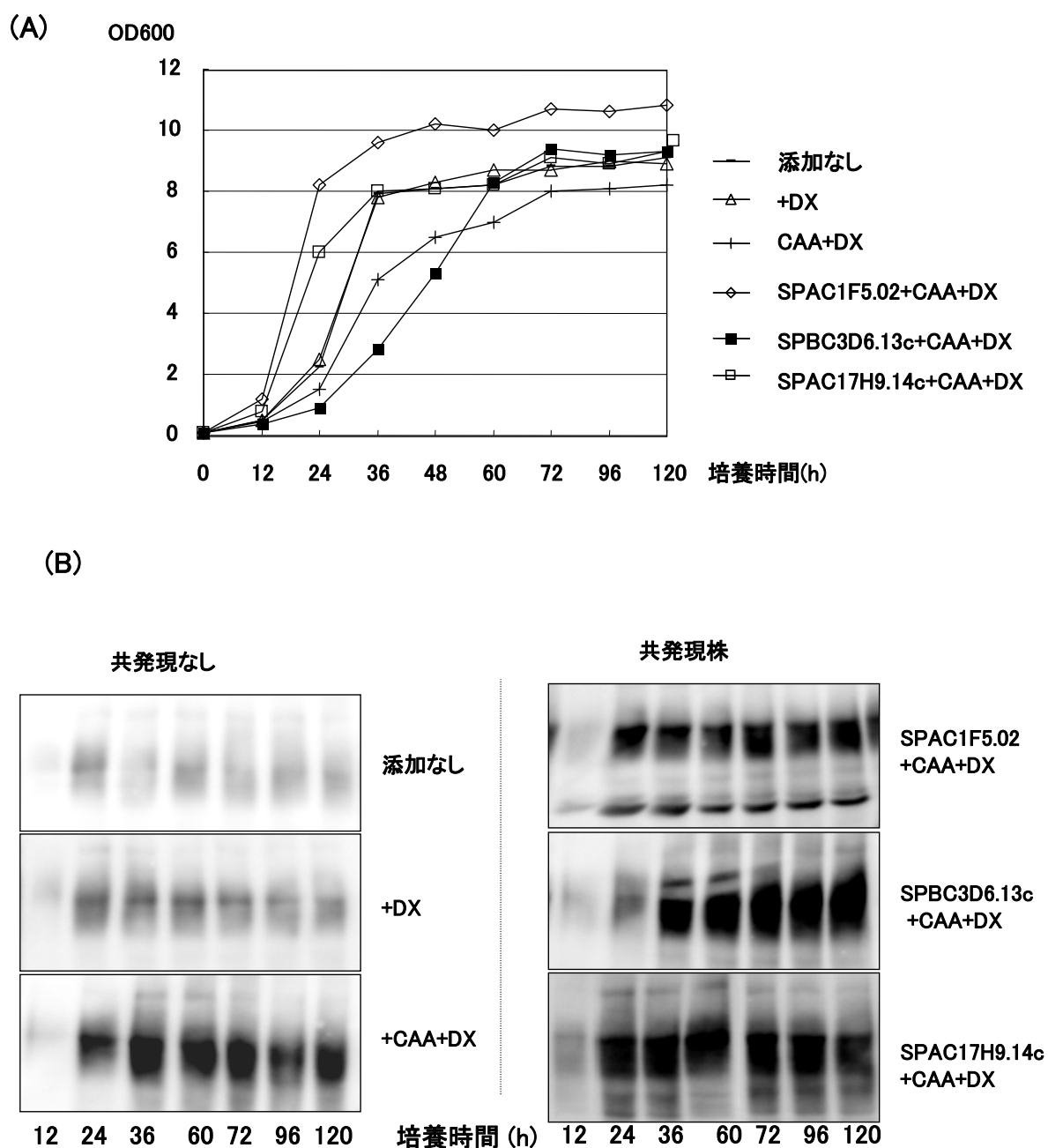


図 2. 1. 3. 4-5 共発現によって生産能に変化を示した PDI ホモログの共発現時の成長曲線と hTF の分泌生産の経時変化

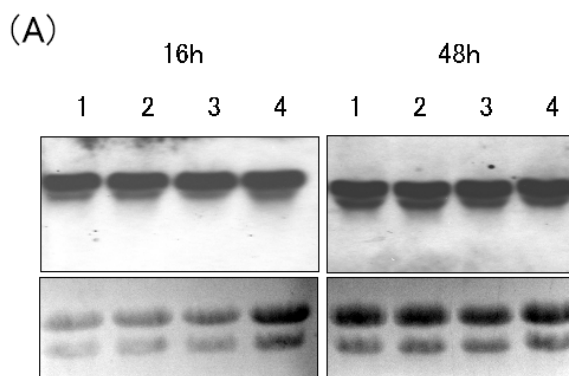
(A)それぞれの株の生育曲線を OD=600 で 120 時間追跡した。(B)分泌生産された hTF の生産量の経時変化をウエスタン解析した結果。各培養時間においてそれぞれの培養上清をアセトン沈殿し、1 レーンあたり培地 0.5 ml 相当を泳動した。

今回の実験で分裂酵母によりヒトトランスフェリンを生産させた場合には、培地としてカザミノ酸

を用いた場合に飛躍的にその生産効率を向上させることができた。さらにデキストラン硫酸を添加した場合にも、著量な hTF を培地中に生産することを見いだした。また今回、分裂酵母の PDI の過剰発現による hTF の生産効率を調べた結果、SPAC17H9.14c、SPBC3D6.13c という2つの PDI ホモログが hTF の生産効率を上昇させることがわかった。

培地添加物で分泌が強化された結果は、どのような作用によるものか明らかとするために、MM 培地への添加物が hTF 遺伝子の発現を強化している可能性についてノザン解析による検討を行った。それぞれの培地において、16もしくは48時間培養後、菌体を回収し RNA を抽出した。その後、hTF 遺伝子の一部をプローブとしてノザン解析を行った。その結果、培地添加物を加えても hTF 遺伝子の転写量は無添加と比較して有意な差はなく、分泌強化は遺伝子発現の変化によるものではないことが明らかとなった。(図 2.1.3.4-6A)

また、3種の PDI (SPAC1F5.02、SPAC17H9.14c、SPBC3D6.13c) 過剰発現株においてもノザン解析を行った。各 PDI はチアミン飢餓応答プロモーター *nmt1* 下流に位置し、チアミン飢餓状態で各 PDI が発現するように作製しており、図 2.1.3.4-6B に示したようにチアミン添加で各 PDI の発現は抑えられているが、それにもにかかわらず hTF の発現量に関してはチアミン添加に関わらず変化しない。このことから、PDI についてもそれらの過剰発現により、hTF 遺伝子の転写が促進されているのではないことが明らかとなった。(図 2.1.3.4-6C)



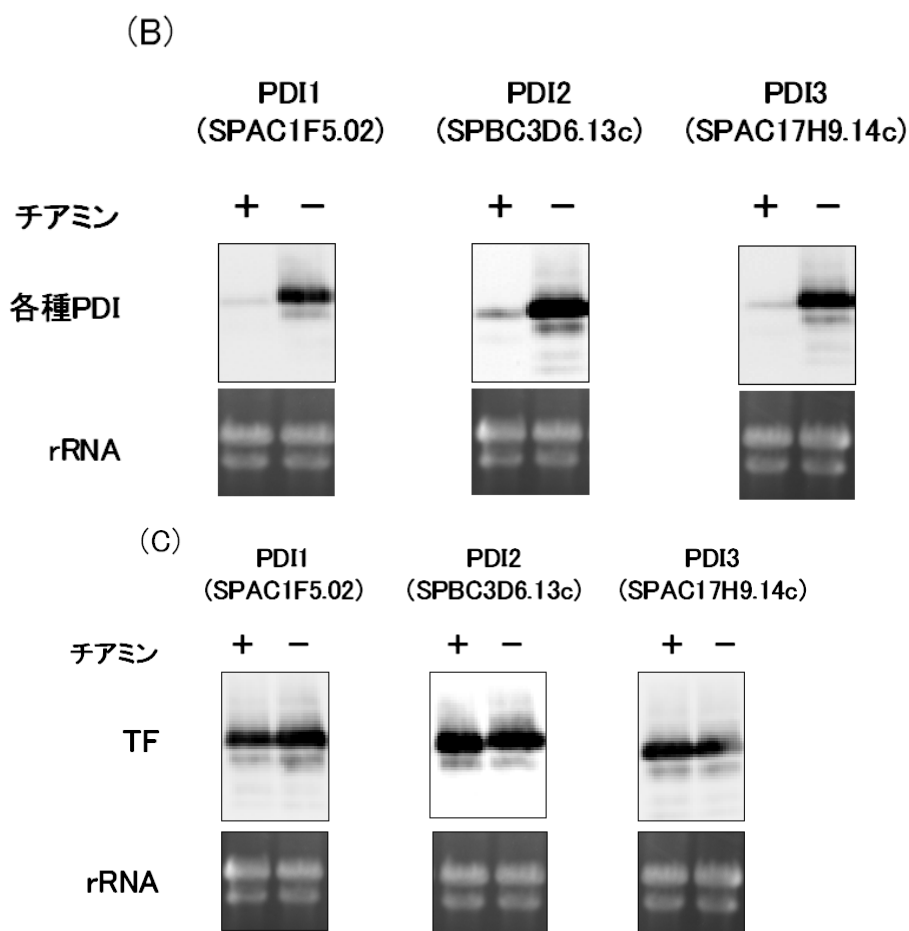


図 2.1.3.4-6 A8 株における hTF 遺伝子のノーザン解析

(A) A8 株における hTF 遺伝子の発現量比較。レーン 1; 添加なし、レーン 2; デキストラン硫酸ナトリウム (DX) 0.002%、レーン 3; カザミノ酸 2%、レーン 4; DX 0.002% + カザミノ酸 2%。A8 株に hTF 発現ベクター pTL20STFN-CF-4XL を導入し、培養 16 時間と 48 時間でそれぞれの添加培地における RNA 量を比較した。上は hTF の mRNA、下は rRNA を示す。培地成分、培養時間に関係なくほぼ一定量の hTF 遺伝子の発現が観察された。(B) 各 PDI 過剰発現株における PDI の転写量。各 PDI 遺伝子はチアミン飢餓誘導性プロモーター nmt1p 下で発現しており、チアミン添加により強く抑制され、チアミン飢餓で過剰発現する。(C) 各 PDI 過剰発現株における hTF の転写量。hTF は hCMV (ヒトサイトメガロウイルス) 由来プロモーター下で恒常的に発現している。hTF 発現量は PDI 遺伝子の発現量の違いにも影響されないことが明らかとなった。

次にデキストラン硫酸ナトリウム (DX) 添加もしくはカザミノ酸 (CAA) の添加物の有無による hTF の細胞内蓄積の変化を検討した。各培養液において hTF 発現株を培養し、培養上清及び細胞を回収し、それぞれに含まれる hTF の量をウエスタン解析により検討した。その結果、添加物を加えた場合に比べて無添加の培地では、有意に蓄積量が増えていることはなく、細胞内に蓄積する hTF の量は培地添加物に影響されないことが明らかとなった(図 2.1.3.4-7)。このことより、培地添

加物は細胞内の輸送を効率化している可能性は低いことが推測された。これらのことから、現在まで明らかとなった、hTF の分泌強化機構は、細胞内における輸送経路の効率化や、hTF 遺伝子の転写量増加によるものではないことが推察された。

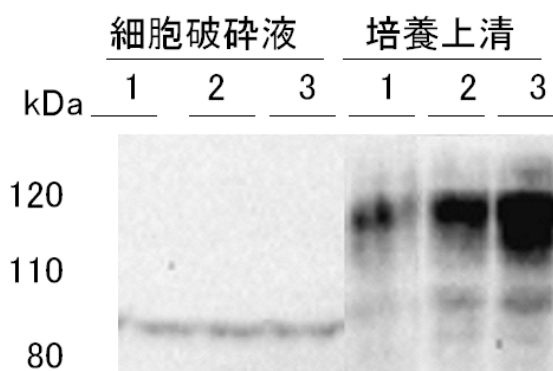


図 2.1.3.4-7 細胞内外での hTF の分布

レーン 1; 添加なし、レーン 2; デキストラン硫酸ナトリウム (DX) 0.002%、レーン 3; カザミノ酸 2%、レーン 4; DX 0.002% + カザミノ酸 2%。hTF 発現株を各培地において 60 時間培養後、細胞はビーズ法により破碎し、培養上清はアセトン沈殿により濃縮しウエスタン解析に供した。細胞内には糖鎖なしの hTF (約 85 kDa) のみが観察され、蓄積は ER 内腔と見られその量は添加物に影響を受けない。

次に現在まで hTF の分泌強化を示した培養方法それぞれにおける hTF の分泌量の定量化を行った。Bethyl 社の Human Transferrin ELISA Quantitation Kit による ELISA による定量化を行った。その結果デキストラン硫酸塩、カザミノ酸を加えた場合、無添加とは有意に hTF の分泌が向上し、デキストラン硫酸塩 (DX) 添加もしくはカザミノ酸添加により約 6 倍、両方加えることにより約 15 倍分泌が強化されたことが明になった (図 2.1.3.4-8)。

さらに、分裂酵母の PDI ホモログである、SPAC17H9.14c もしくは SPBC3D6.13c を hTF と共発現による分泌強化を検討した。無添加培地で且つ PDI 共発現なしにおける hTF の分泌と比較して、共発現株は DX 添加により約 10 倍、カザミノ酸添加により約 13 倍、さらに DX 添加とカザミノ酸両方加えることにより約 40 倍も分泌が強化されることが明になった (図 2.1.3.4-8)。またここで、DX に対して透析を行い、低分子挟雑物の影響を排除しても、その活性に変化はなかったことから、DX の hTF 分泌強化能は、DX 分子自体にあると考えられる。この効果は現在まで報告はなく、まったく新規な現象である。DX は弱い界面活性剤様の作用を持ち、カルシウムイオン等のカチオン存在下で脂質二重膜の疎水領域と相互作用することが報告されている。この作用によりタンパク質分泌の最大の障壁となる、細胞膜に何らかの作用を及ぼし、結果 hTF の細胞膜・細胞壁の透過性が増加し、分泌量が増加することが推察される。今後はその作用機序についてさらに検討を加えていく必要があると考えている。

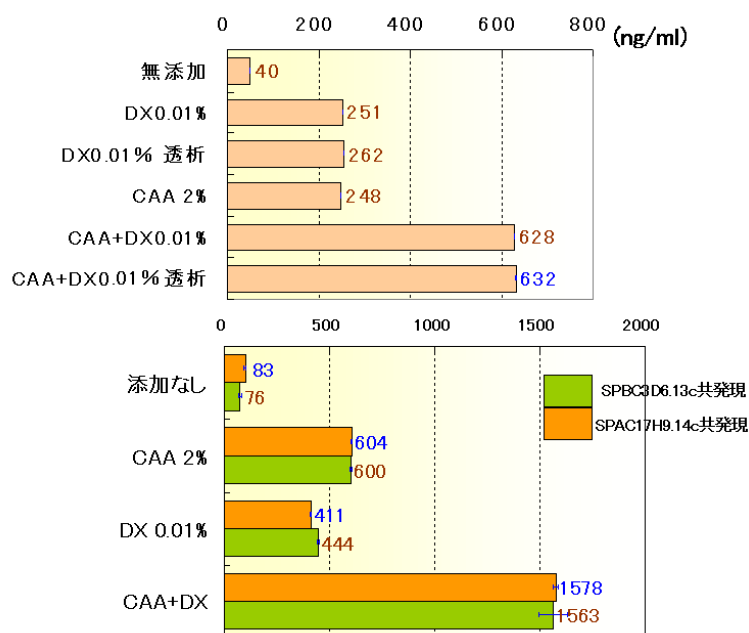


図 2.1.3.4-8 ELISAによるhTFの定量

われわれは hTF の分泌強化に PDI が強く関与することを明らかとしたが、PDI は小胞体(ER)において分泌系タンパク質等の立体構造安定化を担う分子シャペロンとして機能していることが出芽酵母等の研究から明らかとなっている。つまり ER における品質管理機構が hTF の分泌強化に大きな影響を与えている可能性を示唆していると考えられた。そこで ER の品質管理機構のひとつである、ERAD (ER-Associated Degradation) に注目した。タンパク質は ER において PDI や Bip といった分子シャペロンにより安定化させられ、正しい立体構造をとることが促進されるが、一定量の異常なタンパク質の発生は常に起こる。ER で生じた異常・変性タンパク質に対する分解機構である。その機構については、動物細胞や出芽酵母で多くの報告がなされ、ERAD 関連タンパク質がさまざまな変性タンパク質や過剰に発現したタンパク質が引き起こすストレスに ire1p などが応答し、それら変性タンパク質の ER 外への排出とプロテアソーム分解に関与することが示されている(図 2.1.3.4-9)。

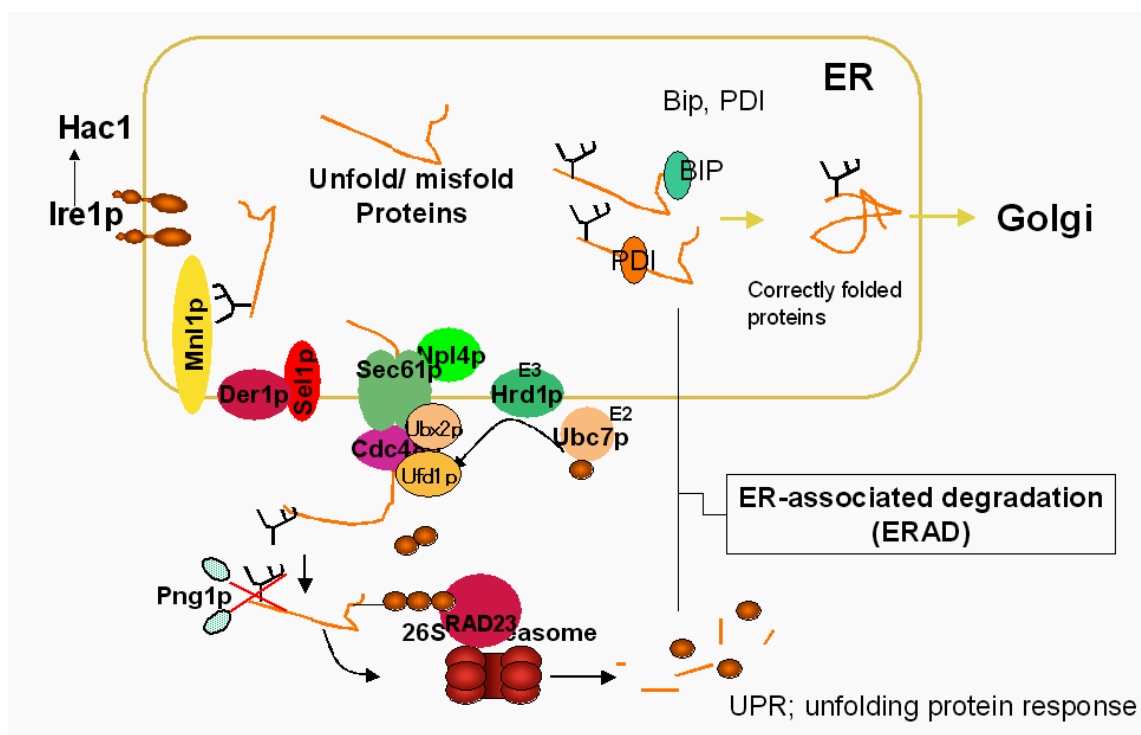


図 2.1.3.4-9 ER におけるタンパク質の品質管理機構 (出芽酵母)

出芽酵母では ER ストレスは Ire1p などにより感知され、転写因子である HAC1 遺伝子を活性化することで PDI などの分子シャペロンの発現増加、もしくは ERAD の活性化を誘導する。

しかしながら、分裂酵母における ERAD の機構についてはほとんど報告がない。そこでわれわれは、分裂酵母における ERAD 関連遺伝子のゲノムデータベースからの抽出を行ったところ、数多くの ERAD 関連遺伝子群のホモログが見出された(表 1)。

表1 ERAD に関わる分裂酵母
ホモログ遺伝子の一覧

<i>S.cerevisiae</i>	<i>S.pombe</i>	相同性
<i>IRE1</i> (YHR079C)	<i>ire1</i> ⁺ SPAC167.01	60%
<i>PNG1</i> (YPL096W)	<i>png1</i> ⁺ SPBC1709.14	57%
<i>UBC7</i> (YMR022W)	<i>ubc3</i> ⁺ SPBP16F5.04	76%
<i>SEL1</i> (YML013W)	<i>sel1</i> ⁺ SPCC285.11	50%
<i>HRD1</i> (YOL013C)	<i>hrd1</i> ⁺ SPBC17D11.02c	45%
<i>DER1</i> (YBR210W)	<i>der1</i> ⁺ SPBC365.08c	52%
<i>NPL4</i> (YBR170C)	<i>npl4</i> ⁺ SPBC1711.10c	61%
<i>UBC6</i> (YMR100W)	<i>ubc6</i> ⁺ SPAC10F6.05c	77%
<i>DOA10</i> (YIL030C)	<i>doa10</i> ⁺ SPBC14F5.07	51%
<i>MDM39</i> (YGL020c)	<i>mdm39</i> ⁺ SPBC543.10	47%

ここで hTF のような外来遺伝子の過剰発現はそれ自体が細胞に対するストレスとなりうることから、ERAD の対象になりうる可能性もあり、ERAD はタンパク質の生産にという観点では、負の影響を与えている可能性がある。そこで野生株 ARC039 において ERAD 関連各遺伝子の破壊株を作製し、各破壊株において hTF の導入と生産能の検討をおこなった。表中に示された 10 種の遺伝子破壊株において hTF の分泌量をウェスタン解析により検討した結果、いくつかの破壊株において hTF の分泌を強化したものが見られた。特に *mdm39*、*npl4* 破壊株においては顕著な hTF 発現強化が見られた。(図 2.1.3.4-10)

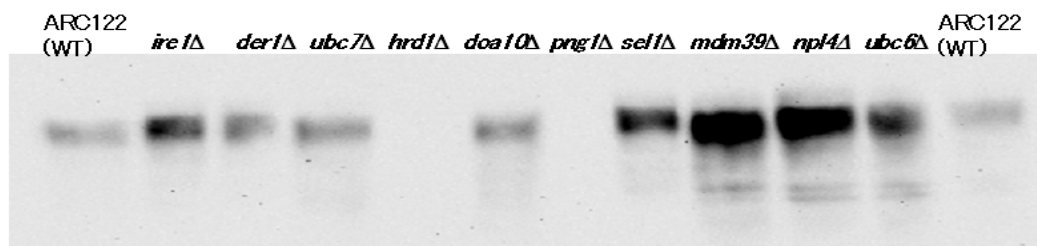


図 2. 1. 3. 4-10 分裂酵母における ERAD 関連遺伝子ホモログ破壊株での hTF の分泌量比較

それぞれの破壊株に染色体組み込み型 hTF 恒常分泌発現ベクター-pTL20STFN-CF-4XL を導入し、それぞれ破壊株を 60 時間培養後、培養上清を回収しアセトン沈殿により濃縮しウエスタン解析に供した。ARC122 株は ARC039 株に pTL20STFN-CF-4XL を組みこんだものである。

今回われわれは ERAD 関連タンパク質が異種タンパク質発現分泌向上に影響を与えるという結果を得たが、このような報告はいまだかつてなく、その作用機序については非常に興味もたれる。出芽酵母では Mdm39p は膜タンパク質として ER 内腔へのタンパク質輸送、ER 滞留シグナルを持つタンパク質のゴルジから ER への逆輸送に関与している。また Npl4p は ERAD 関連タンパク質のひとつ Cdc48p(破壊は致死)と相互作用し、ユビキチン化されたタンパク質を ER から排出する機構に関与している。これら 2 つが過剰生産タンパク質に対しどのような作用し影響を及ぼすかを明らかとすることで ER を効率のよいタンパク質生産の場となるよう改良することが可能と考えられ、現在検討を行っている。また現在この 2 つの破壊株を 8 種のプロテアーゼ破壊株で作成し TF の更なる分泌強化を目指し、さらに我々が前回報告した、添加物による分泌向上や PDI 共発現による分泌向上などの結果との組み合わせによる相乗効果により前回報告よりも更なる TF 分泌強化株の創製を試みている。

結語

われわれはこれまでの研究で分裂酵母と出芽酵母の細胞内タンパク質小胞輸送機構や ABC トランスポーター、さらに糖鎖付加機構などの基本的なメカニズムをゲノム塩基配列から比較し、両酵母には様々な相違点があることが明らかになった。そして研究の過程で異種タンパク質生産を効率良く行う株を作るにあたり、いくつかの問題点もわかってきた。異種タンパク質を過剰に生産した場合には、宿主である分裂酵母本来の細胞内代謝経路や輸送経路に障害を伴うことが考えられる。とりわけ過剰な異種タンパク質生産は粗面小胞体にストレスを与え、分子シャペロンなどの過剰発現を引き起こす。また ER 内で正しくフォールディング出来ない異種タンパク質は ER 内に留まり、最終的にはユビキチン-プロテアソーム系により分解される。ではこのようなタンパク質品質管理機構は分裂酵母の異種タンパク質生産にとって有利に働くのであろうか？ われわれのこれまでの解析結果から、分裂酵母の ER 内で新生タンパク質のフォールディングに関与する Bip タンパク質が過剰生産しており、各種ストレスを与えてもその発現量が変化しないことを見い

だしている。そこで同じくタンパク質のフォールディングに関与する PDI の過剰発現について検討を行ったところ、良好な結果を得ることができた。今後は分裂酵母の品質管理機構を含め、ER からゴルジ-細胞表層への小胞輸送機構についてさらに解析を行いたい。

一言で異種タンパク質生産と言っても、糖タンパク質や膜タンパク質などその種類は多様である。そこで生産させたいタンパク質の種類によって宿主・ベクター系や培養条件などを選択可能な汎用性の高いシステムの構築を目指していきたい。我々のこれまでの研究の過程で異種タンパク質生産を効率良く行う株を作るにあたり、異種タンパク質生産にはいくつかの重要な「関所」が存在することがわかってきた。最も大きな関所は粗面小胞体において立体構造の異常なタンパク質の蓄積を排除する機構である品質管理機構をどのように利用すれば生産効率の向上につながるのかという問題である。これまでの研究成果を生かして、今後はヒト適応型糖鎖を生産する新たな分裂酵母宿主を創製することで、さらに本格的な産業応用に利用可能な分裂酵母宿主を作りだせればと考えている。

最近になって、我々は分裂酵母の品質管理機構を解析するための、マーカータンパク質を同定することができた。そこで今後は分裂酵母の ERAD 関連遺伝子の破壊、およびその機能を明らかにするとともに、異種タンパク質生産への ERAD の機能についても詳細に解析を行う予定である。生産された異種タンパク質が本当に酵素活性などの生物活性を維持しているかについては、まだ明らかにしていない。せつかく菌体外に分泌した異種タンパク質のコンフォーメーションが異常になっている可能性もある。今後は実際にこの系で生産された異種タンパク質が天然型と同等の生物活性を有しているのかさらに明らかにすることが急務である。

本成果は特願 2009-287873 として特許出願し、また Appl Microbiol Biotechnol 誌の 85 巻 (2009 年)ならびに 86 巻 (2010 年)に掲載され、広く成果の公表ならびに普及に努めた。

2. 1. 3. 5 ゴルジ装置における翻訳後修飾系の制御

外来遺伝子発現のための宿主という観点から、分裂酵母は出芽酵母と比較して優れた特性を持っている。例えばタンパク質の翻訳後修飾においても分裂酵母は真核微生物であるために大腸菌や枯草菌とは異なり、糖タンパク質糖鎖を合成する能力がある。そこで真核細胞宿主の利点を活かすためには高等生物由来の糖タンパク質を分裂酵母では生産することが期待されている。しかしながらその糖鎖構造は高等動物由来のものと分裂酵母由来のものでは大きく異なっている。分裂酵母はその糖鎖構成成分にガラクトースを含み、高等動物に近い糖鎖構造を有しているものの、そのまま高等動物の発現用宿主として用いるには問題があり、分裂酵母の糖鎖生合成系を改変することが必要である。そこで本研究では

分裂酵母糖鎖合成欠損変異株の糖鎖構造を詳細に解析を行った結果について報告する。

(1) 分裂酵母の N-結合型糖鎖の改変(*och1* 破壊株の糖鎖構造解析)

分裂酵母を宿主として異種糖タンパク質を発現させる際の問題点として、分裂酵母特有のガラクトマンナンが糖鎖としてタンパク質に付加することが挙げられる。このガラクトマンナンの生合成は α 1,6-マンノース転移酵素である Och1p の作用により Man₉GlcNAc₂ にマンノースを転移すること

により開始される。*och1* 破壊株では糖タンパク質であるアルカリホスファターゼの分子量が大きく減少し、ガラクトマンナンが付加していないと考えられる。分裂酵母の糖鎖をヒト型に改変するためには、ガラクトマンナンが付加しなくなった *och1* 破壊株の糖鎖構造の情報が必要であるが、*och1* 破壊株の詳細な糖鎖構造は未解明である。そこで、糖鎖構造解析で良く用いられるヒドラジン分解・ピリジルアミノ化法により、*och1* 破壊株の糖鎖構造解析を行った。

och1 破壊株の糖鎖構造解析

まずは、*och1* 破壊株より糖タンパク質を熱水-クエン酸緩衝液を用いて抽出した。得られた糖タンパク質よりヒドラジン分解法により、糖鎖を遊離し、還元末端をピリジルアミノ(PA)化法により蛍光標識した。PA糖鎖のサイズ分画 HPLC 分析と HPLC 上の各ピークの質量分析により、*och1* 破壊株の主要な糖鎖は Hex₁₁GlcNAc₂-Hex₁₅GlcNAc₂ であることが明らかとなった。

さらに詳細な構造決定をおこなうために、PA 化糖鎖を HPLC により、単一標品まで精製し、¹H NMR 分析を行った。まずは *och1* 破壊株より糖タンパク質を熱水-クエン酸緩衝液を用いて抽出した。得られた糖タンパク質よりヒドラジン分解法により、糖鎖を遊離し、還元末端を PA 化法により蛍光標識した。PA 化糖鎖をサイズ分画(順相)HPLC と逆相 HPLC を用いて、単一ピークまで精製し、2-10 nmol の PA 化糖鎖を得た。得られた PA 化糖鎖を 600 MHz ¹H MNR により分析を行い、構造を決定した。以下に *och1* 破壊株の主要 N-結合型糖鎖の構造を示す(表 2.1.3.5-1)。

表 2.1.3.5-1 分裂酵母 *och1* 破壊株の糖鎖構造

Structure	Composition
	Gal ₂ Man ₉ GlcNAc ₂ -PA
	Gal ₃ Man ₉ GlcNAc ₂ -PA
	Gal ₄ Man ₉ GlcNAc ₂ -PA
or	Gal ₃ Man ₁₀ GlcNAc ₂ -PA
	Gal ₅ Man ₉ GlcNAc ₂ -PA
	Gal ₆ Man ₉ GlcNAc ₂ -PA

本成果は Biosci. Biotechnol. Biochem. 誌の 73 巻 (2009 年) に掲載され、広く成果の公表ならびに普及に努めた。

gms1och1 二重破壊株の糖鎖構造解析

och1 破壊株の糖鎖構造解析の結果、*och1* 破壊株の糖鎖の非還元末端には α -ガラクトースが多数結合していることが明らかとなった。*och1* 破壊株の糖鎖からヒト型のハイマンノース型糖鎖に改変するには、この α -ガラクトースを除去する必要がある。以前、我々は糖鎖に α -ガラクトースが結合しない *gms1* 破壊株を単離した。分裂酵母 *gms1* はゴルジ局在の UDP-ガラクトース輸送体をコードしており、その破壊株では糖転移酵素の基質である UDP-ガラクトースがゴルジ内腔に取り込まれず、糖鎖にガラクトースが付加しなくなる。そこで *gms1och1* 二重破壊株を作製し、その糖鎖構造解析を行った。

gms1och1 二重破壊株より PA 化糖鎖を調製し、サイズ分画 HPLC 分析を行ったところ、主要な糖鎖として Hex₈GlcNAc₂ - Hex₁₂GlcNAc₂ のピークが検出された。*gms1och1* 二重破壊株の糖鎖は *och1* 単独破壊株と比較して、糖鎖サイズの減少が見られた。これは α -ガラクトースが結合しなくなったためであると考えられる。次に α 1,2-マンノシダーゼ消化を行い、消化前後のクロマトグラムを比較することにより、構造解析を進めた。*gms1och1* 二重破壊株の糖鎖に *in vitro* で α 1,2-マンノシダーゼを作用させたところ、Hex₈₋₁₂GlcNAc₂-PA の糖鎖は、全て M5 の糖鎖へと加水分解された。この結果より、*gms1och1* 二重破壊株の糖鎖は M5 の糖鎖の非還元末端に α 1,2-マンノースが 3 から 7 個結合した構造を持つことが明らかとなった。

さらに α 1,2-マンノースの詳細な分岐構造を調べるために、*gms1och1* 二重破壊株のサイズの異なるピークをそれぞれ分取し、逆相 HPLC でさらに精製を行い、単一標品を調製した後、部分アセトリシス分析を行った。部分アセトリシス分析では α 1,6 マンノース結合を特異的に加水分解することにより、ハイマンノース型糖鎖の分岐構造を調べることができる。部分アセトリシス解析の結果、この α 1,2-マンノースの分岐構造を含めた詳細な *gms1och1* 二重破壊株の糖鎖構造を決定した。糖鎖構造を表 2.1.3.5-2 に示す。*gms1och1* 二重破壊株ではヒト体内で抗原になり得る α -ガラクトースが全く付加しておらず、本株は異種糖タンパク質生産株として有用であると考えられる。

表 2.1.3.5-2 *gms1och1* 二重破壊株の糖鎖構造

ピーク	構造	相対含量 ^a
a		9
b-1		35
b-2		17
c		100
d	<p style="text-align: center;">or</p>	47
e	<p style="text-align: center;">or</p>	20

^a 相対含量は c-1 のピーク面積を 100 とした相対値で示した。

本成果は Appl. Microbiol. Biotechnol. 誌の 86 巻 (2010 年) に掲載され、広く成果の公表ならびに普及に努めた。

また上述のように、*gms1Δoch1Δ* 二重破壊株は α -ガラクトースが完全に欠損した $\text{Man}_{10-12}\text{GlcNAc}_2$ 型糖鎖を生産することが明らかとなった。ヒト型糖鎖生産のためにはさらに α 1,2-マンノースを刈り込む必要があるため、*gms1Δoch1Δ* 二重破壊株に α 1,2-マンノシダーゼ遺伝子を導入し、その糖鎖構造変化の解析を行った。

まずは導入した α 1,2-マンノシダーゼ遺伝子が分裂酵母細胞内で酵素活性を有する酵素として発現しているかを調べるために、 α 1,2-マンノシダーゼ遺伝子導入株から粗細胞抽出液を調製し、酵素活性測定を行った。酵素活性産物はサイズ分画 HPLC を用いて解析を行った(図 2.1.3.5-1)。 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 糖鎖を基質として活性測定を行った場合、酵素産物である $\text{Man}_{5-7}\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 糖鎖が検出され、導入した α 1,2-マンノシダーゼ遺伝子は酵母細胞内で活性を有するタンパクとして発現していることが確認された。

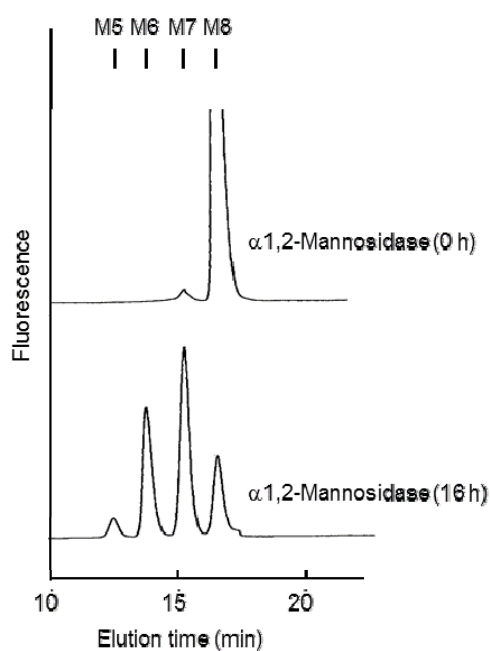


図 2.1.3.5-1 α 1,2-マンノシダーゼの活性測定

α 1,2-マンノシダーゼ遺伝子導入株から粗細胞抽出液を調製し、 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 糖鎖を基質として 37°C 、16 時間で酵素反応を行った。酵素反応産物はサイズ分画 HPLC で解析を行った。図上の黒線はそれぞれ標準糖鎖 $\text{Man}_{5-8}\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ (M5 - M9) の溶出位置を示す。

次に、 α 1,2-マンノシダーゼ遺伝子導入した *gms1Δoch1Δ* 二重破壊株から *N*-結合型 PA 化糖鎖を調製し、サイズ分画 HPLC で分析を行った(図 2.1.3.5-2)。低発現用ベクターを用いて α 1,2-マンノシダーゼ遺伝子を発現させた場合、目的の M5-PA 糖鎖は生産されたものの、M6-PA 以上の大きさの糖鎖も検出された。一方、高発現用ベクターを用いて発現させた場合、ほぼ単一の M5-PA 糖鎖に相当するピークのみが検出された。この M5-PA 糖鎖相当のピークを分取し、逆相 HPLC 分析を行ったところ、図中に構造を示すような M5A-PA の標準標品と溶出位置が一致し、異性体構造が明らかとなった。本株は単一のヒトハイマンノース型糖鎖生産株であり、糖タンパク

質生産宿主として非常に有用な株であると言える。

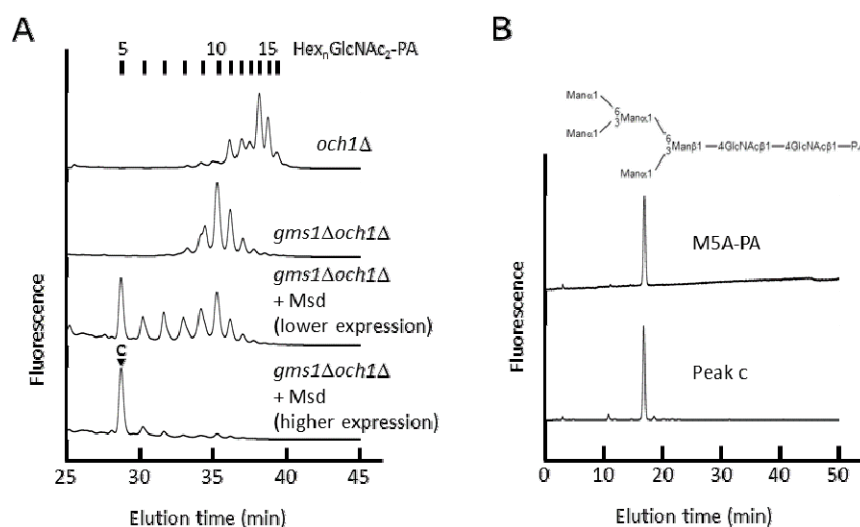


図 2.1.3.5-2 α1,2-マンノシダーゼ遺伝子導入 *gms1Δoch1Δ* 二重破壊株の糖鎖構造解析。

A、*och1Δ*株、*gms1Δoch1Δ*二重破壊株およびα1,2-マンノシダーゼ遺伝子導入（低発現または高発現ベクター）*gms1Δoch1Δ*二重破壊株より *N*-結合型 PA 化糖鎖を調製し、サイズ分画 HPLC 分析を行った。図上の黒線はそれぞれ標準糖鎖 Man₅₋₉GlcNAc₂-PA (M5 - M9) および *och1* 破壊株で同定されたサイズ既知の糖鎖の溶出位置を示す。B、ピーク c の逆相 HPLC を行った。上図は M5A-PA 標準糖鎖、下図はピーク c のクロマトグラムを示す。頭上の模式図は M5A-PA の構造を示す。

alg3och1 二重破壊株の糖鎖構造解析

出芽酵母の *ALG3* (*ScALG3*) は ER 内腔においてドリコールリン酸オリゴ糖の生合成に関与する α1,3-マンノース転移酵素である。出芽酵母における *ALG3* 破壊株における ER 型インベルターゼの糖鎖構造が報告され、主要な糖鎖は以下のような構造であることが報告されていた (図 2.1.3.5-3)。

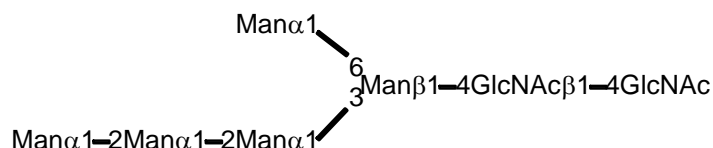


図 2.1.3.5-3 出芽酵母 *ALG3* 破壊株の糖鎖構造

この構造は α1,6-マンノースに α-マンノースが結合しておらず、野生型出芽酵母のコア糖鎖である M9 よりもマンノースの数が少ない構造であった。一方、分裂酵母のホモログである *alg3* に関する報告はない。そこで、出芽酵母と同様に分裂酵母 *alg3* 破壊株においてもコア糖鎖サイズの減少を期待して、*alg3och1* 二重破壊株を作製し、その糖鎖構造解析を行った。

alg3och1 二重破壊株から PA 化糖鎖を調製し、サイズ分画 HPLC 分析を行ったところ、主な *N*-結合型糖鎖としては2つのピークが検出された。これらの糖鎖は標準糖鎖との溶出位置との比較から Hex₇₋₈GlcNAc₂-PA であると予測された。これらのピークを分取し、 α -1,2 マンノシダーゼおよび α -ガラクトシダーゼを作用させたところ、 α -ガラクトシダーゼを作用させたときのみ、サイズ分画 HPLC 上でピークの移動が観察され、M5 のピークが生成した。生成した M5 のピークを分取し、 α 1,2-マンノシダーゼを作用させたところ、M3 のピークが生成した。以上の結果より、*alg3och1* 二重破壊株の糖鎖構造は表 2.1.3.5-3 のように決定された。

表 2.1.3.5-3 *alg3och1* 二重破壊株の糖鎖構造

ピーク	構造	組成	相対含量 a
a		Gal ₂ Man ₅ GlcNAc ₂ -PA	100
b		Gal ₃ Man ₅ GlcNAc ₂ -PA	47

^a 相対含量は a のピーク面積を 100 とした相対値で示した。

分裂酵母の糖鎖構造の改変と異種糖タンパク質の生産

次に、*alg3och1* 二重破壊株を異種糖タンパク質生産宿主として用いた場合においても、異種糖タンパク質にサイズが減少した糖鎖が付加するかどうかを調べた。*alg3och1* 二重破壊株にヒトランスフェリン (hTF) をモデル糖タンパク質として異種発現させ、ウェスタン解析によりその分子量を解析した。野生株および *alg3* 破壊株では 100 - 120 k の分子量を有するスミアなバンドが検出された。一方、*och1* 破壊株および *alg3och1* 二重破壊株では 80 k 付近の分子量を有するシャープなバンドが検出され、*alg3och1* 二重破壊株の方がより小さな分子量を有していた。PNGase を作用させたところ、全ての株でバンドが低分子量化し、同じ位置へ移動した。この結果よりバンド分子量の違いは付加した糖鎖サイズの違いに由来することが考えられた。一方、Endo H を作用させたところ、野生株および *och1* 破壊株では PNGase 消化後と同じ位置にバンド移動が観察されたが、*alg3* 破壊株および *alg3och1* 二重破壊株ではバンド移動が観察されなかった。Endo H は出芽酵母 *alg3* 破壊株が生産する糖鎖には作用しない基質特異性を有することが報告されていることから、異種発現させた hTF にも図 2.1.3.5-4 のような糖鎖が付加していることが示唆された。

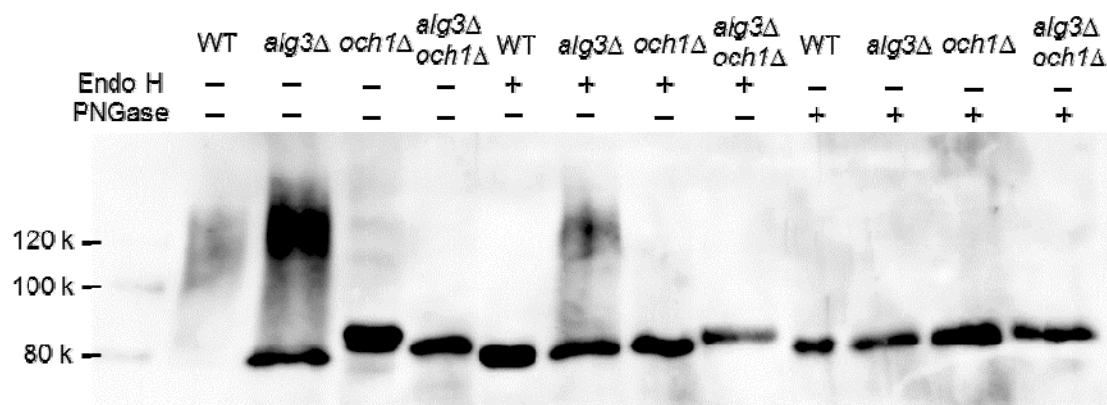


図 2. 1. 3. 5-4 各糖鎖合成欠損株で異種発現させた hTF のウエスタン解析。

野生株、*alg3*破壊株、*och1*破壊株および *alg3och1* 二重破壊株に hTF-FLAG 発現ベクターを導入し、形質転換体を得た。形質転換体を MM 培地にて 60 時間培養し、上清を回収、濃縮後、SDS-PAGE サンプルバッファーに溶解させた。溶解後、Endo H および PNGase 消化を行い、抗 FLAG 抗体によるウエスタン解析により分子量を解析した。

本成果は J. Biotechnol. 誌の 150 巻 (2010 年) に掲載され、広く成果の公表ならびに普及に努めた。

(2) 分裂酵母の O-結合型糖鎖の改変(均一な O-結合型糖鎖を有する *omh1* 変異株の取得)

出芽酵母 *KTR* ファミリーに属する α 1,2-マンノース転移酵素は N-結合型糖鎖だけでなく O-結合型糖鎖の生合成にも関与することが知られている。分裂酵母ゲノムデータベースには 6 個のホモログの存在が示唆されているが、その詳細な解析はなされていない。そのため、分裂酵母 O-結合型糖鎖の生合成メカニズムは未解明である。分裂酵母で異種タンパク質を発現させる際には、Ser/Thr リッチなアミノ酸領域に分裂酵母型である O-マンノース型糖鎖が様々な長さで付加し、問題となっている。そこで、出芽酵母 *KTR* ファミリーの分裂酵母ホモログを *omh1* - θ と命名し、糖鎖生合成への影響を調べた。

まずは、各遺伝子破壊株を作製し、N-結合型糖鎖への影響を酸性ホスファターゼの活性染色により解析した。分裂酵母酸性ホスファターゼは複数の糖付加モチーフを有しており、糖鎖生合成欠損株の解析に良く用いられている。野生株と各破壊株を低リン酸培地で培養することにより酸性ホスファターゼを誘導し、ネイティブゲル電気泳動を行った。泳動後活性染色により、酸性ホスファターゼを可視化し、移動度を比較したところ、野生株と各破壊株で顕著な差は見られなかった。以上の結果より、*omh* 各破壊株は N-結合型糖鎖の生合成には関与しないことが示唆された。次に O-結合型糖鎖の影響を O-結合型糖鎖のみが付加している出芽酵母キチナーゼの分子量を比較することにより解析した。グルコース抑制分泌型プラスミドである pFM1-1 にクローニングされた出芽酵母キチナーゼを野生株および *omh1* 破壊株に形質転換した。両株をグルコース抑制条件下で、定常期まで培養し、低グルコース濃度培地に移し、キチナーゼの発現を誘導した。菌

体を回収後、ガラスビーズを用いて破碎し、粗タンパク質抽出液を得た。得られた粗タンパク質抽出液にキチンを加えて、キチナーゼを吸着させ、緩衝液で洗浄後、野生株と各破壊株で出芽酵母キチナーゼを発現させ、キチンビーズを用いて精製した。精製キチナーゼを SDS-PAGE で分析したところ、*omh1* 破壊株のみ分子量の減少が見られた。以上の結果より、*omh1* は O-結合型糖鎖の生合成に関与することが示唆された。

次に、より詳細な糖鎖構造情報を得るために、野生株および各 *omh* 破壊株より O-結合型 PA 化糖鎖を調製し、サイズ分画 HPLC 分析を行った。野生株では主に5個の糖鎖のピークが検出された。*omh1* 破壊株以外の *omh* 破壊株では野生株と同じピークが検出された。*omh1* 破壊株では単一のピークのみが検出され、その構造はガラクトシルマンノースの 2 糖であった。以上の結果より、Omh1p はセリン/スレオニンに付加されたマンノースへ α 1,2-マンノースを付加している α 1,2-マンノース転移酵素であることが強く示唆された。

分裂酵母 *omh1* の破壊株の O-結合型糖鎖はガラクトシルマンノースからなる2糖のみからなることが明らかとなったが、本破壊株を用いて、O-結合型糖鎖を有する異種糖タンパク質を発現させた場合にも、ガラクトシルマンノースからなる 2 糖のみを有するかどうかに興味を持たれる。そこで、本破壊株に出芽酵母キチナーゼを発現させて、その O-結合型糖鎖の糖鎖構造解析を行った。

まずグルコース抑制分泌型プラスミドである pFM1-1 にクローニングされた出芽酵母キチナーゼを野生株および *omh1* 破壊株に形質転換した。両株をグルコース抑制条件下で、定常期まで培養し、低グルコース濃度培地に移し、キチナーゼの発現を誘導した。菌体を回収後、ガラスビーズを用いて破碎し、粗タンパク質抽出液を得た。得られた粗タンパク質抽出液にキチンを加えて、キチナーゼを吸着させ、緩衝液で洗浄後、SDS を含む緩衝液で溶出させ精製を行った。精製キチナーゼの純度を SDS-PAGE で確認後、透析を行い、ヒドラジン分解-PA 化法を用いて PA 化糖鎖を調製した。次に、得られた PA 化糖鎖のサイズ分画 HPLC 分析を行った。野生株とは異なり *omh1* 破壊株では主要なピークとして 2 糖のみが検出された。この 2 糖画分を分取し、 α -ガラクトシダーゼおよび α -マンノシダーゼを作用させ、逆相 HPLC 分析を行ったところ、 α -ガラクトシダーゼでのみ消化され、マンノース単糖が検出された。以上の結果より、分裂酵母 *omh1* 破壊株で発現させた出芽酵母キチナーゼの O-結合型糖鎖は、細胞全体の糖鎖構造解析の結果と同様に、ガラクトシルマンノースの 2 糖からのみなることが分かった(図 2.1.3.5-5)。

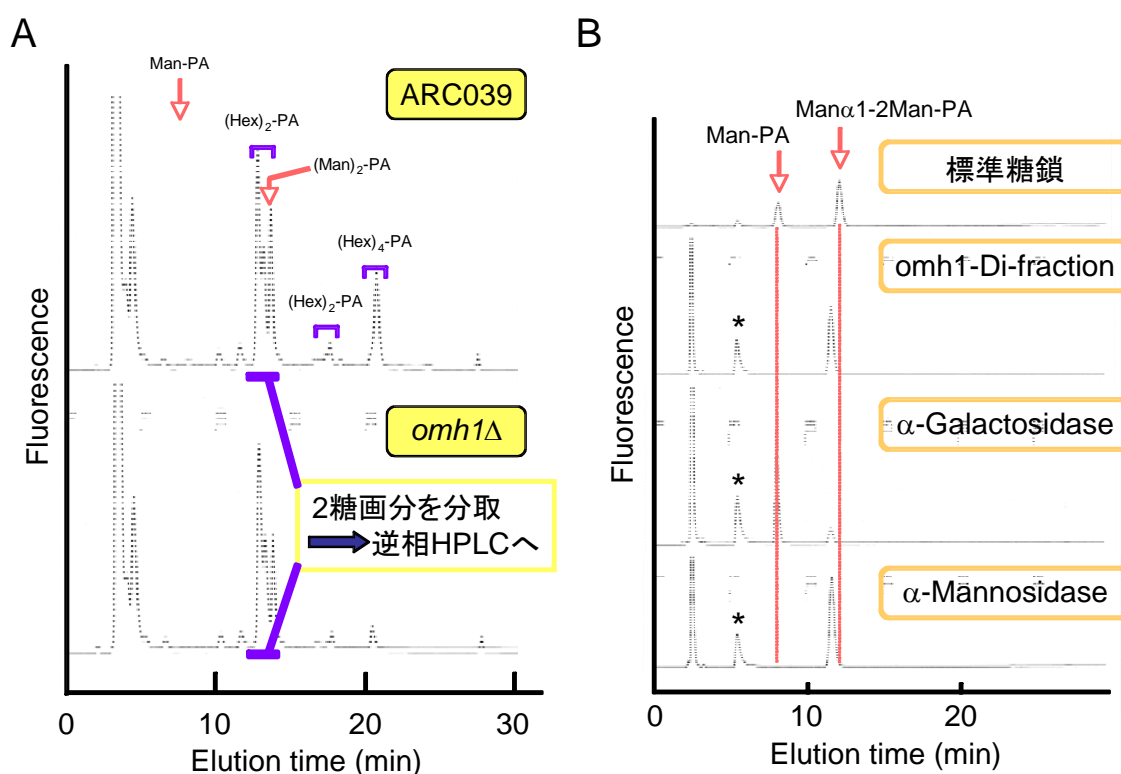


図 2.1.3.5-5 *omh1* 破壊株で発現させた出芽酵母キチナーゼの *O*-結合型糖鎖の解析

A. 野生株および *omh1* 破壊株で発現・精製した出芽酵母キチナーゼより PA 化糖鎖を調製し、サイズ分画 HPLC 分析を行った。B. サイズ分画 HPLC で分取した 2 糖画分の α -ガラクトシダーゼおよび α -マンノシダーゼ消化物の逆相 HPLC 分析を行った。図中の矢印は標準糖鎖 Man-PA および Man α 1,2-Man-PA の溶出位置を、星印は夾雑物のピークを示す。

(3) 分裂酵母 α -ガラクトース転移酵素完全欠損株の作製

分裂酵母ガラクトース転移酵素の機能解析と 7 重破壊株の作製

ヒト型複合型糖鎖 (Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂) を分裂酵母で生産させる場合、ガラクトマンナンを欠損させた *och1* 破壊株から α -マンノースおよび α -ガラクトースの刈り込みによる M3 糖鎖 (Man₃GlcNAc₂) の生産、 β -GlcNAc 付加、 β -ガラクトースの付加のステップが必要である。前項で述べたように α -ガラクトースの刈り込みはゴルジ局在 UDP-ガラクトース輸送体をコードしている *gmsI* 遺伝子を破壊することにより、達成できた。しかし、UDP-ガラクトースは酵母内在性 α -ガラクトース転移酵素だけでなく、 β -ガラクトース付加に必要な β -ガラクトース転移酵素の基質でもあり、 β -ガラクトース付加には *gmsI* 遺伝子を分裂酵母内に残す必要がある。そこで、分裂酵母に存在する全ての α -ガラクトース転移酵素の探索とその多重破壊を試みた。本研究開発開始前までに分裂酵母には 4 つの α -ガラクトース転移酵素 (*gma12*、*gmh1-3*) の存在が報告されている。分裂酵母のゲノムデータベースを検索したところ、さらに 3 つの推定 α -ガラクトース転移酵素が見出さ

れ、*gmh4-6⁺*と名付けた。分裂酵母 α -ガラクトース転移酵素の各単独破壊株を作製し、その機能解析を試みた。

各単独破壊株の生育および細胞形態は野生株との変化は見出されなかった。分裂酵母の代表的な糖タンパク質である酸性ホスファターゼを *N*-結合型糖鎖付加のレポータータンパク質として、ネイティブ PAGE を行い、活性染色を行ったところ、*gma12 Δ* 、*gmh2 Δ* 、*gmh3 Δ* および *gmh6 Δ* において α -ガラクトース付加欠損に由来すると考えられる分子量低下が観察された(図 2.1.3.5-6A)。より定量的に α -ガラクトース付加欠損の程度を観察するために、各単独破壊株より細胞表面糖タンパク質を調製し、 ^1H NMR 解析を行った。各アノマープロトン ($^6\text{-Man}^{-6}$ 、 $^{2,6}\text{-Man}^{-6}$ および Gal^{-2}) の比ピーク面積を $^6\text{-Man}^{-6}$ のピーク面積を 1 とした相対値で示したところ、 Gal^{-2} の量は *gma12 Δ* 、*gmh2 Δ* 、*gmh3 Δ* および *gmh6 Δ* において野生株と比べて 60、59、79 および 75% 減少していることが明らかとなった(図 2.1.3.5-6B)。

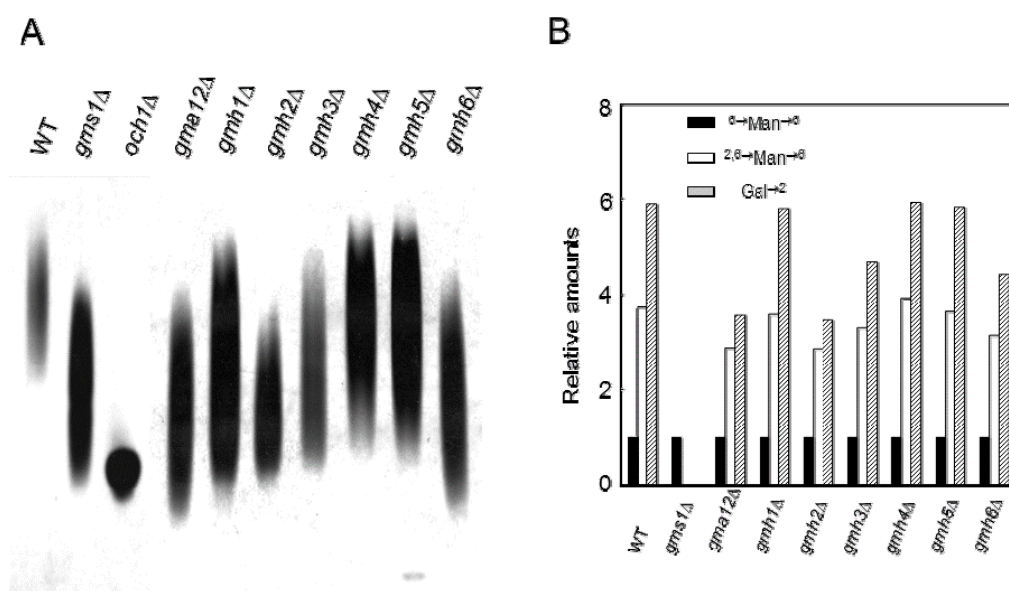


図 2.1.3.5-6 分裂酵母 α -ガラクトース転移酵素単独破壊株の *N*-結合型糖鎖解析

A、各単独破壊株を YES で対数増殖中期 ($\text{OD}_{600}=4-5$) まで培養後、低リン酸 MM 培地で 6 時間培養し、酸性ホスファターゼを誘導した。誘導後、菌体を回収、破碎し、ペリプラズム画分に分泌された酸性ホスファターゼを抽出した。抽出したサンプルをネイティブ PAGE で分画後活性染色を行い、*N*-結合型糖鎖に対するガラクトース付加の程度を観察した。*gms1 Δ* はガラクトース欠損株、*och1 Δ* はガラクトマンナン欠損株のコントロールとして用いた。B、糖タンパク質を各単独破壊株から調製し、 ^1H NMR 解析を行った。各アノマープロトン ($^6\text{-Man}^{-6}$ 、 $^{2,6}\text{-Man}^{-6}$ および Gal^{-2}) の比ピーク面積を $^6\text{-Man}^{-6}$ のピーク面積を 1 とした相対値で示した。

次に各単独破壊株より *O*-結合型 PA 化糖鎖を調製し、サイズ分画 HPLC で分析を行ったところ、*gma12 Δ* 、*gmh2 Δ* および *gmh6 Δ* において野生株とは異なる HPLC プロファイルが得られた(図

2.1.3.5-7)。以上の結果より、Gma12p、Gmh2p および Gmh6p は *N*-および *O*-結合型糖鎖の両方に、Gmh3p は *N*-結合型糖鎖の α -ガラクトース付加に関与することが明らかとなった。

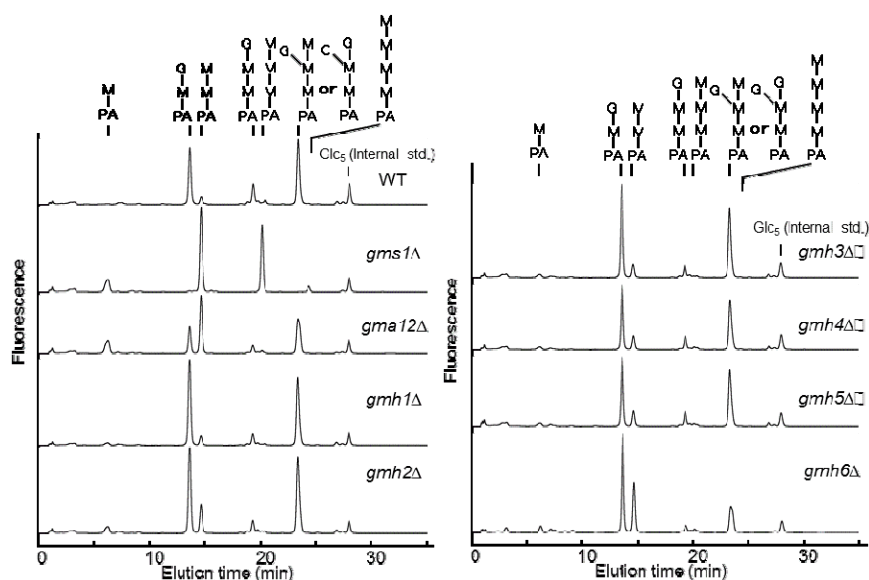


図 2.1.3.5-7 分裂酵母 α -ガラクトース転移酵素単独破壊株の *O*-結合型糖鎖

各単独破壊株より *O*-結合型 PA 化糖鎖を調製し、サイズ分画 HPLC 分析を行った。図上の黒線は野生株および *gms1Δ* で同定された構造既知糖鎖の溶出位置とその構造の模式図を示す (M: マンノース、G: ガラクトース、模式図中の縦線は α 1,2-結合を、斜め線は α 1,3-結合を示す)。

α -ガラクトース転移酵素単独破壊株の糖鎖構造解析の結果より、単独破壊株では α -ガラクトース付加を完全に欠損させることは出来ないことが明らかとなった。そこで、 α -ガラクトース転移酵素破壊による α -ガラクトース完全欠損を期待して 7 つの α -ガラクトース転移酵素を破壊した 7 重破壊株 (7Gal Δ) を作製した。7Gal Δ 株の高温 (37°C) 感受性およびハイグロマイシン B (糖鎖合成欠損株で感受性を示すことが知られている) 感受性を調べたところ、7Gal Δ 株は *gms1Δ*株と同様に高温、ハイグロマイシン B 感受性を示し、 α -ガラクトース付加完全欠損が期待された (図 2.1.3.5-8A)。さらに 7Gal Δ 株糖タンパク質のガラクトース含量を測定するために、単糖組成解析を行ったところ、*gms1Δ*では単糖ガラクトースが検出されないのに対して、7Gal Δ 株では全糖含量の内 3%程度のガラクトースを含有していることが明らかとなった (図 2.1.3.5-8B)。

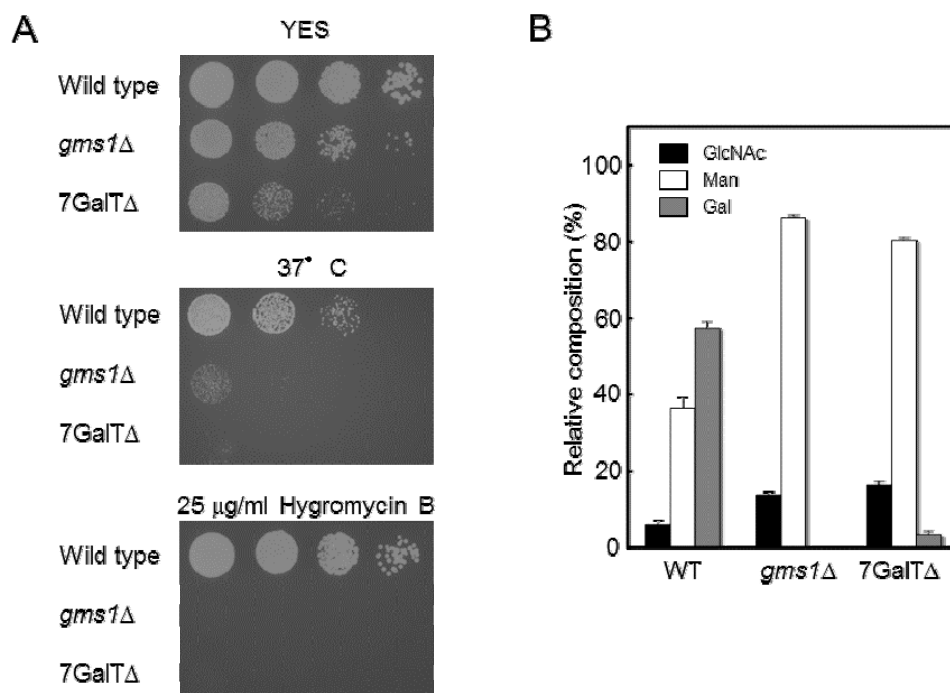


図 2.1.3.5-8 7GalTΔ株の表現系解析と糖組成解析

A、野生株、*gms1Δ*株および7GalTΔ株をYES培地（30°Cまたは37°C）およびハイグロマイシンBを含むYES培地（30°C）で3日間培養した。B、野生株、*gms1Δ*株および7GalTΔ株よりガラクトマンナン糖タンパク質を抽出し、酸加水分解を行った。得られた単糖をPA化し、HPLCにより定量した。

7GalTΔ株においてどのような α -ガラクトース含有糖鎖が存在するか調べるために、7GalTΔ株よりO-結合型糖鎖を調製し、サイズ分画HPLC分析を行った。サイズ分画HPLCでは*gms1Δ*株に比べて7GalTΔ株では4糖画分の溶出位置に違いが見られた(図2.1.3.5-9A)。7GalTΔ株の4糖画分はサイズ分画HPLC上では野生株のGal残基を含有する4糖ピークと一致していたことから、野生株(a)および7GalTΔ株の4糖ピーク(b)を分取し、逆相HPLC分析を行った(図2.1.3.5-9B)。ピークaからは2種類のピーク(ピークa-1およびa-2)、ピークbからは単一ピーク(ピークb-1)が検出された。

つの遺伝子があり、それぞれ *otg1* - 3 (α 1 (one),3 (three)-galactosyltransferase)と名付け、この遺伝子解析を行うことにした。これらの遺伝子を 7GalT Δ 株より破壊し、10 重破壊株を作製した (10GalT Δ)。10GalT Δ 株糖タンパク質のガラクトース付加を調べるために、ガラクトース認識レクチンである PNA レクチンブロットを行った (図 2.1.3.5-11)。7GalT Δ 株ではわずかに染色されるのに対して、10GalT Δ 株では *gms1* Δ 株と同様に、全く染色が見られなかった。

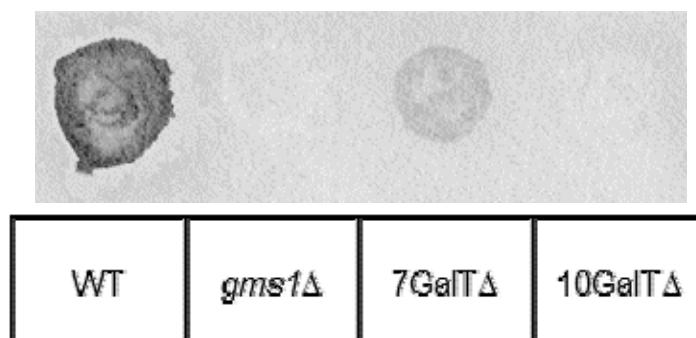


図 2.1.3.5-11 10GalT Δ 株の PNA レクチンブロット

野生株、*gms1* Δ 株、7GalT Δ 株および 10GalT Δ よりガラクトマンナン糖タンパク質を抽出し、ガラクトース認識レクチンである PNA のレクチンブロットを行った。

また 10GalT Δ 株より O-結合型糖鎖を調製し、サイズ分画 HPLC 分析を行ったところ、*gms1* Δ 株と同様の HPLC プロファイルが得られた (図 2.1.3.5-12)。また *otg1* - 3 Δ 株では α 1,2-ガラクトース含有糖鎖は検出されるものの、 α 1,3-ガラクトース含有 4 糖ピークは検出されなかった。以上の結果より、10GalT Δ 株の糖鎖には全く α -ガラクトースが付加しておらず、また *otg1* - 3は α 1,3-ガラクトース転移酵素をコードしていることが強く示唆された。今回得られた 10GalT Δ 株は α -ガラクトース付加完全欠損株であるが、*gms1*が機能しているためゴルジ体にはヒト型複合型糖鎖生産に必要な β -ガラクトース転移酵素の基質となる UDP-ガラクトースが取り込まれる。つまり、10GalT Δ 株はヒト型複合型糖鎖生産の基盤となる非常に有用な株であると言える。

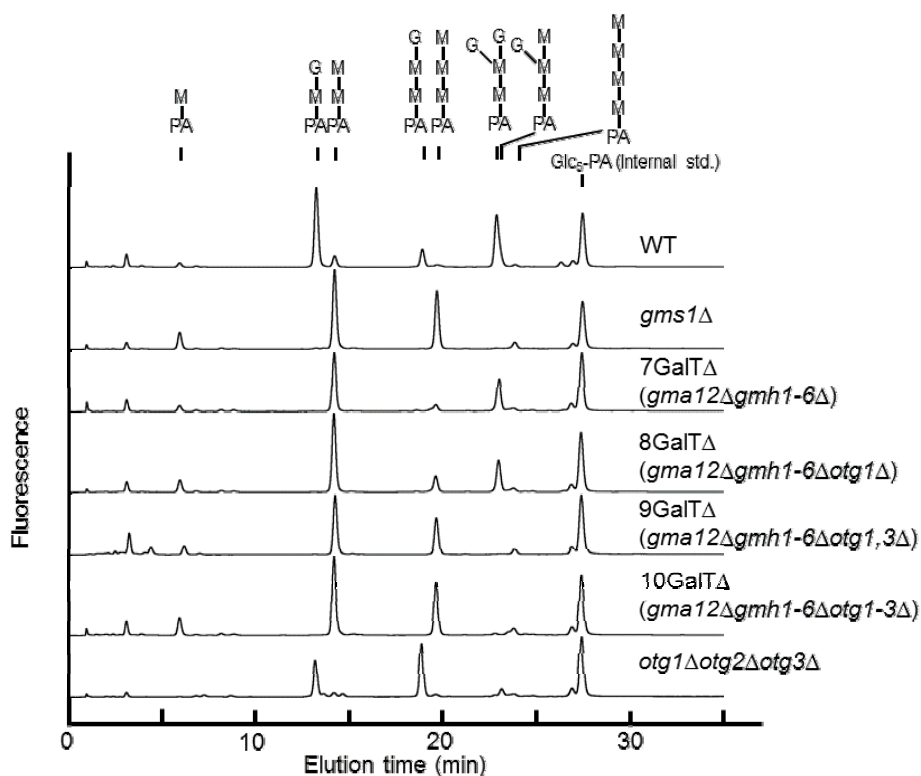


図 2. 1. 3. 5-12 10GalT Δ 株 O-結合型糖鎖のサイズ分画 HPLC 解析

野生株、*gms1* Δ 株、7GalT Δ 株、8GalT Δ 株、9GalT Δ 株、10GalT Δ 株および *otg1-3*より O-結合型 PA 化糖鎖を調製し、サイズ分画 HPLC 分析を行った。図上の黒線は野生株および *gms1* Δ で同定された構造既知糖鎖の溶出位置とその構造を示す (M: マンノース、G: ガラクトース、模式図中の縦線は α 1,2-結合を、斜め線は α 1,3-結合を示す)。

結語

我々は分裂酵母の N-及び O-結合型糖鎖の構造解析及び糖鎖の生合成に関与する遺伝子の解析を行った。その結果、N-結合型糖鎖に関してはガラクトース転移酵素の機能と遺伝子破壊株を取得し、初めて分裂酵母の α -1,3 転移酵素遺伝子を同定することができた。さらにヒト型糖鎖のコア構造を持った糖鎖を分裂酵母で生産することも可能になった。最終的にはヒト由来の糖転移酵素を発見して、よりヒト型糖鎖に近い構造を持った分裂酵母宿主の創製を行いたいと考えている。O-結合型糖鎖に関しては細胞表層糖タンパク質も、また実際に異種糖タンパク質を生産させた場合にも、均一な二糖構造から成ることを今回明らかにすることが出来た。

本研究で述べたように分裂酵母には多数の糖鎖へのガラクトース付加に関連する転移酵素が存在する。今回、これまで全く報告のない新たな α -1,3 ガラクトース転移酵素を同定することに成功し、さらにゲノム上に存在するすべての分裂酵母糖転移酵素ホモログの機能を明らかにすることができた。一般に高等動物における糖鎖のガラクトース残基は β 結合の場合が多く、本研究で創製した全ガラクトース転移酵素 10 重破壊株は今後、 β 結合のガラクトースを含む糖鎖の生合

成には極めて有用な宿主であると考えている。分裂酵母には他の生物とは異なり、酸性糖鎖はすべてガラクトースにピルビン酸が付加されていることが Trimble らの研究で明らかにされている。我々は分裂酵母の糖鎖へのピルビン酸の付加に重要な転移酵素である Pvg1 を大腸菌で生産して、その酵素学的性質の解析も行っている。もし高等動物の糖鎖で見られる酸性糖であるシアル酸と分裂酵母のピルビン酸が類似した機能を有する場合には、シアル酸合成系を分裂酵母に導入することを省けるのでより実用化に近くなるのではないかと考えている。よってピルビン酸含有糖鎖の機能についても更なる研究を進めて行く予定である。

本研究で作製した株を用いれば、ヘテロな糖鎖による影響を考えずにすむために、非常に有用な宿主細胞が創製されたと考えている。今後も引き続き生産させたいタンパク質の種類によって宿主・ベクター系や培養条件などを選択可能な汎用性の高いシステムの構築を目指していきたい。これまで得られた研究成果を生かしてヒト適応型糖鎖を生産する新たな分裂酵母宿主を創製することで、さらに本格的な産業応用に利用可能な分裂酵母宿主の創製を進めていきたい。

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

区分 年度	特許出願			論文		その他外部発表（プレス発表等）
	国内	外国	PCT [※] 出願	査読付き	その他	
H18FY	0件	0件	0件	7件	0件	2件
H19FY	0件	0件	0件	6件	3件	6件
H20FY	1件	0件	0件	8件	1件	3件
H21FY	4件	0件	2件	9件	0件	11件
H22FY	1件	0件	1件	6件	0件	7件

(※ Patent Cooperation Treaty : 特許協力条約)

2. 1. 4 発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発

(独立行政法人製品評価技術基盤機構)

2. 1. 4. 1 MGF-01 株及び *E. coli* K-12 W3110 株の培養条件の検討

バイオプロセスに適用できる培地によりMGF-01及び*E. coli* K-12 W3110株を培養し、プロテオーム解析を行うための菌体を採集した。

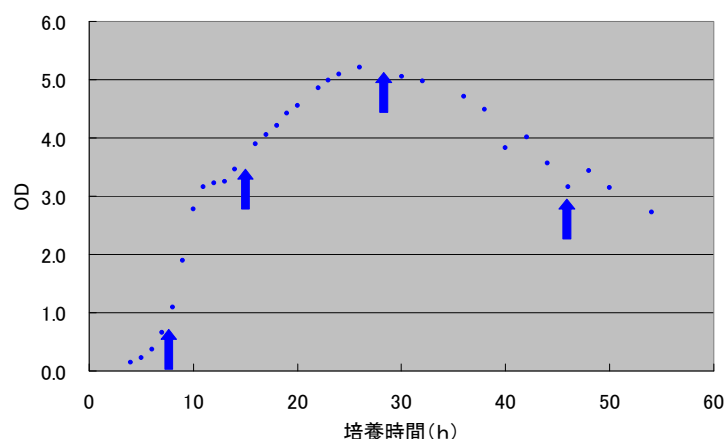
(1) 培地

培地は、コスト、生産物質の精製及び発酵タンク内に栄養源の投入が簡便である単純培地とした。

(2) 培養結果

培地と菌体を培養フラスコに入れ、回転培養を実施した。MGF-01株の培養結果を図1に示す。MGF-01株は、*E. coli* K-12 W3110株とは違う増殖パターンを示し、遺伝子多重削除の効果により、増殖を継続できるようになったものと考えられる。

MGF-01株の特殊な増殖状態をプロテオームから解明するため、対数増殖期中期として8時間、対数増殖期後期として16時間、MGF-01株の特長である再増殖期後期として30時間、定常期後期として48時間の菌体を採取した。



図－1 MGF-01株増殖曲線

2. 1. 4. 2 ショットガン法による網羅的プロテオーム解析

培養により得られた菌体からタンパク質を抽出し、一次元電気泳動法(SDS-PAGE)を用いタンパク質を分離した。分離されたタンパク質を酵素消化し、高速液体クロマトグラフィー・エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析法(LC-ESI-MS/MS)でペプチド断片を検出した。

ショットガン法の結果、MGF-01株からは、1,382種のタンパク質を同定した。同定タンパク質の内、363種が機能未知タンパク質であった。MGF-01株の残存遺伝子の中で363種の機能未知遺伝子の発現が確認された。よって、この363種のタンパク質が機能解析対象遺伝子の候補となる。

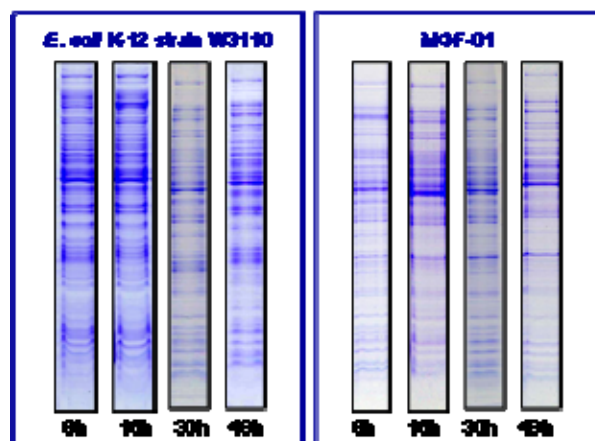


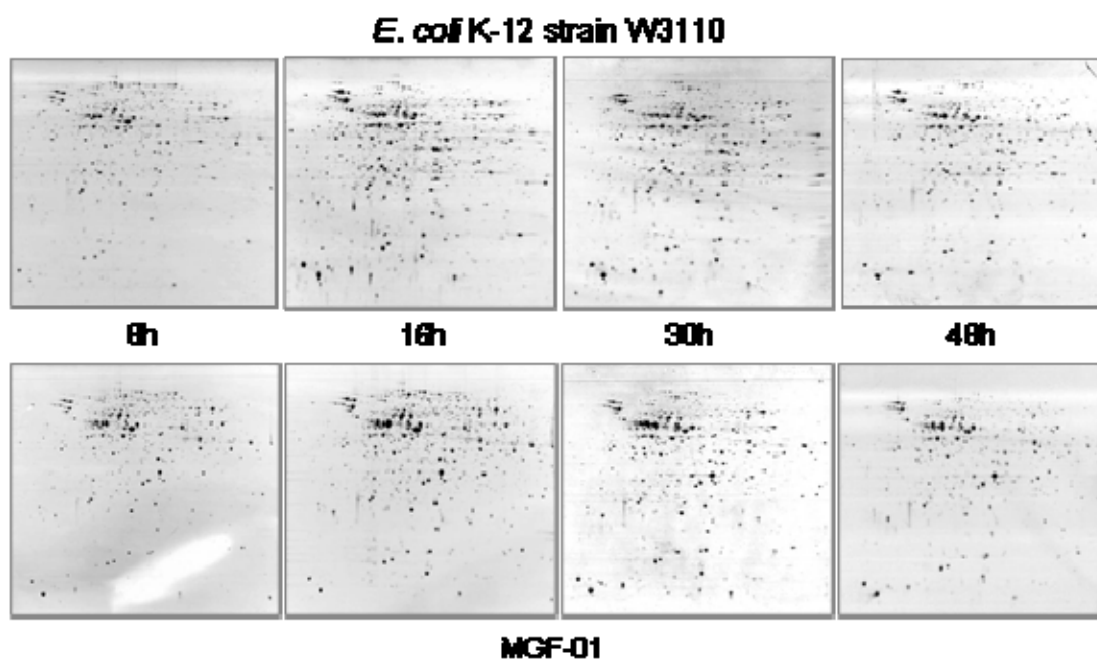
図-2 ショットガン法用SDS-PAGE

2. 1. 4. 3 ペプチドマスマーフィンガープリント法によるプロテオーム解析

菌体からタンパク質を抽出し、二次元電気泳動法 (2D-PAGE) を用いタンパク質を分離した。分離されたタンパク質を酵素消化し、マトリックス支援イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF-MS) でペプチド断片を検出した。

(1) 二次元電気泳動

MGF-01株の増殖状態の変化をプロテオームから解明するため、8、16、30及び48時間培養した菌体について、二次元電気泳動を行った。*E. coli* K-12 W3110株についても同様に二次元電気泳動を行った。



(上段 *E. coli* K-12 W3110株、下段 MGF-01株。8h,16h,30h,48hはそれぞれ培養時間。)

図－3 二次元電気泳動像

(2) ペプチドマスーフインガープリント法によるプロテオーム解析結果

大腸菌 K-12 W3110株の8、16、30及び48時間培養した菌体について、二次元電気泳動を行い、ペプチドマスーフインガープリント法により、発現タンパク質の同定を行った。*E. coli* K-12 W3110株の総遺伝子数4,227の内、473種を同定した。

得られた二次元電気泳動結果から、それぞれに変動するタンパク質を検出した。これらの変動タンパク質の同定を行うことにより、MGF-01株の増殖機構の解明、高性能化及び発酵工程における菌体状態の把握が可能になることが予想される。

2. 1. 4. 4 エドマン分解法による機能未知遺伝子翻訳開始位置の決定

ペプチドマスーフインガープリント法により、機能未知遺伝子から発現していると確認されたタンパク質について、エドマン分解法にてN-末端解析を行った。

二次元電気泳動法にて発現が確認された85種114個のタンパク質についてN-末端解析を行ったところ、DDBJ登録遺伝子の開始位置と一致したものが69種、開始位置が異なるものが4種、タンパク質としての機能を発揮するため、分解、プロセッシングを受けてN-末端が変化していたものが12種、解析不能が5種であった。

2. 1. 4. 5 データ解析及び提供

(1)MGF 株及び *E. coli* K-12 W3110 株の発現タンパク質の検出結果

MGF-01 株及び *E. coli* K-12 W3110 株網羅的プロテオーム解析を行った。この結果、大腸菌 K-12 W3110 株の総遺伝子数 4,227 の 38.8%である 1,641 の発現タンパク質を検出した。MGF-01 株のプロテオーム解析の結果、1,385 個の発現タンパク質を検出した。解析の結果、MGF-01 株に残存している機能未知遺伝子から、368 の発現タンパク質が発現しているのを確認し、機能解析対象遺伝子の候補とした。発現が確認されていない機能未知遺伝子は、削除対象遺伝子の候補となる。

(2)MGF-01 株と *E. coli* K-12 W3110 株の発現タンパク質の変動の比較解析結果

E. coli K-12 W3110 株と MGF-01 株の間で発現量に変動しているタンパク質の解析結果から、変動タンパク質を選択し機能分類し、93 種類の既存のパスウェイについて解析を行った。

その結果、MGF 株は糖代謝、TCA サイクル、ペントースリン酸回路などにおいて反応の中心となる酵素や回路を構成する多くの酵素について W3110 株より発現量が高まっていた。

(3)MGF 株の高性能増殖について

E. coli K-12 W3110 株では対数増殖期が終了するタイミングにおいても、MGF-01 株は定常期に移らず、更に増殖を続けることが確認された。これは遺伝子削除の効果により、増殖を継続できるようになったと考えられる。

(4) データ提供

E. coli K-12 W3110 株の新規 ORFs 情報及びアノテーション修正情報、MGF-01 に発現している機能未知遺伝子リスト、MGF-01 に発現している機能未知遺伝子の N-末端解析情報、MGF-01 に発現している遺伝子の中で変動する遺伝子のリスト及び 93 種類のパスウェイマップ、MGF-01 に発現している遺伝子の変異情報プロテオーム解析データを協和発酵キリンに提供した。

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

区分 年度	特許出願			論文		その他外部発表（プレス発表等）
	国内	外国	PCT※出願	査読付き	その他	
H18FY	0件	0件	0件	0件	0件	0件
H19FY	1件	0件	0件	0件	0件	2件
H20FY	0件	0件	0件	0件	0件	2件
H21FY	0件	0件	0件	0件	0件	0件
H22FY	0件	0件	0件	0件	0件	0件

(※ Patent Cooperation Treaty : 特許協力条約)

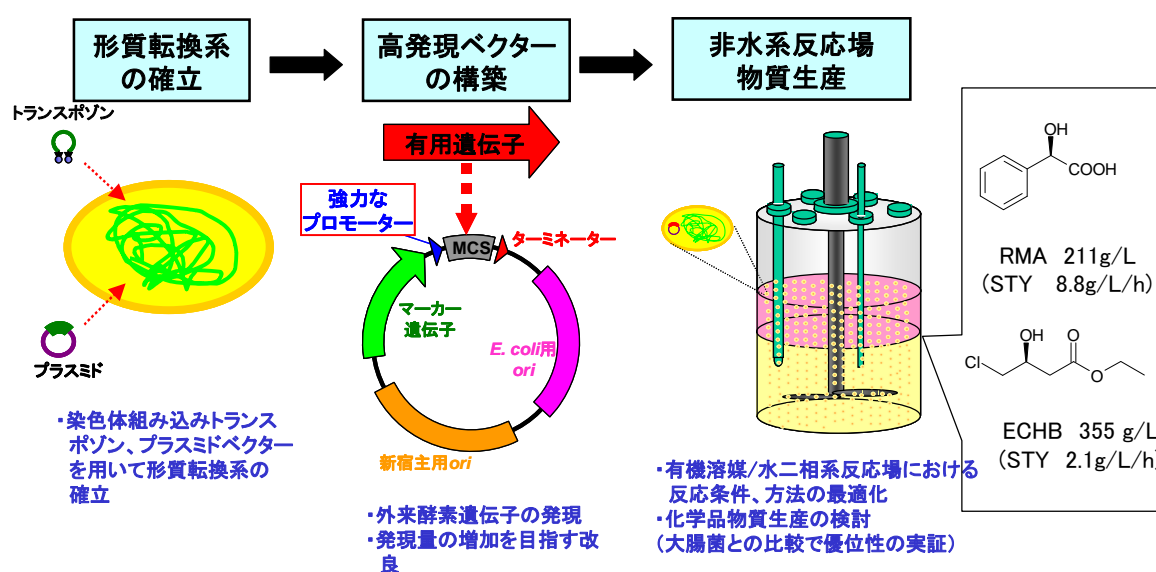
2.2 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発

2.2.1 非水系反応場におけるバイオプロセスの構築(ダイセル化学工業株式会社)

2.2.1.1 *Kocuria rhiozophila* DC2201 等宿主細胞開発と有機溶媒耐性機構の研究(ダイセル化学工業)

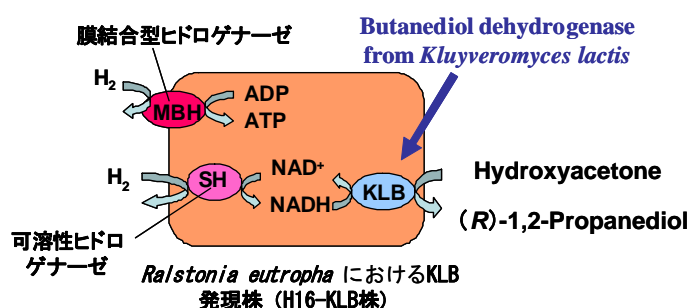
有機溶媒中で細胞構造が変化しにくい *Kocuria rhiozophila* DC2201 株(以下、DC2201)を宿主とする発現系を開発し、水/有機溶媒の二相系反応場を用いた光学活性化合物の生産を実施した。まず、DC2201 を宿主として、遺伝子を発現できる系を確立するために、プラスミドベースの発現ベクター系を開発した。これまでに *Kocuria* で利用できる複製起点は報告されていなかったため、近縁種からプラスミドをスクリーニングすることにより、DC2201 において複製できる複製起点を取得した。次に、外来遺伝子を高発現するためのプロモーターとして、DC2201 において定常期に高生産されるタンパク質を分離、同定することにより、構成的に高発現できる *sodA* プロモーター (P_{sodA}) を取得した。 P_{sodA} を用いて *Arthrobacter* 由来のニトリラーゼ遺伝子を発現させた場合には、大腸菌と同程度の発現量が得られた。以上の結果より得られた複製起点およびプロモーターを利用して、新規の *Kocuria* 用の高発現ベクターを構築した。

開発した DC2201 を宿主とするベクター系を用いて、水/有機溶媒の二相系反応場での物質生産の検討を実施し、その有用性を検証した。その結果、(*R*)-マンデル酸の生産においては、211 g/L(水相)の世界最高濃度で蓄積できること、また、4-クロロ-3 ヒドロキシアセト酪酸エチルの生産においては、補酵素を添加することなく 355g/L(酢酸ブチル相)の濃度で蓄積できることを実証した。



2. 2. 1. 2 水素利用微生物触媒の開発と反応に関する研究開発(茨城大学)

水素利用微生物触媒の開発では水素酸化細菌宿主として *Ralstonia eutropha* H16 株および *Rhodococcus opacus* MR11 株を使用した。親水性化合物の変換反応に適する酵素として *Kluyveromyces lactis* 由来のアルコール脱水素酵素(KLB)、有機溶媒系での疎水性化合物変換反応に適する酵素として *Rhodococcus erythropolis* 由来のアルコール脱水素酵素(ReADH)を選抜し、可溶性ヒドロゲナーゼ・プロモーター制御下にて H16 株での機能的発現に成功した。MR11 株ではニトリラーゼ・プロモーター制御下に KLB 遺伝子を導入し、イソバレロニトリルを誘導剤として有機培養にて KLB を顕著に発現することができたが、誘導剤の添加が独立栄養的生育を顕著に阻害したため、ヒドロゲナーゼと KLB の共発現に至らなかった。得られた H16 株における KLB 発現株を微生物触媒とし、水素を反応駆動力としたヒドロキシアセトンの (*R*)-1, 2-プロパンジオールへの変換(水系)を検討した。ジャー反応により、76h で 67.7 g/l (0.89 g/l/h) の生成物が得られ、R 体過剰率は 99.85% *e. e.* であった。また、10%以上の水素分圧の存在で最大反応速度が得られること、水素ガス閉鎖循環系でも高い反応速度が得られ、消費水素と反応生成物のモル比はほぼ 1:1 であることなど、反応が効率よく進行することが示された。さらに ReSADH 発現株を用いて 4-クロロアセト酢酸エチルの (*R*)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルへの変換を試みたところ、フタル酸ジブチルを有機溶媒層とした二層系反応が基質と生成物の毒性軽減に有効で、水系での反応の約 22 倍の生成量が得られた。



2. 2. 1. 3 非水系生体触媒への水素酸化能付与に関する研究(東京大学)

有機溶媒耐性株あるいは大腸菌に *Ralstonia eutropha* 由来の NAD還元型ヒドロゲナーゼを発現させ、物質生産に資することを目標に研究を進めた。*Ralstonia eutropha* 由来 NAD還元型ヒドロゲナーゼの構造遺伝子 *hoxFUYH* とアクセサリ遺伝子 *hoxW* とをプラスミドに組み込み、当該プラスミドで大腸菌を形質転換したところ、嫌気条件あるいは微好气的条件で培養した菌体において、NAD還元型ヒドロゲナーゼの発現が確認された。なお、好気条件で培養した菌体においては、発現は確認されなかった。ここで、*Ralstonia eutropha* においては、*hoxFUYHWI* なる遺伝子構造をとっていることが分かっているが、*hoxI* については必須性は認められなかった。NAD還元型

ヒドロゲナーゼの機能的発現には、その活性中心を形成するためのアクセサリ遺伝子 (*hypABCDE*)が必要であるが、大腸菌ゲノム中にはそれぞれに対応する遺伝子が存在している。そこで1遺伝子破壊株を入手し、大腸菌中のそれぞれのアクセサリ遺伝子の必須性を調べたところ、基本的に全ての遺伝子に必須性が認められた。溶媒耐性株におけるヒドロゲナーゼの発現は、発現に必要な断片を含んだプラスミドの調製まで終了したものの、形質転換株を得ることができず、成功していない。

2. 2. 1. 4 酵素タンパク質の有機溶媒耐性機構と疎水性化合物変換酵素の研究(岐阜大学)

本研究課題に対して、「酵素タンパク質の有機溶媒耐性機構の研究」「水酸化反応、酸素添加反応を触媒する酵素の探索」「炭素-炭素結合反応(炭酸固定)を触媒する酵素の探索」を実施した。

(1) *Arthrobacter* F73 のニトリラーゼをとりあげ、ランダム変異導入による有機溶媒耐性が向上した強化変異体の取得を行なった。エラープローンPCR法でニトリラーゼに変異を導入し、特定のアミノ酸残基の置換、およびC末端領域のアミノ酸配列の改変が有機溶媒耐性の向上に影響を与えることを見いだした。その構造特性を明らかにするために、野生型ニトリラーゼの高純度で精製した。凝集体の形成し易さが結晶化に向けての問題点であり、精製ステップ等の改良を進めた。

(2) 難水溶性の基質であるアダマンタンおよびイソオイゲノールに作用する微生物酵素の探索を実施した。アダマンタンに水酸基を3つまで導入する微生物反応を放線菌に見だし、反応条件を最適化した。イソオイゲノールをバニリンへと変換する新規酵素イソオイゲノールモノオキシゲナーゼを *Pseudomonas* 属細菌に見だし、反応特性および遺伝子クローニングを行なった。大腸菌および *Kocuria rhizophila* DC2201 に遺伝子を導入して変換活性を比較し、イソオイゲノールの変換には有機溶媒耐性宿主が適することを示した。

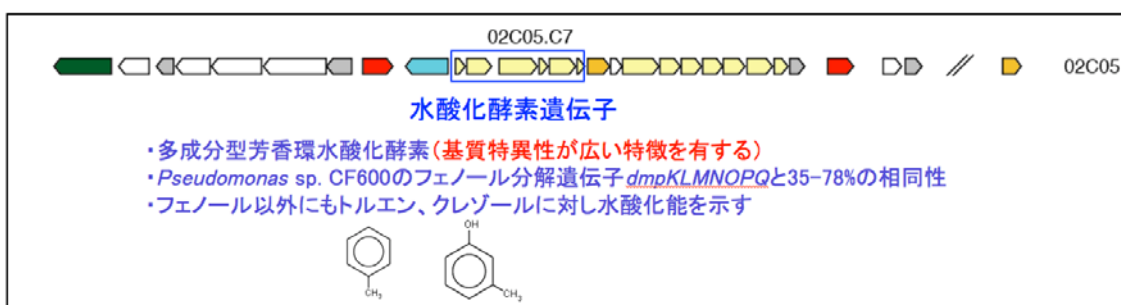
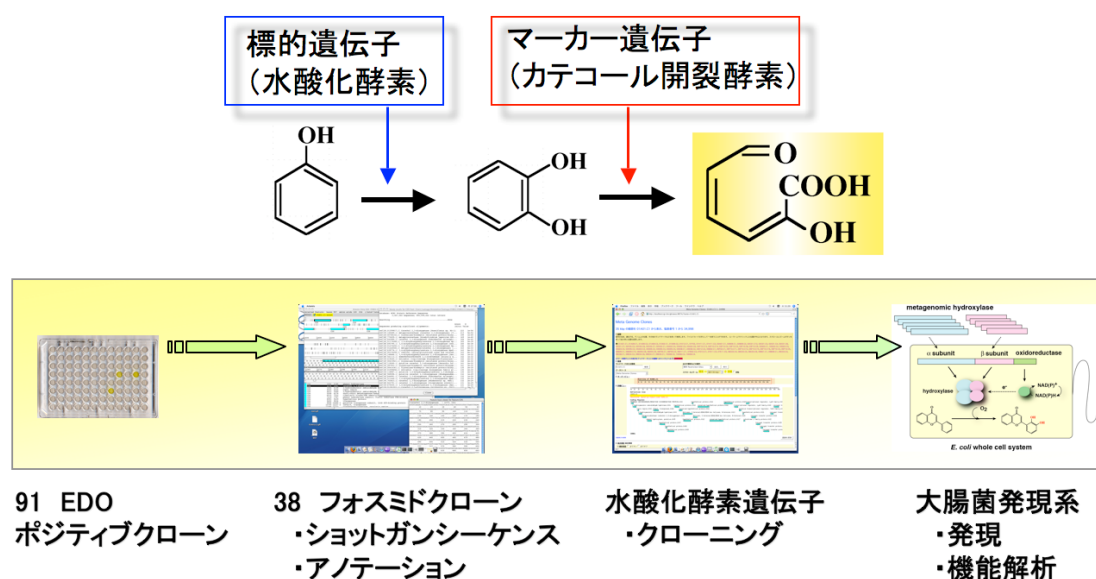
(3) 脱炭酸酵素の炭酸固定活性を活用した有用カルボン酸の酵素合成を目指し、超臨界二酸化炭素条件下で機能する酵素の探索を進めた。高温域適応型の4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素を見出すために、集積培養を行ない、*Bacillus* 属細菌に高温域で安定に活性を示す菌株を見いだした。

2. 2. 1. 5 メタゲノム手法による芳香族水酸化酵素の開発と反応ルートの開拓(産業技術総合研究所)

メタゲノムより種々の芳香環水酸化酵素遺伝子を単離し、遺伝情報解析と機能解析を行った。既知の酵素と類似のマルチコンポーネント以外に、産業上の有用性が見込まれるモノコンポーネントタイプの酵素2種を見出した。これらの酵素遺伝子を大腸菌内で発現し、ナフトエ酸に対する水酸化活性を検討した。この際、位置選択的な水酸化体の検出方法として、4-アミノアンチピリンとナフトエ酸水酸化物をラッカーゼ存在下でカップリング重合させることを試み、実際に、ナフトエ酸の水酸化位置の違いにより異なる呈色反応産物が得られることを見出した。本アッセイ系を構築した上で、野生型酵素の水酸可能を検討したが、有意な活性を示さなかった。

そこで、特にモノコンポーネントタイプの酵素2種について、進化工学的な改変(変異 PCR 法によるランダム変異)も試みたが、ナフトエ酸に対して水酸化能を持つ酵素は得られなかった。

この他、in house メタゲノム配列データベースを活用し、その遺伝情報解析により、ナフトエ酸水酸化活性を持つと推測される酵素遺伝子を同定し、遺伝子発現と機能解析を行ったが、本酵素についてもナフトエ酸水酸化活性を確認するには至っていない。



2. 2. 1. 6 有機溶媒耐性酵素等有用酵素の精製・結晶化・構造化学的研究(兵庫県立大学)

本研究課題に対して「有機溶媒耐性ニトリラーゼの精製・結晶化および構造化学的研究」「その他の有用酵素の構造化学的研究」を実施した。

(1) *Fusarium* AAM1 由来のニトリラーゼについて SDS 電気泳動的に不純物バンドが見られないところまで精製し、結晶化を試みたが結晶は得られなかった。そこで、ネイティブ電気泳動および動的散乱法によりその性状を調査した。その結果、精製酵素はネイティブ電気泳動ゲル上で単量体から 10 量体以上におよぶ多量体の混合物であることがわかった。また、動的散乱法による結果も分子量的に不均一な会合物の混合物であることを指示していた。そこで、他の菌株由来の同等酵素の検索を行い、*Arthrobacter* F73 由来のニトリラーゼを精製し、同様にその性状を調査した。その結果、本酵素は、精製直後はネイティブ電気泳動上単一のバンドを示し、動的散乱の結果は、ほぼ 10 量体程度の均一な会合状態であることがわかった。しかし、精製後、時間経過に伴ってさらに大きな凝集状態に移って行く傾向も見られた。現在は、できるだけ 10 量体を維持できる溶液条件と短時間で結晶化させる条件を検討中である。

(2) *Alkaligene* 由来の 2,6-dihydroxybenzoate decarboxylase の結晶化および結晶構造解析に成功した。分子は 4 量体で一分子の全体構造は、*Rhizobium* 由来の酵素 (PDB=2DVU) とほぼ同じであり、両者の原子座標の変位の二乗平均平方根は約 0.6 Å であった。活性部位と思われる部分の重要残基の原子座標もほぼ重なった。しかし、*Rhizobium* の酵素で活性に必須と思われる Zn とと思われる電子密度が低かった。また、*Alkaligenes* 由来の酵素では、酵素活性は Zn の濃度に依存しないことがわかった。現在、その原子種について調査を続けている。

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

区分 年度	特許出願			論文		その他外部発表（プレス発表等）
	国内	外国	PCT [※] 出願	査読付き	その他	
H18FY 2006	0件	0件	0件	3件	0件	3件
H19FY 2007	0件	0件	0件	2件	0件	6件
H20FY 2008	0件	0件	0件	1件	0件	9件
H21FY 2009	1件	0件	0件	2件	1件	4件
H22FY 2010	1件(予定)	0件	0件	3件	2件	9件

(※ Patent Cooperation Treaty : 特許協力条約)

2. 2. 2 酸素添加酵素の高機能化・多様化技術の研究開発(メルシヤン株式会社)

2. 2. 2. 1 酸素添加酵素任意デザイン化技術の研究開発 Vdh の機能改変 (メルシヤン株式会社)

大腸菌発現系、スクリーニング系の構築

Vdh のビタミン D2 (VD2) 25 位水酸化活性向上を目的として機能改変を行った。大腸菌を宿主とした機能改変を行うために、大腸菌における Vdh の発現と電子伝達系の検討を行った。Vdh は *Pseudonocardia autotrophica* よりクローニングされたが、共役する電子伝達系タンパク質(レドックスパートナー)について本研究開始時は未同定であった。そこで、大腸菌の休止菌体反応による VD2 変換試験での VD2 25 位水酸化活性を指標に他の微生物由来のレドックスパートナーを検討したところ、*Acinetobacter* 属細菌由来のフェレドキシンおよびフェレドキシン還元酵素遺伝子 (*aciBC*) を共発現させた時、最も高い活性が得られた。続いて、大腸菌の whole cell 反応を利用した Vdh 変異ライブラリーのスクリーニング条件を検討した。基質濃度や反応時間を検討することにより、活性のばらつきが無く、活性向上クローンを検出しやすいスクリーニング条件を設定した。

高機能化酵素の取得

設定した条件により高活性 Vdh 変異体のスクリーニングを行った。Error-prone PCR 法で Vdh 遺伝子のランダム変異ライブラリーを構築し、前述のスクリーニング法に従って、VD2 25 位水酸化活性が向上した変異クローンの分離を試みた。約 1000 クローンのスクリーニングにより、コントロール株より活性が高い株を 23 株同定した。これら 23 株の変異点解析により、Vdh の活性向上に寄与する 8 箇所の置換部位を同定した。これらの部位をアミノ酸総置換し、最も比活性(酵素あたりの活性)が高くなるアミノ酸置換を決定した(図1)。その結果、一箇所のアミノ酸置換で活性が 1.9 から 2.8 倍上昇し、3 次元結晶構造解析を元にそれらの置換部位の分布を見ると、基質ポケットの入り口やフレキシビリティが高いと推測される FG ヘリックスの付け根、フェレドキシン相互作用部位と推測される部位の近傍に分布していることが示された(図2)。

更なる高活性化 Vdh を作製するために、上記 8 箇所の中から有効アミノ酸変異の多重化を行い、四重変異体活性向上酵素 (Vdh-K1) を構築した(図 1)。この Vdh 改変酵素を大腸菌で発現させて水酸化活性を調べた結果、VD2 の水酸化は最高で野生型 Vdh の 11.5 倍まで増加した。さらにこれらの改変 Vdh は VD3 に対しても野生型の 21.6 倍の比活性向上が認められた。

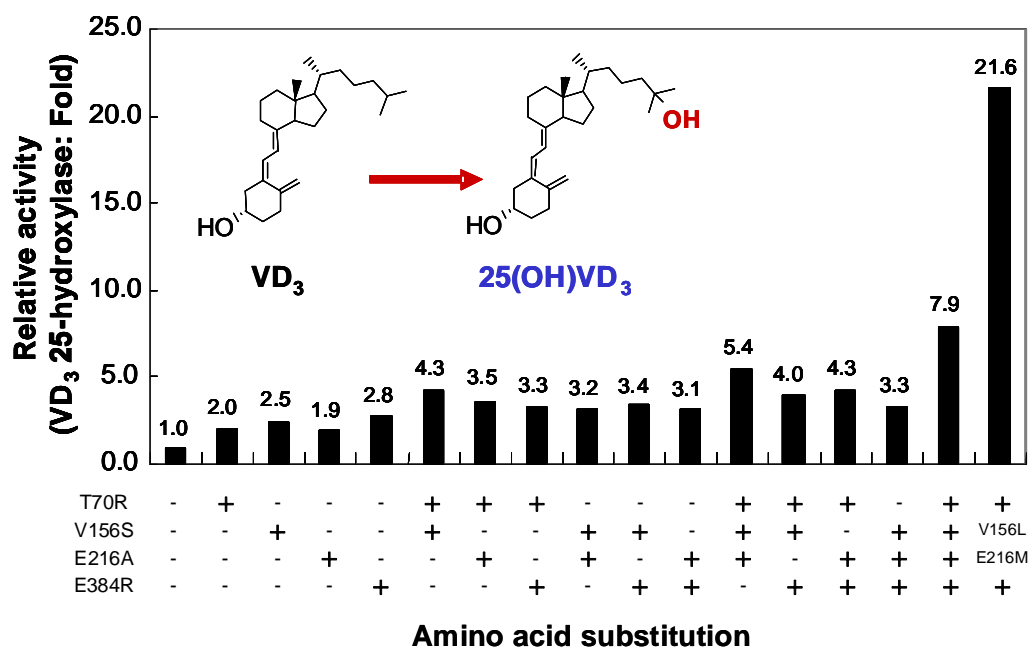


図1. Vdhの有効変異の組合せによる活性上昇

活性向上に寄与する各変異部位において最大の活性をもたらすアミノ酸の置換体、さらにそれらの2-4の多重変異体を作製した。それぞれの相対活性を示す。

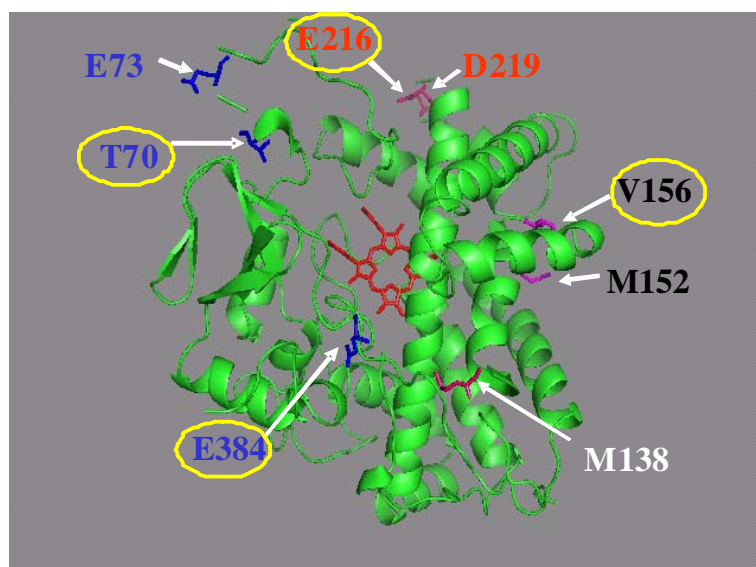


図2. Vdhの活性向上に有効だった変異部位

活性向上に寄与する変異部位を野生型Vdh結晶構造上に示した。E73, T70, E384は基質認識部位、E216, D219はフェレドキシン作用部位、V156, M152はFGヘリックスのヒンジ部位と推定される。最大の活性を有する改変酵素Vdh-K1がもつ変異部位(T70R, V156L, E216M, E384R)

を○で囲む。

Vdh の機能改変による高活性化に加えて、副反応制御も生産プロセスを視野に入れた酵素の高機能化では重要な課題である。VD3 は Vdh により水酸化されてカルシトリオール (1,25-dihydroxy VD3) を生成する。この時、26 位水酸化体が副生成物として生じる。そこで 26 位水酸化反応が抑制された Vdh の構築を目的として有効変異点の探索を開始した。産総研で明らかにされた結晶構造データに基づいて基質 VD3 と相互作用すると考えられる Vdh のへム近傍に位置する数箇所のアミノ酸残基に対してアミノ酸置換による副反応抑制効果を調べた。その結果 88 番目のイソロイシン残基をバリンに置換した時に副反応物生成が顕著に抑制されることを発見した。この変異(I88V)を前述の高活性化酵素 Vdh-K1 に導入した酵素(VdhK1-I88V)では顕著な副反応物比率の減少が認められた。すなわち VdhK1-I88V では向上した比活性(野生型酵素の 20 倍)を維持したまま副反応物比率(野生型酵素は 10.1%)が 1.7% まで低減していた。以上の改変酵素の機能評価は大腸菌組み換え株を用いたものであるため、実際の能力検証のため、VdhK1-I88V 遺伝子を親株の VD 変換放線菌 *P. autotrophica* に導入した株を構築し、VD3 の水酸化変換試験を実施した。すでに開発 *P. autotrophica* ベクターを用いて内在の野生型 Vdh を破壊した *P. autotrophica* を宿主にして Vdh-K1 遺伝子や VdhK1-I88V 遺伝子をゲノムにインテグレートさせた。得られた株は元の株に対して最大 2 倍の 25(OH)VD3 の生産速度(変換 24 時間後)を与えたものの変換速度は持続しなかったため 72-96 時間後には元株の生産量に追いついた(図3A)。一方で I88V 変異に基づく 26 位水酸化副反応の抑制は顕著な効果を示し、副反応生成比は元株の 1/13 に低減させることができた(図3B)。

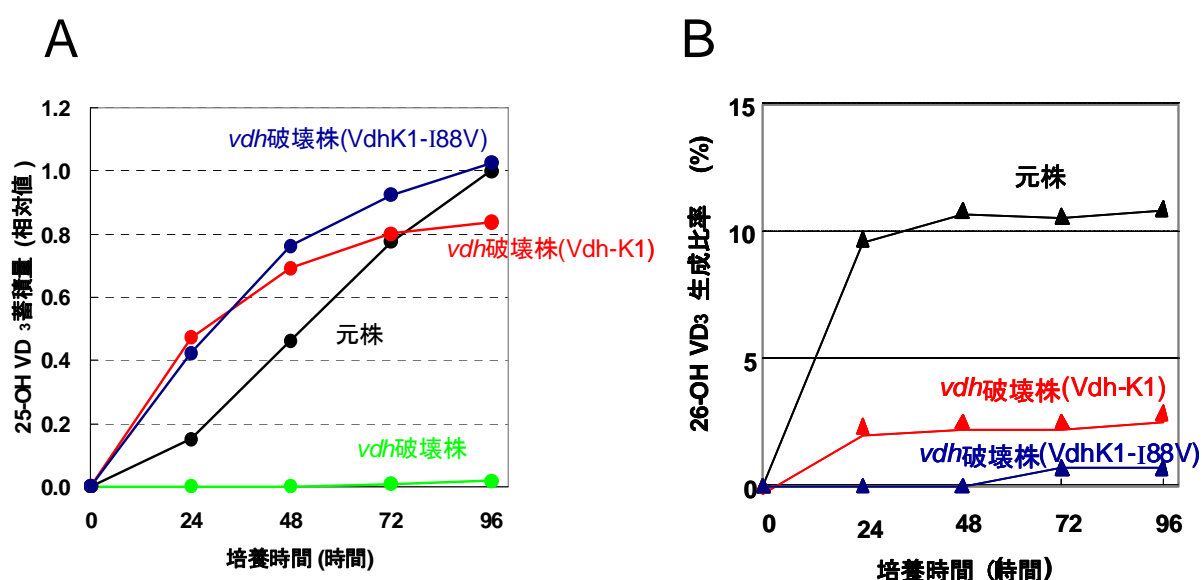


図 3. 高機能化酵素を発現させた *P. autotrophica* による VD3 変換試験

VD3 を基質とした変換試験で 25(OH)VD₃ の生産量 (A) および 26 位水酸化副反応物生成比

率 (B) を示した。

ドラフトゲノム配列情報を利用したビタミンD水酸化に影響を及ぼす遺伝子の探索と利用

VD 水酸化変換菌 *P. autotrophica* のゲノム配列をドラフトレベルで解析した結果、ゲノムは 6.9 Mb の環状ゲノムと 278 kb の環状プラスミドから構成されることが分かった。全配列の GC 含量は 72.8% であった。このゲノムデータから水酸化反応場促進に関わる遺伝子の探索を行うことで、従来の遺伝生化学的手法に比べ迅速な目的候補遺伝子の有効性検証が可能となった。細胞外からの基質取込みを促進することは、変換反応の効率の向上につながる。ゲノムに見出された物質の取り込みや排出に関与するトランスポーター遺伝子を使って機能試験を行ったが、VD 類の排出、取り込みに強く関わるものは認められなかった。そのほか、数種の反応場促進に影響を及ぼすことが推測される遺伝子の探索、有効性の検証を行い、有効な遺伝子を *P. autotrophica* の育種に利用することで最終的に生産性を従来の数倍に高めることができた。

2. 2. 2. 2 Vdh の結晶構造解析 (産総研)

Vdh 大量発現系の構築・結晶化

実験に用いるサンプルを取得するため、最初に組替え Vdh の大量発現系の構築および精製方法の確立を行った。野生型 Vdh (Vdh-WT) は大腸菌もしくは *Rhodococcus erythropolis* を用いて、高活性型 4 重変異体 Vdh-K1 は大腸菌を用いて、それぞれ結晶化に用いる事が可能な十分量の蛋白質の発現に成功した。サンプルは C 末端にヒスチジンタグを融合させて発現させ、Ni アフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製を行い、高純度サンプルの調製を行った。サンプルは約 20 mg/ml にまで濃縮した後、結晶化スクリーニング、および可視紫外吸収スペクトル測定、酵素アッセイ等に用いた。

精製サンプルは、市販の結晶化スクリーニングキット (約 300 条件) を利用し蒸気拡散法によって初期結晶化条件を探索し、得られた初期条件を最適化することで Vdh-WT および Vdh-K1 とともに高品質の単結晶を得る事に成功した。また、基質であるビタミン D₃ (VD₃) および 25 位水酸化ビタミン D₃ (25(OH)VD₃) との複合体構造の解析を行うため、過剰量の基質をサンプルと混合することで複合体を形成させ、上記と同様の手法で結晶化条件の探索を行い、解析可能な単結晶を得た。複合体の形成は、可視紫外吸収スペクトルを測定することで確認した (後述の「高活性化の構造基盤」)。

Vdh の立体構造解析

・構造決定

全ての結晶回折データ収集は、茨城県つくば市の高エネルギー加速器研究機構に設置されているシンクロトロン放射光施設において行った。構造解析は、Vdh が所属する CYP107 ファミリーにおいて構造既知であった P450eryF をサーチモデルとして用いた分子置換法を適用し、解を得ることに成功した。Vdh-WT に対しては二つの異なる結晶系に属する基質フリー状態の構造を、

また Vdh-K1 に対しては基質フリー状態、VD3 複合体、および 25(OH)VD3 複合体の構造解析を行い、全ての構造モデルを精密化し、比較考察に用いた。構造モデルは全て蛋白質構造データベース(Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/>)に登録した(PDB code; 3A4G, 3AH, 3A4Z, 3A50, 3A51)。

・全体構造

構造解析の結果、Vdh の全体構造が明らかになった(図 4)。一般的にフレキシブルであり基質認識に重要な役割を果たすことが多い BC ループや FG ループを含め、ほぼ全ての領域の電子密度が明瞭に観察された。Vdh の立体構造は、これまでに知られている基本的な P450 フォールドを示し、分子中央にはヘムの結合が確認された。Vdh-WT および Vdh-K1 を比較したところ、大きな構造変化が観察された。Vdh-WT はヘム鉄上部の基質結合ポケットが大きく溶媒に露出したオープン構造を形成していたのに対し、Vdh-K1 は FG ヘルックスが約 8Å ほど基質結合ポケット側に移動し、それに伴って基質結合サイトが分子外部の溶媒領域から部分的に遮断されることでクローズ構造を形成していた。基質複合体においては、この基質結合ポケットに VD3 および 25(OH)VD3 に相当する電子密度が観察された。一方、Vdh-WT においては結晶化条件に多量の基質分子を加えた場合であっても、基質に相当する電子密度は観察されなかった。Vdh の結晶構造を既に解析されている他の P450 分子と比較したところ、同じ 107ファミリーに属する P450 PikC に最も相同であった。Vdh-WT (オープン構造)は PikC の基質フリー構造(オープン構造)に、Vdh-K1 (クローズ構造)は PikC の基質結合構造(クローズ構造)に最も相同であり、PikC の基質結合に伴う構造変化は、Vdh-WT と Vdh-K1 の間で観察される構造変化と類似していた。

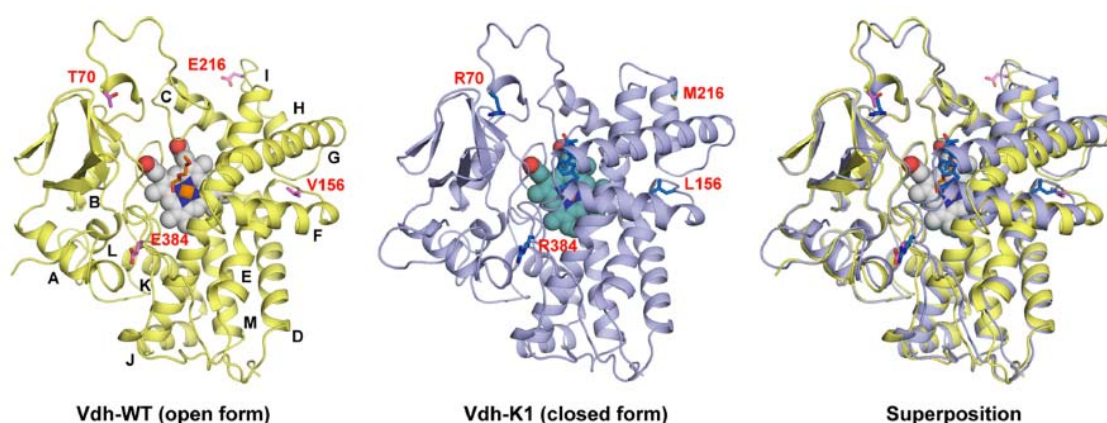


図 4. Vdh-WT および Vdh-K1 の全体構造

Vdh-WT と Vdh-K1 の間で顕著なコンフォメーション変化が観察された。進化工学により Vdh-K1 に導入された 4 カ所の変異を赤で示した。

・高活性化の構造基盤

進化学により取得された高活性型4重変異体である Vdh-K1 は、*in vitro* 再構成系による活性測定の結果、VD₃ に対する2段階水酸化反応のどちらのステップに対しても飛躍的な活性の向上が観察された(表1)。また、可視紫外吸収スペクトル測定により酵素と基質の解離定数を調べたところ、Vdh-WT では基質結合スペクトル変化は観察されず親和性が認められないのに対し、Vdh-K1 は非常に高い基質親和性を示すことが明らかになった(図5)。結晶構造解析の結果も、これらスペクトルアッセイおよび活性測定の結果を支持しており、Vdh-K1 ではクローズ構造へとコンフォメーションを変化させ、基質をへムポケットに取り込んでいることが確認された。基質フリーおよび基質結合状態のどちらに対しても Vdh-WT はオープン構造を、Vdh-K1 はクローズ構造を示したことから、構造の変化は基質結合によって誘導されるのではなく、Vdh-K1 に導入された4カ所の変異によって引き起こされたと考えられた。すなわち、オープン構造とクローズ構造の構造変化の平衡は Vdh-WT においては大きくオープン側に傾いており、この平衡状態は4カ所の変異が導入されることによってクローズ側に移行したと考えられる。Vdh-K1 に導入された変異箇所はいずれも活性部位から大きく離れた場所に位置しており、基質認識に直接関与しているとは考えられない。一方で4カ所の変異のうち3カ所の変異は、それぞれオープン構造を不安定化もしくはクローズ構造を安定化する作用があると推察され、構造変化の平衡状態を移動させる駆動力となりうると考えられた(図6)。

4カ所のそれぞれの変異が基質結合アフィニティ変化にどれくらい寄与するかを調べるため、それぞれの1アミノ酸残基変異体を作製し可視紫外吸収スペクトル測定を行った。結果として、V156L で大きな変化が見られたが、Vdh-K1 ほどの高アフィニティは観察されなかった。その他の3種の変異体は Vdh-WT 同様に基質への親和性はほとんど見られなかった。このような結果から、Vdh-K1 の基質に対する高い親和性は、これら4カ所の変異が協

調的に作用して初めて起こるものと考えられる。

表1 *in vitro* 再構成系による酵素活性の比較

	Vdh-WT	Vdh-K1
VD ₃ 25-hydroxylase activity (mmol/min/mol Vdh)	173.3 ± 10.7 (1.00)*	2,002 ± 361 (11.6)*
25(OH)VD ₃ 1 α -hydroxylase activity (mmol/min/mol Vdh)	253.0 ± 4.5 (1.00)*	6,337 ± 383 (25.0)*

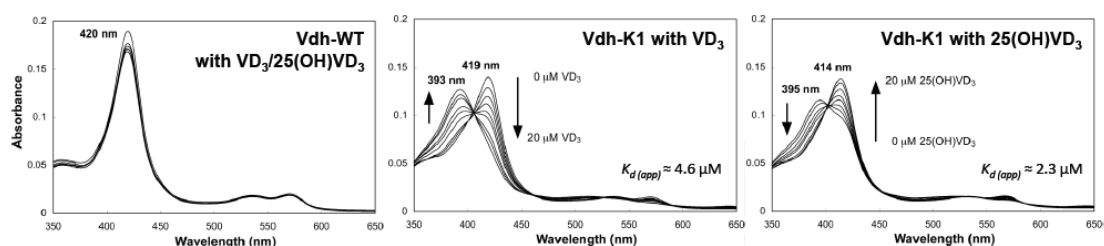


図 5. 可視紫外吸収スペクトル測定による酵素基質間の親和性の比較

Vdh-WT においてはいずれの基質に対してもほとんどスペクトル変化が観察されないが、Vdh-K1 は大きく変化することが明らかになった。スペクトル変化はヘム鉄の電子状態の変化を示しており、ヘム鉄近傍に基質が結合したことを示している。

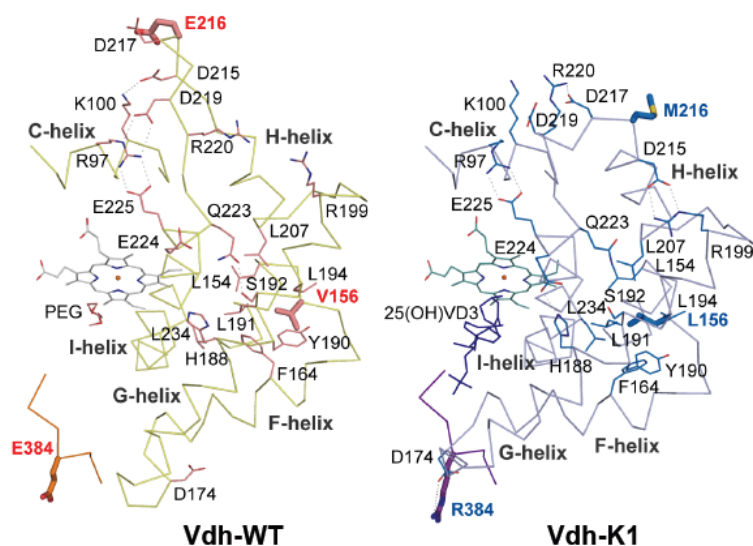


図 6. 構造変化が観察された FG ヘルックスおよび HI ループ近傍

Vdh-K1 に導入された 4 種の変異のうち 3 種を赤で示した。E216M および V156L はそれぞれオープン構造を不安定化させ、E384R はクローズ構造を安定化させる寄与を持つ事が推測される。

・ 2段階連続水酸化を可能とする基質結合メカニズム

Vdh-K1 と基質 VD3 および 25(OH)VD3 との複合体構造解析に成功したため、基質認識の詳細を観察することが可能となった。Vdh はまず VD3 の 25 位を水酸化し、引き続いて 25(OH)VD3 に対して 1 α 位を水酸化する。25 位と 1 位はビタミン D 骨格の両端に位置するため、酵素のビタミン D 骨格の認識は両者で大きく異なっていることが考えられる。

構造解析の結果、Vdh-K1 に対して VD3 と 25(OH)VD3 の結合は完全に上下が反転しており、VD3 は 25 位側を、25(OH)VD3 は 1 位側をそれぞれヘム鉄に向けるように結合していることが明らかになった (図 7)。これは酵素の二段階水酸化反応の結果と矛盾しない。VD3 複合体と 25(OH)VD3 複合体の構造を重ね合わせたところ、両者の間に酵素構造の差異は全く認められなかった。つまり、Vdh-K1 で観察されたクローズ構造は、ビタミン D 骨格を上下反転した二つの状態で認識可能であることが示唆される。しかかしながら実際には、VD3 に対して最初に 1 位が水酸化されることはない。これは、疎水性の高い 25 位側を溶媒に接する分子の外側 (ヘムから遠い基質結合ポケットの入り口側) に向けることがエネルギー的に不安定であることに起因すると推測される。一方、25(OH)VD3 複合体構造において 25 位水酸基は溶媒の水と水素結合を形成しており、1 位をヘム側に向けた状態でも安定な結合が可能になると考えられる。

上下が反転した全く異なる二種の基質結合状態が存在するにも関わらず、酵素は全く基質の形状に応じた構造変化を示さない。このことは、Vdh-K1 における活性の向上が基質特異性の向上によるものではないことを示唆している。上述の通り、Vdh-K1 に導入された 4 カ所の変異は全て基質認識に直接関わるができない場所であり、おそらくオープンとクローズ構造間の平衡状態を大きくクローズ側にシフトさせる役割を果たすことで、そもそもの酵素の性能向上を可能にしたと考えられる。多くの P450 分子が基質の取り込みに際してオープンとクローズ間の構造変化があることが分かっており、このような構造状態間の平衡を調整する変異を選択することで、どのような P450 に対しても基質の種類に関係なく活性を向上させることができる可能性が示された。

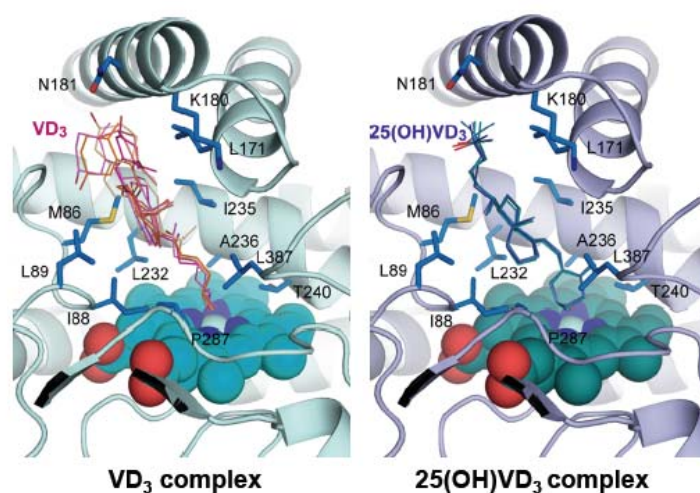


図 7. Vdh-K1 基質複合体の基質結合ポケットの詳細

VD₃ および 25(OH)VD₃ は互いに上下反転した方向で酵素に結合しており、水酸化される部位をヘム鉄近傍に接近させていた。一方、基質がどちらの向きで結合しても酵素の構造には全く変化は観察されなかった。

・副反応低減変異体作成に向けた情報取得

Vdh-K1 において基質複合体構造の解析に成功したため、酵素と基質間の原子間相互作用の詳細情報を取得する事ができた。この情報をもとに、炭素 25 位近傍に存在する Vdh のアミノ酸残基を 4 種類選択し、26 位水酸化の副反応を低減させる変異導入箇所の候補とした。結果、Vdh-K1 にさらに I88V の変異を導入した 5 重変異体を用いる事で、26 位水酸化体が検出されない VD₃ 変換が可能になった（前述「高機能化酵素の取得」）。

レドックスパートナー蛋白質の構造解析

P450 酵素が活性を発揮するためには、適切な電子伝達蛋白質が必要となる。異宿主における生体変換を可能とするためには、酵素反応が適切に進むためのレドックスパートナーの探索および電子伝達の効率化が不可欠となる。今回、Vdh に電子を受け渡すことが可能な *Rhodococcus* 由来 ThcCD および *Acinetobacter* 由来 AciBC 蛋白質（フェレドキシンおよびフェレドキシン還元酵素）を大量発現させ、結晶化および構造解析を行い、電子伝達に重要なアミノ酸残基の解析および変異導入による電子伝達のされなく効率化を目指した。これまでにフェレドキシン還元酵素（ThcD および AciC）の構造解析に成功したが、鉄硫黄クラスターを含むフェレドキシンの結晶を得る事ができなかったため、構造モデルを利用した変異導入による電子伝達の効率化に関する実験は実施することができなかった。

ナイシン処理細胞による変換実験

Vdh の構造解析が予定より早く完了したため、研究後半において、VD₃ の微生物変換効率を高める研究を行った。これまでの研究から、VD₃ の水酸化体生産効率は、宿主細胞内に発現する Vdh やレドックスパートナー分子の細胞内発現量と比例せず、あるレベルで頭打ちになることを確認している。VD₃ は水に難溶性のため、シクロデキストリン(CD)に包接し反応液への溶解度を高めているが、細胞内への VD₃ 移行は CD から乖離して拡散により進むと考えられており、細胞内の VD₃ 濃度を高めることは容易でない。従って、VD₃ 水酸化反応の効率改善には宿主細胞における VD₃ 透過性の改善が重要であることが示唆された。そこで標的細胞 (*R. erythropolis* JCM3201 株)の細胞膜に抗菌物質 nisin により孔を形成させ、VD₃-CD 複合体がその孔から細胞内へ移行することで VD₃ 水酸化効率の上昇を期待し研究を展開した。

nisin は食品添加物として認定されている抗菌物質で、その作用機序は詳細に解析されている。実際、*R. erythropolis* JCM3201 株に nisin を添加すると細胞膜上に孔が形成され 99%以上の細胞は致死する。この時、細胞は溶菌することなく再回収できることから、nisin 処理した細胞の形態は安定に保持されていると予想された。また細胞内タンパク質の漏出も確認されなかったことから、細胞内に過剰発現したタンパク質がそのまま保持できると考えられた。次に、nisin 処理した細胞に対し、モデル基質として過酸化水素によって発光する緑色化学発光 γ -シクロデキストリン (Green Chemi-luminescence CD, GCCD) を添加し、その細胞内取り込みを調べると、nisin の濃度、処理時間に依存して高くなり、nisin 孔が CD の通り道として利用可能であることを確認した。

そこで、実際 VD₃ を包接させた CD 複合体を使用して水酸化反応の条件検討を行った。その結果、nisin 処理した細胞は、生細胞の場合とは異なり反応系に NADH 再生系を要求すること、そして細胞内に安定なレドックスパートナーを発現させておくことが重要であることが判明した。

上記条件を満たした反応系を用いて nisin 処理細胞の VD₃ 水酸化体生産性を検討した。その結果、nisin 処理細胞は、同未処理細胞に比べて数倍高い水酸化効率が得られることが確認された。更に nisin 処理した細胞を、16 時間の反応を 1 サイクルとした繰返し反応を行うと、1 回毎の VD₃ 水酸化率は最大 90%近くまで向上させうることを見出した。また、4 サイクル反応後の VD₃ 水酸化体総収量は、nisin 未処理細胞に対し約 6 倍高くなることを見出し、生細胞を利用して得られる結果より遙かに高効率な水酸化生産系の構築に成功した(図 8)。

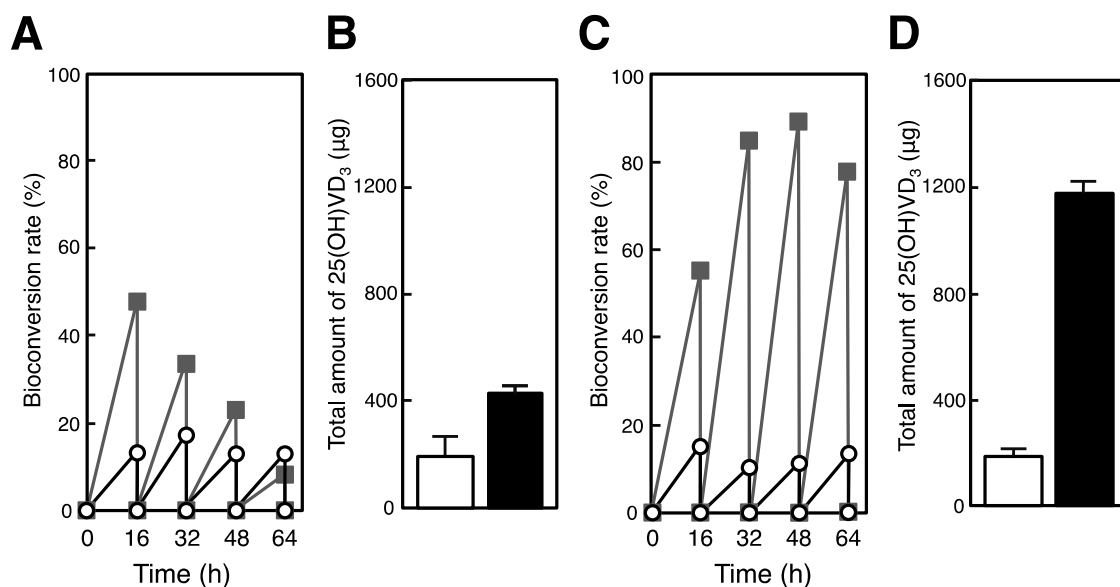


図 8. ナイシン処理した *Rhodococcus erythropolis* 細胞を用いた 25(OH)VD₃ 水酸化変換の繰り返し実験

nisin 処理した細胞を用いて 16 時間を 1 サイクルとした繰り返し反応を行い各反応時間における 25(OH)VD₃ 水酸化効率を調べた (■)。同効率は、細胞内安定性の低いフェレドキシン (ThcC) をレドックスパートナーとして発現した細胞では時間と共に低下する (A)。一方、細胞内安定性の高いフェレドキシン (AciB) をレドックスパートナーとして発現した場合には、変換効率を高く維持できる (C)。生細胞による変換効率は、反応サイクルを通して大きく変動しないが低いレベルで維持される (○)。25(OH)VD₃ の生産量は、生細胞 (open bar) に比べて nisin 処理細胞 (closed bar) が高く、ThcC を発現した場合より (B)、AciB を発現した方が著しく高くなる (D)。

以上のことより、Vdh とその基質複合体の構造解析より、VD₃ 水酸化反応機構を原子レベルで解析・応用することを可能とする成果が得られた。また、nisin を利用した VD₃ 水酸化反応効率を向上させる反応系の構築にも成功した。これらの成果により、VD₃ のみならず、他の難溶性物質を基質とした微生物変換、あるいは P450 を介した微生物変換系に有用な情報を取得出来たと考えられる。

2. 2. 2. 3 Whole cell catalyst 内外における酵素反応場の解析・制御技術の開発（大阪大学）

細胞内反応場構成素子の研究

P450活性に影響を及ぼす宿主細胞遺伝子の同定・制御を目的として、大腸菌1遺伝子破壊株ライブラリーを宿主とした活性向上株のスクリーニングを行った。大腸菌BW25113由来の1遺伝子破壊株約4,000からなるKeio collectionを宿主とし、これらに*Streptomyces coelicolor*由来のP450であるCYP154A1遺伝子を導入・発現させた。7-エトキシマリンの脱エチル化活性を指標としたスクリーニングを行った結果、約80の活性上昇株が見出された。ついで、再現性を確認するために試験管スケールでの2次スクリーニングを実施した。この結果、野生株と比較して、生育速度に大きな違いがなく、なおかつ相対活性が1.5倍以上に上昇した4株を選抜した。野生株から再度相応する遺伝子破壊株を作成し、結果の再現性を評価したところ、これらのうち3株($\Delta cpxA$, $\Delta gcvR$, $\Delta glnL$)においてCYP154A1活性の増大が認められた。再現性が見られなかった1株についてはターゲット遺伝子以外の部分に生じた自然発生的な変異がP450活性に影響を及ぼしたものと考えられる。

多重遺伝子破壊による活性向上を目指したところ、 $\Delta cpxA/\Delta glnL$, $\Delta glnL/\Delta gcvR$ の組み合わせにおいて、単位菌体量当たりの比活性が、一重変異株の1.5倍程度に向上した。しかし、これは主として生育の悪化によるものであり、単位培養液量当たりの活性にほとんど変化が見られなかった。なお、 $\Delta cpxA/\Delta gcvR$ の二重破壊株は取得できず、両者がともに欠損することにより大腸菌に致命的な影響が及ぶものと考えられる。従って、3重変異株の作成は行っていない。

次にここまで得られた3つの1遺伝子破壊株を用いて、CYP154A1以外のP450に対する活性向上効果の有無を検証した。この結果、 $\Delta gcvR$, $\Delta glnL$ の2株における活性向上は、CYP154A1にのみ特異的であったのに対して、 $\Delta cpxA$ はアッセイを行った全てのP450反応 (*Streptomyces* sp. TM-7由来BoxAによるジクロフェナク水酸化反応、*Pseudonocardia autotrophica*由来VdhによるビタミンD3の25位水酸化反応、および*Bacillus megaterium*由来BM3 F87V変異型P450によるジクロロフェノール水酸化反応)において、野生株に比べ、それぞれ7.8、3.9、4.6倍の相対活性を示した(表2)。

これらのP450アッセイはいずれも転写制御にラクトース誘導型プロモーター (*tac*およびT7プロモーター)を用いたものであった。次に熱誘導型プロモーターである P_{rP_L} プロモーター制御下にBM3 F87Vを連結したベクターを用い、プロモーター種の違いによる影響を調査した。この場合、野生株、 $\Delta cpxA$ の両者において、BM3 F87V活性に大きな違いは認められず、 $\Delta cpxA$ におけるP450活性の向上はラクトース誘導型プロモーターの転写活性増大に起因することが示唆された(表2)。 $\Delta cpxA$ 内におけるT7プロモーター下からのBM3 F87Vの転写量をreal-time RT PCRで定量化したところ、野生株を宿主とした場合に比べ、mRNA量が100倍程度向上していることが明らかとなった。

CpxAは大腸菌内に約30ペアが存在するとされる2成分シグナル伝達経路のセンサーキナーゼの1つである。CpxAは、折りたたみ不全タンパク質蓄積など、膜ストレスと総称される一連のストレスを感知し、カウンターパートナーであるCpxRのリン酸化を通じて、各種のストレス応答タンパク質の転写調節を行う。本シグナル伝達経路(Cpx経路)の活性化により転写が促進される*degP*の発現量を定量することでCpx経路の活性化をモニターしたところ、野生株においてはP450発現時にのみ同経路が活性化されていることが確認された。大腸菌ではCpxAにより感知される膜ストレス存在下でラクトースやプロリンなどの能動輸送が抑制されることが知られている。これに従って考察すると、*cpxA*を欠損させることにより、膜ストレスによって引き起こされるラクトースの輸送抑制が解除をされ、転写誘導物質であるラクトースの細胞内濃度が高まり、この結果、P450転写量が増大した、という一連の推察を行うことができる。一方で、 $\Delta cpxR$ を宿主とした場合、 $\Delta cpxA$ と同様の

活性向上効果は認められず、上記の推察の是非によらず CpxA の欠損による活性向上は本来のカウンターパートナーである CpxR を介さないクロストークによって引き起こされていることが示唆された。

表2. $\Delta cpxA$ 株を宿主とした各種P450の酵素活性

P450	Promoter	Total activity		Specific activity		Total relative activity ^a
		(nmol/h/ml culture)		(nmol/h/mg dry cells)		
		Wild type	$\Delta cpxA$	Wild type	$\Delta cpxA$	
CYP154A1	<i>tac</i>	2.20 ± 0.17	4.05 ± 0.30	0.27 ± 0.03	0.53 ± 0.05	184
	T7	2.31 ± 0.18	5.68 ± 0.33	0.30 ± 0.03	0.77 ± 0.09	246
BoxA	T7	1.64 ± 0.09	13.0 ± 0.94	0.25 ± 0.02	2.40 ± 0.19	785
Vdh	T7	27.8 ± 1.94 ^b	109 ± 11.0 ^b	5.25 ± 0.33 ^b	21.1 ± 1.70 ^b	3.94
BM3 F87V	T7	34.1 ± 1.91	156 ± 12.6	6.93 ± 0.47	34.2 ± 3.13	461
	P _R P _L	54.2 ± 4.93	46.1 ± 5.11	9.25 ± 1.01	8.48 ± 0.66	85

^a 野生株を宿主とした時の活性を 100%とした CpxA 破壊株の相対活性

^b × 10⁻³

非水環境下での物質生産系の研究

有機溶媒耐性細菌として発見・単離された *Rhodococcus opacus* B4 は疎水性の高い細胞表層構造を有し、湿潤状態で有機溶媒に分散・けん濁できるユニークな特性を示す。本菌を宿主として利用することにより、水をほとんど含まない有機溶媒中における微生物変換反応を実施した。種々の有機溶媒に *R. opacus* B4 の湿菌体をけん濁し、30°C にて 1~5 日間、振とうした後の菌体の生存率をコロニーカウンティングにより測定した。有機溶媒の微生物への毒性は、水/オクタノール分配係数である $\log P_{ow}$ 値に相関があることが知られている。この値が小さい（水に分配しやすい）有機溶媒ほど生物毒性が高いとされるが、得られた結果は、おおむねこの $\log P_{ow}$ 則に従ったものであった。*R. opacus* B4 は $\log P_{ow}$ が 4 を超えるような有機溶媒中において、少なくとも 5 日間の生存が可能であった（図 9）。また、各溶媒中において本菌中で発現した酵素が難水溶性物質の変換を触媒しうるかを調査した。発現用プラスミドベクターに *R. opacus* B4 自身が有するベンゼンジオキシゲナーゼ（BnzA）遺伝子を導入し、これを構成的に発現させた組換え株を作成した。変換反応は BnzA によって触媒されるインドールからのインジゴ生産をモデルに行った。結果は図 9 のとおりであり、各有機溶媒中での菌体の生存率と生産性に有意な相関は見られず、ビス(2-エチルヘキシル)フタル酸（BEHP）中にて良好な生産性が見られた（図 9）。

BnzA は補酵素として NADH を要求することから、持続的な反応のためには補酵素の再還元が必要である。NADH などの再還元は炭化水素の異化代謝を通じて行われることから脂溶性炭化水素としてオレイン酸を選択し、*R. opacus* B4 による非水条件下での代謝試験を行っ

た。この結果、水を含まないBEHP中においても *R. opacus* B4はオレイン酸の消費を示し、また、オレイン酸の添加によりインジゴ生産能の持続性が向上することが確認された (図 10)。

また、好熱性微生物由来の耐熱性酵素の多くが有機溶媒などの変性作用に対しても優れた耐性を示すことに着目し、好熱性細菌である *Thermus thermophilus* HB27由来のアルコー

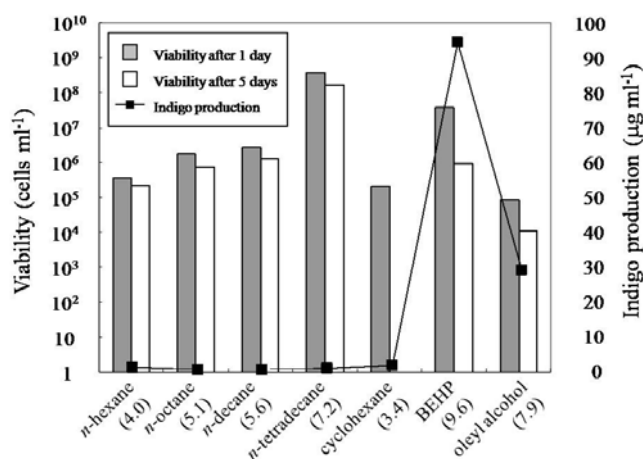


図 9. 有機溶媒中における *R. opacus* B4 の生残数およびインジゴ生産。初期菌体濃度は 2.4×10^9 cell/ml。括弧内の数字は各溶媒の $\log P_{ow}$ を示す。

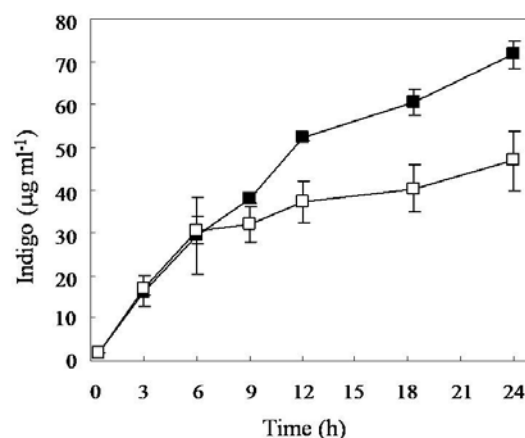


図 10. BEHP 中での *R. opacus* B4 によるインジゴ生産。反応液に 10 mg/ml のオレイン酸を含む場合 (■)、含まない場合 (□) で試験を行った。

ルデヒドロゲナーゼ (ADH) を発現させた *R. opacus* B4 による芳香族ケトンの還元反応を実施した。反応は目的酵素の最適温度である 70°C にて実施した。このため菌体は死滅しているが、その生死により有機溶媒中への分散性に顕著な違いは見られなかった。2,2,2-トリフルオロアセトフェノン (TFAP) から \cdot - (トリフルオロメチル) ベンジルアルコールへの還元反応をターゲットとし、補酵素再生反応として同じく *T. thermophilus* HB27 に由来する別の ADH によるシクロヘキサノールの NAD^+ 依存的酸化反応をカップリングさせた。2つの ADH を共発現させた *R. opacus* B4 を TFAP とシクロヘキサノールの等モル混合液中に直接分散させることにより溶媒成分を全く含まない反応液中での変換を試みた。この結果、12時間の反応でモル変換率約60%、最終生産物濃度 510 mg/mL という変換効率を示すことができた (図 11)。

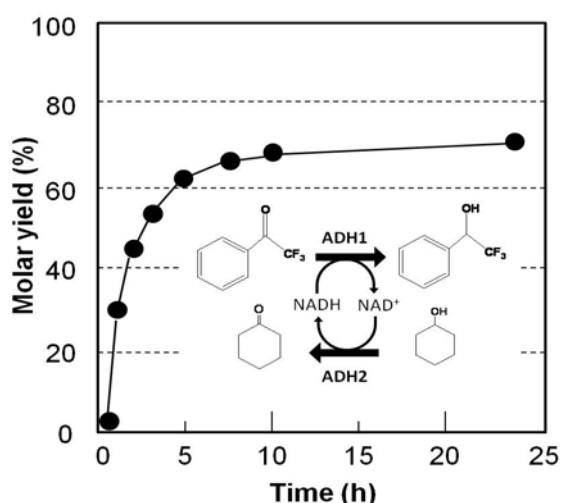


図 11. *T. thermophilus* HB27 由来 ADH を発現させた *R. opacus* B4 による TFAP 還元反応

一方、総体積の10%程度の少量の水を含む有機溶媒中において、*R. opacus* B4 の菌体は

水/有機溶媒界面に偏在し、water-in-oil型の安定なエマルジョンを形成することを見出した。この状態で*R. opacus* B4は、水、有機溶媒のそれぞれに溶解した物質に対して高い接触効率を維持していると期待できる。上述のインジゴ生産の系で補酵素再生のための還元力供給源をオレイン酸から水溶性のグルコースに置き換えた結果、インジゴ濃度は217 $\mu\text{g/mL}$ とオレイン酸を用いた場合の約3倍にまで向上した。

以上の成果より、親油性細菌である*R. opacus* B4を用いることによって、水を全く、あるいはほとんど含まない反応系においても微生物変換反応が実施可能であることが実証された。一方で、有機溶媒相に吸着する本菌の特性は、従来の水/有機溶媒二相反応系においても有機相中の難水溶性基質との接触効率を高く保つ上で有利に働くと期待される。そこで

Pseudomonas putida F1由来のトルエンジオキシゲナーゼを発現させた*R. opacus* B4および大腸菌のそれぞれを触媒とし、二相反応系中での変換効率について比較検討を実施した。この際、モデル反応を基本計画中のインドール酸化によるインジゴ生産からアルキル化ベンゼン水酸化反応へと切り替えた。これは、側鎖アルキル基の炭素鎖数を変化させることで基質の水溶度とこれらの変換能との相関を明確にするためである。有機相としてオレイルアルコールを採用し、水：オレイルアルコール比を変化させた二相反応液中にてトルエン、エチルベンゼン、プロピルベンゼン、およびブチルベンゼンの水酸化を実施した。大腸菌を触媒とした場合、基質の水溶度が低下するにつれて生産物量が低下していくのに対し、*R. opacus* B4使用時には目立った収率の低下は認められなかった(図12)。

親水性細菌である大腸菌は主として水相に分配された基質に対して作用するため、基質の水溶度に強く影響されるのに対し、*R. opacus* B4は有機相中の基質に対する高い接触効率を保持しているためだと推察できる。また、水：有機溶媒比が収率に及ぼす影響について見てみると、大腸菌では有機溶媒濃度が低いほど反応効率が高まるのに対し、*R. opacus* B4の場合、等量の水/有機溶媒混合液にて最大の変換効率を示した。二相反応系における難水溶性基質の水相への分配は両相間の基質濃度勾配がドライビングフォースとなる。従って、大腸菌の場合、有機相の割合が小さく基質濃度勾配が大きくなるほど基質が菌体に供給されやすくなるのに対し、*R. opacus* B4は、この影響を受けず水/有機溶媒間の比界面積

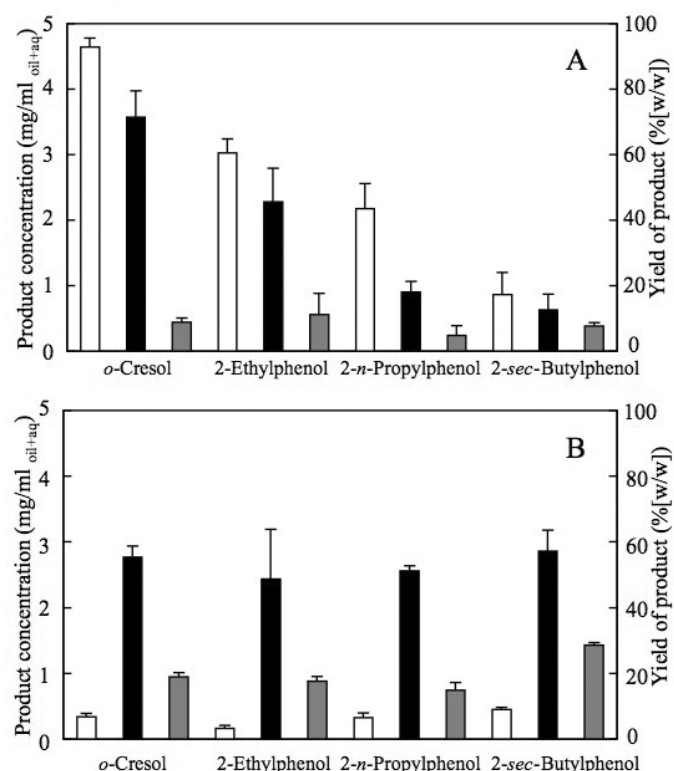


図12. 大腸菌(A)、*R. opacus* B4 (B)を用いた二相反応系におけるアルキルベンゼンの水酸化。それぞれ 10(白)、50(黒)、90%(灰色)容量のオレイルアルコールを有機相として含む反応液中にて変換反応を実施した。

が最大となる等量混合液中にて最大の変換効率を示したものと考えられる。

これらの知見に基づき、水/有機溶媒二相系でのブチルベンゼンの水酸化反応を5-L バイオリアクタースケールで実施した。同反応は分子状酸素を基質とすることなどからも、生産効率を高めるには、通気攪拌速度の向上による酸素供給速度の向上が肝要であることは容易に推察される。しかし、有機溶媒存在下では攪拌による菌体への物理的ダメージが大きくなる上、通気速度の上昇は基質・生成物の揮発が著しくなる。そこで、多孔質型スパージャーを用いることで通気気泡の粒径を小さく保ち、気液比界面積の増大による酸素供給速度の向上を試みた。この結果、30時間の反応で有機相中に9.6 g/L (モル収率86%) の生産物を蓄積させることに成功した。

Rhodococcus opacus B4 の有機溶媒耐性・親油性機構の研究

R. opacus B4における有機溶媒耐性メカニズムの解明を目指し、本菌より有機溶媒感受性変異株の取得を試みた。変異導入には共同実施先である産総研・田村グループにより開発されたトランスポゾンベクターであるpTNR-0riTを用いた。トルエン蒸気供給下における生育能を指標としたスクリーニングの結果、生育が著しく低下した複数の変異株が取得された。プラスミドレスキューによる変異点同定を行ったところ、いずれの変異株でも*R. opacus* B4 の内在性環状プラスミド上へトランスポゾンが導入されており、本プラスミドが有機溶媒耐性に関与している可能性を強く示唆する結果が得られている。一方でスクリーニング期間を通じて野生型*R. opacus* B4のトルエン耐性が大きく低下するといった問題が見られた。産業分野への応用を念頭においた場合、表現型として著しく不安定な本菌の有機溶媒耐性を活用するという考えは現実的ではない。また物質生産を目的とした上述の研究において、本菌の親油性は菌体の生死に左右されないという結果が得られたことから大阪大学では平成22年度より有機溶媒耐性に関する研究を中断した。

一方、*R. opacus* B4の親油性機構を研究するにあたり、細菌の細胞表層疎水度を定量的に評価する手法の確立を目指した。既報に見られる細胞表層疎水度評価法のうち、bacterial adhesion to hydrocarbon (BATH)、contact angle measurement (CAM)、hydrophobic interaction chromatography (HIC)、glass adhesion test (GAT)の4とおりの方法を用いて、*R. opacus* B4、*R. erythropolis* PR4、*Pseudomonas putida* T57、ならびに大腸菌JM109の4つの細菌の疎水度測定を実施した(表3)。用いた測定法のうちBATH、HIC、GATは、それぞれ有機溶媒、アルキル化セファロース樹脂、シラン樹脂コートされたスライドガラスという疎水性担体への菌体の吸着性を指標とするものである。これらの方法を用いた場合、いずれも*R. opacus* B4のみが顕著に高い疎水性を示す結果が得られた。一方、CAMはメンブレンフィルター上に作成された細菌の層(ローン)が水滴をはじく力をローンと水滴の接触角により定量化するものであり、定義上の「疎水性」、すなわち水(極性溶媒)との親和性の低さを定量する上では最も適当な方法とされている。CAMによる疎水度測定では、*R. opacus* B4に加え*R. erythropolis* PR4が高い疎水度を示す結果が得られた。*R. erythropolis*

PR4におけるCAMとその他の方法により測定された疎水度の違いを説明するものとして、BATH、HIC、GATにおける各種担体への吸着度には菌体の表層疎水度のみでなくゼータ電位が大きく関わっていると考えられる。*R. opacus* B4と*R. erythropolis* PR4のpH 7におけるゼータ電位を測定したところ、前者はニュートラルな値を示したのに対し、後者は-18 mVという負の電荷を有することが明らかとなった。水中に分散した有機溶媒の油滴は負に帯電しているとの報告もあり、これらから有機溶媒への吸着度、すなわち親油性にはCAMによって測定される疎水性の他にゼータ電位が大きく関わることが示唆された。一方、*R. erythropolis* PR4は、二相反応液中における有機相への吸着度は低いものの、*R. opacus* B4と同様に湿潤状態で有機溶媒中に分散することができる。すなわち有機溶媒中での分散性には菌体のゼータ電位は寄与せず、疎水度のみが重要なファクターとなると考えられる。

表3. 各法により定量した細菌の細胞表層疎水度

	BATH (%) ^a	CAM (°)	HIC (%) ^b	GAT (%)	ζ potential (mV)
<i>R. opacus</i> B4	98	118	79	64	-1.7
<i>R. erythropolis</i> PR4	24	132	0	14	-18
<i>E. coli</i> JM109	13	21	18	6	-16
<i>P. putida</i> T57	1.1	ND ^c	17	6	0.2

^a n-ヘキサデカンへの吸着度

^b オクチルセファロースビーズへの吸着度

^c 水滴が細菌ローンに浸透してしまうため測定不能

2. 2. 2. 4 マルチコンポーネント酸化酵素系の反応場制御基盤技術の開発 (広島大学)

Rhodococcus opacus B4 株の有機溶媒耐性機構の解明

本研究では、有機溶媒耐性細菌 *R. opacus* B4 株の有機溶媒耐性機構の解明を行った。[シグマ因子 SigB の関与] 細菌の有機溶媒耐性機構の解析はほぼグラム陰性細菌でのみ行われ、*R. opacus* B4 株が含まれるグラム陽性細菌ではほとんど解析されていなかった。*Bacillus subtilis* のアルコール耐性の解析から、環境ストレス対応型のシグマ因子が有機溶媒耐性に関与しているのではないかと予想が立てられていたが、その実験的検証は行われていなかった。そこで、*R. opacus* B4 株を対象にその検証を行った。*R. opacus* B4 株のゲノム情報から、環境ストレス対応型のシグマ因子と予想される SigB を割り出した。そして本事業で開発したノンマーカークローン破壊法を用い、*R. opacus* B4 株の *sigB* 破壊株を作成した。*sigB* 破壊株は親株と比べ温度ストレスやエタノールストレスに感受性になっており、SigB が確かに環境ストレス対応型のシグマ因子であることが分かった。得られた *sigB* 破壊株は、デカン、テトラデカンやキシレンなどには親株と同等の耐性を示す一方、特定の有機溶媒 (トルエン、ヘキサン、シクロヘキサン) に対して感受性になった。以上

のことから、SigB が *R. opacus* B4 株の有機溶媒耐性に関与していることが分かった。

[ミコール酸合成系の関与] SigB はシグマ因子であるので、SigB そのものが直接有機溶媒耐性に関与しているのではなく、SigB 支配下の遺伝子産物が有機溶媒耐性に寄与していると考えられる。まず、有機溶媒と細胞の界面にあたる細胞表層の成分が有機溶媒耐性に重要であると考え、Actinobacterium 類特有の長鎖脂肪酸ミコール酸について検討を行った。*R. opacus* B4 株のゲノム情報から、ミコール酸合成系の候補遺伝子 *fabI* と *fabF1* を選抜した。このうち、*fabF1* の転写は *sigB* の破壊で減少することが分かった。有機溶媒耐性が低下した *sigB* 破壊株に *fabI* と *fabF1* を導入したところ、いずれの形質転換株も特にヘキサンへの耐性が復帰することが分かった(図 13)。それぞれの株をヘキサンに曝露

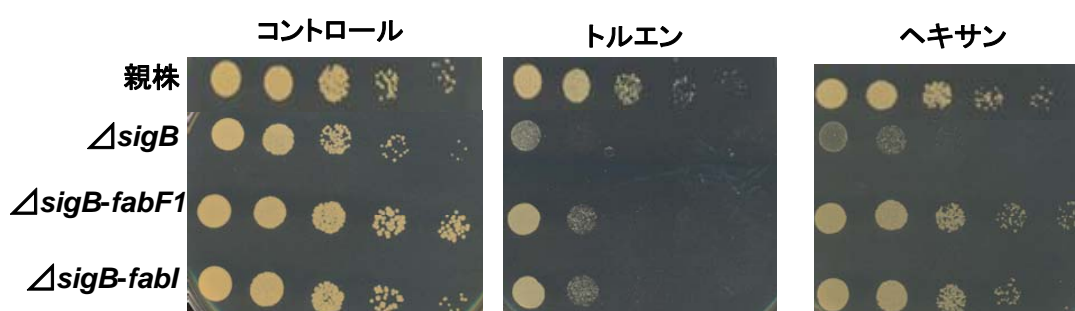


図 13. *R. opacus* B4 株、*sigB* 破壊株 ($\Delta sigB$) および *sigB* 破壊株に *fabF1* および *fabI* を導入した株 ($\Delta sigB-fabF1$ および $\Delta sigB-fabI$) のトルエン、ヘキサン耐性

TSB 培地で前培養した菌株を 1/10 ずつ段階的に希釈した後、TSB 寒天培地上にスポットした。その寒天培地を有機溶媒の蒸気に曝露して培養した。

した後、細胞内のヘキサン蓄積量を GC で定量したところ、*sigB* 破壊株で有意に蓄積量が増加していた。この蓄積は、*fabI* および *fabF1* 導入で親株程度に低下した。ミコール酸を抽出して TLC 分析したところミコール酸量自体は *sigB* 破壊で変化していないことから、*sigB* 破壊によりミコール酸組成が変化し、ヘキサンやトルエンが透過しやすくなったため、それら有機溶媒に対する耐性が低下したと考えられる。

[排出ポンプの関与] グラム陰性細菌での解析から、細胞膜に存在する排出ポンプが有機溶媒耐性で重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。しかし、グラム陽性菌ではまったく検討されていない。*R. opacus* B4 株のゲノム情報を調べると多剤耐性排出ポンプ遺伝子の候補が 32 見出された。定量的 RT-PCR により親株と *sigB* 破壊株での転写を調べたところ、*efp21*、*efp22*、*efp23* および *efp24* 遺伝子の転写が *sigB* の破壊により低下することが分かった。そこで、これら遺伝子を *sigB* 破壊株に導入してヘキサンおよびトルエンに対する耐性を調べたところ、*efp21* および *efp22* の導入でヘキサンおよびトルエン耐性が復帰することが分かった(図 14)。一方、*efp23* と *efp24* を導入しても耐性

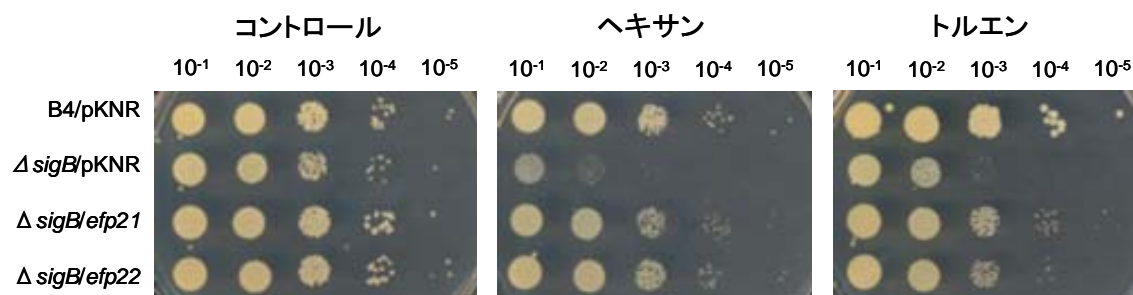


図 14. *R. opacus* B4 株 (B4/pKNR)、*sigB* 破壊株 ($\Delta sigB/pKNR$) およびその *efp21* および *efp22* 遺伝子導入株 ($\Delta sigB/efp21$, $\Delta sigB/efp22$) のヘキサン、トルエン耐性 pKNR は空ベクター。

の復帰は見られなかった。*efp21* および *efp22* は major facilitator superfamily タイプの排出ポンプをコードしている。これら遺伝子産物が本当に排出ポンプの機能を持つかを検討するために、親株 (B4/pKNR)、*sigB* 破壊株 ($\Delta sigB/pKNR$)、排出ポンプ遺伝子導入株 ($\Delta sigB/efp21$, 22) をヘキサンおよびトルエンに曝露した後、菌体内に蓄積したヘキサンおよびトルエンをクロロホルムで抽出し、GC で定量した (図 15)。その結果、*sigB* の破壊により、ヘキサンおよびトルエンの蓄積量は親株の 5~6 倍に増加することが分かった。また、*sigB* 破壊株に *efp21* および *efp22* の導入により、ヘキサンおよびトルエンの蓄積量は親株と同等か (*efp22*) それ以下 (*efp21*) になった。この結果から、Efp21 および Efp22 はヘキサンおよびトルエンの排出ポンプとして機能していることが強く示唆された。

以上、本研究を通じ、グラム陽性細菌の有機溶媒耐性においてミコール酸合成系および排出ポンプが関与していることを世界で初めて明らかにした。

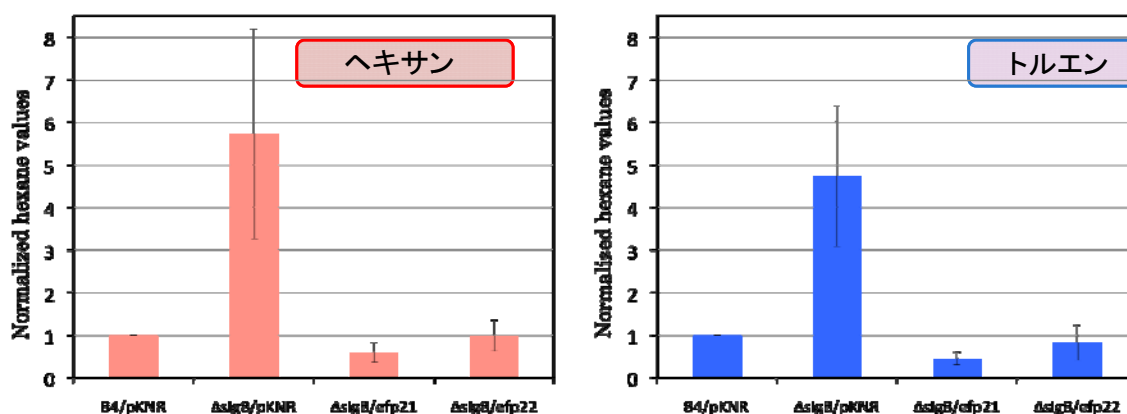


図 15. *R. opacus* B4 株およびその変異株におけるヘキサソおよびトルエンの細胞内蓄積量

各株をヘキサソおよびトルエンにお直接曝露した後、細胞内に蓄積するヘキサソ、トルエンをクロロフォルムで抽出し、GC で定量した。

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

区分 年度	特許出願			論文		その他外部発表（プレス発表等）
	国内	外国	PCT [※] 出願	査読付き	その他	
H18FY	0件	0件	0件	1件	1件	6件
H19FY	0件	0件	0件	3件	2件	15件
H20FY	1件	0件	0件	3件	1件	11件（プレス発表2件含む）
H21FY	1件	0件	0件	4件	2件	11件
H22FY	0件	0件	0件	5件	1件	7件

（※ Patent Cooperation Treaty : 特許協力条約）

2. 2. 3 高効率酵素設計のための酵素反応シミュレーション技術の研究開発

(日本電気株式会社)

従来からのランダム変異などによる酵素の高効率化手法と相補的に、そして大きく加速するために、分子シミュレーションによる分子設計手法の開発が重要である。そのために、新しい分子シミュレーション理論の構築により酵素反応機構を解明し、アミノ酸置換に伴う活性化自由エネルギーなど化学反応に関わる変化を定量的に予測することによって、部位特異的変異手法を用いて効率的酵素を実現する基盤技術を構築した。具体的なターゲットであるメルシャン社のP450に関しては、目標生成物の生産を効率化し、かつ副生成物を押さえるようにP450のアミノ酸配列を置換することが目的である。

この目的を達成するために、本研究では複数の異なる分子シミュレーション手法の開発を行った。まず、反応効率を決定するものは遷移状態であり、その電子状態を解明できる高度な分子軌道法であるCASSCF法やCASSCF-DFT法の基本的なモジュールの開発・整備を行って十分な高い性能が得られた。第二に、のぞましいアミノ酸配列を決めるには、目標生成物や副反応物とP450の複合体構造に基づいて、目標生成物のドッキングを邪魔することなく、副反応物のドッキングを邪魔するようなアミノ酸配列であり、そのために必要となる反応中間体に対する高性能の複合体モデリング技術やスコアリング技術の開発を行った。第三に、シミュレーション評価と有用性実証のためにラマン分光取得システムの開発を行った。

メルシャン社の P450 に関しては、まず、酵素反応メカニズムの解析を行った。①基質結合過程、②水酸化反応、③反応生成物解離過程を含む酵素反応の一連の流れに対するシミュレーションを実施し、反応プロセス全体を視覚化することができた。特に、水酸化反応の解析において、P450 の反応活性種と推測されている compound I に対して、2 種類の構造: perferryl-oxo 種と ferryl-oxo 種を考え、反応機構を詳細に検討した結果、P450 の反応機構におけるいくつかの謎を解明する手掛かりを得たことは大きな成果である(詳細は、以下のチーム毎の成果を参照)。

変異体設計に関しては、第1段階では、これまでに構築した技術・メカニズム解析に基づいて、メルシャン社による P450VDH に対する変異実験の結果を論理的に理解することを試みた。その結果、活性向上については、構造揺らぎを拡大させる変異、塩橋を形成する変異で効果が説明できた。副反応制御に関しては、立体障害を低減する変異で効果が定量的に説明できた。

次の段階では、P450VDH に対する計算で向上した予測技術と仮説に基づいて、メルシャン社が有するP450の新規基質に対する副反応制御を目的とする計算を行い、7個の変異位置候補を提案した。変異実験の結果、4個で副反応を抑制できることが分かり(約 1/3 に抑制)、成功率は57%であった。ランダム変異に比べて遥かに高く、有効性が実証できた。

2. 2. 3. 1 非経験的分子軌道法(CASSCF 法)による酵素反応シミュレーション基本技術の開発 (日本電気(株))

CASSCF 法の開発:収束性向上ならびに MM/PB 法による部位特異性の解析に活用 CASSCF 法にもとづいて、分子のエネルギーや勾配(原子に作用する力)を計算するコードを開発・整備を

行った。P450 の主要構成要素である鉄ポルフィンは計算難度の高い分子であるが、エネルギー計算の収束性を向上させた結果、計算できるようになった。計算で得られた鉄ポルフィンの電荷部分布を、我々の開発した MM/PB 法(溶媒効果を考慮したエネルギー計算法のひとつ)に活用したところ、P450camphor が樟脳類似分子(ノルカンフォー)を水酸化する反応に関しては、部位特異性の定性的説明が可能になったことが分かり、計算手法の有用性が実証された。メルシャン社の P450 に関しては、共同実施先の産総研で決定されたドッキングモードを出発点として、MM/PB 計算を行い複合体モデルの精密化を行ったが、反応制御の仕組みは P450camphor に比べて遥かに複雑である。QM/MM 法の方法論に関しては、大阪大学(蛋白研)中村教授と NEC とで共同出願されている特許がベースとなっているが、これを補う特許も新たに出願して強化を行った。

妥当な複合体構造の識別能に優れた BBCS 法(Bootstrap Based Consensus Scoring)を開発 精度の高い量子化学計算を行う上で、計算の出発点は蛋白質とリガンドの複合体構造であり、それが間違っていると妥当な計算結果は得られないので、これを精度よく決定することは非常に重要である。初期構造モデルは様々な計算手法を用いれば、多数の候補構造を作成できるが、その中で最も妥当なものを識別することが困難であった。そこで、我々は、情報科学の分野で発展した学習理論を応用したある種の多数決法である BBCS 法を開発した。代表的な蛋白質複合体 100 個に対するテスト計算を行ったところ、BBCS 法を用いれば、従来の多数決法にくらべて、より確実に Robust にドッキング構造として妥当な構造を判別できることが分かった。この成果は、J. Chem. Info. Model. 誌に発表し、また関連特許を出願した。

反応制御のための変異部位予測法の開発 基質と酵素の相互作用をエネルギー成分分割法によって解析する手法を独自に開発した。この手法により、基質のビタミン D3 とそれに接触する P450 のアミノ酸間の立体障害を解析した結果、主反応と副反応では相互作用の特徴が異なることを明らかにし、副反応抑制のための変異部位予測の設計指針を提案した。別種の P450SU-1 に適用したところ、活性向上変異の実験結果が本手法で説明可能なことが分かり、本手法は汎用性があることが示された。

遷移状態の結合配座の構築と副反応率の計算 酵素反応の遷移状態の構造は X 線結晶解析からは不明であるので、自由エネルギー計算および高度量子化学計算で得られたヘムと基質の結合角情報(大阪大学の項を参照)に基づいて、P450 酵素反応の遷移状態の結合配座モデルを構築した(図1)。この結合配座を用いて、計算機上でアミノ酸変異実験(熱力学積分法)を行い、副反応の割合を推算したところ、メルシャン社の実験結果と良好に一致し、シミュレーションの有効性が実証された。

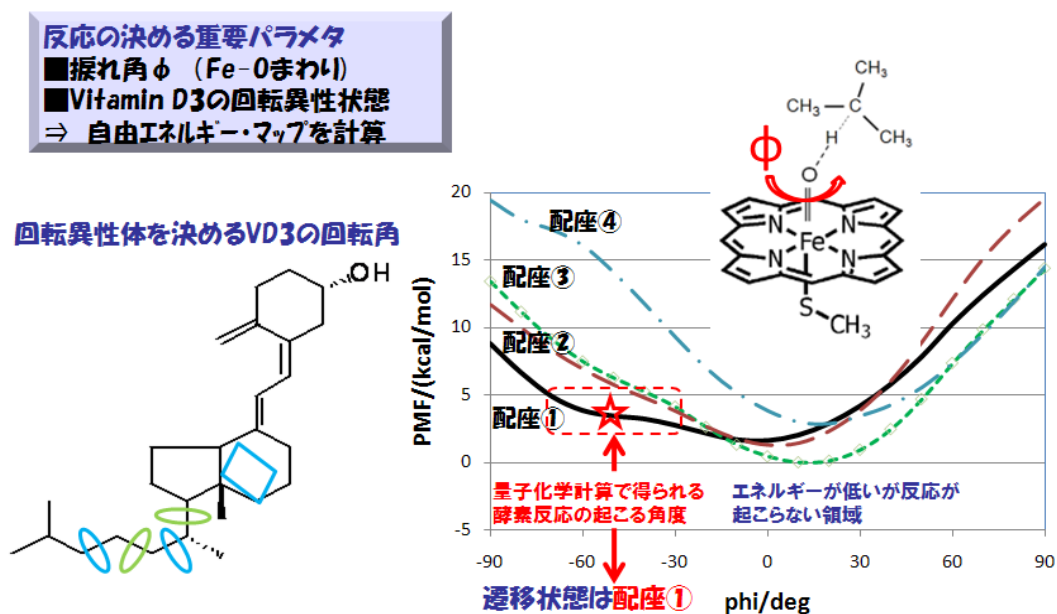


図1 高精度計算による結合モードの探索

結晶構造情報では不明であった進入経路上の変異のメカニズムを提案 ビタミン D3 の想定進入経路上の変異が塩橋形成により活性を向上させるメカニズムを提案した。野生型ではその部位に塩橋形成はありえず、また変異体の結晶構造でも塩橋の形成が見られないが、本研究で実施したダイナミクス計算によって塩橋が生成・消滅を繰り返していることを見出した。ビタミン D3 の放出経路を Steered MD 法(計算機上での仮想的な AFM 測定)を用いて定量的解析を行った。結合経路に沿った自由エネルギー変化を解析した結果、この変異が結合親和性の向上に寄与していることが分かった。

P450 の新規基質に対する変異予測の成功(副反応が従来の 1/3 の変異体の開発に貢献) これまで構築した技術により、メルシャン社保有の P450 の新規基質に対する副反応制御を目的とする計算を行い、7個の変異位置候補を提案した。変異実験の結果、4個で副反応を抑制できることが分かり(約 1/3 に抑制)、成功率は 57%であった。ランダム変異に比べて遥かに高く、構築したシミュレーション技術の有効性が実証できた。

2. 2. 3. 2 密度汎関数法(CASSCF-DFT 法)による酵素反応シミュレーション高信頼化技術の開発(共同実施先:大阪大学 奥村光隆教授)

世界でも最速のCAS-DFT積分コード開発 遷移金属酵素活性中心の電子状態は極めて複雑であり、エネルギー差の妥当な値を得るためには、多配置キャラクターによる取り扱いが必要不可欠になる。我々は、擬縮退電子系の静的相関にはCASSCF(あるいはCASCI)法を残りの動的電子相関部分には密度関数(DFT)法を用いるCAS-DFT法を開発した。さらに、DFT積分の高速化のた

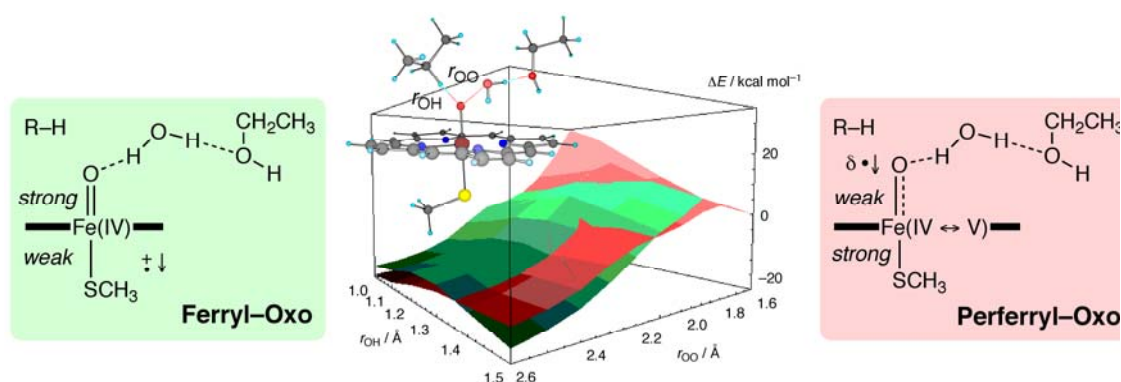


図2 グリッドサーチによる O-O および C-H 結合活性化過程に関するポテンシャル面

め、DFT数値積分の元となる積分公式から再検討し、既存の世界標準であるEuler-Maclaurin-Lebedev (EML)数値積分法と別に、GillとChenが巨大分子用の積分として考案した Gauss-Gill-Chen公式に基づくGauss-Gill-Chen-Lebedev数値積分法の積分コードを開発した。通常のKohn-Sham DFT用テスト版も開発し、GAMESSに組み込み直接DFT数値積分速度を比較し、同程度の精度で3倍近く高速となる事を確認した。実際、Q-Chem, Inc.の汎用プログラムQ-Chemの他に搭載しているプログラムは未だなく、これによりDFT数値積分コアコードの速度に関しては、本研究で使用するCAS-DFT用DFTコードは、世界でも最速のコードの一つになった。

P450触媒サイクルにおける反応中間体の電子・スピン状態の決定 P450の酸素分子活性化過程におけるすべての中間体の最安定電子・スピン構造、化学結合様式、エネルギーダイアグラムを Broken Symmetry (BS)法に基づいた非制限型hybrid DFT計算により検討した。この成果は、Int. J. Quant. Chem.誌 (Vol. 108, 631-650 (2008))にて発表した。

Compound I の電子・スピン状態の決定 P450 の酸化活性種である compound I の電子・スピン状態、化学結合様式、相対安定性を BS 法により検討した。Compound I では、鉄原子の酸化数が4価になった ferryl-oxo (Fe(IV)=O)コアとポルフィリンとシステインアニオンから構成される配位子部分にホールが存在する3スピン系が重要であると考えられている。基底状態では、Fe(IV)=O 3重項とリガンドスピンが弱く相互作用するため、ほぼ縮退した4および2重項状態になる。我々は、基底状態以外に Fe(IV)=O 励起1重項由来の複数の BS 解の電子状態解析も行い、BS 解に含まれるスピン混入を除去して波動関数の解の対称性を回復させる問題を考察した。さらに、ferryl-oxo コアが.....*励起した5スピン系の高スピン(6重項)および中間スピン(4重項)状態や鉄サイトの酸化数が5価になった低スピン(2重項)perferryl-oxo 状態の結合様式も明らかにした。Ferryl-oxo 種の電子状態に関する成果は、Int. J. Quant. Chem. 誌 (Vol. 108, 2991-3009 (2008))および Polyhedron 誌 (Vol. 28, 2044-2052 (2009))にて発表した。

律速段階の反応シミュレーション実施 上記酸化活性種による P450 の水酸化反応の中間体、遷移状態構造、活性化エネルギーを非制限型 hybrid DFT 法を用いて決定し、反応性解析を行った。基質として、メルシャン関連化合物であるビタミン D₃ の側鎖をモデル化したイソブタン・プロパンとリング A 部位のモデル分子を用いた。イソブタンからの水素引き抜き反応の活性化エネルギー

一は第1級より第3級の方が小さくなり、P450 変異体開発で大きな課題となっている酸素原子挿入部位に関する位置選択性を再現した。イソブタンの第1級水酸化反応に関する成果は、Int. J. Quant. Chem.誌 (Vol. 108, 2991-3009 (2008))にて発表した。

4状態モデルに基づいた水酸化反応機構の提案 従来の研究では、Fe(IV)=O3重項とリガンド2重項がスピン結合した4および2重項状態に着目した2状態モデルを中心に議論されていた。我々は、Fe(IV)=O1重項由来の複雑なスピン構造をもつ励起状態の反応性も詳細に調べ、反応の前後での電子状態相関ダイアグラムを明らかにすることで、すくなくとも4つの状態が P450 の反応メカニズムを理解する上で必要不可欠であることを示した。この成果は、Int. J. Quant. Chem. (Vol. 108, 2991-3009 (2008), Vol. 109, 3723-3744 (2009), Vol. 109, 3745-3766 (2009)) 誌にて発表した。

高スピンおよび中間スピン状態による水酸化反応機構 ビタミン D₃ の 1a 位の水酸化反応では、遷移状態付近で ferryl-oxo コアが $\delta \rightarrow \sigma^*$ 励起した5スピン系の高スピンまたは中間スピン状態が compound I の反応性に寄与する可能性があることが分かった。 σ^* 軌道のエネルギーレベルが低下するほど $\delta \rightarrow \sigma^*$ 励起エネルギーが小さくなるため、Fe-S 結合長が伸長することで高スピンまたは中間スピン状態の反応性が向上することが明らかになった。

高原子価状態による水酸化反応機構 Compound I の励起状態において、鉄イオンの価数が変動しやすいチオレートリガンドのコンフォメーションが存在し、水素引き抜き過程において ferryl-oxo 状態(Fe(IV)=O)から perferryl-oxo 状態(Fe(V)=O)に電荷再配置する可能性があることが分かった。Ferryl-oxo および perferryl-oxo 種の構造最適化と平衡分子構造での振動解析を行い、Fe-O および Fe-S 結合の平衡核間距離と伸縮振動数を比較した結果、電荷再配置することで、トランス効果により Fe-O と Fe-S の結合強度が逆転し、電子が異なる部分に局在することが明らかになった。Ferryl-oxo 種では Fe-O 結合が強く Fe-S 結合が弱いいため、不対電子がチオレートリガンドに局在化し、基質からの水素引き抜きに対する反応性は低くなることが分かった。一方、perferryl-oxo 種では Fe-S 結合が強く Fe-O 結合が弱いいため、不対電子がオキソリガンドに局在化し、水素引き抜きに対するラジカル反応性が極めて高くなることが分かった(図 2)。

新たな P450 による水酸化反応メカニズムの提案 O-O および C-H 結合活性化過程における ferryl-oxo 種と perferryl-oxo 種の振る舞いを調べるために、前駆体である compound 0 の O-O 結合が開裂して compound I を生成する過程および compound I が基質から水素原子を引き抜いてラジカル中間体を生成する過程に関する ferryl-oxo 状態と perferryl-oxo 状態のポテンシャル面を計算した(図 2)。その結果、O-O および C-H 結合開裂過程においてそれぞれ1回ずつポテンシャル面が交差することが分かった。この結果から、反応メカニズムとして、プロトン化した compound 0 の O-O 結合がヘテロリティック開裂して perferryl-oxo 種を生成する協奏的な機構や compound 0 の O-O 結合がホモリティック開裂して ferryl-oxo 種を生成する段階的な機構などいくつかの可能性が考えられる。前者は酸素分子と還元系を用いた P450 の触媒サイクルでは compound I は観測されないという実験事実と矛盾しない。一方、後者は酸素分子と還元系の代わりにメタクロロ過安息香酸のような過酸化物を用いると compound I が観測されるという実験事実と矛盾しない。

水分子の役割の解明 周辺の水分子(水素結合網)が活性化エネルギーに大きな影響を及ぼすことを計算で実証した。

密度汎関数法による遷移金属オキシ化合物の分光学的帰属 compound I および compound II の基底および低い励起状態の最適化分子構造を密度汎関数法による full geometry optimization により決定した。さらに、平衡構造での振動解析を行い、赤外およびラマンスペクトルの帰属を行った。さらに、メスバウアー分光法によるアイソマーシフトや四極子分極定数などを計算し、Fe サイトの酸化数を推定した。これらの結果を総合的に比較検討し、構造と電子状態の相関を明らかにした。この成果は、Int. J. Quant. Chem. 誌 (Vol. 108, 2950-2965 (2008)) にて発表した。

2. 2. 3. 3 酵素反応シミュレーションのための自由エネルギー計算手法の開発(共同実施先:産業技術総合研究所 福西快文主任研究員)

反応中間体を扱える新規機能をMDソフトに実現 分子シミュレーションは古典力場を基礎とするため、原子間相互作用に関数系を割り当てる。しかし、基質ドッキングによる構造モデリング、モデルを精密化するMDシミュレーション、いずれにおいても世界にみても既存欧米ソフトウェアなどでは、安定分子のモデリングはできても、反応中間体を扱える機能を実現しているものは存在しない。我々は、AMBER力場を改良し、中間体が扱えるソフトウェアを産総研で開発中のmyPresto®システムを用いて作成した。このソフトによって、実証研究の対象であるP450のヘム鉄に酸素が配位した中間体のモデリングを行い、以下に述べる解析を行った。

従来よりも遥かに高精度でドッキングできる MVO 法を開発 標的蛋白質への化合物のドッキングシミュレーションは、化合物が標的に結合するならば、どのような形で結合しうるかを提示するものであって、化合物が結合するか、しないかを判別できる精度はもっていない。しかし、X線による構造決定は極めて時間を要するため、しかも X 線では普通は反応中間体を捕らえることができないため、酵素とリガンドの複合体をドッキングソフトで高精度に予測できる技術の確立は非常に重要である。しかし、実際に行うドッキング計算は、複合体構造未知の新しいリガンドと標的との複合体の予測であって、この場合予測精度は著しく低いのが普通であり、たとえば SievGene/myPresto® の場合、27%程度にとどまるのが課題であった。我々は、既知の蛋白質-リガンド複合体の3D座標をもとに、未知のリガンドの蛋白質-リガンド複合体の3D構造を高精度で予測する手法として、Maximum volume overlap (MVO)法を新規に開発した。開発は産総研の SievGene/myPresto を用いて行った。ドッキングソフトは、多数の複合体構造の候補を算出するが、スコア上位 100 候補をとれば、その構造の中には正しい構造が含まれるケースがほとんどであるが(90%の割合)、どの構造が正しい構造であるかは不明である。我々の MVO 法では、ドッキングの結果の多数の構造のうち、既知の蛋白質-リガンド複合体構造のリガンド座標と重なるの大きい構造を選ぶことによって精度を 70%にまで飛躍的に向上させることに成功した。この MVO 法に関しては、J Mol Graph Model 誌に発表した。

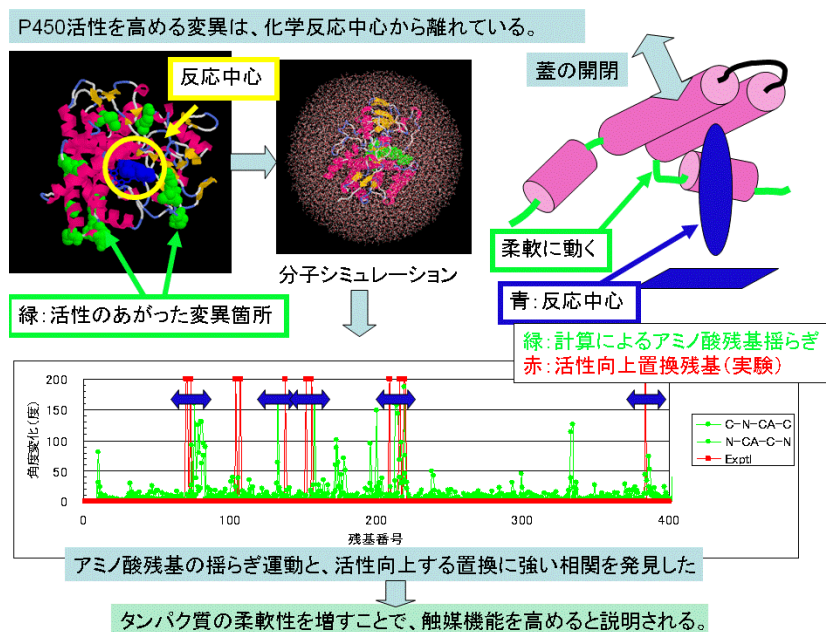


図3 活性向上と構造揺らぎの関係

メルシヤン社のP450-VD3およびP450-VD2の反応中間体複合体モデルの構築 このMVO法を用いて、P450 に対しビタミン D3(VD3)および D2(VD2)をドッキングし、P450-VD3 およびP450-VD2 複合体モデルを作成した。この構造に対し、反応中間体を保持するMDシミュレーションを実施して、反応中間体モデルを作成した。MVO 法を適用した結果、いくつかの実験を説明できる構造が得られたので、上記の中間体の扱える新規開発のMDソフトを用い水中でのMD計算を行い、構造の精密化を行った。

メルシヤン社の P450-VDh の反応機構の解明 上記のように新規開発した手法を用い、P450-VDh のアミノ酸変異と活性の関係を調べた。(1)活性を向上させるアミノ酸変異は、リガンド結合ポケット、反応中心にはなく、タンパク質の外周部分に分布していた。タンパク質の分子シミュレーションは、タンパク質は堅いヘリックスと柔らかいループでできているが、リガンド結合・解離において良く動くループ(特にヘリックスとヘリックスをつなぐ短いループ)に変異が入ると活性が向上することを示した。このことから、アミノ酸変異によるタンパク質の柔軟性の増大が活性の向上につながると期待された。(2)タンパク質とアミノ酸の結合のしやすさを統計的に調べた。その結果、ポケット入口付近のアミノ酸を、低分子を結合しやすい残基に置換した場合に、活性が向上していると解釈できた。ポケットのリガンド結合性を増すだけでなく、水中を漂うリガンドをかき集める「手」のような働きをするアミノ酸があり、そのアミノ酸を望みのリガンドに合わせて変異させると、望みの活性を上げることができると期待される。(3)アミノ酸とアミノ酸の結合のしやすさも統計的に調べた結果、特定のアミノ酸同士の結合が強いことが分かった。この結果をP450に適用した結果、タンパク質複合体形成による活性の向上といった機構は、あまり働いていないと解釈された。(4)アミノ酸変異が、P450 をリガンド非結合型からリガンド結合型構造にシフトさせることで、活性

を向上させる機構も考えられるが、我々の実現可能な計算機時間の範囲では、このアイデアは検証することはできなかった。

2. 2. 3. 4 ラマン分光法による酵素反応シミュレーション評価技術の開発(共同実施先: 茨城大学 高妻孝光教授)

シトクロームP450のように、機能を発現するために金属イオンを要求する金属タンパク質では、金属イオンの部分と基質の認識などに重要なタンパク質骨格部分との構造相関を系統的に調べることが重要である。また、高度な理論計算によって、酵素機能の本質を検討するためには、超高分解能のX線結晶構造と精密な分光学的情報を必要とする。特に、精密な生体分子触媒設計における微細な構造変化を実験的に検出することが、計算機から得られる理論的結果の活用において重要であり、酵素反応の本質を担う微細構造変化を調べる上で、ラマンスペクトルは、きわめて有効な方法である。変異体で生じるヘム近傍の構造転移の測定・解析を行った。

これまでに、P450と同様のヘム蛋白であるシトクロームc' (Cyt c') に対して、pH変化がアルカリに変化するに伴って起こる構造転移を詳細に測定した。可視光励起の共鳴ラマン(514.5nm励起)でポルフィリン環のコアサイズをモニターし、紫外共鳴ラマン(244nm励起)でトリプトファン残基の親水性環境度をモニターする測定を行った。その結果、アルカリ条件下におけるタンパク質のわずかな構造変化が、中心部のポルフィリン環のコアサイズを変化させていることを見事に解明することができた。これは、P450に関していえば、周辺部位で起こった変異が中心部のポルフィリン近傍の反応場に及ぼす影響をラマン分光で検出できる可能性を示唆する重要な結果であると考えている。

P450と同様のヘムタンパク質であるシトクロームc' (Cyt c') に対して、pH変化がアルカリに変化するに伴って起こる構造転移を、共鳴ラマンスペクトルによって、局所構造の精密分子構造解析を行ってきたが、最近、0.92 Å分解能でのX線結晶構造を得る事にも成功し、ラマンスペクトルから得られる精緻な分子構造情報の解析と反応性との相関について新たな知見を得た。さらに、金属イオンの特色の現れやすい銅タンパク質シュウドアズリンを用いる事によって、活性中心の電子状態をタンパク質部分の変異で制御できる事を、共鳴ラマンスペクトルをはじめとする各種分光方法と結晶学的方法によって明らかとした(図4)。これらのことは、P450の周辺部位で起こった構造変化が中心部のポルフィリン近傍の反応場に及ぼす影響をラマン分光で検出できる可能性を強く示唆する重要な結果である。またほかにも、関連酵素であるH-PGDS (Human Hematopoietic Prostaglandin D2 Synthase)の精密なスペクトルを得て、理論計算を行い、理論計算のアプローチの有効性についての検証を行なうことに成功している。これらの成果は、国際学会での招待講演、および Theor. Chem. Acc. 誌において発表した。

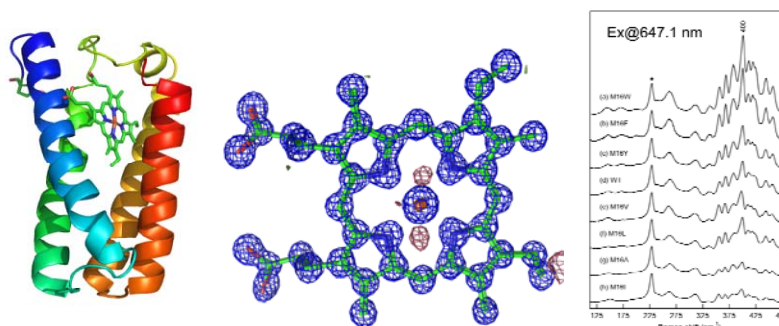


図4 理論計算を確立するために有効なシトクローム *c*'の原子レベル(0.92 Å分解能)での超高分解能X線結晶構造。全体構造(左)とヘム部分の構造(中央)。タンパク質デザインに有効となるタンパク質の微細構造変化が電子状態に与える影響を系統的に検証した銅タンパク質シュウドアズリンとその変異体の共鳴ラマンスペクトル(右)。シュウドアズリンの共鳴ラマンスペクトルは、活性中と相互作用をするアミノ酸残基の効果について系統的情報を与えており、シトクローム P450 における理論的タンパク質デザインの指針としても有効なデータである。

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

区分	特許出願			論文		その他外部発表（プレス発表等）
	国内	外国	PCT [※] 出願	査読付き	その他	
H18FY	0件	0件	0件	0件	0件	1件
H19FY	1件	0件	0件	5件	0件	4件
H20FY	2件	0件	0件	4件	0件	7件
H21FY	1件	0件	2件	5件	0件	20件
H22FY	1件	0件	0件	3件	0件	20件

(※ Patent Cooperation Treaty : 特許協力条約)

2. 2. 4 微生物複合酵素系の産業用触媒としての研究開発(株式会社カネカ)

複合要素を統合化した物質生産プロセス(Integrated bio factory-IBF)の基盤技術を確立すべく、光学活性アミノ酸、光学活性アルコール、光学活性アミンをターゲットとした生産プロセスの開発、及び、還元酵素、脱水素酵素、酸化酵素、P450、peroxidase、laccase などの酸化還元酵素、ならびに産業化が期待される付加、脱離、転移、異性化酵素などを対象とした探索・機能解析を行った。具体的成果は以下のとおりである。

2. 2. 4. 1 高機能性 Multi-component 酵素系による光学活性アミノ酸生産プロセスの開発(株式会社カネカ)

複合酵素系を利用した非天然 L 体アミノ酸の酵素合成法について検討した。D 体選択的なアミノ酸オキシダーゼ、L 体選択的なアミノ酸脱水素酵素、NADH 再生用のギ酸脱水素酵素によって D 体アミノ酸は α -ケト酸を介して L 体アミノ酸に変換される(図 1)。

これを構成する酵素のうち、高活性、低基質特異性が要求される D-アミノ酸オキシダーゼ(DAAO)の生産菌として、*Candida intermedia* IFO0761 株を発見した。本菌は2種類の DAAO を生産し、DAAO1 は脂肪族アミノ酸に対して高活性であり、芳香族アミノ酸、酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸に対して活性を示さなかった。DAAO2 は、芳香族アミノ酸に対して高活性であり、幅広い基質特異性を有していた。組換えDAAO1とロイシン脱水素酵素、ギ酸脱水素酵素、カタラーゼを用いて、ラセミ体の 2-アミノ酪酸から 100%e.e.の L 体 2-アミノ酪酸が収率 95%で、また組換えDAAO2 とフェニルアラニン脱水素酵素、ギ酸脱水素酵素、市販カタラーゼを用いて、ラセミ体の *p*-フルオロフェニルアラニンから 100%e.e.の L 体 *p*-フルオロフェニルアラニンが収率 92%で生成した。

ケト酸を還元的にアミノ化して L 体アミノ酸を生成するアミノ酸脱水素酵素の生産菌として土壌分離菌 *Rhodococcus qingshengii* KNK2-10-8 株を発見した。本菌のアミノ酸脱水素酵素は NADH 依存性で約 46kDa のサブユニットからなるホモ二量体と推定され、ナフチルピルビン酸、インドールピルビン酸、ホモフェニルピルビン酸などの側鎖の大きなケト酸に対して既知酵素に比べて特異性が高い傾向にあり、大きな側鎖を有する L-アミノ酸合成への利用が期待できる。本酵素遺伝子の*E. coli*での発現実験では、組換え酵素の大部分が不溶化し低活性となった。そこで、本酵素遺伝子と *groEL*、*groES* のシャペロン蛋白遺伝子を同時発現させることによって、可溶化に成功し当初の約 30 倍の酵素活性が得られた。

L-アミノ酸脱水素酵素、D-アミノ酸オキシダーゼ、ギ酸脱水素酵素、市販カタラーゼの混合液によって、ラセミ体を原料に、光学的に純粋な L 体のナフチルアラニン及びホモフェニルアラニンが 97%以上のモル収率で合成できた。次に、L-アミノ酸脱水素酵素、D-アミノ酸オキシダーゼ、ギ酸脱水素酵素の 3 酵素を同時に高生産する組換え大腸菌を育種した。本菌の培養液と市販カタラーゼの混合液を用いて、ラセミ体のフェニルアラニン誘導體から L 体のそれが 90%収率で得られた。これら 4 酵素を混合した場合よりも収率は向上し、副生物である中間体 α -ケト酸の分解物も低減できた。次に、熱安定性が高く、低 K_m 値をもつ大腸菌のカタラーゼ遺伝子をクローニングし、先の 3 酵素とカタラーゼの計 4 酵素を同時に高生産する組換え大腸菌を育種した。本菌の

培養液を用いて同様に L 体のフェニルアラニン誘導体を合成したところ、3 酵素菌利用時よりもさらに高濃度の蓄積が可能であった。

この 4 酵素生産菌内の組換えプラスミド上のフェニルアラニン脱水素酵素遺伝子をロイシン脱水素酵素遺伝子に置き換えたプラスミドを構築し、4 酵素生産菌と同様に組換え大腸菌を育種した。本菌を用いてラセミ体のノルバリンを原料に L-ノルバリンを合成したところ、ほぼ光学的に純粋な 50g/L の L-ノルバリンが蓄積し、基質に応じてアミノ酸脱水素酵素遺伝子を替えることで、さまざまなアミノ酸合成に対応できることを示した。さらに、4 酵素生産大腸菌を合成高分子化合物によって包括固定化することにより、バッチ式で繰り返し使用可能な固定化微生物触媒を容易に調製できた。

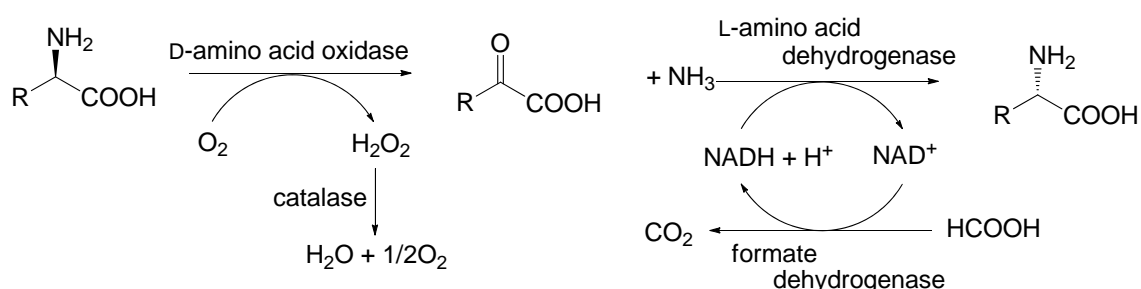


図 1. 立体反転反応による光学活性アミノ酸の生産プロセス

2. 2. 4. 2 高機能性 Multi-component 酵素系による光学活性アルコール生産プロセスの開発 (株式会社カネカ)

(1) 複合酵素系を利用した光学活性なアルコール類の生産プロセス開発

立体選択的酸化酵素と NADH オキシダーゼからなるアルコールの酸化反応と、還元酵素および補酵素再生用酵素からなる中間体ケトンの還元反応のワンポット複合反応によって、ラセミ体の全量を一方の立体配置をもつアルコール体に変換する(図 2)。

これを構成する 4 酵素のうち、*Streptococcus mutans* 由来の水生成型 NADH オキシダーゼ (NOX) は、安定性に乏しく工業的利用には制限を受ける。そこで、理論的分子設計によるアミノ酸変異設計、およびランダム変異実験による安定性向上変異酵素の取得検討を行なった。理論的分子設計の方針としては、NOX 酵素の熱安定性を向上させる変異、および反応中心のシステイン残基の過剰酸化を防ぐことにより化学的安定性を向上させる変異を選択した。次いで、設計した二十数種類の NOX 変異体が大腸菌にて発現させ、その性質を評価した。その結果、化学的安定性向上を図ったアミノ酸変異によって、NOX 酵素の耐久性を向上させる効果が見られた。

本複合酵素系による(*S*)-3-クロロ 1,2-プロパンジオール(CPD)を(*R*)体に立体反転する反応を解析した結果、酸化反応には NADH オキシダーゼの添加が効果的なこと、及び酸化反応に NAD⁺依存性の酵素系を用いる場合、還元反応には NADPH 依存性の酵素系が必要なことが確

認できた。したがって、バイオ還元反応時の還元型補酵素の再生用に繁用されている *Bacillus* 属細菌由来のグルコース脱水素酵素(GDH)は、NADH と NADPH の両者に作用するため適切ではない。そこで、*Bacillus* の GDH の部位特異的アミノ酸変異設計による NADPH 単独依存性付与について検討し、設計した十数種類の GDH 変異体遺伝子を大腸菌で発現させ、GDH 変異体を取得した。一残基変異および二残基変異を与えた GDH 変異体のうち、NADP 依存性が 2~3 倍に向上し、酵素活性も野生型 GDH と同等である変異体を数種得た。また、乳酸菌数株から新たに 8 種類のグルコース脱水素酵素を得た。これらはいずれも NADP⁺ に高い選択性を有し、うち 3 酵素は NADP⁺/NAD⁺ が 10,000 以上であった。反応至適 pH は 6.5-7.5 であり、*Cryptococcus* 酵素の 7.0-8.0、*Bacillus* 酵素の 8.0 と比べて酸性側に偏っていた。さらに、スクリーニング実験によって得られた *Cellulomonas* sp. KNK0102 株由来のグリセリン脱水素酵素、上述した変異型 NADH オキシダーゼ、*Candida magonoliae* AKU4643 由来のカルボニル還元酵素 S1、上述の乳酸菌由来の NADPH 依存性グルコース脱水素酵素の 4 酵素を同時に生産する組換え大腸菌を育種し、本菌を用いてグルコースの存在下、ラセミ体 CPD を本菌に作用させたところ、反応約 50 時間で 96.7%e.e. の (*S*)-CPD がほぼ定量的に蓄積した。

次に、(*R*)-CPD を (*S*) 体に立体反転する反応に必要な (*R*)-CPD 酸化酵素を土壌分離菌 *Orchrobactrum* sp. KNKc71-3 中に発見した。本酵素は NADH 依存性のアルコール脱水素酵素であり、その基質特異性から 2,3-ブタンジオール脱水素酵素の 1 種と考えられた。本酵素は CDP 以外にも様々な 2 級の (*S*) 体の脂肪族アルコールに作用した。本酵素、変異型 NADH オキシダーゼ、*Rhodotorula glutinis* var. *dairenensis* IFO415 由来のカルボニル還元酵素、乳酸菌由来の NADP 依存性グルコース脱水素酵素の 4 酵素を同時に生産する組換え大腸菌を育種し、本菌を用いてラセミ体 CPD を原料に (*R*)-CPD を合成したところ、反応約 40 時間で 100%e.e. の (*R*)-CPD が 100g/L 蓄積した。また、同様にラセミ体 1,2-ペンタンジオールを立体反転させたところ、反応約 24 時間で 99.9%e.e. の (*S*)-1,2-ペンタンジオールが 100g/L 蓄積した。いずれもモル収率はほぼ 100%であった。

酸化還元複合酵素系によるアルコール類の立体反転反応においては、上述したように酸化反応と還元反応における補酵素種の厳密な管理が必要である。天然に存在するアルコール脱水素酵素においては、補酵素依存性と所望する化合物への反応性には制限があるため、補酵素依存性を改変できる技術は重要となる。そこで、計算化学的手法によるアルコール脱水素酵素の補酵素改変変異体の取得を試みた。NADH 依存性の *Candida* 属酵母由来のアルコール脱水素酵素を題材に、既存の類似酵素を参考にコンピューターモデリングを行ない、補酵素認識部位を中心に変異を導入したモデルを設計し、さらに酵素活性の維持を目標に計算を行なった。得られた変異候補部位を部位特異的変異によって当該酵素に導入し、変異酵素を調製してその触媒能力等を評価した。14 個の変異酵素のうちの一つにおいて、活性比 (NADPH/NADH) が 44 に達し、酵素活性が約 1/5 になった三重変異酵素が得られた。なお野生型酵素では NADH/NADPH が 357 であった。

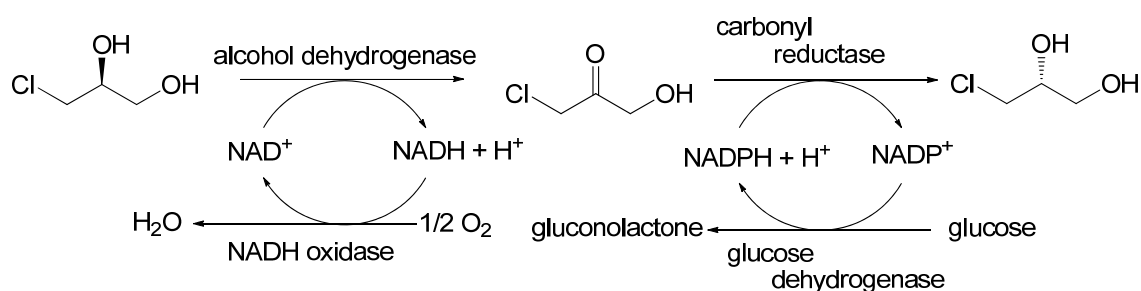


図 2. 立体反転反応による光学活性アルコールの生産プロセス

(2) 複合酵素系を利用した光学活性なアミン類の生産プロセス開発

光学活性アミンは医薬品等の原料として、光学活性アミノ酸や光学活性アルコールと同様に重要な化合物群である。安価なカルボニル化合物からの従来の合成法においては、高温高压反応を必要とし、多段階の反応が必要である。カルボニル化合物に直接立体選択的にアミノ基が導入するアミノ基転移反応は経済面でも環境配慮面でも魅力的な反応である。まずアミン化合物を単一窒素源とする集積培養法によって、カルボニル化合物とアミン化合物とのあいだでアミノ基を立体選択的に転移する活性を有する *Pseudomonas* 属細菌を単離した。本菌から当該酵素活性を電気泳動的に単一にまで精製した。本酵素 TFP は分子量 53,000 のホモダイマーで反応にはピリドキサルリン酸を必要とし、(S)-1-フェネチルアミンとピルビン酸によく作用するが、(R)-1-フェネチルアミンや D-アラニンには作用しなかった。また、 β -アラニンや 4-アミノ酪酸には作用せず、 ω -アミノ酸トランスアミナーゼとは異なる酵素と考えられた。本酵素をコードする遺伝子のクローニング及び大腸菌での高発現にも成功し、本菌によって、(S)-1-フェネチルアミンの存在下、7-メトキシ-2-テトラロンを 97%e.e. の 7-メトキシ-2-アミノテトラリンに変換することができた。しかし、収率は 80%と低く、その原因としてアミノ化反応の反応平衡が考えられた。そこで、アミノ基供与体を L-アラニンとし、乳酸脱水素酵素、グルコース脱水素酵素、触媒量の NAD^+ 、グルコースを反応液に添加したところ、L-アラニンのみの添加ではほぼ反応が進行しなかったにもかかわらず、ほぼ定量的に 7-メトキシ-2-アミノテトラリンが生成した。これは、アラニンのアミノ基転移後生成物であるピルビン酸が乳酸脱水素酵素によって乳酸に変換されるため、アミノ化反応の平衡が解除された結果である。グルコース脱水素酵素はピルビン酸還元時に必要な還元型補酵素を強力に再生するのに有効であった。

本アミン生成反応をさらに容易に実施できる触媒を調製した。トランスアミナーゼ TFP、*Pediococcus acidilactici* 由来の乳酸脱水素酵素、*Bacillus megaterium* 由来のグルコース脱水素酵素の 3 酵素を同時に生産する組換え大腸菌を育種した。本菌を用いた場合、7-メトキシ-2-アミノテトラリンのほかに、高光学純度の 3-アミノピロリジン誘導体、3-アミノピペリジン誘導体などの有用な光学活性アミン類を、対応するカルボニル化合物からワンポットでかつ高収率で合成することができた。

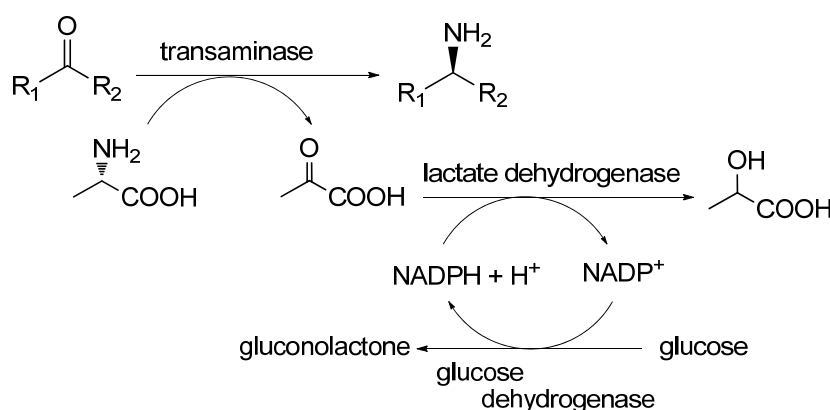


図 3. 複合酵素系による光学活性アミンの生産プロセス

2. 2. 4. 3 高機能性 Multi-component 酵素系の探索・機能解析(京都大学農学研究科)

還元酵素、脱水素酵素、酸化酵素、P450、peroxidase、laccase などの酸化還元酵素、ならびに産業化が期待される付加、脱離、転移、異性化酵素などを対象とした探索・機能解析を行った。具体的成果は以下のとおりである。

(1) 光学活性 β -アミノ酸の立体反転反応による生産に有用な新規トランスアミナーゼ、オキシダーゼを取得した。このうち新規酵素 β -フェニルアラニン: α -ケトグルタル酸アミノ基転移酵素の精製を行い諸性質を解明した。本酵素は、 β -フェニルアラニンに立体選択的に作用するアミノ基転移酵素としては初めての報告であり、立体反転反応による光学活性 β -アミノ酸生産における第一段階、すなわち、立体選択的のケト酸生成反応に有用であることが判明した。

(2) 酵母解糖系を用いるリン酸化基質供給とカップリング可能なアルドラーゼ活性菌を取得した。特に、基質となるアセトアルデヒドに対して耐性をしめすデオキシリボアルドラーゼを *Klebsiella* 属細菌に見いだした。また、アルドラーゼ-トランスアミナーゼカップリング反応による 4-ヒドロキシイソロイシン生産に有用なアルドラーゼ類の探索を行い、*Arthrobacter* 属細菌に新規なアルドラーゼ (asHPAL) を見みいだした。さらに、asHPAL の遺伝子情報を活用して、様々な微生物ゲノム中にホモログを見いだすとともに、これら大腸菌にて発現し、様々な 4-ヒドロキシアミノ酸誘導体の合成に有用な酵素群(4 種類)を見いだした。

(3) 高度不飽和脂肪酸に関する不飽和化酵素活性菌を *Mortierella* 属、*Trichoderma* 属、*Delacroixia* 属糸状菌に見いだした。また、高度不飽和脂肪酸分子内の二重結合を異性化、飽和化する菌株を、*Lactobacillus* 属乳酸菌(C18の脂肪酸に特異的)、ならびに、*Clostridium* 属の嫌気性細菌(C20の脂肪酸にも作用する)に見いだした。さらに、脂肪酸の二重結合水和化による水酸化脂肪酸の生産に関し、*Lactobacillus* 属細菌に $\Delta 9$ 位ならびに $\Delta 12$ 位を水和する特異な活性を見いだした。

(4) L-イソロイシンからの 4-ヒドロキシイソロイシン生産に有用な 2-ケトグルタル酸依存性新規ジオキシゲナーゼ(L-イソロイシンジオキシゲナーゼ)を *Bacillus* 属細菌に見いだした。また、L-イソロイシンジオキシゲナーゼの遺伝子情報を活用して、様々な微生物ゲノム中にホモログを見いだす

とともに、これらが大腸菌にて発現し、アミノ酸水酸化酵素としての機能解析を行った。その結果、水酸化部位の異なる酵素(3位、4位、5位にそれぞれ特異的な酵素)を取得した。

(5) L-イソロイシンジオキシゲナーゼを生産する *Bacillus* 属細菌において、4-ヒドロキシイソロイシンがさらに酸化を受け対応する 4-ケト体となる新規 L-イソロイシン代謝経路を見いだした。この知見に基づき、4-ケト体を還元するカルボニル還元酵素の探索を行った結果、立体選択性の異なる様々な、3-ketoacyl-ACP reductase 類を取得した。

2. 2. 4. 4 Multi-component 酵素系の機能発現制御技術の開発(京都大学農学研究科)

電子伝達系、還元力供給系、エネルギー供給系、安定化蛋白質、低分子化合物(メディエーター)などを対象とした探索・機能解析を行った。具体的成果は以下のとおり。

(1) 酸化還元酵素系に有用な電子伝達系に関し FMN 依存酸化還元酵素系の解析を行い *Rhodococcus erythropolis* 由来の FMN 依存酸化還元酵素、L-パントイルラクトンデヒドロゲナーゼ(LPLDH)について周辺遺伝子の解析を行った。その結果、LPLDH 遺伝子の上流、下流にそれぞれ、鉄-硫黄クラスター・オキシドレダクターゼ、NADH-フラビン・オキシドレダクターゼと相同な遺伝子を見いだした。さらに、これらのアクセサリ蛋白質が LPLDH の誘導物質である 1,2-プロパンジオールにより誘導発現されることが、高発現された LPLDH の活性向上に寄与することを見いだした。

(2) *Bacillus* 属細菌由来シトクロム P450 水酸化酵素(BM-3)によるフェノール化合物(2-ベンジルオキシフェノール; 2-BP)のパラ位特異的水酸化を指標にシトクロム P450 水酸化酵素活性化因子の探索し、superoxide dismutase(SOD)に BM-3 の活性化/安定化効果を見いだした。また、2BP 水酸化反応に対する SOD の添加効果を、NADPH 消費速度およびカップリング定数にて評価したところ、SOD は BM-3 に対して、NADPH 消費速度の向上すなわち電子伝達の効率化、ならびに、カップリング定数の向上すなわち基質酸化の選択性向上に寄与しており、結果的に 2BP 水酸化反応を大幅に活性化していることが判明した。さらに、各種低分子ラジカル消去剤についてシトクロム P450 水酸化酵素活性化を検討し有効性を見いだした。また、P450 モノオキシゲナーゼの電子伝達系として、BM-3 還元ドメイン系、フェレドキシン系、ルブレドキシン系の 3 種の大腸菌発現系を構築した。

(3) 高度不飽和脂肪酸の分子内二重結合を異性異化する共役リノール酸生産性乳酸菌における関連酵素群の解析を行い、3 成分の複合酵素系(CLA-HY、CLA-DH、CLA-DC)が触媒する水和(CLA-HY)、アルコール酸化(CLA-DH)、異性化(CLA-DC)、カルボニル還元(CLA-DH)、脱水(CLA-HY)の連続する反応により共役化が起こることを解明した。また、これらの酵素群にゲノム上にて隣接する遺伝子がコードする酵素(CLA-ER)の機能解析を行った結果、CLA-ERを合わせた計 4 種類の酵素の働きによる、水和(CLA-HY)、アルコール酸化(CLA-DH)、異性化(CLA-DC)、エノン還元(CLA-ER)、カルボニル還元(CLA-DH)、脱水(CLA-HY)の連続する反応により二重結合の飽和化が起こることを明らかにした。

(4) ラッカーゼ・ペルオキシダーゼの活性を賦活化する低分子メディエーターの探索を行い、ター

メリック、ポピーシードなどの植物抽出物に活性を見いだした。さらに、微生物二次代謝産物、フェノール性合成化合物、*N*-ヒドロキシ合成化合物等に活性を見いだした。

(5) ジオキシゲナーゼの補酵素である 2-ケトグルタル酸を効率供給する大腸菌宿主の開発を行い、水酸化アミノ酸生産を効率化する大腸菌宿主細胞を構築した。

2. 2. 4. 5 最適反応場・プロセスの構築(京都大学大学院農学研究科)

(1) 細胞内での multi component 酵素系発現の最適化に関して、ケトイソフロンから(4*R*,6*R*)-アクチノールを生産するプロセスに有用な複合酵素系発現微生物触媒の開発を行った。すなわち、本プロセスに必要な、*Candida* 属酵母ならびに *Torulopsis* 属酵母由来の2種類のオレフィン還元酵素(CYE ならびに TYE)、*Corynebacterium* 属細菌由来カルボニル還元酵素(LVR)、さらに補酵素再生系としての *Bacillus* 属細菌由来グルコース脱水素酵素(GDH)の4つの酵素の大腸菌における共発現を試みた。その結果、薬剤耐性マーカーの異なる2種のベクターを活用することにより、4つの酵素を効率よく発現する形質転換大腸菌の構築に成功し、ブチル酢酸を用いる有機溶媒-水二相系反応の導入による反応条件の最適化を経て、50g/L スケールの変換に成功した(図4)。この際の反応収率は100%、生成した(4*R*,6*R*)-アクチノールの光学純度は89.5% *d.e.*であった。

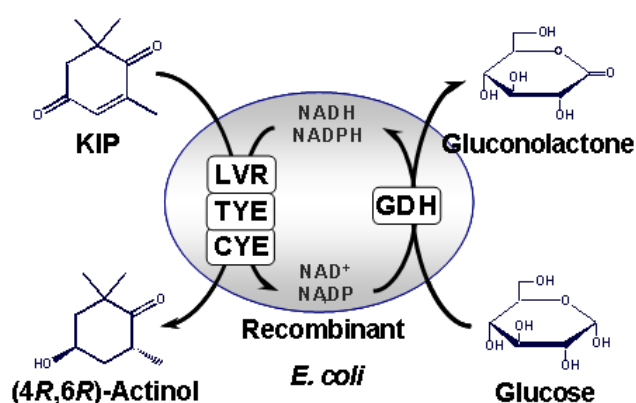


図4. 複合酵素系による光学活性アルコール(アクチノール)の生産プロセス

(2) パン酵母の解糖系を活用したグルコースからの高エネルギー化合物(フルクトース 1,6-ニリン; FDP)の供給系と、高エネルギー化合物(FDP)から誘導されるグリセルアルデヒド 3-リン酸とアセトアルデヒドとのアルドール縮合を触媒するアルドラーゼ(アセトアルデヒド耐性のデオキシリボアルドラーゼ)の反応とを共役させることにより、グルコースとアセトアルデヒドから、抗ウイルス剤の合成原料となるデオキシリボース 5-リン酸(DR5P)を効率的に生産しうるプロセスを構築した。このプロセスにおける中間体FDPならびに最終産物DR5Pの生産量はそれぞれ、120 g/Lならびに52.6 g/Lに達した(図5)。

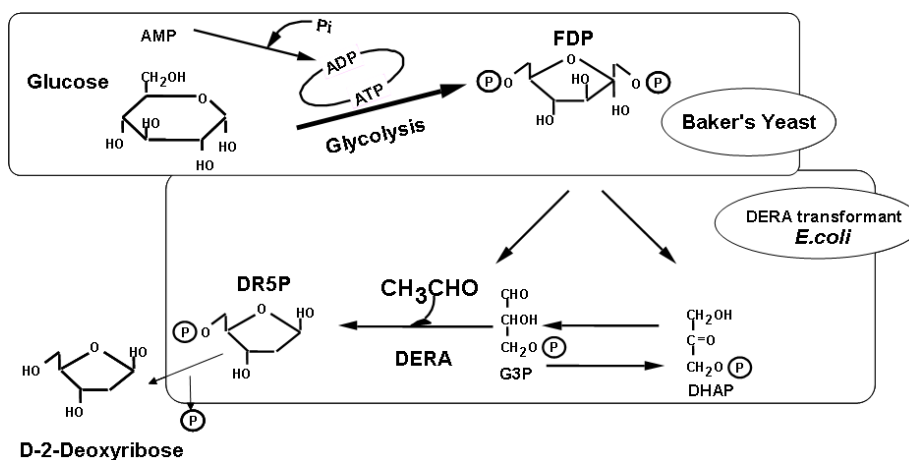


図5. パン酵母解糖系とアルドラーゼからなる複合酵素系によるグルコース、アセトアルデヒドからのデオキシリボース 5-リン酸生産

(3) 新規ジオキシゲナーゼ(L-イソロイシンジオキシゲナーゼ; IDO)の反応(図6)に必須である2-ケトグルタル酸(α -KG)を大腸菌の解糖系、TCA サイクルを活用してグルコースから供給すべく、 α -KG 消費に機能する酵素の遺伝子群を欠損させた大腸菌遺伝子破壊株を作成した。本大腸菌遺伝子破壊株に IDO を導入し、グルコースを炭素源とする培養法による L-イソロイシンからの 4-ヒドロキシイソロイシンの生産を試みた結果、収率 87%にて、73 g/L の生産を達成した。

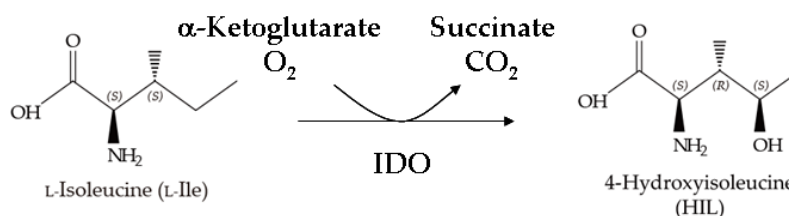


図6. L-イソロイシンジオキシゲナーゼを用いる L-イソロイシンからの 4-ヒドロキシイソロイシンの生産

(4) アルドラーゼ-トランスアミナーゼカップリング反応による 4-ヒドロキシイソロイシン生産に有用な酵素として見いだした HpaI/HpcH-aldolase family に属する 5 種のアルドラーゼ *Arthrobacter simplex* 由来 asHPAL、*Escherichia coli* 由来 YhaF ならびに YfaU、*Novosphingobium aromaticivorans* 由来 BphF、*Rhizobium radiobacter* 由来 HkpA を大腸菌にて発現させ、発現酵素群の機能解析を行った。その結果、これらの酵素が分岐鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼとカップリングした複合酵素系において、ピルビン酸ならびに α -ケトブタン酸と様々な脂肪族ならびに芳香族アルデヒドから、多様な 4-ヒドロキシアミノ酸を生成しうること、また、その際の立体選択性が酵素により異なることを見いだした(図7)。

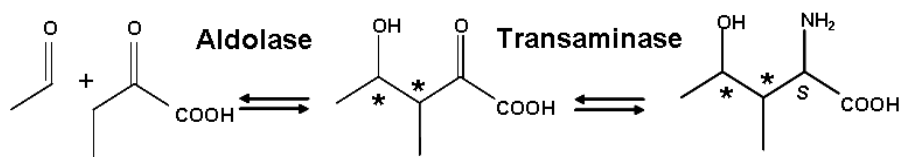


図7. アルドラーゼ-トランスアミナーゼ共役反応による4-ヒドロキシアミノ酸生産

(5) 乳酸菌由来の共役化酵素群 (CLA-HY、CLA-DH、CLA-DC) を共発現する大腸菌を構築するとともに、本大腸菌を用いるリノール酸からの共役リノール酸生産条件を最適化し、収率 60%にて 53.5 mg/ml の共役リノール酸生産を達成した (図8)。本形質転換大腸菌は、 α -リノレン酸、 γ -リノレン酸、ステアリドン酸を基質とし対応する共役高度不飽和脂肪酸を生産するプロセスにも応用可能であった。また、ポリマー原料等として有用な水酸化脂肪酸の生産プロセスに関し、乳酸菌由来の共役化酵素群コンポーネントの一つである水和酵素を用いる反応の最適化を行い、収率約 90%にて 30 g/L の生産を達成した (図9)。

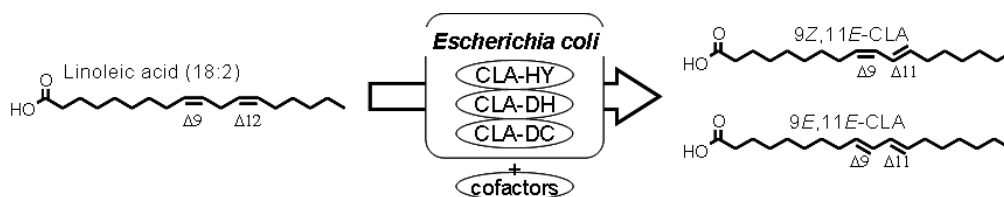


図8. 乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* 由来の不飽和脂肪酸共役化酵素群を発現させた大腸菌によるリノール酸からの共役リノール酸生産

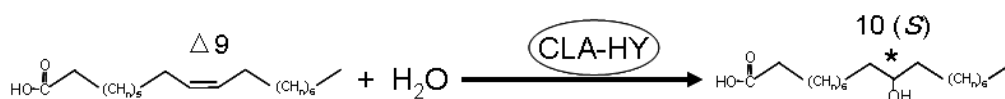


図9. 乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* 由来の水和酵素を用いる水酸化脂肪酸生産

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

区分	特許出願			論文		その他外部発表 (プレス発表等)
	国内	外国	PCT [※] 出願	査読付き	その他	
年度						
H18FY	2件	0件	1件	10件	1件	10件
H19FY	2件	0件	0件	10件	5件	12件
H20FY	0件	0件	0件	8件	2件	3件
H21FY	1件	0件	1件	16件	2件	9件
H22FY	0件	0件	1件	10件	13件	22件

2. 2. 5 放線菌の活用による新規二次代謝産物の開発(明治製菓株式会社)

2. 2. 5. 1 天然型抗生物質A生合成遺伝子クラスターの解析

「非天然型」抗生物質Bを発酵生産させる戦略は図1に示す通りである。

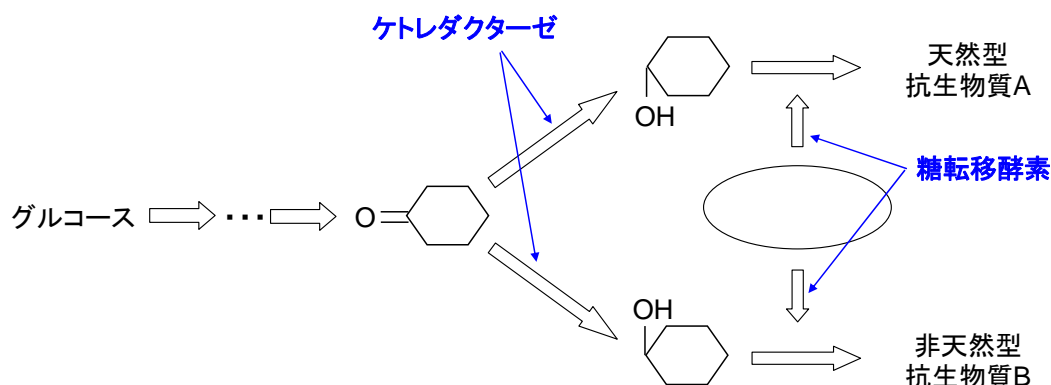


図1 非天然型抗生物質「非天然型抗生物質B」の発酵生産戦略

本戦略は、天然型抗生物質Aの生合成に関わるケトレダクターゼ遺伝子を破壊し、その代わりにエピ型ケトレダクターゼ遺伝子を導入することから成る。そこで、まず、明治製菓保有の天然型抗生物質A生産菌よりケトレダクターゼ遺伝子の単離を行った。天然型抗生物質A生産菌のゲノムDNAを鋳型として、ケトレダクターゼ遺伝子の一部をPCRで増幅した。これをプローブとして、EMBL3に作成したゲノムDNAライブラリーをスクリーニングし、ケトレダクターゼ遺伝子及びその周辺のDNA断片(約7.4kb)を取得した(図2)。

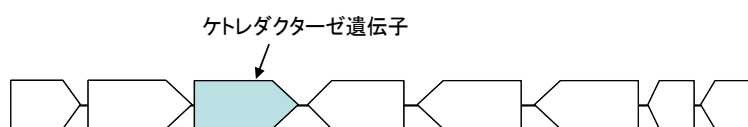


図2 ケトレダクターゼ遺伝子と周辺のORFの配置

次に、上記DNA断片を利用して、ケトレダクターゼ遺伝子破壊用プラスミドを構築した。即ち、部位特異的変異法によりケトレダクターゼ遺伝子の翻訳領域にin-frameで終止コドンを導入した変異ケトレダクターゼ遺伝子を含むDNA断片を、アブラマイシン耐性遺伝子と接合伝達用oriTを含むプラスミドに挿入して構築した。このプラスミドを天然型抗生物質A生産菌へ接合伝達法により導入しアブラマイシン耐性株を取得した。アブラマイシン耐性株のゲノムDNAをPCR及びサザン解析にて分析し相同組換え体であることを確認した。相同組換え体をアブラマイシンを含まない液体培地で継代培養し、アブラマイシン耐性遺伝子を含むベクター領域が除去されたケトレダクターゼ遺伝子破壊株を得た(図3)。これを液体培養して天然型抗生物質Aの生産の有無をHPLCで分析した。その結果、ケトレダクターゼ遺伝子破壊株が天然型抗生物質A非生産となっている

ことを確認した(図4)。

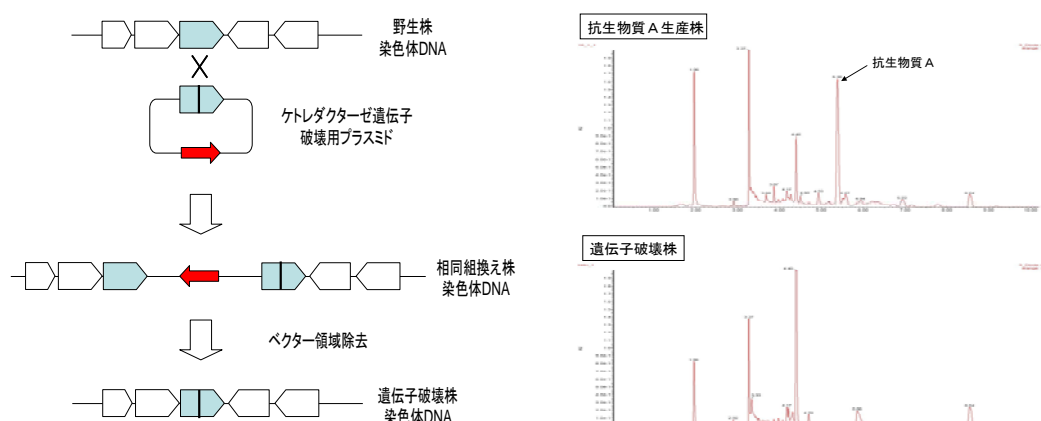


図3 相同組換えによるケトレダクターゼ
遺伝子破壊株取得の概略

図4 天然型抗生物質A生産株と遺伝子
破壊株の培養液の HPLC 分析

また、天然型抗生物質A生合成遺伝子クラスター全体をクローニングすべく、コスミドライブラリーをスクリーニングし、クラスター全体をカバーするコスミド(2 クローン)を単離した。これらの塩基配列を解析し全長 71, 079bp の塩基配列を決定した。決定した塩基配列内には 52 個の ORF が存在した。この中に、非天然型抗生物質B発酵生産においてケトレダクターゼに次いで重要と考えられる糖転移酵素遺伝子を2 個見出した。このうちの1 個の遺伝子(S)については、上述のケトレダクターゼ遺伝子破壊のときと同様、2 ステップ法による遺伝子破壊用プラスミドを構築し、接合伝達法によって天然型抗生物質A生産菌に導入した。得られたアプラマイシン耐性の形質転換体について、相同組換えによってプラスミド DNA が染色体に挿入されていることをPCRにより確認した後、該形質転換体よりアプラマイシン感受性株を誘導し、S 遺伝子破壊株を得た。本遺伝子破壊株を抗生物質生産培地で培養した結果、天然型抗生物質Aの生産は認められず、S 遺伝子が天然型抗生物質Aの生合成に関わる糖転移酵素遺伝子であることを明らかにした。

一方、生合成遺伝子クラスター中に存在するもう一つの糖転移酵素遺伝子(H)について、S 遺伝子の場合と同様に 2 ステップ法による遺伝子破壊用プラスミドを構築し遺伝子破壊株を取得したが、天然型抗生物質Aの生産に何ら影響は及ぼさなかったことから、天然型抗生物質Aの生合成に関わる糖転移酵素遺伝子ではないことが示された。

2. 2. 5. 2 非天然型抗生物質B生産用遺伝子資源の探索

非天然型抗生物質Bを生産させるためには、天然型抗生物質A生合成に関わるケトレダクターゼとは酵素反応後の水酸基の立体配置が異なるケトレダクターゼ(エピ型ケトレダクターゼ)をコードする遺伝子が必要である。そこで、放線菌が生産する既知二次代謝産物の分子構造を検索し、非天然型抗生物質B生産に利用可能なエピ型ケトレダクターゼ遺伝子を含む可能性がある菌株をピックアップし、下表に示す5 種のエピ型ケトレダクターゼ遺伝子をクローニングし塩基配列を確

認した。

菌株	抗生物質	遺伝子
<i>Streptomyces mycarofaciens</i>	ミデカマイシン	<i>orf29</i>
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	エリスロマイシン	<i>eryBIV</i>
<i>Streptomyces avermitilis</i>	アベルメクチン	<i>avrE</i>
<i>Streptomyces olivocromogenes</i>	オレアンドマイシン	<i>oleU</i>
<i>Amycolatopsis orientalis</i>	クロレモマイシン	<i>evaE</i>

初めに、*S. mycarofaciens*由来の *orf29* 遺伝子を *ermE**プロモーター制御下に配置した接合伝達用プラスミド pMED-E を構築した。これをケトレダクターゼ遺伝子破壊株の染色体 DNA 上の *attB* 部位に導入した(図5)。

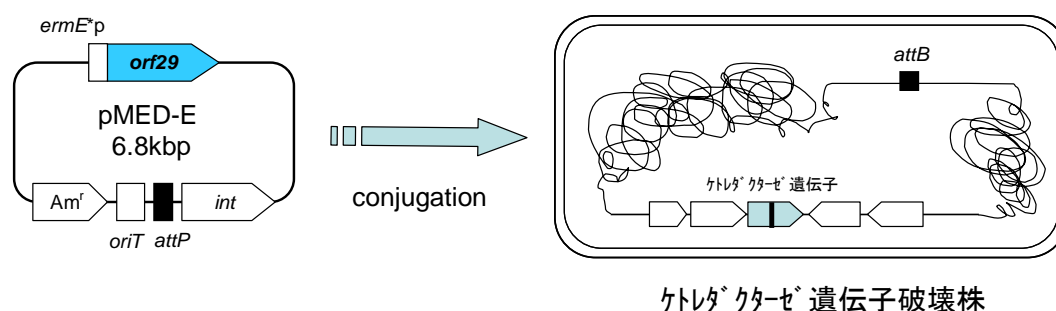


図5 接合伝達法によるプラスミド pMED-E のケトレダクターゼ遺伝子破壊株への導入

得られた形質転換体(ケトレダクターゼ破壊株/pMED-E)を培養し、培養液を LC-TOFMS で分析した結果、非天然型抗生物質B標品と同じ保持時間に新たなピークが検出され、その分子量は非天然型抗生物質Bのものと同じで、目的とする非天然型抗生物質Bの発酵生産を確認できた(図6)。

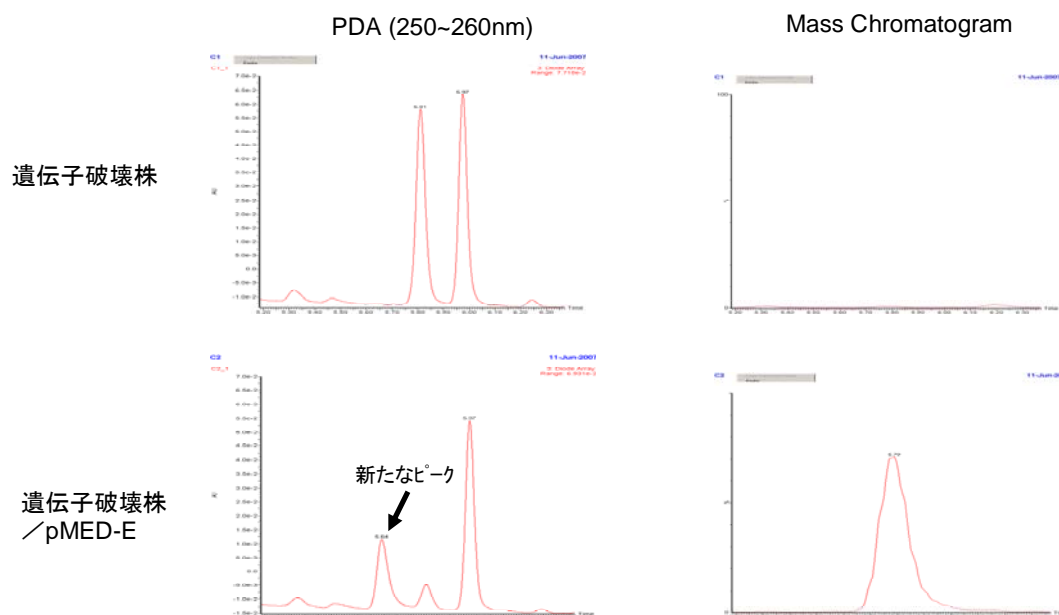


図6 LC-TOFMS 分析による非天然型抗生物質Bの検出

次に、他の4種のエピ型ケトレダクターゼ遺伝子についても *ermE**プロモーター制御下に配置した接合伝達用プラスミド(pERY-E, pAVR-E, pOLE-E, pEVA-E)を構築し、ケトレダクターゼ遺伝子破壊株の染色体DNA上の *attB* 部位に導入した。各形質転換体を培養し、非天然型抗生物質Bの生産量を比較した結果、*A. orientalis* 由来の *evaE* 遺伝子を使用したとき(ケトレダクターゼ破壊株/pEVA-E)が最も高く、ケトレダクターゼ破壊株/pMED-Eの約8倍の生産性を示した。この結果から、エピ型ケトレダクターゼの基質特異性が目的物質の生産性に大きく影響することが推定された。そこで、*evaE* 遺伝子産物の基質特異性を目的物質生産に最適化するため、error-prone PCRによるランダム変異導入及び優良変異遺伝子のスクリーニング系を確立した。

このスクリーニング系を用いて *A. orientalis* 由来の *evaE* 遺伝子の改良を試みた結果、野生型の遺伝子と比較して「非天然型」抗生物質Bの生産性を向上させるアミノ酸置換として Q42L、K153T 及び C270Rを見出すことができた。非天然型用の *evaE* 遺伝子は天然型抗生物質Aを生産するためのケトレダクターゼ遺伝子とも僅かながら相同性を有しており、コードするアミノ酸配列をアライメントすることが可能であるが、今回見出されたアミノ酸置換は全て天然型ケトレダクターゼタイプへのアミノ酸置換であったことは興味深い。また、これらアミノ酸置換のうち K153T が最も非天然型抗生物質Bの生産性を向上させる変異であったことから、サチュレーション変異法により153番目の位置のアミノ酸の最適化を実施した。その結果、プロリン以外のアミノ酸であれば生産性向上が認められ、その中でもトレオニンが最も良いアミノ酸であることが明らかとなった。また、153番目の近傍のアミノ酸について天然型ケトレダクターゼタイプへのアミノ酸置換を行った結果、

Q149S に生産性向上の効果を認めた。

さらに、K153T のアミノ酸置換を有する変異遺伝子を親遺伝子として、前述と同等の方法で非天然型抗生物質Bの生産性を向上させる変異遺伝子のスクリーニングを実施したところ、1980 株をスクリーニングして E306D のアミノ酸置換を見出した。このアミノ酸置換についても天然型ケトレダクターゼタイプへのアミノ酸置換であった。

```

M-RVVVLGATGSVGRQVCAAYQAHGWDVHGVARR---PAPHLGCGFTELDLAAAAPGRI
MKLITVLGASGFIGSAVTRALAQQPIRLRAVARRQFTTPAPGQAETTVVAADLTDRV-ALA
                                     Q42L
ATVGLDLPADV VVNAAGGWGDTE-EEMTYSHLRLVRRRLVEALALLPFRPRLVHLGSVHEY
DAVAGSDAVVYLLLSDGGWRAVETEDAERVNVGVMRDLIDVTGSDNGTTPPVVVFGGTVSQ
                                     Q149S
GPVPAGTLLHEDLLPEPVTPYARVKLETSSAVLTAARAGVLDVAVLRAANMSGPHPPQES
VGVPREPLDGESEPDNPATPYDIQKLTAEQILKKATANGQVRGISLRLPTIFGETTAQGA
                                     K153T
FLA-ALMARISTAFAHGGRLEL-SVADARRDFIDVRDVAQA--VVRAGRPAVGG-LVVN
NHDRGVVSSMARRALDGQALTIWGDGSVRRD VVHVEDVAAAFTAALANPDSL VGGHWLIG

IGRGDAV-PIGDLVGW-LLEAAAFPEDRVDRREAPVRSKGGDWTRLDI--GRARRLLSWA
AGRGDQLGEIFRLVAREVAEQTGQRPEVETCV EPPSHAPEMDFRSVTIDSSPFRAVTGWR
                                     C270R
PRIGLFD SVHSMWRTAHGAPA-----
PEISLSEGVRRRTVAALTTSVHGKARA
                                     E306D

```

図7 非天然型抗生物質の生産性を向上させるアミノ酸置換

2. 2. 5. 3 放線菌による「非天然型」抗生物質の生産検討

ケトレダクターゼ遺伝子破壊株に導入した5種のエピ型ケトレダクターゼ遺伝子は *ermE** プロモーター制御下で染色体上の *attB* 部位に挿入していたが、遺伝子を挿入する位置及び遺伝子発現制御の効果を検討するため、相同組換えにより *A. orientalis* 由来 *evaE* 遺伝子を天然型抗生物質A生合成遺伝子クラスター中のケトレダクターゼ遺伝子と置換するためのプラスミド pDaEva を構築した。図8に示すように、このプラスミドを使用して *evaE* 遺伝子を天然型抗生物質A生合成遺伝子クラスター中のケトレダクターゼ遺伝子部位に配置した菌株を取得し、非天然型抗生物質Bの生産性を調べた結果、*ermE** プロモーター制御下で *attB* 部位に挿入した場合と比較して非天然型抗生物質Bの生産量が約1.2倍に向上した。

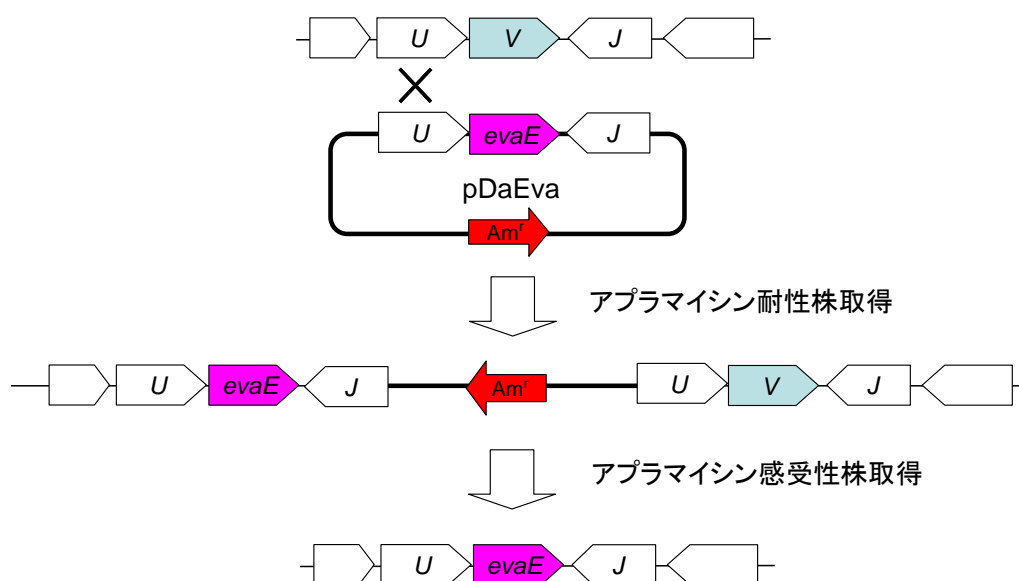


図8 相同組換えによるケトレダクターゼ遺伝子と *evaE* 遺伝子の置換

天然型抗生物質A合成遺伝子クラスター中のケトレダクターゼ遺伝子部位で *A. orientalis* 由来 *evaE* 遺伝子のコピー数を増加させた場合の効果調べることを目的に、*evaE* 遺伝子を2コピー直列に配置した組換え体を構築した。生産性を評価した結果、1コピーだけ配置した菌株と比較して約160%の生産性を示し、*evaE* 遺伝子のコピー数を向上させることによって生産性が向上することを見出した。

次に、同様の方法で *evaE* 遺伝子のコピー数を4コピーとした組換え体を構築して評価した。その結果、フラスコ培養では2コピーの組換え体と比較して生産性が向上する傾向が認められたが、ジャー培養では10日目以降の生産性が2コピーの組換え体よりも低迷する結果となった。

次に、非天然型抗生物質B合成遺伝子クラスターの中には、遺伝子発現制御遺伝子として2種の遺伝子(NとI)が存在していることに着目し(図9)、これら制御遺伝子を構成的且つ強力なプロモーターである *ermE**プロモーター制御下に配置し、染色体の *attB* 部位に挿入した。得られた組換え体についてフラスコ培養で評価した結果、N遺伝子を発現させた組換え体においてベクターのみを導入したコントロールに対して115%の生産性を示した。しかし、これらの組換え体をジャー培養で評価した結果、培養初期はN遺伝子を発現させた組換え体の生産性が親株を上回ったが、最終的には親株の方が生産性が高い結果となり、N遺伝子を強制発現させるメリットを見出すことはできなかった。

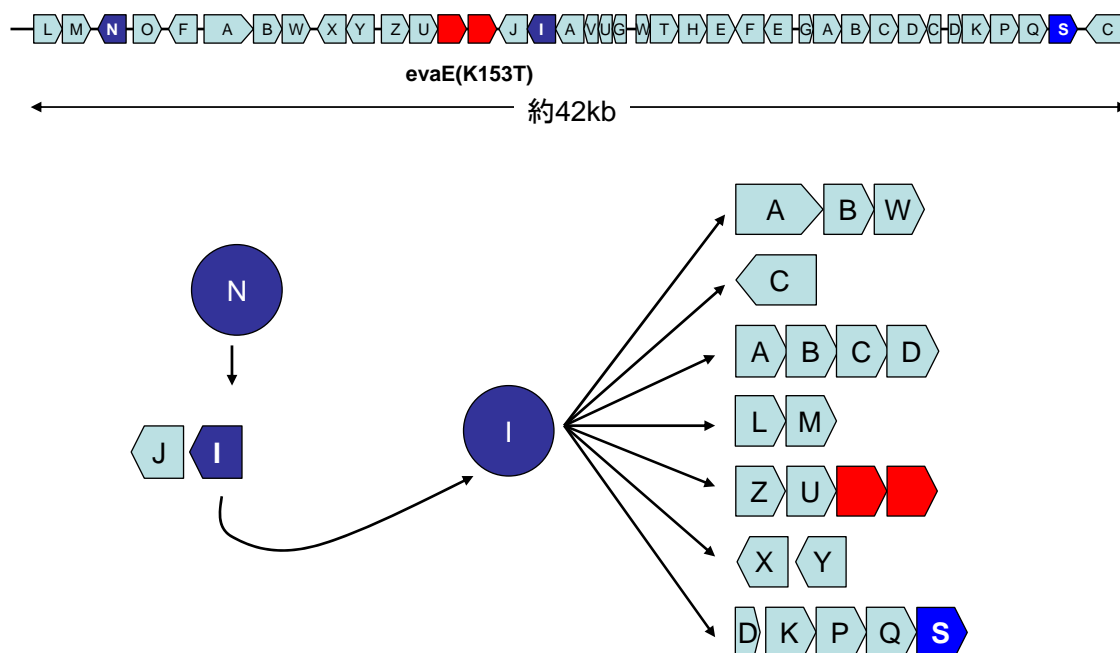


図9 非天然型抗生物質 B 生合成遺伝子クラスターの構造と制御遺伝子

次に、非天然型抗生物質B生合成遺伝子クラスター全体を増幅させることを目的に、生合成遺伝子クラスター全体を含み、放線菌に接合伝達可能なプラスミド pEPI-01 を構築した(図10)。

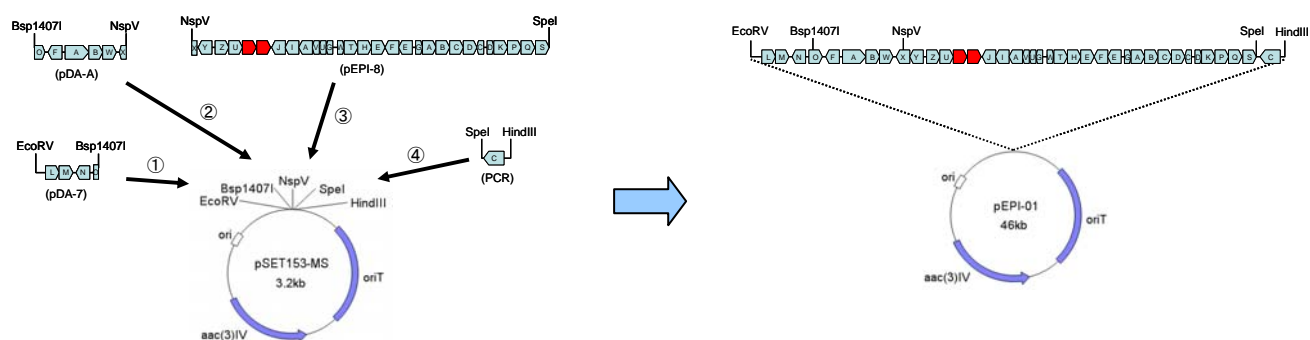


図10 非天然型抗生物質B生合成遺伝子クラスターを含むコスミド pEPI-01 の構築

本プラスミドを、ケトレダクターゼ遺伝子部位に *evaE* 遺伝子を 2 コピー直列に配置した非天然型抗生物質B生産菌に接合伝達で導入した。サザン解析により生合成遺伝子クラスターが導入されたことを確認した後、各菌株をプラスコ培養で評価した結果、生合成遺伝子クラスター全体の増幅により生産性が 1.2 倍に向上した。本組換え体をジャー培養で評価した結果、培養の途中の時期ではあるものの、非天然型抗生物質Bの生産速度が 175mg/L/D に達し、最終目標 (200mg/

L/D)をほぼ達成することができた。これまでの生産性向上検討の結果をまとめると(図11)、*S. mycarofaciens* 由来の *orf29* 遺伝子を利用して非天然型抗生物質Bの発酵生産を確認できて以来、約 50 倍に培養生産性が向上したことになる。

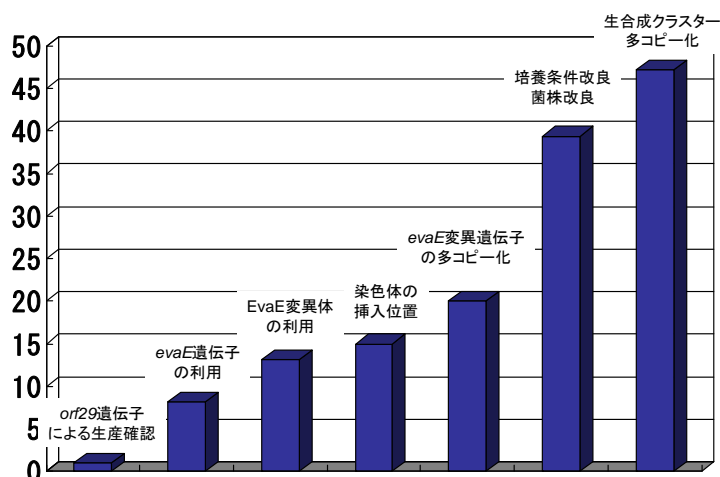


図11 非天然型抗生物質Bの培養生産性向上

2. 2. 5. 4 二次代謝産物生合成の制御技術の開発(東京大学と共同研究)

放線菌の二次代謝は、複雑な機構により制御されている。炭素源、窒素源などの栄養条件以外に、自身の生産する γ -ブチロラクトンによるスイッチング機構やタンパクのリン酸化を介した制御が絡み合っており、これらを統括的に理解することが二次代謝産物の生産量を上げるために必須である。ストレプトマイシン生産菌である *Streptomyces griseus* の γ -ブチロラクトンおよびタンパクリン酸化の二次代謝への制御を明らかにすべく、全ゲノム配列に基づいた DNA マイクロアレイの実験条件を確立した。DNA マイクロアレイを利用して明らかになった A-ファクター制御下にある約 600 遺伝子を順次、破壊・過剰発現し、それらの機能の同定を進めた。そのうち、ストレプトマイシン生産の制御を行う AtrA を同定し、*strR* 制御遺伝子を介するその制御機構を解明した。さらに形態分化に関する *whiB* 関連遺伝子7種につき、破壊・過剰発現から2種の重要な遺伝子を同定した。また、*S. griseus* ゲノム上の small non-coding RNA を 12 種全てを検出し、それらの破壊を行ったが、単独の破壊では二次代謝、形態分化いずれにも影響は観察されなかった。

一方では、 γ -ブチロラクトンの全生合成経路を明らかにした。本成果は、長年待ち望まれていた課題を解決したことになり、放線菌の二次代謝研究に大きなインパクトを与えた。

また、*S. griseus* で A-ファクターに直接制御されるグリキサゾン生合成につき、その制御機構の全貌を明らかにした。

更に、放線菌の二次代謝をグローバルに制御する蛋白質リン酸化系、AfsK/AfsR/AfsS、につき、転写因子 AfsR がいかに *afsS* のプロモーターを活性化するかの詳細を明らかにできた。AfsR は、放線菌の経路特異的転写因子 (SARP: *Streptomyces* antibiotic regulatory protein) の一員でもあり、この成果はこれまで不明であった SARP の転写活性化機構を説明でき

たことになる。

また、二次代謝、形態分化に及ぼすグルコース抑制については、その本質を担うと推定されるグルコースキナーゼの機能解析を中心に研究を進めた。グルコースキナーゼは制御領域と酵素触媒部位を有する”bifunctional”な酵素であると考えられていたため、その立体構造をX線結晶構造解析で解いた。一方、グルコース抑制を受ける β -ガラクトシダーゼ遺伝子を同定することに成功し、本遺伝子の転写解析によりグルコース抑制の程度を直接的に捉えることが可能になった。その結果、*Rhodococcus* 由来のグルコースキナーゼを用いた解析において、グルコースキナーゼ活性とカタボライト抑制能がある程度相関していることが明らかになった。この結果は、従来の「グルコースキナーゼは制御領域と酵素触媒部位を有する “bifunctional” な酵素である」という考えと合致しないものである。

2. 2. 5. 5 コンビナトリアル生合成技術の開発(東京大学と共同研究)

非微生物産物であるフラボノイドやイソフラボノイドを微生物を用いた発酵により生産させるため、「人工的生合成遺伝子クラスター」を構築し、大腸菌に導入した。生産量を上げるというよりは、より多くの化合物を生産させることに集中して取り組んだ。その結果、天然型である各種フラボノイド、フラボン、フラボノールの発酵生産に成功し、さらに種々の前駆体を投与することにより、非天然型化合物の生産にも成功した。また、大腸菌と酵母を組み合わせることにより、イソフラボンの生産にも成功した。一方、ワインに含まれるポリフェノールとして知られるレスベラトロール及びその誘導体をチロシンから発酵生産することにも成功した。さらに、イネから発見したクルクミノイド合成酵素を用い、大腸菌でチロシンやフェニルアラニンからクルクミノイド類を効率よく発酵生産させることに成功した。アミノ酸の代わりに種々のカルボン酸を投与すると、効率良く「非天然型」クルクミノイドが生産された。更に、クルクミノイド合成酵素、酵母由来の脂肪酸 β 酸化酵素群等を利用した大腸菌でのジゲロールアナログ生産系も構築できた。ウコンの根で生産されるクルクミン(カレーの黄色色素の本体)に代表されるクルクミノイドは、種々の生理活性を有することから大変注目を集めている化合物である。

一方、人工的生合成遺伝子クラスターの一員として用いるためのIII型ポリケタイド合成酵素を各種微生物や植物に求め、放線菌、カビ、イネが有するいくつかの遺伝子につき、その酵素反応機構を明らかにした。窒素固定細菌である *Azotobacter vinelandii* のIII型ポリケタイド合成酵素は、包囊の脂質成分として必須なレゾシノール(フェノール性長鎖脂質)の生合成に与ることを明らかにした。また、一方、イネゲノムからレゾシノール生合成酵素2種、カルコン合成酵素2種を同定し、それらの反応を解析した。レゾシノール合成酵素は、放線菌、枯草菌をはじめとする多くの微生物で見出され、一連の研究成果は、生物の膜脂質研究の一方向性を示したものとして評価されている。

更に、コンビナトリアル生合成に応用可能な酵素遺伝子の探索のため、いくつかの化合物の生合成研究を行ってきた。その結果、放線菌の4-ヒドロキシ-3-ニトロソベンズアミド生合成経路を解明するとともに、芳香族アミンのニトロソ化に関わる新規酵素を見出した。さらに、4-ヒドロキシ-3-

ニトロソベンズアミド生合成経路と一部類似したフェロベルディン生合成経路を明らかにし、興味深い反応を触媒する酵素を新たに複数取得するとともに、経路の改変によって新規フェロベルディンの生産にも成功した。一方、稀少放線菌の新規テルペノイドキノン生合成経路を明らかにした。

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

区分 年度	特許出願			論文		その他外部発表（プレス発表等）
	国内	外国	PCT [※] 出願	査読付き	その他	
H18FY	0件	0件	0件	6件	0件	11件
H19FY	1件	0件	0件	7件	0件	15件
H20FY	0件	0件	1件	8件	0件	31件
H21FY	1件	0件	0件	13件	0件	15件
H22FY	0件	0件	1件	8件	0件	21件

（※ Patent Cooperation Treaty : 特許協力条約）

2. 2. 6発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発

(独立行政法人製品評価技術基盤機構)

2. 2. 6. 1 *R. opacus* B4株の培養条件の検討

R. opacus B4株による非水系バイオプロセスの実現のため、通常の培養方法及び有機溶媒を菌体に接触させる培養方法を検討した。*R. opacus* B4株の水系培養菌体、有機溶媒重層培養菌体及び有機溶媒接触菌体を採取し、網羅的プロテオーム解析を実施した。網羅的プロテオーム解析結果に基づき、水系培養に比べて、有機溶媒重層培養菌体に発現するタンパク質を確認し、有機溶媒耐性株の性質や有機溶媒耐性機構解明のための発現タンパク質リストを作成した。

(1)解析対象菌株

解析対象菌株①～③までの3株である。

- ① *R. opacus* B4 有機溶媒耐性株(大阪大学保存株)
- ② *R. opacus* B4 有機溶媒耐性劣化株(NITE保存株)
- ③ *R. opacus* B4 有機溶媒耐性欠損株(広島大学SigB破壊株)

(2)培地

R. opacus B4有機溶媒耐性株 通常培養(24時間後採集)、有機溶媒耐性劣化株 通常培養(24時間後採集)及び有機溶媒耐性欠損株 通常培養(24時間後採集)の培地は、コスト、生産物質の精製及び発酵タンク内に栄養源の投入が簡便である単純培地とした。なお、有機溶媒耐性株 有機溶媒接触培養(24時間後、オレイルアルコール8時間接触)については富栄養培地とした。

(3)培養結果

培地と菌体を培養フラスコに入れ、回転培養を実施した。*R. opacus* B4有機溶媒耐性株の単純培地による培養結果を図-1に示す。培養の結果、*R. opacus* B4株は、対数増殖期が24時間後に終了し定常期に移行した。

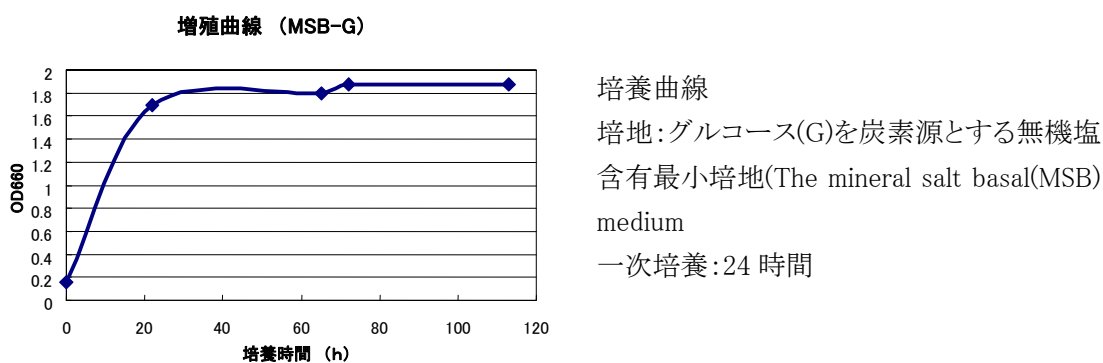


図-1 *R. opacus* B4有機溶媒耐性株増殖曲線

R. opacus B4有機溶媒耐性株及び*R. opacus* B4有機溶媒耐性劣化株の有機溶媒耐性を確認するため、トルエン及びデカンの気相接触培養を実施した。培養の結果、*R. opacus*

B4有機溶媒耐性劣化株は、デカンの気相接触培養については単純培地による通常培養と同様な増殖が認められたが、トルエンの気相接触培養については増殖が認められなかった(図-2)。一方、トルエンの気相接触培養では*R. opacus* B4有機溶媒耐性株のトルエン耐性が高かった(図-2)。このことから、*R. opacus* B4有機溶媒耐性劣化株は、何らかの作用により、有機溶媒耐性が劣化しているものと考えられた。よって、*R. opacus* B4有機溶媒耐性株及び*R. opacus* B4有機溶媒耐性劣化株のプロテオーム解析の結果を比較検討することで、有機溶媒耐性機構の解明に有効なデータが得ることとした。

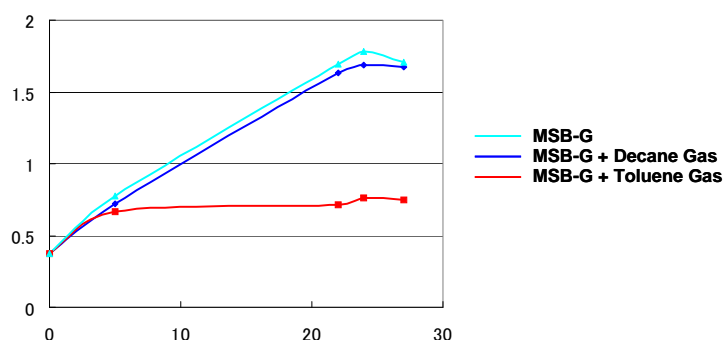
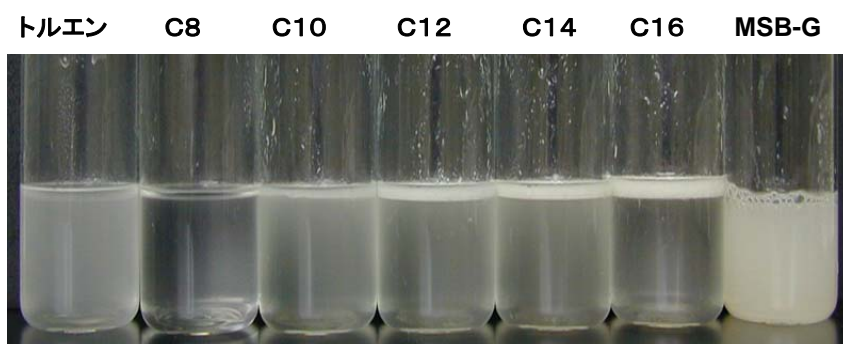


図-2 有機溶媒耐性劣化株の有機溶媒気相接触培養増殖曲線

広島大学において、*R. opacus* B4のSigB破壊株が有機溶媒耐性を欠損することが発見された。有機溶媒耐性機構の解明のため、*R. opacus* B4のSigB破壊株を*R. opacus* B4有機溶媒耐性欠損株として培養を行った。培養の結果、通常の水系培養では、*R. opacus* B4有機溶媒耐性株と同様の増殖を示した。*R. opacus* B4有機溶媒耐性株及び*R. opacus* B4有機溶媒耐性欠損株のプロテオーム解析の結果を比較検討することで、有機溶媒耐性機構の解明に有効なデータが得られる。

(4) 非水系バイオプロセス用有機溶媒の選定及び培養

有機溶媒耐性機構解明及び非水系バイオプロセスにおける菌体の挙動把握のため、重層する有機溶媒の種類について検討を行った。有機溶媒は、直鎖状アルカン(C8~16)及びオレイルアルコールを重層し培養を実施した。培養の結果、C12以上であれば溶媒中で良好に増殖することを確認した(図-3)。また、オレイルアルコールが菌体への影響が少なく、原料溶解性が高いことが判明したため、模擬的な非水系バイオプロセス用の重層溶媒はオレイルアルコールに決定した。



図－3 非水系バイオプロセス用有機溶媒の選定培養結果

模擬的な非水系バイオプロセスである有機溶媒重層ジャーフェーマンターによる培養を行った。培養の結果、*R. opacus* B4 有機溶媒耐性株は、オレイルアルコール重層による二相系培養では増殖することが確認された(図－4)。ただし、トルエンでは死滅することが確認された。



図－4 有機溶媒重層ジャーフェーマンターによる *R. opacus* B4 有機溶媒耐性株培養

2. 2. 6. 2 *K. rhizophila* DC2201 株の培養条件の検討

K. rhizophila DC2201 株による非水系バイオプロセスの実現のため、通常の培養方法及び有機溶媒を菌体に接触させる培養方法を検討した。*K. rhizophila* DC2201 株は、有機溶媒中で使用できる生体触媒として利用が期待されており、*K. rhizophila* DC2201 株の水系培養菌体及び有機溶媒接触菌体を採集し、網羅的プロテオーム解析を実施する。網羅的プロテオーム解析結果に基づき、水系培養に比べて、有機溶媒接触菌体に発現するタンパク質を確認し、有機溶媒耐性株の性質や有機溶媒耐性機構解明のための発現タンパク質リストを作成する。

(1) 解析対象菌株

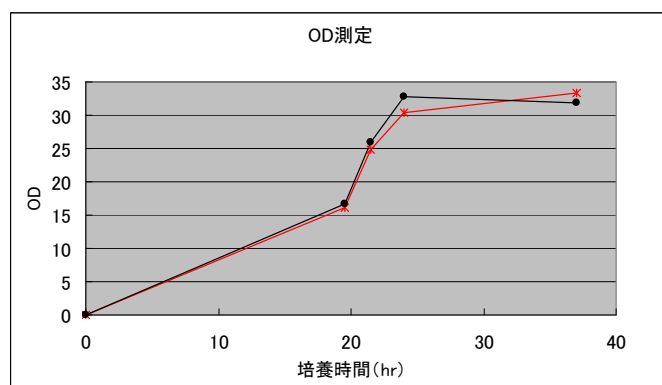
Kocuria rhizophila DC2201 ダイセル保存株 (NBRC1032170株と16Sで同等性を確認した。)

(2) 培地

培地は、*K. rhizophila* DC2201株の培養のためダイセルが検討した富栄養培地を用いた。

(3) 培養結果

K. rhizophila DC2201株の富栄養培地による培養結果を図-5に示す。培地と菌体を培養フラスコに入れ、回転培養を実施した。培養の結果、*K. rhizophila* DC2201株は、対数増殖期が24時間後に終了し定常期に移行した。



一次培養: 24 時間
酢酸エチル時間: 8 時間

図-5 *K. rhizophila* DC2201株増殖曲線

(4) 非水系バイオプロセス用有機溶媒の選定及び培養

有機溶媒耐性機構解明及び非水系バイオプロセスにおける菌体の挙動把握のため、重層及び接触させる有機溶媒の種類について検討を行った。8種類の有機溶媒に対する耐性を検討したところ、エタノール、イソプロパノール、ブタノール、酢酸エチル、オレイルアルコールの5種類の有機溶媒に実用的な耐性が認められた。酢酸ブチル、トルエン、ヘキサンの3種類の有機溶媒には実用的な耐性が認められなかった。汎用性や実用化を目指しているマンデル酸の製造を考慮し、接触有機溶媒は酢酸エチルとした。

K. rhizophila DC2201株を定常期まで培養し、その菌体を酢酸エチルに8時間接触させ、プロテオーム解析用菌体を得た(図-5)。

K. rhizophila DC2201株の物質変換を工業的に行うことを模擬した培養系による菌体の採集を実施した。*K. rhizophila* DC2201株は、菌体を生体触媒として用いることが研究されており、マンデル酸生産条件下の培養条件で菌体採集を実施した。模擬的な非水系バイオプロセスである有機溶媒重層ジャーファーメンターによる培養を行った(図-6)。培養の結果、*K. rhizophila* DC2201株有機溶媒耐性株は、酢酸エチル重層による二層系培養では菌体は増殖することはないが、生存しており、二層系培養の可能性が示された。

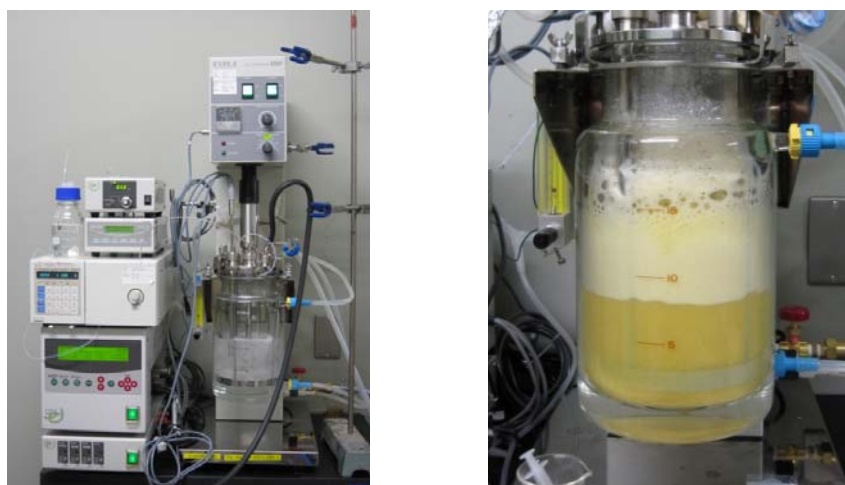


図-6 有機溶媒重層ジャーフェンターによる *K. rhizophila* DC2201 株の培養

2. 2. 6. 3 ショットガン法による網羅的プロテオーム解析

各培養により採集された菌体からタンパク質を抽出し、一次元電気泳動法 (SDS-PAGE) を用いタンパク質を分離した。分離されたタンパク質を酵素消化し、高速液体クロマトグラフィー・エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析法 (LC-ESI-MS/MS) でペプチド断片を検出した。

(1) *R. opacus* B4株のショットガン法による網羅的プロテオーム解析結果

①有機溶媒耐性株 通常培養 (24時間後採集)

1,966種のタンパク質を検出した。*R. opacus* B4の総遺伝子8,366の23.5%に当たる。

②有機溶媒耐性劣化株 通常培養 (24時間後採集)

2,541種のタンパク質を検出した。*R. opacus* B4の総遺伝子8,366の30.4%に当たる。③

有機溶媒耐性欠損株 通常培養 (24時間後採集)

2,198種のタンパク質を検出した。*R. opacus* B4の総遺伝子8,366の26.3%に当たる。

④ 有機溶媒耐性株 有機溶媒接触培養 (24時間後、オレイルアルコール8時間接触)

1,997種のタンパク質を検出した。*R. opacus* B4の総遺伝子8,366の23.9%に当たる。

(2) *K. rhizophila* DC2201のショットガン法による網羅的プロテオーム解析結果

①通常培養 (24時間後採集)

1,118種のタンパク質を検出した。*K. rhizophila* DC2201の総遺伝子2,356の47.5%に当たる。

②有機溶媒接触培養 (24時間培養後酢酸エチル5%添加、8時間接触後採集)

972種のタンパク質を検出した。*K. rhizophila* DC2201の総遺伝子2,356の41.3%に当たる。

③有機溶媒接触培養 (22時間後採集、酢酸エチル3%含有培地)

1,146種のタンパク質を検出した。*K. rhizophila* DC2201の総遺伝子2,356の48.6%に当たる。

④物質変換系培養 (ジャーフェンター通常培養、16時間後採集)

994種のタンパク質を検出した。*K. rhizophila* DC2201の総遺伝子2,356の42.2%に当たる。

⑤質変換系培養(ジャーファーメンター通常培養、12時間培養後酢酸エチル5%添加、4時間接触後採集)

1,098種のタンパク質を検出した。*K. rhizophila* DC2201の総遺伝子2,356の46.6%に当たる。

⑥物質変換系培養(マンデル酸生産条件菌体:生体触媒反応系)

919種のタンパク質を検出した。*K. rhizophila* DC2201の総遺伝子2,356の39.0%に当たる。

2. 2. 6. 4 ペプチドマスーフインガープリント法による網羅的プロテオーム解析

各培養により採集された菌体からタンパク質を抽出し、二次元電気泳動法(2D-PAGE)を用いタンパク質を分離した(図-7、8)。分離されたタンパク質を酵素消化し、マトリックス支援イオン化飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF-MS)でペプチド断片を検出した。

(1) *R. opacus* B4株のペプチドマスーフインガープリント法による網羅的プロテオーム解析結果

①有機溶媒耐性株 通常培養(24時間後採集)

432種のタンパク質を検出した。

②有機溶媒耐性劣化株 通常培養(24時間後採集)

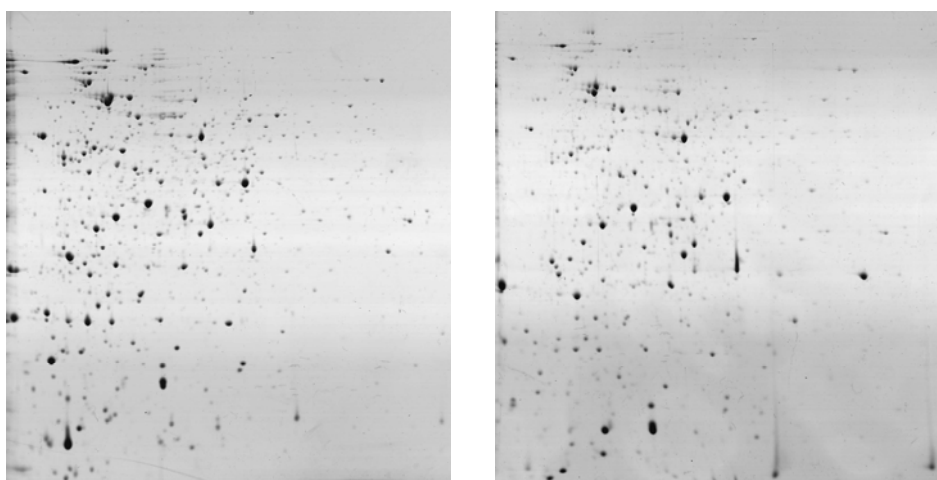
475種のタンパク質を検出した。

③有機溶媒耐性欠損株 通常培養(24時間後採集)

468種のタンパク質を検出した。

④有機溶媒耐性株 有機溶媒接触培養(24時間後、オレイルアルコール8時間接触)

467種のタンパク質を検出した。



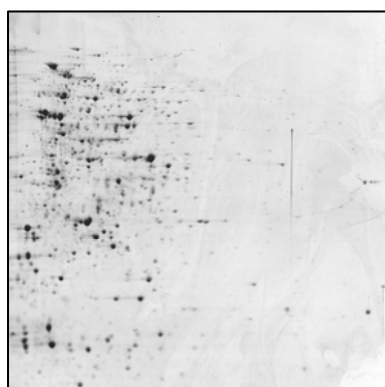
有機溶媒耐性結果株

有機溶媒耐性株

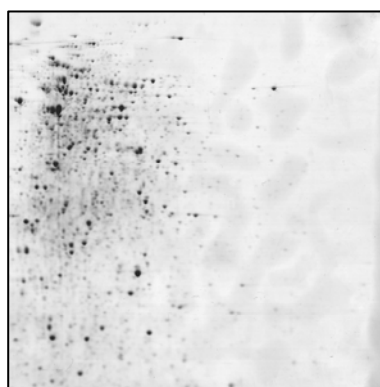
図-7 *R. opacus* B4の2次元電気泳動画像

(2) *K. rhizophila* DC2201のペプチドマスマスーフインガープリント法による網羅的プロテオーム解析結果

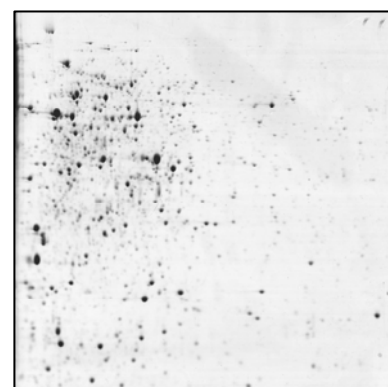
- ①通常培養(24時間後採集)
289種のタンパク質を検出した。
- ②有機溶媒接触培養(24時間培養後酢酸エチル5%添加、8時間接触後採集)
271種のタンパク質を検出した。
- ③有機溶媒接触培養(22時間後採集、酢酸エチル3%含有培地)
293種のタンパク質を検出した。
- ④物質変換系培養(ジャーファーマンター通常培養、16時間後採集)
241種のタンパク質を検出した。
- ⑤物質変換系培養(ジャーファーマンター通常培養、12時間培養後酢酸エチル5%添加、4時間接触後採集)
239種のタンパク質を検出した。
- ⑥物質変換系培養(マンデル酸生産条件菌体:生体触媒反応系)
174種のタンパク質を検出した。



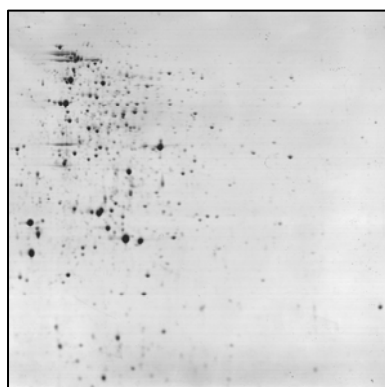
①通常培養



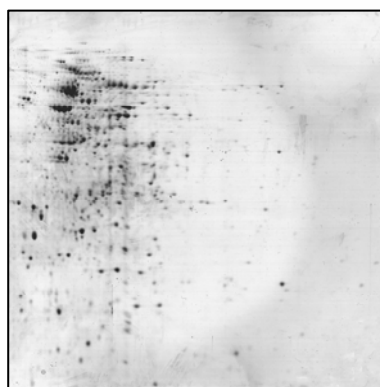
②有機溶媒接触培養



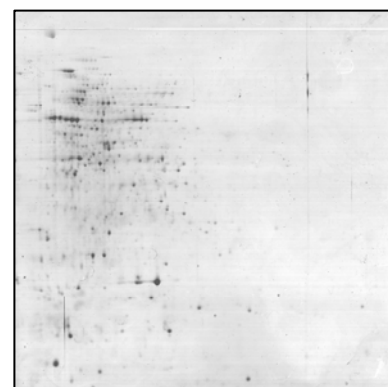
③有機溶媒接触培養



④物質変換系培養



⑤物質変換系培養



⑥物質変換系培養

図－8 *K. rhizophila* DC2201の2次元電気泳動画像

2. 2. 6. 5 エドマン分解法による有機溶媒耐性重要遺伝子の翻訳開始位置の決定

有機溶媒耐性機構の解明に重要と思われるタンパク質についてエドマン分解法による解析を行った。

(1) *R. opacus* B4 のエドマン分解法によるプロテオーム解析結果

172種の発現タンパク質を検出し、同定及びN-末端アミノ酸配列を決定した。遺伝子翻訳位置の割合はATG:68.0%, GTG:31.4%, GGA:0.6%であった。他の生物種に比べて特異的であることから、有機溶媒耐性への関連が示唆された。

(2) *K. rhizophila* DC2201 のプロテオーム解析結果

73種の発現タンパク質を検出し、同定及びN-末端アミノ酸配列を決定した。特に遺伝子翻訳位置の割合に特徴は見られなかった。

2. 2. 6. 6 膜タンパク質のプロテオーム解析技術の開発

有機溶媒耐性菌の有機溶媒耐性は、膜タンパク質が重要な役割をはたしていると考えられている。菌体破砕物からタンパク質を抽出するため、細胞膜類似構造の特殊両性界面活性剤(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate(CHAPS))及びジスルファイド結合(-S-S-)を開裂させ、タンパク質の立体構造を破壊する還元剤(Dithiothreitol(DDT))を同時に混合させるタンパク質溶解方法を新たに開発した。また、タンパク質を沈殿させるため、アセトンを加える条件を最適化した。他種類のタンパク質混合物である抽出液を強力なタンパク質溶解効果をもつ界面活性剤(Sodium *n*-dodecyl sulfate(SDS))を含有させる一次元電気泳動法(SDS-PAGE)にて分離・精製した。これにより、難溶性タンパク質も溶解させたまま分離・精製し、プロテオーム解析対象とすることが可能となった。

K. rhizophila DC2201株は、有機溶媒耐性機構が膜構造にあるとされ、強固であると想定されている。膜タンパク質を検出するため、菌体破砕方法として、従来の超音波式に変えて、高流速オリフィス式に変更し細胞破砕を実施した。

R. opacus B4及び*K. rhizophila* DC2201のショットガンプロテオーム法の結果では、有機溶媒排出ポンプとして機能している膜タンパク質をそれぞれ50種類以上検出することができた。しかし、検出した膜タンパク質のペプチド断片の位置を解析したところ、膜外部分に偏っていることが判明した。

2. 2. 6. 7 データ解析及び提供

(1) *R. opacus* B4株のデータ解析結果

R. opacus B4の有機溶媒耐性株及び耐性が減少した有機溶媒耐性劣化株の網羅的プロテオーム解析結果に基づき、水系の通常培養に比べて、有機溶媒重層培養菌体に発現するタンパク質を確認し、有機溶媒耐性株の有機溶媒重層培養時の性質や有機溶媒耐性機構解明のための発現タンパク質リストを作成した。

有機溶媒耐性株及び有機溶媒耐性劣化株の間で発現量に変動しているタンパク質の

解析結果から、変動タンパク質の機能分類を実施した。代謝変動の詳細をさらに明らかにするため、代謝パスウェイごとに構成遺伝子の発現の増減について解析を行った。結果として、有機溶媒に対してより高い耐性を示す有機溶媒耐性株は、有機溶媒耐性劣化株に比べて代謝系の発現が顕著であることが明らかになった。

R. opacus B4 株の SigB 遺伝子を破壊し有機溶媒耐性が無くなった有機溶媒耐性欠損株から検出した約 2,200 種の発現タンパク質及び二次元電気泳動の結果を解析したところ、*R. opacus* B4 の有機溶媒耐性株と類似のタンパク質発現状況であることが明らかになった。有機溶媒耐性に関係あると考えられている膜構造関連遺伝子の発現もあることから、有機溶媒耐性欠損の理由は膜構造ではなく、SigB 関連遺伝子による代謝が関係していると考えられる。よって、有機溶媒耐性には SigB 関連遺伝子による代謝と膜構造による2種類が存在すると推察される。

網羅的プロテオーム解析の結果から *R. opacus* B4 の有機溶媒耐性と非水系バイオプロセスによる物質生産のためには、膜構造の構築が重要であることが判明した。*R. opacus* B4 を通常の培養により、細胞外膜に親油性層を形成させた後に、有機溶媒と接触させる非水系バイオプロセスを模擬した培養方法が大阪大学で開発された。その菌体を有機溶媒接触株としてプロテオーム解析を実施した。検出した約 2,000 種の発現タンパク質及び二次元電気泳動の結果を検討したところ、*R. opacus* B4 の有機溶媒耐性株と類似のタンパク質発現状況であることが明らかになった。しかし、代謝関連遺伝子の種類の減少及び発現量の減少が見られた。また、代わりに、有機溶媒排出ポンプとして機能している膜タンパク質の発現が見られた。代謝を抑えて、有機溶媒排出を行っている菌体状態と考えられる。SigB 等有機溶媒ショック対応遺伝子からのタンパク質が検出されていない理由については不明である。これらの結果は、*R. opacus* B4 の特徴である有機溶媒耐性機構の解明及びバイオプロセスにおける菌体状態の把握に重要な情報であると考えられる。

(2) *K. rhizophila* DC2201株のデータ解析結果

K. rhizophila DC2201 の定常期までの培養菌体から検出した約 1,120 種の発現タンパク質と有機溶媒接触(酢酸エチル 3%含有培地)させた約 1,150 種の発現タンパク質及び物質変換系培養菌体を解析したところ、有機溶媒接触株は、代謝関連遺伝子の種類の減少及び発現量の減少が見られた。また、代わりに、有機溶媒排出ポンプとして機能している膜タンパク質の発現が見られた。代謝を押さえて、有機溶媒排出を行っている菌体状態と考えられ、*R. opacus* B4 とほぼ同様の結果となった。

K. rhizophila DC2201 株の物質変換系が有望であり、網羅的プロテオーム解析の解析結果の発現タンパク質リストは、生体触媒として活用する際の触媒反応酵素群のリストと考えることもできる。現状の発現タンパク質リストからは、アリキル鎖の修飾に関する遺伝子が見つかっている。また、アルケン化の可能性のある酵素もあり、高分子材料の生合成の可能性も見いだされた。

これらの結果は、*K. rhizophila* DC2201 の特徴である有機溶媒耐性機構の解明及びバイオプロセスにおける菌体状態の把握に重要な情報であると考えられる。

(3) データの提供

R. opacus B4株のプロテオーム解析結果について、共同実施先である大阪大学及び広島大学に提供した。

K. rhizophila DC2201株のプロテオーム解析結果について、共同実施先であるダイセル化学工業株式会社に提供した。

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

区分 年度	特許出願			論文		その他外部発表（プレス発表等）
	国内	外国	PCT※出願	査読付き	その他	
H18FY	0件	0件	0件	0件	0件	0件
H19FY	0件	0件	0件	0件	0件	0件
H20FY	0件	0件	0件	0件	0件	0件
H21FY	0件	0件	0件	0件	0件	1件
H22FY	0件	0件	0件	0件	0件	0件

（※ Patent Cooperation Treaty : 特許協力条約）

2.3 バイオリファイナリー技術の開発

2.3.1 ソフトバイオマスの糖化技術の開発・増殖非依存型バイオプロセスの開発・トータルシステムの開発 (財団法人地球環境産業技術研究機構)

2.3.1.1 研究成果の概要

本プロジェクトでは、日本における経済性優位なるバイオリファイナリー産業の早期実現を目指し、独自の革新的なバイオプロセス「増殖非依存型バイオプロセス」をコア技術として、ソフトバイオマス由来の糖を原料とした基幹化学物質製造プロセスの工業化技術の研究開発を行った。本技術開発は、ソフトバイオマスから糖を調製する糖化技術の開発((1)ソフトバイオマス糖化技術の開発)と糖から基幹物質を製造する糖変換技術の開発((2)増殖非依存型バイオプロセスの開発)に分けて実施し、また、双方の技術を連結したトータルシステムの開発((3)トータルシステムの開発)を平成19年度より実施した。平成20年度後半より、増殖非依存型バイオプロセスのスケールアップ時の反応条件の最適化を検討した((4)ベンチプラントによる実証試験)。

「(1)ソフトバイオマス糖化技術の開発」に関わる基盤研究として、カリフォルニア大学デービス校に「(1)(a)-1. セルロソーム構造の発現、機能解析」を、石川県立大学に「(1)(a)-2. スーパーセルラーゼの創製」を、かずさDNA研究所に「(1)(a)-3. メタゲノム的手法によるバイオリファイナリー酵素の開発」を再委託して実施した。「(2)増殖非依存型バイオプロセスの開発」に関わる基盤研究として、北海道大学に「(2)(a)-2-5. *C. glutamicum*におけるピルビン酸キナーゼ活性変異株の取得と解析」を、東京工業大学に「(2)(a)-5-4. コリネ型細菌 *C. glutamicum* の細胞増殖機構の解析」を再委託して実施した。

これまでに得られた成果により、糖化技術の開発では、高機能糖化酵素(セルロソーム)を活用したソフトバイオマスの高効率糖化プロセスの基盤要素技術を確立し、目標を達成した。また、糖変換技術の開発では、増殖非依存型バイオプロセスによる各種有用化合物の高効率生産の基盤要素技術を確立し、D-乳酸、L-アラニン、キシリトール、バリンについて目標生産性 10 g/L/hを上回る高効率生成システムを確立した。さらに、ソフトバイオマス由来の糖を原料としたバイオプロセスの工業化の重要課題である、C6糖とC5糖混合糖の同時利用技術を確立した。

(1)ソフトバイオマスの糖化技術の開発

セルロソームは、絶対嫌気性細菌の *Clostridium* 属細菌等に見出される蛋白質・酵素高次構造複合体であり、既存の *Trichoderma reesei* 等のセルラーゼに比べて蛋白質当たりの活性値が数十倍高いことが知られている。しかしながら、セルロソームを生成する絶対嫌気性細菌は極端に増殖が遅いことから、経済的なセルロソーム製造は困難である。本プロジェクトでは、この高機能糖化酵素の実用的な製造技術を確立することを目指し、有用工業微生物である *Corynebacterium glutamicum*(コリネ型細菌)によるセルロソーム生産(人工セルロソーム)の基盤技術開発を行った。

人工セルロソームにおけるセルラーゼ酵素の組み合わせをソフトバイオマスの分解に最適化するとともに、巨大な骨格蛋白質から酵素結合に必須ではないドメインの除去等による改良を加え、

新規骨格蛋白質を構築した。一方、高機能糖化酵素開発の基盤研究として、耐熱性セルラーゼの取得とその特性・構造の解明、酵素の耐熱性向上・活性向上技術の基盤となるライゲーションフリー・ランダム変異導入法の開発等を行った。また、高機能酵素遺伝子の取得方法としてメタゲノム的手法の基盤技術の開発および改良を行い、構築したメタゲノムライブラリーから得られた 28 種のセルラーゼ様遺伝子産物のセルラーゼ活性を確認し、4 個の新規酵素の特性を明らかにした。

Clostridium cellulovorans のセルロソームを構成するセルロース分解酵素の一つ (EngB) と骨格蛋白質の一部 (Cbpa) をコリネ型細菌において発現させ、細胞外に分泌されることを確認した。さらに、コリネ型細菌における異種蛋白質発現分泌系の効率化に利用するため、該細菌のゲノム情報解析に基づく分泌シグナルの探索を行った結果、106 種の新規分泌シグナルを確認し、このうち 31 種は既知分泌シグナルより高い分泌能を示した。また、高分泌能を示す変異株を取得し、新規分泌シグナルの利用等と合わせて、これまでのコリネ型細菌による異種蛋白質分泌量を大きく上回る高効率分泌システムを確立した。

高効率糖化プロセスの開発として、酵素再利用法による連続糖化システムを構築し、市販酵素を用いたリグニン含有古紙の糖化では糖化率 80% を維持したまま、400 時間超の連続糖化を確認した。本技術を確立することにより酵素再利用による酵素コストの低減が可能となり、ソフトバイオマスの糖化プロセスの工業化に有用と考えられる。また、市販酵素にセルロソームを添加した場合の糖化能の相乗的な促進効果を確認した。

(2) 増殖非依存型バイオプロセスの開発

コリネ型細菌は還元条件下において増殖は停止するものの主要な代謝系は維持され機能する性質を持ち、さらに、非増殖条件下では増殖条件下よりも、細胞当りの代謝活性が高く、より高い物質生産能力を有する。本プロジェクトではこの増殖非依存型バイオプロセスに関連する細胞機能を解明し、その知見を利用して高度経済性を有するバイオリファインリーの実現に必要なバイオマス由来糖類からの各種化合物高効率生成システムの基盤技術開発を行った。

コリネ型細菌の物質代謝や細胞複製に関与する様々な遺伝子の機能および発現制御機構を明らかにした。これらの解析の結果、コリネ型細菌が中央代謝系の制御や細胞複製について、モデル微生物として研究の進んでいる大腸菌や枯草菌とは大きく異なるシステムとなっていることが明らかになった。また、糖代謝関連遺伝子の欠損株・高発現株の糖代謝活性の解析を行った。これらの知見に基づき非増殖条件下で糖消費速度が向上する遺伝子改変株が得られ、また、解糖系酵素の発現量の改変による糖代謝機能強化・生産性向上の基盤要素技術を確立した。

物質生産細胞の遺伝子発現レベルの最適化の検討を行う際に重要なツールとなる、ベクター系と誘導プロモーターの開発を行った。新規プラスミド 2 種を単離し、これと既存のプラスミド 4 種、抗生物質耐性遺伝子 7 種を利用して、計 42 種の共存可能なベクターを構築した。また、コピー数を数十から数百まで増加させたプラスミドを開発した。網羅的遺伝子発現制御機構の解析に基づき、各種プロモーターを利用した遺伝子発現誘導系を確立した。さらに、新規プラスミドにランダム

変異を導入してスクリーニングを行い、効率的な染色体組換えが可能な温度感受性プラスミドを開発した。

有用化合物高効率生成システムの基盤技術開発として、有機酸、糖アルコール、アミノ酸、の各種化合物の生産細胞の構築を行った。解糖系のピルビン酸から一段階の反応で生成する D-乳酸と L-アラニン生産株では、増殖非依存条件におけるコリネ型細菌の高効率糖変換能が良く反映され、この基盤技術の適用により高い生産性を確認した。D-乳酸の生産性は目標とする STY 10 g/L/h を大きく上回った。L-アラニンに関しては、生産経路の構築により糖代謝速度が野生株と比較して低下したが、アンモニアからのアミノ基の供与と解糖系酵素の強化により目標生産性を達成した。キシリトール生産株の構築では、xylose reductase (XR) 遺伝子の導入、XR の補酵素特異性の改変、キシリトール取り込み経路の破壊等に加え、下記グルコース-キシロース同時利用技術の確立により、目標生産性を達成し、本プロセスにおいて XR によるキシリトール生産に必要な補酵素再生が解糖系との共役により効率良く行われることを示した。中央代謝系の Key 代謝物から反応段数の多い分岐鎖アミノ酸バリンの生産株の構築では、これまでに開発した要素技術を基盤として、改良を重ね、競合代謝経路遺伝子の破壊、バリン生合成経路遺伝子の発現最適化、フィードバック阻害の解除、アミノ基供与の効率化、細胞内酸化還元バランスの調整、解糖系強化等を行い、目標生産性を達成した。

(3) トータルシステムの開発

バイオマスの有効利用のためには、通常、微生物が利用しやすいグルコースだけでなく、バイオマス由来の様々な C6 糖と C5 糖の混合糖を効率的に利用する必要がある。また、糖化過程で生じるフェノール類、フラン類、酸による発酵過程の阻害が大きな技術障壁となっている。後者に関しては、これら発酵阻害物質により細胞増殖は阻害されるが、増殖非依存型バイオプロセスでは発酵阻害物質の影響は極めて小さいことが示された。前者の混合糖利用に関しては、コリネ型細菌の各種糖類取り込み・代謝経路に関する解析により得られた知見に基づき、糖利用能改変の基盤技術開発を行った。C5 糖利用能を付与したコリネ型細菌を用いた増殖非依存型バイオプロセスにより、バイオマス由来の主要な糖類であるグルコース、キシロース、アラビノース3糖混合糖の完全同時利用を確認した。さらに、マンノース利用能を向上させた。コリネ型細菌で確立したこの混合糖利用技術は、幅広いバイオマス原料から各種有用化合物の高効率生産システムの構築を可能とし、他の工業微生物と比較して高い優位性を持つと考えられる。

糖化工程での混合糖液による基幹物質生産への影響を把握するため、モデル糖液のグルコースとキシリトール混合糖からのキシリトール生産に対する基質の量比の影響を明らかにした。上記混合糖の同時利用技術により、キシリトールの生産性が著しく向上することを確認した。また、バリン生産株にキシロースとアラビノース利用能を付与することにより、グルコース、キシロース、アラビノース3糖混合糖が同時利用され、高効率でバリンが生成することを確認した。

フラスコスケールレベルで古紙を原料として基幹物質の生産実験を行った。増殖非依存型バイオプロセスにより実糖化液中のグルコースとキシロース等を含む混合糖が同時利用され、高効率

で D-乳酸が生成することを確認した。

(4) ベンチプラントによる実証試験

増殖非依存型バイオプロセスのスケールアップの検討を行った。10 L 容量のジャーフェンターを用いて反応を行ったところ、フラスコスケールレベルと同等以上の生産性が得られた。

2. 3. 1. 2 研究成果の詳細

(1) ソフトバイオマス糖化技術の開発

ソフトバイオマスの高効率糖化に利用可能な高機能セルラーゼ(セルロソーム)生産技術の基盤研究開発と酵素コストの低減が可能な酵素再利用法による糖化システムの構築を行った。

(a) セルロソーム酵素遺伝子群の機能解析と遺伝子改良

高機能セルラーゼとしてセルロソームに着目した。セルロソームはセルラーゼと骨格蛋白質の高次構造複合体であり、絶対嫌気性 *Clostridium* 属細菌が細胞表層に生成し、既存の *Trichoderma reesei* 等のセルラーゼに比べて蛋白質当たりの活性値が数十倍高いことが知られている。しかしながら、絶対嫌気性細菌は極端に増殖が遅いことから、経済性あるセルロソームの製造は不可能とされていた。本プロジェクトでは、高活性セルロソームの経済性ある製造法の確立を目指し、コリネ型細菌等の工業微生物によるセルロソーム生産(人工セルロソーム)の基盤技術開発を行った。カリフォルニア大学デービス校で「(1) (a)-1. セルロソーム構造の発現・機能解析」を実施した。また、高機能糖化酵素の開発の基盤研究として、石川県立大学で「(1) (a)-2. スーパーセルラーゼの創製」、かずさ DNA 研究所で「(1) (a)-3. メタゲノム的手法によるバイオリファインアリー酵素の開発」を実施した。

(a)-1. セルロソーム構造の発現・機能解析

(カリフォルニア大学デービス校 Roy H Doi 教授)

Clostridium cellulovorans のセルロソーム画分のアニオン交換カラムからの溶出パターンと2次元ゲルクロマトグラフィーによる解析から、セルロソームがサブ集合体を含むことを示した。また、*C. cellulovorans* をセルロース(アビセル)、キシラン、ペクチン、コーンファイバーで生育し、セルロソーム画分と非セルロソーム画分を単離し、それぞれの活性を調べ、さらに、両画分の混合物の活性比較により、異なる炭素源で生育した細胞由来のセルロソームの間で相乗効果があるかどうか検証した。全ての場合で、相加的な活性が観察されたが、相乗効果は認められなかった。この結果はそれぞれの炭素源で生育した細胞内でセルロソーム活性の最大化がおこっていることを示唆しており、興味深い。

C. cellulovorans のセルロソームの構造と機能の解析により、大きなセルロソーム遺伝子クラスターに存在する *hbpA* を見出した。この遺伝子がコードする HpbA 蛋白質は2個のドメイン、surface layer homology (SLH) ドメインとコヘシンドメインを有していた。この遺伝子を大腸菌で発現させて、

機能解析を行った。その結果、HpbAは*C. cellulovorans*の細胞壁に結合し、また、EngBやEngLなどセルロソーム酵素に対しても結合能を有することが示された。HpbAとセルロソーム酵素複合体はアビセル、コーンファイバー、酸膨潤セルロースを分解した。これらの複合体はセルロソームに対して相補的に働くのではないかと考えられる。

セルロソーム酵素の sugar cane bagasse 分解に対する有効性を調べるため、XynA、ManA、EngEを大腸菌で発現精製し、それら単独および混合物の sugar cane bagasse、xylan、locust bean gum、carboxymethylcellulose (CMC) に対する活性を調べた。XynA:EngE:ManAを25%:24%:50%の比率で混合することにより sugar cane bagasse に対する相乗的なセルロソーム酵素活性が得られた。sugar cane bagasse に対する XynA:EngE の最適比率は75%:25%であった。これらの結果はセルロソーム酵素の最適な混合がバイオマス糖化に有用であることを示している。

ミニ骨格蛋白質のコヘシンの数がミニセルロソームの活性に影響を与えるかどうかを調べるため、コヘシンをそれぞれ1個、2個または4個含むミニ骨格蛋白質 CbpA を構築し、endoglucanase B (EngB)と混合し、活性に対する相乗効果がみられるかどうか解析した。興味深いことに、コヘシンの数が多いほど相乗的に活性が増加した。このことから、多くのコヘシンを持つ骨格蛋白質のターゲットサイトに酵素がより高濃度に配置されることにより、セルロソームの活性を促進することが示唆された。

(a)-2. スーパーセルラーゼの創製

(石川県立大学 熊谷英彦教授)

耐熱性のセルラーゼ類をさらに高耐熱性化、高活性化し、高温で効率よくセルロースを分解できるスーパーセルラーゼ類を創製することを目的として下記の研究を行った。

- i) 耐熱性カビ *Thermoascus aurantiacus* IFO9748 の β -グルコシダーゼ I の酵母での高発現と性質の解明 (Hong, J. et al. Appl. Microbiol. Biotechnol., 73, 80-88)。
- ii) 耐熱性カビ *T. aurantiacus* IFO9748 の β -グルコシダーゼ II の酵母での高発現と性質の解明ならびに有機溶媒による活性化機構の解明 (Hong, J. et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. 73, 1331-133.)。
- iii) 耐熱性カビ *T. aurantiacus* の β -グルコシダーゼ I の結晶化と構造解析
- iv) 耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* 由来 β -グルコシダーゼ(*KmBglI*)遺伝子の取得と性質の解明 (Yoshida, E., et al. Structural Biology and Crystallization Communications 65:1190-1192.)。
- v) 耐熱性酵母 *K. marxianus* 由来の β -グルコシダーゼの結晶化と構造解析 (Yoshida, E., Biochem. J. [k2]:431:39-49(本論文は、Nature Glycomics Gateway で紹介された))。
- vi) 耐熱性酵母 *K. marxianus* の耐熱性セルラーゼ類遺伝子発現株の分子育種 (Hong J., J. Biotechnol. 130, 114-123)。
- vii) 耐熱性や触媒活性向上のための変異導入技術の大腸菌におけるライゲーションフリー・ラ

ンダム変異導入法の開発 (Koyanagi, T., Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 72, 1134-1137.)。

viii) 耐熱性カビ由来の β -グルコシダーゼを発現させた組み換え酵母 *K. marxianus* によるセロビオースからの効率的エタノール生産(学会発表予定)

ix) 耐熱性酵母を用いる糖化・発酵・蒸留連続システムの開発(特許出願中)

(a)-3. メタゲノム的手法によるバイオリファイナリー酵素の開発

(かずさDNA研究所 大石道夫所長)

i) 環境中の微生物ゲノムの効率的取得方法の開発

環境試料より効率的に微生物ゲノムを単離する方法と、それを用いて単離した環境 DNA を、Phi29 ポリメラーゼを用いて効率的に増幅する方法を確立した。

ii) 効率的平均化ライブラリー構築技術及び効率的な遺伝子取得技術の開発

縮退プライマーによるPCRを行う際に耐熱性 RecA を加えることにより、非特異的な増幅が劇的に抑制されることを示した。

セルラーゼを含んでいる糖質加水分解酵素ファミリー6、ファミリー9、ファミリー12、ファミリー45、ファミリー48 の遺伝子に対し CODEHOP 法による縮退プライマーを作製した。これを用いて耐熱性 RecA を添加した PCR を行うことで、微生物菌株より 10 個の既知糖質加水分解酵素と 42 個の新規糖質加水分解酵素の遺伝子断片をクローニングした。更に、環境サンプルとして、海底土壌及び堆肥よりそれぞれ約 50 種と約 10 種の新規糖質加水分解酵素の遺伝子断片をクローニングした。

得られた新規糖質加水分解酵素遺伝子の断片の情報を用い、微生物菌株より 8 個の遺伝子の全長を、堆肥より 37 個の遺伝子の全長を取得した。この他に、2 個の酸化還元酵素様遺伝子、2 個のキシラナーゼ様遺伝子、及び 2 個のエステラーゼ様遺伝子を持つオペロンのクローニングを行った。

iii) メタゲノムライブラリーの構築及びそれを用いた有用蛋白質の単離

環境試料から得られた 37 種のセルラーゼ様遺伝子から作られる 28 種の酵素は、平板培地を用いたセルラーゼアッセイにより、そのほとんどが活性をもつことが明らかになった。更に微生物株およびメタゲノムより得られた 29 個の新規糖質加水分解酵素に関して大腸菌での発現系を構築した。そのうち 10 個に関して発現を行い、SDS ポリアクリルアミドゲルを用いた活性染色により、これら酵素はセルラーゼ活性を有していることが明らかになった。次に糖質加水分解酵素 GH45 ファミリーに属する新規酵素を 3 個、GH6 ファミリーに属する新規酵素を 1 個精製し、セルラーゼ活性を生化学的に調べた。

7 個のメタゲノムライブラリーを作製した。

(論文発表:1件、学会発表:国際学会:2件;国内学会:7件)

(b) 人工セルロソーム触媒の開発

セルロソームは、セルラーゼ、キシラナーゼ等、多種類の多糖分解酵素が細胞表層で骨格蛋白質と高次構造複合体を形成することにより、高いセルロース分解活性を示すと考えられている。ところが、セルロソーム生産菌は、嫌気性細菌であり、培養条件の煩雑さや生育速度が遅いなど好気性細菌と比べ物質生産菌として不向きである。本研究では、この高機能糖化酵素の実用的な製造技術を確立することを目指し、有用工業微生物であるコリネ型細菌によるセルロソーム生産(人工セルロソーム)の基盤技術開発を行った。

コリネ型細菌には菌体外における蛋白質分解酵素の活性がほとんど検出されないことなどから、高効率な異種蛋白質分泌生産系の宿主としての可能性が期待される。これまで、amylase、nuclease、protease、transglutaminase、subtilisin-like serine protease、epidermal growth factor、green fluorescence protein、protein glutaminaseなどがコリネ型細菌における異種蛋白質の分泌例として挙げられる。コリネ型細菌の分泌蛋白質として知られている S-layer protein 2(PS2)の分泌シグナルを利用したセルロソーム構成成分分泌生産用プラスミドを構築し、コリネ型細菌に導入して、分泌生産が可能であるかを検証した。その結果、セルロソーム構成セルラーゼ、endoglucanase B(EngB) 遺伝子導入株の培養液中からザイモグラフにより該セルラーゼを検出した。一方、セルロソーム骨格たんぱく質の一部(ミニ骨格蛋白質、CbpA) 導入株の培養液中から、特異抗体を用いたウエスタン解析により、該蛋白質を検出した。

一方、コリネ型細菌における異種蛋白質発現分泌系の改良の基盤となる分泌シグナルの探索を行った。異種蛋白質の分泌に用いる分泌シグナルとして、コリネ型細菌の分泌蛋白質として知られるPS2の分泌シグナルが良く用いられてきたが、目的蛋白質によっては成熟型蛋白質の分泌が十分に観察されないことが報告されている。そこで我々は、コリネ型細菌(R株)の全ゲノム配列から、分泌シグナル予想ソフトSignalPを用いて、405個の予想分泌シグナルを抽出した。これらの予想分泌シグナルを *Geobacillus stearothermophilus* 由来の α -アミラーゼに連結してコリネ型細菌に導入し、アミラーゼの分泌の検出により、分泌シグナルとして機能するか検証した。

405個の分泌候補シグナルによる分泌能の検証の結果、108個の分泌シグナルによるアミラーゼの分泌を確認した(うち106個は新規分泌シグナル)。Tat分泌経路欠損株を用いた解析や配列の特徴等によって、上記108個の分泌シグナル中、89個がSec型、11個がTat型、8個がLipo型シグナルであることが示唆された。同定された108個の分泌シグナル中、既知の分泌シグナルに対し分泌効率が優れているシグナルを同定するため、100 mLスケールで24時間培養し、分泌されるアミラーゼの活性を計測した。その結果、31シグナル(全て新規シグナル)で既知シグナル(PS2シグナル)を超える分泌効率を示した。このうちCgR0949シグナルはPS2シグナルに対して150倍以上高いアミラーゼ活性を示した(発表論文:Microbiology 155:741-750, 2009.)。得られた新規高効率分泌シグナルは green fluorescence protein(GFP)やセルロソーム構成セルラーゼ(EngBとEngL)の分泌においても、既知のPS2分泌シグナルと比較して、高い分泌能を示した。

また、高分泌能を示す変異株を取得し、新規分泌シグナルの利用等と合わせて、これまでのコリネ型細菌による異種蛋白質分泌量を大きく上回る高効率分泌システムを確立した。

(c) 高効率糖化プロセスの開発

ソフトバイオマス資源から糖類を生産する「酵素糖化プロセス」における、酵素コストの低減を目的として、“酵素再利用”による連続糖化プロセスを検討した。該プロセスは、バッチ糖化プロセスと比較して、“酵素再利用”による大幅な酵素コストの低減、と、生成糖の除去による生産物阻害の低減、が期待される。しかし、現有のバイオマス糖化プロセスについて“酵素再利用”による連続糖化プロセスの研究報告はほとんどなかった。我々は、リグニンを含まない上質古紙を対象として“酵素再利用”による連続糖化プロセスを確立し、酵素使用量の大幅削減によるコストダウンが可能となることを示していた。本プロジェクトでは、この技術をソフトバイオマスであるコーンストバーおよびリグニン含有古紙に適用することを目指し、特に古紙原料からの混合糖製造に関する早期工業化に向けて開発を行った。

ソフトバイオマスを“酵素再利用”による連続糖化プロセスに適応すると、リグニンを含まない上質古紙の場合と比較して、リグニンが含有しているため糖化率の低下と未分解残渣への酵素吸着が観察された。このことより、以下の課題が挙げられる。

- ①糖化率の向上;ヘミセルロース分解酵素の増強
- ②酵素回収技術の確立;未分解残渣からの酵素の回収

本研究開発では、ソフトバイオマス資源としてリグニン含有古紙パルプを目的基質として市販酵素 (Genencor 社製、GC220) を用いた連続糖化プロセスを構築し、滞留時間や酵素濃度等の反応条件が糖化反応に与える影響を調べた。また、追加酵素として、*Clostridium* 属細菌が生産するセルロソームを用いて、各種基質に対する分解活性を評価し、目的とするソフトバイオマスに対して最適な酵素系を検討した。

“酵素再利用”による連続糖化プロセスに市販酵素を用いて、各種ソフトバイオマスの糖化を検討した。上質紙パルプでは糖化率 90%以上を維持したまま 1,200 時間の連続糖化を確認した。また、リグニン含有古紙パルプでは糖化率 80%を維持したまま、400 時間超の連続糖化を確認した。酵素の安定性については上質紙パルプにおける糖化反応では反応上清中に大部分の酵素が遊離していることが確認された。また、リグニン含有古紙パルプの場合には残渣の蓄積と共に遊離酵素の減少が認められ、未分解残渣からの酵素の回収が今後の課題である。本技術を確立することにより酵素再利用による酵素コストの低減が可能となり、ソフトバイオマスの糖化プロセスの工業化に有用と考えられる。

一方、セルロソームの糖化能を評価するため、各種セルロースを炭素源として用いて *Clostridium thermocellum* の培養を行った。得られた培養上清から回収したセルロソームのソフトバイオマスに対する糖化について市販酵素と比較した。難分解性の結晶性セルロース基質であるアビセルの場合は、同一酵素量においてセルロソームの方が市販酵素より 50%程度糖化率が高かった。

また、本研究開発のターゲット・バイオマスであるリグニン含有古紙パルプの糖化では、セルロソームは市販酵素より糖化率が 20%程度高いことが認められた。さらに、市販酵素と併用した場

合、反応初期の糖化速度が 40%程度向上する相乗効果が認められた。これらの結果から、セルロソームを添加酵素として利用することにより、糖化プロセスの効率化が可能であることが示唆された。

(2) 増殖非依存型バイオプロセスの開発

コリネ型細菌は還元条件下において増殖は停止するものの主要な代謝系は維持され機能する性質を持ち、さらに、この非増殖条件下では増殖状態よりも、細胞あたりの代謝活性が高く、より高い物質生産能力を有する。増殖非依存型バイオプロセスでは高濃度菌体による反応が可能のため高生産速度(高 STY)が期待でき、増殖に伴う副生成物が少ないことより目的生産物の分離・精製工程の効率化が可能となる。この増殖非依存型バイオプロセスの構築により、高度経済性を有するバイオリファイナーを実現するための基盤技術開発を行った。本開発は「(a) 増殖抑制下における細胞機能の統合的解明」、「(b) 基幹物質生産細胞の創製」、「(c) 糖からの各基幹物質製造プロセスの確立」の3つの研究項目より構成される。

コリネ型細菌における糖変換能向上のための基盤研究として、北海道大学に「(a)-2-5. *C. glutamicum* におけるピルビン酸キナーゼ活性変異株の取得と解析」を、東京工業大学に「(a)-5-4. コリネ型細菌 *C. glutamicum* の細胞増殖機構の解析」を再委託して実施した。

(a) 増殖抑制下における細胞機能の統合的解明

コリネ型細菌は古くからアミノ酸生産に用いられてきた有用工業微生物であるが、代謝工学的改変に必要な物質代謝に関わる細胞機能遺伝子に関する知見は非常に限られていた。そこで、増殖非依存型バイオプロセスの開発における代謝工学的改変の基盤情報として活用するため、コリネ型細菌の物質代謝に関する様々な細胞機能遺伝子について解析を行った。

(a)-1. 糖取り込み機構の解析

i) 糖取り込み系遺伝子の発現解析

ホスホエノールピルビン酸からのリン酸基の転移と共役した糖類取り込み系(PTS)は広く細菌に保存され、環境中の炭素源に応じた糖代謝調節機構において重要な役割を担うことが知られており、大腸菌や枯草菌ではその調節機構の解明が良く進んでいる。コリネ型細菌においても、PTS はグルコースやフルクトースなどの糖を取り込む主要経路であるが、その遺伝子発現制御機構や炭素源応答における役割はほとんどわかっていなかった。グルコース等の C6 糖はバイオプロセスの主な炭素源であることから PTS の機能・発現制御の解明はバイオプロセスの開発の基盤として重要である。

コリネ型細菌にはPTSを構成する因子として、全てのPTS糖取り込みに利用される細胞質共通PTS蛋白質である EnzymeI と HPr (それぞれ *ptsH*, *ptsI* にコードされる) が存在し、さらに糖特異的輸送蛋白質として それぞれグルコース、フルクトース、スクロースに特異的な EnzymeII (それぞれ *ptsG*, *ptsF*, *ptsS* にコードされる) と基質未知の EnzymeII が存在する。さらにコリネ型細菌

(R株)には β -グルコシド特異的な *pts* 遺伝子が存在する。しかし、これら *pts* 遺伝子の発現に関する報告はほとんどなかった。そこで本研究では *pts* 遺伝子の発現が PTS 糖の存在下でどのように制御されるのか解析した。

まず PTS 糖存在下と非存在下での発現をノザンブロットングで解析した。グルコース存在下で *ptsI*、*ptsH*、*ptsG* の発現が上昇した。フルクトース、スクロース存在下では全ての *pts* 遺伝子の発現誘導が観察された。また PTS 糖のなかではフルクトースが最も誘導効果が高かった。このことから PTS 糖の存在を感知し *pts* 遺伝子の発現制御につなげる機構の存在が示唆された。

次に転写制御機構の解明を行うため、それぞれの *pts* 遺伝子の転写開始点をプライマーエクステンション法で解析した。それぞれの *pts* 遺伝子の転写開始点上流にコリネ型細菌の-10、-35 配列に類似した配列が見出された。また、全てのプロモーター領域に TGTT(TTT)G の配列が見出された。

コリネ型細菌ゲノム上の *ptsI*、*ptsF* の遺伝子間に転写因子をコードすると推定される *fruR* が存在したので、この転写因子が *pts* 遺伝子の発現を制御している可能性を検討した。*fruR* 破壊株では、野生株と比較して、フルクトース存在下で *ptsI* と *fruR* 遺伝子の発現レベルが高いことが示された。このことおよび FruR が *ptsI*-*fruR* 遺伝子間に直接結合すること(後述)から FruR はフルクトース存在下で *ptsI*、*ptsF* オペロンの過剰な発現を抑制する因子として働くことが示唆された。また *fruR* 破壊の効果はフルクトース非存在下ではほとんど見られなかったことから PTS 糖非存在下で *pts* 遺伝子群を抑制する未知の転写因子の存在が予想された。これに関しては次節に報告する。

本研究により示された *pts* 遺伝子発現のフルクトース応答機構は大腸菌や枯草菌などのモデル微生物では知られておらず、コリネ型細菌がこれらモデル生物と異なる独自の *pts* 遺伝子発現制御機構を有することを示唆する。

以上の成果を論文として発表した(Microbiology 154:264-274, 2008.)。

ii) 転写因子 SugR による糖取り込み系遺伝子 *pts* の発現制御

前節の解析により、*pts* 遺伝子の発現が PTS 糖によって誘導されることが示された。このことから PTS 糖の存在で活性制御される転写因子の存在が示唆された。そこで、*pts* プロモーターに結合する蛋白質のアフィニティー精製を行ったところ、*ptsI*-*fruR* 遺伝子間領域に結合する約 28 kDa の 2 つの蛋白質を取得した。一つは前節に記述した FruR であり、もう一つは SugR と判明した。SugR は PTS 糖特異的輸送蛋白質遺伝子 (*ptsG*、*ptsF*、*ptsS*) の転写を抑制する因子として最近見出された。新たに *ptsI* プロモーターにより精製されたことから SugR が細胞質共通 PTS の発現も制御している可能性が考えられた。そこで *ptsI*、*ptsH* の発現を SugR が制御しているか検討した。RT-PCR による解析の結果、*sugR* 破壊株では PTS 糖非存在下において野生株のフルクトース存在下と比べても2倍以上の顕著な発現が観察された。*sugR* 破壊株をフルクトース存在下で培養すると *ptsI*、*ptsH* の発現は野生株の同条件と同程度になった。このことから SugR は *ptsI* と *ptsH* の発現を負に制御していることが明らかとなった。*sugR* 破壊株では PTS 糖存在下で発現が野生株の発現レベルまで低下したことは、FruR や他の未知の転写因子による制御によるものと考えられ

る。

DNase I フットプリンティング法により、SugR は *ptsI*-*fruR* 間 DNA に結合することが明らかとなった。SugR の結合する領域は *ptsI* のプロモーター領域と *fruR* 転写開始点下流に存在しており、この配置からも SugR が転写抑制因子として働くことが支持される。SugR の結合した領域には、TGTT(TTT)G の配列が繰り返して存在しており、これに変異を導入することにより、SugR の結合が抑制されることを、ゲルシフトアッセイにより確認した。この TGTT(TTT)G 配列は全ての *pts* 遺伝子のプロモーター領域に存在することから、SugR による制御のシス配列として機能すると考えられる。以上の結果から SugR が PTS 糖膜輸送蛋白質に加え、細胞質共通 PTS の発現も一括して制御するグローバルレギュレーターであることが明らかとなった。SugR を介した制御機構は大腸菌における Mlc を介した制御や枯草菌における GlcT を介した制御とは大きく異なることが示された。

以上の成果を論文上で発表した (Appl Microbiol Biotechnol 78:309-318. 2008.)。

iii) 第二の β -グルコシド PTS (*bglF2*) の同定および発現解析

我々は、コリネ型細菌(R株)には β -グルコシド特異的 PTS (*bglF*) が存在すること、その点変異導入によりセロビオースの取り込みが可能となること、を報告していた(2)。この *bglF* を欠損させても β -グルコシドの取り込みが観察されたことから、これとは別の β -グルコシド取り込み経路の存在が考えられた。ゲノム配列を検索したところ、*bglF* と相同性をもつ遺伝子 *bglF2* が見出された。*bglF*、*bglF2* 遺伝子それぞれ単独の破壊では β -グルコシドであるサリシンを単一炭素源とした生育に大きな影響は見られなかったのに対し、*bglF*、*bglF2* 二重破壊株は、同条件でほとんど生育できず、サリシン消費能は著しく低下することを確認した。このことから *bglF2* が β -グルコシド取り込みを行うことが示唆された。

bglF、*bglF2* 遺伝子と染色体上でそれぞれクラスターを形成する *bglG* と *bglG2* 遺伝子は転写アンチターミネーター様蛋白質をコードする。定量的 RT-PCR 解析により、*bglG* 破壊株と *bglG2* 破壊株では、それぞれ *bglF* と *bglF2* 遺伝子のサリシンによる発現誘導が消失することが示された。以上の結果、および、転写アンチターミネーターの認識配列 (RAT 配列) が *bglF* および *bglF2* 遺伝子上流域に存在することから、*bglF*、*bglF2* 遺伝子は転写アンチターミネーション機構により発現制御されていることが明らかとなった。さらに、*bglG* の破壊株で *bglF2* 発現が、*bglG2* の破壊株で *bglF* の発現がサリシンにより強く誘導されたことから、*BglG* と *BglG2* による制御システムのクロストークは存在しないことが示された。これまで他の細菌で報告されている多くのアンチターミネーション蛋白質は PTS からのリン酸化により活性制御されることが知られている。共通 PTS からのリン酸化を *ptsI* 変異株を用いて遮断することにより、*bgl* 遺伝子の発現誘導が消失したことから、コリネ型細菌における PTS からのリン酸化による制御機構の存在が示唆された。

以上の成果を論文として発表した (Microbiology 155:3652-3660. 2009.)。

iv) *bgl* 遺伝子のグルコース抑制機構の解析

多くの微生物において、グルコースによる他の炭素源取り込み・代謝遺伝子の発現阻害 (グル

コース抑制)が知られており、これにより代謝しやすい炭素源(グルコース)が優先的に利用される。バイオマス由来混合糖の効率的な同時利用技術の確立にはグルコース抑制機構の理解が重要である。前述の *bglF* と *bglF2* 遺伝子のグルコース感受性を、*lacZ* レポーター遺伝子との融合遺伝子の発現解析により調べたところ、*bglF* は強いグルコース抑制を受けるのに対して、*bglF2* はグルコース抑制に耐性を示すことが明らかとなった。*bglF* 遺伝子上流域の RAT 配列に変異を導入したところ (*bglF* Δ *RAT-lacZ*)、グルコース抑制が見られなくなった。このことはアンチターミネーションがグルコース抑制のターゲットであることを示唆している。さらに BglG アンチターミネーター蛋白質を plasmid により発現させた BglG 発現強化株ではグルコース抑制が観察されなかったことから、BglG のタンパク質発現量がグルコース抑制に対する感受性を決定する因子の一つであることが示された。*bglG* と *bglG2* 遺伝子の翻訳開始コドンと比較すると、*bglG2* の場合は効率的な翻訳開始の行われる ATG であるのに対して、*bglG* の場合は翻訳効率の低い GTG であった。そこで *bglG* と *bglG2* の翻訳開始コドンを入れ替え、その効果を観察した。その結果、*bglG* の翻訳開始コドンを ATG にして発現強化すると (*bglG*-ATG 株)、*bglF* 発現がグルコース抑制に耐性を示した。逆に *bglG2* の翻訳開始コドンを GTG にすると (*bglG2*-GTG 株)、*bglF2* の発現がグルコース存在条件下で強い抑制を受けた。以上の結果は、*bgl* の発現において転写アンチターミネーター蛋白質の翻訳効率がグルコース抑制に対する感受性を決める重要なファクターであることを示している。興味深いことに、グルコース抑制が弱まった *bglG*-ATG 株ではグルコースによる *bglF* の弱い発現誘導が観察された。BglF は PtsG ファミリーに属する糖輸送蛋白質であり、大腸菌においてはグルコース輸送能が示されている。コリネ型細菌 (R 株) では *ptsG* を破壊しても高いグルコース消費能が観察されるが、*ptsG*、*bglF* 二重破壊株ではグルコース消費が強く抑えられた。これに対して *ptsG*、*bglF2* 二重破壊株では *ptsG* 一重破壊株と同等のグルコース消費が観察された。このことは BglF がグルコース輸送能を有することを示している。通常、グルコース存在下では BglF の発現は強く抑制されるため機能しないと考えられるが、グルコース濃度低下条件や PtsG の発現低下条件においては BglF を介したグルコース取り込みが行われる可能性がある。

以上の成果を論文として発表した(J Bacteriol 193:349-357. 2011.)。

(a)-2. 糖代謝調節機構の解析

(a)-2-1. 中央代謝系遺伝子・酵素の基礎解析

コリネ型細菌における糖代謝調節機構の基盤情報を得るため、解糖系酵素および TCA 経路の全遺伝子の転写単位を決定し、炭素源や増殖相に応じて、それぞれの代謝経路に関わる複数の酵素遺伝子群が協調した発現パターンを示すことを明らかにした (Microbiology 153:2190-2202. 2007.、J Mol Microbiol Biotechnol 15: 264-276. 2008.、Microbiology 154: 3073-3083. 2008.)。さらに、解糖系全酵素の精製・特性解析を行った。

(a)-2-2. 増殖非依存型バイオペロセスにおける網羅的遺伝子発現解析

増殖非依存型バイオペロセスにおける代謝調節機構の解明および後述する有用プロモーター

の探索を目的として DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。当研究室のゲノム解読により明らかにされたコリネ型細菌 (R 株) の全 3080 遺伝子(発表論文: Microbiology 153:1042-1058, 2007.)の内、3076 遺伝子(99.9%) の ORF を搭載した DNA マイクロアレイを構築した。好気増殖および増殖非依存型バイオプロセスにおけるコリネ型細菌の細胞それぞれから全 RNA を抽出し、マイクロアレイ解析および定量的 RT-PCR 解析を行った。その結果、好気増殖条件に比べ増殖非依存型バイオプロセス条件において、2 倍以上遺伝子発現比率が上昇している遺伝子が 161 個、1/2 以下に減少している遺伝子が 221 個確認された。これら発現が顕著に変化した遺伝子について NCBI COG (Clusters of Orthologous Groups) データベースにより機能別分類を行った結果、発現上昇した遺伝子では 161 遺伝子中 64 遺伝子が、減少した遺伝子では 221 遺伝子中 64 遺伝子が代謝関連遺伝子に分類された。

次に増殖非依存型バイオプロセスにおいて、糖代謝速度および有機酸生産能の増加が観察されることから、解糖系、アナプレロティック経路および TCA 経路の遺伝子について詳細な解析を行った。その結果、主要糖代謝酵素遺伝子 (*gapA*, *pgk*, *tpi*, *ppc*)、還元的 TCA 経路遺伝子の発現量の増加が観察され、また、対照的に、酸化 TCA 経路 (ピルビン酸→クエン酸→イソクエン酸→オキソグルタル酸→スクシニル CoA→コハク酸) の遺伝子発現量の減少が観察された。さらに、*gapA*, *pgk*, *tpi*, *ppc*, *ldhA*, *mdh* について好気増殖条件および増殖非依存型バイオプロセスにおける酵素活性について解析を行った結果、TPI と MDH 酵素の活性比率は、マイクロアレイ解析の結果よりも極めて高い値を示した。

また、還元条件下において、 H^+ -ATPase オペロン (*atpB*, *atpE*, *atpF*, *atpH*, *atpA*, *atpG*, *atpD* および *atpC* 遺伝子) の遺伝子発現が好気増殖条件と比較して 1/2 から 1/4 のレベルに減少している事が確認された。これらの結果から、非増殖条件下において H^+ -ATPase 活性が減少することにより解糖系が強化されることが示唆された。このような現象は、 H^+ -ATPase 変異体を用いた大腸菌、枯草菌およびコリネ型細菌で報告されている。

増殖非依存型バイオプロセス条件下において 2 倍以上遺伝子発現上昇が認められた *gapA* オペロン、*ldhA* および *mdh* 遺伝子について培地中の溶存酸素濃度が遺伝子発現制御に与える影響について調べた。好気培養 4 時間後 (DO 6.9 p.p.m) に、通気を空気から窒素ガスに変えることにより嫌気状態 (DO 0.01 p.p.m 以下) にした細胞を用いて解析を行った。培養開始 5 時間後 (窒素通気開始 1 時間後) の遺伝子発現比率を定量的 RT-PCR により調べた結果、好気状態に比べ嫌気状態では窒素通気 1 時間後から全ての遺伝子において発現上昇が観察された。特に、*ldhA* 遺伝子の著しい発現上昇が観察され、窒素ガス通気直後より L-乳酸の生産も確認された。以上の結果から、増殖非依存型バイオプロセスにおけるこれらの遺伝子発現制御に、培養液中の溶存酸素濃度が関与する可能性が示唆された。

好気培養および還元条件の細胞を用いてプライマー伸長法により *gapA*, *ldhA* および *mdh* 遺伝子の転写開始点を決定した。その結果、これらの遺伝子の転写開始点は、好気増殖条件および非増殖条件下において同じであった。さらに上流配列の解析から、大腸菌の $\sigma 70$ プロモーターの共通配列との比較により-10 領域および-35 領域を推定した。

gapA, *ldhA* および *mdh* 遺伝子のプロモーター部位と *lacZ* 遺伝子の融合遺伝子を染色体に導入した株を用いて、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定することにより発現の経時変化を調べた。その結果、好気培養の溶存酸素濃度が減少する定常期初期に、これらの遺伝子の発現上昇が観察された。また、この遺伝子発現レベルは還元条件に移行しても高い状態で維持されていた。

以上の成果を論文上で発表した (Microbiology 153: 2491-2504. 2007.)。

(a)-2-3. 解糖系酵素 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子 (*gapA*) の発現制御機構

解糖系酵素の GAPDH は解糖系とペントースリン酸経路共通の代謝産物である glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) の酸化的リン酸化を触媒する酵素である。コリネ型細菌において、本酵素をコードする遺伝子 *gapA* は同じく解糖系酵素である、triose isomerase、phosphoglycerate kinase をコードする遺伝子 (*tpi* および *pgk*) とオペロンを形成していることから、このオペロンの発現調節はこの細菌の解糖系にとって非常に重要である。増殖非依存型バイオプロセス条件下でこのオペロンの発現が上昇することが明らかとなっており、また、GAPDH は反応産物である NADH によって阻害を受けることから、細胞内の酸化還元状態や糖代謝フローの調節に重要と考えられる。したがって、GAPDH 制御機構の解明は、増殖非依存型バイオプロセスにおける生産性向上のための基盤として重要である。本研究では、*gapA* の発現調節機構の解析を行った。

i) 転写因子 SugR による *gapA* 遺伝子発現制御

DNA アフィニティービーズにより *gapA* 遺伝子のプロモーター領域に結合する蛋白質を精製した。その結果、転写因子ホモログを 5 個取得した。得られた転写因子ホモログの 1 つ SugR は DeoR type の転写因子で、糖取り込み機構である PTS の構成因子すべての遺伝子の発現を糖非存在下で抑制することが我々を含め複数のグループから最近報告されている。ゲルシフトアッセイにより、SugR が *gapA* 遺伝子のプロモーター上の配列、TGTTTG、を認識して結合することを示した。次に、*sugR* 遺伝子欠損株における *gapA* 遺伝子の発現を調べた結果、糖非存在下において野生株よりも高いことを示した。このことから SugR が *gapA* 遺伝子の発現に対して抑制因子として機能していることが示された。異なる炭素源存在下での *gapA* 遺伝子の発現を調べたところ、酢酸やピルビン酸といった有機酸存在下においてはグルコース存在下と比較して *gapA* の発現は半分程度に減少していた。一方、フルクトースもしくはスクロース存在下における *gapA* 遺伝子の発現はグルコース存在下におけるレベルよりも高いことを見出した。これらの結果から、フルクトースもしくはスクロース特異的な代謝産物によって SugR による抑制効果が解除されると考えられた。

ゲルシフトアッセイによる SugR の DNA 結合解析の結果、SugR の *gapA* プロモーター領域への結合がフルクトースやスクロースの取り込みによって生じる fructose-1-phosphate (F-1-P) によって強く阻害されるとともに、糖代謝の中間産物である fructose-1,6-bisphosphate (F-1,6-P) によってもわずかに阻害を受けることを示した。フルクトース、スクロース特異的な中間代謝産物である

F-1-Pによって SugR の DNA 結合能が著しく阻害を受けることは、グルコース存在下よりもフルクトースやスクロース存在下における *gapA* の発現が高いことと一致している。グルコース存在下では SugR による抑制が F-1,6-P によってわずかながら解除され、フルクトース存在下では F-1-P によって抑制が完全に解除されると考えられる。SugR は PTS 遺伝子群全体の抑制因子として機能すること、および、これらの遺伝子のプロモーターへの結合が F-1-P や F-1,6-P によって阻害されることが明らかとなっている。以上のことから、SugR は糖非存在下において糖の取り込みと糖代謝両方の遺伝子発現における抑制因子として機能することが明らかとなった。

以上の成果を論文として発表した (Appl Microbiol Biotechnol 81:291-301, 2008.)。

ii) LuxR type の転写因子 RamA による *gapA* の発現制御

前述の DNA アフィニティー精製により、*gapA* のプロモーター領域に LuxR type の転写因子 RamA が結合することが示された。RamA はグリオキシル酸経路の酵素および酢酸代謝に関わる酵素の発現活性化因子として同定され、*ramA* 遺伝子破壊株は酢酸を利用できないことが示されている。これまでに酢酸のトランスポーター、グリコーゲン代謝、エタノール代謝、TCA 経路といった様々な代謝経路から、細胞表層タンパク質や resuscitation factor などその他細胞機能に関与する蛋白質の発現活性化因子として機能することが報告されている。さらに、その遺伝子破壊株のトランスクリプトーム解析により、非常に多くの遺伝子発現を直接もしくは間接的に制御している主要なグローバルレギュレーターであることが近年分かってきた。RamA の DNA への結合に必要な認識配列として 5'-A/TG₍₄₋₆₎T/C-3'もしくは 5'-A/C₍₄₋₅₎A/G/T-3'が同定されているが、RamA が細胞内のどのようなシグナルを認識しているかは明らかとなっていない。

RamA が *gapA* の発現をどのように制御しているかを調べるために、*ramA* 遺伝子破壊株における *gapA* の発現を野生株と比較した。野生株では糖存在下において *gapA* の発現が対数期(3h)と比較して定常期入り口(6h)に 4 倍程度上昇するのに対し、非存在下では増殖相によらず変化がない。*ramA* 遺伝子破壊株では糖存在下の定常期入り口においても *gapA* の発現がほとんど上昇しなかった。その一方で非存在下の条件では野生株と大きく変わらない発現量を示した。これらの結果から RamA は糖存在下において *gapA* の発現を活性化することが示された。

gapA のプロモーター領域内の RamA の結合部位をゲルシフトアッセイおよび DNase I フットプリンティング法を用いて同定した結果、RamA は転写開始点から 84 bp、168 bp、198 bp 上流を中心とする3つの領域に結合することを見出した。これらの領域には RamA の認識配列である連続した G もしくは C が存在した。この G もしくは C を別の塩基と置換すると RamA の結合能が消失したことから、この配列を認識していることが明らかとなった。各 RamA 結合サイトに変異を導入したプロモーター活性を比較した結果、168 bp 上流に位置する結合サイト 2 が *gapA* の発現の活性化に最も深く関与していることが示された。また、一連のプロモーター活性の測定結果から RamA は炭素源に関わらず *gapA* の発現を活性化することが明らかとなった。

さらに、*ramA* 遺伝子破壊株においては前節で示した *gapA* 遺伝子の発現の抑制因子である SugR の発現が低下していることを見出した。これらの知見から RamA は直接的には *gapA* の発現

を活性化するが、抑制因子である SugR の発現を高めることで間接的に発現を抑えていることが明らかとなった。DNA アフィニティー精製では、さらに別の転写因子 GlxR が *gapA* プロモーター領域へ結合することを確認しているが、これが cAMP 依存的に *gapA* の発現を活性化することを明らかにしている(後述)。ここで示した各転写因子は自身の発現を抑制していることが報告されており、転写因子の発現レベルも複雑な制御を受けている。GapA が解糖系の流量制御だけではなく NAD の還元という細胞内の酸化還元バランスの調整にも寄与していることから、糖に応答する制御因子 SugR だけではなく、多様な細胞機能の発現制御に関与する RamA、GlxR というグローバルレギュレーターによって、他の代謝経路の遺伝子発現とのバランスをとりつつ発現が制御されていると考えられる。

以上の成果を論文として発表した(J Bacteriol 191:968-977. 2009.)。

(a)-2-4. 乳酸生成酵素 lactate dehydrogenase (LDH) 遺伝子 (*ldhA*) の発現制御機構

LDH は NADH を補酵素としてピルビン酸から乳酸への還元反応を触媒する酵素である。この酵素は大腸菌や枯草菌など多くの細菌に保存されており、細胞が低酸素濃度もしくは嫌気的な環境下におかれ好気呼吸が阻害された際に発現することが知られている。前述のとおり、増殖非依存型バイオプロセス条件(還元条件)下で *ldhA* の発現が上昇することが明らかとなっている。本条件では乳酸が主要な生成物であり、LDH は糖代謝によって生じた還元力(NADH)の再酸化による細胞内酸化還元バランスの調節に主要な役割を担っている。細胞内酸化還元バランスは増殖非依存型バイオプロセスにおける生産性を決定する主要な要素であり、その調節機構の解明は本プロセス開発の基盤として重要である。そこで、本研究では、*ldhA* の発現調節機構の解析を行った。

i) 転写因子 SugR による *ldhA* 発現制御

DNA アフィニティービーズにより *ldhA* 遺伝子のプロモーター領域に結合するタンパク質を精製した。その結果、転写因子ホモログを3個取得した。このうち SugR は、前述のとおり糖非存在下において糖の取り込みと糖代謝両方の遺伝子発現における抑制因子として機能することが明らかとなっている。SugR によって *ldhA* の発現がどのように制御されているか、*sugR* 遺伝子破壊株を構築して解析した。グルコースを含む培地では、野生株における *ldhA* の発現は対数期でほとんど見られないが定常期入口において上昇した。グルコースを含まない培地では培養期間を通じて *ldhA* の発現はほぼ完全に抑制されていた。同条件で *sugR* 遺伝子破壊株における *ldhA* の発現を解析した結果、グルコースが存在する条件では対数期においても *ldhA* の発現がみられ、定常期入口で上昇し野生株よりも高い発現レベルを示した。グルコース非存在下では、培養期間を通じて *ldhA* の発現が検出された。これらの結果から SugR は *ldhA* 遺伝子の発現に対して抑制因子として機能していることが示された。

ゲルシフトアッセイおよび DNase I フットプリンティング法により、*ldhA* 遺伝子転写開始点のすぐ上流に位置する direct repeat (5'-CGGNCATAATCGGNCATAAT-3') が SugR の結合に必要で

あることが示された。この配列には我々とほぼ同時期に他のグループから報告された SugR の認識配列 5'-TCGGACA-3'が含まれていることもこの配列の重要性を支持するものである。結合サイトの位置から SugR が *ldhA* 遺伝子の転写開始を阻害することによって発現を抑制していると考えられる。

ゲルシフトアッセイによって SugR の *ldhA* のプロモーター領域への結合が fructose-1-phosphate によって強く阻害されるとともに fructose-1,6-bisphosphate によっても弱いながらも阻害されることが示された。また、フルクトース、スクロース存在下では *ldhA* 遺伝子の発現レベルがグルコース存在下におけるものより高いことを明らかにした。

一連の SugR による *ldhA* の制御機構は、前述した SugR によって制御を受ける他の遺伝子群のものと同様であることから、SugR は糖非存在下において糖の取り込みから糖代謝そしてその後の発酵まで、糖利用に関する代謝経路全体の抑制因子として機能することが明らかとなった。以上の成果を論文として発表した(*Appl Microbiol Biotechnol* 83:315-327, 2009.)。

ii) 転写因子 LldR による乳酸生成酵素 lactate dehydrogenase (LDH) 遺伝子 (*ldhA*) の発現制御機構

ldhA 遺伝子の発現に関与する新たな転写因子を同定する目的でトランスポゾンを用いて作成した突然変異株ライブラリーの中から、*ldhA* のプロモーター活性を指標に *ldhA* の発現が低下した株を取得した。複数の株においてトランスポゾンは *ldhA* 遺伝子に挿入されていたことから、LdhA が触媒する NADH 依存的なピルビン酸の L-乳酸への還元反応が *ldhA* 自身の発現制御に関与していることが考えられた。*ldhA* 遺伝子破壊株内で L 体ではなく D 体の乳酸を生成する別のタイプの LDH (D-LDH) を発現させても、*ldhA* の発現は回復しなかったことから、LdhA による L-乳酸の生成が *ldhA* の発現に重要であることが示された。

前述の DNA アフィニティー精製により、*ldhA* 遺伝子プロモーター領域に LldR が結合することが示されている。LldR は L-乳酸存在下で DNA 結合能が阻害される転写因子として報告されている。L-乳酸が *ldhA* 遺伝子の発現の活性化に必要であることから、LldR が *ldhA* 遺伝子の抑制因子として機能しており、*ldhA* 遺伝子破壊株では L-乳酸が生成されないため LldR による抑制が解除されず *ldhA* の発現が減少していることが考えられた。実際、*ldhA* 遺伝子破壊株内の *lldR* 遺伝子を破壊すると、*ldhA* の発現が野生株レベルまで回復したことから、推定どおり LldR が *ldhA* 遺伝子の転写抑制因子であることが示された。

SugR と LldR の2つの抑制因子がどのように *ldhA* の発現を制御しているか、*ldhA* プロモーター活性を指標に *ldhA* の発現レベルを野生株、各因子の遺伝子破壊株およびそれらの二重破壊株の間で比較を行なった。前節に示したように、野生株においては糖非存在下では *ldhA* の発現は抑制されている。そして、この抑制が SugR によるものであることが *sugR* 遺伝子破壊株の結果から分かる。*lldR* 遺伝子の単独破壊株は野生株と同様の *ldhA* の発現レベルを示した。*sugR* と *lldR* の二重遺伝子破壊株における *ldhA* の発現レベルは糖存在下では *sugR* 遺伝子破壊株と同程度であるが、非存在下では *sugR* 遺伝子破壊株よりも高いレベルを示した。LldR の欠損が単独では影

響しなかったのは、糖存在下では発現した LdhA によって生成された L-乳酸によって LldR の DNA 結合能がすでに阻害されており、抑制が緩和されているためと考えられる。また、糖非存在下で影響が見られなかったのは SugR による抑制効果が LldR より優位であるためと考えられる。これは *lldR* と *sugR* の二重遺伝子破壊株における *ldhA* の発現レベルが糖存在下では *sugR* 遺伝子破壊株と同程度であるのに対し、糖非存在下では *sugR* 単独破壊株のものよりも高いレベルを示したことによっても支持される。

ゲルシフトアッセイおよび DNase I フットプリンティング法により、LldR が *ldhA* プロモーター領域の -35 領域付近に結合することが示された。この領域には LldR の認識配列 (5'-TNGTNNACNA-3')(3)が含まれていた。SugR は *ldhA* プロモーターの -10 領域付近に結合することから、LldR より強く転写を抑制していることが考えられ、これは上記の二重遺伝子破壊株における *ldhA* の発現解析結果とも一致する。以上の知見から、*ldhA* は少なくとも 2 つの転写抑制因子 SugR と LldR によって制御されており、糖存在下生じる糖代謝産物に応じて SugR による *ldhA* の抑制が緩和され、その結果発現した LdhA によって生じる L-乳酸に応じて LldR による抑制が緩和されるという、2 段階の制御を受けていることが明らかとなった。このように *ldhA* の発現は自身の反応産物である L-乳酸および LldR を介した正のフィードバック制御を受けることが示された。本研究は微生物の LDH 遺伝子の中でこのような制御機構が働いていることを示した最初の例である。

LldR は L-乳酸を炭素源として利用するために働く乳酸デヒドロゲナーゼ Lld の発現抑制因子として同定された。培地中に L-乳酸が存在するとき LldR の DNA 結合能が阻害され Lld の抑制が解除される。Lld は LdhA と異なり NAD/NADH ではなく menaquinone/menaquinol を用いて L-乳酸の酸化を行なう。今回の結果をふまえるとコリネ型細菌は L-乳酸を生成する酵素 LdhA と利用する酵素 Lld の発現が同一の転写因子 LldR によって制御されていることになる。両方の酵素の発現が同時に脱抑制されるとすると、ピルビン酸と L-乳酸の間でサイクルが形成され、全体として NADH を用いて menaquinone の還元を行っていることになる。LDH が発現する微好気もしくは嫌気条件下では呼吸が阻害されるため、LDH を用いて解糖系より生じた NADH の再酸化を行なう必要がある。しかし、乳酸として炭素源をロスしてしまうため、同時に Lld の発現を高めることでピルビン酸を供給していると考えられる。このような自身の代謝産物を利用した酸化還元バランスの調節機構はバイオプロセスにおいても生産性を維持するために重要であると考えられる。

以上の成果を論文として発表した(J Bacteriol 191:4251-4258. 2009.)。

(a)-2-5. *C. glutamicum* におけるピルビン酸キナーゼ活性変異株の取得と解析 (北海道大学 横田篤教授)

Corynebacterium glutamicum は各種アミノ酸の工業的生産に用いられている産業上重要な細菌である。本研究では *C. glutamicum* のピルビン酸キナーゼ (PK) に着目した。この酵素の活性増減が本菌の糖代謝活性、代謝産物等におよぼす影響を明らかにし、高効率な糖変換技術の開発に資する基盤技術の提供を目的として研究を行なった。*C. glutamicum* ATCC 13032 から作

製した PK 欠失株と PK 過剰発現株をジャーファーメンターを用いて必須ビタミンであるビオチンを制限したグルタミン酸生産条件で培養を行ったところ、PK 欠失株では菌体あたりの糖消費速度が向上し、グルタミン酸生産量は野生株の 1.3 倍になった。PK 過剰発現株ではグルタミン酸生産量が 10%低下した。同様にビオチンを十分添加した培地で培養すると生育量が野生株と比べて PK 欠失株では 1.4 倍に増大し、PK 過剰発現株では 0.86 倍に低下した。これらの現象は PK 活性が変化しておこるホスホエノールピルビン酸の蓄積、および枯渇を調整するためにホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、およびホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの活性が変化した結果であると考えられた。また、PK 欠失株の生育量増大を物質生産に応用するため PK 欠失株によるバイオプラスチック生産を行ったところ、菌体あたりの PHB 蓄積量が PK 欠失株において 1.7 倍に増大していた。

(a)-3. 遺伝子ネットワークの解析

(a)-3-1. グローバルレギュレーター GlxR の機能解析

大腸菌においては cAMP とそのレセプター蛋白質 CRP が糖代謝系遺伝子群の制御に重要な役割を担うことが知られている。コリネ型細菌における CRP type の転写因子 GlxR は cAMP 依存的に 5'-TGTGANNNNNTCACA-3' という DNA 配列に結合する。GlxR はグリオキシル酸経路の酵素 malate synthase をコードする *aceB* 遺伝子の発現抑制因子として同定されたのち、我々を含む複数のグループの研究結果から解糖系や TCA 経路といった中央代謝系をはじめ様々な細胞機能に関与する酵素遺伝子の発現制御に関与していることが示されている。コリネ型細菌のゲノム上の遺伝子上流域 215 箇所にも GlxR 結合配列とほぼ同様の配列が見出されている。大腸菌において cAMP はグルコース存在下で減少し、CRP の機能を抑制することでカタボライト遺伝子群の発現を抑える。一方、コリネ型細菌においてはグルコース存在下で cAMP 濃度が高まることが報告されているが、cAMP 濃度変化と GlxR の機能に相関が取れていない。また、cAMP 合成酵素遺伝子 *cyaB* の破壊株では cAMP 濃度が著しく減少するが、その生育は野生株とほとんど差がない。このように GlxR はその標的遺伝子は明らかになりつつあるが生体内でどのような環境もしくは細胞シグナルを感知し標的遺伝子の発現をどのように制御しているかは明らかとなっていない。

本研究では GlxR の生体内における DNA 結合領域を決定するとともにその生理的機能の解析を行った。ChIP-chip 解析により *in vivo* における GlxR の結合領域として 209 箇所を同定した。これらの領域には CRP と同様の保存配列が見出された。*in vitro* での DNA 結合実験および *in vivo* におけるプロモーターアッセイにより、GlxR は糖代謝、呼吸、細胞複製、ストレス応答に関与する遺伝子上流に cAMP 依存的に結合し、活性化因子として機能していることが示された。

(a)-3-2. 糖代謝遺伝子発現制御における RNA ポリメラーゼ σ 因子の役割

RNA ポリメラーゼの σ 因子はプロモーター配列の認識に関わるサブユニットであり、遺伝子発現の制御において重要な役割を果たしている。通常、細菌のゲノム上には σ 因子をコードする遺伝子が複数個存在し、それぞれが異なるプロモーター配列を認識する。細菌は複数の σ 因子を

使い分けることで、様々な環境条件下において特異的な遺伝子発現を可能にしている。コリネ型細菌のゲノム上には、7 個の σ 因子をコードする遺伝子 (*sigA*, *sigB*, *sigC*, *sigD*, *sigE*, *sigH*, *sigM*) が存在するが、その機能に関する知見は限られている。

増殖非依存型バイオプロセスにおいては、糖代謝に関わるいくつかの遺伝子の発現量が増加する。この遺伝子発現制御機構の解明は、遺伝子発現レベルの最適化による糖代謝機能強化技術の重要な基盤となる。前述のトランスクリプトーム解析により *sigB* 遺伝子の発現量は、増殖非依存型バイオプロセス条件下において増加することを見出した。SigB はハウスキーピング遺伝子の転写に関わる SigA とアミノ酸配列の相同性が高く、これら 2 個の σ 因子はよく似たプロモーター配列を認識すると考えられているが、その生理的機能は良くわかっていない。グローバルな遺伝子発現制御に関わる σ 因子の還元条件下での転写制御における役割を解明するため、*sigB* 遺伝子欠損株を用いて SigB の機能解析を行った。

sigB 遺伝子欠損株は、好気条件下での増殖速度、グルコース消費速度に関しては野生株と違いはみられなかった。しかし、増殖非依存型バイオプロセス条件下における *sigB* 遺伝子欠損株のグルコースの消費速度は 3.3 ± 0.4 (mmol / h / g dry cells) であり、野生株 [4.3 ± 0.2 (mmol / h / g dry cells)] の約 75% に低下した。*sigB* 遺伝子欠損株に *sigB* 遺伝子を相補することでグルコース消費速度は野生株と同程度 [4.2 ± 0.2 (mmol / h / g dry cells)] にまで回復したことから、SigB は増殖非依存型バイオプロセス条件下においてグルコース代謝を活性化する機能を有することが明らかとなった。

DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行い、SigB が発現制御に関わる遺伝子の同定を行った。増殖非依存型バイオプロセス条件下 2 時間培養した野生株と *sigB* 遺伝子破壊株から RNA を抽出し、遺伝子発現プロファイルを比較した。*sigB* 遺伝子の不活性化により、45 個の遺伝子の転写産物量が 2 分の 1 以下に減少し、30 個の遺伝子の転写産物量が 2 倍以上に増加した。その中には様々な細胞機能に関わることが推定される遺伝子が含まれていたが、ほとんどは機能未知の遺伝子であった。SigB のグルコース代謝との関連を明らかにするため、増殖非依存型バイオプロセス条件下においてグルコースの代謝に関わると推定される 29 個の遺伝子に注目し、さらに解析を行った。定量的 RT-PCR により、グルコース代謝に関わる 9 個の遺伝子 (*pfkA*, *fba*, *tpi*, *gapA*, *pgk*, *eno*, *ppc*, *fum*, *pqo*) の転写産物量が *sigB* 遺伝子欠損株において減少していることが示された。2 分の 1 以下に転写産物量が減少した 2 個の遺伝子 *fba* と *gapA* に関して、それぞれがコードする酵素、fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA) と glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の活性を測定した。FBA 活性は *sigB* 遺伝子欠損株においては野生株の 56% に低下し、GAPDH 活性は 70% に低下していた。さらに細胞内代謝中間体量を測定したところ、*sigB* 遺伝子欠損株においては FBA の基質となる fructose-1,6-bisphosphate (FBP) の細胞内濃度が 3 倍に増加していた。このことから、FBA 活性の低下がグルコース消費速度の低下の原因であると考え、FBA 活性増強株を作製した。*fba* 遺伝子を含むプラスミドを *sigB* 遺伝子欠損株に導入したところ、FBA 活性が約 4 倍に増強された。しかし、非増殖条件下でのグルコースの消費速度は *sigB* 遺伝子欠損株と変わらなかった。*sigB* 遺

伝子の不活性化により複数の解糖系遺伝子の発現が低下したことが、*sigB* 遺伝子欠損株のグルコース消費速度の低下の原因となっていると推測された。以上の結果から、SigB はグルコース代謝に関わる多くの遺伝子の発現を正に制御し、そして非増殖条件においてグルコース代謝を促進する機能を有することが明らかとなった。

解糖系遺伝子のプロモーター配列の解析を行い、SigB が認識するプロモーター配列を同定した。SigB による発現制御を受ける解糖系遺伝子のプロモーター配列のアライメントから、SigB が認識するプロモーター配列は-10 領域が tAnAAT、-35 領域が cgGCaa であると推定された。このプロモーター配列は SigA が認識すると考えられる配列と特に-35 領域において異なっており、SigB が SigA とは異なるプロモーター認識機構を有していることが示唆された。

以上の成果を論文として発表した (Appl Environ Microbiol 74: 5146-5152, 2008.)。

(a)-3-3. 代謝遺伝子の機能および発現制御機構の解析

有用工業微生物であるコリネ型細菌の全ゲノム配列は 2003 年に公開され、その後、多くの研究グループが様々な細胞機能遺伝子に関する研究を進めており、全ゲノムレベルの遺伝子ネットワークに関する理解が急速に進んでいる。本プロジェクトでは、前述の糖代謝関連遺伝子の解析に加え、当研究室で決定したコリネ型細菌 (R 株) の全ゲノム配列とこれに基づくトランスクリプトーム解析を基盤として、物質代謝に関わる様々な遺伝子の機能および発現制御の解析を行った。

i) メチオニン合成系遺伝子群の発現制御機構

前述のトランスクリプトーム解析の結果からメチオニン合成系遺伝子の多くが増殖非依存型バイオプロセス条件下で高発現することに着目した。本プロセスにおける高効率有機酸生成には天然栄養源の添加を必要としない。RT-PCR 解析の結果、本プロセス条件におけるメチオニン合成系遺伝子群の高発現は主にメチオニン欠乏によることが示された。また、転写抑制因子 McbR の遺伝子欠損株における解析から、メチオニン欠乏による遺伝子発現の促進に McbR が関与することが示唆された。McbR の effector として報告されていた S-adenosylhomocysteine (SAH) に加え、S-adenosylmethionine (SAM) が McbR のメチオニン合成系遺伝子 (*metY*) プロモーター領域への結合に影響することを示し、細胞内における SAM と SAH のバランスに応じた転写制御機構の存在が示唆された。

(発表論文: Appl Microbiol Biotechnol 81: 505-513, 2008.)

ii) RNA ポリメラーゼ σ 因子 SigH の機能解析

RNA ポリメラーゼの σ 因子は、細胞内外の様々な環境変化に応じた遺伝子発現制御ネットワークにおいて重要な役割を担っている。コリネ型細菌のゲノムには 7 個の σ 因子をコードする遺伝子が存在しており、本プロジェクトでは、前述の SigB に加えて、ECF σ 因子をコードする SigH の機能解析を行った。様々な培養条件における *sigH* 遺伝子の発現解析の結果、ヒートショックにより転写産物量が増加することが示された。*sigH* 破壊株を用いてトランスクリプトーム解析を行い、

SigH の制御下にある遺伝子の同定を行った。その結果、広く細菌に保存されているヒートショック蛋白質 (HSP) 群に加え、様々な細胞機能に関する遺伝子を含む、45 個の遺伝子の発現制御に SigH が関与することが示唆された。HSP (分子シャペロンや ATP 依存性プロテアーゼ) は蛋白質の quality control に重要な役割を担うと考えられる。HSP 遺伝子群の発現は特異的な2つの転写因子 HspR、HrcA とグローバルな役割を担う SigH により協調的に制御されることが示された。また、転写因子をコードする遺伝子 18 個が SigH の制御下にあることがわかり、複雑な転写制御ネットワークを形成することが示唆された。

(発表論文: J Bacteriol 191: 2964-2974. 2009.)

iii) レドックス応答性転写因子の解析

細菌では、細胞内酸化還元バランスの変化に応じた細胞機能調節に関わる様々なタイプの転写因子が知られている。しかしながら、コリネ型細菌のレドックス応答制御因子の報告はこれまでなかった。本研究では、コリネ型細菌の新規レドックス応答性転写因子 QorR による *qor2* (キノノキシンドレダクターゼ) の制御機構を明らかにした。QorR は、DUF24 protein family に属する新規転写因子である。トランスクリプトーム解析により、QorR は *qor2* と *qorR* の発現を負に制御することが示された。また、ゲルシフトアッセイにより、*qor2* と *qorR* のそれぞれのプロモーター領域に QorR が結合することを確認した。*qor2* と *qorR* は、チオール基特異的な酸化剤であるジアミドによる発現誘導を受け、さらに QorR は酸化剤処理により 17 番目のシステイン残基を介して二量体化し、DNA 結合活性を失った。以上の結果より、QorR はレドックス応答性の転写因子であり、*qor2* の転写を制御することで酸化ストレス応答に関与していることが明らかとなった。QorR ホモログは多くの細菌に存在し、そのシステイン残基も保存されている。また、*qor2* と *qorR* の遺伝的編成、さらにはそれらのプロモーター領域にある QorR 結合配列も保存されている。このことから、多くの細菌において *qor2* の発現制御機構が保存されていることが示唆された。

また、転写因子 CyeR による *cye1* の制御機構を明らかにした。*cye1* 遺伝子にコードされる old yellow enzyme は細菌に広く保存されるフラビン蛋白質で酸化ストレス応答に関与することが示唆されているが、その機能の詳細は不明である。*cyeR* 遺伝子は染色体上で *cye1* オペロンの上流に位置し、逆向きに転写される。*cyeR* 破壊株における遺伝子発現解析により、CyeR は *cye1* オペロンと自身の遺伝子の発現の抑制因子として働くことが示された。また、ゲルシフトアッセイにより CyeR が *cyeR-cye1* 遺伝子間領域に結合し、その結合がジアミドおよび過酸化水素による酸化処理により阻害されることを示した。CyeR には 2 個のシステイン残基 (Cys-36、Cys-43) が存在し、前者をアラニンに置換しても DNA 結合活性に影響はみられなかったが、後者をアラニンおよびセリンに置換したところ DNA 結合活性が消失した。これらの結果から、CyeR はレドックス応答性転写因子であり、その活性制御に Cys-43 が必須であることが明らかとなった。

(発表論文: J Biol Chem 284: 16736-16742. 2009., Microbiology 156: 1335-1341. 2010.)

v) NAD *de novo* 生合成経路遺伝子群の発現制御機構

NAD は細胞代謝における様々な酸化還元反応の補酵素として働き、生命活動にとって重要な役割を担う。多くの細菌は、アスパラギン酸からの NAD *de novo* 生合成経路と、細胞外の NAD 誘導体取り込み利用経路を持ち、これらの経路が協調的に制御されることにより、細胞内 NAD 補酵素レベルが維持される。本研究では、コリネ型細菌における NAD *de novo* 生合成経路遺伝子群の発現解析を行った。NAD *de novo* 生合成経路遺伝子の *nadA* と *nadC* は、コリネ型細菌ゲノム上で、その他 2 つの遺伝子とクラスターを形成している (*ndnR-nadA-nadC-nadS*)。 *nadA*、 *nadC*、 *nadS* それぞれの遺伝子欠損株を作成し、それらが NAD 生合成前駆体として利用されるニコチン酸要求性を示すことを確認した。このクラスターの先頭に位置する *ndnR* がコードする NrtR タイプの転写因子は、比較ゲノム解析により NAD 生合成・分解・再利用サイクルの制御に関与する新規転写因子であることが、最近示唆されたが、細菌によりその制御下にある遺伝子が異なることが予想され、*in vivo* における役割は示されていない。 *ndnR* 破壊株における *nad* mRNA の発現および *ndnR* プロモーター活性の解析により、この NAD *de novo* 生合成遺伝子の発現がニコチン酸存在下で抑制され、NdnR が転写抑制因子としてその制御に必須の役割を担うことが示唆された。

(発表論文:Appl Environ Microbiol 76 : 5488-5495. 2010.)

vi) C4-ジカルボン酸輸送体の探索

TCA 経路の中間代謝物である C4-ジカルボン酸(コハク酸、リンゴ酸、フマル酸)は多くの細菌により炭素源やエネルギー源として利用され、その取り込みや排出、交換輸送に関与する様々なタイプの輸送体が報告されている。増殖非依存型バイオプロセスを行う還元条件では乳酸や酢酸とともにコハク酸が生成する。したがって、C4-ジカルボン酸の輸送機構に関する知見は本プロセスの開発における基盤情報として重要である。コリネ型細菌のゲノム配列には 8 個の該輸送体相同遺伝子が存在するが、それらの機能はわかっていなかった。これらの C4-ジカルボン酸輸送体相同遺伝子の破壊株を、トランスポゾンを用いて構築した遺伝子破壊株ライブラリーから選択し、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸を単一炭素源としたプレート培養を行った。その結果、これら C4-ジカルボン酸により生育できない株を見出した。この遺伝子産物(DcsT と名づけた)は、多様な細菌で C4-ジカルボン酸による好気生育に関与することが知られている DctA とは異なるタイプ、divalent anion/Na⁺ symporter (DASS)ファミリーに属する。コリネ型細菌野生株における C4-ジカルボン酸利用能は非常に低いが、*dcsT* の高発現により著しく向上することを示した。コリネ型細菌のゲノム上には、200 以上の各種輸送体様遺伝子が存在するが、その多くは機能がまだわかっていない。今後、これらの機能解析を進めることにより、コリネ型細菌における独特な代謝物輸送機構について理解が深まることが期待される。

(発表論文:Appl Environ Microbiol 74 : 5290-5296. 2008.)

以上、遺伝子ネットワークの解析により得られた、様々な遺伝子の機能および発現制御に関する知見は、今後の代謝解析研究などの発展とあわせ、コリネ型細菌の細胞機能制御機構の全容

解明に大きく貢献し、代謝工学の重要な基盤になると考えられる。

(a)-5. 細胞複製機構の解析

増殖非依存型バイオプロセスは、コリネ型細菌が増殖を停止しながら高い物質生産能を維持するという特性を利用している。そのメカニズムを理解し、これを他の微生物に応用するための基盤研究として、コリネ型細菌の細胞複製機構に関する遺伝子の探索を行った。

コリネ型細菌はグラム陽性細菌に分類される桿菌であるが、その細胞形態は一方の端が膨らんだ棍棒型であるのが特徴的である。また細胞分裂様式も独特であり、細胞中央から折れるようにして行われる(スナッピング)。しかしながら細胞形態を維持する細胞骨格蛋白質 MreB や細菌間に広く保存されている細胞分裂蛋白質 FtsA などと相同性のある蛋白質の遺伝子を有していない。これらのことから、コリネ型細菌はモデル微生物とは異なる細胞複製機構に関わる遺伝子を有していると考えられる。

(a)-5-1. SOS 応答時におけるコリネ型細菌の細胞分裂阻害機構の解析

SOS 応答は、染色体 DNA が損傷した際に DNA 修復遺伝子および細胞分裂阻害遺伝子を発現誘導する機構である。SOS 応答で誘導される遺伝子は SOS 遺伝子と呼ばれる。SOS 応答は細菌に広く保存され、DNA 修復遺伝子や DNA 損傷を感知する RecA、SOS 遺伝子を負に制御する LexA などは細菌間での相同性も高い。しかしながら細胞分裂阻害遺伝子は、DNA 修復が完了するまで細胞分裂を抑える働きをもつ重要な遺伝子であるにもかかわらず、大腸菌の *sulA*、枯草菌の *yneA*、*Mycobacterium tuberculosis* の *rv2719c* の 3 遺伝子しか明らかになっていない。各遺伝子がコードする蛋白質間の相同性は低く、それぞれの細胞分裂阻害機構も異なっている。これらのことから、コリネ型細菌が新規の細胞分裂阻害遺伝子を有することが予想された。

yneA と *rv2719c* は共に染色体上で *lexA* 遺伝子と隣接してコードされている。バイオインフォマテックス的手法により YneA と Rv2719c は膜貫通領域を持つと予想されている。コリネ型細菌(R株)では *lexA* 遺伝子と隣接して、機能未知遺伝子 *cgR1759* がコードされていた。CgR1759 は C 末端に YneA や Rv2719c と同じく膜貫通領域と予想される部位を持つが、その他の部分でのアミノ酸配列に相同性は見られなかった。CgR1759 ホモログは *C. glutamicum* ATCC13032、*C. efficiens* に存在しており、すべて *lexA* 遺伝子と隣接してコードされていた。

コリネ型細菌に DNA 損傷を引き起こす mitomycin C を処理し細胞形態を観察した。大腸菌や枯草菌では mitomycin C 処理により SOS 応答が誘導され、細胞がフィラメント状に伸長することが報告されている。mitomycin C を処理したコリネ型細菌野生株では未処理のものと比較して約 6 倍にまで伸長した細胞が観察された。これに対し *cgR1759* 欠損株および *recA* 欠損株では mitomycin C 処理を施しても細胞の伸長は見られなかった。次に SOS 応答による遺伝子発現誘導が見られるかを検討するため、mitomycin C を処理した野生株および *recA* 欠損株で Northern blot 法により *cgR1759* の発現を確認した。その結果、*cgR1759* は mitomycin C 処理した野生株での発現誘導は認められたが *recA* 欠損株では発現誘導されなかった。以上の結果より *cgR1759* は SOS 応答

で誘導される細胞分裂阻害遺伝子であることが示唆された。さらに、*recA* 欠損株および *cgR1759* 欠損株では mitomycin C への感受性が高まったことから、コリネ型細菌の *recA* 遺伝子および *cgR1759* 遺伝子は DNA 損傷時の生存にも寄与していることが示唆された。

大腸菌や枯草菌、*M. tuberculosis* では SOS 応答時に細胞分裂環である FtsZ ring の形成および隔壁形成が阻害されることが知られている。コリネ型細菌でも同様に SOS 応答時に FtsZ ring および隔壁の形成阻害が見られた。さらに CgR1759 過剰発現株では細胞伸長に加え、分岐や膨張した細胞が見られた。以上の結果より、CgR1759 は細胞分裂阻害能を持つ蛋白質であることが示された。

本研究により、コリネ型細菌における SOS 応答時に誘導される細胞分裂阻害遺伝子 *cgR1759* が明らかとなった。CgR1759 は既に報告されている SulA、YneA、Rv2719c とは異なる構造を持つ新規な蛋白質である。今後、CgR1759 の細胞分裂阻害機構を詳細に研究することにより、コリネ型細菌の細胞複製機構についてさらなる知見が得られることが期待される。

以上の成果を論文として発表した (Mol Microbiol 67: 597-608. 2007.)。

(a)-5-2. コリネ型細菌の細胞分離に関わる遺伝子群の解析

細胞分裂は、細胞中央での FtsZ ring 形成に始まり、隔壁の形成、それに続く隔壁の分解により細胞が分離されることで完了する。大腸菌や枯草菌などのモデル微生物では細胞の分離に関わる遺伝子が明らかにされてきているが、コリネ型細菌の細胞分離に関わる遺伝子についての報告はなかった。また、コリネ型細菌はスナッピングという独特の分裂様式をとることから、これに関わる新規の遺伝子を持つことが予想される。

大腸菌や枯草菌で細胞分離に異常が見られるものは、細胞伸長することが報告されている。そこで、コリネ型細菌 (R 株) の大規模ランダムゲノム削除法により得られた変異株の中から、細胞分離に異常が見られるものを顕微鏡観察により選別した。その結果、細胞が伸長し、内部に節のようなものが見られる変異株 RD41 を得た。RD41 は *cgR1595* から *cgR1604* までの 10 遺伝子を欠損していた。本形態異常の原因遺伝子を明らかにするため、*cgR1595* から *cgR1604* までの遺伝子を一つずつ RD41 に導入し細胞形態を観察したところ、*cgR1596* を導入した株でのみ細胞形態が野生型に戻ることが見出された。さらに *cgR1596* 単独欠損株でも RD41 と同様の細胞形態異常が観察されたことから、*cgR1596* がコリネ型細菌の細胞分離に関与することが示唆された。

CgR1596 は N 末端に細胞外分泌に関わるシグナル配列を持ち、C 末端には大腸菌や枯草菌の細胞分離に関わる細胞壁分解酵素によく保存されているドメイン (NlpC/P60 ドメイン) を有している。大腸菌や枯草菌では複数の細胞壁分解酵素が細胞分離に関わることから、コリネ型細菌における *cgR1596* 以外の細胞分離に関わる遺伝子を NlpC/P60 ドメインに着目して探索した。その結果、コリネ型細菌のゲノム配列から、CgR1596 の他に NlpC/P60 ドメインを持つ蛋白質 (CgR0802、CgR2069、CgR2070) をコードすると推測される遺伝子が 3 個見出された。これら 3 つの単独欠損株では細胞分離に異常は見られなかったが、CgR1596-CgR2070 二重欠損株では CgR1596 単独欠損株よりも重篤な細胞分離異常が認められた。以上の結果より、CgR1596 と CgR2070 がコリネ型

細菌の細胞分離に関わるタンパク質であり、CgR1596 が主要な役割を果たしていることが示唆された。

CgR2070 は CgR1596 と同様に N 末端に細胞外分泌シグナルを有していた。各シグナル配列と α -アミラーゼを融合させ細胞外分泌能を判定した結果、両シグナル配列とも機能することが示唆された。CgR1596 と CgR2070 の C 末端に myc-tag を融合させ、その局在部位を観察したところ、CgR1596 は細胞中央と細胞端に局在が認められた。しかしながら CgR2070 は局在が検出できなかった。以上の結果より、CgR1596 は細胞外に分泌された後に細胞中央の細胞分裂面に局在し細胞分離に関わることが示唆された。CgR2070 は細胞壁への結合力が弱いためにシグナルが検出できない可能性がある。

cgR1596 単独欠損株および *cgR1596 cgR2070* 二重欠損株を透過型電子顕微鏡で観察したところ、細胞内部に隔壁が多数観察された。以上の結果より、両遺伝子は確かにコリネ型細菌の細胞分離に関わることが示された。

本研究により、コリネ型細菌の細胞分離に関わる遺伝子が明らかとなった。本知見は、コリネ型細菌の細胞分裂機構と密接に関わるものであり、今後の研究によりスナッピングや他の細胞分裂蛋白質との相互作用などが明らかにされることが期待される。

以上の成果を論文として発表した (J Bacteriol 190: 8204-8214. 2008.)。

(a)-5-3. 硝酸存在下における嫌気増殖

増殖非依存型バイオプロセスは、還元条件下においてコリネ型細菌が増殖を停止しながら高い物質生産能を維持するという特性を利用している。該細菌の嫌気条件下における細胞増殖(停止)機構・代謝制御機構の解析により、増殖非依存型バイオプロセスの開発を進める上で有用な基盤情報が得られることが期待される。コリネ型細菌は一般的に好気性微生物と認識されており、嫌気条件下における細胞増殖や遺伝子発現制御に関する知見はほとんどなかった。一方、コリネ型細菌は分類学上、硝酸還元能を有することが知られている。また、近年明らかになった本菌の全ゲノム配列から、細菌に広く保存されている硝酸/亜硝酸トランスポーター NarK、膜結合型の硝酸還元酵素複合体 NarGHI に相同性の高い蛋白質群をコードする *narKGHJI* 遺伝子クラスターが認められた。そこで、我々はコリネ型細菌 (R 株) の嫌気条件下における硝酸呼吸による細胞増殖、硝酸呼吸に関与する *nar* オペロンの発現調節機構の解析を行い、さらに嫌気硝酸呼吸時のトランスクリプトーム解析を行った。

i) コリネ型細菌の硝酸呼吸に関与する *narKGHJI* オペロン

最小培地を用いて、硝酸塩存在下におけるコリネ型細菌 (R 株) の嫌気培養試験を行った結果、本菌が硝酸塩を電子受容体として嫌気的な生育(硝酸呼吸)を行う“通性嫌気性細菌”であることを明らかにした。また、*narG*、*narH* 遺伝子の破壊株を用いた解析により、これらの遺伝子が硝酸呼吸による生育に必須であることを示した。プライマー伸長法および定量的 RT-PCR 法を用いた *narKGHJI* 遺伝子領域の転写産物の解析結果から、*narKGHJI* 遺伝子群が *narK* を 5' 末端とする

単一のおペロンを形成し、同おペロンの発現が嫌気硝酸呼吸条件下において顕著に誘導されることを示した。

(発表論文:Appl Microbiol Biotechnol 75:889-897. 2007.)

ii) *nar* おペロンの新規転写抑制因子 ArnR の同定

narKGHJI おペロンのすぐ下流に位置する *arnR* 遺伝子がコードする ArnR (aerobic repressor of nitrate reductase R) による同おペロンの転写制御に注目した。アミノ酸配列比較解析から、ArnR は機能既知タンパク質と有意な相同性を示さなかった。*arnR* 欠損株 (Δ *arnR*) の硝酸還元能および *nar* おペロンの転写量の解析結果から、ArnR は好気条件下において *nar* おペロンの転写を抑制する転写因子であることが示唆された。嫌気硝酸呼吸条件下では、この ArnR による抑制が解除されることにより、*nar* おペロンの発現誘導が起こるものと考えられる。また DNA マイクロアレイを用いた Δ *arnR* 株の網羅的な遺伝子発現解析から、一酸化窒素 (NO) の解毒への関与が予想されるフラボヘモグロビンをコードする *hmp* 遺伝子の発現が、ArnR によって抑制されることを示した。ArnR タンパク質は、*nar* おペロンおよび *hmp* 遺伝子に加えて、自身をコードする *arnR* 遺伝子のプロモーター領域にも特異的に結合することから、これら3つの標的遺伝子の転写を直接的に制御することが明らかとなった。さらに、これら標的遺伝子のプロモーター領域内に存在するコンセンサス配列に ArnR が結合することを示した。

大腸菌や枯草菌では、嫌気条件において *nar* おペロンを含む多数の嫌気代謝遺伝子の発現誘導に関わる転写因子 Fnr が知られている。Fnr は嫌気条件下で *nar* 遺伝子の転写促進因子として働くが、コリネ型細菌の ArnR は Fnr とは逆に好気条件下で転写抑制因子として働き、嫌気条件における脱抑制により *nar* 遺伝子の発現が誘導されることが示唆され、構造・機能ともに Fnr とは異なる新規転写因子であることが示された。

(発表論文:J Bacteriol 190:3264-3273. 2008.)

iii) cAMP 依存性転写因子 GlxR による *nar* おペロンの発現制御

nar プロモーター領域の ArnR 結合サイトの upstream に、大腸菌においてカタボライト抑制に関与する CRP (cAMP receptor protein) のホモログである転写因子 GlxR が結合すると予想されるコンセンサス配列を見出した。まず、GlxR がこのコンセンサス配列に cAMP 依存的に結合することを確認した。*in vivo* において GlxR および cAMP が *nar* おペロンの転写制御に関与するかどうかを検討するために、*nar* プロモーター領域の GlxR 結合サイトへの変異導入の影響を β -galactosidase を発現レポーターとして評価した。その結果、好気および嫌気硝酸呼吸両条件下において、変異導入により、同プロモーター活性が顕著に低下することを認めた。*arnR* 欠損株においてもこの傾向は変わらなかった。次に、cAMP の合成に関与する *cyaB* 遺伝子の欠損による転写活性への影響を同様に評価した結果、好気および嫌気硝酸呼吸両条件下において、同プロモーター活性が顕著に低下した。以上の結果から、酸素またはレドックスに応答すると予想される ArnR の機能とは独立して、GlxR は *nar* おペロンの転写を cAMP 依存的に正に制御することを明らかにした。

「(2)(a)-3-1. グローバルレギュレーターGlxR の機能解析」で記したように、GlxR は中央代謝系や細胞複製を含む様々な細胞機能に関わる遺伝子の発現制御に関与するグローバルレギュレーターであり、大腸菌 CRP とは異なるコリネ型細菌独特の制御システムとして機能することが示唆されている。この cAMP-GlxR グローバル制御システムが嫌気代謝調節においてどのような役割を担っているのか、今後の解明が期待される。

(発表論文:Microbiology 157:21-28, 2011.)

iv) 嫌気硝酸呼吸時における遺伝子発現プロファイリング

嫌気硝酸呼吸時の遺伝子発現応答の全容を理解するために、トランスクリプトーム解析を行った。同条件下では好気条件下と比較して、80 個の遺伝子の発現が有意に上昇したのに対し、151 個の遺伝子の発現が低下した。硝酸呼吸 (*nar*) および *hmp* 遺伝子に加えて、炭素代謝、呼吸鎖コンポーネントを含む様々な細胞機能に関与する多数の遺伝子の発現変化を検出した。炭素代謝に関与する発酵性の L-乳酸脱水素酵素遺伝子 *ldhA* の発現上昇、TCA 経路遺伝子 (*gltA*, *icd*, *odhA*, *fum*) の発現低下を観察した。呼吸鎖コンポーネントについては、NADH 脱水素酵素遺伝子 *ndh* の発現低下、呼吸性の L-乳酸脱水素酵素遺伝子 *lldD* およびシトクロム *bd* オキシダーゼ遺伝子クラスター *cydABDC* の発現上昇を観察した。増殖非依存型バイオプロセスにおけるトランスクリプトーム解析の結果と同様、好気-嫌気代謝シフトが認められ、さらなる解析により本菌における嫌気応答システムの理解が深まることが期待される。

嫌気硝酸呼吸条件において、DNA 損傷に対するヌクレオチド除去・組換え修復、細胞分裂抑制、SOS 応答の発現制御に関与する“SOS 応答”遺伝子群の発現が誘導されることに着目した。本条件下において、SOS 応答の特徴である細胞分裂抑制因子の誘導による異常な細胞伸長も観察された。これらの転写および形態レベルの変化は、センサータンパク質として SOS 遺伝子群の転写活性化に関与する RecA をコードする *recA* 遺伝子の破壊株では観察されなかった。さらに、嫌気硝酸呼吸条件下における *recA* 破壊株の生存率が、野生株のそれと比較して著しく低下することを確認した。以上の結果から、RecA 依存的な SOS 応答が、嫌気硝酸呼吸条件下におけるコリネ型細菌の生存に重要な役割を果たしていることを示した。SOS 応答は、他の細菌において細胞壁ストレス、酸化ストレス、高圧等、様々な環境要因によって発動されることが知られているが、嫌気硝酸呼吸条件下における SOS 応答に関する報告は初めてであり、細菌における SOS 応答の新しい役割を示すものである。

(発表論文:J Bacteriol. (in press).)

(a)-5-4. コリネ型細菌 *C. glutamicum* の細胞増殖機構の解析

(東京工業大学 和地正明准教授)

コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* には、グルタミン酸生産誘導処理のように細胞表層合成を阻害すると直ちに増殖を停止し、細胞の代謝を維持するという独特な細胞増殖の制御機構が存在する。本研究は、*C. glutamicum* の細胞増殖の停止を引き起こす要因を明らかにし、人

為的に本菌の増殖を制御する技術を開発することを目的とした。

C. glutamicum の増殖を抑制するような因子を見いだすために、ペニシリン処理した細胞のプロテオーム解析を行った。その結果、グルタミン酸生産におけるキー酵素である 2-oxoglutarate dehydrogenase の活性を阻害する OdhI タンパク質の発現がペニシリン処理により顕著に上昇することを見出した。*odhI* 遺伝子を多コピープラスミドにクローン化した OdhI 発現増強株はペニシリン誘導なしでも培養後期になるとグルタミン酸を生産した。この成果は「L-グルタミン酸の製造方法」として特許出願した(特願2007-330383)。OdhI のリン酸化部位である Thr-14 を Ala に置換した非リン酸化型 OdhI 変異体(OdhI-T14A)を発現誘導したところ、速やかに細胞増殖が抑制されることが確認された。これにより、IPTG 誘導により人為的に *C. glutamicum* の細胞増殖を抑制する系の開発に成功した。

(a)-6. 代謝産物のマテリアルバランスの解析／細胞内酸化還元状態の解析

基幹物質の高生産を目的とした代謝改変において、代謝改変の効果を細胞内代謝産物のレベルで解析し、その結果をさらなる代謝改変にフィードバックすることは迅速かつ効率的な生産菌の作出に必須である。従来の発酵法による物質生産では、目的とする生産物以外に細胞構造体等の増殖に必要な多種類の代謝産物が生成すること、さらにそれら代謝産物には微量なものも多数存在し、検出・定量が困難なことから代謝物を総合的に把握することは実質的に不可能であった。これに対して、増殖非依存型バイオプロセスによる物質生産は、目的の生産物の収率が発酵法と比較してはるかに高いという利点も加わり、細胞内外の代謝物の総合的な検出定量がはるかに容易かつ正確にできることから、代謝系の全容解明が可能となる。

そこで本研究では、代謝改変の効果を還元(非増殖)条件下のコリネ型細菌における細胞内代謝産物のレベルで解析することを目的とし、細胞内代謝産物をハイスループットかつ高感度、高精度で一斉定量可能となる分析系の開発を行った。

中央代謝系(解糖系、ペントースリン酸経路、TCA 経路)の中間代謝産物は代謝が速いことからサンプリング時に菌体の代謝を瞬時に停止させること(クエンチング)、さらにその後細胞内代謝産物を効率よく抽出する必要がある。条件検討した結果、冷メタノールによるクエンチング、その後クロロホルムによる抽出を行うことにより高効率かつ再現性の高い抽出法が確立された。分離分析系には定量分析において感度、精度ともに優れている LC-MS/MS を採用した。標品を用いて分離系の確立を行い、イオンペア試薬を用いた逆相分離を行うことで測定対象化合物の分離に成功した。続いて MS/MS 分析条件の検討を行い、各化合物におけるイオン化条件の最適化、定量分析に用いるフラグメントイオンの選択を行った。各化合物の最適化測定条件をもとに MRM メソッドを作成し、メタボローム解析を可能とする一斉定量法を構築した。標品を用いて分析感度、精度を検証したところ、ほぼ全ての化合物において 0.5-100 pmol の間で再現性よく定量できることが明らかになった。

そこで実際にコリネ型細菌より水溶性代謝産物を抽出し、メタボローム解析を行ったところ、標品と同様の感度、精度で定量分析が可能であった。既に確立されているメタボローム分析法と比

較して、今回構築した分析法は解析対象化合物の種類、感度および精度、全てにおいて優れており、代謝改変による生産菌の作出に役立つことが期待された。

(b) 基幹物質生産細胞の創製

コリネ型細菌の物質代謝に関わる細胞機能解析により得られた知見に基づき、増殖非依存型バイオプロセスにおける生産性向上のための基盤要素技術開発として、糖代謝機能の強化、副生物代謝経路の抑制制御、代謝遺伝子の発現レベルの最適化などの研究課題に取り組んだ。確立した基盤要素技術を改良・統合して、有機酸、糖アルコール、アミノ酸、の各種化合物の高効率生成システムの構築を行った。

(b)-1. 代謝遺伝子の発現レベルの最適化

物質生産細胞の遺伝子発現レベルの最適化の検討を行う際に重要なツールとなる、ベクター系と誘導プロモーターの開発を行った。

i) コリネ型細菌におけるホスト・ベクターシステムの開発

コリネ型細菌を用いたバイオプロセスによる有用物質の高生産を達成するためには、代謝遺伝子を効率よく機能的に発現させるための遺伝子発現技術の開発やホスト・ベクターシステムの開発が必要不可欠である。いくつもの遺伝子を複数同時に発現させるためには目的遺伝子を導入したプラスミドベクターをコリネ型細菌に共存させる必要があり、そのためには複製起点と薬剤耐性マーカーがそれぞれ異なるベクターシリーズが必要となる。また、導入遺伝子の最適な発現レベルや活性レベルを維持するためには、ベクターのコピー数やプロモーターの強度により遺伝子の発現量を調整することが重要である。これらのことから、様々なコピー数、複製起点、薬剤耐性マーカーを持つコリネ型細菌のホスト・ベクターシステムの開発を行った。

これまでにコリネ型細菌において rolling circle 型のプラスミドである pBL1 ファミリーや pCG1 ファミリーのプラスミド、theta 型の pXZ10142 プラスミドファミリーが報告されている。コリネ型細菌のスクリーニングにより新規のプラスミドの単離を試みた結果、*Corynebacterium casei* JCM12072 株から pCASE1 プラスミドと、*C. glutamicum* ATCC14997 株から pCGR2 プラスミドの単離に成功した（発表論文：Appl Microbiol Biotechnol. 81:1107-1115. 2009.、Appl Microbiol Biotechnol. 87:1855-1866. 2010.）。系統学的分類により pCASE1 は theta 型の pXZ10142 プラスミドファミリーに属し、pCGR2 は rolling circle 型の pCG1 ファミリーに属することが明らかになった。またコピー数の測定の結果、pCASE1 は 11~20 コピー、pCGR2 は 4 コピーであった。さらにコピー数が 1 である pCG1 ファミリーに属する pBY503 の複製起点を新たに単離した。これらの結果、報告のある pBL1 プラスミド、pCG1 プラスミド、pCC1 プラスミドから取得した 3 種類の複製起点に加え、新規に pCASE1 プラスミド、pCGR2 プラスミド、pBY503 プラスミドの複製起点の単離に成功し、合計で 6 種類の異なる複製起点を持つベクターの作製に成功した。

耐性マーカーは Chloramphenicol、Kanamycin、Zeocin、Hygromycin、Erythromycin、

Streptomycin、Apramycin の 7 種類の薬剤耐性遺伝子を取得し、大腸菌の pBR322 複製起点と、コリネ型細菌の 6 種類の各複製起点のベクターにそれぞれ連結することで、複製起点と薬剤耐性マーカーの異なる合計 42 種類のシャトルベクターの作製に成功した。これらのシャトルベクターはいずれも共存可能であった。

また、コピー数の改変のため、antisense RNA によるコピー数制御に着目した。antisense RNA によるプラスミド複製制御はプラスミドのコピー数の決定要因の一つであることが知られている。antisense-RNA は、複製開始因子の発現の抑制因子として働くが、*Streptococcus* の pIP501 プラスミドで見られるような転写の減衰や大腸菌の R1 プラスミドで見られるような翻訳阻害など多様なメカニズムが知られている。antisense-RNA は、複製開始因子をコードする *rep* 遺伝子の 5' 非翻訳領域 leader region に逆向きにコードされ、相補する mRNA の leader 領域との相互作用により複製開始因子の発現を負に制御する。そこで、コリネ型細菌の pCGR2 と pCG1 プラスミドにおいて *rep* 遺伝子の leader 領域に antisense-RNA がコードされているかどうか検討した。両プラスミドは、それぞれ pCG1 family の中の異なる subfamily に属するが、いずれも antisense-RNA 遺伝子の存在は示されていなかった。RACE 法により、それぞれ 72 nt と 73 nt の antisense-RNA が発現していることを確認し、また、その上流に *rep* の ORF とオーバーラップしてプロモーターとして働くことが予想される配列が見出された。次に、それぞれ pCGR2 と pCG1 由来のシャトルベクターを構築し、antisense-RNA 遺伝子の推定プロモーター配列への変異導入の影響を調べた。その結果、Ribonuclease protection assay によって、それぞれ、antisense-RNA が検出され、プロモーター変異導入により、その発現が消失することを確認した。この antisense-RNA の消失に伴い、プラスミドのコピー数が 6-7 倍まで上昇した。さらに pCGR2 プラスミドの *rep* 遺伝子上流に位置する 2 つの遺伝子 *parA* と *parB* に着目した。これらは協調してプラスミド複製後の分配に関与すると推定される。antisense-RNA の発現阻害と *parB* の削除により、元のコピー数の 80 倍、200 コピーまでコピー数が増加したプラスミドが得られた(発表論文: Microbiology 156: 3609-3623.)。

この antisense-RNA と *par* 遺伝子の変異により、上記 7 種の薬剤耐性マーカーを導入した pCGR2 のハイコピーナンバープラスミドのシリーズを構築した。また、pCC1 の *repA* 遺伝子の 5'-UTP に変異を導入することで、コピー数が 300 コピーに増加することを見出し、これに基づいて、pCC1 のハイコピーナンバープラスミドのシリーズを構築した。

さらに、上記新規プラスミドにランダム変異を導入してスクリーニングを行い、温度感受性プラスミドを取得した。これを利用して、コリネ型細菌の複数の菌株の染色体組換えが可能であることを確認した。

ii) 誘導プロモーターの開発

コリネ型細菌でこれまでに遺伝子組換え技術に用いられたプロモーターは、コリネ型細菌プラスミド由来の配列やアミノ酸生合成系遺伝子のプロモーター等に限られる。これらは一般に恒常的に発現するタイプと考えられており、誘導発現が可能なプロモーターの報告例はほとんどない。このことから還元条件下で誘導可能なコリネ型細菌プロモーターの探索と機能解析を実施した。

トランスクリプトーム解析により、好気増殖条件と比較して増殖非依存型バイオプロセス条件下において高発現する遺伝子のプロモーターにレポーター遺伝子 (*lacZ*) を連結し、プロモーター活性の強度や誘導パターンを解析した。その結果、様々な強度や誘導パターンを持つプロモーターを取得した。また、トランスクリプトーム解析に基づき、 β -グルコシド、マルトース、グルコン酸により誘導するプロモーターを単離した(発表論文:Lett Appl Microbiol 50: 173-180. 2010.、J Bacteriol 193: 349-357. 2010.)。

さらに、大腸菌の *lacI* 制御系を利用した誘導プロモーターを開発した。

(b)-2. 増殖非依存型バイオプロセスにおける糖消費速度の向上

基幹物質生産性向上のためには糖代謝速度の向上が鍵となる。中でもグルコースはソフトバイオマスで最も多く含まれる糖源であることから、この代謝速度を上げることを重要課題として研究開発を行った。糖代謝遺伝子発現制御に関する知見から、糖消費速度が向上する遺伝子改変株が得られた。

(b)-3. 増殖非依存型バイオプロセスにおける酢酸生成経路の特定

発酵法等の既存のバイオプロセスにおいて一般的に、回収精製コストは、総コストの中で大きな割合を占める。この理由としては、目的産物の濃度が一般的にあまり高くは望めないこと、培地成分として天然栄養源が通常必要なことがあるが、特に副生物の種類、濃度が“相当なレベル”に達することがあげられる。

これに対し、増殖非依存型バイオプロセスでは、反応液組成に天然栄養源が不要であるというメリットは当然として、副生物の種類、量を極限まで低下させることが可能なことから、回収精製コストは大幅に低下する。更なる回収精製コストの低下を目指すためには、本プロセスにおいて主な副生物である酢酸生成を抑制させる必要があり、本研究では酢酸抑制に適した宿主作製のための基礎的知見として、コリネ型細菌の主要酢酸生成経路を特定した。

酢酸生成に関与する酵素遺伝子の特定

大腸菌や枯草菌、*Clostridium* 属等では既に酢酸代謝経路について報告がある。それらを参考に、コリネ型細菌における酢酸生成経路および関与する酵素(群)を推定した。その結果、ターゲットとなる酵素として、pyruvate:quinone oxidoreductase (PQO)、pyruvate dehydrogenase complex (PDHC)、phosphotransacetylase (PTA)、acetate kinase (ACK)、CoA-transferease (CTF) が挙げられた。PQO、PDHC、PTA、ACK に関しては、*C. glutamicum* ATCC13032 株で既に、各遺伝子 *pqo*、*aceE*、*pta*、*ack* についての機能に関する報告がみられ、R 株のゲノム配列中に 99%以上のアミノ酸相同性配列を示す遺伝子が 1 つずつ存在した。一方、CTF はコリネ型細菌における機能に関する報告はなく、機能が報告されている最も近種の菌株としては、同じグラム陽性細菌である *Clostridium kluyveri* の succinyl-CoA/CoA transferase が挙げられる。コリネ型細菌(R 株)中に、この遺伝子と配列上相同性のある遺伝子が 2 つ存在した(*ctfA*、*ctfB*)。

副生成物抑制株の構築

遺伝子工学的手法を用いてターゲットとなる遺伝子の破壊を行った。親株は、L-lactate dehydrogenase (LDH) 破壊株を使用した。作製した株について酵素活性測定により、ターゲットとなる酵素遺伝子が破壊されたことを確認した。作製した株を使用して増殖非依存型バイオプロセスを行い、グルコース添加 6 時間後の培養液中の酢酸濃度とグルコース濃度を定量した。各作製株のグルコース消費あたりの酢酸生成量から、各遺伝子破壊が酢酸生成に与える影響を調べた。

まず、ピルビン酸からの反応に関連する酵素、PQO および PDHC の遺伝子破壊が酢酸生成に与える影響を調べた。その結果、*pqo* 欠損株は親株と同程度の酢酸生成量であったのに対し、*aceE* 欠損株は、親株の 3% 程度量にまで抑えられた。*aceE* 欠損株に、さらに、*pqo* 破壊を重ねても更なる酢酸抑制がみられなかったことから、本条件下において、ほとんどの酢酸が、ピルビン酸からアセチル CoA を経由して生成されていることがわかった。

次に、アセチル CoA から酢酸への反応に関与する酵素である PTA、ACK および CTF の各遺伝子破壊が酢酸生成に与える影響を調べた。その結果、*pta-ack* 欠損株、*ctfActfB* 欠損株は親株と同程度の酢酸生成量であったのに対し、これらを同時に破壊した株、 $\Delta ctfA \Delta ctfB \Delta (pta-ack)$ 株では、酢酸が親株の 35% 量にまで減少した。すなわち、本条件下、コリネ型細菌では、PTA-ACK 経路と CTF 経路の両経路が酢酸生成に大きく関与することが示された。大腸菌では、アセチル CoA からの酢酸経路が PTA-ACK の 1 経路だけであり、また、枯草菌においても、PTA-ACK 経路以外の経路も示唆されているものの、はっきりとその経路が知られていないことから、コリネ型細菌では、PTA-ACK 経路だけでなく、CTF 経路が主要経路であるという点で、これらの細菌と異なる可能性が示唆された。

さらに、機能未知の遺伝子 *ctfA*、*ctfB* のうち、どちらの遺伝子が酢酸生成に関与するのかを調べるために、 $\Delta ctfA \Delta (pta-ack)$ 株と $\Delta ctfB \Delta (pta-ack)$ 株との酢酸生成量を調べた。その結果、 $\Delta ctfB \Delta (pta-ack)$ 株は親株と同程度の生成量であったのに対し、 $\Delta ctfA \Delta (pta-ack)$ 株で $\Delta ctfA \Delta ctfB \Delta (pta-ack)$ 株と同様、親株の 35% 量にまで生成量が減少したことから、*ctfA*、*ctfB* のうち、*ctfA* が酢酸生成に関与していると考えられた。

以上の結果から、コリネ型細菌は、本条件下において、ピルビン酸から PDHC によりアセチル CoA を生成し、その後、PTA-ACK と CTF 両経路を介して、酢酸を生成することがわかった。

以上の成果を論文として発表した (Appl Microbiol Biotechnol 77: 853-860. 2007.)。

(b)-4. D-乳酸生産細胞の創製

ポリ乳酸は、各国で食品包装材として利用が認可されたバイオマスプラスチックであるが、耐熱性が低いことから用途が限られている。その様な中、ポリ L-乳酸とポリ D-乳酸のステレオコンプレックス型ポリ乳酸が、高い熱安定性を有することが知られてきた。また乳酸は、年間 420 万トンの需要があるアクリル酸に、一段階の触媒反応によって変換可能であることが知られており、市場の大

きい基幹物質として可能性がある。そこで、高生産性(10 g/L/h 以上)の D-乳酸生産プロセスの構築を目的として、増殖非依存型バイオプロセスに用いるコリネ型細菌を代謝改変し、D-乳酸生産を検討した。

コリネ型細菌の L-lactate dehydrogenase 遺伝子(*ldhA*)欠損株にて、大腸菌、および *Lactobacillus delbrueckii* 由来の D-lactate dehydrogenase 遺伝子を発現した D-乳酸生産株を構築した。同遺伝子導入株の lactate dehydrogenase 活性を測定したところ、親株である D-lactate dehydrogenase 欠損株(Δ *ldhA*)では、その活性は認められなかったが、D-lactate dehydrogenase 遺伝子を導入した株では、lactate dehydrogenase 活性が検出され、導入遺伝子が機能していることを確認した。

続いて、これらの株の増殖非依存型バイオプロセスによるD-乳酸の生産試験を行い、株間のD-乳酸生産性を比較した。その結果、大腸菌由来のD-lactate dehydrogenase 遺伝子を導入した株(Δ *ldh*/pCRB201)よりも、乳酸菌由来の D-lactate dehydrogenase 遺伝子を導入した株(Δ *ldh*/pCRB203、 Δ *ldh*/pCRB204)の方が、高いD-乳酸生産性を示した。また、乳酸菌の D-lactate dehydrogenase 遺伝子導入株では、プロモーターの違いによって本酵素の発現量に差が認められたが、D-乳酸の生産性には顕著な差は認められなかった。従って、本条件下においては D-lactate dehydrogenase 発現量は充分であり、他の代謝系が D-乳酸生産の律速要因になっていることが示唆された。

次に乳酸菌の D-lactate dehydrogenase 遺伝子導入株を用い、高濃度の D-乳酸生産試験を行った。その結果、反応初期では 10g/L/h 以上の生産性にてD-乳酸が生成し、反応 24 時間時には、約 120 g/L の D-乳酸が生成されることが認められ、従来の D-乳酸生産株と比較しても、高生産性、高生産濃度であった。生産された D-乳酸の光学純度は、キラルカラムを装備したHPLCによって測定し、99.9%以上であることが認められた。

以上の成果を論文上で発表した(Appl Microbiol Biotechnol 78:449-454, 2008.)。

(b)-5. L-アラニン生産細胞の創製

L-アラニンは医療用の輸液や甘味料として使用されるアミノ酸の一種であり、これまでに微生物による L-アラニンの生産の方法が開発されてきた。生産方法は酵素法と発酵法の二つに大別される。酵素法の生産性は高いものの、基質が L-アスパラギン酸であること、発酵法は糖を原料に生産できるが増殖依存型の反応であり生産性が低いという問題点がある。我々が開発した増殖非依存型バイオプロセスは、糖を原料とし目的の基幹物質を高効率で生産することから、これらの問題点を解決することができると思われる。

本研究では、増殖非依存型バイオプロセスでのアミノ酸生産の開発を目的とし、そのモデルケースとしてL-アラニン生産細胞の構築を行った。

コリネ型細菌に新たなアラニン生産経路を付与するため *Bacillus sphaericus* 由来の alanine dehydrogenase 遺伝子(以下 *alaD*とする)を *tac* プロモーター下流に連結したプラスミドを構築した。アラニンの生合成では、他のアミノ酸をアミノ基供与体として用いることが一般的であるが、該酵素

は、アンモニアをアミノ基供与体とするため効率的なアミノ酸生産に有効と思われる。構築したプラスミドを phosphoenolpyruvate carboxylase 遺伝子、lactate dehydrogenase 遺伝子、alanine racemase 遺伝子を破壊したコリネ型細菌に導入することで *alaD* 株を作製した。作製した *alaD* 株では、親株と比較してアラニン生産の向上が確認されたが、還元条件における糖消費速度が大きく低下した。該条件における糖代謝速度の律速因子として、NADH/NAD⁺のインバランスが考えられ、これを回避するために glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の高発現を試みた。GAPDH はグルコースの代謝過程で glyceraldehyde-3-phosphate を酸化する酵素であり、その反応において補酵素 NAD⁺を還元する。この反応により生成した NADH は GAPDH の反応阻害因子として作用することが知られており、NADH/NAD⁺ 比が糖代謝速度の制御に関与していることが明らかになっている。そこで、糖消費速度の改善を目的とし、*alaD* および *gapA* 遺伝子を高発現させた *alaD-gapA* 株を構築し、該菌株および *alaD* 株の L-アラニン生産を比較検討した。その結果、*alaD-gapA* 株は糖消費速度が向上し、*alaD* 導入株の約4倍のアラニン生産性を示した。アラニン生成条件における *alaD* 株、*alaD-gapA* 株の細胞内代謝物濃度を本プロジェクトにて開発された手法により定量分析した。その結果、*alaD-gapA* 株では、グリセルアルデヒド 3-リン酸の細胞内濃度が *alaD* 株と比較して半減していた。このことから、GAPDH を高発現することで細胞内の NADH/NAD⁺のインバランスが回避され、増殖非依存型バイオプロセスにおける糖消費速度、および L-アラニン生産性が向上したと考えられる。

さらに高生産速度(高 STY)の達成を目的に *alaD-gapA* 株を用いた増殖非依存型バイオプロセスによる高濃度の L-アラニン生産試験を行ったところ、最大生産性 10 g/L/h 以上、光学純度 99% のアラニン生産を確認した。また、これまでに報告されているバイオプロセスによる L-アラニン生産と比較して、非増殖・非通気条件である増殖非依存型バイオプロセスは、32 時間で最大生産量 104 g/L、最大生産速度 10.3 g/L/h と短時間に高濃度の L-アラニンを生産することができた。

以上の成果を論文上で発表した (Appl Microbiol Biotechnol 87:159-165, 2008.)。

(b)-6. キシリトール生産細胞の創製

キシリトールは、カロリーフリーな甘味料としての用途のほか、近年では、米国エネルギー省が選抜したバイオマスから製造の可能性がある有用物質トップ 12 に含まれるなど、各種化学製品の基幹物質として期待されている。現在キシリトールは、白樺などより単離したキシロースを水素化還元することで製造されている。この工程は非常に効率がよく、収率は約 99%である。しかし、該製造方法では、高度に精製されたキシロースを必要とし、製造コスト上昇の一因となっている。一方、微生物を用いたキシリトール製造法では、キシロースの精製が必要ないという利点を有するが、低生産性が工業化におけるハードルとなっている。微生物を利用した生産では、*Candida tropicalis* による研究が多い。*C. tropicalis* を使用した場合、キシリトール収率は、70-85 mol% xylitol / xylose、生産性は、cell recycle 法を用いた場合 12 g/L/h と報告されている。組換え微生物を使用した研究は、1991 年に Hallborn らにより報告された *Saccharomyces cerevisiae* を宿主とした研究を契機に、多くの研究が報告されている。組換え微生物を用いた場合、収率は理論収率

に近い値が報告されているが、生産性は2.5 g/L/h程度と低い。こうした背景から我々は、増殖非依存型バイオプロセスにおける高生産性キシリトール生産細胞の創製研究を行った。

コリネ型細菌に複数の微生物由来の xylose reductase (XR) 遺伝子を導入し、この中からコリネ型細菌に最も適した酵素遺伝子を選抜した。その結果、*Candida tenuis* 由来の XR 遺伝子が、最も高い活性を示した。該遺伝子を導入したコリネ型細菌株 (CtXR1) を用い、グルコースおよびキシロースを基質としたキシリトール生成を検討した。その結果、12 時間の反応により、3.5 g/L のキシリトールを生成した。

遺伝子組換えコリネ型細菌のキシリトール生産性の向上を目的に、①原料キシロースの取り込み強化、②細胞内酸化還元バランスの調整について検討した。①について、我々がこれまでに単離した新規アラビノーストランスポーター(AraE)は、アラビノースのみならず、キシロースの取り込み活性も示すことを明らかにしており、該アラビノーストランスポーター遺伝子を導入した組換え株を構築し、キシリトール生産性へ与える影響を検討した。②について、増殖非依存型バイオプロセスにおける主要な糖代謝物である乳酸生成の抑制、および NADH に対する反応性を高めた XR の利用を検討した。AraE 導入株(CtXR2)では、キシロース消費速度が顕著に上昇し、キシリトール最大生成速度が親株(CtXR1)と比較して、13 倍に向上した。次に CtXR2 の乳酸生成を抑制するために、*ldhA* 遺伝子を破壊し(CtXR3)、該菌株に NADH 高親和性 XR 変異体(K274R)を導入することで CtXR4 株を構築した。該菌株は、12 時間の反応により、26.5g/L のキシリトールを生成した。

キシリトールは、細菌の生育を阻害することが知られており、コリネ型細菌(R 株)においても、200 mM のキシリトールを含む最少培地では、生育速度が約 20%阻害された。キシリトールによる増殖阻害では、キシリトールリン酸の関与が知られており、該物質の生成には、大腸菌においてキシロキナーゼの関与が示されている。また、コリネ型細菌(R 株)においては、キシリトールの取り込みに PTS の関与が示されており、キシリトールの取り込みにともない、キシリトールリン酸の生成が推測される。これらの知見に基づき、CtXR4 のキシロキナーゼ遺伝子(*xyIB*)およびキシリトールの取り込みに関与する PTS fructose enzyme II (*ptsF*)遺伝子を破壊した CtXR7 株を構築した。該菌株は、CtXR4 株よりキシリトール最大生成速度が 1.6 倍向上した。そこで、該菌株を用いた高濃度キシリトール生成を検討した結果、最大生産性は目標とする STY 10 g/L/h を上回り、21 時間の反応により 166 g/L のキシリトールを生成することができた。この生産性は組換え微生物によるキシリトール生成において、最大の生産性であった。

以上の成果を論文として発表した (Appl Microbiol Biotechnol 86: 1057-1066. 2010.)。

(b)-7. バリン生産細胞の創製

アミノ酸は、生物の成長に必要なタンパク質の原料であり、必須の栄養素である。アミノ酸の用途として、従来は栄養食品や医薬品など人に対するものが多かったが、近年は家畜用の飼料としての用途も増加傾向にある。今後人口の増加による世界のアミノ酸市場の拡大が予想され、アミノ酸製造法のコストダウンが求められている。

需要拡大が特に期待されているアミノ酸の一つとしてバリンが挙げられる。バリンはロイシン・イソロイシンと共に分岐鎖アミノ酸に分類され、高等動物には合成できない必須アミノ酸とされている。分岐鎖アミノ酸は蛋白質合成の素材として生体に不可欠であると共に、エネルギー源あるいは生体成分の前駆体として重要である。また、バリンには成長を促す働きがある他、血中の窒素の濃度調整機能を有し、輸液、サプリメントの原料として用いられている。現在、バリンは発酵法で生産されていることから、菌株の改良は重要な研究課題であり、高効率な製造法の確立によって安価で安定したバリン供給を行うことが期待される。

我々は増殖非依存型バイオプロセスによる基幹物質の生産を目的とした研究を進めており、本研究では当該プロセスにおけるアミノ酸群の生産の一環として、コリネ型細菌の代謝改変・有用遺伝子の付与によりバリン生産細胞の創製を行った。これまでに開発した要素技術を基盤として、改良を重ね、競合代謝経路遺伝子の破壊、バリン合成経路遺伝子の発現最適化、フィードバック阻害の解除、アミノ基供与の効率化、細胞内酸化還元バランスの調整、解糖系強化等を行い、目標生産性を達成した。

(c) 糖からの各基幹物質の製造プロセスの確立

糖からの各基幹物質製造プロセスの開発では、主にコリネ型細菌を用いた増殖非依存型バイオプロセスに細胞を効率的に供給する、菌体触媒調製法の検討、および増殖非依存型バイオプロセスによって生産される基幹物質の回収精製法の検討を行った。

(3) トータルシステムの開発

バイオマスの有効利用のためには、通常、微生物が利用しやすいグルコースだけでなく、バイオマス由来の様々な C6 糖と C5 糖の混合糖を効率的に利用する必要がある。また、糖化過程で生じるフェノール類、フラン類、酸による発酵過程の阻害が大きな技術障壁となっている。本プロジェクトでは、これらバイオマス原料に由来する固有の研究開発課題に取り組んだ。

(a) 発酵阻害物質の耐性評価

酵素糖化を前提としたソフトバイオマスからの糖類生成では、高温・高圧による前処理が必要となるが、本処理過程では、バイオマスが過分解されアルデヒド類、フェノール類、および有機酸類などが副生成する。これらの糖類とともに発生する副生成物は、微生物に対し強力な増殖阻害作用を示す“発酵阻害物質”として、特に現在、セルロース系バイオマスからのエタノールの生産実用化における一つの障壁となっている。本プロジェクトにおける、ソフトバイオマスからの各種基幹物質生産の際にも同様に、発酵阻害物質によって、生産が阻害されることが考えられることから、増殖非依存型バイオプロセスに及ぼす該物質の影響について評価を行った。

供試菌株には、本プロジェクトを通じて利用しているコリネ型細菌のエタノール生産株をモデル株として用いた。該株を好気培養(触媒調製)し、得られた菌体を増殖非依存型バイオプロセスに供した。阻害の程度は、好気培養時は該株の増殖、増殖非依存型バイオプロセス時は物質の生

産速度にて評価した。

好気培養時には、furfural、5-hydroxymethylfurfural、4-hydroxybenzaldehyde、vanillin および syringaldehyde による増殖の阻害が認められた。一方で、増殖非依存型バイオプロセス時には、それぞれの物質に対して高い耐性を示し、同濃度の発酵阻害物質存在下において、エタノール生産微生物である酵母や大腸菌と比較して、コリネ型細菌を用いた増殖非依存型バイオプロセスは、高い耐性を有していることが認められた。増殖非依存型バイオプロセスが、ソフトバイオマス利用において、極めて実用的かつ新規性のある特性を有していることが示された。

以上の成果を論文として発表した (Appl Environ Microbiol 73:2349-2353, 2007.)。

(b) ソフトバイオマス由来混合糖同時利用技術の開発

現在、エタノールをはじめとするバイオ燃料やバイオケミカルの原料は、コーンやサトウキビなどのデンプン系バイオマスが主に用いられているが、食料との競合や原料価格の高騰などの問題から不可食性資源の有効利用技術の開発が望まれている。特に、コーンストーバーや稲わら、バガスなどの農産廃棄物やスイッチグラスなどのエネルギー作物などのリグノセルロース系バイオマスが注目されている。ここにその一例として、コーンストーバーの組成を示した。セルロースに由来する glucose の他にもヘミセルロースに由来する xylose、galactose、mannose、arabinose など複数の糖類で構成される。C5 糖である xylose と arabinose は合計すると全体の 24% を占め、glucose について存在量が多いことから、リグノセルロース系バイオマスの有効利用を図る上で、生物的方法による効率的な xylose と arabinose 利用技術の開発が望まれている。また、リグノセルロース系バイオマスの利用技術においては、まずこれらの原料を C6 糖、C5 糖等単糖類への糖化分解が必要であるが、プロセス設計上、有機化合物産生培地にはこれら単糖類が共存することになる。しかしながら、バイオ燃料生産微生物として工業的に利用されている *Zymomonas* や *Saccharomyces* は、本来 C5 糖を利用できない。また、それらの株に C5 糖利用能を付与しても、glucose 存在下では glucose 抑制により、同時利用が出来なくなり、効率的な工業化利用技術確立の妨げとなっている。そのため、幅広い糖利用能を有する微生物の開発がリグノセルロース系バイオマスの工業的利用に向けた鍵となる。

そこで、本研究開発では物質生産に有用なコリネ型細菌の糖利用能拡大と、これを用いた増殖非依存型バイオプロセスによる C5 糖を含む混合糖の同時利用を検討した。

i) コリネ型細菌への xylose 利用能の付与

xylose 資化微生物では、2つの酵素 xylose isomerase (*xyIA* 遺伝子によりコード) と xylulokinase (*xyIB* 遺伝子) による 2段階の反応を経て、xylose をペントースリン酸経路の中間代謝物である D-xylulose-5-phosphate へと変換する。コリネ型細菌 (R株) のゲノム情報の解析により、現在データベースに登録されている他のコリネ型細菌と同様に、*xyIA* を持たないことを確認した。一方、R株のゲノム中には *xyIB* と高い相同性を示す ORF をひとつ確認した。これらの解析を基に、基礎的知見の多い大腸菌から *xyLAB* 両遺伝子をクローニングし、R株に導入して xylose 利用能を付与し

た組換え株を作製した。作製した組換え体は xylose を単一炭素源として増殖することを確認した。次に、glucose と xylose 混合糖液の利用を好気増殖と還元条件下(増殖非依存型バイオプロセス)でそれぞれ評価した。その結果、好気増殖では xylose の消費は glucose 消費期間中抑制されており、グルコース抑制がみられたが、非増殖条件では、このグルコース抑制は緩和され、glucose と xylose の同時消費による乳酸、コハク酸の生成が確認された。

以上の成果を論文として発表した (Appl Environ Microbiol 72:3418-328. 2006.)。

ii) コリネ型細菌への arabinose 利用能の付与

リグノセルロース系バイオマス由来糖類の利用が可能な組換えコリネ型細菌の構築の一環として、arabinose 利用能付与を検討した。微生物における arabinose の代謝経路は、大腸菌や枯草菌で研究が進んでおり、arabinose は細胞内に取り込まれた後 L-arabinose isomerase (*araA* 遺伝子によりコード)によって、L-ribulose へ変換され、続いて L-ribulokinase (*araB* 遺伝子)によって L-ribulose-5-phosphate に、最後に L-ribulose-5 phosphate 4-epimerase (*araD* 遺伝子)によって、ペントースリン酸経路の中間代謝物である D-xylulose-5-phosphate に変換された後代謝されるが、既にゲノムが解読されているコリネ型細菌 (*C. glutamicum*, *C. efficiens*, *C. jeikeium*, *C. diphtheriae*)のいずれも、上記の3つの遺伝子を有していない。そこで、大腸菌の arabinose 代謝に関与する3つの遺伝子 *araA*, *araB*, *araD* により形成される *araBAD* オペロンをクローニングし、コリネ型細菌 (R 株)における発現系を構築した。作製した組換え株は arabinose を単一炭素源とする増殖が可能であることを確認した。組換え株を用いてリグノセルロース系バイオマスの組成に近似した glucose と arabinose を 5:1 の割合で含む混合糖を反応基質として、増殖非依存型バイオプロセスによる有機酸生成を評価した。その結果、arabinose は glucose の消費過程より消費され、arabinose は glucose 枯渇後も一定の速度で消費されて有機酸に変換されており、この組換えコリネ型細菌が arabinose を有機酸生成の基質として利用できること、また増殖非依存型バイオプロセスでは glucose と arabinose の同時利用が可能になることを明らかにした。

以上の成果を論文として発表した (Appl Microbiol Biotechnol 77:1053-1062. 2008.)。

iii) コリネ型細菌の arabinose 代謝遺伝子の取得と機能解析

コリネ型細菌による arabinose 資化能についてはこれまで報告がなかった。我々は、*C. glutamicum* ATCC31831 株が arabinose 資化性を示すことを確認し、同株の arabinose 利用に関連した遺伝子の特定および、その機能解析を行なった。31831 株は arabinose を単一基質とした場合に、他の炭素源の場合と比較して効率的に増殖することを確認した。31831 株の染色体上の arabinose 代謝遺伝子群 *araBDA* を含む遺伝子クラスターの配列を決定した。

この *araBDA* 遺伝子の導入により、*C. glutamicum* R 株が arabinose 資化能を獲得することを確認した。さらに、arabinose transporter をコードすると予想された遺伝子 (*araE*) を染色体に導入することで、arabinose の利用能が向上することを明らかにした。

以上の成果を論文として発表した (Appl Environ Microbiol 75: 3419-3429. 2009.)。

iv) glucose、xylose、arabinose の 3 糖混合糖の同時利用

大腸菌由来の xylose 代謝酵素をコードする 2 つの遺伝子 *xyIA*、*xyIB*、arabinose 代謝酵素をコードする 3 つの遺伝子 *araA*、*araB*、*araD*、arabinose transporter 遺伝子 (*araE*) をコリネ型細菌 (R 株) の染色体に導入した株を作製した。構築した組換え株を用いてリグノセルロース系バイオマスの組成に近似した glucose、xylose、arabinose を 5:2.5:1 の割合で含む混合糖を反応基質として、増殖非依存型バイオプロセスによる有機酸生成を評価した。その結果、arabinose と xylose は glucose の消費過程より消費され、乳酸、コハク酸等が生成した。以上の結果から、この組換えコリネ型細菌を用いた増殖非依存型バイオプロセスにより arabinose と xylose を有機酸生成の基質として効率的に利用し、また、glucose、xylose、arabinose の 3 糖の完全同時利用が可能であることが示された。

以上の成果を論文として発表した (Appl Microbiol Biotechnol 85: 105-115. 2009.)。

v) mannose 利用能の向上と glucose との同時利用

マンノースはバイオマス構成糖の一つであり、特に、ハードバイオマスでは 20~30%含有することが報告されている。そこで、コリネ型細菌によるマンノース利用について検討した。

細菌におけるマンノースの取り込み系については、PTS による取り込みと非 PTS による取り込みが知られており、PTS の中でも、マンノース取り込み系として同定されたものだけでなく、グルコースやフルクトース PTS がマンノース取り込み能を持つ例が報告されている。PTS による取り込みではリン酸化との共役により mannose-6-phosphate として取り込まれ、mannose-6-phosphate isomerase により fructose-6-phosphate に変換されて解糖系に入る。一方、様々なタイプの非 PTS トランスポーターでの取り込みも知られるが、この場合は、hexokinase によりリン酸化されて mannose-6-phosphate が生成し、その後、解糖系へ入ると考えられている。mannose-6-phosphate isomerase をコードする遺伝子は大腸菌で同定され、その破壊により、マンノース利用能が消失することが報告されている。この遺伝子は広くバクテリアで保存されているため、マンノース代謝に共通の役割を持つと考えられている。コリネ型細菌のゲノム上でこの遺伝子のホモログが一つ存在していたため、まず、この遺伝子のマンノース利用への関与について検討した。

コリネ型細菌野生株によるマンノース利用能は著しく低い、マンノース代謝遺伝子ホモログ *manA* の破壊により、マンノースを単一炭素源として生育できなくなった。一方、*manA* の発現を強化した株ではマンノース利用能が著しく向上した。増殖非依存型バイオプロセス条件でマンノースの消費を調べた結果、野生株でマンノースの消費が確認されたが、*manA* 破壊株では、ほとんど消費されず、*manA* 強化株では、消費速度が向上した。これらの結果から、*manA* がコリネ型細菌のマンノース利用に関与することが示され、また、この強化がコリネ型細菌によるマンノース利用能の向上に非常に有効であることが示された。

次に、マンノースとグルコースの混合糖の利用について検討した。好気増殖における混合糖の

利用では、野生株でも、*manA* 強化株でも、グルコースが優先的に消費された後、マンノースが消費された。増殖非依存型バイオプロセスにおけるグルコースとマンノース混合糖の利用について調べた結果、好気増殖の場合と同様に、グルコースの優先的消費が観察された。そこで、グルコースとマンノースの同時利用を検討するため、まず、マンノース取り込みに関わる遺伝子の特定を試みた。

各種遺伝子破壊株のマンノースによる生育と増殖非依存型バイオプロセスにおけるマンノース消費速度を調べたところ、general PTSをコードする *ptsH* の破壊株ではマンノース消費がみられないことから、マンノースは PTS により取り込まれることが示唆された。*ptsG* の破壊ではマンノース消費速度は半分程度に低下し、これに *ptsF* の破壊を重ねた二重破壊株ではマンノース消費がみられなくなったことから、グルコース PTS である PtsG とフルクトース PTS である PtsF がマンノースの取り込みにも関与することが示唆された。*ptsF* 単独破壊株では、マンノース消費に影響はみられなかったことから、野生株では PtsG が主にマンノースの取り込み系として働き、PtsF は PtsG が働かない場合に機能すると考えられた。このことから、グルコースとマンノースの混合糖でグルコースが優先的に消費されるのは、両者の取り込み系として働く PtsG の性質に依存すると考えられた。そこで、マンノース取り込み能を持つことが示唆され、なおかつ、グルコースの取り込みには関与しないことがわかっている PtsF を強化することによって、グルコースとマンノースの同時利用が可能となるのではないかと考えた。実際、*ptsF* 高発現株では、好気増殖条件においても、増殖非依存型バイオプロセス条件においても、グルコースとマンノースが同時に消費されることが示された。

以上の成果を論文として発表した (Appl Microbiol Biotechnol 89: 1905-1916. 2011.)。

これまでの研究開発におけるコリネ型細菌の糖利用能の拡大により、バイオマス由来糖類のキシロース、アラビノース、セロビオース、マンノースの利用が可能となっている。本研究開発により、幅広いバイオマス原料からの各種有用化合物生産の実用化の鍵となる混合糖の完全同時利用技術が確立されたと考えられる。

(c) ソフトバイオマス由来混合糖からの物質生成

糖化工程での混合糖液による基幹物質生産への影響を把握するため、モデル糖液のグルコースとキシリトール混合糖からのキシリトール生産に対する基質の量比の影響を明らかにした。上記混合糖の同時利用技術により、キシリトールの生産性が著しく向上することを確認した。

また、モデル混合糖液からのバリン生産を行い、グルコース・キシロース・アラビノースを同時に消費してバリンを高い速度・収率で生産可能であることを確認した。この結果は、ソフトバイオマスを原料としたバリン生産プロセスの高い実現可能性を示すものといえる。

(d) 実糖化液からの D-乳酸の生成

トータルシステムの開発では、プラスコスケールレベル (基本的な反応条件の制御可能な機能

とする)にて、ソフトバイオマスを出発原料とした基幹物質生産までの一連実験がテーマとなっている。そこで、ソフトバイオマスの一つである古紙(脱墨パルプ)を糖化し、得られた糖化液から、基幹物質の一つであるD-乳酸の生産を行い、一連の評価を行った。その結果、増殖非依存型バイオプロセスにより実糖化液中のグルコースとキシロース等を含む混合糖が同時利用され、高効率でD-乳酸が生成することを確認した。

(4) ベンチプラントによる実証試験

本研究項目では、増殖非依存型バイオプロセスのスケールアップの検討を実施した。バイオプロセスの実用化では、実験室レベルの成果を工業的規模の大規模発酵槽で安定的に再現するスケールアップ研究が、生産菌の育種と同様に重要である。コリネ型細菌によるアミノ酸発酵では、スケールアップにおいて、種々のパラメーター、例えば通気速度、攪拌速度、タンク内の圧力、原料糖の添加速度、pH、温度等が検討課題として挙げられるが、中でも通気・攪拌条件が生産性に大きな影響を与える因子と言われている。これは、酸素がコリネ型細菌の菌体増殖に不可欠な物質であることだけでなく、代謝の方向性を左右する因子となっているためである。また一般に、実験室レベルの通気条件を大型発酵槽で再現することは困難である。これは、発酵槽のサイズが大きくなればなるほど十分な攪拌が困難になり、層内が不均一な状態になるためである。従来の発酵法では、こうした複数の因子が混在する中で、最大の生産性が得られるプロセス条件を探索することになる。一方、増殖非依存型バイオプロセスでは、菌体増殖と物質生産反応が切り離されているため、スケールアップに伴う条件検討が従来の発酵法と比較して容易である。

本研究では増殖非依存型バイオプロセスのスケールアップの検討を行った。10 L 容量のジャーファーメンターを用いて反応を行ったところ、フラスコスケールレベルと同等以上の生産性が得られた。

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

区分	特許出願			論文		その他外部発表(プレス発表等)
	国内	外国	PCT*出願	査読付き	その他	
H18FY	2	0	0	15	9	90
H19FY	3	0	0	32	17	97
H20FY	1	3	1	21	10	73
H21FY	2	10	3	14	8	32
H22FY	0	0	0	25	10	22

(※ Patent Cooperation Treaty : 特許協力条約)

2. 3. 2 メンブレン利用高効率発酵システムによる有機酸製造基盤技術の開発(東レ株式会社)

2. 3. 2. 1 膜利用発酵リアクターの開発

(1) ラボ用膜利用発酵リアクター装置の設計

ラボ用膜利用発酵リアクター装置の開発に当たっては、装置組み立て、発酵試験ハンドリングを容易にするため、ラボ発酵装置(2L 容)内に、現在弊社が生物学的排水処理、河川水処理等の水処理に用いている PVDF(ポリフッ化ビニリデン)製精密ろ過(MF)平膜および中空糸膜を設置できるように膜エレメントを設計した。膜エレメントについては、次の6つの要求特性を満たすものを設計・試作した(図1、図2)。

- ①ラボ発酵装置に設置可能
- ②オートクレーブ可能(121℃、20分)
- ③MFろ過膜は機械的方法で脱着
- ④菌漏洩なし
- ⑤繰り返し利用可能
- ⑥取水に圧損のない構造



図1 平膜エレメント



図2 中空糸膜エレメント

この分離膜を用いた発酵リアクターを、膜利用発酵リアクター(MFR: Membrane-integrated Fermentation Reactor)とした。図3にラボ用膜利用発酵リアクターの概念図を示す。図中各部分は、1:発酵槽、2:分離膜エレメント、3:原料タンク、4:原料供給ポンプ、5:ろ過ポンプ、6:ろ過差圧計、および7:発酵路液タンクであり、分離膜エレメントで菌体を含む固液分離を行いながら、連続的に高効率で発酵生産可能な装置である(1)。

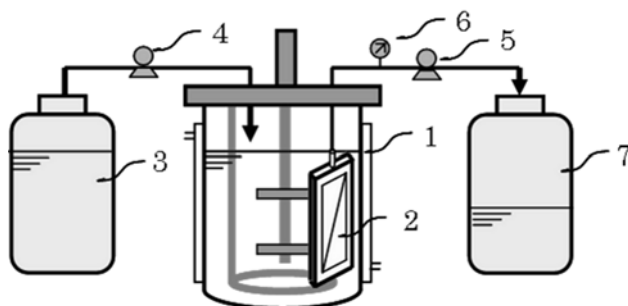


図3 膜利用発酵リアクター(ラボ用)

(2) ラボ用膜利用発酵リアクターによる有機酸連続発酵への適用

膜利用発酵リアクターによる連続発酵技術を確認するために、ピルビン酸発酵微生物 (*Torulopsis glabrata* NL2a株) を用い、連続発酵運転を行った。試作したラボ用 MFR 装置を用いて、連続発酵試験を行った。表1に平膜エレメントおよび中空糸膜エレメントを用いた連続発酵試験結果をまとめた。連続発酵により菌体濃度がバッチ発酵と比較して10倍程度に増加し、ピルビン酸生産速度がバッチ発酵の約4倍に向上することを確認した。発酵時間は500時間(約20日間)以上安定に運転可能であり、微生物の能力低下は観察されなかった。

表1 ピルビン酸発酵(バッチ発酵とMFR連続発酵の比較)

発酵形式	膜ユニット	発酵時間 (hr)	Na Pyruvate 収率 (w/w %)	STY (g/L/h)
バッチ発酵	—	66	65	1.0
連続発酵	平膜	300 以上	58	4.1
	中空糸	500 以上	52	5.1

(3) MFR のパイロット装置設計・導入

・装置構成

本装置の構成は、発酵原料を調整する原料調整槽、発酵原料を滅菌する原料滅菌槽、滅菌発酵原料を貯蔵するリザーバタンク、発酵生産を行う発酵槽、固液分離を行う分離膜モジュールで主に構成されるようデザインした(図4)。また運転は、装置ライン滅菌、原料滅菌、バッチ培養、ならびに連続培養の各工程をシーケンサーによって自動制御で行うことを前提にして、バルブ配置等を考慮に入れた設計とした。

それぞれの槽の配置に関しては、様々なデザインが可能であるが、メンテナンス時の利便を考

慮して、装置の前後からアクセスが容易なことが望ましい。検討の結果、それぞれの槽を一直線に配置したデザインとした。装置はスチール製フレーム上に固定し、用役(蒸気、圧縮空気、実験水、ドレイン)配管は、フレームの桁間を通した(図5)。

また MFR 装置の鍵となる分離膜モジュール部分については、様々な形式の分離膜モジュールを適用できるように、配管の取り回しはフレキシブルな構造とした。

・運転制御

連続発酵試験は装置の終夜運転を行うことから、自動制御による運転を行うことにした。制御法としては、シーケンサーによる自動制御法を採用した。運転制御を行うシーケンサーは、1)装置のライン、タンクの滅菌工程、2)発酵原料の滅菌、ならびに滅菌原料のリザーバタンク貯留、3)連続運転に供する微生物の前培養を行うための培地を滅菌する工程、4)発酵(バッチ、連続)の工程(発酵)、連続発酵を行うときの発酵槽～膜分離槽の培養液の循環、5)連続発酵時の発酵槽への原料の供給工程(流加)のそれぞれの工程を独立して稼働できるような設計とした。

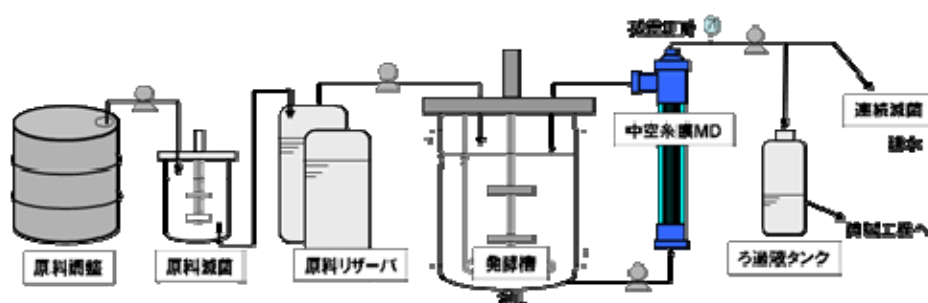


図4 MFR パイロット装置の概要



図5 MFR パイロット装置

(4) 膜利用発酵用分離膜モジュールの開発

これまで MF 膜を用いた分離膜モジュールは多種類開発されているが、発酵生産に適用できる大型モジュールが開発された例はない。MFR システムを工業的規模で実用化するためには、発酵生産用大型モジュールを開発する必要がある。そこで、分離膜モジュールの開発を進めた。モジュールは段階的にラボ用、パイロット用のスケールアップしたモジュールを設計、試作し、ラボ装置、パイロット装置に装着、D-乳酸連続発酵試験を行い、分離膜モジュールの改良を行った(図6)。これら、発酵試験で得られた知見から工業化用モジュールの基本的設計を完了し、試作を行った。分離膜モジュールの設計には、中空糸膜充填率、モジュール構造などは当社水処理の知見を応用して設計し、分離膜として、当社が開発した PVDF 耐熱性中空糸 MF 膜、筐体としてポリスルホン製を採用して、高圧蒸気滅菌可能で連続発酵に用いることができる。

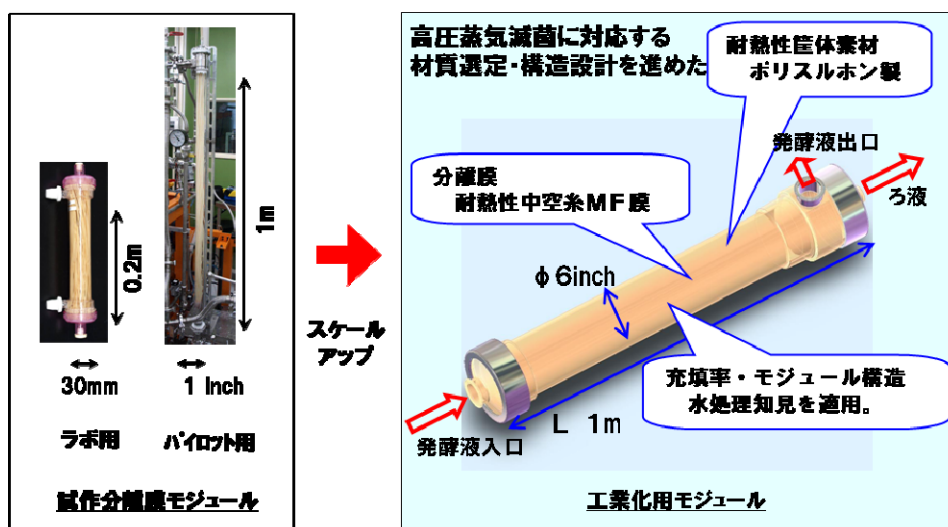


図6 MFR用分離膜モジュールの開発

2.3.2.2 D-乳酸製造用組換え酵母の創出

ポリ乳酸(PLA)はバイオプロセスで合成される代表的なバイオベースポリマーである。現在、ポリL-乳酸(PLLA)が商業化されているものの、そのポリマー融点に課題がある。ポリ乳酸の融点向上には、原料となる乳酸の光学純度を高めることが有効であるが、更にD-乳酸を原料とするポリD-乳酸(PDPLA)とPLPLAを混合してなるステレオコンプレックスPLA、ならびにそれぞれのブロック重縮合体であるステレオブロックPLAは耐熱性が著しく改善されることから(2)、市場の拡大が期待できる。また、これらステレオタイプPLAにおいても、原料となる乳酸の光学純度が融点に影響を与えることが知られている。D-乳酸は、工業的な発酵生産は実施されていないが、D-乳酸生産微生物の探索などが進められており、生産性高いD-乳酸菌としては *Lactobacillus delbrueckii* などが知られているが、これまでに報告されているD-乳酸菌による乳酸発酵は、D-乳酸の対糖収率は高いものの、光学純度において課題がある。そこで、高光学純度でD-乳酸を産生するD-乳酸菌の開発に取り組んだ。更に、生産宿主として酵母を用いることとした。酵母は、乳酸の産生能力がないものの、乳酸のラセミ化能力がなく、高光学純度のD-乳酸を生産するポテンシャルを有する。高性能なD-乳酸脱水素酵素遺伝子を広くスクリーニングし、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に、導入してD-乳酸生産酵母の造成する検討を行った。

(1) 高性能D-乳酸菌の探索

ステレオコンプレックスPLA、あるいはステレオブロックPLAを製造するためには高い光学純度のD-乳酸を必要とする。そのため、D-乳酸連続発酵で、高光学純度D-乳酸を生産するD-乳酸菌を適用することが重要である。そこで、自然界サンプルからD-乳酸菌のスクリーニングを行った。スクリーニングの結果の一例を図7に示す。縦軸には対糖収率とD-乳酸光学純度を示し、横軸には候補D-乳酸菌を示している。スクリーニングの結果、対糖収率90%以上、光学純度98%e.e.で

D-乳酸を生産するD-乳酸菌 *Sporolactobacillus laevolacticus* を獲得した。*S. laevolacticus* によるバッチ発酵を行ったところ、生産速度 0.5g/L/h、光学純度は 98%e.e.、対糖収率は 95%であった。

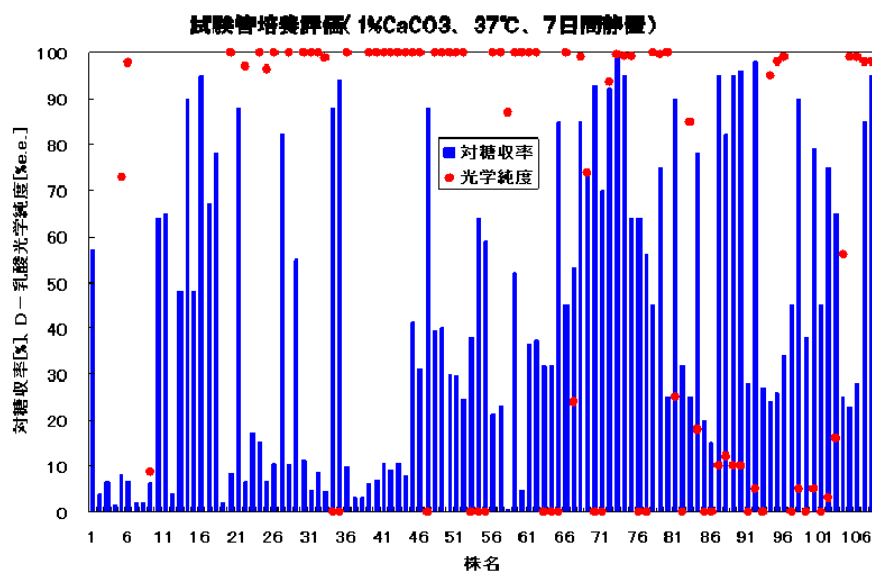


図7 高性能D-乳酸菌スクリーニング評価(評価結果の一部)

次に、獲得した *S. laevolacticus* を用いたラボ MFR 装置によるD-乳酸連続発酵を行った。バッチ発酵では生産速度が 0.5g/L/hであったのに対して、連続発酵を行うことにより生産速度を 11g/L/h まで大幅に向上した。また、光学純度は予想外にバッチ発酵では 98%e.e.であったのに対して、連続発酵を行うことにより 99.7%以上まで向上することを確認した。更なる効果として、低栄養源培地を用いても膜利用連続発酵では高生産速度及び高光学純度の D-乳酸生産が可能であった。バッチ発酵では栄養源として5g/Lの酵母エキスを加えることによって上記発酵成績を得たが、栄養源を低減させると、光学純度、生産速度、生産収率が低下した。一方、MFR による連続発酵では栄養源を実際に酵母エキスを 5g/L から 1g/L まで低減させても 11g/L・h の高い生産速度を維持でき、また 99.7%e.e.以上の高き光学純度を長時間にわたり維持可能であった(図8)。

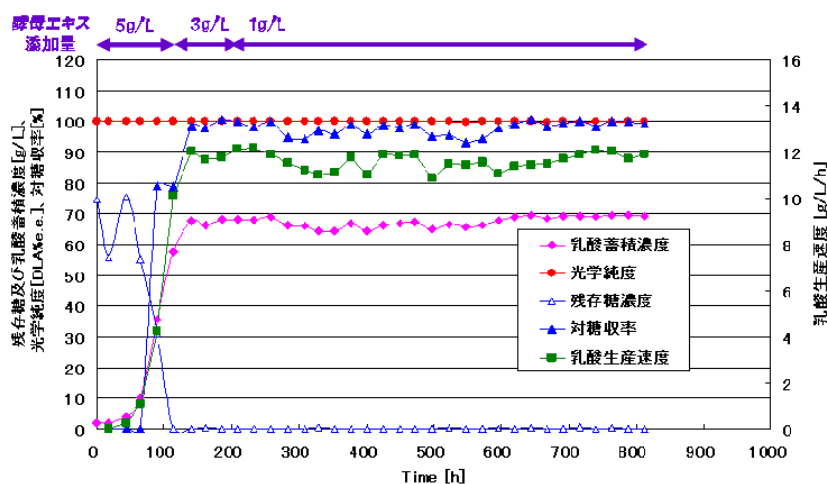


図8 *S. laevolacticus* による MFR 装置を用いた D-乳酸連続発酵

(2) D-乳酸発酵酵母育種における *D-LDH* の性能評価手法の開発

酵母を用いた D-乳酸生産を行う場合、様々な D-乳酸脱水素酵素遺伝子をクローニングして酵母に適した D-乳酸脱水素遺伝子 (*D-LDH*) をスクリーニングする必要がある。そこで、まず、適切な *D-LDH* を選択するための *D-LDH* の性能評価手法を開発した。手法開発には、これまでに報告されている L-乳酸脱水素酵素遺伝子 (*L-LDH*) として L-乳酸菌 *Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus sakei*、および *Pediococcus acidilactici* 由来の *L-LDH*、牛由来の *LDH-A*、*LDH-B* をクローニングし、これら遺伝子を用いて評価手法の有効性を検証した。*TDH3* プロモーター、ターミネーター間に MCS を挿入した発現カセット連結した *LDH* 性能評価用発現プラスミドを作製し、上記 *L-LDH* を酵母に導入し L-乳酸の対等収率を調べた。更に、それぞれの酵素の諸性質を調べ、乳酸の対等収率との関係を調べたところ、酵素のピルビン酸に対する基質親和性と L-乳酸の対等収率に相関があることが明らかになった。これらの結果より、ピルビン酸に対する基質親和性と D-乳酸の対等収率の相関を指標とした *D-LDH* の性能評価ができることを明らかにした。

(3) *S. laevolacticus* 由来 *D-LDH* の取得、評価

スクリーニングによって獲得した *S. laevolacticus* は高光学純度で D-乳酸を発酵生産できることから、*S. laevolacticus* 由来の *D-LDH* の性能が高いことが予想された。同細菌由来の新規 *D-LDH* のクローニングし、得られた *D-LDH* を開発した性能評価手法によって評価したところ、これまで知られている *Lactobacillus plantarum* ならびに *Pediococcus acidilactici* の *D-LDH* と比較して D-乳酸の対等収率が高いことが明らかになった (図9)。

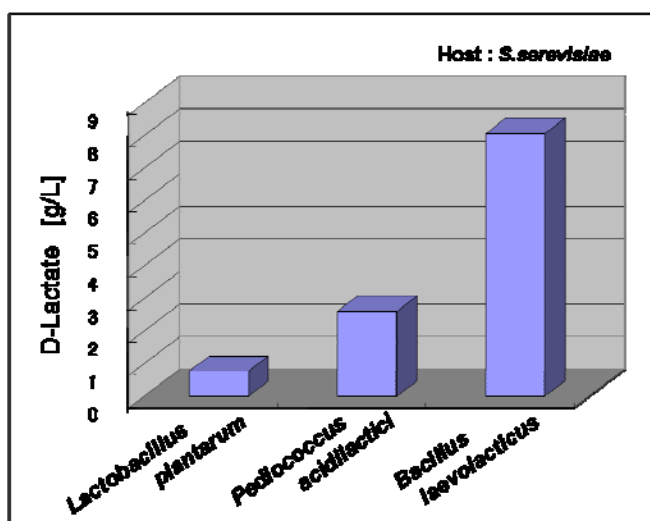


図9 *Bacillus laevolacticus* 由来 D-LDH の性能評価

(4) 酵母糖代謝経路の改変

酵母を用いたD-乳酸発酵を行う場合、副産物となるエタノール低減が課題となることから、酵母のエタノール発酵経路に関わる遺伝子の改変を行った。ターゲットとする遺伝子として、ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子群(*PDC*)を改変した。これまでの報告では、酵母は *PDC*、あるいはアルコール脱水素酵素遺伝子群(*ADH*)を破壊し酵素活性を消失させるとグルコース培地上で、その生育が著しく低下することが知られている。従って、それぞれの酵素活性が低下した改変遺伝子の取得を行った。ピルビン酸脱炭酸酵素の活性低下変異の取得には *PDC5* をランダム変異法により温度感受性変異をスクリーニングすることで酵素活性低下遺伝子を取得した(図10)。それぞれの温度感受性変異の酵素活性を比較したところ野生型に対してピルビン酸脱炭酸酵素が1/3~1/5となった変異遺伝子 *pdc5^{ts}* を取得した(図11)。

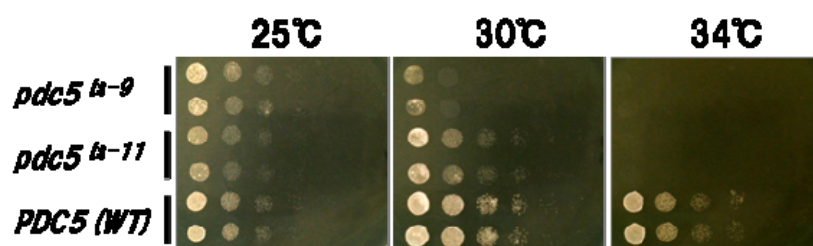


図10 *pdc5* 温度感受性変異の取得

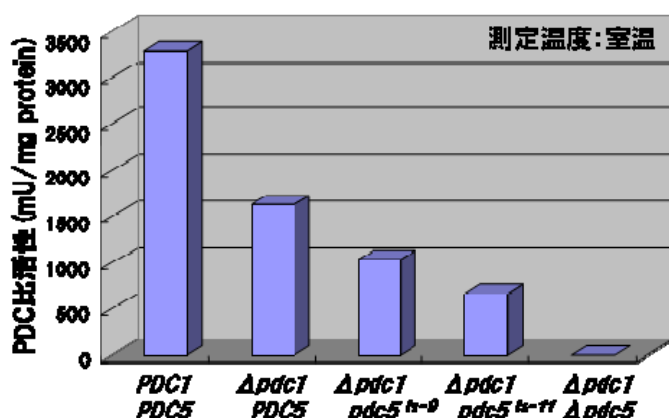


図11 酵母 *PDC5* のピルビン酸脱炭酸酵素活性比較

(5) 高性能 *D-LDH* の探索

高性能 *D-LDH* として、文献上で高いピルビン酸基質親和性を有するとされるアメリカカブトガニ由来の *D*-乳酸脱水素酵素 (表2) をコードする遺伝子クローニングを試みた。アメリカカブトガニ由来 *D-LDH* の核酸配列は知られておらず、タンパク質として単離・精製され、その存在が確認されているだけである。そこで、他生物由来の *D-LDH* において保存されている領域を参考にしたプライマーを用いて、cDNA ライブラリーからPCR法により *D-LDH* のクローニングを行った。その結果、二種類の遺伝子 (*D-LDH-1*, *D-LDH-2*) の取得に成功し、それぞれベクターに搭載した後、酵母に導入した。導入した遺伝子が高活性 *D*-乳酸脱水素酵素をコードしていることを、先に決定した性能評価手法によって評価を行った。その結果、*D-LDH-1*, *D-LDH-2* は、既にクローニングを行った *Sporolactobacillus laevolacticus* 由来 *D-LDH* 導入酵母よりも高い *D*-乳酸対糖収率を示すことがわかった (図12)。次に、得られたアメリカカブトガニ由来の二種類の *D*-乳酸脱水素酵素活性を測定した。活性は *D-LDH* を導入した酵母細胞の破碎液を用いることで行い、ピルビン酸および NADH に対する K_m 値を求めた。その結果、アメリカカブトガニ由来 *D-LDH-1* は既知の *D-LDH* よりも低い K_m 値を有していることがわかり、高活性を有する *D-LDH* であることを確認した。

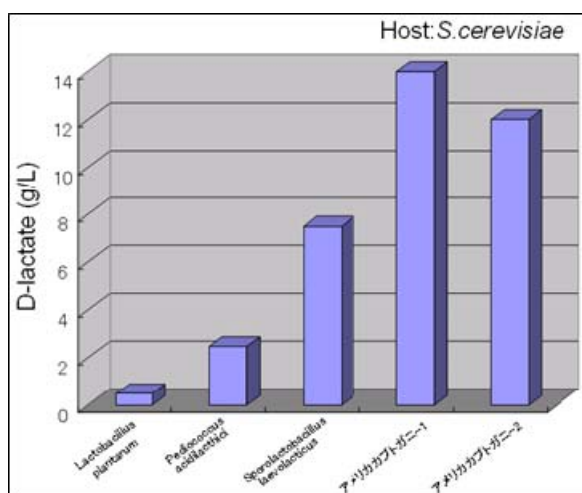


図12 アメリカカブトガニ由来 D-LDH の性能評価

次にエタノール発酵経路を抑制するためにピルビン酸脱炭酸酵素活性を低下させた変異 *pdc5^s* を導入し、D-乳酸生産性をさらに高めることに成功した。得られた酵母を用いてラボスケールにて膜利用連続培養を行ったところ、D-乳酸生産速度の大幅な向上を達成するとともに、D-乳酸収率が70%近くまで向上することがわかった。一方、連続培養途中でD-乳酸生産速度の低下が起きたことから、培養中のD-乳酸脱水素酵素活性を測定したところ、D-乳酸脱水素酵素活性の低下とD-乳酸生産速度の低下には相関があることが明らかとなった。

そこで、D-乳酸脱水素酵素活性を長期間維持可能な酵母へと改良を行った。D-乳酸生産速度の低下後のDNAチップ「3D-Gene Yeast Oligo chip 6k (出芽)」(http://www.3d-gene.com/products/pro_006.html)を用いて網羅的発現解析を行ったところ、複数の遺伝子が高発現していることが観察された。これら遺伝子のプロモーターを利用して *D-LDH-1* を発現させれば、長期間 D-乳酸発酵能力を維持可能な酵母を創出できるはずである。そこで、それらプロモーターのうち *SEDI* 遺伝子座に導入した酵母において連続培養中もD-乳酸脱水素酵素活性の低下しない酵母へと改良することに成功し、その結果、D-乳酸生産速度も高期間維持可能となった。また、*TDH3* 遺伝子座にも *D-LDH-1* を導入することで更なるD-乳酸脱水素酵素活性が増強でき、D-乳酸収率を90%まで向上した高性能D-乳酸発酵酵母を造成した。

(6) 膜利用発酵リアクターによる連続 D-乳酸発酵

育種したD-乳酸発酵酵母を用いてラボ MFR 装置によるD-乳酸連続発酵試験を行ったところ、STY10g/L/h、光学純度 99.9%e.e.以上、対糖収率90%で、700時間の連続発酵が可能であることを確認した。

次に、パイロット MFR 装置を用いてスケールアップ実証を行ったところ、*Bacillus Laevolacticus* では、STY11.2g/L/h、光学純度 99.7%e.e.以上、対糖収率95%で、800時間の、また、D-乳酸発酵酵母においては、STY10g/L/h、光学純度 99.9%e.e.以上、対糖収率90%で、700時間のそ

それぞれ連続発酵を可能であることを確認した。表5に、MFRによる上記パイロットMFR装置におけるD-乳酸連続発酵結果をまとめた。連続発酵の技術比較としては、工業化が可能であるかという比較が最も重要である。なぜなら、使用する膜面積を増やせば、生産速度は簡単に向上し、低速ろ過を行えば長期間の連続発酵も容易に実現するからである。そこで、新たに膜当たりの生産性という指標により技術の比較をおこなったところ、MFR技術は膜当たりの生産性が、従来技術(4, 5, 6, 7, 8)の10倍程度に達した。すなわち、MFRは従来の技術と比較して1/10の分離膜で高い生産性が得られることを意味していることから、コンパクトな連続発酵設備が実現し、工業化プロセス構築可能性が高いことを示している。

表2 D-乳酸連続発酵結果

微生物種	発酵方式	光学純度 (%e.e.)	収率 (%)	生産速度 (g/L·h)	膜当たり生産性 (g/cm ²)	連続発酵時間 (h)
乳酸菌	バッチ	99.0	95	0.5	—	—
	MFR	99.8	95	11.2	112	800
組換え酵母	バッチ	99.9<	75	1.0	—	—
	MFR	99.9<	90	10.0	87.5	1000

2.3.2.3 高選択性分離膜を組み込んだダウンストリーム開発

上述したように、PLA樹脂の高機能化(高耐熱性)には、PLLAならびにPDLAから構成される、ステレオコンプレックスPLA、およびステレオブロックPLAの実用化が望まれている。これら高機能化PLAを得るには原料となる乳酸の高い光学純度はもちろん、高いケミカル純度が重要であるが、乳酸発酵液には、発酵菌由来の多種多様な不純物が含まれており、これら不純物を効率的に分離精製可能な技術が望まれている。更に、D-乳酸発酵液に含まれるD-乳酸は高々10(w/w)%程度であり、その濃縮、すなわち水分除去には多大なエネルギーを投入しており、乳酸製造コスト増の大きな要因になっている上、プロセスから排出されるGHGも大きく環境負荷の大きい工程であった。そこで、乳酸の精製・濃縮に分離膜を用いることによる、精製・濃縮の効率化技術の開発に取り組んだ。

(1) 高選択性分離膜を用いた不純物および乳酸透過性の評価

発酵液からのD-乳酸の選択的な精製においてNF膜を適用した検討を行った。D-乳酸発酵液を想定したモデル水溶液を用いて、糖、タンパク質、カルシウムイオン、硫酸イオンと生産物であるD-乳酸の透過性試験を行ったところ、不純物である糖の除去率は95%であり、タンパク質、カルシウムイオン、および硫酸イオンの除去率は99%以上であった。一方、生産物であるD-乳酸は除去率が35%であったことから、NF膜を用いることで、効率的にD-乳酸を分離精製できることを確かめた(表6)。

表3 乳酸、および代表的な不純物のNF膜除去特性

	NF膜透過前 (ppm)	NF膜透過後 (ppm)	除去率 (%)
残糖	1000	50	95
タンパク質	10	検出限界以下	>99
カルシウムイオン	600	4	>99
硫酸イオン	1400	7	>99
乳酸	50 (g/L)	33 (g/L)	35

(2) ベンチスケールテストによる膜利用精製プロセス基本技術確立

NF膜によるろ過操作によって、D-乳酸の選択的分離が可能であったことから、NF膜ろ過工程を含む D-乳酸精製基本フロー構築に向けた検討を行った。微生物による D-乳酸製造は、産生される D-乳酸の全てあるいは一部をカルシウムイオンで中和しながら、発酵生産する。ポリ乳酸原料としての D-乳酸としては、高純度の 90(w/w)%を得る必要があることから、分離膜を用いることによって、①微生物由来の不純物を含む発酵液からの D-乳酸の選択的な分離、②発酵液の水分の効率的な除去のそれぞれが可能なプロセスフローを検討した。

フリーD-乳酸を得るためには、乳酸塩(乖離乳酸)をフリー乳酸(非乖離乳酸)に変換する必要があることから、MFR 連続発酵で得られた発酵ろ液を濃硫酸によって解塩する工程を設定した。得られたフリー乳酸は、次工程でNF膜ろ過を行うことで、微生物由来の副生物、および解塩工程で生成されるカルシウムイオン、硫酸イオンを選択的に分離することが出来た。水分の除去、すなわちフリーD-乳酸の濃縮にはRO膜による水除去を考案した。RO膜はフリー乳酸を阻止することから効率的に水分の除去が可能である。但し、逆浸透による水除去では、フリー乳酸濃度上昇に合わせてろ過圧をあげる必要があることから、フリーD-乳酸が濃度領域での水除去にRO膜処理を行い、高濃度領域では従来の熱濃縮を併用する濃縮工程とした。熱濃縮後、蒸留を行うことで90(w/w)%の高純度D-乳酸を得る膜利用精製プロセス基本フローを構築した(図13)。

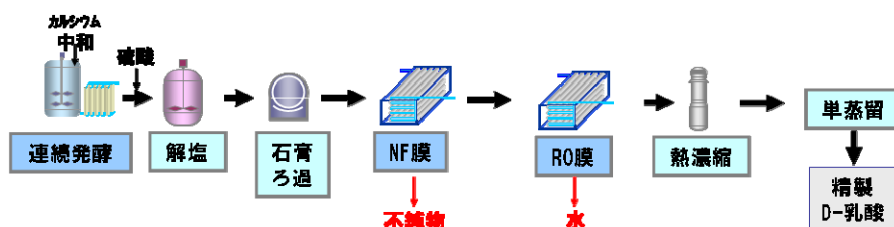


図13 D-乳酸膜利用精製プロセスフロー

次に本プロセスの実用性を評価するために、ベンチスケールでの精製実証を行った。ベンチスケール(図14)での精製検討には、D-乳酸発酵酵母、およびD-乳酸菌のパイロットMFR装置によるD-乳酸発酵液を用いて行った。D-乳酸発酵酵母、およびD-乳酸菌の発酵液からのD-乳酸

精製結果を表4に示す。A 社品、B 社品は現状、入手可能なフリーD-乳酸製品として、最も高純度であるとされるが、膜利用精製プロセスによって得られた精製 D-乳酸は、それら高純度製品と同等以上の純度が得られた。更に、精製 D-乳酸を原料とした直接重合法による PDLA 重合評価を行った。PLA 重合法のうち、直接重合法は原料乳酸の純度によって重合される PLA の品位に大きく影響受けることから、精製法としての性能評価として適する。直接重合の結果、膜利用精製品からの PDLA は、高純度製品からの PDLA よりも、融点、分子量、および色調ともに高い品位の PDLA が得られることを確認し、膜利用精製プロセスを用いることにより極めて高い純度の D-乳酸が得られることを確認した(表4)。



図14 膜利用精製プロセス ベンチスケール試験装置

a. 膜利用精製試験装置(NF/RO 膜)、b.大型遠心ろ過装置(石膏ろ過)

表4 D-乳酸膜利用精製:精製 D-乳酸と精製 D-乳酸原料 PLA の品質

D-乳酸由来		膜利用精製		A社品	B社品
発酵微生物		酵母	乳酸菌	乳酸菌	乳酸菌
精製乳酸	光学純度(%e.e.)	99.9	99.5	98.6	98.3
	着色度(APHA)	2	5	5	7
直接重合 PLA	融点(℃)	168.0 (○)	167.9 (○)	165.1 (△)	163.4 (×)
	分子量(万)	19.5 (○)	18.0 (○)	12.9 (△)	12.0 (△)
	ポリマー色相(目視)				

(3) 逆浸透膜を用いた D-乳酸の濃縮効果

膜利用精製プロセスによる D-乳酸精製ベンチスケール検討を行い、精製プロセス各工程での投入エネルギーから、排出される二酸化炭素量を試算した。発電効率、冷却効率、エネルギー CO2 排出係数に関して、それぞれ前提をおいて算出した。濃縮工程に熱濃縮のみ、および RO

膜による濃縮併用(D-乳酸膜利用精製プロセスフロー参照)のそれぞれのケースに関する PDLA 1kg生産あたりの二酸化炭素排出量を比較した結果、熱濃縮のみの場合より、RO 膜による濃縮を併用することで、精製プロセスからの二酸化炭素排出量が半減することが明らかになった。

(参考文献)

- 1) Sawai H, Mimitsuka T, Minegishi SI, Henmi M, Yamada K, Shimizu S, Yonehara T. 2011. A novel membrane-integrated fermentation reactor system: application to pyruvic acid production in continuous culture by *Torulopsis glabrata*. Bioprocess Biosyst Eng. 2011 Feb 12. [Epub ahead of print] DOI: 10.1007/s00449-011-0521-3.
- 2) Tsuji H. 2005. Poly (lactide) stereocomplexes: formation, structure, properties, degradation and applications. Macromol Biosci. 5:569-597.
- 3) Levente L.D., and T. Pllzanov. 2005 Membrane Fermentation of Lactic Acid. Inter. J. Appl. Sci. Eng. 3:19-
- 4) Hurok O., Young-Jung W., Jong-Sun Y., and Hwa-Won R., 2003 Lactic Acid Production Thorough Cell-Recycle Repeated-Batch Bioreactor. Appl. Biochem. Biotech. 105-108:603-613.
- 5) Sunhoon K., Lk-Keun Y., Woo G. L., and Yong K. C. 2001/ High-Rate Continuous Production of Lactic Acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a Two-Stage Membrane Cell-Recycle Bioreactor. Biotech. Bioeng. 73: 25-34.
- 6) Cirilo N-H, Toshiyuki M, Genta K, Kenji S, and Ayaaki I. 2002. Synchronized Fesh Cell Bioreactor System for Continuous L-(+)-Lactic Acid Production Using *Lactococcus lactis* IO-1 in Hydrolysed Sago Starch. J. Biosci. Bioeng. 93: 281-287.
- 7) Ryo O, Tomonori Y, and Takahiro S, 1999 Continuous Production of Lactic Acid from Molasses by Perfusion Culture of *Lactococcus lactis* Using a Stirred Ceramic Membrane Reactor. J. Biosci. Bioeng. 87: 647-654.
- 8) Danner H, Madzingaidzo L, Thomasser C, Neureiter M, and Braun R, 2002 Thermophilic production of lactic acid using integrated membrane bioreactor systems coupled with monopolar electrodialysis. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59: 160-169.

年度毎の特許、論文、外部発表等の件数

区分 年度	特許出願			論文		その他外部発表（プレス発表等）
	国内	外国	PCT※出願	査読付き	その他	
H18FY	12件	0件	0件	0件	0件	0件
H19FY	13件	0件	0件	0件	0件	0件
H20FY	15件	0件	3件	0件	0件	0件
H21FY	2件	0件	2件	0件	0件	4件
H22FY	0件	0件	0件	1件	0件	2件

(※ Patent Cooperation Treaty : 特許協力条約)

2.4 総合調査研究(財団法人バイオインダストリー協会)

プロジェクトの一体的かつ円滑な推進および研究成果の検討による適切な研究の方向性の調整、研究者間の情報交換・意見交換による効率的な研究の推進等を目的として、プロジェクトリーダー、サブプロジェクトリーダー、プロジェクト全参加メンバー、外部有識者による研究開発委員及び関係者を交えて、研究開発委員会(本委員会)9回、分科会15回を以下のとおり開催した。

開催日	委員会名称
平成18年6月5日(月)	第1回研究開発委員会
平成18年12月1日(金)	「高性能宿主細胞創製技術の開発」第1回分科会 「微生物反応の多様化・高機能化技術の開発」第1回分科会
平成18年12月18日(月)	「バイオリファイナリー技術の開発」第1回分科会
平成19年2月28日(水)	第2回研究開発委員会
平成19年6月29日(金)	第3回研究開発委員会
平成19年12月25日(火)	「バイオリファイナリー技術の開発」第2回分科会
平成19年12月26日(水)	「高性能宿主細胞創製技術の開発」第2回分科会 「微生物反応の多様化・高機能化技術の開発」第2回分科会
平成20年2月26日(火)	第4回研究開発委員会
平成20年7月14日(月)	第5回研究開発委員会
平成20年12月15日(月)	「高性能宿主細胞創製技術の開発」第3回分科会 「微生物反応の多様化・高機能化技術の開発」第3回分科会 「バイオリファイナリー技術の開発」第3回分科会
平成21年3月2日(月)	第6回研究開発委員会
平成21年7月31日(金)	第7回研究開発委員会
平成21年12月25日(金)	「高性能宿主細胞創製技術の開発」第4回分科会 「微生物反応の多様化・高機能化技術の開発」第4回分科会 「バイオリファイナリー技術の開発」第4回分科会
平成22年3月1日(月)	第8回研究開発委員会
平成22年7月15日(木)	「高性能宿主細胞創製技術の開発」第5回分科会 「微生物反応の多様化・高機能化技術の開発」第5回分科会 「バイオリファイナリー技術の開発」第5回分科会
平成23年1月31日(月)	第9回研究開発委員会

また、成果の実用化および具体的出口イメージを念頭に置いて、METI および NEDO プロジェクト担当者、プロジェクトリーダー、サブプロジェクトリーダー同席のもと、各研究実施者よりヒアリングを行い、次年度に向けた研究計画の確認・修正、今後の具体的実施方針策定等について議論するための検討会を4回開催した(平成19年1月31日(水)、平成20年1月21日(月)、平成

21年2月2日(月)、平成22年2月8日(月))。

さらに、外部調査機関を利用して、平成18年度は、バイオリファイナリー技術(特にバイオマスから糖への変換技術を中心)に関する欧米の技術動向調査を実施、最新情報を収集して調査報告書「微生物機能を活用した高度調和型製造基盤技術開発関連の文献調査・抄録」を作成し、関係者へ提供した。

平成19年度は、微生物反応の多様化・高機能化技術(特に有機溶媒耐性微生物の開発と利用)に関する国内外の研究動向調査を実施、2004年から2007年の4年間に公表された学術文献・学会発表・レポートなどの最新情報を収集し、有機溶媒耐性微生物の探索・分離、有機溶媒耐性微生物の有機溶媒耐性機構、有機溶媒耐性微生物を用いたバイオ変換プロセスの開発、有機溶媒耐性酵素、有機溶媒耐性微生物の宿主ベクター系の開発について整理・解析して調査報告書「有機溶媒耐性微生物の開発と利用に関する研究動向調査」を作成し、関係者へ提供した。

平成20年度は、高性能宿主細胞創製技術に関わり、「systems biology」、「synthetic biology」、「synthetic genomics」などの研究分野で微生物に関連した国内外の研究動向調査を実施、1999年から2008年の10年間に公表された学術論文・総説・レポートなどの最新情報を収集し、シンセティックバイオロジーと代謝工学・遺伝子発現・細胞間コミュニケーション、シンセティックゲノミクスと合成ゲノム構築・ゲノム移植などについて整理・解析して調査報告書「微生物機能を活用した高度調和型製造基盤技術開発関連の文献調査・解析－微生物関連の *in vivo* シンセティックバイオロジーの研究動向－」を作成し、関係者へ提供した。

平成21年度は、本プロジェクト研究技術開発に関連するホワイトバイオテクノロジーの研究開発分野で微生物による物質生産に関わる海外(主に欧米)の研究動向調査を実施した。2005年から2009年の5年間に公表された学術論文・レポート・インターネットサイトなどからの最新情報を収集し、ホワイトバイオテクノロジーに関する現状、国家戦略、関連プロジェクト、企業動向、トピックスなどについて整理・解析して調査報告書「プロジェクト研究技術開発に関連するホワイトバイオテクノロジーの海外研究動向調査(主に欧米)」を作成し、関係者へ提供した。

平成22年度は、本プロジェクト研究技術開発に関連する、欧米における微生物機能を利用したバイオプロセス・バイオプロダクトの技術開発動向調査を実施した。主に2010年に公表された公式レポートやインターネットサイトなどからの最新技術情報を収集し、石油化学品に換わる微生物によるバイオ化学品をキーワードに、欧米の政府省庁や民間企業の技術開発動向、さらには産業・経済への波及効果、GHG(地球温室効果ガス)削減・省エネルギーなどの地球環境保全効果にまで展開して整理・解析して調査報告書「欧米における微生物機能を利用したバイオプロセス・バイオプロダクトの技術開発動向調査」を作成し、関係者へ提供した。

また、特許周辺情報の調査を行い、平成18年度は「特許調査報告」、平成19年度、20年度、21年度、22年度は「国内外研究動向調査結果報告」を各年度1報作成し、計5報を関係者に提供した。

IV. 実用化、事業化の見通しについて

1. 実用化、事業化の見通し

1.1 実用化、事業化の見通し

本事業の研究開発の成果から、以下のとおりの実用化の見通しが立てられる。

高性能宿主細胞創製技術の開発においては、大腸菌 DGF の研究開発で、作製した染色体縮小化株群は自社での利用以外にも他社へのライセンスアウトを交渉中である。また更に活用範囲を広げるため、アカデミアのグループへの分与を計画中である。2～3年後には、実用化の具体的な事例が出てくるように普及活動に努めている。実用化の事例がでてくれば、そこから2年以内には事業化に結びつくものとする。枯草菌 RGF の研究開発で、得られた高機能性宿主細胞を用いて、セルラーゼ、プロテアーゼなどの産業用酵素ならびに異種生物由来蛋白質の微生物工業生産技術を確立し、経済的生産性アップとコストダウンを実現する。また、得られた研究成果は国内外の学会発表及び論文発表として公開し、条件が合えば幅広くライセンスアウトし、実用化を加速する。分裂酵母 IGF の研究開発で、旭硝子における異種タンパク質生産受託ビジネスへのIGF 宿主ならびに技術の提供、および社外への積極的なライセンスアウトを行う。また公的・民間菌株分譲機関を活用し、宿主ならびに周辺ライブラリーを恒久的に保管・分譲し、かつ同様の技術移転機関を活用し、開発成果の普及を図る。

微生物反応の多様化・高機能化技術の開発においては、非水系反応場におけるバイオプロセスの構築で、有機溶媒耐性 *K. rhizophila* DC2201 に各種の反応を触媒する酵素遺伝子を導入することによって有機溶媒反応場で難水溶性化合物を原料にした医薬品中間体等の生産を 3～5年後の実用化を目指して、検討して行く。酸素添加酵素の高機能化・多様化技術の研究開発で、プロジェクトで達成した成果をビタミンD類水酸化体の製造に活用を検討するほか、独自に保有する P450 水酸化酵素遺伝子ライブラリーを活用して、同様な開発手順で医薬としての新たな有用水酸化化合物の製造開発の展開を図ってゆく。酵素反応シミュレーション技術の開発で、将来的には、製薬企業や化学関連企業に向けた解析サービスやコンサルティングが事業として有望であるが、まずは、弊社内での実用化を検討する。具体的には、自社内で事業化に向けて研究開発を行っている抗体や酵素を利用した分子センサの高度化に利用する。補酵素再生系を含む複合酵素系による生産プロセスの開発で、非天然アミノ酸生産プロセス等の実用化レベルに達した生産プロセスについては、プロジェクト終了後数年以内での工業規模使用に向けて、製品の市場調査とコスト評価、及び技術導入時の経済的妥当性の検証を進め、必要に応じて製品化や設備取得に向けた工業化技術検討に移行する。非天然型抗生物質生産の基盤技術となる人工遺伝子クラスター法の開発で、非天然型抗生物質Bの培養生産性についてはほぼ目標を達成し実用化可能なレベルにある。一方、実用化のためには、本物質が新規物質であるため培養液からの精製プロセスの開発が必要である。また、本物質は医薬品原体の合成中間体として利用されるため、合成工程への適用確認、得られた原薬の不純物プロファイル等の確認も必要である。

また、発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発(独立行政法人製品評価技術基盤機構)では、高性能宿主細胞 DGF は、代謝変化により、効率的な増殖を行

うことで製薬分野における利用が推進される。有機溶媒耐性株の非水系バイオプロセス中の酵素の発現状況が判明、物質変換可能な反応系が見いだされた。非水系バイオプロセスによる物質変換系が可能となった。

バイオリファイナリー技術の開発においては、増殖非依存型バイオプロセスの開発で、国内企業との共同により増殖非依存型バイオプロセスによる各種化学品・燃料の工業化研究を開始した。メンブレン利用高効率発酵システムによる有機酸製造基盤技術で、本技術の実用化、事業化促進のため、有機酸以外の有用物質製造への適用実証、実用システム構築に重要な発酵・精製システムの運転技術開発、および汎用発酵システムとしての既存発酵システムとの優位性の明確化を行うことにより、高効率な微生物発酵プロセスの実用化・事業化に目処をつける。

研究開発項目毎の実用化の見通しは以下のとおりである。

1. 1. 1 高性能宿主細胞創製技術の開発

1. 1. 1. 1 大腸菌 DGF (Designed Genome Factory) の研究開発 (協和発酵キリン株式会社)

(1) 成果の実用化可能性

本研究開発で作製した染色体縮小化株を用いた物質生産に関して、既存の菌株と比べた優位性を実証した。またプロモーター群もユニークな制御が可能なるものをコレクションしたので、プロモーター単独での使用も十分に実用的である。染色体縮小化株を宿主として、生産系遺伝子を発現させ、目的化合物に応じてチューニングすることで、効率的な物質生産系を構築することが可能である。実用化の可能性は高いと判断する。

(2) 事業化までのシナリオ

実用化・事業化に向けては、引き続き子会社で検討を継続する。また積極的なライセンスアウトや共同研究により更なるブラッシュアップを予定している。ニコチアナミンに代表されるような、これまでに製造方法が確立できなかったような、製造困難な化合物の生産プロセス構築に利用することで、既存の菌株に対する優位性が示され、事業化にも繋がりやすいと考える。そのようなターゲットも、ライセンスアウトや共同研究の中で試される予定。2~3年後の実用化を目指す。事業化に関しては、ターゲット化合物の需要の推移によるところも大きい。複数の実用化例が出れば、そこから2年以内には事業化例がでてくるものとする。課題としては、組換えの規制の問題がある。規制が厳しくなれば、事業化の可能性は低くなる。

(3) 波及効果

本研究開発成果に関して、ライセンスインの打診、共同研究に関する問い合わせなどがある。今後さらに波及効果が現れるものと思われる。

本プロジェクトの実施に際しては、ポスドク研究員を積極的に雇い入れた。ポスドクの皆さんには、応用研究、企業研究の手法に習熟していただいた。そのような方々が、アカデミアに戻られており、応用研究分野の活性化に少なからず寄与した。

1. 1. 1. 2 枯草菌 RGF (Refined Genome Factory) の研究開発 (花王株式会社)

ゲノムサイズを30%以上縮小することで、(1)糖消費効率の向上、(2)プラスミド DNA コピー数の増加、(3)細胞内代謝効率の向上など、酵素生産効率を大幅に向上させる事に成功した。また、培養後半の代謝活動も高レベルで維持できており、定常期以降の細胞当たりの酵素生産効率が向上したことで、生産性がさらに向上した RGF を創製できた。更に、本プロジェクトにおいて RGF 株のアミノ酸および糖の代謝をデザインしたことで生産性が 2.5 倍向上させることができた。

得られた高機能性宿主細胞を用いて、セルラーゼ、プロテアーゼ、アミラーゼ、リパーゼなどの産業用酵素ならびにインターフェロンなどの異種生物由来蛋白質の微生物工業生産技術を確立し、経済的生産性アップとコストダウンを実現する。また、得られた研究成果は国内外の学会発表及び論文発表として公開し、条件が合えば幅広くライセンスアウトし、実用化を加速する。

1. 1. 1. 3 分裂酵母高性能宿主細胞創製技術の研究開発 (旭硝子株式会社)

旭硝子における異種タンパク質生産受託ビジネスへの IGF 宿主ならびに技術の提供、および社外へのライセンスアウトを積極的に行う。また公的・民間菌株分譲機関を活用し、宿主ならびに周辺ライブラリーを恒久的に保管・分譲し、かつ同様の技術移転機関を活用し、開発成果の普及を図る。

1. 1. 1. 4 発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発

(独立行政法人製品評価技術基盤機構)

本研究開発の結果、MGF-01 株の持つ特異な性質を、遺伝子の大量削除による遺伝子発現の変化として捉えることができた。これらの情報から異常増殖の仕組みが明らかになることで DGF 株の高度化に必要な情報となり、協和発酵キリンにおいてプロジェクト開始時に対して生産性を2倍以上に向上させた DGF 株の創製がなされるものと期待される。

1. 1. 2 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発

1. 1. 2. 1 非水系反応場におけるバイオプロセスの構築 (ダイセル化学工業株式会社)

有機溶媒耐性 *K. rhizophila* DC2201 にニトリラーゼ、酸化還元酵素、水酸化酵素遺伝子を導入することによって難水溶性化合物を原料にして有機溶媒反応場でマンデル酸等を生産する。また、水素酸化細菌を用いて不斉還元酵素とヒドロゲナーゼを共役させて原料と水素から医薬品の中間体となる光学活性化合物を生産する。いずれも、3~5年後の実用化を目指して、プロセス検討を行って行く。有機溶媒耐性菌は化学物質に対する耐久性が高いところから、物質生産ばかりでなく、有害な化学物質を分解させることにも応用可能であり、環境修復技術への利用も検討して行く。

1. 1. 2. 2 酸素添加酵素の高機能化・多様化技術の研究開発 (メルシャン株式会社)

天然物由来の複雑な化合物における位置・立体特異的水酸化反応は、修飾標的の炭素原子

の不活性化、保護すべき反応基の存在、異性体の生成などの理由から化学合成的アプローチが最も困難とする反応である。P450バイオプロセスによる水酸化反応製造技術が確立すれば、これまで化学合成的に困難であった新規生理活性物質の創製や、導入水酸基を反応活性基点としたコンビナトリアルケミストリー的手法による医薬品中間体の調製、さらには汎用アルコール類の生産といった広範な産業用途の拡大が期待できる。

メルシャンは活性型ビタミンD3を含め水酸化反応による複数の製造品目を製造に結びつけたこれまでの実績から、本研究開発の成果を比較的短期間で自社で実用化することが可能である。例えば医薬または医薬中間体としての水酸化ビタミンD誘導体が実用化候補品目に挙げられる。さらに、本委託研究成果が、多くの有用なシトクロムP450モノオキシゲナーゼ(望ましくはさらに広範な酸素添加酵素)を活用したバイオプロセスに汎用的に応用できれば、様々な有用水酸化化合物の受託製造を外部企業から請け負うことで事業を展開することを考えている。

成果物については可能な限り特許出願し、化合物の水酸化を希望する企業・大学等には有償の実施許諾契約の下で貸与することも考慮する。

1. 1. 2. 3 高効率酵素設計のための酵素反応シミュレーション技術の研究開発(日本電気株式会社)

コンピュータの計算処理能力が飛躍的に増大する昨今、シミュレーションツールを活用して酵素や抗体などの高分子を設計するニーズは、今後増えていくと考えている。将来的には、このようなニーズがある製薬企業や化学関連企業に向けた解析サービスやコンサルティングが事業として有望であるが、まずは、弊社内での実用化を検討する。具体的には、自社内で事業化に向けて研究開発を行っている抗体や酵素を利用した分子センサの高度化に向けて、本研究開発の成果を反映させる。

1. 1. 2. 4 微生物複合酵素系の産業用触媒としての研究開発(株式会社カネカ)

非天然アミノ酸生産プロセス等の実用化レベルに達した生産プロセスについては、プロジェクト終了後数年以内での工業規模使用に向けて、製品の市場調査とコスト評価、及び技術導入時の経済的妥当性の検証を進め、必要に応じて製品化や設備取得に向けた工業化技術検討に移行する。

1. 1. 2. 5 放線菌の活用による新規二次代謝産物の開発(明治製菓株式会社)

本研究開発のモデル化合物は、医薬品分野で極めて有用な物質である。現状、本モデル化合物は「天然型」生理活性物質を原料として化学プロセスによって製造可能であるが、多工程に及ぶ化学反応を必要とするため、収率が低く製造コストが高くなっている。本研究開発で得られた遺伝子組換え体を培養し、精製工程も含めて、化学プロセス法と競争可能な製造コストでモデル化合物を生産する技術が確立されれば、本物質及びその関連物質を明治製菓株式会社の国内工場生産し、国内外で販売する計画である。実用化時期は、本研究開発終了後3年以降を目

処としている。条件が合えば国内企業にライセンスアウトする。

1. 1. 2. 6 発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発

(独立行政法人製品評価技術基盤機構)

本研究開発の結果、OSR 株の持つ有機溶媒耐性機構の解明の一端を掴むことができた。これらの情報については共同実施先の大阪大学、広島大学、ダイセル化学へ提供を行った。これらの情報からそれぞれの特徴を生かした OSR 株の持つ有機溶媒耐性機構を利用し、非水系バイオプロセスが実現に近づいたものと考えられる。特に *K. rhizophila* DC2201 の優れた有機溶媒耐性を利用した有機溶媒重層二層系培養の可能性が示されたことから、網羅的プロテオーム解析により得られた発現タンパク質のリストをもとに物質生産の設計が可能になり、新たな反応場の創製につながるものと期待される。

本研究開発の成果物である「創製された高性能宿主細胞」「OSR株」については、NEDO 及び研究実施機関が成果の普及に努めることとなっており、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物遺伝子資源部門(NBRC)への寄託が検討される予定である。これにより、広く普及し、研究開発、産業利用が進むものと期待される。

1. 1. 3 バイオリファイナリー技術の開発

1. 1. 3. 1 ソフトバイオマス糖化技術の開発・増殖非依存型バイオプロセスの開発・トータルシステムの開発

(財団法人地球環境産業技術研究機構)

(1) 実用化のシナリオ

日本の自動車、家電企業等は、再生資源からの材料使用率 up の早期実現を図るため一日も早い該材料の原料となるバイオリファイナリーによる“経済性ある化学品製造”が実現されることを望んでいる。

実際に、これらの企業は該化学品の製造に自ら乗り出すこと、もしくは化学系企業等との連携による製造も視野に入れている。RITE では、本研究開発に付随する活動として、バイオリファイナリー化学品の応用用途もしくは製造に関心ある企業情報を収集し、それを基に日本におけるバイオリファイナリー産業化の早期実現を目指してきた。

現在、本プロジェクトで開発したポリマー原料等の基幹物質製造技術に関して、複数の国内企業とプロジェクトの枠外にて実用化研究をスタートしており、今後 5 年以内に数種の本格的なバイオリファイナリー産業の構築が可能となる。特に D-乳酸、L-乳酸は、高機能バイオプラスチックであるステレオコンプレックス型ポリ乳酸(scPLA)の原料として近年再び注目を浴びている。これは、近年の樹脂合成技術の飛躍的進歩から従来バイオマスプラスチックでは達成できなかった石油系ポリエステル(PBT,PBT)に匹敵する高い耐熱性と易結晶化特性を有する産業用、耐久消費材に適したバイオマスプラスチックが合成可能となったことによる。現在、国内化学メーカーとの共同研究による工業化研究を実施中であり、数年以内に実用化予定である。

一方、本プロジェクトにおける基盤技術として先行して開発が進んでいる増殖非依存型バイオプロセスによるエタノールやブタノール生産については、プロジェクト枠外でそれぞれ複数の国内企業との共同により既に工業化研究を進めており、これらの工業化の実現に本プロジェクトの成果であるソフトバイオマス由来混合糖同時利用技術や発酵阻害物質耐性等が大きく寄与すると考えられる。

(2)波及効果

増殖非依存型プロセスは日本独自の技術で「ものづくりバイオプロセスのパラダイムシフト」を引き起こすことが可能であり、今後、バイオ化学品は自動車、家電等のエンドユーザーから切望され、コアプロセスとして、大きな波及効果が期待される。今後の具体的な出口の製品として、飼料用アミノ酸、バイオプロパノール、コハク酸などの樹脂モノマーがあげられる。さらに、燃料エタノール、燃料ブタノールの効率的生産にも大いに貢献する。

これらのバイオリファイナリー新産業創生は、自動車・家電メーカー等への再生可能資源由来の材料供給を可能とし、地球環境保護・循環型社会の構築に貢献する。また、新規市場開拓により、10万人以上の新規雇用が可能となる。

1. 1. 3. 2 メンブレン利用高効率発酵システムによる有機酸製造基盤技術の開発(東レ株式会社)

バイオリファイナリー技術の開発で取り組んでいる「メンブレン利用発酵システムによる有機酸製造基盤技術」は、有機酸に限らずその他発酵品目の生産に適用可能性の高い発酵生産システムである。実用的な物質生産プロセスを構築するにあたっては工業的規模で最終製品を適切なコストで生産できるようにプロセスの最適化を進める必要がある。このためには、発酵、精製を含む製造工程において原料から製品までの全体でプロセスを構築し、段階的なスケールアップ実証をすすめる必要がある。

本プロジェクトでは、適用可能性があり大きな需要が期待できる有機酸として D-乳酸を挙げて、効率的な発酵生産技術開発に取り組んだ。その結果、膜利用発酵リアクター(MFR)を開発し、新開発の分離膜モジュールを適用したパイロットスケール MFR 装置で STY10g/L/h 以上で 700 時間以上、安定して発酵生産できた。また、膜利用精製プロセスを開発して、NF 膜を用いることによって D-乳酸を効率的に精製し、RO 膜を用いることによって低エネルギーで D-乳酸を濃縮できた。また、別途検討から、本発酵・精製プロセスは有機酸以外の物質生産へも適用可能性を見出しており、汎用性の高い技術として展開できるポテンシャルを有している。

これら確立した基盤技術を、今後実用化・事業化を促進するためには、本技術の有機酸以外の有用物質製造への適用実証、実用システム構築に重要な発酵・精製システムの運転技術開発、および汎用発酵システムとしての既存発酵システムとの優位性の明確化を行うことにより、本技術による高効率な微生物発酵プロセスの実用化・事業化に目処をつける必要がある。本システムを実用化できれば、微生物発酵による物質生産コストを飛躍的に低減できることから、バイオリファイナリーによる様々な物質生産プロセスの実用化につなげることができる。

イノベーションプログラム 基本計画

平成21年4月
経 済 産 業 省

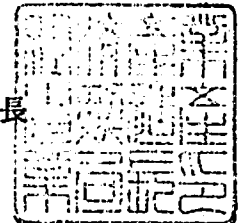
経済産業省

平成21・03・24産局第1号
平成21年4月1日

経済産業省産業技術環境局長



経済産業省製造産業局長



環境安心イノベーションプログラム基本計画の制定について

上記の件について、イノベーションプログラム実施要領（平成16・07・27産局第1号）第4条第1項の規定に基づき、別添のとおり制定する。

平成21・03・24産局第1号
平成21年4月1日

環境安心イノベーションプログラム基本計画

1. 目的

資源制約を克服し、環境と調和した持続的な経済・社会の実現と、安全・安心な国民生活を実現するため、革新的な技術開発や低炭素社会の構築等を通じた地球全体での温室効果ガスの排出削減、廃棄物の発生抑制（リデュース）、製品や部品の再使用（リユース）、原材料としての再利用（リサイクル）推進による循環型社会の形成、バイオテクノロジーを活用した環境に優しい製造プロセスや循環型産業システムの創造、化学物質のリスクの総合的な評価及びリスクを適切に管理する社会システムの構築を推進する。

2. 政策的位置付け

第3期科学技術基本計画（2006年3月閣議決定）及び分野別推進戦略（2006年3月総合科学技術会議）における国家的・社会的課題に対応した研究開発の重点推進分野である環境分野及び国の存立にとって基盤的であり国として取り組むことが不可欠な研究開発の推進分野であるエネルギー分野に位置付けられるものであるほか、次のとおり位置付けられている。

新産業創造戦略2005（2005年6月経済産業省）

先端的新産業分野として揚げられた戦略7分野の一つの「環境・エネルギー・機器・サービス」及び「健康・福祉・機器・サービス」に該当し、「技術戦略マップ」を活用し、効果的な研究開発を促進することが今後の取組として指摘されている。

「新・国家エネルギー戦略」（2006年5月経済産業省）

省エネルギーフロントランナー計画において省エネルギー技術開発の一層の推進を図ることとしている。

経済成長戦略大綱（2006年7月財政・経済一体改革会議）

「環境と経済の両立を図るため、金融面からの環境配慮を進めるとともに、環境技術の開発、3Rイニシアティブやアジア環境行動パートナーシップ構想による優れた技術・制度の国際的な普及と標準化等に向けた取組を進める」との方針が示されている。

イノベーション25（2007年6月閣議決定）

イノベーション立国に向けた政策ロードマップ - 社会システムの改革戦略 - 早急に取り組むべき課題「環境・エネルギー等日本の科学技術力による成長と国際貢献」において、「環境・資源・エネルギー等の世界的制約となる課題の解決に貢献し、技術開発や環境整備を通じて持続可能な産業体系・社会基盤・生活を実現することにより世界と日本の経済成長の原動力とするエコイノベーションを実現すべきである。」との方針が示されている。

イノベーション立国に向けた政策ロードマップ - 技術革新戦略ロードマップ「世界的課題解決に貢献する社会 ものづくり技術分野」の中で「3R型設計・生産・メンテナンス技術、製品の設計・製造段階でのリサイクル阻害物質の使用排除を可能とする技術、製品中の有用・有害物質管理技術の開発・標準化」が資源を有効利用し、環境に配慮したものづくり技術として位置づけられている。

21世紀環境立国戦略（2007年6月閣議決定）

今後1、2年で重点的に着手すべき八つの戦略の中で「3R関連法制度等の充実や技術開発の支援を通じて、製品のライフサイクル全体での天然資源投入量の最小化や

再生資源の高付加価値製品への利用を促進し、資源生産性の更なる向上と環境負荷の低減を図る」との方針が示されている。

同じく、今後1、2年で重点的に着手すべき八つの戦略のうち「環境・エネルギー技術の中核とした経済成長 - 環境技術・環境ビジネスの展開」において「環境重視・人間重視の技術革新・社会革新を図る「エコイノベーション」というコンセプトの下、我が国の強みである「ものづくり」と「環境・省エネ」の技術力を梃子に、持続可能な生産システムへの転換、ゼロエミッション型社会インフラ整備、環境価値を重視した持続可能な生活の実現に向けた技術革新と社会システム改革を一体的に推進し、その成果をOECD等を通じて世界に発信する。」との方針が示されている。

「地球温暖化対策技術研究開発の推進について」(2003年4月総合科学技術会議)

総合科学技術会議重点分野推進戦略専門委員会に設置された温暖化対策技術プロジェクトチームでまとめられた上記報告書における研究開発推進戦略に対応するものである。

京都議定書目標達成計画(2005年4月閣議決定)

目標達成のための対策と施策のうち地球温暖化対策技術開発の推進に位置づけられるものである。

Cool Earth - エネルギー革新技术計画(2008年3月経産省公表)

重点的に取り組むべきエネルギー革新技术「21」を含むものである。

低炭素社会づくり行動計画(2008年7月閣議決定)

「低炭素社会を目指し、長期目標を実現するために重要な革新的技術開発の推進及び既存先進技術の普及促進を行う。」とされている。

産業構造審議会廃棄物・リサイクル小委員会基本政策ワーキンググループ報告書(2008年1月)

「近年、安定供給が懸念されているレアメタルの中には、使用製品からの回収・再利用技術が確立していないものもあることから、回収された使用済製品から効率的に抽出するための新たな技術の開発にも取り組むべきである。」とされている。

バイオマス・ニッポン総合戦略(2006年3月閣議決定)

バイオマスの変換に関する戦略として、経済性の向上、革新的な変換技術の開発に取り組むこととしている。

ドリームBTジャパン(2008年12月BT戦略推進官民会議取りまとめ)

バイオテクノロジー(BT)を活用して、環境に優しい低炭素社会の実現と環境修復のための技術開発と実用化支援を行うこととしている。

3. 達成目標

・地球温暖化防止新技術

- (1) 世界全体の温室効果ガス排出量を現状に比して2050年までに半減するという長期目標を達成するため、経済成長と温室効果ガスの排出削減の双方を同時に達成できる革新的技術を開発するとともに、低炭素社会モデル構築に向けた取り組みを推進。

【目標】 世界全体の温室効果ガス排出量を現状に比して2050年までに半減

- (2) 「京都議定書」で課せられた温室効果ガス削減目標の達成

(「京都議定書目標達成計画」に示された各部門の目安としての目標(基準年比)は以下のとおり)

【目標】

エネルギー起源CO₂: +1.3~2.3%

非エネルギー起源CO₂: 0.04%

メタン: 0.9%

一酸化二窒素： 0.6%
 代替フロン等3ガス： 1.6%

() 「京都議定書目標達成計画」とは、「地球温暖化対策の推進に関する法律」に基づき、「京都議定書」の6%削減約束を確実に達成するために必要な措置を定めるものをいう(平成17年4月閣議決定、平成18年7月一部改定、平成20年3月全部改定)

・資源制約克服 / 3R

「第2次循環型社会形成推進基本計画(平成20年3月閣議決定)に基づき、2015年度までに以下の目標の達成を図る。

資源生産性：約42万円/トン(2000年度：約26万円/トン)

循環利用率：約14~15%(2000年度：約10%)

最終処分量：約23百万トン(2000年度：約57百万トン)

(備考)

資源生産性 = (GDP) / (天然資源等投入量)

循環利用率 = (循環利用量) / (循環利用量 + 天然資源等投入量)

・環境調和産業創造バイオ

バイオプロセスによって有用物質を生産し、廃棄物や汚染物質を発酵等により処理又は再資源化するという、循環型の産業システムを実現するために必要な技術基盤の構築を図るとともに、遺伝子組換え体の産業利用における安全性管理の充実を図る。具体的には、工業プロセスにバイオテクノロジーを導入することや、微生物や植物機能等を活用したモノ作り技術の開発、バイオマス利用、及びバイオ技術による産業廃水等処理技術の開発等を通して、環境調和型産業の創出に資する。

・化学物質総合評価管理

化学物質のリスクの総合的な評価を行いつつ、リスクを評価・管理するための技術体系を構築する。そのために、化学物質のリスクに係る国民の理解増進のための基盤、事業者が自らリスクを判断する手段及び国が規制等の施策を講ずる際の手段として、化学物質のライフサイクルにわたるリスクの総合的な評価管理を行うための手法を確立するとともに、リスクの削減に資するプロセス、手法の開発、さらには知的基盤を整備する。

4. 研究開発内容

- 1. CO2固定化・有効利用技術

地球温暖化対策のため、排出される二酸化炭素を分離回収・固定化することや、有用物質に変換する技術を開発し、低炭素社会の構築に資する。

() 共通技術開発等

(1) プログラム方式二酸化炭素固定化・有効利用技術開発

概要

二酸化炭素の固定化・有効利用技術開発は、現時点においては基礎的な段階に属する研究が多く、長期的観点からの取り組みが必要不可欠。このため本事業では将来において実現可能性の高い二酸化炭素固定化・有効利用技術に関する革新的な技術シーズを発掘し、実現可能性を確認した上で、基盤技術として確立する。

事業期間

1999年度～2011年度

実施形態

適切な研究課題等を選定して研究開発を実施。

(2) 地球環境国際研究推進事業

概要

地球温暖化問題の解決に向け、CTI（気候変動技術イニシアティブ）等の国際的な枠組みを活用し、諸外国の先進的取組との研究協力や、発展途上国への技術普及を進めることにより、世界的な温暖化問題への取り組みを強化する。

事業期間

2002年度～2011年度

実施形態

諸外国との連携のもと、テーマ毎に適切な体制を構築し実施。

() 二酸化炭素回収・貯留(CCS)に関する技術開発

(1) 分子ゲート機能CO₂分離膜の技術研究開発

概要

二酸化炭素回収・貯留(CCS)の実用化に向け、最大の課題のひとつであるCO₂分離回収コストの大幅低減を目指し、圧力を有するガスからのCO₂/H₂の分離用に期待されている膜分離技術の実用化のため、分子ゲート機能CO₂分離膜の高圧下におけるCO₂/H₂選択性の向上、分離膜モジュールの大型化等に取り組む。

技術目標及び達成時期

2015年頃において、石炭ガス化複合発電(IGCC)等で発生する圧力ガスから従来の3分の1程度(1,500円/t-CO₂程度)のコストでCO₂を分離回収することを可能とする膜分離技術の確立を目指す。

研究開発期間

2006年度～2010年度

(2) 二酸化炭素貯留隔離技術研究開発

概要

二酸化炭素回収・貯留(CCS)(地中貯留及び海洋隔離)の実用化に向け、CCS実施における安全性評価・社会的信頼醸成に必要な基盤技術や手法の開発に重点的に取り組む。本事業の実施にあたっては、国内外で実施される実証事業等と必要な連携をしながら取り組む。

また、本事業で獲得した安全性評価等に関する知見を活用し、CCS事業を計画する上での基礎情報である、貯留隔離ポテンシャルの調査を行う。

技術目標及び達成時期

貯留した二酸化炭素のモニタリング技術、挙動予測手法、環境・生物影響評価、安全性評価手法の開発、及び全国貯留層賦存量調査を行う。

研究開発期間

フェーズ1：2000年度～2004年度

フェーズ2：2005年度～2012年度

注) 本事業は、平成20年度までの「二酸化炭素地中貯留技術研究開発」(うち実証試験を除く)と「二酸化炭素の海洋隔離に伴う環境影響予測技術開発」を統合したもの。

(参考：「二酸化炭素海洋隔離に伴う環境影響予測技術開発」の研究開発期間)

フェーズ1：1997年度～2001年度

フェーズ2：2002年度～2006年度

フェーズ3：2007年度～2011年度

当初単独事業として2011年度まで実施する予定であったが、2009年度

より地中貯留技術研究開発と事業統合。海底下帯水層への地中貯留等に係る、安全性評価・環境影響評価等にこれまでの成果を活用する。

(3) 二酸化炭素削減技術実証試験委託費

概要

二酸化炭素回収・貯留(CCS)技術の実用化に向けた実証試験を行う。具体的には、火力発電所等の大規模発生源から分離回収したCO₂を年間約10万トン規模で地下帯水層(地下1,000m程度)等へ貯留する技術を実証するとともに、長期挙動予測可能な二酸化炭素挙動予測シミュレーション技術、モニタリング技術等の基盤技術の確立を行う。

技術目標及び達成時期

2015年度までに、CCS技術の本格導入となる、100万トン/年規模での地中貯留を実現するために必要な基盤技術を確立する。

研究開発期間

2008年度(補正)~2013年度

() 環境調和型製鉄プロセス技術開発(運営費交付金)

概要

高炉ガスからの効率的な二酸化炭素分離と中低温排熱の有効活用及び水素を炭素(コークス)の一部代替として鉄鉱石を還元する革新的製鉄プロセスの開発を行う。

技術目標及び達成時期

最終的な技術開発目標として製鉄プロセスにおけるCO₂排出量を30%削減することを目指し、2050年までに実用化する。

研究開発期間

2008年度~2017年度

() 大規模植林

(1) バイオ技術活用型二酸化炭素大規模固定化技術開発

概要

バイオエタノール化に適した樹木への環境耐性付与を遺伝子技術により実施し、これら原料樹木の不良環境下での効率的な植林技術を開発する。

技術目標及び達成時期

事業4年目までに、未利用の不良環境地でも生育できる高セルロース樹木を遺伝子技術により開発し、実証植林を行う。

研究開発期間

2008年度~2011年度

- 2. 脱フロン等技術

代替フロンの排出量を抑制するため、代替フロンを削減する技術(脱フロン等技術)を開発する。

(1) 革新的ノンフロン系断熱材技術開発(運営費交付金)

概要

エネルギー需給構造の高度化を図る観点から行うものであり、住宅・建築物の省エネルギーという社会適用性に応えるため超微細発泡等による断熱性能の向上のための技術開発を行う。

技術的目標及び達成時期

既存のノンフロン断熱材では達成できていない断熱性能を実現し、更には従来のフ

ロン断熱材の断熱性能を超える高断熱性能を実現する断熱材を2012年頃を目途に開発する。

研究開発期間

2007年度～2011年度

(2) ノンフロン型省エネ冷凍空調システムの開発(運営費交付金)

概要

エネルギー需給構造の高度化を図る観点から行うものであり、家庭用・業務用及び運輸用エアコン及びショーケース等に使用可能なノンフロンかつ高効率を達成でき、安全性についても配慮された新たな冷凍システムの開発を行う。

技術的目標及び達成時期

2009年度までに、ノンフロン(自然冷媒等)型省エネ冷凍・空調システムを開発する。

研究開発期間

2005年度～2009年度

・資源制約克服/3R

() 金属資源等3R対策

(1) 希少金属等高効率回収システム開発(再掲)

概要

小型電子・電気機器にはベースメタルや、金、銀等の貴金属の他、インジウム、ニッケル等の希少金属等を含有している。現状では、これらの機器が廃棄された後は、非常に高温で処理する乾式製錬技術を用いてリサイクル・処理されているため、多大なエネルギーを消費するばかりか、回収可能な金属が銅、金、銀等に限定されており、その他の希少金属等は回収できずに廃棄処分されている。このため、湿式製錬技術を活用した高効率な最適技術の開発等を通じて、回収工程の省エネルギー及び希少金属等の回収率向上を図る。

技術目標及び達成時期

- ・従来方法(乾式製錬)で処理する場合に比べて、大幅な省エネルギーの実現(省エネルギー効果:原油換算で約78万k l/年削減)
- ・廃小型電子・電気機器、廃超硬工具等中に含まれる希少金属等の回収率の向上(インジウム0% 90%、ニッケル50% 95%、コバルト0% 95%、タンタル0% 80%、タングステン90% 95%、レアアース0% 80%)

研究開発期間

2007年度～2010年度

(2) 希土類金属等回収技術研究開発

概要

今後、普及拡大が見込まれる製品の製造工程において排出されるレアアースを含む不要物など技術的・経済的に抽出が困難なレアアース含有物について、レアアース等有用金属のリサイクル技術の研究開発を行う。

具体的には、液晶パネル用ガラス、ハードディスク用ガラスの製造工程等で使用された低品位状態のレアアースについて高品位化し再利用するための技術開発を実施する。

技術目標及び達成時期

液晶パネル用ガラス、ハードディスク用ガラスなどの精密な表面処理が必要な製品の研磨に使用されているセリウム等のレアアースを含有する研磨剤について、

研磨廃滓中のレアアース成分と不純物の分離に新たな低温での化学的・物理的プロセスを確立・導入（具体的には低温での効率的な化学処理や、研磨剤成分ではなく不純物を物理的に分離する回収プロセスに変更する等）することでレアアース回収プロセスの低コスト化及びエネルギー使用合理化を目標とする。

研究開発期間

2008年度（補正）～2012年度

（3）希少金属代替材料開発プロジェクト（再掲）

概要

希少金属は、特殊用途において希少な機能を発揮する一方で、その希少性・偏在性・代替困難性から、市場メカニズムが必ずしもうまく機能せず、その供給停止は川下の経済成長の制約要因となりうるリスクを伴っている。近年、「コンピュータによる材料設計」、「ナノテクによる微細構造制御」等が飛躍的に向上した結果、従来できなかった、「コンピュータによる最適制御設計による候補元素系の探索」、「結晶粒界、界面の制御等マイクロ構造の制御」等が可能となりつつあることから、こうした最先端技術を用いることで、希少金属の新たな代替/使用量低減技術を開発する。

技術目標及び達成時期

2011年度までに、以下希少金属元素の使用原単位について現状と比較して以下の低減ができる製造技術を開発し、ユーザー企業、大学等の外部機関に対して機能評価のためにラボレベルで提供できる（試料提供）水準に至るまでの技術を確立することを目標とする。また、製品の機能や製造コストは現状と同等を少なくとも維持することを前提とする。

- ・透明電極向けインジウム（In）：現状から50%以上低減
- ・希土類磁石向けディスプロシウム（Dy）：現状から30%以上低減
- ・超硬工具向けタングステン（W）：現状から30%以上低減

研究開発期間

2007年度～2011年度

（ ）水資源制約克服

（1）環境調和型水循環プラント実証事業（運営費交付金）

概要

我が国が強みを持つ、膜技術を始めとする水処理技術を活用し、省水型・環境調和型の水循環システムを開発するとともに、海外展開等を支援する。

技術目標及び達成時期

2013年度までに省水型・環境調和型の水循環システムを確立し、以降、国内外の水不足が深刻な地域へ当該水循環システムを順次普及させる。

研究開発期間

2009年度～2013年度

（2）環境調和型水循環技術開発（運営費交付金）（再掲）

概要

我が国が強みを持つ、膜技術を始めとする水処理技術を強化し、省水型・環境調和型の水循環システムの開発に資する省エネ・省水型の要素技術を開発する。

技術目標及び達成時期

2013年度までに、以下の技術を開発する。

- 革新的膜分離技術の開発：

従来法に比べ膜透過加圧エネルギー等を50%以上削減。

- 省エネ型膜分離活性汚泥法（MBR）技術の開発：
従来法に比べ膜洗浄の曝気（空気気泡）エネルギー等を30%以上削減。
- 有用金属・有害物質の分離・回収技術の開発：
従来法に比べ汚泥の削減により汚泥処理・処分エネルギーを80%以上削減。
- 高効率難分解性物質分解技術の開発：
従来法に比べ窒素処理に係るエネルギーを50%以上削減。
オゾン酸化法等のエネルギーを50%以上削減。

研究開発期間

2009年度～2013年度

・環境調和産業創造バイオ

(1) 植物機能を活用した高度モノ作り基盤技術開発

() 植物利用エネルギー使用合理化工業原料生産技術開発（運営費交付金）

概要

現在の化学工業プロセスに代わる、植物の有する有用物質生産能を活用した省エネルギー・低環境負荷型の工業原料生産プロセスへの変換を促進する。具体的には、工業原料の生産に関わる重要な物質生産プロセスに関する代謝系をゲノム情報に基づき解析するとともに、有用物質生産制御に必要な一連の代謝遺伝子群の発現を統一的に制御する技術の開発を行う。

技術目標及び達成時期

2009年度までに、工業原料として有望なバイオマスとしてイソプレノイド、油脂などの有用物質生産に関わる代謝経路とその調節メカニズム及び生産物質の蓄積・移動に係るメカニズムの解析を行い、関連遺伝子情報を整備するとともに、統括的発現制御技術を開発する。

研究開発期間

2002年度～2009年度

(ii) 植物利用高付加価値物質製造基盤技術開発

概要

動物や微生物による物質生産と比較して、安全性が高い、生産コストが低い、省エネルギーで環境調和型といった特徴を有する植物を活用した高機能タンパク質等の高付加価値物質生産（モノ作り）の基盤技術を開発するために、有用物質を高効率に高生産させる組換え植物の基盤技術を開発するとともに、閉鎖型人工環境下での高効率な栽培技術の開発を一体的に進める。

技術目標及び達成時期

2010年度までに、実用植物において実用可能なレベルまで有用物質を効率的に高生産・高蓄積させる組換え植物を開発するとともに、目的有用物質を安定かつ均一に生産・蓄積させる栽培技術を確立し、その生産の実用性を閉鎖型人工環境下において確認する。

研究開発期間

2006年度～2010年度

(2) 微生物機能を活用した環境調和型製造基盤技術開発（再掲）

() 微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発（運営費交付金）

概要

エネルギー需給構造の高度化を図る観点から行うものであり、省エネルギーかつ環境負荷が少ないといった特徴を有する微生物機能を活用した有用物質の革新的な生産プロセス（モノ作り）の技術を構築するため、産業用途に必要な機能既知遺伝子で構成されたゲノムを持ち、物質生産性向上につながる性能を備えた高

性能宿主細胞の創製や、微生物反応の多様化・高機能化技術を開発するとともに、バイオマスを原料として有用物質を体系的かつ効率的に生産する（バイオリファイナリー）ための基盤技術を開発する。

技術目標及び達成時期

2010年度までに、物質生産性向上につながる性能を備えた高性能宿主細胞を創製するとともに、バイオプロセスの実用化適用範囲の拡大のための微生物反応の多様化・高機能化技術の開発を行う。バイオリファイナリー技術については、バイオマスを高効率で糖化し、糖から高効率で各種化成品の基幹物質を生産するバイオプロセス体系を構築する。

研究開発期間

2006年度～2010年度

(ii) 微生物群のデザイン化による高効率型環境バイオ処理技術開発（運営費交付金）

概要

エネルギー需給構造の高度化を図る観点から行うものであり、従来エネルギー多消費・廃棄物多排出型であった廃水・廃棄物処理において、微生物群の構成及び配置等を人為的に制御（デザイン化）することで、その処理効率を大幅に向上させ、省エネルギーで廃棄物も少ない高効率型廃水、廃棄物処理の基盤技術を確立する。

技術目標及び達成時期

2011年度までに、特定有用微生物群を人為的に安定導入・維持もしくは人為的に空間配置・優先化させる等のデザイン化技術を開発し、従来の廃水、廃棄物処理に比べより高効率で省エネルギーな処理技術を開発するとともに、実用化に資するための実証可能なテストプラント規模にて評価する。

研究開発期間

2007年度～2011年度

(3) バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発（再掲）

概要

食料と競合しないセルロース系バイオマスからバイオ燃料を製造する革新的技術の開発を軸に、バイオ燃料生産に有用な遺伝子組み換えによる植物・微生物の開発等、バイオ燃料のコスト競争力強化に資するバイオリファイナリーの一環として、ブタノール、プロピレン等の製造技術の実用化を目指した開発を行う。

技術目標及び達成時期

2013年度までに、セルロース系バイオマスを原料とし、バイオ燃料製造の従来技術に比べて画期的に優れた効率や低コスト化を可能とする糖化・発酵等の基盤技術を開発するとともに、バイオマス利用に資する微生物の利用基盤技術の開発を行う。さらに、プロパノール等の高効率取得のための触媒開発等により、化成品製造の実用化を目指した技術開発を行い、バイオマスに関する燃料分野と化成品分野の融合・連携を図る。

研究開発期間

2007年度～2013年度

- 1. 化学物質総合評価管理

(1) 化学物質の最適管理をめざすリスクトレードオフ解析手法の開発（運営費交付金）

概要

化学物質のリスクを共通指標で比較、検討し、事業者等における代替物質の選択の際に、リスクの相互比較が可能となるリスク評価手法及び社会経済分析等リスクトレードオフ解析手法を構築する。

技術目標及び達成時期

2011年度までに、代表的な化学物質用途群につき、化学物質のライフサイクルに応じたあらゆる暴露を考慮した排出量推計手法や室内暴露評価手法等環境動態解析手法を構築する。さらに、用途群内の物質間でのリスクトレードオフ解析手法を開発する。

研究開発期間

2007年度～2011年度

(2) ナノ粒子の特性評価手法開発(運営費交付金)(再掲)

概要

ナノ粒子のキャラクタリゼーション、計測技術の確立とともに、生体影響等評価手法、暴露評価手法及びナノテクノロジーによるリスク不安に対処したリスク管理手法を開発する。

技術目標及び達成時期

2010年度までに、生体影響等評価手法、暴露評価手法及びリスク評価手法を開発し、ナノ粒子のリスク評価及び管理の考え方の提言を行う。

研究開発期間

2006年度～2010年度

(3) 構造活性相関手法による有害性評価手法開発(運営費交付金)

概要

従来動物実験による反復投与毒性試験に代わり、*in silico* や類推等を用いた予測・評価を可能とするため、既知の毒性情報を整備したデータベースを基に、よりの確に効率よく毒性を評価可能とする有害性評価支援システムを構築する。

技術目標及び達成時期

2011年度までに、公開されている反復投与毒性試験データや毒性作用機序情報が搭載されたデータベース、肝臓における代謝産物・代謝経路を予測する手法、及び対象とする化学物質の標的臓器・症状やその毒性の強さの範囲等を予測する手法を開発する。さらに、それらを統合して毒性判断に必要な情報を効率的に抽出する有害性評価支援システムを構築する。

研究開発期間

2007年度～2011年度

(4) 石油精製物質等簡易有害性評価手法開発(運営費交付金)(再掲)

概要

石油の生産及び流通の合理化を図る観点から、石油製品等に含まれる化学物質によるリスクを把握し、必要な対策を適切に行うことを可能とするため、*in vitro* 培養系技術等の活用により遺伝子組換え細胞等を用いた *in vitro* 系簡易有害性予測手法、また、トキシコゲノミクスを活用した短期動物試験結果と相関する遺伝子発現データセットを開発する。

技術目標及び達成時期

2010年度までに、遺伝子導入技術、幹細胞分化誘導技術、生物発光技術等を適用した培養細胞を用いて、試験期間1ヶ月程度、発がん性、催奇形性及び免疫毒性を予測評価できる試験手法を開発し、また、遺伝子発現解析技術を短期動物試験に適用し、28日間反復投与試験結果と相関する遺伝子発現データセットを完成させる。また、標準的な試験プロトコルを策定する。

研究開発期間

2006年度～2010年度

- 2 . 化学物質リスク削減技術開発

アスベスト含有建材等回収・処理等技術開発事業（運営費交付金）

概要

今後、大量の排出が予測されるアスベスト含有建材等の廃棄物を対象として、そのアスベスト含有状況について簡易かつ確実な探知・分析を可能とし、安全性、信頼性の高い回収・処理を実現する関連機器・システムの技術開発を行う。

技術目標及び達成時期

2009年度までに、アスベスト含有製品の使用時、解体・回収・廃棄時においてオンサイト方式で検出感度0.1wt%超レベルに検出できる計測技術を確立し、アスベストを含む建材等の回収・除去現場におけるアスベストの飛散及びばく露を最小化し、回収・除去の安全性及び信頼性等を確保する技術を確立する。また、アスベスト含有廃棄物の無害化処理における安全性、効率性に優れた技術を確立する。

研究開発期間

2007年度～2009年度

. その他

エコイノベーション推進・革新的温暖化対策技術発掘・実証プログラム（運営費交付金）

概要

エコイノベーション（環境重視・人間重視の技術革新・社会革新）の創出および、低炭素社会の構築のため、それに資するテーマを公募し、その実現可能性調査や地域実証試験を実施する。発掘された技術シーズや実証された有望な社会システムモデルは広く国民に示し、民間におけるエコイノベーション推進や低炭素社会構築に関する研究や取組を加速させる。

技術目標及び達成時期

F S 結果や実証モデルから生み出された公的機関の実施する研究開発件数や民間主導の取り組みモデル件数を事業のアウトカムとしてモニタリングする。

また、O E C Dにおいて、エコイノベーション・ロードマップとともに、その進捗を測る指標の2010年を目処にした作成が検討されているところ。こうした指標を参考とし、エコイノベーションが進展する度合いの数値化を可能にした上で調査段階でこれらの指標を設定し国際比較を行う。

研究開発期間

2008年度～2012年度

5 . 政策目標の実現に向けた環境整備（成果の実用化、導入普及に向けた取組）

【導入普及促進】

排出量の多い品目・業種や処理困難物を中心にリサイクルシステムなどの実証・市場化対策に関するフィージビリティ・スタディを実施する。

サプライチェーングループを対象に、部品等の仕様と原材料の使用・副産物の発生状況等に関する診断を実施し、製品設計及び製造プロセスの同時改善の方向性に関する提案、指導を行うとともに、取組事例を分析・評価し、資源投入量の抑制効果の高い優良な事例を公開する。

商品選択に資するわかりやすい3R配慮情報（省資源性や再生資源・部品の使用状況等）を消費者に提供し、環境配慮型製品の市場拡大を推進するため、指標の策定や、情報提供手法の確立、製品の情報検索が可能なシステムの検討・開発を行う。

3R対策が講じられている製品等の市場開拓を促進するため、政府が環境物品等を率先購入することを定めたグリーン購入法について、同法の判断基準が引き続き3R対策

を適切に反映するようにしていく。

化学物質の有害性評価、暴露分析、リスク評価等のデータベースの構築を図るとともに、それらの手法の各種活動（事業者の自主管理活動、事業者、地方自治体等が国民とリスクコミュニケーションを図る活動等）等への導入を図る。

公害防止設備に対する優遇税制等の支援を行う。

【法規制・制度改革】

二酸化炭素回収・貯留（CCS）の国内での本格実施に必要な法規制・制度の整備等に関して検討を行う。

資源有効利用促進法等のリサイクル関連法制度によるスキームを活用して、3R対策を網羅的に講じることにより、循環型社会の構築を図る。

遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（カルタヘナ法）に基づく立入検査で査収した生物が遺伝子組換え生物であるか否かを判断するための基盤的な技術の高度化や収去方法を確立すること等により、的確な法律の執行体制を整備する。

【ガイドライン】

事業者による自主的取組を促進する観点から、産業構造審議会において策定している「業種別・品目別廃棄物処理・リサイクルガイドライン」（自主的な目標の設定）について、3R対策を加速する観点から適宜フォローアップを行い、改定を行う。

【基準・標準化】

各プロジェクトや民間における技術開発等で得られた成果のうち、標準化すべきものについては、適切な標準化活動（国際規格（ISO/IEC）、日本工業規格（JIS）その他国際的に認知された標準の提案等）を実施する。

CO₂回収・貯留後のモニタリング、植林等によるCO₂固定化量の計算、バイオマス利用時のCO₂排出削減量の評価、環境影響や安全性評価手法など、CO₂固定化・有効利用を推進するに当たって標準化が必要となる事項については、研究・開発状況や社会情勢を常に意識しながら計画的に標準化を推進する。

リサイクル品などの3R配慮製品に対する需要の創出・拡大を図るため、「環境JIS策定促進のアクションプログラム」に基づき、リサイクル品等の品質基準及び試験評価方法の規格（環境JIS）の策定を引き続き推進する。

バイオマス由来プラスチックにおけるバイオマス含有量測定の標準化を推進するとともに、生分解性プラスチックに係る微生物嫌気分解試験方法の国際標準化を着実に実施する。

石油精製物質等簡易有害性評価手法開発については、開発された簡易有害性評価手法等を2014年度を目途に経済開発協力機構（OECD）にテストガイドラインとして提案することを検討し、国際標準化を推進する。

【調達促進】

バイオマス由来プラスチック等、生物機能を用いた生産プロセスにより生産された製品について、グリーン購入法に基づく調達品目として位置付けられるべく検討を行う。

【広報・啓発】

研究開発プロジェクトの成果について広く普及啓発を図るため、シンポジウム等を行う。

3Rの普及・促進を図るため、毎年10月を「3R推進月間」とし、この期間を中心として、3R活動への関係者の取組を促すための「3R推進功労者等表彰」や、循環ビジネス振興のための「資源循環技術・システム表彰」等の普及啓発活動を実施する。

【知的基盤整備】

国内外との共同研究等を通じ、革新的な温暖化対策技術や方策についての情報交換に資する、情報ネットワークの構築等を行う。

物質生産用に関与された汎用宿主細胞や取得した生物遺伝資源は、独立行政法人製品

評価技術基盤機構に整備し、社会に幅広く提供する。

独立行政法人製品評価技術基盤機構の化学物質管理センターにて事業者・国民・公的機関の化学物質管理に関する冷静な対話（科学的知見の共有）を促進するための知的情報基盤整備を図る。

【国際協力】

生物多様性条約に基づく遺伝子資源へのアクセス促進事業において、日本のバイオ関連企業の遺伝子資源保有国（途上国）の遺伝子資源に対するアクセスを促進するための技術的環境整備及び遺伝子資源へのアクセス実施の調整を行う。

【他省庁との連携】

総合化学技術会議が推進する科学技術連携施策群の「食料・生物生産研究」及び「総合的リスク評価による化学物質の安全管理・活用のための開発技術」、ライフサイエンスPT、社会還元プロジェクトの下での関係府省間における適切な連携の実施。

【プロジェクト等との連携】

CO₂固定化・有効利用技術のロードマップに基づき、技術シーズ発掘型技術開発事業成果のプロジェクトへの取り込みや、プロジェクト間の連携により、低炭素社会モデルの構築に資する効果的なCO₂固定化・有効利用システムの実現を図る。

植物機能を活用したモノ作り基盤技術開発に係る2つのプロジェクト間での、遺伝子高発現技術やモデル植物での基盤技術及び実用作物への技術展開に関する情報交換を推進する。

6. 研究開発の実施に当たっての留意事項

- ・事業の全部又は一部について独立行政法人の運営費交付金により実施されるもの（事業名に（運営費交付金）と記載したものは、中期目標、中期計画等に基づき、運営費交付金の総額の範囲内で当該独立行政法人の裁量によって実施されるものである。
- ・プログラム目標等については、京都議定書目標達成計画の評価・見直しプロセスに伴う対応を行う。
- ・各プロジェクトを横断的観点からマネジメントする体制を整備し、技術の進捗状況や社会情勢等を踏まえた適切な資源配分、技術成果のレビュー、普及施策の検討、実施すべき技術開発テーマ・領域・分野等の検討等を実施する。

7. 改訂履歴

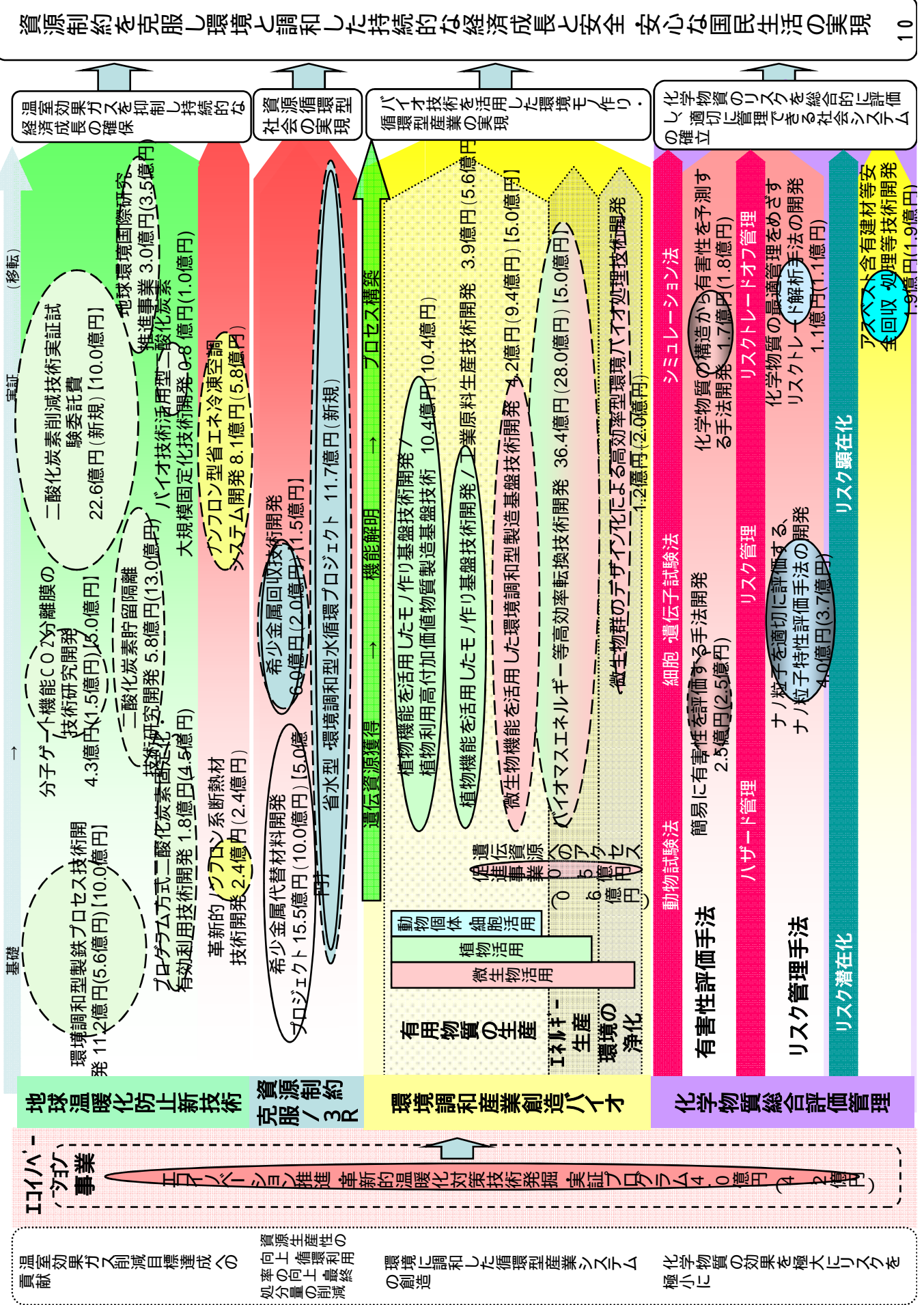
- (1) 平成12年12月28日付け、生物機能活用型循環産業システム創造プログラム基本計画、化学物質総合評価管理プログラム基本計画制定。
- (2) 平成14年2月27日付け、生物機能活用型循環産業システム創造プログラム基本計画制定。生物機能活用型循環産業システム創造プログラム基本計画（平成12・12・27工総第15号）は、廃止。平成14年2月28日付け、革新的温暖化対策技術プログラム基本計画、3Rプログラム基本計画、化学物質総合評価管理プログラム基本計画制定。化学物質総合評価管理プログラム基本計画（平成12・12・27工総第14号）は、廃止。
- (3) 平成15年3月10日付け制定。革新的温暖化対策技術プログラム基本計画（平成14・02・25産局第16号）、3Rプログラム基本計画（平成14・02・25産局第13号）、生物機能活用型循環産業システム創造プログラム基本計画（平成14・02・25産局第5号）、化学物質総合評価管理プログラム基本計画（平成14・02・25産局第7号）は、廃止。
- (4) 平成16年2月3日付け制定。革新的温暖化対策技術プログラム基本計画（平成15・03・07産局第18号）及びエネルギー環境二酸化炭素固定化・有効利用プログラム基本計画（平成15・03・07産局第19号）は、革新的温暖化対策技術プログラム基本計画に統合することとし、廃止。3Rプログラム基本計画（平成15・03・

- 07産局第6号) 生物機能活用型循環産業システム創造プログラム基本計画(平成15・03・07産局第3号) 化学物質総合評価管理プログラム基本計画(平成15・03・07産局第8号)は、廃止。
- (5)平成17年3月31日付け制定。地球温暖化防止新技術プログラム基本計画(平成16・02・03産局第13号) 3Rプログラム基本計画(平成16・02・03産局第5号) 生物機能活用型循環産業システム創造プログラム基本計画(平成16・02・03産局第15号) 化学物質総合評価管理プログラム基本計画(平成16・02・03産局第3号)は、廃止。
- (6)平成18年3月31日付け制定。地球温暖化防止新技術プログラム基本計画(平成17・03・25産局第8号) 3Rプログラム基本計画(平成17・03・29産局第1号) 生物機能活用型循環産業システム創造プログラム基本計画(平成17・03・25産局第2号) 化学物質総合評価管理プログラム基本計画(平成17・03・25産局第10号)は、廃止。
- (7)平成19年4月2日付け制定。地球温暖化防止新技術プログラム基本計画(平成18・03・31産局第9号) 3Rプログラム基本計画(平成18・03・31産局第10号) 生物機能活用型循環産業システム創造プログラム基本計画(平成18・03・31産局第3号) 化学物質総合評価管理プログラム基本計画(平成18・03・31産局第11号)は、廃止。
- (8)平成20年4月1日付け、環境安心イノベーションプログラム基本計画制定。地球温暖化防止新技術プログラム基本計画(平成19・03・19産局第6号) 3Rプログラム基本計画(平成19・03・19産局第5号) 生物機能活用型循環産業システム創造プログラム基本計画(平成19・03・16産局第2号) 化学物質総合評価管理プログラム基本計画(平成19・03・20産局第2号)は、本イノベーションプログラム基本計画に統合することとし、廃止。
- (9)平成21年4月1日付け制定。環境安心イノベーションプログラム基本計画(平成19・03・25産局第7号)は、廃止。

5. 環境安心イノベーションプログラム

[平成21年度予算額: 165億円]

各プロジェクト毎の予算額は21年度予算(20年度予算)[20年度補正予算]



(環境安心イノベーションプログラム・エネルギーイノベーションプログラム)

「微生物機能を活用した環境調和型製造基盤技術開発／
微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発」基本計画

1. 研究開発の目的・目標・内容

(1) 研究開発の目的

「環境安心イノベーションプログラム」は、資源制約を克服し、環境と調和した持続的な経済・社会の実現と、安全・安心な国民生活を実現するため、革新的な技術の開発等を通じた地球全体での温室効果ガスの排出削減、廃棄物の発生抑制（リデュース）、製品や部品の再使用（リユース）、原材料としての再利用（リサイクル）推進による循環型社会の形成、バイオテクノロジーを活用した環境に優しい製造プロセスや循環型産業システムの創造、化学物質のリスクの総合的な評価及びリスクを適切に管理する社会システムの構築を推進するものである。本プロジェクトは上記プログラムの一環として、微生物機能を活用した環境負荷の少ない高度製造基盤技術を開発する。

微生物を利用した工業原料等有用物質の製造プロセスは、一般にエネルギー消費が少なく、廃棄物も少ないといった特徴を有している。このため、近年、資源枯渇やCO₂等排出物の環境への影響が懸念されている中、微生物機能を活用した有用物質の生産（バイオプロセス）技術の開発が環境調和型循環産業システムにおける製造技術基盤として必要とされている。こうした中で政府は、平成14年12月にとりまとめられたバイオテクノロジー戦略大綱において、「バイオテクノロジー（BT）を活用して、画期的な新製品の開発と工業生産の抜本的効率化を図るとともに、生産に要する環境負荷を大幅に減少させる」ことの重要性を掲げている。

他方、微生物を利用するバイオプロセス技術については、我が国は伝統的に強みを有するものの、米国では微生物のゲノム解析等を精力的に進めており、欧州では White・biotechnology として環境負荷の少ない生物プロセスを活用する動きが進展している。このため、我が国の強みを一層強化するとともに、微生物機能を活用した有用物質の製造技術基盤の開発を強化・発展させる必要がある。

このような背景の下、本事業では、高性能宿主細胞の創製技術、微生物反応の多様化・高機能化技術やバイオマスを原料とした高効率生産技術（バイオリファイナリー技術）の開発を通し、バイオプロセスによって効率的に有用物質を生産するために必要な基盤技術を開発することを目的とする。

本技術の確立により、エネルギー消費の低減、再生可能な資源であるバイオマスの利用等が達成され環境調和型循環産業システムへの変革が期待される。

(2) 研究開発の目標

(最終目標：平成22年度末)

高性能宿主細胞創製技術については、大部分が機能既知となるまでの遺伝子の多重削除により、設計どおりに遺伝子改変の効果が引き出されるように恒常性維持機能を低減させた微生物細胞への特異的遺伝子発現制御機能付与及び補酵素供給等のユーティリティ（主要代謝系補助）機能増強によって、プロジェクト開始時における世界最高値の2倍以上の生産性を達成する。

微生物反応の多様化・高機能化技術については、複合酵素系や非水系などにおける反

応場制御技術の開発と、遺伝子改変等による酵素の高機能化技術の開発を行い、既にバイオプロセスにより生産できることが知られている物質については STY (Space/Time/Yield: 反応容器の時間あたりの生産量) 数 g/L/h 以上、バイオプロセスによって生産できることが知られていない物質についてはその 10 分の 1 以上 (医薬品等の高付加価値品については実用化に十分な STY の数倍以上) の生産を行うことにより、バイオプロセスの実用化適用範囲を拡大する。

バイオリファイナリー技術については、草本系のソフトバイオマスについて、原料濃度 10% にて 1 日で 90% の糖化を行える技術を開発する。また、糖から新たに 6 種の基幹物質を STY 10 g/L/h 以上で継続的に生産することのできる技術を開発する。これにより実用的に利用可能なバイオマスを原料として高効率で糖化し、各種化成品等生産のための基幹物質を、生成した糖から高効率で生産するバイオプロセス体系を開発・構築する。

これらの研究開発によって、環境負荷の少ない微生物機能を活用した高度製造基盤技術を開発する。

(中間目標: 平成 20 年度末)

平成 20 年度末までに、以下のことの達成を目標とする。

高性能宿主細胞創製技術については、物質生産性の向上するゲノム改変例を示す。

微生物反応の多様化・高機能化技術については、実用化に向けた手法を確立し、その実証例を示す。

バイオリファイナリー技術については、糖化効率達成に向けての見通しを示し、糖からの STY 10 g/L/h 以上で 3 種の基幹物質を継続的に生産する新規な実例を示す。

(3) 研究開発の内容

上記目標を達成するために、以下の研究開発項目について、別紙の研究開発計画に基づき研究開発を実施する。

- ① 高性能宿主細胞創製技術の開発
- ② 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発
- ③ バイオリファイナリー技術の開発

2. 研究開発の実施方式

(1) 研究開発実施体制

本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (以下、「NEDO 技術開発機構」という。) が、単独ないし複数の原則、本邦の企業、研究組合、公益法人等の研究機関 (原則、国内に研究開発拠点を有していること。ただし、国外企業の特別な研究開発能力、研究施設等の活用あるいは国際標準獲得の観点からの国外企業との連携が必要な場合はこの限りではない。) から公募によって研究開発実施者を選定後、共同研究契約等を締結する研究体を構築し、委託して実施する。

共同研究開発に参加する各研究開発グループの有する研究開発ポテンシャルを最大限に活用することにより効率的な研究開発の推進を図る観点から、研究体には NEDO 技術開発機構が委託先決定後に指名する研究開発責任者 (プロジェクトリーダー) を置き、その下に研究者を可能な限り結集して効率的な研究開発を実施する。

(2) 研究開発の運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有する NEDO 技術開発機構は、経済産業省及び研究開発責任者と密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本研究開

発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施する。具体的には、必要に応じて、NEDO 技術開発機構に設置する委員会及び技術検討会等、外部有識者の意見を運営管理に反映させる他、四半期に一回程度プロジェクトリーダー等を通じてプロジェクトの進捗について報告を受けること等を行う。

3. 研究開発の実施期間

本研究開発の期間は、平成18年度から平成22年度までの5年間とする。

4. 評価に関する事項

NEDO 技術開発機構は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義ならびに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成20年度、事後評価を平成23年度に実施する。なお、評価の時期については、当該研究開発に係る技術動向、政策動向や当該研究開発の進捗状況に応じて、前倒しする等、適宜見直すものとする。

5. その他重要事項

(1) 研究開発成果の取扱い

① 共通基盤技術の形成に資する成果の普及

得られた研究開発のうち、下記共通基盤技術に係る研究開発成果については、NEDO 技術開発機構、実施者とも普及に努めるものとする。

- a) 解析された遺伝子・タンパク質・代謝系・制御系に関するデータ
- b) 染色体レベル遺伝子操作技術
- c) 宿主細胞の創製技術
- d) 創製された高性能宿主細胞
- e) 微生物反応の多様化・高度化技術
- f) バイオリファイナリー技術

② 知的基盤整備事業又は標準化等との連携

得られた研究開発の成果については、知的基盤整備事業又は標準化等との連携を図るため、データベースへのデータの提供、標準情報（TR）制度への提案等を積極的に行う。

③ 知的財産権の帰属

委託研究開発の成果に関わる知的所有権については、「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー業務方法書」第25条の規定等に基づき、原則として、すべて委託先に帰属させることとする。

④ 成果の産業化

- a) 受託者は、本研究開発から得られる研究開発成果の産業面での着実な活用を図るため、本研究開発の終了後に実施すべき取り組みのあり方や研究開発成果の産業面での活用のビジネスモデルを立案するとともに、立案した取り組みのあり方とビジネスモデルについて、研究開発の進捗等を考慮して、本研究開発期間中に必要な見直しを行う。
- b) 受託者は、上記 a) で立案した取り組みとビジネスモデルを本研究開発終了後、実行に移し、成果の産業面での活用に努めるものとする。

(2) 基本計画の変更

NEDO 技術開発機構は、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済的状況、内外の研究開発動向、政策動向、プログラム基本計画の変更、第三者の視点からの評価結果、研究開発費の確保状況、当該研究開発の進捗状況等を総合的に勘案し、達成目標、実施期間、研究開発体制等基本計画の見直しを弾力的に行うものとする。

(3) プロジェクトの根拠法

本プロジェクトは、独立行政法人新エネルギー・産業技術開発機構法第15条第1項第1号ハに基づき実施する。

6. 基本計画の改定履歴

(1) 平成18年1月、制定

(2) 平成19年2月、対象物質範囲拡大のため、研究開発の目標の最終目標、および(別紙)研究開発計画 研究開発項目②の達成目標の改定。

(3) 平成20年2月、「5.その他重要事項」に「知的基盤整備事業又は標準化等との連携」を追加。

(4) 平成20年7月、イノベーションプログラム基本計画の制定により、「(1)研究開発の目的」の記載を改訂。

(別紙) 研究開発計画

研究開発項目①「高性能宿主細胞創製技術」

1. 研究開発の必要性

バイオプロセスの物質生産性向上を図るには、汎用的宿主細胞自体を物質生産性向上(物質生産速度あるいは収率の向上)につながるように改変する必要がある。そのために特異的遺伝子発現制御技術及び宿主のユーティリティー機能増強技術を開発する必要がある。それにより化学プロセスの代替を図るとともにバイオプロセスにより初めて生産できる高付加価値製品の拡大を図る。

2. 研究開発の具体的内容

遺伝子の大部分が機能既知となるまでの遺伝子の多重削除により、遺伝子強化・削減の効果が設計どおりに最大限に引き出されるように生物のもつ恒常性維持機能を低減させ、さらに、遺伝子発現制御機能付与及び補酵素供給等のユーティリティー機能増強によって物質生産に最適化された高性能宿主を創製する。

(1) 特異的遺伝子発現制御技術

システムバイオロジー技術の利用や遺伝子機能解明等に基づき、増殖から物質生産への切り替えや代謝フラックスの切り替え等の生産性向上に寄与する特異的遺伝子の発現制御技術を開発する。

(2) ユーティリティー機能増強技術

補酵素供給機能増強やオルガネラ機能増強など、物質合成速度向上につながる機能を付与した宿主細胞を開発する。

3. 達成目標

(最終目標：平成22年度末)

遺伝子の大部分が機能既知となるまでの遺伝子の多重削除により恒常性維持機能を低減させた宿主細胞に対しての宿主としての機能付与(代謝フラックス制御・物質生産への切り替え・補酵素供給機能増強等)により、プロジェクト開始時における世界最高値の2倍以上の生産性を達成する。

(中間目標：平成20年度末)

遺伝子多重削除を行った宿主に対する特異的遺伝子発現制御やユーティリティー機能増強により物質生産性の向上するゲノム改変例を示す。

研究開発項目②「微生物反応の多様化・高機能化技術」

1. 研究開発の必要性

バイオプロセスの従来型化学プロセスへの適用が循環型の産業システムを実現する上で極めて重要であると考えられている一方、多様な化学反応に対応しうる複合酵素系を利用した微生物反応技術ならびにそれに適した反応場（有機溶媒存在下など）に適用するための基盤技術が確立されていないため、生産できる製品の種類が限られているという問題がある。また、反応に関与する酵素の安定性・効率などに関しても実用化レベルに達していないために適用範囲が限られている。さらに、バイオプロセスには従来の化学反応のみではなしえなかった反応を行う可能性もある。このため、微生物反応の特異性を活かした多様化・高機能化を達成していくための技術開発が必要である。

2. 研究開発の具体的内容

バイオプロセスの実用化適用範囲と有用性拡大のための微生物反応の多様化・高機能化として以下の研究を行う。

（1）反応場制御技術の開発

取り扱い・制御の難しさから実用化の遅れている複合酵素系や、化成品の生産には適しているが酵素反応の難しかった非水系などの反応場について新規酵素のスクリーニング・人為的複合酵素系構成等の制御技術の開発を行い、バイオプロセスの適用範囲の拡大を行う。

（2）酵素の高機能化技術の開発

極限微生物の遺伝子や進化工学の利用等の酵素の高機能化にとって重要と考えられる技術により、酵素の基質特異性の改変や耐熱性の獲得・向上等を行い、酵素の活性、効率、安定性等における高機能化を行う。

3. 達成目標

（最終目標：平成22年度末）

既に微生物反応により生成されることが基礎研究で知られている物質については STY（Space/Time/Yield：反応容器の時間あたりの生産量）数 g/L/h 以上、知られていない物質についてはその10分の1以上（医薬品等の高付加価値品については実用化に十分な STY の数倍以上）の生産を行う。

（中間目標：平成20年度末）

バイオプロセスの多様化・高機能化において目標達成に向けての手法を確立し、その実例を示す。

研究開発項目③「バイオリファイナリー技術」

1. 研究開発の必要性

従来の化学品の生産プロセスは基本的に石油を原料とし、エネルギーを大量消費するプロセスであり、それが発生する二酸化炭素による地球環境問題を引き起こしたりエネルギー・資源の枯渇という危惧を引き起こしたりしている。これに対し、バイオリファイナリーは再生可能なバイオマス为原料とし、より省エネルギーなバイオプロセスを主とする化成品等の新しい製造システムであり、様々な環境問題の解決に大きく貢献することができると期待されている。しかし、主要な原料となる未利用バイオマスの糖への変換は容易ではなく、糖から各種生産品への変換についても、化学反応と比較して生産性が低く副生物が多いなどの問題を抱えている。このため、それらの問題を解決し、従来のプロセスによる生産に代わりうる化学品等の総合的生産体系の開発・構築が必要である。

2. 研究開発の具体的内容

実用的に利用可能なバイオマス为原料とし、それから生産される糖、さらに糖から各種化成品等に至る過程にある基幹物質を、主にバイオプロセスで生産する総合的生産体系を開発・構築するために以下の研究を行う。

(1) バイオマス糖化技術の開発

リグニン含量の少ない草本系のソフトバイオマス等のバイオプロセスによる糖化技術を確立する。

(2) 高効率糖変換技術の開発

バイオマスから生産される糖为原料に、各種化成品等を製造するための一連の基幹物質(C₃からC₆の有機酸等)を生産することが可能で、且つSTYが高い実用的な総合的バイオプロセス技術の開発を、増殖非依存型バイオプロセスの利用などにより行う。

3. 達成目標

(最終目標：平成22年度末)

バイオマス糖化技術においては、草本系のソフトバイオマスについて、原料濃度10%にて1日で90%の糖化を行える技術を開発する。また、高効率糖変換技術においては、糖から新たに6種の基幹物質をSTY10g/L/h以上で継続的に生産することのできる技術を開発する。これら技術の開発により、総合的生産体系を開発・構築する。

(中間目標：平成20年度末)

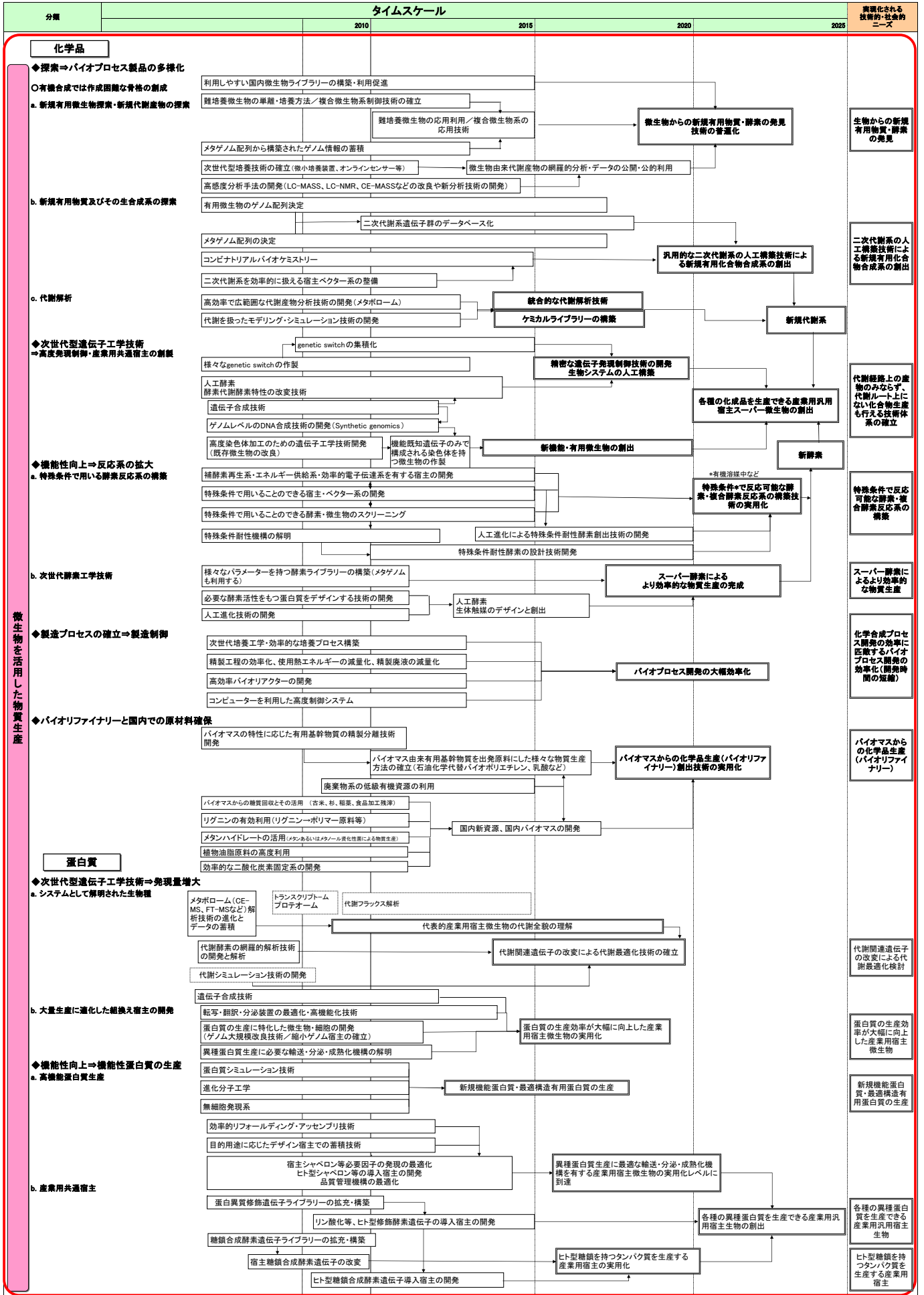
バイオマス糖化技術においては、目標達成に向けての手法を確立し、その実例を示す。また、高効率糖変換技術においては、糖から新たに3種の基幹物質をSTY10g/L/h以上で継続的に生産することのできる技術を開発する。これら技術の開発により、総合的生産体系の開発に目処をつける。

【1. 生物機能を活用した物質生産】

生物機能活用技術分野の技術ロードマップ

■ 物質生産をする為の宿主
■ 生産物質の種類
 開発技術
 技術到達目標

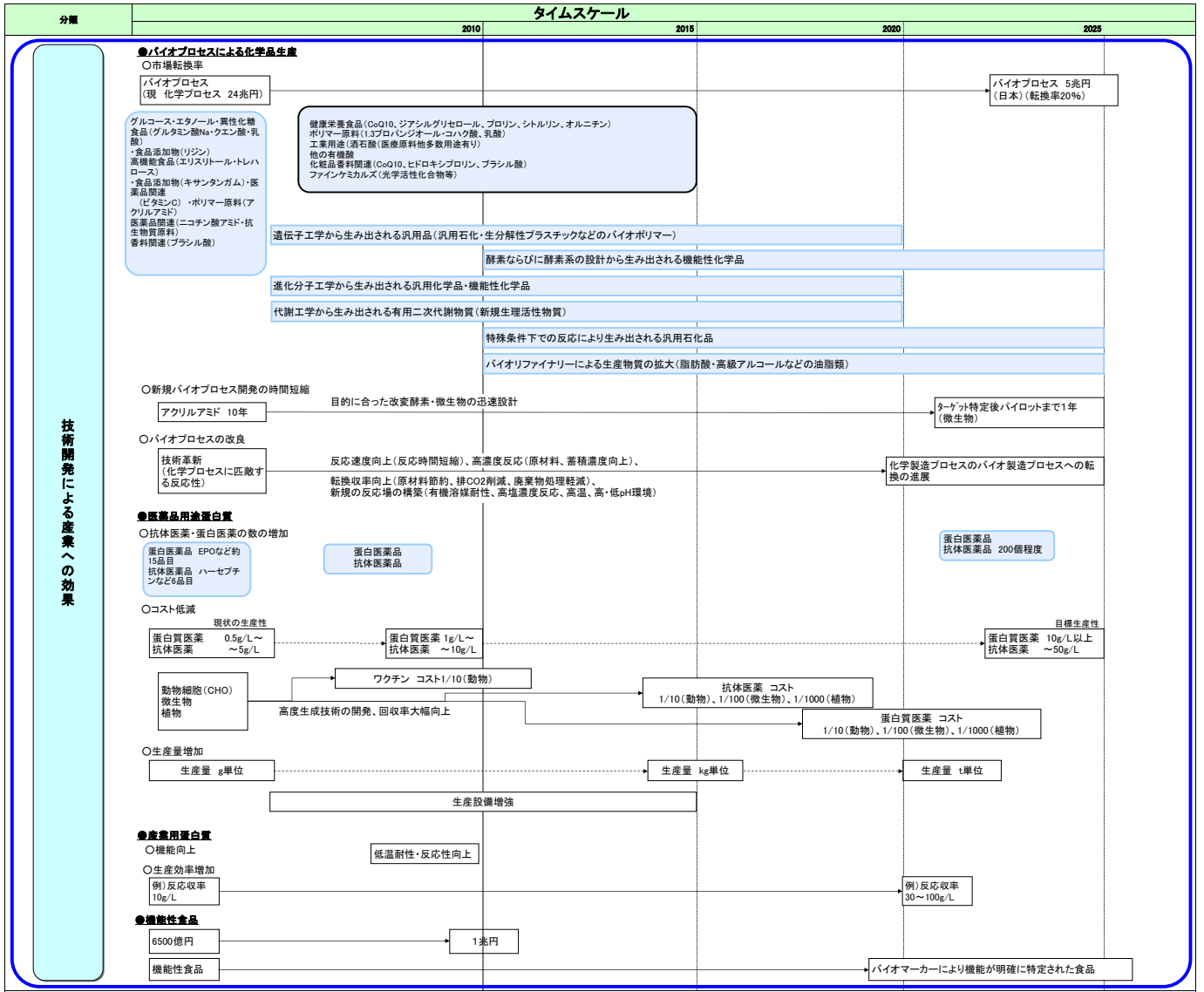
1-1) 物質生産技術



生物機能活用技術分野の技術ロードマップ

: 産業への効果
 : 製品例
 : 技術目標レベル

1-2) 産業への効果



事前評価書

	作成日	平成17年12月26日
1. 事業名称 (コード番号)	微生物機能を活用した環境調和型製造基盤技術開発/ 微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発	
2. 推進部署名	バイオテクノロジー・医療技術開発部	
3. 事業概要	<p>(1) 概要：本プロジェクトでは、高性能宿主細胞の創製技術（遺伝子多重削除によるロバスト性低下（制御機構簡素化等）等を利用した特異的遺伝子発現制御及び補酵素供給等のユーティリティ機能増強による高性能宿主の創製）、微生物反応の多様化・高機能化技術（バイオプロセスの実用的適用範囲と有用性拡大のための、人為的複合酵素系構成等による反応場制御技術の開発、及び遺伝子改変等による酵素の高機能化技術の開発）やバイオリファイナー技術の開発（実用的なバイオマスを原料として、各種化成品に至る過程にある基幹物質に変換する総合的バイオプロセス体系を開発・構築するためのバイオマス糖化技術・高効率糖変換技術の開発）により従来の工業プロセスに替わるバイオプロセスによって効率的に有用物質を生産するために必要な基盤技術を開発する。</p> <p>(2) 事業規模：平成18年度事業費 15.7億円</p> <p>(3) 事業期間：平成18年度～22年度（5年間）</p>	
4. 評価の検討状況		

(1) 事業の位置付け・必要性

「生物機能活用型循環産業システム創造プログラム」は、工業プロセスや環境関連分野へのバイオテクノロジーの利用を促進することにより、生物機能を活用した高度ものづくり社会の構築を図りつつ、廃棄物、汚染物質等の生分解・処理技術の高度化を通して、環境に調和した循環型産業システムの創造を図るものである。本プロジェクトは上記プログラムの一環として、環境負荷の少ない微生物を活用した高度製造基盤技術を開発する。

生物機能を利用したバイオプロセスは、循環型の産業システムを実現する上で極めて重要であると考えられている。平成13年9月に取りまとめられた総合科学技術会議の分野別推進戦略においても、「近年急速に蓄積されつつあるゲノム情報や目覚しい進展を見せているゲノム関連技術を活用し、生物の持つ多様な機能を高度に活用することによって、有用物質の効率的な生産技術や環境汚染物質の分解を行うなど環境対応型の産業技術を開発する」ことの重要性が指摘されている。

微生物を利用した製造プロセスは、一般にエネルギー消費が少なく、廃棄物も少ないといった特徴を有している。このため、近年、資源枯渇やCO₂等排出物の環境への影響が懸念されている中、微生物機能を活用した有用物質の生産（バイオプロセス）技術の開発が循環・環境対応型システムにおける製造技術基盤として必要とされている。

他方、微生物を利用するバイオプロセス技術については、我が国は伝統的に強みを有するものの、米国では微生物のゲノム解析等を精力的に進めており、欧州では White biotechnology として環境負荷の少ない生物プロセスを活用する動きが見られる。このため、我が国の優位性を確保し、環境負荷の少ない微生物を活用した製造技術基盤を確立する必要がある。

グリーンバイオ技術戦略マップ「生物機能を利用した物質生産」の「バイオプロセスにより生産できる物質の更なる多様化」や「バイオプロセス生産効率の更なる向上」に重要技術として位置付けられている。

(2) 研究開発目標の妥当性

(目標)

研究開発課題として3項目を掲げ、物質生産性の向上を図り、化学プロセスに替わるバイオプロセス実用化の目処をつける。それぞれの目標は以下の通り。

①高性能宿主細胞創製技術の開発

遺伝子の多重削除・機能付与等による宿主機能の大幅向上を図り、プロジェクト開始時に対して生産性が2倍以上となる宿主を創製する。

②微生物反応の多様化・高機能化技術の開発

既にバイオプロセスにより生産できることが知られている物質については数g/L/h以上、バイオプロセスによって生産できることが知られていない物質についてはその10分の1以上の生産を行う。

③バイオリファイナー技術の開発

バイオマスからの高効率糖化技術を開発するとともに、糖から工業原料としての一連の基幹化合物を10g/L/h以上で継続的に生産することのできる技術を開発する。

(妥当性)

目標設定は物質生産のための基盤技術を構築する本事業においては十分と考えられるが、今後のNEDO POST3などで意見を収集し、妥当性について最終判断を行う。

<p>(3) 研究開発マネジメント</p> <p>公募を行い最適な研究体制を構築する。各研究開発課題は密接に連携を取る。プロジェクト開始後3年目に中間評価を予定しており、その評価結果を踏まえて事業全体について見直しを行うことを想定している。</p>
<p>(4) 研究開発成果</p> <p>本事業の直接の成果として、高性能宿主細胞、新規バイオプロセス、バイオリファイナリーの体系が構築される。高性能宿主細胞についてはそこに生産系の遺伝子を導入することにより各種の物質生産に対応が可能である。新規バイオプロセスについては、同様の開発手法を他のバイオプロセスの開発に応用可能であり、バイオリファイナリーについては生成される基幹物質から多くの化成品を生産することが可能となる。このように波及効果は大きく、その効果は要するコストに相応するものであると考えられる。</p>
<p>(5) 実用化・事業化の見通し</p> <p>本事業の目標は基盤技術の開発であるが、現在の化学工業プロセスに替わるバイオプロセスの開発を目指すものであり、本事業の研究開発課題として掲げる高性能宿主細胞創製技術の開発、微生物反応の多様化・高機能化技術の開発、バイオリファイナリー技術の開発の3課題それぞれにおいてその開発成果が実用レベルの生産例につながりうる技術であるとともにそれを目標とした研究開発を行うことから、本開発技術の実用化・事業化の可能性は高い。</p>
<p>(6) その他特記事項</p>
<p>5. 総合評価</p> <p>本事業はNEDOで実施する事業として適切であると判断する。</p>

「微生物機能を活用した環境調和型製造基盤技術開発／微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発基本計画（案）」

に対するパブリックコメント募集の結果について

平成18年2月28日
NEDO技術開発機構
バイオテクノロジ－・医療技術開発部

NEDO POST 3において標記基本計画（案）に対するパブリックコメントの募集を行いました結果をご報告いたします。
お寄せいただきましたご意見を検討し、別添の基本計画に反映させていただきました。
みなさまからのご協力を頂き、ありがとうございます。

1. パブリックコメント募集期間
平成17年12月28日～平成18年1月11日
2. パブリックコメント投稿数＜有効のもの＞
計1件
3. パブリックコメントの内容とそれに対する考え方

ご意見の概要	ご意見に対する考え方	基本計画への反映
<p>1. 研究開発の目的 (3) 研究開発の内容</p> <p>ソフトバイオマスの糖化技術については、旧通産省あるいは林野庁関連のプロジェクトでも同様の技術開発計画が行われており、糖化プロセスについてはいくつかの基盤的な技術開発がなされているが、原材料バイオマスの集荷コストが問題であるというのが、日本固有の問題であるとの認識が一般的である。その部分、つまり社会システムの部分の検討を行い、過去の研究開発の二の舞を踏まないようすべきである。</p>	<p>国内で実現可能性のある資源及び国外資源のソフトバイオマスをも対象として効率において革新的な技術開発を進める。</p>	<p>特になし。</p>

以上

【特許(公開)】

番号	出願者	出願番号	国内外国 PCT	出願日	状態	名 称	発明者
1	協和発酵キリン (株)	特願2008-068793	国内	2008/3/18	放棄して PCT/JP2009/055267に移行 公開WO2009/116566	工業的に有用な微生物	榊田貴美枝他
2	協和発酵キリン (株)	PCT/JP2009/055267	PCT	2009/3/18	1のPCT出願 現在放棄して各国移行(3、 4、5)	工業的に有用な微生物	榊田貴美枝他
3	協和発酵キリン (株)	特願2010-503901	国内	2009/3/18	2の日本への移行	工業的に有用な微生物	榊田貴美枝他
4	協和発酵キリン (株)	EP 09722714.4	外国	2009/3/18	2のEPへの移行	工業的に有用な微生物	榊田貴美枝他
5	協和発酵キリン (株)	US 12/933022	外国	2009/3/18	2のUSへの移行	工業的に有用な微生物	榊田貴美枝他
6	協和発酵キリン (株)	PCT/JP2008/056760	PCT	2008/4/4	放棄して7の日本へ移行	有用物質の製造法	原清敬他
7	協和発酵キリン (株)	特願2009-509319	国内	2008/4/4	6の日本への移行	有用物質の製造法	原清敬他
8	花王(株)/信州 大	特願2007-197754	国内	2007/7/30	審査請求済み	細胞呼吸活性の測定方法及びそ のキット、タンパク質生産性向上株 のスクリーニング方法及びその	児玉武子 他
9	花王(株)	特願2007-203046	国内	2007/8/3	審査請求済み	組換え微生物	影山泰 他
10	花王(株)	特願2007-204413	国内	2007/8/6	審査請求済み	微生物株及び目的物質の製造方 法	影山泰 他
11	花王(株)	特願2007-204595	国内	2007/8/6	審査請求済み	微生物及びこれを用いたタンパク 質又ポリペプチドの製造方法	眞鍋憲二 他
12	花王(株)/信州 大	特願2007-226679	国内	2007/8/31	審査請求済み	細菌の溶菌抑制方法及び溶菌が 抑制された細菌	児玉武子 他
13	花王(株)/信州 大	特願2007-226686	国内	2007/8/31	審査請求済み	タンパク質生産方法	児玉武子 他
14	花王(株)/信州 大/奈良先端大	特願2007-245978	国内	2007/9/21	審査請求済み	新規枯草菌変異株及び長寿命化 した枯草菌変異株の作製方法	児玉武子 他
15	花王(株)	特願2008-013043	国内	2008/1/23	審査請求済み	新規枯草菌変異株及びタンパク質 の製造方法	劉生浩 他
16	花王(株)/奈良 先端大	特願2009-044193	国内	2009/2/26	公開	宿主DNAの欠失対象領域の欠失 方法及び選択マーカーカセット	森本拓也 他
17	花王(株)/奈良 先端大	PCT/JP2009/056409	PCT	2009/2/26	公開	宿主DNAの欠失対象領域の欠失 方法及び選択マーカーカセット	森本拓也 他
18	花王(株)	特願2008-85292	国内	2008/3/28	審査請求済み	改変微生物	掛下大規 他
19	花王(株)	PCT/JP2008/056842	PCT	2008/3/28	審査請求済み	改変微生物	掛下大規 他
20	花王(株)	特願2009-026676	国内	2009/2/6	公開	枯草菌変異株	影山泰 他
21	花王(株)	特願2009-027260	国内	2009/2/9	公開	組換え微生物	劉生浩 他
22	花王(株)	特願2009-34413	国内	2009/2/17	公開	α -アミラーゼの生産方法	眞鍋憲二 他
23	花王(株)	特願2009-041123	国内	2009/2/24	公開	タンパク質又はポリペプチドの製造 方法	眞鍋憲二 他
24	旭硝子株式会社	特願2008-256354	国内	2008/10/1	公開	宿主、形質転換体およびその製造 方法、ならびにO-グリコシド型糖 鎖含有異種蛋白質の製造方法	竹川薫他
25	旭硝子株式会社	特願2009-119280	国内	2009/5/15	公開	宿主、形質転換体およびその製造 方法、ならびにO-グリコシド型糖 鎖含有異種蛋白質の製造方法	竹川薫他
26	旭硝子株式会社	特願2009-015472	国内	2009/1/27	公開	シソサッカロミセス・ポンペの形質 転換方法および形質転換体、なら びに異種蛋白質の製造方法	イディリスアリ ムジャン他
27	旭硝子株式会社	特願2009-192271	国内	2009/8/21	公開	分裂酵母を用いた乳酸製造法	原太志他
28	旭硝子株式会社	特願2009-287873	国内	2009/12/18	公開	形質転換体の培養方法および異 種タンパク質の生産方法	竹川薫他
29	旭硝子株式会社	PCT/JP2010/050984	PCT	2010/1/26	公開	シソサッカロミセス・ポンペの形質 転換方法および形質転換体、なら びに異種蛋白質の製造方法	イディリスアリ ムジャン他

番号	出願者	出願番号	国内外国 PCT	出願日	状態	名 称	発明者
30	旭硝子株式会社	PCT/JP2009/067081	PCT	2009/9/30	公開	宿主、形質転換体およびその製造方法、ならびにO-グリコシド型糖鎖含有異種蛋白質の製造方法	竹川薫他
31	旭硝子株式会社	PCT/JP2010/063888	PCT	2010/8/17	公開	分裂酵母を用いた乳酸製造法	原太志他
32	ダイセル化学工業(株)	P2009-004905	国内	2009/1/13	出願	新規発現ベクター	松村他
33	メルシヤン株式会社	特願2008-064808号	国内	2008/3/13	公開	ビタミンD類の水酸化活性をもつポリペプチドの改良	藤井良和 他
34	日本電気株式会社	特願2008-006426	国内	2008/1/16	出願	エネルギー関数最適化システム及び方法、並びにプログラムと、このエネルギー関数最適化方法によって最適化されたエネルギー関数を利用する分子シミュレーションシステム及び方法、並びにプログラム	福西広晃、寺本礼仁、島田次郎
35	日本電気株式会社	特願2008-080452	国内	2008/3/26	出願	分子シミュレーション装置、方法、及び、プログラム	島田次郎、福西広晃、津田健一郎
36	日本電気株式会社	PCT/JP2008/71137	PCT	2008/11/20	出願	エネルギー関数最適化システム及び方法、並びにプログラムと、このエネルギー関数最適化方法によって最適化されたエネルギー関数を利用する分子シミュレーションシステム及び方法、並びにプログラム	福西広晃、島田次郎
37	日本電気株式会社	特願2009-024833	国内	2009/2/5	出願	溶媒効果計算装置、計算方法及びプログラム	福西広晃、島田次郎
38	日本電気株式会社	PCT/JP2009/55889	PCT	2009/2/25	出願	分子シミュレーション装置、方法、及び、プログラム	島田次郎、福西広晃、津田健一郎
39	日本電気株式会社	特願2010-018413	国内	2010/1/29	出願	タンパク質設計装置、タンパク質設計方法、ならびにプログラム	福西広晃、島田次郎
40	日本電気株式会社	特願2010-230117	国内	2010/10/12	出願	タンパク質分子のアミノ酸置換部位選択装置、置換アミノ酸選択装置、アミノ酸置換部位選択方法、置換アミノ酸オキシダーゼ、およびL-アミノ酸、2-オキシ酸、又は環状イミンの製造方法	島田次郎、福西広晃、上條憲一
41	(株)カネカ	特願2006-225647	国内	2006/6/22	公開	新規グルコース脱水素酵素	金丸博幸他
42	(株)カネカ	特願2007-249118	国内	2007/9/26	取下	新規グルコース脱水素酵素	川野茂他
43	(株)カネカ	特願2008-37811	国内	2008/2/19	取下	新規グルコース脱水素酵素	川野茂他
44	(株)カネカ	PCT/JP2008/067154	PCT	2008/9/24	公開	新規グルコース脱水素酵素	川野茂他
45	(株)カネカ	特願2008-313326	国内	2008/12/9	取下	新規なアミノ酸脱水素酵素、およびL-アミノ酸、2-オキシ酸、又はD-アミノ酸の製造方法	金丸博幸他
46	(株)カネカ	PCT/JP2009/006679	PCT	2009/12/8	公開	新規なアミノ酸脱水素酵素、およびL-アミノ酸、2-オキシ酸、又はD-アミノ酸の製造方法	金丸博幸他
47	(株)カネカ	特願2010-10308	国内	2010/1/20	取下	安定性が向上したNADHオキシダーゼ変異体とその利用法	吉田慎一他
48	(株)カネカ	PCT/JP2011/050824	PCT	2010/1/19	出願	安定性が向上したNADHオキシダーゼ変異体とその利用法	吉田慎一他
49	明治製菓(株)	特願2009-532254	PCT	2008/9/12	公開	非天然型抗生物質の製造方法	隅田奈緒美他
50	明治製菓(株)	特願2009-104555	国内	2009/4/22	公開	ケトレダクターゼ変異体	間塚風介他
51	(独)製品評価技術基盤機構	特願2007-143039	国内	2007/6/18	出願	生体試料からのタンパク質の分離もしくは精製方法、およびその利用	佐々木和美他
52	(財)地球環境産業技術研究機構	特願2006-124440 特開2007-295809	国内	2006/4/27	公開	コリネ型細菌形質転換体による高効率な有機化合物の製造方法	沖野祥平、乾将行、湯川英
53	(財)地球環境産業技術研究機構	特願2007-018557 特開2008-182936	国内	2007/1/29	公開	cis-アコニット酸炭酸酵素及びそれをコードする遺伝子	湯川英明、乾将行、城島透
54	(財)地球環境産業技術研究機構、(株)アストム	特願2007-210311 特開2009-39695	国内	2007/8/10	公開	酸とアルカリの製造方法	湯川英明、乾将行、有富俊男、岸野剛之、河島稔、山本
55	(財)地球環境産業技術研究機構	特願2007-222439 特開2009-50236	国内	2007/8/29	公開	L-アラビノース利用機能を有するコリネ型細菌形質転換体	湯川英明、乾将行、沖野祥平、川口秀夫
56	(財)地球環境産業技術研究機構	特願2007-330383 特開2009-148222	国内	2007/12/21	公開	L-グルタミン酸の製造方法	清水 浩、永久圭介、福田洋久、平沢 敬、和地正明
57	(財)地球環境産業技術研究機構	PCT/JP2008/065355	PCT	2008/8/28 (国際出願)	国際公開 各国移行済	イソプロパノール生産能を有する形質転換体	湯川英明、乾将行
58	(財)地球環境産業技術研究機構	特願2009-530164	国内	2008/8/28 (国際出願)	日本再公表 (2010.12.2)	イソプロパノール生産能を有する形質転換体	湯川英明、乾将行
59	(財)地球環境産業技術研究機構	United States Patent Application No. 12/733366	外国	2008/8/28 (国際出願)	US公開 (2010.8.12)	Transformant capable of producing isopropanol	Hideaki Yukawa, Masayuki Inui

番号	出願者	出願番号	国内外国PCT	出願日	状態	名称	発明者
60	(財)地球環境産業技術研究機構	European Patent Application No. 08828643.0	外国	2008/8/28 (国際出願)	EP公開 (2010.5.5)	Transformant capable of producing isopropanol	Hideaki Yukawa, Masayuki Inui
61	(財)地球環境産業技術研究機構	Brazilian Patent Application No. PI0816161-5	外国	2008/8/28 (国際出願)	ブラジル出願中	Transformant capable of producing isopropanol	Hideaki Yukawa, Masayuki Inui
62	(財)地球環境産業技術研究機構	PCT/JP2009/057547	PCT	2009/4/15 (国際出願日)	国際公開 各国移行済	イソプロパノール生産能を有するコリネ型細菌の形質転換体	湯川英明、乾将行
63	(財)地球環境産業技術研究機構	特願2010-509150	国内	2009/4/15 (国際出願日)	日本出願中	イソプロパノール生産能を有するコリネ型細菌の形質転換体	湯川英明、乾将行
64	(財)地球環境産業技術研究機構	United States Patent Application No. 12/988882	外国	2009/4/15 (国際出願日)	US出願中	Genetically modified coryneform bacteria capable of producing isopropanol	Hideaki Yukawa, Masayuki Inui
65	(財)地球環境産業技術研究機構	European Patent Application No. 09735982.2	外国	2009/4/15 (国際出願日)	EP公開 (2011.1.5)	Genetically modified coryneform bacteria capable of producing isopropanol	Hideaki Yukawa, Masayuki Inui
66	(財)地球環境産業技術研究機構	Chinese Patent Application No. 200980114644.0	外国	2009/4/15 (国際出願日)	中国出願中	Genetically modified coryneform bacteria capable of producing isopropanol	Hideaki Yukawa, Masayuki Inui
67	(財)地球環境産業技術研究機構	South Korean Patent Application No. 10-2010-7026007	外国	2009/4/15 (国際出願日)	韓国出願中	Genetically modified coryneform bacteria capable of producing isopropanol	Hideaki Yukawa, Masayuki Inui
68	(財)地球環境産業技術研究機構	PCT/JP2009/060637	PCT	2009/6/10 (国際出願日)	国際公開 各国移行済	D-キシロース利用機能が向上したコリネ型細菌形質転換体	湯川英明、乾将行
69	(財)地球環境産業技術研究機構	特願2010-517869	国内	2009/6/10 (国際出願日)	日本出願中	D-キシロース利用機能が向上したコリネ型細菌形質転換体	湯川英明、乾将行
70	(財)地球環境産業技術研究機構	United States Patent No. 12/995774	外国	2009/6/10 (国際出願日)	US出願中	Coryneform bacterium transformant having improved D-xylose-utilizing function	Yukawa, Hideaki; Inui, Masayuki;
71	(財)地球環境産業技術研究機構	European Patent Application No. 09766570.7	外国	2009/6/10 (国際出願日)	EP公開 (2011.2.23)	Coryneform bacterium transformant having improved D-xylose-utilizing function	Yukawa, Hideaki; Inui, Masayuki;
72	(財)地球環境産業技術研究機構	Chinese Patent No.20090123139.2	外国	2009/6/10 (国際出願日)	中国出願中	Coryneform bacterium transformant having improved D-xylose-utilizing function	Yukawa, Hideaki; Inui, Masayuki;
73	(財)地球環境産業技術研究機構	South Korean Patent No.2011-7001106	外国	2009/6/10 (国際出願日)	韓国出願中	Coryneform bacterium transformant having improved D-xylose-utilizing function	Yukawa, Hideaki; Inui, Masayuki;
74	(財)地球環境産業技術研究機構	Indian Patent No.4661/KOLNP/2010	外国	2009/6/10 (国際出願日)	インド出願中	Coryneform bacterium transformant having improved D-xylose-utilizing function	Yukawa, Hideaki; Inui, Masayuki;
75	(財)地球環境産業技術研究機構	Indonesian Patent No.W00201100212	外国	2009/6/10 (国際出願日)	インドネシア出願中	Coryneform bacterium transformant having improved D-xylose-utilizing function	Yukawa, Hideaki; Inui, Masayuki;
76	(財)地球環境産業技術研究機構	PCT/JP2010/055504	PCT	2010/3/29 (国際出願日)	国際公開	コリネ型細菌形質転換体及びそれを用いるイソプロパノールの製造方法	湯川英明、乾将行
77	東レ(株)	特願2006-261125	国内	2006/9/26	取下	連続発酵によるD-乳酸の製造方法	耳塚孝 他
78	東レ(株)	特願2006-315140	国内	2006/11/22	公開	連続培養方法及び連続培養装置	大竹要生 他
79	東レ(株)	特願2006-351104	国内	2006/12/27	公開	メンブレンバイリアクターの運転方法	伊藤世人 他
80	東レ(株)	特願2006-351105	国内	2006/12/27	公開	メンブレンバイリアクターの運転方法	伊藤世人 他
81	東レ(株)	特願2007-040518	国内	2007/2/21	公開	連続発酵による化学品の製造方法および連続発酵装置	澤井秀樹 他
82	東レ(株)	特願2007-040519	国内	2007/2/21	公開	連続発酵装置	澤井秀樹 他
83	東レ(株)	特願2007-042045	国内	2007/2/22	公開	培養液濾過用平膜エレメント	志水衣理 他
84	東レ(株)	特願2007-045825	国内	2007/2/26	取下	連続発酵装置	澤井秀樹 他
85	東レ(株)	特願2007-045106	国内	2007/2/26	公開	平膜エレメント及び生物反応槽	大竹要生 他
86	東レ(株)	特願2007-048664	国内	2007/2/28	公開	平膜エレメントおよび発酵槽	伊藤世人 他
87	東レ(株)	特願2007-081744	国内	2007/3/27	公開	連続発酵による化学品の製造方法	澤井秀樹 他
88	東レ(株)	特願2007-088063	国内	2007/3/29	公開	連続発酵による化学品の製造方法	澤井秀樹 他
89	東レ(株)	特願2007-172082	国内	2007/6/29	取下	乳酸の分離方法	伊藤正照 他
90	東レ(株)	特願2007-198567	国内	2007/7/31	取下	乳酸の製造方法および分離装置	峯岸進一 他
91	東レ(株)	特願2007-200439	国内	2007/8/1	公開	乳酸の製造方法および製造装置	峯岸進一 他
92	東レ(株)	特願2007-200458	国内	2007/8/1	公開	連続発酵によるD-乳酸の製造方法	耳塚孝 他
93	東レ(株)	特願2007-201598	国内	2007/8/2	公開	メンブレンバイリアクターを用いた有価物の製造方法	伊藤世人 他
94	東レ(株)	特願2007-217976	国内	2007/8/24	公開	連続発酵による化学品の製造方法	峯岸進一 他
95	東レ(株)	特願2007-253486	国内	2007/9/28	公開	有価物連続発酵生産用メンブレンバイリアクター	伊藤世人 他
96	東レ(株)	特願2007-300171	国内	2007/11/20	取下	乳酸の精製方法	伊藤正照 他
97	東レ(株)	特願2007-329034	国内	2007/12/20	取下	乳酸の精製方法	伊藤正照 他
98	東レ(株)	特願2008-012374	国内	2008/1/23	公開	乳酸の製造方法	澤井秀樹 他
99	東レ(株)	特願2008-017918	国内	2008/1/29	取下	乳酸の精製方法	耳塚孝 他
100	東レ(株)	特願2008-023917	国内	2008/2/4	取下	高次倍数体酵母を用いた連続培養による有機酸の製造方法	守田健 他
101	東レ(株)	特願2008-034462	国内	2008/2/15	取下	栄養非要求性酵母による有機酸の製造方法	佐々木七生 他
102	東レ(株)	特願2008-126782	国内	2008/5/18	取下	乳酸の製造方法	羅景洙 他
103	東レ(株)	特願2008-153846	国内	2008/6/12	公開	連続培養装置および化学品の製造方法	澤井秀樹 他
104	東レ(株)	PCT/JP/2008/061105	PCT	2008/6/18	公開	乳酸の製造方法	伊藤正照 他
105	東レ(株)	特願2008-190092	国内	2008/7/23	公開	連続培養による化学品の製造方法	耳塚孝 他

特許(4/4)

番号	出願者	出願番号	国内外国 PCT	出願日	状態	名 称	発明者
106	東レ(株)	特願2008-190093	国内	2008/7/23	公開	連続発酵による化学品の製造方法	澤井秀樹 他
107	東レ(株)	特願2008-194618	国内	2008/7/29	公開	連続発酵による化学品の製造方法	千智勲 他
108	東レ(株)	特願2008-195751	国内	2008/7/30	公開	D-乳酸の製造方法	羅景洙 他
109	東レ(株)	特願2008-197767	国内	2008/7/31	公開	膜分離モジュール	平松紳吾 他
110	東レ(株)	特願2008-211685	国内	2008/8/20	公開	連続発酵による化学品の製造方法	羅景洙 他
111	東レ(株)	特願2008-224366	国内	2008/9/2	公開	乳酸の製造方法	伊藤正照 他
112	東レ(株)	特願2008-252723	国内	2008/9/30	取下	化学品の製造方法および連続培養装置	澤井健司 他
113	東レ(株)	特願2008-252724	国内	2008/9/30	取下	化学品の製造方法および連続培養装置	石井健太郎 他
114	東レ(株)	特願2008-282820	国内	2008/11/4	公開	乳酸の製造方法	伊藤正照 他
115	東レ(株)	特願2008-307342	国内	2008/12/2	公開	乳酸の製造方法	伊藤正照 他
116	東レ(株)	PCT/JP/2008/072129	PCT	2008/12/5	公開	乳酸脱水素酵素発現カセット、形質転換酵母および乳酸の製造方法	澤井健司 他
117	東レ(株)	特願2008-333014	国内	2008/12/26	取下	乳酸及びポリ乳酸の製造方法	澤井健司 他
118	東レ(株)	特願2008-333015	国内	2008/12/26	取下	乳酸及びポリ乳酸	澤井健司 他
119	東レ(株)	PCT/JP2009/051750	PCT	2009/2/3	公開	連続発酵による乳酸の製造方法	佐々木七生
120	東レ(株)	特願2009-134213	国内	2009/6/3	取下	D-乳酸脱水素酵素活性を有するポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびD-乳酸の製造方法	澤井健司 他
121	東レ(株)	特願2009-184167	国内	2009/8/7	公開	連続培養による化学品の製造方法および製造装置	守田健 他
122	東レ(株)	PCT/JP2009/066119	PCT	2009/9/16	公開	化学品の製造方法および連続培養装置	耳塚孝 他
123	東レ(株)	PCT/JP2009/071572	PCT	2009/12/25	公開	乳酸およびポリ乳酸の製造方法	澤井健司 他

その他、非公開のもの29件、計152件

【論文】

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
1	森英郎	協和発酵工業	IT駆動型微生物学の創製—予測可能な細胞工場システムは構築可能か	生物工学会誌 84巻7号 267-270	無	2006年
2	溝口寛、森英郎、藤尾達郎	協和発酵工業	E. coli Minimum Genome Factory	Biotechnol. Appl. Biochem. 46(Pt 3):157-	有	2007年
3	日比慎、行友弘美、伊東幹人、森英郎	協和発酵工業	Improvement of NADPH-dependent bioconversion by transcriptome-based molecular breeding	Appl. Environ. Microbiol. 73(23):7657-7663	有	2007年
4	溝口寛、梶田貴美枝、森英郎	協和発酵工業	A simple method for multiple modification of the Escherichia coli K-12 chromosome	Biosci. Biotechnol. Biochem. 71(12):2905-2911	有	2007年
5	溝口寛 ¹ 、澤野由枝 ¹ 、加藤潤一 ² 、森英郎 ¹	協和発酵工業 ¹ 、首都大学東京 ²	Superpositioning of deletions promotes growth of Escherichia coli with a reduced genome	DNA Res. 15(5):277-284	有	2008年
6	河野広朗、広川安孝、森英郎	協和発酵工業	Long-term survival of Escherichia coli lacking the HipBA toxin-antitoxin system during prolonged cultivation	Biosci. Biotechnol. Biochem. 73(1):117-123	有	2009年
7	原清敬 ¹ 、下立夏香 ¹ 、伊東幹人 ¹ 、馬場知哉 ² 、森浩禎 ² 、森英郎 ¹	協和発酵工業 ¹ 、奈良先端大学 ²	Systematic genome-wide scanning for genes involved in ATP generation	Metab. Eng. 11(1):1-7	有	2009年
8	原清敬 ¹ 、下立夏香 ¹ 、広川安孝 ¹ 、伊東幹人 ¹ 、馬場知哉 ² 、森浩禎 ² 、森英郎 ¹	協和発酵キリン ¹ 、奈良先端大学 ²	Glutathione production by efficient ATP-regenerating Escherichia coli mutants.	FEMS Microbiol. Lett. 297(2):217-224	有	2009年
9	塩見大輔 ¹ 、森英郎 ² 、仁木宏典 ¹	国立遺伝学研究所 ¹ 、協和発酵キリン ²	Systematic genome-wide scanning for genes involved in ATP generation	Commun. Integr. Biol. 2(3):219-220	有	2009年
10	K. Ara et al.	花王・生科研	Bacillus Minimum Genome Factory - effective utilization of microbial genome information-	Biotech. Appl. Biochem., 46, 169	有	2007
11	T. Kodama et al.	信州大大学院	Effect of the <i>Bacillus subtilis</i> <i>spo0A</i> Mutation on Cell Wall Lytic Enzymes and Extracellular Proteases, and Prevention of Cell Lysis	J. Biosci. Bioeng.,103, 13	有	2007
12	S. Liu et al.	花王・生科研	The accurate replacement of long genome region more than several hundred kb in <i>Bacillus subtilis</i>	Genes Genet. Syst., 82, 9.	有	2007
13	荒勝俊	花王・生科研	動脈産業における高機能性宿主(RGF)の創生研究	生物工学会誌, 85, 174	無	2007
14	T. Kodama et al.	信州大大学院	<i>Bacillus subtilis</i> AprX involved in degradation a heterologous protein during the late stationary growth phase	J. Biosci. Bioeng.,104, 135	有	2007
15	T. Morimoto et al.	奈良先端科学技術大学院大学	Enhanced recombinant protein productivity by genome reduction in <i>Bacillus subtilis</i>	DNA Res., 4, 1-9	有	2008

論文(2/31)

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
16	S. Liu et al.	花王・生科研	Introduction of marker-free deletion in <i>Bacillus subtilis</i> using the AraR repressor and the <i>ara</i> promoter	Microbiology, 154, 2562-2570	有	2008
17	T. Morimoto et al.	奈良先端科学技術大学院大学	A new simple method to introduce marker-free deletion in the <i>Bacillus subtilis</i> genome	Genes Genet. Syst., 84, 315-318	有	2009
18	Rukmana et al.	奈良先端科学技術大学院大学	Assessment of transcriptional responses of <i>Bacillus subtilis</i> cells to the antibiotic enduracidin, which interferes with cell wall synthesis, using a high-density tiling	Genes Genet Syst.84, 253-67.	有	2009
19	H. Kakeshtia et al.	筑波大大学院	Enhanced extracellular production of heterologous proteins in <i>Bacillus subtilis</i> by deleting the C-terminal region of the SecA secretory machinery.	Mol Biotechnol, 46, 250-7.	有	2010
20	H. Kakeshtia et al.	筑波大大学院	Propeptide of <i>Bacillus subtilis</i> amylase enhances extracellular production of human interferon- γ in <i>Bacillus subtilis</i>	Appl Microbiol Biotechnol, 89, 1509-17	有	2010
21	Sudiarta et al.	信州大大学院	<i>Bacillus subtilis</i> CwlQ (previous YjbJ) is a bifunctional enzyme exhibiting muramidase and soluble-lytic transglycosylase activities.	Biochem. Biophys. Res. Commun. 398:606-612.	有	2010
22	Sudiarta et al.	信州大大学院	<i>Bacillus subtilis</i> CwlP of the SP- β prophage has two novel peptidoglycan hydrolase domains, muramidase and cross-linkage digesting DD-endopeptidase.	J. Biol. Chem. 285:41232-41243.	有	2010
23	H. Kakeshtia et al.	筑波大大学院	Secretion of biologically active human interferon- β by <i>Bacillus subtilis</i> .	Biotechnology Letters (投稿中)	有	2011
24	K. Manabe et al.	花王・生科研	Synergetic Effect in Genome Reduction Enhance Recombinant Enzyme Production in <i>Bacillus subtilis</i> strain, MGB874	Appl. Environ. Microbiol. (投稿中)	有	2011
25	T. Kodama et al.	信州大大学院	<i>Bacillus subtilis</i> Novel Small Protein Involved in Spore Germination and Coat Assembly	Biosci. Biotechnol. Biochem. (投稿中)	有	2011
26	K. Kobayashi et al.	信州大大学院	Novel polysaccharide deacetylase C(PdaC) deacetylates N-acetylmuramic acid from <i>B. subtilis</i> peptidoglycan and N-acetylglucosamine from chitin oligomers in vitro	J. Biol. Chem. (投稿中)	有	2011
27	H. Takahashi	奈良先端科学技術大学院大学	AMDORAP: Non-targeted metabolic profiling based on high-resolution LC-MS	BMC Bioinformatics (投稿中)	有	2011
28	K. Nakamura	筑波大大学院	Mismatch-tolerant mapping discloses the sequence-specific error profile of Illumina sequencers.	Nucleic Acids Research (投稿中)	有	2011
29	H. Kakeshtia et al.	筑波大大学院	Identificaton and functional analysis of novel small RNA under sporulation control in <i>Bacillus subtilis</i>	Archives of Microbiology (投稿中)	有	2011

論文(3/31)

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
30	H. Kakeshtia et al.	筑波大大学院	Secretion of biological active human interferon- α by <i>Bacillus subtilis</i> MGB874	BMC Biotechnology (投稿中)	有	2011
31	荒勝俊 他	花王・生科研	第三章:枯草菌のミニマムゲノムファクトリー	微生物機能を活用した革新的生産技術の最前	無	2007
32	Y. Kageyama et al.	花王・生科研	Genome reduction in <i>Bacillus subtilis</i> and enhanced productivities of recombinant proteins	Bacterial DNA, DNA polymerase and DNA helicases	有	2009
33	T. Morimoto et al.	奈良先端科学技術大学院大学	Simple method to introduce marker-free deletions in the <i>Bacillus subtilis</i> genome	Methods and Protocols	有	2010
34	Iwaki, T., Hosomi, A., Tokudomi, S., Kusunoki, Y., Fujita, Y., Giga-Hama, Y., Tanaka, N., and Takegawa, K.	旭硝子・香川大学	Vacuolar protein sorting receptor in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	Microbiology 152, 1523-1532	有	2006
35	Morita, T., Tanaka, N., Hosomi, A., Giga-Hama, Y., and Takegawa, K.	旭硝子・香川大学	An alpha-amylase homologue, aah3, encodes a GPI-anchored membrane protein required for cell wall integrity and morphogenesis in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	Biosci. Biotechnol. Biochem. 70, 1454-1463	有	2006
36	Iwaki, T., Giga-Hama, Y., and Takegawa, K.	旭硝子・香川大学	A survey of all 11 ABC transporters in fission yeast: two novel ABC transporters are required for red pigment accumulation in a <i>Schizosaccharomyces pombe</i> adenine biosynthetic mutant.	Microbiology 152, 2309-2321	有	2006
37	Fujita, Y., Tohda, H., Giga-Hama, Y., and Takegawa, K.	旭硝子・香川大学	Heat shock-inducible expression vectors for use in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	FEMS Yeast Res. 6, 883-887	有	2006
38	Idiris A, Tohda H, Bi K, Isoai A, Kumagai H, and Giga-Hama Y.	旭硝子	Enhanced productivity of protease-sensitive heterologous proteins by disruption of multiple protease genes in the fission yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	Appl. Microbiol. Biotechnol. 73, 404-420	有	2006
39	Iwaki, T., Morita, T., Tanaka, N., Giga-Hama, Y., and Takegawa, K.	旭硝子・香川大学	Loss of a GPI-anchored membrane protein Aah3p causes a defect of vacuolar protein sorting in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	Biosci. Biotechnol. Biochem. 71, 623-626	有	2007
40	Giga-Hama, Y., Tohda, H., Takegawa, K., and Kumagai, H.	旭硝子・香川大学	Minimum genome factory using fission yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , improvement of host genome for heterologous protein production.	Biotechnol. Appl. Biochem. 46, 147-155	有	2007
41	Iwaki, T., Onishi, M., Ikeuchi, M., Kita, A., Sugiura, R., Giga-Hama, Y., Fukui, Y., and Takegawa, K.	旭硝子・香川大学他	Essential roles of class E Vps proteins for sorting into multivesicular bodies in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	Microbiology 153, 2753-2764	有	2007
42	Ma, Y., Sugiura, R., Saito, M., Koike, A., Sio, S.-O., Fujita, Y., Takegawa, K. and Kuno, T.	旭硝子・香川大学他	New amino acid-auxotrophic markers for targeted gene integration and disruption in fission yeast.	Curr.Genet. 52, 97-105	有	2007

論文(4/31)

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
43	Onishi, M., Iida, M., Koga, T., Yamada, S., Hirata, A., Iwaki, T., Takegawa, K., Fukui, Y., and Takegawa, K.	旭硝子・香川大学他	Fission yeast Sst4p, a conserved Vps27/Hrs homolog, functions downstream of PtdIns 3-kinase Pik3p to mediate proper spore formation.	Eukaryot. Cell 6, 2343-2353	有	2007
44	Takanashi, K., Shitan, N., Sugiyama, A., Kamimoto, Y., Hamamoto, M., Iwaki, T.,	旭硝子・香川大学他	Galactinol synthase genes of <i>Coptis japonica</i> are involved in confers berberine tolerance in yeast.	Biosci. Biotechnol. Biochem. 72, 398-405	有	2008
45	Hosomi, A., Kawanishi, Y., Tanaka, N., and Takegawa, K.	香川大学	PXA domain-containing protein Pxa1 is required for normal vacuole function and morphology in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	Biosci. Biotechnol. Biochem. 72, 548-556	有	2008
46	Iwaki, T., Iefuji, H., Hiraga, Y., Hosomi, A., Morita, T., Giga-Hama, Y., and Takegawa, K.	旭硝子・香川大学他	Multiple functions of ergosterol in the fission yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	Microbiology 154, 830-841	有	2008
47	Chardwiriyaapreecha, S., Shimazu, M., Morita, T., Sekito, T., Akiyama, K.,	旭硝子・香川大学他	Identification of the <i>fnx1+</i> and <i>fnx2+</i> genes for vacuolar amino acid transporters in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	FEBS Lett 582, 2225-2230	有	2008
48	Ikeda, Y., Ohashi, T., Tanaka, N., Takegawa, K.	旭硝子・香川大学	Identification and characterization of a gene required for alpha-1,2-mannose extension in the O-linked glycan synthesis pathway in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	FEMS Yeast Res 9, 115-125	有	2009
49	Ohashi, T., Ikeda, Y., Tanaka, N., Nakakita, S., Natsuka, S., Giga-Hama, Y., Takegawa, K.	旭硝子・香川大学	The <i>och1</i> mutant of <i>Schizosaccharomyces pombe</i> produces galactosylated core structures of N-linked oligosaccharides.	Biosci Biotechnol Biochem 73, 407-414	有	2009
50	Kashiwazaki, J., Iwaki, T., Takegawa, K., Shimoda, C., Nakamura, T.	旭硝子・香川大学他	Two <i>Schizosaccharomyces pombe</i> Rab7 homologs, Ypt7 and Ypt71, play antagonistic roles in the regulation of vacuolar morphology.	Traffic 10, 912-924	有	2009
51	Sasaki, M., Idris, A. Tada, A., Kumagai, H., Giga-Hama, Y., Tohda,	旭硝子	The gap filling sequence on the left arm of chromosome 2 in fission yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Yeast 25, 673-679	有	2008
52	Sugino, C., Hirose, M., Tohda, H., Yoshinari, Y., Abe, T., Giga-Hama, Y., Iizuka, R., Shimizu, M., Kidokoro, S., Ishii, N., Yohda, M.	旭硝子他	Characterization of a sHsp of <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , SpHsp15.8, and implication of functional mechanism from the comparison with another sHsp, SpHsp16.0.	PROTEINS 74, 6-17	有	2009
53	Satoh, R., Morita, T., Takada, H., Kita, A., Ishiwata, S., Doi, A., Hagihara, K., Taga, A., Matsumura, Y., Tohda, H., Sugiura, R.	旭硝子他	Role of the RNA-Binding Protein Nrd1 and Pmk1 MAPK in the Regulation of Myosin mRNA Stability in Fission Yeast.	Mol Biol Cell. 20, 2473-85.	有	2009

論文(5/31)

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
54	Takegawa, K., Tohda, H., Sasaki, M., Idiris, A., Ohashi, T., Mukaiyama, H., Giga-Hama, Y..	旭硝子・香 川大学他	Production of heterologous proteins using the fission yeast expression system.	Biotechnol Appl Biochem. 53, 227-35	有	2009
55	Mukaiyama, H., Tohda, H., Giga- Hama, Y., and Takegawa, K.	旭硝子・九 州大学	Dextran sodium sulfate is effective enhancer for secretion of recombinant human transferrin in Schizosaccharomyces pombe.	Appl. Microbiol. Biotechnol. 85, 155-164	有	2009
56	Rothlisberger, S., Jourdain, I., Johnson, C., Takegawa, K., and Hyams, J. S.	九州大学他	The dynamin-related protein Vps1 regulates vacuole fission, fusion and tubulation in the fission yeast, S. pombe.	Fungal Genet. Biol. 46, 927-935	有	2009
57	Mukaiyama, H., Kajiwara, S., Hosomi, A., Giga- Hama, Y., Tanaka, N., Namkamura, T., and Takegawa, K.	旭硝子・九 州大学他	Autophagy-deficient Schizosaccharomyces pombe mutants undergo partial sporulation during nitrogen starvation.	Microbiology 155, 3816- 3826	有	2009
58	Idiris, A., Tohda, H., Kumagai, H., Giga-Hama, Y., and Takegawa, K.	旭硝子・九 州大学	Enhanced protein secretion from the multiprotease-deletion fission yeast by modification of vacuolar protein sorting pathway.	Appl. Microbiol. Biotechnol. 85, 667-677	有	2010
59	Ohashi, T., and Takegawa, K.	旭硝子・九 州大学	Structure of the N- and O-linked oligosaccharides that show complete loss of galactose residues from gms1och1 mutant of Schizosaccharomyces pombe.	Appl. Microbiol. Biotechnol. 86, 263-272	有	2010
60	Suzuki, S., Matsuzawa, T., Nukigi, Y., Takegawa, K., and Tanaka, N.	九州大学他	Characterization of two different types of UDP-glucose/-galactose 4-epimerase involved in galactosylation in fission yeast.	Microbiology 156, 708- 718	有	2010
61	Mukaiyama, H., Tohda, H., and Takegawa, K.	旭硝子・九 州大学	Overexpression of protein disulfide isomerases enhances secretion of recombinant human transferrin in Schizosaccharomyces pombe.	Appl. Microbiol. Biotechnol. 86, 1135- 1143	有	2010
62	Mukaiyama, H., Nakase, M., Nakamura, T., Kakinuma, Y., and Takegawa, K.	旭硝子・九 州大学他	Autophagy in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe.	FEBS Lett 584, 1327-34	有	2010
63	Idiris, A., Tohda, H., Kumagai, H., and Takegawa, K.	旭硝子・九 州大学他	Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production.	Appl. Microbiol. Biotechnol. 86, 403-417	有	2010
64	Nakase, M., Tani, M., Morita, T., Kitamoto, H.K., Kashiwazaki, J., Nakamura, T., Hosomi, A.,	九州大学他	Mannosylinositol phosphorylceramide is a main phospholipid component and required for proper localization of plasma membrane proteins in Schizosaccharomyces pombe.	J. Cell Sci. 123, 1578- 1587	有	2010
65	Chardwiriyaapreecha , S., Mukaiyama, H., Sekito, T., Iwaki, T., Takegawa, K., and Kakinuma, Y.	旭硝子・九 州大学他	Avt5p is required for vacuolar uptake of amino acids in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe.	FEBS Lett. 584, 2339- 2345	有	2010

論文(6/31)

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
66	Ohashi, T., Nakakita, S., Sumiyoshi, W., and Takegawa, K.	旭硝子・九州大学他	Production of heterologous glycoproteins by a glycosylation-defective alg3och1 mutant of <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	J. Biotechnol. 150, 348-356	有	2010
67	Ohashi, T., Nakakita, S., Sumiyoshi, W., Yamada, N., Ikeda, Y., Tanaka, N., and Takegawa, K.	旭硝子・九州大学他	:Structural analysis of alpha-1,3-linked galactose-containing oligosaccharides in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> mutants harboring single and multiple alpha-galactosyltransferase genes disruptions	Glycobiology 21, 340-351	有	2011
68	Mukaiyama, H., Iwaki, T., Idiris, A. and Takegawa, K.	旭硝子・九州大学他	Analysis of processing and maturation mechanism of carboxypeptidase Y and alkaline phosphatase in <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Appl Microbiol Biotechnol, in press.	有	2011
69	Shigehisa A, Okuzaki, D, Kasama T, Tohda H, Hirata A, Nojima H.	旭硝子他	Mug28, a meiosis-specific protein of <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , Regulates spore wall formation	Molecular Biology of the Cell 21, 1955-1967	有	2010
70	西原宏史	茨城大学	低炭素社会をめざした好気的水素ガス代謝能の産業利用	バイオサイエンスとインダストリー, 68, 390-393	無	2010
71	Matsui, T., Yoshida, T., Hayashi, T., Nagasawa, T.	岐阜大学	T. Purification, characterization and gene cloning of 4-hydroxybenzoate decarboxylase of <i>Enterobacter cloacae</i> P240.	Arch. Microbiol., 186, 21-29	有	2006
72	Mitsukura, K., Kondo, Y., Yoshida, T., Nagasawa, T.	岐阜大学	Regioselective hydroxylation of adamantane by <i>Streptomyces griseoplanus</i> cells.	Appl. Microbiol. Biotechnol., 71, 502-5-4	有	2006
73	Matsui, T., Yoshida, T., Yoshimura, T., Nagasawa, T.	岐阜大学	Regioselective carboxylation of 1,3-dihydroxybenzene by 2,6-dihydroxybenzoate decarboxylase of <i>Pandoraea</i> sp. 12B-2.	Appl. Microbiol. Biotechnol., 73, 95-102	有	2006
74	Yamada, M., Okada, Y., Yoshida, T., Nagasawa, T.	岐阜大学	Biotransformation of isoeugenol to vanillin by <i>Pseudomonas putida</i> IE27 cells.	Appl. Microbiol. Biotechnol., 73, 1225-1230	有	2007
75	Yamada, M., Okada, Y., Yoshida, T., Nagasawa, T.	岐阜大学	Purification, characterization and gene cloning of isoeugenol-degrading enzyme from <i>Pseudomonas putida</i> IE27.	Arch. Microbiol., 187 511-517	有	2007
76	Yamada, M., Okada, Y., Yoshida, T., Nagasawa, T.	岐阜大学	Vanillin production using <i>Escherichia coli</i> cells over-expressing isoeugenol monooxygenase of <i>Pseudomonas putida</i> IE27.	Biotechnol. Lett., 30, 665-670	有	2008
77	Yoshida, T., Inami, Y., Nagasawa, T.	岐阜大学	Regioselective carboxylation of catechol by 3,4-dihydroxybenzoate decarboxylase of <i>Enterobacter cloacae</i> P241.	Biotechnol. Lett., 32, 701-705	有	2010
78	Mitsukura, K., Suzuki, M., Tada, K., Yoshida, T., Nagasawa, T.	岐阜大学	Asymmetric synthesis of chiral cyclic amine from cyclic imine by bacterial whole-cell catalyst of enantioselective imine reductase.	Org. Biomol. Chem., 8, 4533-4535	有	2010
79	Mitsukura, K., Sakamoto, H., Kondo, H., Yoshida, T., Nagasawa, T.	岐阜大学	Bioconversion of 1-adamantanol to 1,3-adamantanediol using <i>Streptomyces</i> sp. SA8 oxidatio system.	J. Biosci. Biotechnol., 109, 550-553	有	2010

論文(7/31)

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
80	Suenaga H, Koyama Y, Miyakoshi M, Miyazaki R, Yano H, Sota M, Ohtsubo Y, Tsuda	産総研	Novel organization of aromatic degradation pathway genes in a microbial community as revealed by metagenomic analysis.	ISME J. Dec;3(12):1335-48.	有	2009
81	Suenaga H, Mizuta S, Miyazaki K.	産総研	The molecular basis for adaptive evolution in novel extradiol dioxygenases retrieved from the metagenome.	FEMS Microbiol Ecol. Sep;69(3):472-80.	有	2009
82	Suenaga H, Kanagawa T, Miyazaki K	産総研	A Culture-Independent Novel Approach to the Monitoring of the Activity and Stability of Activated Sludge in Wastewater Treatment. in Sludge	Types, Treatment Processes and Disposal (ed Baily RE pp. 229-243, Nova Science Publishers, NY)	無	2009
83	末永光、宮崎健太郎	産総研	Schizosaccharomyces pombe minimum genome factory.	化学と生物 48(2):100-106.	無	2010
84	Ohtake, H., Yamashita, S., Kato, J. ¹	阪大・工学研究科 1 広大・先端物質科学	Development of a new biotechnological basis for improving industrial sustainability in Japan	Eng. Life Sci. 6 (3), 278-284	有	2006
85	Yamashita, S., Sameshima, Y., Konishi, M., Kato, J., Kishimoto, M., Honda, K., Omasa, T., Ohtake, H.	阪大・工学研究科	Integrated biooxidation and acid dehydration process for monohydroxylation of aromatics.	Process Biochem. 42 (1), 46-51	有	2007
86	Yamashita, S., Satoi, M., Iwasa, Y., Honda, K., Sameshima, Y., Omasa, T., Kato, J. ¹ , Ohtake, H.	阪大・工学研究科 1 広大・先端物質科学	Utilization of hydrophobic bacterium <i>Rhodococcus opacus</i> B-4 as whole-cell catalyst in anhydrous organic solvents.	Appl Microbiol Biotechnol 74 (4), 761-7	有	2007
87	Faizal, I., Ohba, M., Kuroda, A., Takiguchi, N., Ohtake, H ¹ ., Honda, K ¹ ., Kato, J. ¹	広大・先端物質科学 1 阪大・工学研究科	Bioproduction of 3-methylcatechol from toluene in a two-phase (organic-aqueous) system by a genetically modified solvent-tolerant <i>Pseudomonas putida</i> strain T-57.	J. Environ. Biotechnol., 7:39-44.	有	2007
88	Honda, K., Yamashita, S., Nakagawa, H., Sameshima, Y., Omasa, T., Kato, J. ¹ , Ohtake, H.	阪大・工学研究科 1 広大・先端物質科学	Stabilization of water-in-oil emulsion by <i>Rhodococcus opacus</i> B-4 and its application to biotransformations.	Appl. Microbiol. Biotechnol. 78, 767-773	有	2008
89	Sameshima, Y., Honda, K., Kato, J. ¹ , Omasa, T., Ohtake, H.	阪大・工学研究科 1 広大・先端物質科学	Expression of <i>Rhodococcus opacus alkB</i> genes in anhydrous organic solvents.	J. Biosci. Bioeng. 106 (2), 199-203	有	2008
90	Hamada, T., Sameshima, Y., Honda, K., Omasa, T., Kato, J. ¹ , Ohtake, H.	阪大・工学研究科 1 広大・先端物質科学	A Comparison of various methods to predict bacterial predilection for organic solvents used as reaction media.	J. Biosci. Bioeng. 106 (4), 357-362	有	2008
91	A. Kita, N. Takiguchi, J. Kato.	広大・先端物質科学	Development of unmarked gene modification system in organic solvent-tolerant <i>Rhodococcus opacus</i> strain B4.	J. Environ. Biotechnol., 9: 25-29.	有	2009

論文(8/31)

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
92	A. Kita, N. Takiguchi, J. Kato.	広大・先端物質科学	Cloning and characterization of <i>sigA</i> and <i>sigB</i> genes from <i>Rhodococcus opacus</i> strain B4: Involvement of <i>sigB</i> in organic solvent tolerance.	<i>J. Environ. Biotechnol.</i> , 9: 43-50.	有	2009
93	Hamada, T., Maeda, Y., Matsuda, H., Sameshima, Y., Honda, K., Omasa, T., Kato, J. ¹ , Ohtake, H.	阪大・工学研究科 1 広大・先端物質科学	Effect of cell-surface hydrophobicity on bacterial conversion of water-immiscible chemicals in two-liquid-phase culture systems.	<i>J. Biosci. Bioeng.</i> 106 (4), 357-362	有	2009
94	Fujii, Y., Kabumoto, H., Nishimura, T., Fujii, T., Yanai, S., Takeda, K., Tamura, N., Arisawa, A., Z	メルシヤン株式会社 産総研	Purification, characterization, and directed evolution study of a vitamin D3 hydroxylase from <i>Pseudonocardia autotrophica</i> .	<i>Biochem. Biophys. Res Commun.</i> , 385, 170-175	有	2009
95	Zhou, Y., Minami, T., Honda, K., Omasa, T., Ohtake, H.	阪大・工学研究科	Systematic screening of <i>Escherichia coli</i> single-gene knockout mutants for improving recombinant whole-cell biocatalysts.	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 87 (2), 647-655	有	2010
96	Zhou, Y., Minami, T., Honda, K., Omasa, T., Ohtake, H.	阪大・工学研究科	Enhancement of recombinant enzyme activity in <i>cpxA</i> -deficient mutant of <i>Escherichia coli</i> .	<i>J. Biosci. Bioeng.</i> 110 (4), 403-407	有	2010
97	Yasutake, Y., Fujii, Y., Nishioka, T., Cheon, W.-K., Arisawa, A., & Tamura, T.	産総研 メルシヤン株式会社	Structural evidence for enhancement of sequential vitamin D3 hydroxylation activities by directed evolution of cytochrome P450 Vdh.	<i>J. Biol. Chem.</i> , 285(41), 31193-31201	有	2010
98	Fujii, Y., Norihisa, K., Fujii, T., Aritoku, Y., Kagawa, Y., Sallam K. I., Jodo, O., Arisawa, A., & Tamura, T	メルシヤン株式会社 産総研	Construction of a novel expression vector in <i>Pseudonocardia autotrophica</i> and its application to efficient biotransformation of compactin to pravastatin, a specific HMG-CoA reductase inhibitor.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 404(1), 511-516	有	2011
99	Imoto, N., Nishioka, T., & Tamura, T.	産総研	Permeabilization induced by lipid II-targeting lantibiotic nisin and its effect on the bioconversion of vitamin D3 to 25-hydroxyvitamin D3 by <i>Rhodococcus erythropolis</i> .	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , in press.	有	2011
100	本田孝祐、加藤純一 ¹ 、大竹久夫	阪大・工学研究科 1 広大・先端物質科学	有機溶媒耐性微生物を用いた非水系の世界でのものづくり	環境バイオテクノロジー学会誌 6 (2), 109-114	無	2006
101	本田孝祐	阪大・工学研究科	細菌の疎水性	生物工学会誌 85, 377	無	2007
102	本田孝祐、大竹久夫	阪大・工学研究科	「有機溶媒中でのバイオプロダクション」微生物機能を活用した革新的生産技術の最前線 清水 昌、大竹久夫、藤尾達郎、穴澤秀治 編	シーエムシー出版, pp. 154-165.	無	2007

論文(9/31)

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
103	加藤純一、本田孝祐 ¹ 、大竹久夫 ¹	広大・先端物質科学 1阪大・工学研究科	疎水性ケミカルのバイオプロダクションのための有機溶媒耐性細菌の活用「微生物によるものづくり」(植田充美監修)	pp. 24-31 シーエムシー出版	無	2008
104	藤井良和、田村具博、有澤章	メルシヤン株式会社 産総研	ビタミンD3を活性化する酵素の医薬品・中間体製造への応用”産業酵素の応用技術と最新動向	シーエムシー出版, 75-82	無	2009
105	藤井良和、田村具博、有澤章	メルシヤン株式会社 産総研	新規ビタミンD水酸化酵素による効率の良い活性型ビタミンD生産への応用展開	バイオインダストリー, 26(4), 21-26	無	2009
106	加藤純一	広大・先端物質科学	有機溶媒耐性細菌を利用した疎水性ケミカル生産技術の開発	バイオサイエンスとインダストリー, 68: 15-20.	無	2010
107	M. Shoji, H. Isobe, Y. Takano, Y. Kitagawa, S. Yamanaka, M. Okumura, K.	Osaka Univ.	Theory of Chemical Bonds in Metalloenzymes. IX. Theoretical Study on the Active Site of the Ribonucleotide Reductase and the Related Species.	Int. J. Quant. Chem., Vol. 107, 3250-3265	有	2007
108	M. Shoji, H. Isobe, T. Sato, H. Yabushita, K. Koizumi, Y. Kitagawa, S. Yamanaka, T. Kawakami, M. Okumura, M. Hagiwara, K.	Osaka Univ.	Theory of Chemical Bonds in Metalloenzymes. VII. Hybrid-Density Functional Theory Studies on the Electronic Structures of P450	Int. J. Quant. Chem., Vol. 108, 631-650	有	2008
109	H. Isobe, S. Yamanaka, S. Kuramitsu, K. Yamaguchi	Osaka Univ.	Regulation Mechanism of Spin-Orbit Coupling in Charge-Transfer-Induced Luminescence of Imidazopyrazinone Derivatives.	J. Am. Chem. Soc., Vol. 130, 132-149	有	2008
110	Yoshifumi Fukunishi, Haruki Nakamura	AIST	Prediction of protein-ligand complex structure by docking software guided by other complex structures.	J. Mol. Graph. Model., Vol. 6, 1030-1033	有	2008
111	H. Fukunishi, R. Teramoto, J. Shimada	NEC	Hidden Active Information in a Random Compound Library.	J. Chem. Info. Model., Vol. 48, 575-582	有	2008
112	H. Fukunishi, R. Teramoto, T. Takada, J. Shimada	NEC	Bootstrap-Based Consensus Scoring Method for Protein-Ligand Docking.	J. Chem. Info. Model., Vol. 48, 988-996	有	2008
113	Mitsuo Shoji, Hiroshi Isobe, Toru Saito, Yasutaka Kitagawa, Shusuke Yamanaka, Takashi Kawakami, Mitsutaka	Osaka Univ.	Theory of Chemical Bonds in Metalloenzymes XI: Full Geometry Optimization and Vibration Analysis of Porphyrin Iron-Oxo Species.	Int. J. Quant. Chem., Vol. 108, 2950-2965	有	2008
114	Hiroshi Isobe, Satomichi Nishihara, Mitsuo Shoji, Jiro Shimada, Masayuki Hagiwara, and Kizashi	Osaka Univ.	Extended Hartree-Fock Theory of Chemical Reactions. VIII. Hydroxylation Reactions by P450.	Int. J. Quant. Chem., Vol. 108, 2991-3009	有	2008
115	Kizashi Yamaguchi, Mitsuo Shoji, Hiroshi Isobe, Syusuke Yamanaka, Jiro Shimada, Yasutaka Kitagawa, Mitsutaka.	Osaka Univ.	Theory of chemical bonds in metalloenzymes XII: Electronic and spin structures of metallo-oxo and isoelectronic species and spin crossover phenomena in oxygenation reactions.	Polyhedron, Vol. 28, 2044-2052	有	2009

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
116	Kizashi Yamaguchi, Syusuke Yamanaka, Hiroshi Isobe, Mitsuo Shoji, Toru Saito, Yasutaka Kitagawa, Mitsutaka.	Osaka Univ.	Theory of Chemical Bonds in Metalloenzymes XIII: Singlet and Triplet Diradical Mechanisms of Hydroxylations With Iron-Oxo Species and P450 are Revisited.	Int. J. Quant. Chem., Vol. 109, 3723-3744	有	2009
117	Kizashi Yamaguchi, Syusuke Yamanaka, Jiro Shimada, Hiroshi Isobe, Toru Saito, Mitsuo Shoji, Yasutaka Kitagawa, Mitsutaka.	Osaka Univ.	Extended Hartree-Fock Theory of Chemical Reactions. IX. Diradical and Peroxide Mechanisms for Oxygenations of Ethylene With Molecular Oxygen and Iron-Oxo Species Are Revisited.	Int. J. Quant. Chem., 109, 3745-3766	有	2009
118	Hiroshi Isobe, Syusuke Yamanaka, Mitsutaka Okumura, and Kizashi Yamaguchi	Osaka Univ.	Theoretical Investigation of Thermal Decomposition of Peroxidized Coelenterazines with and without External Perturbations.	J. Phys. Chem. A, Vol. 113, 15171-15187	有	2009
119	Marzena B. Fitzpatrick, Yuji Obara, Koyu Fujita, Doreen E. Brown, David M. Dooley, Takamitsu Kohzuma, Roman S. Czernuszewicz	Ibaraki Univ.	Non-covalent interactions in blue copper protein probed by Met16 mutation and electronic and resonance Raman spectroscopy of <i>Achromobacter</i> <i>cycloclastes</i> pseudoazurin.	J. Bioinorg. Chem., Vol. 104, 250-260	有	2010
120	Yoshiko Uchida, Yoshihiro Urade, Seiji Mori, and Takamitsu Kohzuma	Ibaraki Univ.	UV Resonance Raman Studies on the Activation Mechanism of Human Hematopoietic Prostaglandin D2 Synthase by a Divalent Cation, Mg ²⁺ .	J. Bioinorg. Chem., Vol. 104, 331-340	有	2010
121	Kizashi Yamaguchi, Mitsuo Shoji, Toru Saito, Hiroshi Isobe, Satomichi Nishihara, Kenichi Koizumi, Satoru Yamada, Takashi Kawakami, Yasutaka Kitagawa, Shusuke Yamanaka.	Osaka Univ.	Theory of Chemical Bonds in Metalloenzymes. XV. Local Singlet and Triplet Diradical Mechanisms for Radical Coupling Reactions in the Oxygen Evolution Complex.	Int. J. Quant. Chem., 110, 3101-3128	有	2010
122	Naoto Yamaguchi; Tatsuya Naiki; Takamitsu Kohzuma; Toshikazu Takada; Fumihiko Sakata;	Ibaraki Univ.	Theoretical Studies on Model Reaction Pathways of Prostaglandin H2 Isomerization to Prostaglandin D2/E2 Theoretical Chemistry Accounts	Theor.Chem. Acc., 128, 191-206	有	2011
123	Abe, T., E. Sakuradani, T. Asano, H. Kanamaru, S.	京都大学大 学院農学研 究科	Functional characterization of $\Delta 9$ and $\omega 9$ desaturase genes in <i>Mortierella alpina</i> 1S-4 and its derivative mutants.	Appl. Microbiol. Biotechnol. 70(6)711- 719	有	2006,
124	Horinouchi, N., J. Ogawa, T. Kawano, T. Sakai, K. Saito, S. Matsumoto, M. Sasaki, Y. Mikami, S. Shimizu.	京都大学大 学院農学研 究科	Biochemical retrosynthesis of 2'- deoxyribonucleosides from glucose, acetaldehyde, and a nucleobase.	Appl. Microbiol. Biotechnol. 71(5)615- 621	有	2006,

論文(11/31)

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
125	Horinouchi, N., J. Ogawa, T. Kawano, T. Sakai, K. Saito, S. Matsumoto, M. Sasaki, Y. Mikami, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	One-pot microbial synthesis of 2'-deoxyribonucleoside from glucose, acetaldehyde, and a nucleobase.	Biotechnol. Lett. 28(12)877-881	有	2006,
126	Zhang, S., E. Sakuradani, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	Identification and production of n-8 odd-numbered polyunsaturated fatty acids by a $\Delta 12$ desaturation-defective mutant of <i>Mortierella alpina</i> 1S-4.	Lipids 41(6)623-626	有	2006,
127	Horinouchi, N., J. Ogawa, T. Kawano, T. Sakai, K. Saito, S. Matsumoto, M. Sasaki, Y. Mikami, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	Efficient production of 2-deoxyribose 5-phosphate from glucose and acetaldehyde by coupling of the alcoholic fermentation system of baker's yeast and deoxyriboaldolase-expressing <i>Escherichia coli</i> .	Biosci. Biotechnol. Biochem. 70(6)1371-1378	有	2006,
128	Kataoka, M., A. Hoshino-Hasegawa, R. Thiwthong, N. Higuchi, T. Ishige, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	Gene cloning of an NADPH-dependent menadione reductase from <i>Candida macedoniensis</i> , and its application to chiral alcohol production.	Enzyme Microb. Technol. 38(7)994-951	有	2006,
129	Kataoka, M., Y. Nakamura, N. Urano, T. Ishige, G. Shi, S. Kita, K. Sakamoto, S.	京都大学大学院農学研究科	A novel NADP+-dependent l-1-amino-2-propanol dehydrogenase from <i>Rhodococcus erythropolis</i> MAK154: a promising enzyme for the production of double chiral aminoalcohols.	Lett. Appl. Microbiol.43(4)430-435	有	2006,
130	片岡道彦, 清水 昌	京都大学大学院農学研究科	Old Yellow Enzymeの再発見-キラルインダストリーへの利用.	バイオサイエンスとインダストリー 64(5)277-278	無	2006,
131	Mano, J., J. Ogawa, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	Microbial production of optically active β -phenylalanine through stereoselective degradation of racemic β -phenylalanine.	Biosci. Biotechnol. Biochem.70(8)1941-1946	有	2006,
132	Ogawa, J., J. Mano, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	Microbial production of optically active β -phenylalanine ethyl ester through stereoselective hydrolysis of racemic β -phenylalanine ethyl ester.	Appl. Microbiol. Biotechnol. 70(6)663-669	有	2006,
133	Ogawa, J., CL. Soong, S. Kishino, QS. Li, N. Horinouchi, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	creening and industrial application of unique microbial reactions involved in nucleic acid and lipid metabolisms.	Biosci. Biotechnol. Biochem.70(3)574-582	有	2006,
134	Honda, K., T. Ishige, M. Kataoka, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	Microbial and enzymatic processes for the production of chiral compounds.	Biocatalysis in the pharmaceutical and biotechnology industries. R. N. Patel ed., Taylor & Francis, 529-545	有	2007,
135	Isobe, K., A. Kato, J. Ogawa, M. Kataoka, A. Iwasaki, J.	京都大学大学院農学研究科、(株)カネカ	Characterization of alcohol oxidase from <i>Aspergillus ochraceus</i> AIU 031.	J. Gen. Appl. Microbiol. 53(3)177-183	有	2007,
136	Isobe, K., A. Kato, Y. Sasaki, S. Suzuki, M. Kataoka, J. Ogawa, A. Iwasaki, J.	京都大学大学院農学研究科、(株)カネカ	Purification and characterization of a novel alcohol oxidase from <i>Paenibacillus</i> sp. AIU 311.	J. Biosci. Bioeng.104(2)124-128	有	2007,
137	礮部公安, 岩崎晃, 川野茂, 八十原良彦, 長谷川淳三, 片岡道彦, 小川順, 清水昌	京都大学大学院農学研究科、(株)カネカ	位置選択的酵素酸化、立体選択的酵素還元反応の探索.	微生物機能を活用した革新的生産技術の最前線(清水昌, 大竹久夫, 藤尾達郎, 穴澤秀治編), シーエムシー出版, 138-	無	2007,

論文(12/31)

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
138	Kataoka, M., K. Honda, K. Sakamoto, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	Microbial enzymes involved in lactone compound metabolism and their biotechnological applications.	Appl. Microbiol. Biotechnol. 75(2)257-266.	有	2007,
139	片岡道彦, 浦野信行, 清水昌	京都大学大学院農学研究科	キラルテクノロジーにおける進化分子工学的手法の利用.	生物工程85(9)400-402	無	2007,
140	Ogawa, J., H. Yamanaka, J. Mano, Y. Doi, N. Horinouchi, T. Kodera, N. Nio, S.V. Smirnov, N.N. Samsonova, Y.I. Kozlov, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	Synthesis of 4-hydroxyisoleucine by the aldolase-transaminase coupling reaction and basic characterization of the aldolase from <i>Arthrobacter simplex</i> AKU 626.	Bioaci. Biotechnol. Biochem. 71(7)1607-1615	有	2007,
141	小川順, 岸野重信, 清水昌.	京都大学大学院農学研究科	酵素法による共役脂肪酸の合成.	ファインケミカル 37(1)18-27	無	2007,
142	Shimizu, S.	京都大学大学院農学研究科	Microbial and enzymatic production of useful chemicals.	Microbiol. Cult. Coll. 23(1)23-28	有	2007,
143	清水昌	京都大学大学院農学研究科	ユニークな微生物機能の探索・開発と物質生産への利用.	ファインケミカル 37(1)5-7	無	2007,
144	清水昌	京都大学大学院農学研究科	物質生産プロセスのバイオ化をめざして	微生物機能を活用した革新的生産技術の最前線(清水昌, 大竹久夫, 藤尾達郎, 穴澤秀治編), シーエムシー出版, 1-8	無	2007,
145	Smirnov, S.V., N.N. Samsonova, A.E. Novikova, N.G. Matrosov, N.Y. Rushkevich, T. Kodera, J. Ogawa, H. Yamanaka, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	A novel strategy for enzymatic synthesis of 4-hydroxyisoleucine: identification of an enzyme possessing HMKP (4-hydroxy-3-methyl-2-keto-pentanoate) aldolase activity.	FEMS Microbiol. Lett. 237(1)70-77	有	2007,
146	von Canstein H, Ogawa J, Shimizu S, Lloyd JR.	京都大学大学院農学研究科	Secretion of flavins by <i>Shewanella</i> species and their role in extracellular electron transfer.	Appl. Environ. Microbiol. 74(3)615-623	有	2007,
147	Zhang, S., E. Sakuradani, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	Identification of a sterol Delta7 reductase gene involved in desmosterol biosynthesis in <i>Mortierella alpina</i> 1S-4.	Appl. Environ. Microbiol. 73(6)1736-1741	有	2007,
148	Zhang, S., E. Sakuradani, K. Ito, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	Identification of a novel bifunctional delta12/delta15 fatty acid desaturase from a basidiomycete, <i>Coprinus cinereus</i> TD#822-2.	FEBS Lett. 81(2)315-319	有	2007,
149	Isobe, K., K. Ishikura, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	Identification and characterization of enzyme catalyzing conversion of N α -benzyloxycarbonyl-L-amino adipic- Δ -semialdehyde to N α -benzyloxycarbonyl-L-amino adipic acid in <i>Aspergillus niger</i> AKU3302.	J. Biosci. Bioeng. 106(4)409-411	有	2008,
150	Isobe, K., A. Kato, Y. Sasaki, M. Kataoka, J. Ogawa, A. Iwasaki, J. Hasegawa, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科、(株)カネカ	Superoxide dismutase exhibit oxidase activity on aldehyde alcohols similar to alcohol oxidase from <i>Paenibacillus</i> sp. AIU311.	J. Biosci. Bioeng. 105(6)666-670	有	2008,

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
151	Kataoka, M., S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	Screening of novel microbial enzymes and their application to chiral compound production.	Biocatalysis and Bioenergy (eds. C.T. Hou and J.-R. Shaw), John Wiley & Sons, 355-	有	2008,
152	Kataoka, M., T. Ishige, N. Urano, Y. Nakamura, E. Sakuradani, S. Fukui, S. Kita, K. Sakamoto, S.	京都大学大学院農学研究科	Cloning and expression of the L-1-amino-2-propanol dehydrogenase gene from <i>Rhodococcus erythropolis</i> , and its application to double chiral compound production.	Appl. Microbiol. Biotechnol. 80(4)597-604	有	2008,
153	岸野重信, 小川順, 横関健三, 清水昌	京都大学大学院農学研究科	乳酸菌による共役脂肪酸生産.	バイオサイエンスとインダストリー66(2)54-59	無	2008,
154	Ogawa, J., N. Horinouchi, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	Multi-step enzyme catalysis.	Biotransformations and chemoenzymatic synthesis (ed. Garcia-Junceda, E.), Wiley-	有	2008,
155	小川 順, 岸野重信, 櫻谷英治, 清水昌	京都大学大学院農学研究科	高度不飽和脂肪酸・共役脂肪酸含有油脂の微生物生産.	バイオテクノロジーシリーズ 微生物によるものづくり -化学法に代わるホワイバイオテクノロジーのすべて- (植田充美監修), シーエムシー出版,	無	2008,
156	Sakuradani, E., S. Murata, H. Kanamaru, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	Functional analysis of a fatty acid elongase from arachidonic acid-producing <i>Mortierella alpina</i> 1S-4.	Appl. Microbiol. Biotechnol. 81(3)497-503	有	2008,
157	Sasaki, Y., K. Isobe, M. Kataoka, J. Ogawa, A. Iwasaki, J.	京都大学大学院農学研究科、(株)カネカ	Purification and characterization of a new aldehyde oxidase from <i>Pseudomonas</i> sp. AIU362	J. Biosci. Bioeng. 106(3)297-302	有	2008,
158	Thiwthong, R., M. Kataoka, A. Iwasaki, H. Watanabe, J. Hasegawa, K.	京都大学大学院農学研究科、(株)カネカ	Aldehyde oxidase carrying an unusual subunit structure from <i>Pseudomonas</i> sp. MX-058.	Microbial Biotechnol. 1(5)395-402	有	2008,
159	Ando, A., J. Ogawa, S. Kishino, T. Ito, N. Shirasaka, E. Sakuradani, K.	京都大学大学院農学研究科	Fatty acid desturation and elongation reactions of <i>Trichoderma</i> sp. 1-OH-2-3.	J. Am. Oil Chem. Soc. 86(3)227-233	有	2009,
160	Ando, A., J. Ogawa, S. Sugimoto, S. Kishino, E. Sakuradani, K. Yokozeki, S.	京都大学大学院農学研究科	Selective production of <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 isomer of conjugated linoleic acid from <i>trans</i> -vaccenic acid methyl ester by <i>Delacroixia coronata</i> .	J. Appl. Microbiol. 106(5)1697-1704	有	2009,
161	Isobe, K., T. Takahashi, J. Ogawa, M. Kataoka, S.	京都大学大学院農学研究科	Production and characterization of alcohol oxidase from <i>Penicillium purpurescens</i> AIU063.	J. Biosci. Bioeng. 107(2)108-112	有	2009,
162	Ogawa, J., N. Horinouchi, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	Retrosynthetic production of 2'-deoxyribonucleoside from glucose, acetaldehyde, and nucleobase through multistep enzyme reactions.	Biocatalysis and Agricultural Biotechnology (ed. by C.T. Hou, J.-F. Shaw), CRC Press, 269-278	有	2009,
163	Sakuradani, E., T. Abe, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	Identification of mutation sites on ω 3 desaturase genes from <i>Mortierella alpina</i> 1S-4 mutants.	J. Biosci. Bioeng. 107(1)7-9	有	2009,

論文(14/31)

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
164	Sakuradani, E., T. Abe, K. Matsumura, A. Tomi, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	Identification of mutation sites on $\Delta 12$ desaturase genes from <i>Mortierella alpina</i> 1S-4 mutants.	J. Biosci. Bioeng. 107 (2)99-101	有	2009,
165	Kishino, S., J. Ogawa, K. Yokozeki, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	Metabolic diversity in biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids by lactic acid bacteria involving conjugated fatty acid production.	Appl. Microbiol. Biotechnol. 84(1)87-97	有	2009,
166	Sakuradani, E., A. Ando, J. Ogawa, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	Improved production of various polyunsaturated fatty acids through filamentous fungus <i>Mortierella alpina</i> breeding.	Appl. Microbiol. Biotechnol. 84(1)1-10	有	2009,
167	Sakuradani, E., M. Nojiri, H. Suzuki, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	Identification of a novel fatty acid elongase with a wide substrate specificity from arachidonic acid-producing fungus <i>Mortierella alpina</i> 1S-4.	Appl. Microbiol. Biotechnol. 84(4)709-716	有	2009,
168	Sakuradani, E., S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	Single cell oil production by <i>Mortierella alpina</i> .	J. Biotechnol. 144(1)31-36	有	2009,
169	Uzura, A., F. Nomoto, A. Sakoda, Y. Nishimoto, M. Kataoka, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	Stereoselective synthesis of (<i>R</i>)-3-quinuclidinol through asymmetric reduction of 3-quinuclidinone with 3-quinuclidinone reductase of <i>Rhodotorula rubra</i> .	Appl. Microbiol. Biotechnol. 83(4)617-626	有	2009,
170	Ogawa, J., J. Mano, T. Hagishita, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	Enantioselective ester hydrolase from <i>Sphingobacterium</i> sp. 238C5 useful for chiral resolution of β -phenylalanine and for its β -peptide synthesis.	J. Mol. Catal. B: Enzymatic.60(3-4)138-144	有	2009,
171	Horinouchi, N., T. Kawano, T. Sakai, S. Matsumoto, M. Sasaki, Y. Mikami, J. Ogawa, S. Shimizu	京都大学大学院農学研究科	Screening and characterization of a phosphopentomutase useful for enzymatic production of 2'-deoxyribonucleoside.	New Biotechnol. 26(1-2)75-82	有	2009,
172	Yamamura, A., S. Maruoka, J. Ohtsuka, T. Miyakawa, K. Nagata, M. Kataoka, N. Kitamura, S.	京都大学大学院農学研究科	Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of conjugated polyketone reductase C2 (CPR-C2) from <i>Candida parapsilosis</i> IFO 0708.	Acta Cryst. F65(11)1145-1148	有	2009,
173	Kodera, T., S. V. Smirnov, N. N. Samsonova, Y. I. Kozlov, R. Koyama, M. Hibi, J. Ogawa, K. Yokozeki, S.	京都大学大学院農学研究科	A novel L-isoleucine hydroxylating enzyme, L-isoleucine dioxygenase from <i>Bacillus thuringiensis</i> , produces (2S,3R,4S)-4-hydroxyisoleucine.	Biochem. Biophys. Res. Commun. 390(3)506-510	有	2009,
174	Kishino, S., J. Ogawa, K. Yokozeki, S.	京都大学大学院農学研究科	Microbial production of conjugated fatty acids.	Lipid Technol. 21(8-9)177-181	有	2009,
175	櫻谷英治, 安藤晃規, 小川 順, 清水 昌	京都大学大学院農学研究科	機能性脂質の微生物による生産: アラキドン酸に関連する油脂の発酵生産を中心として.	蛋白質 核酸 酵素 54 (6)725-734	無	2009,
176	小川 順, 清水 昌	京都大学大学院農学研究科	微生物酵素の産業利用 その最前線を探る.	化学と生物 47(6)412-418	無	2009,

論文(15/31)

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
177	Nakatani, M., M. Hibi, M. Minoda, J. Ogawa, K. Yokozeki and S. Shimizu	京都大学大学院農学研究科	Two laccase isoenzymes and a peroxidase of a commercial laccase-producing basidiomycete, <i>Trametes</i> sp. Ha1	New Biotechnol. 27(4) 317-323	有	2010,
178	Kishino, S., J. Ogawa, A. Ando, K. Yokozeki and S. Shimizu	京都大学大学院農学研究科	Microbial production of conjugated γ -linolenic acid from γ -linolenic acid by <i>Lactobacillus plantarum</i> AKU 1009a	J. Applied Microbiol. 108(6)2012-2018	有	2010,
179	Sakuradani, E..	京都大学大学院農学研究科	Advances in the Production of Various Polyunsaturated Fatty Acids through Oleaginous Fungus <i>Mortierella alpina</i> Breeding	Biosci. Biotechnol. Biochem. 74(5)908-917	有	2010,
180	Sasaki, Y., M. Kataoka, N. Urano, J. Ogawa, A. Iwasaki, J. Hasegawa, K. Isobe	京都大学大学院農学研究科	Cloning, sequencing and expression analysis of a gene encoding alcohol oxidase in <i>Paenibacillus</i> sp. AIU311	J. Biosci. Bioeng. 110(2)147-151	有	2010,
181	片岡道彦, 清水 昌	京都大学大学院農学研究科	酵素法によるキラルアルコールの生産①	酵素利用技術体系 第5編 - 第1章 - 第5節1 (小宮山真 監修), エヌ・ティー・エス, 418-422	無	2010,
182	小川 順, 櫻谷英治, 岸野重信, 安藤晃規, 清水 昌	京都大学大学院農学研究科	有用脂肪酸の生産	酵素利用技術体系 第5編 - 第1章 - 第5節2 (小宮山真 監修) エヌ・ティー・エス, 430-433	無	2010,
183	Sakuradani, E., A. Ando, J. Ogawa and S. Shimizu	京都大学大学院農学研究科	Arachidonic Acid-Producing <i>Mortierella alpina</i> : Creation of Mutants, Isolation of the Related Enzyme Genes, and Molecular Breeding	Single Cell Oils - Microbial and Algal Oils, 2nd Edition (eds. Z. Cohen and C. Ratledge), AOCS Press, 29-49	無	2010,
184	岸野重信, 小川 順	京都大学大学院農学研究科	バイオマスからの有用物質生産プロセス 最前線 脂肪酸誘導体の合成	バイオインダストリー (11)32-37	無	2010,
185	岸野重信, 小川 順	京都大学大学院農学研究科	脂肪酸誘導体の合成	地球環境シリーズ エコバイオリアファイナリー - 脱石油社会へ移行するための環境ものづくり戦略- (植田充美, 田丸浩 監修), シーエムシー	無	2010,
186	浦野信行, 清水 昌, 片岡道彦	京都大学大学院農学研究科	組換え微生物による1-プロパノール生産	地球環境シリーズ エコバイオリアファイナリー - 脱石油社会へ移行するための環境ものづくり戦略- (植田充美, 田丸浩 監修), シーエムシー	無	2010,
187	片岡道彦, 清水 昌	京都大学大学院農学研究科	パントテン酸	ビタミン総合事典(日本ビタミン学会編), 朝倉書店, 268-277	無	2010,
188	櫻谷英治	京都大学大学院農学研究科	多様な高度不飽和脂肪酸生合成経路と生産への応用	生化学 82(12)1128-1132	無	2010,
189	Sakuradani, E., J. Ogawa, S. Kishino, A. Ando, K. Yokozeki, S. Shimizu.	京都大学大学院農学研究科	Oils, Microbial Production	Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (ed. by M.C. Flickinger) John Wiley &	無	2010,

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
190	Shimizu, S., M. Kataoka	京都大学大学院農学研究科	Aldehyde reductase (Carbonyl reductase)	Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (ed. by M.C. Flickinger) John Wiley &	無	2010,
191	Shimizu, S., M. Kataoka	京都大学大学院農学研究科	Lactonohydrolase (Lactonase)	Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (ed. by M.C. Flickinger) John Wiley &	無	2010,
192	Shimizu, S., M. Kataoka	京都大学大学院農学研究科	Pantothenic Acid and Related Compounds	Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (ed. by M.C. Flickinger) John Wiley &	無	2010,
193	Smirnov, S.V., T. Kodera, N.N. Samsonova, V.A. Kotlyarova, N.Y. Rushkevich, A.D. Kivero, P. M. Sokolov, M. Hibi, J. Ogawa, S. Shimizu	京都大学大学院農学研究科	Metabolic engineering of <i>Escherichia coli</i> to produce (2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>S</i>)-4-hydroxyisoleucine	Appl. Microbiol. Biotechnol. 88(3)719-726	有	2010,
194	Hasegawa, J., H. Nanba, Y. Yasohara	(株)カネカ	Application of a multiple-enzyme system for chiral alcohol production.	Asymmetric Catalysis on Industrial Scale: Challenges, Approaches and Solutions (eds. H.U. Blaser and E. Schmidt), Wiley-VCH, 81-110	無	2010,
195	Nara, T.Y., H. Togashi, S. Ono, M. Egami, C. Sekikawa, Y. Suzuki, I. Masuda, J. Ogawa, N. Horinouchi, S. Shimizu, F.	京都大学大学院農学研究科	Improvement of aldehyde tolerance and sequential aldol condensation activity of deoxyriboaldolase via immobilization on interparticle pore type mesoporous silica	Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 68(2)181-186	有	2011,
196	Urano, N., M. Kataoka, T. Ishige, S. Kita, K. Sakamoto, S. Shimizu	京都大学大学院農学研究科	Genetic analysis around aminoalcohol dehydrogenase gene of <i>Rhodococcus erythropolis</i> MAK154: a putative GntR transcription factor in transcriptional regulation	Appl. Microbiol. Biotechnol. 89(3)739-746	有	2011,
197	Ogawa, J., T. Kodera, S.V. Smirnov, M. Hibi, N.N. Samsonova, R. Koyama, H. Yamanaka, J. Mano, T. Kawashima, K. Yokozeki, S.	京都大学大学院農学研究科	A novel l-isoleucine metabolism in <i>Bacillus thuringiensis</i> generating (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-4-hydroxyisoleucine, a potential insulinotropic and anti-obesity amino acid	Appl. Microbiol. Biotechnol. in press	有	2011,
198	Urano, N., S. Fukui, S. Kumashiro, T. Ishige, S. Kita, K. Sakamoto, M.	京都大学大学院農学研究科	Directed evolution of an aminoalcohol dehydrogenase for efficient production of double chiral aminoalcohols	J. Biosci. Bioeng., in press	有	2011,

論文(17/31)

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
199	Misawa, N., M. Nodate, T. Otomatsu, K. Shimizu, C. Kaido, M. Kikuta, A. Ideno, H. Ikenaga,	京都大学大学院農学研究科	Bioconversion of substituted naphthalenes and β -eudesmol with the cytochrome P450 BM3 variant F87V	Appl. Microbiol. Biotechnol. in press	有	2011,
200	宮永 顕正	東京大学	フェノール性脂質の生合成に関わる新規な脂肪酸合成酵素	酵素工学ニュース1、59: 25-29	有	2008
201	勝山 陽平	東京大学	クルクミノイド合成酵素の発見、触媒機構とその応用	バイオサイエンスとインダストリー、66: 369-371	有	2008
202	堀之内 未治	東京大学	Chemical biology, biological chemistry, chemical genetics それともchemistry & biology	細胞工学、28: 386-387	有	2009
203	大西 康夫	東京大学	微生物ホルモンのケミカルジェネティク	細胞工学、28: 360-365	有	2009
204	大西 康夫	東京大学	微生物ホルモンのケミカルバイオロジー	化学と生物、47: 419-	有	2009
205	Hirano, Setsu	東京大学	Control of the <i>Streptomyces</i> subtilisin inhibitor gene by AdpA in the A-factor regulatory cascade in <i>Streptomyces griseus</i> .	J. Bacteriol. 188:6207-6216	有	2006
206	Miyahisa, Ikuo	東京大学	Combinatorial biosynthesis of flavones and flavonols in <i>Escherichia coli</i> .	Appl. Microbiol. Biotechnol. 71:53-58	有	2006
207	Funa, Nobutaka	東京大学	Pentaketide resorcylic acid synthesis by type III polyketide synthase from <i>Neurospora crassa</i> .	J. Biol. Chem. 282: 14476-14481	有	2007
208	Higashi, Tatsuichiro	東京大学	A-factor and phosphate-depletion signals are transmitted to the grixazone biosynthesis genes via the pathway-specific transcriptional activator GriR.	J. Bacteriol. 189:3515-3524	有	2007
209	Horinouchi, Sueharu	東京大学	Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus <i>Streptomyces</i> .	Biosci. Biotechnol. Biochem. 71:283-299	有	2007
210	Kato, Jun-ya	東京大学	Biosynthesis of γ -butyrolactone autoregulators that switch on secondary metabolism and morphological development in <i>Streptomyces</i> .	Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:2378-2383	有	2007
211	Katsuyama, Yohei	東京大学	Precursor-directed biosynthesis of stilbene methyl ethers in <i>Escherichia coli</i> .	Biotechnol. J. 2:1286-1293	有	2007
212	Katsuyama, Yohei	東京大学	Synthesis of unnatural flavonoids and stilbenes by exploiting the plant biosynthetic pathway in <i>Escherichia coli</i> .	Chem. Biol. 14:613-621	有	2007
213	Katsuyama, Yohei	東京大学	One-pot synthesis of genistein from tyrosine by coinubation of genetically engineered <i>Escherichia coli</i> and <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cells.	Appl. Microbiol. Biotechnol. 73:1143-1149	有	2007
214	Katsuyama, Yohei	東京大学	<i>In vitro</i> synthesis of curcuminoids by type III polyketide synthase from <i>Oryza sativa</i> .	J. Biol. Chem. 282:37702-37709	有	2007

論文(18/31)

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
215	Suzuki, Hirokazu	東京大学	Arylamine <i>N</i> -acetyltransferase responsible for acetylation of 2-aminophenols in <i>Streptomyces griseus</i> .	J. Bacteriol. 189:2155-2159	有	2007
216	Tanaka, Akiko	東京大学	AfsR recruits RNA polymerase to the <i>afsS</i> promoter: a model for transcriptional activation by SARPs.	J. Mol. Biol. 369:322-333	有	2007
217	Funabashi, Masanori	東京大学	Phenolic lipids synthesized by type III polyketide synthase confer penicillin resistance on <i>Streptomyces griseus</i> .	J. Biol. Chem. 283:13983-13991	有	2008
218	Hirano, Setsu	東京大学	Conditionally positive effect of the TetR-family transcriptional regulator AtrA on streptomycin production by <i>Streptomyces griseus</i> .	Microbiology 154:905-914	有	2008
219	Horinouchi, Sueharu	東京大学	Combinatorial biosynthesis of non-bacterial and unnatural flavonoids, stilbenoids and curcuminoids by microorganisms.	J. Antibiot. 61:709-728	有	2008
220	Katsuyama, Yohei	東京大学	Production of curcuminoids by <i>Escherichia coli</i> containing an artificial biosynthesis pathway.	Microbiology 154:2620-2628	有	2008
221	Miyana, Akimasa	東京大学	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	有	2008
222	Ohnishi, Yasuo	東京大学	Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism <i>Streptomyces griseus</i> IFO 13350.	J. Bacteriol. 190:4050-4060	有	2008
223	Suzuki, Hirokazu	東京大学	A novel pair of terminal protein and telomere-associated protein for replication of the linear chromosome of <i>Streptomyces griseus</i> .	Biosci. Biotechnol. Biochem. 72:2973-2980	有	2008
224	Hara, Hirofumi	東京大学	DNA microarray analysis of global gene regulation by A-factor in <i>Streptomyces griseus</i> .	Microbiology 155:2197-2210	有	2009
225	Horinouchi, Sueharu	東京大学	Combinatorial biosynthesis of plant medicinal polyketides by microorganisms.	Curr. Opin. Chem. Biol. 13:197-204	有	2009
226	Katsuyama, Yohei	東京大学	Curcuminoid biosynthesis by two type III polyketide synthases in the herb <i>Curcuma longa</i> .	J. Biol. Chem. 284:11160-11170	有	2009
227	Katsuyama, Yohei	東京大学	Identification and characterization of multiple curcumin synthases from the herb <i>Curcuma longa</i> .	FEBS Lett. 583:2799-2803	有	2009
228	Marushima, Kazuya	東京大学	CebR as a global regulator for cellulose/cellooligosaccharide catabolism affects morphological differentiation in <i>Streptomyces griseus</i> .	J. Bacteriol. 191:5930-5940	有	2009
229	Tezuka, Takeaki	東京大学	Identification and gene disruption of small noncoding RNAs in <i>Streptomyces</i>	J. Bacteriol. 191:4896-4904	有	2009

論文(19/31)

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
230	Akanuma, Genki	東京大学	Dynamic changes in the extracellular proteome caused by absence of a pleiotropic regulator AdpA in <i>Streptomyces griseus</i> .	Mol. Microbiol. 73:898-912	有	2009
231	Miyanaga, Akimasa	東京大学	Enzymatic synthesis of bis-5-alkylresorcinols -producing type III polyketide synthases.	J. Antibiot. 62:371-376	有	2009
232	Awakawa, Takayoshi	東京大学	Physically discrete beta -lactamase-type thioesterase catalyzes product release in atrochryson synthesis by iterative type I polyketide synthase.	Chem. Biol. 16:613-623	有	2009
233	Nakano, Chiaki	東京大学	Biosynthesis of aliphatic polyketides by type III polyketide synthase and methyltransferase in <i>Bacillus subtilis</i> .	J. Bacteriol. 191:4916-4923	有	2009
234	Tezuka, Takeaki	東京大学	Conditional effect of the deletion of <i>eshA</i> on streptomycin production in <i>Streptomyces griseus</i> IFO13350.	Actinomycetologica 24:45-50	有	2010
235	Katsuyama, Yohei	東京大学	Production of dehydrogingerdione derivatives in <i>Escherichia coli</i> by exploiting a curcuminoid synthase from <i>Oryza sativa</i> and a beta-oxidation pathway from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	ChemBiochem 11:2034-2041	有	2010
236	Noguhci, Akio	東京大学	A copper-containing oxidase catalyzes C-nitrosation in nitrosobenzamide biosynthesis.	Nat. Chem. Biol. 6:641-643	有	2010
237	Katsuyama, Yohei	東京大学	Precursor-directed biosynthesis of curcumin analogs in <i>Escherichia coli</i> .	Biosci. Biotechnol. Biochem.	有	2010
238	Noguhci, Akio	東京大学	Substrate specificity of benzamide synthetase involved in 4-hydroxy-3-nitrosobenzamide biosynthesis.	J. Antibiot. 74:641-645	有	2011
239	Katsuyama, Yohei	東京大学	Structural and biochemical elucidation of mechanism for decarboxylative condensation of beta-keto acid by curcumin synthase.	J. Biol. Chem. Epub ahead of print	有	2011
240	Akanuma, Genki	東京大学	Control of aerial mycelium formation by the BldK oligopeptide ABC transporter in <i>Streptomyces griseus</i> .	FEMS Microbiol. Lett. 315:54-62	有	2011
241	Awakawa, Takayoshi	東京大学	Characterization of the biosynthesis gene cluster for alkyl-O-dihydrogeranyl-methoxyhydroquinones in <i>Actinoplanes missouriensis</i> .	ChemBiochem 12:439-448	有	2011
242	T. Arai, A. Kosugi, H. Chan, R. Koukiekolo, H. Yukawa, M. Inui and R.H. Doi	(財)地球環境産業技術研究機構	Properties of cellulosomal family 9 cellulases from <i>Clostridium cellulovorans</i> .	Appl. Microbiol. Biotechnol. 71:654-660	有	2006,

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
243	N. Suzuki, N. Okai, H. Nonaka, Y. Tsuge, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	High throughput transposon mutagenesis of <i>Corynebacterium glutamicum</i> and construction of a single-gene disruptant mutant library.	<i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 72:3750-3755	有	2006,
244	H. Kawaguchi, A.A. Vertès, S. Okino, M. Inui and H.	(財)地球環境産業技術研究機構	Engineering of a Xylose Metabolic Pathway in <i>Corynebacterium glutamicum</i> .	<i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 72:3418-3428	有	2006,
245	A.A. Vertès, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Implementing biofuels on a global scale.	<i>Nat. Biotechnol.</i> 24:761-764.	有	2006,
246	A. Kosugi, T. Arai and R.H. Doi	カリフォルニア大学デービス校	Degradation of cellosome-produced cello-oligosaccharides by an extracellular non-celulosomal beta-glucan glucohydrolase, BglA, from <i>Clostridium cellulovorans</i> .	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 349:20-23	有	2006,
247	S. Kurihara, S. Oda, H. Kumagai and H. Suzuki	石川県立大学	γ -Glutamyl- γ -aminobutyrate hydrolase in the putrescine utilization pathway of <i>Escherichia coli</i> K-12.	<i>FEMS Microbiology Letters</i> 256:318-323	有	2006,
248	T. Okada, H. Suzuki, K. Wada, H. Kumagai and K. Fukuyama	石川県立大学	Crystal structures of γ -glutamyltranspeptidase from <i>E. coli</i> •• a key enzyme in glutathione metabolism, and its reaction intermediate.	<i>Proceedings of the National Academy of Sciences USA</i> 103:6472-6476	有	2006,
249	L. Han, J. Hiratake, N. Tachi, H. Suzuki, H. Kumagai and K. Sakata	石川県立大学	γ -(Monophenyl)phosphono glutamate analogues as mechanism-based inhibitors of γ -glutamyl transpeptidase.	<i>Bioorganic and Medical Chemistry</i> 14:6043-6054	有	2006,
250	J. Hong, H. Tamaki and H. Kumagai.	石川県立大学	Unusual hydrophobic linker region of β -glucosidase (BGLII) from <i>Thermoascus aurantiacus</i> are required for hyper activation by organic solvents.	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 73:80-88	有	2006,
251	Y. Makimura, S. Watanabe, T. Suzuki, Y. Suzuki, H. Ishida, M. Kiso, T. Katayama, H. Kumagai and K. Yamamoto.	石川県立大学	Chemoenzymatic synthesis and application of a sialoglycopolymer with a chitosan backbone as a potent inhibitor of human influenza virus hemagglutination.	<i>Carbohydrate Research</i> 341:1803-1808	有	2006,
252	J. Nakamura, S. Kanno, E. Kimura, K. Matsui, T. Nakamatsu and M.	東京工業大学	Temperature-sensitive cloning vector for <i>Corynebacterium glutamicum</i> .	<i>Plasmid</i> 56:179-186	有	2006,
253	M. Wachi, K. Osaka, T. Kohama, K. Sasaki, I. Ohtsu, N. Iwai, A. Takada	東京工業大学	Transcriptional analysis of the <i>Escherichia coli mreBCD</i> genes responsible for morphogenesis and chromosome segregation.	<i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> 70:2712-2719	有	2006,
254	H. Ito, A. Ura, Y. Oyamada, A. Tanitame, H. Yoshida, S. Yamada, M. Wachi and J. Yamagishi.	東京工業大学	A 4-aminofurazan derivative - A189 - inhibits assembly of bacterial cell division protein FtsZ <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> .	<i>Microbiol. Immunol.</i> 50:759-764	有	2006,
255	T. Kruse, B. Blagoev, A. Løbner-Olesen, M. Wachi, K. Sasaki, N. Iwai, M. Mann	東京工業大学	Actin homolog MreB and RNA polymerase interact and are both required for chromosome segregation in <i>Escherichia coli</i> .	<i>Genes Dev.</i> 20:113-124	有	2006,

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
256	15. Y. Oyamada, H. Ito, M. Fujimoto-Nakamura, A. Tanitame, N. Iwai, K. Nagai, J. Yamagishi and M. Wachi.	東京工業大学	Anucleate cell blue assay: a useful tool for identifying novel type II topoisomerase inhibitors. <i>Antimicrob.</i>	<i>Agents Chemother</i> 50:348-350	有	2006,
257	T. Arai, S. Matsuoka, H-Y. Cho, H. Yukawa, M. Inui, S-L. Wong and R.H. Doi	(財)地球環境産業技術研究機構	Synthesis of <i>Clostridium cellulovorans</i> minicellulosomes by intercellular complementation.	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA.</i> 104:1456-1460	有	2007,
258	S. Sakai, Y. Tsuchida, H. Nakamoto, S. Okino, O.	(財)地球環境産業技術研究機構	Effect of Lignocellulose-Derived Inhibitors on Growth of and Ethanol Production by Growth-Arrested <i>Corynebacterium glutamicum</i> R.	<i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 73:2349-2353	有	2007,
259	Y. Tsuge, N. Suzuki, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Random segment deletion based on IS31831 and Cre/ <i>loxP</i> excision system in <i>Corynebacterium glutamicum</i> .	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 74:1333-1341	有	2007,
260	H. Yukawa, C.A. Omumasaba, H. Nonaka, P. Kós, N. Okai, N. Suzuki, M. Suda, Y. Tsuge, J. Watanabe, Y. Ikeda, A.A. Vertès and M. Inui	(財)地球環境産業技術研究機構	Comparative analysis of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> group and complete genome sequence of strain R.	<i>Microbiology</i> 153:1042-1058	有	2007,
261	T. Nishimura, A.A. Vertès, Y. Shinoda, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Anaerobic growth of <i>Corynebacterium glutamicum</i> using nitrate as a terminal electron acceptor.	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 75:889-897	有	2007,
262	S.O. Han, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Expression of <i>Corynebacterium glutamicum</i> Glycolytic Genes Varies with Carbon Source and Growth Phase.	<i>Microbiology</i> 153:2190-2202	有	2007,
263	M. Inui, M. Suda, S. Okino, H. Nonaka, L.G. Puskás, A.A. Vertès and H.	(財)地球環境産業技術研究機構	Transcriptional profiling of <i>Corynebacterium glutamicum</i> metabolism during organic acid production under oxygen deprivation conditions.	<i>Microbiology</i> 153:2491-2504	有	2007,
264	Y. Tsuge, N. Suzuki, K. Ninomiya, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Isolation of a new insertion sequence, IS13655, and its application to <i>Corynebacterium glutamicum</i> genome mutagenesis.	<i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> 71:1683-1690	有	2007,
265	A.A. Vertès, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Alternative Technologies for Biotechnological Fuel Ethanol Manufacturing.	<i>J. Chem. Technol. Biotechnol.</i> 82:693-697	有	2007,
266	A. Kotrbova-Kozak, P. Kotrba, M. Inui, J. Sajdok and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Transcriptionally regulated adhA gene encodes alcohol dehydrogenase required for ethanol and <i>n</i> -propanol utilization in <i>Corynebacterium glutamicum</i> R.	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 76:1347-1356	有	2007,
267	S. Matsuoka, H. Yukawa, M. Inui and R.H. Doi	(財)地球環境産業技術研究機構	Synergistic Interaction of <i>Clostridium cellulovorans</i> Cellulosomal Cellulases and HbpA.	<i>J. Bacteriol.</i> 189:7190-7194	有	2007,
268	J. Cha, S. Matsuoka, H. Chan, H. Yukawa, M. Inui and R.H.	(財)地球環境産業技術研究機構	Effect of the multiple copies of cohesins on cellulase and hemicellulase activities of <i>Clostridium cellulovorans</i> minicellulosome.	<i>J. Microbiol. Biotech.</i> 17:1782-1788	有	2007,

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
269	K. Yasuda, T. Jojima, M. Suda, S. Okino, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Analyses of the acetate-producing pathways in <i>Corynebacterium glutamicum</i> under oxygen-deprived conditions.	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 77:853-860	有	2007,
270	N. Suzuki, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Site-directed integration system using a combination of mutant <i>lox</i> sites for <i>Corynebacterium glutamicum</i> .	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 77:871-878	有	2007,
271	R.H. Doi and S. Matsuoka.	カリフォルニア大学デービス校	Structure, function and application of cellulolytic complex, "cellulosome", of <i>Clostridium cellulovorans</i> .	<i>Bioscience and Industry.</i> 65:121-125	有	2007,
272	V. Norris, T. den Blaauwen, A. Cabin-Flaman, R.H. Doi, R. Harshey, L. Janniere, A. Jimenez-sanchez, D.J. Jin, P.A. Levin, E. Mileykovskaya, A. Minsky, T. Pugsley,	カリフォルニア大学デービス校	Functional taxonomy of bacterial hyperstructures.	<i>Microb. Mol. Biol. Rev.</i> 71:230-253	有	2007,
273	V. Norris, T. den Blaauwen, R.H. Doi, R. Haarshey, L. Janniere, A. Jimenez-Sanchez, D.J. Jin, P.A. Levin, E. Mileykovskaya, A. Minsky, G. Misevic, C. Ripoli, M. Saier Jr., K. Skarstad and M. Thellier	カリフォルニア大学デービス校	Towards a hyperstructure taxonomy.	<i>Ann. Rev. Microbiol.</i> 61:309-329	有	2007,
274	18. G. Boanca, A. Sand, T. Okada, H. Suzuki, H. Kumagai, K. Fukuyama and J.J.	石川県立大学	Autoprocessing of <i>H. pylori</i> γ -glutamyltranspeptidase leads to the formation of a threonine-threonine catalytic dyad.	<i>J. Biol. Chem.</i> 282:534-541	有	2007,
275	J. Hong, H. Tamaki and H. Kumagai.	石川県立大学	Cloning and functional expression of thermo-stable β t-glucosidase gene from <i>Thermoascus aurantiacus</i> .	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 73:1331-133	有	2007,
276	J. Wada, R. Suzuki, S. Fushinobu, M. Kitaoka, T. Wakagi, H. Shoun, H. Ashida, H. Kumagai, T. Katayama and K.	石川県立大学	Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the galacto-N-biose-/lacto-N-biose I-binding protein (GL-BP) of the ABC transporter from <i>Bifidobacterium longum</i> JCM1217.	<i>Acta Crystallographica Section F. Structural Biology and Crystallography Communications.</i> 63:751-753	有	2007,
277	H. Tamaki, A. Shimada, Y. Ito, M. Ohya, J. Takase, M. Miyashita, H. Miyagawa, H. Nozaki, R. Nakayama and H. Kumagai.	石川県立大学	LPT1 encodes a membrane-bound <i>O</i> -acyltransferase involved in the acylation of lysophospholipids in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	<i>J. Biol. Chem.</i> 282:34288-34298	有	2007,

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
278	M. Nagae, A. Tsuchiya, T. Katayama, S. Wakatsuki and R. Kato.	石川県立大学	Structural basis on the catalytic reaction mechanism of novel 1,2- α -L-fucosidase (AfcA) from <i>Bifidobacterium bifidum</i> .	<i>J. Biol. Chem.</i> 282:18497-18509	有	2007,
279	J. Hong, Y. Wang, H. Kumagai and H. Tamaki.	石川県立大学	Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes.	<i>J. Biotechnol.</i> 130:114-123	有	2007,
280	A. Takada G. Umitsuki, K. Nagai and M. Wachi.	東京工業大学	RNase E is required for induction of the glutamate-dependent acid resistance system in <i>Escherichia coli</i> .	<i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> 71:158-164	有	2007,
281	N. Iwai, T. Fujii, H. Nagura, M. Wachi and T. Kitazume.	東京工業大学	Structure-activity relationship study of the bacterial actin-like protein MreB inhibitors: effects of substitution of benzyl group in <i>S</i> -benzylisothiouraea.	<i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> 71:246-248	有	2007,
282	H. Nakagawa, K. Hasumi, M. Takami, S. Aida-Hyugaji, J.T. Woo, K. Nagai, T. Ishikawa and M. Wachi.	東京工業大学	Identification of two biologically crucial hydroxyl groups of (-)-epigallocatechin gallate in osteoclast culture.	<i>Biochem. Pharmacol.</i> 73:34-43	有	2007,
283	J. Nakamura, S. Hirano, H. Ito and M. Wachi.	東京工業大学	Mutations of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog,	<i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 73:4491-4498	有	2007,
284	28. T. Sakai, N. Nakamura, G. Umitsuki, K. Nagai and M. Wachi.	東京工業大学	Increased production of pyruvic acid by <i>Escherichia coli</i> RNase G mutants in combination with cra mutations.	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 76:183-192	有	2007,
285	Y. Oyamada, J. Yamagishi, T. Kihara, H. Yoshida, M. Wachi and H. Ito.	東京工業大学	Mechanism of inhibition of DNA gyrase by ES-1273, a novel DNA gyrase inhibitor.	<i>Microbiol. Immunol.</i> 51:977-984	有	2007,
286	T. Watanabe, S. Furukawa, T. Kawarai, M. Wachi, H. Ogihara and M. Yamasaki.	東京工業大学	Cytoplasmic acidification may occur in high-pressure carbon dioxide-treated <i>Escherichia coli</i> K12.	<i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> 71:2522-2526	有	2007,
287	Y. Horie, Y. Ito, M. Ono, N. Moriwaki, H. Kato, Y. Hamakubo, T. Amano, M. Wachi, M. Shirai and M. Asayama.	東京工業大学	Dark-induced mRNA instability involves RNase E/G-type endoribonuclease cleavage at the AU-box and SD sequences in cyanobacteria.	<i>Mol. Genet. Genomics.</i> 278:331-346	有	2007,
288	A.A. Vertès, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Technological Options for Biological Fuel Ethanol.	<i>J. Mol. Microbiol. Biotechnol.</i> 15:16-30	有	2008,
289	Y. Tanaka, N. Okai, H. Teramoto, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Regulation of the expression of phosphoenolpyruvate, carbohydrate phosphotransferase system (PTS) genes in <i>Corynebacterium glutamicum</i> R.	<i>Microbiology</i> 154:264-274	有	2008,
290	H. Kawaguchi, M. Sasaki, A.A. Vertès, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Engineering of an L-arabinose metabolic pathway in <i>Corynebacterium glutamicum</i> .	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 77:1053-1062	有	2008,
291	H. Ogino, H. Teramoto, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	DivS, a novel SOS inducible cell-division suppressor in <i>Corynebacterium glutamicum</i> .	<i>Mol. Microbiol.</i> 67:597-608	有	2008,

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
292	Y. Tanaka, H. Teramoto, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Regulation of expression of general components of the PTS by the global regulator SugR in <i>Corynebacterium</i>	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 78:309-318	有	2008,
293	S. Okino, M. Suda, K. Fujikura, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Production of D-lactic acid by <i>Corynebacterium glutamicum</i> under oxygen deprivation.	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 78:449-454	有	2008,
294	T. Nishimura, H. Teramoto, A.A. Vertès, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	ArnR, a novel transcriptional regulator, represses expression of the <i>narKGHJI</i> operon in <i>Corynebacterium glutamicum</i> .	<i>J. Bacteriol.</i> 190:3264-3273	有	2008,
295	N. Suzuki, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Random genome deletion methods applicable to prokaryotes.	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 79:519-526(Mini-Review)	有	2008,
296	S. Ehira, T. Shirai, H. Teramoto, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Group 2 sigma factor SigB of <i>Corynebacterium glutamicum</i> positively regulates glucose metabolism under conditions of oxygen deprivation.	<i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 74:5146-5152	有	2008,
297	H. Teramoto, T. Shirai, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Identification of a gene encoding a transporter essential for utilization of C4-dicarboxylates in <i>Corynebacterium glutamicum</i> .	<i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 74:5290-5296	有	2008,
298	S.O. Han, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Effect of carbon source availability and growth phase on expression of <i>Corynebacterium glutamicum</i> genes involved in tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass.	<i>Microbiology</i> 154:3073-3083	有	2008,
299	S. Okino, R. Noburyu, M. Suda, T. Jojima, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered <i>Corynebacterium glutamicum</i> strain.	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 81:459-464	有	2008,
300	K. Toyoda, H. Teramoto, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Expression of the <i>gapA</i> gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of <i>Corynebacterium glutamicum</i> is regulated by the global regulator SugR.	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 81:291-301	有	2008,
301	M. Suda, H. Teramoto, T. Imamiya, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Transcriptional regulation of <i>Corynebacterium glutamicum</i> methionine biosynthesis genes in response to methionine supplementation under oxygen deprivation.	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 81:505-513	有	2008,
302	M. Sasaki, T. Jojima, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Simultaneous utilization of D-cellobiose, D-glucose, and D-xylose by recombinant <i>Corynebacterium glutamicum</i> under oxygen-deprived conditions.	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 81:691-699	有	2008,
303	Y. Tsuge, H. Ogino, H. Teramoto, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Deletion of <i>cgR_1596</i> and <i>cgR_2070</i> , encoding NlpC/P60 proteins, causes a defect in cell separation in <i>Corynebacterium glutamicum</i> R.	<i>J. Bacteriol.</i> 190:8204-8214	有	2008,
304	H. Sato, K. Orishimo, T. Shirai, T. Hirasawa, K.	東京工業大学	Distinct roles of two anaplerotic pathways in glutamate production induced by biotin limitation in <i>Corynebacterium</i>	<i>J. Biosci. Bioeng.</i> 106:51-58	有	2008,
305	YG. Gao, H. Suzuki, H. Itou, Y. Zhou Y. Tanaka, M. Wachi, N. Watanabe, I.	東京工業大学	Structural and functional characterization of the LldR from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : a transcriptional repressor involved in L-lactate and sugar utilization.	<i>Nucleic Acids Res.</i> 36:7110-7123	有	2008,
306	R. Tatsumi and M. Wachi	東京工業大学	TolC-dependent exclusion of porphyrins in <i>Escherichia coli</i> .	<i>J. Bacteriol.</i> 190:6228-6233	有	2008,

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
307	Y. Takagi, R. Akada, H. Kumagai, K. Yamamoto and H. Tamaki.	石川県立大学	Loss of heterozygosity is induced in <i>Candida albicans</i> by ultraviolet irradiation.	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 77:1073-1082	有	2008,
308	T. Koyanagi, E. Yoshida, H. Minimi, T. Katayama and H. Kumagai.	石川県立大学	A rapid, simple, effective method for constructing a randomly mutagenized plasmid library, free from ligation.	<i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> 72:1134-1137	有	2008,
309	Y. Tsuchida, S. Kimura, N. Suzuki, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Characterization of a new 2.4-kb plasmid of <i>Corynebacterium casei</i> and development of stable corynebacterial cloning vector.	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 81:1107-1115	有	2009,
310	N. Suzuki, K. Watanabe, N. Okibe, Y. Tsuchida, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Identification of new secreted proteins and secretion of heterologous amylase by <i>C. glutamicum</i> .	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 82:491-500	有	2009,
311	K. Toyoda, H. Teramoto, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Involvement of the LuxR-type transcriptional regulator RamA in regulation of expression of the <i>gapA</i> gene, encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of <i>Corynebacterium glutamicum</i> .	<i>J. Bacteriol.</i> 191:968-977	有	2009,
312	K. Watanabe, Y. Tsuchida, N. Okibe, H. Teramoto, N. Suzuki, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Scanning the <i>Corynebacterium glutamicum</i> R genome for high-efficiency secretion signal sequences.	<i>Microbiology</i> 155:741-750	有	2009,
313	K. Toyoda, H. Teramoto, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Molecular mechanism of SugR-mediated sugar-dependent expression of the <i>ldhA</i> gene encoding L-lactate dehydrogenase	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 83:315-327	有	2009,
314	S. Ehira, H. Teramoto, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Regulation of <i>Corynebacterium glutamicum</i> heat shock response by the extracytoplasmic-function sigma factor SigH and transcriptional regulators HspR and HrcA.	<i>J. Bacteriol.</i> 191:2964-2972	有	2009,
315	H. Kawaguchi, M. Sasaki, A.A. Vertès, M. Inui and H.	(財)地球環境産業技術研究機構	Identification and functional analysis of the gene cluster for L-arabinose utilization in <i>Corynebacterium</i>	<i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 75:3419-3429	有	2009,
316	H. Teramoto, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Regulation of expression of genes involved in quinate and shikimate utilization in <i>Corynebacterium glutamicum</i> .	<i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 75:3461-3468	有	2009,
317	K. Toyoda, H. Teramoto, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	The <i>ldhA</i> gene, encoding fermentative L-lactate dehydrogenase of <i>Corynebacterium glutamicum</i> , is under the control of positive feedback regulation mediated by LldR.	<i>J. Bacteriol.</i> 191:4251-4258	有	2009,
318	S. Ehira, H. Ogino, H. Teramoto, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Regulation of quinone oxidoreductase by the redox-sensing transcriptional regulator QorR in <i>Corynebacterium glutamicum</i> .	<i>J. Biol. Chem.</i> 284:16736-16742	有	2009,
319	M. Sasaki, T. Jojima, H. Kawaguchi, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Engineering of pentose transport in <i>Corynebacterium glutamicum</i> to improve simultaneous utilization of mixed sugars.	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 85:105-115	有	2009,

論文(26/31)

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
320	Y. Tanaka, H. Teramoto, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Identification of a second β -glucoside phosphoenolpyruvate, carbohydrate phosphotransferase system in <i>Corynebacterium glutamicum</i> R.	<i>Microbiology</i> 155:3652-3660	有	2009,
321	T. Maeda, T. Sakai and M. Wachi	東京工業大学	The <i>Corynebacterium glutamicum</i> NCgl2281 gene encoding an RNase E/G family endoribonuclease can complement the <i>Escherichia coli</i> <i>rng::cat</i> mutation but not the <i>rne-1</i> mutation.	<i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> 73:2281-2286	有	2009,
322	S. Inamoto, M. Takayama and M. Oishi	かずさDNA研究所	Isolation and Characterization of a Gene Encoding a Member of the Glycoside Hydrolase Family 6 from the Thermophilic Actinomycete <i>Thermobispora hispora</i>	<i>Biotechnol. of Lignocellulose Degradation and Biomass Utilization: Proceedings of Mie</i>	有	2009,
323	T. Jojima, C.A. Omumasaba, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook.	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 85:471-480(Mini-Review)	有	2010,
324	N. Okibe, N. Suzuki, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Isolation, evaluation and use of two strong, carbon source-inducible promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> .	<i>Lett. Appl. Microbiol.</i> 50:173-180	有	2010,
325	M. Sasaki, T. Jojima, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Xylitol production by recombinant <i>Corynebacterium glutamicum</i> under oxygen deprivation.	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 86:1057-1066	有	2010,
326	S. Ehira, H. Teramoto, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	A novel redox-sensing transcriptional regulator CyeR controls expression of an old yellow enzyme family protein in <i>Corynebacterium glutamicum</i> .	<i>Microbiology</i> 156:1335-1341	有	2010,
327	T. Jojima, M. Fujii, E. Mori, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Engineering of sugar metabolism of <i>Corynebacterium glutamicum</i> for production of amino acid L-alanine under oxygen deprivation.	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 87:159-165	有	2010,
328	Y. Tsuchida, S. Kimura, N. Suzuki, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Characterization of a 24-kb plasmid pCGR2 newly isolated from <i>Corynebacterium glutamicum</i> .	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 87:1855-1866	有	2010,
329	H. Teramoto, M. Suda, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Regulation of expression of genes involved in NAD de novo biosynthesis in <i>Corynebacterium glutamicum</i> .	<i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 76:5488-5495	有	2010,
330	N. Okibe, N. Suzuki, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Antisense-RNA-mediated plasmid copy number control in pCG1-family plasmids, pCGR2 and pCG1, in <i>Corynebacterium glutamicum</i> .	<i>Microbiology</i> 156:3609-3623	有	2010,
331	H. Teramoto, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Regulation of genes involved in sugar uptake, glycolysis and lactate production in <i>Corynebacterium glutamicum</i> .	<i>Future Microbiol.</i> 5:1475-1481	有	2010,
332	K. Sawada, S. Zen-in, M. Wada and A. Yokota	北海道大学	Metabolic changes in a pyruvate kinase gene deletion mutant of <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032.	<i>Metab. Eng.</i> 12:401-407	有	2010,

論文(27/31)

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
333	I.U. Heinemann, C. Schulz, W.-D. Schubert, D.W. Heinz, Y.-G. Wang, Y. Kobayashi, Y. Awa, M. Wachi, D. Jahn and M. Jahn	東京工業大学	Structure of the heme biosynthetic <i>Pseudomonas aeruginosa</i> porphobilinogen synthase in complex with the antibiotic alaremycin.	<i>Antimicrob. Agents Chemother.</i> 54:267-272	有	2010,
334	J. Kim, H. Fukuda, T. Hirasawa, K. Nagahisa, K. Nagai, M. Wachi and H. Shimizu	東京工業大学	Requirement of de novo synthesis of the OdhI protein in penicillin-induced glutamate production by <i>Corynebacterium glutamicum</i> .	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 86:911-920	有	2010,
335	E. Yoshida, M. Hidaka, S. Fushinobu, T. Koyanagi, H. Minami, H. Tamaki, M. Kitaoka, T. Katayama and H. Kumagai	石川県立大学	Role of a PA14 domain in determining substrate specificity of a glycoside hydrolase family 3 β -glucosidase from <i>Kluyveromyces marxianus</i> .	<i>Biochem. J.</i> 431:39-49	有	2010,
336	T. Nishimura, H. Teramoto, K. Toyoda, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Regulation of nitrate reductase operon <i>narKGHJI</i> by cyclic AMP-dependent regulator GlxR in <i>Corynebacterium glutamicum</i> .	<i>Microbiology</i> 157:21-28	有	2011,
337	Y. Tanaka, H. Teramoto, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Translation efficiency of antiterminator proteins is a determinant for the difference in glucose repression of two β -glucoside PTS gene clusters in <i>Corynebacterium glutamicum</i> R.	<i>J. Bacteriol.</i> 193:349-357	有	2011,
338	M. Sasaki, H. Teramoto, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Identification of mannose uptake and catabolism genes in <i>Corynebacterium glutamicum</i> and genetic engineering for simultaneous utilization of mannose and glucose.	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 89:1905-1916	有	2011,
339	T. Nishimura, H. Teramoto, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Gene expression profiling of <i>Corynebacterium glutamicum</i> during anaerobic nitrate respiration: induction of the SOS response for cell survival.	<i>J. Bacteriol.</i> 193:1327-1333	有	2011,
340	H. Teramoto, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Transcriptional regulators of multiple genes involved in carbon metabolism in <i>Corynebacterium glutamicum</i> .	<i>J. Biotechnol.</i>	有	(in press)
341	S. Yamamoto, M. Sakai, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Diversity of metabolic shift in response to oxygen deprivation in <i>Corynebacterium glutamicum</i> and its close relatives.	<i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i>	有	(in press)
342	T. Jojima, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Metabolic engineering of bacteria for lignocellulose biomass-based production of chemicals and fuels.	<i>Biofuels</i>	有	(in press)
343	N. Okibe, N. Suzuki, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Efficient markerless gene replacement in <i>Corynebacterium glutamicum</i> using a new temperature-sensitive plasmid.	<i>Journal of Microbiological Methods</i>	有	(in press)
344	T. Maeda and M. Wachi	東京工業大学	The <i>Corynebacterium glutamicum</i> RNase E/G family endoribonuclease encoded by NCgl2281 is involved in the 5' - maturation of 5S rRNA.	<i>Microbiology</i>	有	(in press)

論文(28/31)

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
345	鈴木伸昭、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	嫌気条件下におけるCell Factoryの開発	環境バイオテクノロジー学会誌 5:97-102	無	2006,
346	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオリファイナリー産業化 エネルギー・化学品生産	太陽エネルギー 32:15-18	無	2006,
347	吉野 巖、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオマス資源利用の内外動向	化学経済 53:59-66	無	2006,
348	沖野祥平、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオリファイナリーの現状と将来展望	エネルギー・資源 27:96-100	無	2006,
349	吉野 巖、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオエタノール開発の最新動向	ECO INDUSTRY 11:20-25	無	2006,
350	沖野祥平、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオマス資源の利活用推進に高効率な物質生産を可能にする革新的技術「RITEプロセス」	ウェブ ジャーナル 12:35-38	無	2006,
351	乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオリファイナリーの構築に向けて	電気評論 91:96-97	無	2006,
352	沖野祥平、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	高生産性バイオプロセス“RITEプロセス”によるバイオマスからの化学品・エネルギー生産	電気評論 91:64-65	無	2006,
353	沖野祥平、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオマスからのモノマーの発酵生産	丸善「エコマテリアルハンドブック」(山本良一 監修)	無	2006,
354	沖野祥平、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	Quick on the Straw	The Japan Journal 3:31	無	2007,
355	沖野祥平、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオエタノールの現状と展望	MATERIAL STAGE 6:62-65	無	2007,
356	沖野祥平、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオエタノールの現状と将来	太陽エネルギー 33:7-11	無	2007,
357	M.L. ウォルド	(財)地球環境産業技術研究機構	エタノール燃料の活路	日経サイエンス 37:88-97.(湯川英明 監修)	無	2007,
358	湯川英明、乾 将行	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオリファイナリー:早期実用化に向けて	生物工学会誌 85:177-179	無	2007,
359	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオ燃料の技術動向	OHM 94:43-46	無	2007,
360	沖野祥平、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	次世代バイオエタノール生産プロセスの開発	触媒 49:271-275	無	2007,
361	酒井伸介、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	稲わらなど原料にバイオマス燃料生産	ニューカントリー 54:30-31	無	2007,
362	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオ燃料の最新研究と課題	化学 62:25-28	無	2007,
363	沖野祥平、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	ソフトバイオマスからの燃料用エタノール製造の展望	週刊農林 1992:8-9, 1993:8-9	無	2007,
364	湯川英明、酒井伸介	(財)地球環境産業技術研究機構	稲わらなどを原料にしたバイオエタノール生産技術の開発	コージェネレーション 22:38-45	無	2007,
365	湯川英明、酒井伸介	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオ燃料は地球温暖化対策の救世主となれるか?	化学と生物 45:805-808	無	2007,

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
366	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオエタノールの現状と展望	紙パ技協誌 61:1450-1453	無	2007,
367	湯川英明、酒井伸介、乾 将行	(財)地球環境産業技術研究機構	RITEにおける燃料エタノール製造技術の開発	化学工学 71:804-807	無	2007,
368	H. Yukawa, M. Inui and A.A. Vertès	(財)地球環境産業技術研究機構	Genomes and Genome-Level Engineering of Amino Acid-Producing Bacteria.	In Amino Acid Biosynthesis - Pathways, Regulation and Metabolic Engineering, p.349-401. Edited by V.F. Wendisch. Heidelberg:	有	2007,
369	湯川英明、酒井伸介	(財)地球環境産業技術研究機構	RITEバイオプロセスによる燃料エタノール製造	シーエムシー出版「自動車用バイオ燃料技術の最前線」(山根浩二 監	無	2007,
370	鈴木伸昭、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ菌:コリネ型細菌における染色体大規模加工技術の開発	シーエムシー出版「微生物機能を活用した革新的生産技術の最前線—ミニマムゲノムファクトリーとシステムバイオロジー—」(清水 昌、大竹久夫、藤尾達郎、穴澤秀治	無	2007,
371	湯川英明、沖野祥平	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオマス資源からのコハク酸製造バイオプロセス	サイエンス&テクノロジー株式会社「植物由来プラスチックの高機能化とリサイクル技術」	無	2007,
372	城島 透、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	ソフトバイオマスからのバイオ燃料製造	農林水産技術研究ジャーナル 31:50-52	無	2008,
373	横山益造	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオリファイナリー基本コンセプト、バイオリファイナリーからの化学製品とエネルギー生産、バイオエタノールと地球温暖化問題、米国におけるバイオ燃料、EUにおけるバイオ燃料	シーエムシー出版「バイオリファイナリー技術の工業最前線」(湯川英明 監修)	無	2008,
374	沖野祥平	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオエタノール、バイオブタノール	シーエムシー出版「バイオリファイナリー技術の工業最前線」(湯川英明	無	2008,
375	沖野祥平、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	セルロース系バイオマスからのバイオ燃料製造技術	シーエムシー出版「セルロース利用技術の最先端」(磯貝明 監修)	無	2008,
376	湯川英明、乾 将行、横山益造、沖野祥平、吉田章人、村上嘉孝	(財)地球環境産業技術研究機構	図解 バイオリファイナリー最前線	「図解 バイオリファイナリー最前線」((財)地球環境産業技術研究機構 編集)、工業調査会	無	2008,
377	城島 透、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	ソフトバイオマスからのバイオ燃料製造技術とRITEの研究開発	酵素工学ニュース 59:7-11	無	2008,
378	湯川英明、城島 透	(財)地球環境産業技術研究機構	ソフトバイオマスからのバイオエタノール製造技術開発	日本エネルギー学会誌 87	無	2008,
379	乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	RITEバイオプロセスによるバイオ燃料製造	生物工学会誌 86: 226-229	無	2008,
380	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	非食料バイオマス資源からバイオ燃料を製造	地球環境 39:64-65	無	2008,
381	城島 透、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	セルロース原料からのバイオエタノール製造技術とRITEの研究開発	MATERIAL STAGE 8:55-57	無	2008,
382	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	生物的手法によるバイオマス資源からの燃料エタノール生産技術	バイオエネルギー技術と応用, p.189-194. 柳下立夫 監修、シーエム	無	2009,

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
383	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	Technological Innovation of Bioenergy	<i>Japan SPOTLIGHT</i> 28:6-7	無	2009,
384	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	21世紀の産業革命—バイオリファイナリー— 現状と将来	<i>科学と工業</i> 83:83-89	無	2009,
385	山本省吾、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	非食用原料からのバイオ燃料製造技術とRITEの研究開発	<i>電気評論</i> 94:59-63	無	2009,
386	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	セルロース系バイオマスの技術開発動向	<i>バイオマス白書2009</i> 11	無	2009,
387	有富俊男、沖野祥平、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオコハク酸新規製造技術	<i>プラスチックスエージ</i> 55:86-88	無	2009,
388	乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオリファイナリーを取り巻く世界の現状とRITEの研究開発	<i>Cellulose Communications</i>	無	2009,
389	乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	非食料資源からのバイオ燃料製造	<i>環境バイオテクノロジー学会誌</i> 9:76-79	無	2009,
390	城島 透、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	海外におけるセルロースエタノール導入・研究開発動向	次世代バイオエタノール生産の技術革新と事業展開、鮫島正浩 監修、フロンティア出版	無	2010,
391	猪狩尊史、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	RITEバイオプロセスによるセルロースバイオ燃料製造	次世代バイオエタノール生産の技術革新と事業展開、鮫島正浩 監修、フロンティア出版	無	2010,
392	城島 透、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	ソフトバイオマスを原料にしたコリネ型細菌による混合糖同時変換エタノール製造技術	セルロース系バイオエタノール製造技術-食料クライシス回避のために-、p.277-289. 近藤昭彦、植田充美 監修、エヌティーエス	無	2010,
393	S. Okino, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	L-aspartic acid.	In Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology, Edited by M.C. Flickinger. New York: John Wiley and Sons, Inc	有	2010,
394	T. Jojima, M. Inui and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	L-isoleucine.	In The Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology, Edited by M.C. Flickinger. New York: John Wiley and Sons, Inc	有	2010,
395	M. Inui, A.A. Vertès and H. Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Advanced fermentation technologies.	In Biomass to Biofuel: Strategies for Global Industries, p.311-330. Edited by A.A. Vertès, H. Yukawa, H.P. Blaschek, and N. Qureshi. Chichester: John Wiley and Sons,	有	2010,

論文(31/31)

番号	発表者	所属	タイトル	発表誌名、ページ番号	査読	発表年
396	稲富健一、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	アミノ酸全般	エコバイオリファイナリー-脱石油社会へ移行するための環境ものづくり戦略-, p.149-159. 植田充美、田丸 浩 監修、シーエムシー出版	無	2010,
397	城島 透、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	非可食バイオマスからのエタノール製造と化学品生産	未利用バイオマスの活用技術と事業性評価、p.235-247. サイエンス&テクノロジー株式会社	無	2010,
398	乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオリファイナリーの現状と展望	繊維学会誌 66:P-150-153	無	2010,
399	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	世界のバイオリファイナリー動向とRITEの研究開発	化学経済 57:49-54	無	2010,
400	稲富健一、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	地下微生物とエネルギー	電気評論 95:60-61	無	2010,
401	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオリファイナリー:世界の動向とRITEの研究開発	化学工学 75	無	2011,
402	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	急展開が見込まれるバイオリファイナリー産業	バイオプラジャーナル 40	無	2011,
403	澤井秀樹他	東レ株式会社	A novel membrane-integrated fermentation reactor system: application to pyruvic acid production in continuous culture by <i>Torulopsis glabrata</i>	Bioprocess Biosyst Eng in press DOI: 10.1007/s00449-011-0521-3	有	2011

【学会・シンポジウム(口頭発表)】

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
1	森英郎	協和発酵工業	Minimum genome factory for the advanced bio-process	The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB	2006/6/23
2	森英郎	協和発酵工業	Minimum genome factory – Improvement of basic cellular activity	Gordon Research Conference “Biocatalysis (2006)”	2006/7/13
3	穴澤秀治	協和発酵工業	E. coli Minimum Genome Factory	The 1st Japan–Finland Biotechnology Symposium	2006/8/10
4	森英郎	協和発酵工業	E. coli Minimum Genome Factory	第58回日本生物工学会	2006/9/11
5	森英郎	協和発酵工業	E. coli Minimum Genome Factory	Metabolic Engineering VI: From recDNA towards Engineering Biological Systems	2006/10/5
6	溝口寛	協和発酵工業	大腸菌ミニマムゲノムファクトリー	日本放線菌学会講演会	2006/10/13
7	森英郎	協和発酵工業	ミニマムゲノム細胞の実用化に向けて	JBAバイオエンジニアリング研究会	2006/11/17
8	穴澤秀治	協和発酵工業	ゲノム時代の発酵生産菌育種戦略 – Minimum Genome Factory (MGF) コンセプト –	第一回日本ゲノム微生物学会大会	2007/3/1
9	森英郎	協和発酵工業	ゲノム工学と高機能宿主細胞創製	農芸化学会中四国・西日本支部大会	2007/9/14
10	穴澤秀治	協和発酵工業	E. coli Minimum Genome Factory	Biotechnologia Habana	2007/11/2
11	穴澤秀治	協和発酵工業	From Minimum Genome factory to designed genome factory	Surrey UK–Japan Systems Biology Workshop	2008/7/8
12	森英郎	協和発酵キリン	From Minimum Genome factory to designed genome factory	The 11th Swiss–Japanese Joint Meeting on Biotechnology and Bioprocess Development	2008/10/28
13	原清敬 ¹ 、森英郎 ² 、木野邦器 ¹	早稲田大学 ¹ 、協和発酵 ²	大腸菌のATP供給力の計測と利用	酵素工学研究会30周年記念シンポジウム	2008/11/13
14	河野広朗、広川安孝、森英郎	協和発酵キリン	大腸菌HipBA トキシン–アンチトキシンは長期培養時の細胞死に関与する	BMB 2008	2008/12/12
15	森英郎	協和発酵キリン	Minimum Genome Project for E. coli	UK–Japan Workshop on Systems Biology	2009/9/23
16	森英郎	協和発酵キリン	染色体縮小化による大腸菌高機能化プロジェクト	第25回バイオテクノロジー懇談会	2010/1/21
17	森英郎	協和発酵キリン	「次世代型細胞工場の展開 – 大腸菌 Designed Genome Factory」	JBA“未来へのバイオ技術”勉強会	2010/8/27
18	広川安孝 ¹ 、榎田貴美枝 ¹ 、中村典子 ¹ 、溝口寛 ² 、森英郎 ¹	協和発酵キリン ¹ 、協和発酵バイオ ²	大腸菌染色体縮小化株の作製と解析	第62回日本生物工学会大会	2010/10/28

学会・シンポジウム(2/37)

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
19	荒 勝俊	花王・生科 研	動脈産業の根幹を支える宿主細胞 創製に向けて	日本生物工学会2006年度 大会シンポジウム	2006/9/12
20	荒 勝俊	花王・生科 研	枯草菌ゲノムのミニマム化による酵 素高生産	京都大学第8回21世紀COE ミニシンポジウム	2007/2/16
21	児玉武子	信州大大学 院	枯草菌AprXプロテアーゼは細胞増殖の 定常期後半に異種分泌蛋白質を分 解する	日本ゲノム微生物学会第1 回年会	2007/3/2
22	影山 泰	花王・生科 研	枯草菌ゲノム大領域欠失株の解析	日本農芸化学会2007年度 大会	2007/3/25
23	劉 生浩	花王・生科 研	枯草菌AraRリプレッサーとそれに抑制さ れるaraAプロモーターを用いたマーカ ーフリー遺伝子削除法の検討	日本農芸化学会2007年度 大会	2007/3/25
24	掛下大視	筑波大大学 院	枯草菌による非翻訳型RNA, BS101 RNAの機能解析	日本農芸化学会2007年度 大会	2007/3/26
25	掛下大視	筑波大大学 院	枯草菌による異種蛋白質の分泌生 産	グラム陽性細菌のゲノム生物 学研究会	2007/9/15
26	眞鍋憲二	花王・生科 研	枯草菌によるリパーゼLipA発現系の 開発	平成19年度日本生物工学 会	2007/9/25
27	児玉武子	信州大大学 院	枯草菌のyjeAの多糖アセチラーゼ活 性に関する解析	平成19年度日本生物工学 会	2007/9/25
28	森本拓也	奈良先端科 学技術大学 院大学	枯草菌ゲノム縮小株のトランスクリプト ーム解析	第30回日本分子生物学会 大会	2007/12/11
29	森本拓也	奈良先端科 学技術大学 院大学	枯草菌ゲノム縮小株のトランスクリプト ーム解析	平成20年度日本ゲノム微生 物学会	2008/3/8
30	掛下大規	筑波大大学 院	枯草菌SecAのC末端領域の解析	平成20年度日本農芸化学 会	2008/3/27
31	荒勝俊	花王・生科 研	未来を拓くRefined Genome Factory	日本化学会第88回春季年 会ATPプログラム依頼講演	2008/3/29
32	尾崎克也	花王・生科 研	枯草菌ゲノム工学によるタンパク質高発 現宿主の開発	平成20年度日本生物工学 会シンポジウム	2008/8/29
33	尾崎克也	花王・生科 研	Hyper-production of industrial enzymes by <i>Bacillus subtilis</i> host	日本・フィンランドニカ国シ ンポジウム	2008/10/2
34	荒勝俊	花王・生科 研	微生物からの贈り物	バイोजパン2008	2008/10/17
35	影山泰	花王・生科 研	枯草菌ゲノム縮小株のトランスクリプト ーム解析	平成21年度日本ゲノム微生 物学会	2009/3/5
36	影山泰	花王・生科 研	Production of a <i>Bacillus subtilis</i> strain with a reduced genome	第82回日本細菌学会国際 シンポジウム	2009/3/13
37	児玉武子	信州大大学 院	枯草菌 yjeA のヘプテグリカン糖鎖のデ アセチラーゼ活性に関する解析	平成21年度日本ゲノム微生 物学会	2009/3/5-7
38	眞鍋憲二	花王・生科 研	枯草菌ゲノム縮小株の酵素高生産因 子の解明	平成21年度日本農芸化学 会	2009/3/28

学会・シンポジウム(3/37)

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
39	小澤忠弘	花王・生科研	枯草菌ゲノム縮小株の酵素生産におけるグルタミン酸デヒドロゲナーゼの役割	平成21年度日本農芸化学会	2009/3/28
40	掛下大規	筑波大大学院	枯草菌における分子シャペロンを用いた異種タンパク質の分泌生産	平成21年度日本農芸化学会	2009/3/28
41	尾崎克也	花王・生科研	微生物バイオ基盤技術向上のための良好な研究ネットワークの構築と	発酵と代謝研究会シンポジウム	2009.7.10
42	森本拓也	奈良先端科学技術大学院大学	枯草菌高密度転写マップの作製	グラム陽性菌ゲノム機能会議	2009/9/4-5
43	掛下大規	筑波大大学院	枯草菌を宿主とした菌体外分泌によるタンパク質生産	平成22年度日本農芸化学会シンポジウム	2010/3/30
44	劉生浩	花王・生科研	枯草菌ゲノム工学によるセルラーセ高発現宿主の開発	平成22年度セルラーセ研究会	2010/7/23
45	影山泰	花王・生科研	枯草菌ゲノム縮小株による蛋白質高生産	2010年グラム陽性菌研究会	2010/9/2
46	児玉武子	信州大大学院	枯草菌細胞壁のアニオン性ポリマー組成改変株に関して	2010年グラム陽性菌研究会	2010/9/2
47	掛下大規	筑波大大学院	枯草菌を宿主とした菌体外分泌によるヒト型異種タンパク質生産 -AmyE プロ配列の付加は、hIFN- γ 2bの分泌を促進する-	2010年グラム陽性菌研究会	2010/9/2
48	小澤忠弘	花王・生科研	Enhanced recombinant protein productivity by genome reduction and regulation of gene expression in <i>Bacillus subtilis</i>	第12回日本-スイスバイオテクノロジー・バイオプロセス会議	2010/10/11
49	Y. Kageyama	花王・生科研	Prorerties of a <i>Bacillus subtilis</i> strain with a reduced genome	Functional genomics of Gram-positive	Terrenia, Italy (2007)
50	H. Kakeshtia	筑波大大学院	Enhanced heterologous production of human interferon alpha by <i>Bacillus subtilis</i> expressing mutant SecA lacking the extreme C-terminal domain (CTD)	Functional genomics of Gram-positive microorganisms	Terrenia, Italy (2007)
51	T. Kodama	信州大大学院	<i>Bacillus subtilis</i> AprX involved in degradation of a heterologous protein during the late stationary growth phase	Functional genomics of Gram-positive microorganisms	Terrenia, Italy (2007)
52	T. Morimoto	奈良先端科学技術大学院大学	Enhanced recombinant protein productivity by genome reduction in <i>Bacillus subtilis</i>	The University of Tokyo International Symposium	Tokyo, Japan(2007)
53	K. Kobayashi	信州大大学院	PdaC deacetylates the acetyl groups of <i>N</i> -acetylglucosamine in chitin oligomers and <i>N</i> -acetylmuramic acid in peptidoglycan -Biochemical approach for identification of YjeA (PdaC) in <i>Bacillus subtilis</i>	Functional genomics of Gram-positive microorganisms	San Diego, California (2009)
54	K. Kobayashi	信州大大学院	Characterization of gene products regulated by the essential two-component system in <i>Bacillus</i>	Functional genomics of Gram-positive microorganisms	San Diego, California (2009)
55	N. Ogasawara	奈良先端科学技術大学院大学	Enhanced recombinant protein productivity by genome reduction in <i>Bacillus subtilis</i>	The 4th European Conference on Prokaryotic Genomics	ProkaGENO MICS 2009
56	T. Morimoto	奈良先端科学技術大学院大学	Reprogramming of the metabolic network in a <i>Bacillus subtilis</i> strain depleted of 874 kb of the genomic sequence	The 4th European Conference on Prokaryotic Genomics	ProkaGENO MICS 2009

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
57	Y. Kageyama	花王・生科 研	Properties of a <i>Bacillus subtilis</i> strain with a reduced genome	11th International Symposium on the Genetics of Industrial	Melbourne, Australia (2010)
58	K. Manabe	花王・生科 研	Effect of rocG expression on recombinant enzyme productivity in a <i>Bacillus subtilis</i> strain with a reduced genome	11th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms (GIM)	Melbourne, Australia (2010)
59	Kashiwazaki, J., Nakamura, T., Iwaki, T., Takegawa, K., and Shimoda, C	香川大学他	Regulation of vacuolar morphology in the fission yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i> : Two Rab7 homologs act antagonistically.	The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress	2006/6/18
60	Tohda, H. and Giga-Hama, Y.	旭硝子	Efficient gene deletion and essential gene discrimination system in the fission yeast, <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	10th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms	2006/6/24
61	Kashiwazaki, J., Iwaki, T., Takegawa, K., Shimoda, C., and Nakamura, T.	香川大学他	Two Rab7 homologs act antagonistically for regulation of vacuolar morphology in the fission yeast.	Fourth International Fission Yeast Meeting	2007
62	Hosomi, A., Tanaka, N., and Takegawa, K.	香川大学	PXA domain-containing protein Pxa1 is required for normal vacuole function and morphology in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	International Symposium on Membrane Traffic	2007
63	Nakase, M., Iwaki, T., Hosomi, A., Tanaka, N., and Takegawa, K.	香川大学	Role of sphingolipid and ergosterol in membrane trafficking in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	International Symposium on Membrane Traffic	2007
64	Alimjan Idiris, Hideki Tohda, Yuko Giga-Hama	旭硝子	Enhanced productivity of human growth hormone by disruption of multiple protease genes in the fission yeast <i>S. pombe</i>	XXIII International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology	2007
65	Yuko Giga-Hama	旭硝子	From gene expression system to protein production business using fission yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	14th Japanese-German Workshop on Enzyme Technology	2007
66	Tanaka, N., Shibutani, D., Nakai, K., Takegawa, K.	香川大学	Functional analysis of Golgi-localized rhomboid proteases in fission yeast	ASCB Conference, San Francisco, USA	2008/12/10
67	Idiris, A., Tohda, H., Takegawa, K., Giga-Hama, Y.	旭硝子	Enhanced Protein Secretion from the Fission Yeast by Deleting Multiple Proteases and Vacuolar Transporting Related Protein.	Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting, Toronto, Canada	2008/7/22
68	Sasaki, M., Tada, A., Giga-Hama, Y., Tohda, H.	旭硝子	The Large-scale deletion on the terminal regions of chromosome in fission yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting, Toronto, Canada	2008/7/22
69	Mai Nakase, and Kaoru Takegawa	九州大学	Mannosylinositol phosphorylceramide is a main phospholipid component and required for proper localization of plasma membrane proteins in fission	The 5th International Fission Yeast Meeting	2009
70	Hiroyuki Mukaiyama, Hideki Tohda, and Kaoru	九州大学	Improvement of secretory production of heterologous proteins in fission yeast.	The 5th International Fission Yeast Meeting	2009

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
71	Takao Ohashi, Hideki Tohda, Naotaka Tanaka, and Kaoru Takegawa	九州大学	Characterization of galactosyltransferase-deficient mutants in fission yeast.	The 5th International Fission Yeast Meeting	2009
72	Tomohiko Matsuzawa, Takao Ohashi, Naotaka Tanaka, and Kaoru Takegawa	九州大学	The <i>gld1+</i> gene encoding glycerol dehydrogenase is required for glycerol metabolism in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	The 5th International Fission Yeast Meeting	2009
73	Kaoru Takegawa, Takao Ohashi, Yuka Ikeda, and Naotaka Tanaka	九州大学	Biosynthesis and physiological role of pyruvylated galactose in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	The 5th International Fission Yeast Meeting	2009
74	Tohda H, Sasaki M, Tada A, Hara F, Idiris A, Kumagai H, Giga-Hama Y.	旭硝子	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> minimum genome factory.	The 24th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology	2009
75	Sato R, Morita T, Takada H, Kita A, Ishiwata S, Doi A, Hagihara K,	旭硝子他	MAP kinase signaling dependent regulation of cell fate mediated by the RNA-binding protein <i>Nrd1</i> in fission yeast.	The 24th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology	2009
76	Tohda H, Sasaki M, Tada A, Hara F, Idiris A, Kumagai H,	旭硝子	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> minimum genome factory.	The 5th International Fission Yeast Meeting	2009
77	Uemura H, Yazawa H, Kamisaka Y, Kimura K, Kimura H, Tohda H, Kumagai	旭硝子他	Analysis of putative triacylglycerol lipase genes in <i>S. pombe</i> ; SPCC1450.16c, SPAC1786.01c, and SPAC1A6.05c.	The 5th International Fission Yeast Meeting	2009
78	K. Takegawa, T. Ohashi, and N. Tanaka	九州大学	Biosynthesis and physiological role of pyruvylated galactose in fission yeast.	25th International Carbohydrate Symposium; ICS2010	2010
79	T. Ohashi, S. Nakakita, and K. Takegawa	九州大学	Identification and characterization of novel α -1,3-galactosyltransferase genes in the fission yeast <i>Schizosaccharomyces</i>	25th International Carbohydrate Symposium; ICS2010	2010
80	T. Matsuzawa, Y. Nukigi, S. Suzuki, K. Takegawa, and N. Tanaka	九州大学	Characterization of two different types of UDP-glucose/galactose 4-epimerase involved in glycosylation in fission yeast.	25th International Carbohydrate Symposium; ICS2010	2010
81	M. Nakase, M. Tani, J. Kashiwazaki, T. Nakamura, N. Tanaka, and K. Takegawa	九州大学他	Mannosylinositol phosphorylceramide is a main phospholipid component and required for proper localization of plasma membrane proteins in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	25th International Carbohydrate Symposium; ICS2010	2010
82	Hideki Tohda, Alimjan Idiris, Kiyokazu Nikaido, Keita Araki, Yusuke Takahashi, Hiromichi Kumagai	旭硝子	ASPEX-Fission yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i> expression system, from lab to pilot scale production.	The 23rd Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2010), Sapporo, Japan,	2010/9/2
83	H. Tohda, M. Sasaki, A. Tada, F. Hara, A. Idiris, H. Kumagai, Y. Giga-	旭硝子	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> minimum genome factory.	14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, Rimini, Italy	2010/9/14

学会・シンポジウム(6/37)

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
84	Hideki Tohda	旭硝子	Fission yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i> Minimum Genome Factory	12th Japanese-Swiss Meeting on Biotechnology and Bioprocess Development, Toyama,	2010/10/10
85	松山彰収	ダイセル化学工業(株)	Whole-cell biotransformations with organic solvent-tolerant <i>Kocuria rhizophila</i> strain DC2201 in biphasic systems	Pacificchem2010	2010/12/19
86	松村栄太郎他	ダイセル化学工業(株)	<i>Kocuria rhizophila</i> DC2201 株を用いた有機溶媒耐性宿主ベクター系の開発と(R)-マンデル酸生産への利用	日本農芸化学会2010年度大会	2011/3
87	小田航史、松山彰収、山本浩明、西原宏史	茨城大学	<i>Ralstonia eutropha</i> を宿主とする水素利用微生物触媒の開発と反応	第60回日本生物工学会大会	2008
88	服部佑、松山彰収、山本浩明、橋本義輝、小林達彦、西原宏史	茨城大学	水素酸化細菌 <i>Rhodococcus opacus</i> でのアルコール脱水素酵素の発現による水素利用微生物触媒の開発	第60回日本生物工学会大会	2008
89	西原宏史、五十嵐泰夫、石井正治	茨城大学	水素利用バイオプロセスによる環境調和型物質生産の検討	平成21年度日本農芸化学会大会シンポジウム「環境調和型微生物工場のデザインテクノロジー」、日本農芸化学会・バイオインダストリー協会新資源生物変換	2009
90	西原宏史、尹基石	茨城大学	好気性水素酸化細菌の水素ガス代謝能の応用	第61回日本生物工学会大会シンポジウム「独立栄養的代謝の産業応用的基軸」、日本生物工学会・バイオインダストリー協会新資源生物変換研究会共催	2009
91	宮崎 健太郎	産総研	Highly sensitive, high-throughput screening of metagenomic library for enzymes	JBA-AISTジョイントセミナー	2007
92	宮崎 健太郎	産総研	Mining enzymes from metagenome	SNU-KRICT Joint workshop on white	2007
93	宮崎 健太郎	産総研	メタゲノムを利用した“プレ”蛋白質工学	第8回 日本蛋白質科学会年会	2008
94	末永 光、水田 志織、宮崎 健太郎	産総研	Adaptive evolution of manganese(II)-dependent extradiol dioxygenases as revealed by metagenomic approach	12th International Symposium on Microbial Ecology	2008
95	末永 光、影井亜貴子、宮崎 健太郎	産総研	メタゲノムアプローチによる環境中の芳香環水酸化酵素の探索とクローニ	日本農芸化学会2008年度大会	2008
96	宮崎 健太郎	産総研	メタゲノム解析とその応用研究	第9回 糸状菌分子生物学コンファレンス・シンポジウム	2009
97	末永 光、小山 芳典、宮崎亮、宮腰昌利、矢野大和、曾田匡洋、津田雅孝、宮崎 健太郎	産総研	機能性メタゲノム解析により明らかにされた環境中の芳香環分解遺伝子の実態	第3回日本ゲノム微生物学会	2009
98	宮崎 健太郎	産総研	Functional metagenomics for enzyme discovery: A case study in glucose-tolerant beta-glucosidases	A-IMBN Regional Workshop on Gene Discovery from Uncultured Microbes Using Metagenomic Approach	2010

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
99	末永光、小山芳典、宮崎亮、宮腰昌利、矢野大和、曾田匡洋、津田雅孝、宮崎健太郎	産総研	Meta-plasmid: in silico reconstruction of a plasmid-like circular DNA molecule and its possible role in the retrieved environment	13th International Symposium on Microbial Ecology	2010
100	吉田豊和、岡田幸可、山田守、長澤透	岐阜大学	イソオイゲノール分解酵素の遺伝子クローニングと一次構造解析	日本生物工学会大会(大阪)講演要旨集1F15-2	2006
101	山田守、岡田幸可、吉田豊和、長澤透	岐阜大学	二相系におけるイソオイゲノールのバニリンへの微生物変換	日本生物工学会大会(大阪)講演要旨集1F15-3	2006
102	Yoshida, T., Uno, S., Matsui, T., Nagasawa, T.	岐阜大学	Regioselective carboxylation reaction of aromatic carboxylic acid decarboxylases.	3rd International congress on biocatalysis 2006, Hamburg, P069	2006
103	宇野慎一、新美智子、吉田豊和、長澤透	岐阜大学	2,3-ジヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の炭酸固定機能の評価	日本農芸化学会大会(東京)講演要旨集2A11p05	2007
104	満倉浩一、坂本拓望、吉田豊和、長澤透	岐阜大学	微生物による1-アダマンタノールの位置選択的水酸化	日本農芸化学会大会(東京)講演要旨集2A11p06	2007
105	Yoshida, T., Yamada, M., Okada, Y., Nagasawa, T.	岐阜大学	Biotransformation of isoeugenol into vanillin by isoeugenol monooxygenase of <i>Pseudomonas putida</i> .	Biotrans symposium 2007, Oviedo, P133	2007
106	Mitsukura, K., Yoshida, T., Nagasawa, T.	岐阜大学	Microbial hydroxylation of adamantane and 1-adamantanol.	Biotrans symposium 2007, Oviedo, P150	2007
107	吉田豊和、小坂拓也、宇野慎一、長澤透	岐阜大学	4-ヒドロキシ安息香酸脱炭酸酵素の構造と機能発現の相関	日本生物工学会大会(仙台)講演要旨集1Fp09	2008
108	満倉浩一、山中直紀、吉田豊和、長澤透	岐阜大学	微生物による1,3-アダマンタンジールの位置選択的水酸化	日本生物工学会大会(仙台)講演要旨集2Fp03	2008
109	吉田豊和、高橋裕恵、長澤透	岐阜大学	<i>Fusarium</i> 属カビのニトリラーゼの分子特性の解析.	日本生物工学会大会(仙台)講演要旨集2Fp05	2008
110	山田守、岡田幸可、吉田豊和、長澤透	岐阜大学	<i>Pseudomonas putida</i> イソオイゲノールモノオキシゲナーゼを高発現させた大腸菌によるバニリン生産	日本農芸化学会大会(名古屋)講演要旨集3A26p03	2008
111	吉田豊和	岐阜大学	有機溶媒耐性酵素を活用した疎水性ケミカルの生産	日本生物工学会有機溶媒耐性微生物利用技術研究部会シンポジウム(東京)	2010
112	Yamashita, S., Honda, K., Sameshima, Y., Omasa, T., Kato, J.	阪大・工学研究科 広大・先端物質科学	Whole-cell biocatalyst in anhydrous organic solvents.	ISEB/ESEB/JSEB 2006, Leipzig, Germany	2006/7/9-13
113	J. Kato, Kita, A., Ohtake, H ¹ .	広大・先端物質科学 1 阪大・工学研究科	Benzene dioxygenase operon in benzene-tolerant <i>Rhodococcus opacus</i> B4.	International Conference on Environmental Biotechnology, Leipzig, Germany.	2006/7/9-13
114	Ohtake, H.	阪大・工学研究科	Bio-based production toward sustainable industrial development.	ISEB/ESEB/JSEB 2006, Leipzig, Germany	2006/7/9-13
115	本田孝祐、鮫島結香、山下志保、岩朝義弘、大政健史、加藤純一、大竹久夫	阪大・工学研究科	親油性細菌 <i>Rhodococcus opacus</i> B4の有機溶媒中での利用	日本農芸化学会2007年度大会、東京農業大学、東京	2007/3/24-27
116	加藤純一、大竹久夫 ¹ 、本田孝祐 ¹	広大・先端物質科学 1 阪大・工学研究科	<i>Rhodococcus</i> 属細菌による非水系でのものづくりへの挑戦	日本農芸化学会2007年度大会、東京農業大学、東京	2007/3/24-27

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
117	喜多晃久、黒田章夫、滝口昇、大竹久夫 ¹ 、加藤純一	広大・先端物質科学 1 阪大・工学研究科	有機溶媒耐性 <i>Rhodococcus opacus</i> B4株におけるノンマーカ―遺伝子破壊法の確立	日本農芸化学会2007年度大会、東京農業大学、東京	2007/3/24-27
118	岩朝義弘、山下志保、里井祐章、本田孝祐、鮫島結香、大政健史、加藤純一、大竹久夫	阪大・工学研究科 広大・先端物質科学	親油性細菌 <i>Rhodococcus opacus</i> B4の有機溶媒中での利用	環境バイオテクノロジー学会2007年度大会 大阪	2007/6/27-28
119	Tamura, T., Fujii, Y., Yasutake, Y., Mitani, Y., Khalid, S., Arisawa, A.	産総研 メルシヤン株式会社	Development of a <i>Rhodococcus erythropolis</i> host vector system – the bioconversion of vitamin D3 into calcitriol by expression of a novel cytochrome P450	14th International Symposium on the Biology of Actinomycetes, New Castle, UK	2007/8/26-30
120	遠坂侑晃、濱田崇弘、朴 志薫、本田孝祐、大政健史、田村具博、加藤純一、大竹久夫	阪大・工学研究科 産総研 広大・先端物質科学	<i>Rhodococcus opacus</i> B4由来表層構造変異株の取得とその特性評価	生物工学会2007年度大会 広島	2007/9/25-27
121	西野琢磨、Zhou Ying、Darmawan Ari Nugroho、本田孝祐、大政健史、大竹	阪大・工学研究科	シトクロムP450モノオキシゲナーゼ活性に影響を及ぼす細胞構成因子の探索	生物工学会2007年度大会 広島	2007/9/25-27
122	濱田崇弘、本田孝祐、大政健史、加藤純一、大竹久夫	阪大・工学研究科 広大・先端物質科学	細菌表層の疎水性の定量法の確立	生物工学会2007年度大会 広島	2007/9/25-27
123	Arisawa, A., Fujii, Y., Kabumoto, H., Takeda, K., Yasutake, Y.,	メルシヤン株式会社 産総研	Biotransformation of vitaminD3 by actinomycete cytochrome P450 monooxygenase	The 14th Japanese-German Workshop on Enzyme Technology, Kanazawa, Japan	2007/10/10
124	A. Kita, Na, K.-S., Kuroda, A., Takiguchi, N., Ohtake, H ¹ , Kato, J.	広大・先端物質科学 1 阪大・工学研究科	Development of genome engineering technology for solvent-tolerant <i>Rhodococcus opacus</i> strain B4.	APBioChEC '07, Taipei, Taiwan. (Poster)	2007/11/4-7
125	J. Kato, Faizal, I., Ohba, M., Ohtake, H	広大・先端物質科学 1 阪大・工学研究科	Bioproduction of 3-methylcatechol in two-liquid-phase system by genetically-modified solvent tolerant <i>Pseudomonas putida</i> T-57.	. APBioChEC '07, Taipei, Taiwan. (Poster)	2007/11/4-7
126	Ohtake, H	阪大・工学研究科	Minimum genome factory project: Development of a new bio-based production platform for improving industrial sustainability of Japan	BioMicroWorld 2007, Seville, Spain	2007/11/28-12/1
127	Zhou, Y., Honda, K., Omasa, T., Ohtake, H.	阪大・工学研究科	Screening of <i>Escherichia coli</i> single-gene knockout mutants which are able to enhance the deethylation of 7-ethoxycoumarin catalyzed by CYP154A1	BioMicroWorld 2007, Seville, Spain	2007/11/28-12/1
128	Hamada, T., Honda, K., Omasa, T., Kato, J., Ohtake, H.	阪大・工学研究科	Use of a hydrophobic, solvent-tolerant bacterium <i>Rhodococcus opacus</i> B-4 as a whole-cell biocatalyst in organic solvents	BioMicroWorld 2007, Seville, Spain	2007/11/28-12/1
129	藤井良和、株本浩樹、武田耕治、安武義晃、田村具博、有澤 章	メルシヤン株式会社 産総研	新規ビタミンD水酸化酵素遺伝子のクローニングと活性化ビタミンD生産への応用	日本化学会第88春季年会アドバンス・テクノロジー・プログラム	2008/3/26-30
130	濱田崇宏、本田孝祐、大政健史、加藤純一、大竹久夫	阪大・工学研究科 広大・先端物質科学	Whole cell catalystにおける細胞表層疎水度と難水溶性物質の取り込みの相関	日本農芸化学会2008年度大会、名古屋大学、名古屋	2008/3/27-28

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
131	Ying Zhou, Takeshi Minami, Takuma Nishino, Darmawan	阪大・工学研究科	Screening of Escherichia coli single-gene knockout mutant which could enhance a P450 activity	日本農芸化学会2008年度大会、名古屋大学、名古屋	2008/3/27-28
132	喜多晃久、黒田章夫、滝口昇、大竹久夫、加藤純一	広大・先端物質科学 1 阪大・工学研究科	Rhodococcus opacus B4株における有機溶媒耐性機構の解明	日本農芸化学会2008年度大会、名古屋大学、名古屋	2008/3/27-28
133	Fujii, Y., Yasutake, Y., Kabumoto, H., Nishimura, K., Takeda, K., Arisawa, A., Tamura, T.	メルシヤン株式会社産総研	Identification and characterization of novel vitamin D hydroxylase from rare actinomycete <i>Pseudonocardia autotrophica</i>	9th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology, Nice, France	2008/6/8-12
134	Fujii Y., Nishimura K., Yasutake Y., Fujii T., Kabumoto H., Tamura T.,	メルシヤン株式会社産総研	Identification of vitamin D3 hydroxylase from <i>Pseudonocardia autotrophica</i> and enhancement of the enzyme activity by directed	15th International Symposium on the Biology of Actinomycetes, Shanghai, China	2009/8/20-25
135	Yasutake, Y., Fujii, Y., Cheon, W.-K., Arisawa, A., & Tamura, T.	産総研 メルシヤン株式会社	Structure of vitamin D3 hydroxylase, a novel cytochrome P450 from <i>Pseudonocardia autotrophica</i>	XXI Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography	2008/8/26
136	藤井良和、武田耕治、株本浩樹、安武義晃、田村具博、有澤章	メルシヤン株式会社産総研	放線菌シトクロムP450モノオキシゲナーゼによるビタミンD3の水酸化：骨粗鬆症治療薬製造への応用	日本生物工学会第60回大会、シンポジウム「新産業創出に挑むキーエンザイムの顔ぶれ」、東北学院大学、仙台	2008/8/27
137	竹下慎一、滝口昇、加藤純一	広大・先端物質科学	有機溶媒耐性細菌 <i>Pseudomonas putida</i> T-57株によるカテコール化合物生産プロセスの構築	日本生物工学会第60回大会、東北学院大学、仙台	2008/8/27-29
138	Arisawa, A., Fujii, Y., Kabumito, H., Takeda, K., Yasutake, Y., & Tamura, T.	メルシヤン株式会社産総研	Application of actinomycete cytochrome P450 monooxygenases in biotransformation	放線菌ゲノム生物学に関する日英ワークショップ	2008/11/1
139	藤井良和、株本浩樹、西村賢治、武田耕治、安武義晃、田村具博、有澤章	メルシヤン株式会社産総研	新規ビタミンD水酸化酵素遺伝子のクローニングと活性型ビタミンD生産バイオプロセスへの応用	第12回生体触媒化学シンポジウム	2008/12/5
140	喜多晃久、滝口昇、大竹久夫 ¹ 、加藤純一	広大・先端物質科学 1 阪大・工学研究科	<i>Rhodococcus opacus</i> B4株における有機溶媒耐性機構の解明	日本農芸化学会2009年度大会、マリンメッセ福岡、福岡（ポスター発表）	2008/3/27-29
141	安武義晃、藤井良和、西村賢治株本浩樹、有澤章、田村具博	産総研 メルシヤン株式会社	<i>Pseudonocardia autotrophica</i> 由来ビタミンD3水酸化酵素の構造解析	日本農芸化学会2009年大会	2009/3/28
142	藤井良和、安武義晃、藤井匡、株本浩樹、有澤章、田村具博	メルシヤン株式会社産総研	進化工学的機能改変によるビタミンD3水酸化酵素の活性向上	日本農芸化学会2009年大会	2009/3/28
143	Fujii, Y., Yasutake, Y., Fujii, T., Kabumito, H., Tamura, T., &	メルシヤン株式会社産総研	Enhancement of Vitamin D3 Hydroxylase Activity by Directed Evolution	16th Interbational Conference on Cytochrome P450	2009/6/24
144	Arisawa, A. Fujii, Y., Yasutake, Y., Fujii, T., Kabumito, H., Takeda, K., &	メルシヤン株式会社産総研	Actinomycete cytochrome P450 from <i>Pseudonocardia autotrophica</i> that catalyzes vitamin D3 hydroxylation	16th Interbational Conference on Cytochrome P450	2009/6/24
145	井元紀子、田村具博	産総研	ロドコッカス属放線菌を宿主としたビタミンD3水酸化体生産に影響を及ぼす細胞内因子の探索	2009年度放線菌学会大会	2009/7/16

学会・シンポジウム(10/37)

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
146	藤井良和、西村賢治、安武義晃、藤井匡、株本浩樹、田村具博、有澤章	メルシヤン株式会社 産総研	<i>Pseudonocardia autotrophica</i> 由来ビタミンD3水酸化酵素の同定および進化工学的機能改変	2009年度放線菌学会大会	2009/7/16
147	A. Kita, Nakashimada, Y., Kato, J.	広大・先端物質科学	Molecular mechanism of organic solvent tolerance in <i>Rhodococcus opacus</i> strain B4.	APBioChEC '09, Kobe, Japan. (Poster)	2009/11/24-28
148	井元紀子、田村具博	産総研	Searching for proteins that influence biotransformation of VitaminD3 into hydroxylated VD3 in <i>Rhodococcus erythropolis</i> .	第32回分子生物学会年会	2009/12/11
149	Imoto, N., & Tamura, T.	産総研	Searching for proteins that influence biotransformation of VitaminD3 in <i>Rhodococcus erythropolis</i> .	BioMicroWorld2009	2009/12/4
150	安武義晃、藤井良和、千宇光、西村賢治、株本浩樹、有澤章、田村具博	産総研 メルシヤン株式会社	Crystal structures of P450 Vdh before and after directed evolution reveal the basis for the enhancement of catalytic activity	第32回分子生物学会年会	2009/12/11
151	安武義晃、藤井良和、千宇光、西村賢治、株本浩樹、有澤章、田村具博	産総研 メルシヤン株式会社	進化工学適用前後でのビタミンD3水酸化酵素の立体構造と活性上昇の構造基盤	第27回PFシンポジウム	2010/3/9
152	加藤純一、大竹久夫 ¹ 、本田孝祐 ¹	広大・先端物質科学 1 阪大・工学研究科	有機溶媒耐性細菌を用いた疎水性ケミカル生産プロセスの開発	日本農芸化学会2010年度大会、東京大学駒場キャンパス、東京	2010/3/27-30
153	安武義晃、藤井良和、千宇光、西村賢治、株本浩樹、有澤章、田村具博	産総研 メルシヤン株式会社	多才な機能を生むシクロムP450の構造～ビタミンD水酸化酵素からの知見を中心に～	第10回日本蛋白質科学会年会	2010/6/18
154	藤井良和、安武義晃、西村賢治、株本浩樹、藤井匡、上松仁、田村具博、有澤章	メルシヤン株式会社 産総研	産業上有用なP450の酵素学的性質と高機能化	第10回日本蛋白質科学会年会	2010/6/18
155	J. Kato, Kajiwara, R., Atsumi, T., Nakashimada, Y., Tajima, T.	広大・先端物質科学	Application of solvent tolerant bacterium to biohydroxylation of aromatic hydrocarbons in two-phase reaction system.	2010 International Symposium on Advanced Biological Engineering (ISABE2010), Beijing.	2010/7/23-25
156	西松東希、井元紀子、田村具博	産総研	<i>Rhodococcus</i> 属放線菌を宿主とした活性型ビタミンD3生産に影響を及ぼす細胞内因子の探索	第62回日本生物工学会大会	2010/10/28
157	西村賢治、藤井良和、安武義晃、田村具博、有澤章	産総研 メルシヤン株式会社	機能改変による <i>Pseudonocardia autotrophica</i> 由来ビタミンD3水酸化酵素の副反応抑制	2010年度日本放線菌学会大会	2010/9/2
158	Yasutake, Y., Fujii, Y., Nisioka, T., Cheon, W.-K., Arisawa, A., & Tamura, T.	産総研 メルシヤン株式会社	Structural insights into enhancement of regio-selective sequential vitamin D3 hydroxylation activities by directed evolution of cytochrome P450 Vdh	10th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology	2010/10/5
159	Nishioka, T., Imoto, N., Yasutake, Y., Fujii, Y., Arisawa, A., & Tamura, T.	産総研 メルシヤン株式会社	Characterization of electron transport proteins suitable for Vitamin D3 hydroxylase (P450 Vdh)	10th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology	2010/10/4

学会・シンポジウム(11/37)

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
160	Kizashi Yamaguchi	Osaka Univ.	Extended Hartree-Fock Theory of Chemical Reaction IX. Broken-Symmetry and Multi-Reference Approaches to Hydroxylation Reaction by P450 Model Complex	49th Sanibel Symposium at The King and Prince Golf & Beach Resort on St. Simons Island	2008/2/
161	K. Yamaguchi, S. Nishihara, T. Ukai, K. Nakata, S. Yamanaka, T.	Osaka Univ.	CAS-DFT approach to the ligand field theory	48th Sanibel Symposium	2008/2/
162	S. Nishihara, T. Ukai, K. Nakata, M. Shoji, S. Yamanaka, H. Isobe, J. Shimada, K.	Osaka Univ.	Theory of Chemical Bonds in Metalloenzymes XI: CAS-DFT study of transition metal-oxo species	48th Sanibel Symposium	2008/2/
163	磯部寛、山中秀介、山口兆	Osaka Univ.	配位子場理論へのCAS-DFTアプローチ	日本化学会第88回春季年会	2008/3/
164	Kizashi Yamaguchi	Osaka Univ.	Instability in Chemical Bonds - from broken-symmetry single-reference to symmetry-adapted multi-reference approaches to strongly correlated electron systems.	2nd Annual meeting in section for theoretical chemistry	2008/9/
165	Kizashi Yamaguchi	Osaka Univ.	Instability in Chemical Bonds - from broken-symmetry single-reference to symmetry-adapted multi-reference approaches to strongly correlated electron systems.	International Conference of Computational Methods in Science and 6 Engineering	2008/9/
166	福西広晃、寺本礼仁、島田次郎	NEC	擬似構造活性相関モデルによる活性情報の抽出	生物物理学会年会	2007/12/
167	福西広晃、寺本礼仁、島田次郎	NEC	CASSCF法の電荷を用いたMM/PBSAドッキングシミュレーション P450camphor	生物物理学会年会	2007/12/
168	福西広晃、寺本礼二、島田次郎	NEC	Comparison of Pseudo Structure Activity Relationship (PSAR) Model with quantitative structure activity relationship (QSAR) model	生物物理学会年会	2008/12/
169	島田次郎、福西広晃、上條憲一	NEC	QM/MM Simulation of P450	生物物理学会年会	2009/10/
170	H. Fukunishi, K. Kamijo and J. Shimada.	NEC	Computational analysis of high-affinity anti-fluorescein antibodies by using free energy calculation based on Jarzynski equality.	The EMBO meeting 2010, Barcelona	2010/9/
171	島田次郎、福西広晃、上條憲一	NEC	Cytochrome P450の遷移状態の構造モデリング	分子シミュレーション討論会	2010/11/
172	Takamitsu Kohzuma	Ibaraki Univ.	UV Resonance Raman Spectroscopic Study of Human Hematopoietic Prostaglandin D2 Synthase	International Symposium on Biological Application of Vibrational Spectroscopy, Center for Advanced Science and Technology	2007/3/

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
173	Sotaro Kimura, Rehab F. Abdelhamid, Takamitsu Kohzuma	Ibaraki Univ.	UV Resonance Raman Spectroscopic Studies of Azurin I and Azurin II from <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> NCIMB 11015.	9th European Biological Inorganic Chemistry Conference	2008/9/
174	Takamitsu Kohzuma	Ibaraki Univ.	Perturbation of the Protein Electronic Structure through Weak Chemical Interaction.	6th China-Japan Crossover Science Symposium	2008/10/
175	Takamitsu Kohzuma, Rehab F. Abdelhamid, Yuji Obara, Junko Yano, Doreen E. Brown, David M. Dooley.	Ibaraki Univ.	The role of 2 nd coordination sphere in a blue copper protein, pseudoazurin.	Gordon Research Conference, Metals in Biology	2009/1/
176	高妻孝光	Ibaraki Univ.	放射光等先端的手法によるタンパク質のしくみの研究	日中科学技術交流協会講演会「バイオと原子力—先端科学技術での日中協力を探る」	2010/3/
177	Takamitsu Kohzuma, Yoshiko Uchida, Yoshihiro Urade, and Seiji Mori.	Ibaraki Univ.	Long Range Weak Interaction in a Mg ²⁺ -containing Prostaglandin D ₂ Synthase Probed by UV Resonance Raman Spectroscopy.	2nd Georgian Bay International Symposium of Bioinorganic Chemistry	2009/5/
178	Hiromi Togashi, Junko Yano, Vittal Yachandra, Takamitsu Kohzuma.	Ibaraki Univ.	XAS and Electrochemical Studies on Blue Copper Proteins, Pseudoazurin and Plastocyanin.	2nd Georgian Bay International Symposium of Bioinorganic Chemistry	2009/5/
179	Rika Takahashi, Hiromi Togashi, Hideto Terakado, Takamitsu Kohzuma.	Ibaraki Univ.	UV and Visible Resonance Raman Spectroscopic Studies of Laccase and Stellacyanin of Japanese Lacquer Tree from Oku-Kuji	2nd Georgian Bay International Symposium of Bioinorganic Chemistry	2009/5/
180	Yuko Nihei, Yuji Obara, Koyu Fujita, Doreen E. Brown, David M. Dooley, Takamitsu Kohzuma.	Ibaraki Univ.	Spectroscopic and Electrochemical Studies of a Blue Copper Protein, Pseudoazurin Met16His mutant.	2nd Georgian Bay International Symposium of Bioinorganic Chemistry	2009/5/
181	Yuji Obara, Yuko Nihei, Koyu Fujita, Doreen E. Brown, David M. Dooley, Takamitsu Kohzuma.	Ibaraki Univ.	Structure and Functions of Non-Covalent Weak Interaction Probed with a Blue Copper Protein, Met16X Pseudoazurin Variants.	14th International Conference on Bioinorganic Chemistry	2009/7/
182	Koyu Fujita, Fumihito Ijima, Yuji Obara, Mika Hirasawa, Doreen E. Brown, Takamitsu Kohzuma.	Ibaraki Univ.	Direct Electron Transfer from Pseudoazurin to Nitrous Oxide Reductase in Catalytic N ₂ O Reduction.	14th International Conference on Bioinorganic Chemistry	2009/7/
183	Hiromi Togashi, Junko Yano, Travis V. Harris, Vittal Yashandra, Robert K. Szilagy, Takamitsu Kohzuma.	Ibaraki Univ.	XAS Studies on the Influence of Weak Interaction in Blue Copper Protein, Fern Plastocyanin and Pseudoazurin Variants.	14th International Conference on Bioinorganic Chemistry	2009/7/
184	Mika Hirasawa, Yuji Obara, Koyu Fujita, David M. Dooley, Takamitsu Kohzuma.	Ibaraki Univ.	Direct Electrochemistry of Nitrous Oxide Reductase from <i>Achromobacter cycloclastes</i> .	14th International Conference of Biological Inorganic Chemistry	2009/7/

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
185	小原裕二、仁平裕子、富樫ひろ美、藤田晃優、Doreen E. Brown、David M. Dooly、高妻孝光	Ibaraki Univ.	脱窒菌 <i>Achromobacter cycloclastes</i> 由来のブルー銅タンパク質シュードアズリンにおける弱い相互作用の効果.	日本生化学会関東支部例会、つくば	2009/6/
186	富樫ひろ美、矢野淳子、Travis V. Harris、Vittal Yachandra、Robert K. Szilagyi、高妻孝光	Ibaraki Univ.	X線吸収分光法による銅タンパク質の弱い相互作用に関する研究.	日本原子力学会、仙台	2009/6/
187	高橋里佳、寺門秀人、高妻孝光	Ibaraki Univ.	奥久慈産ウルシ由来ステラシアニンの精製と性質.	第82回日本生化学会大会、神戸	2009/10/
188	仁平裕子、高妻孝光	Ibaraki Univ.	ブルー銅タンパク質シュードアズリンM16H変異体の分光学的および電気化学的性質.	第82回日本生化学会大会、神戸	2009/10/
189	仁平裕子、高妻孝光	Ibaraki Univ.	ブルー銅タンパク質シュードアズリンMet16His変異体の分光学的および電気化学的性質.	第20回日本化学会関東支部茨城地区研究交流会、多賀	2009/11/
190	高橋里佳、寺門秀人、高妻孝光	Ibaraki Univ.	奥久慈産ウルシ由来ステラシアニンのアルカリ構造転移.	第20回日本化学会関東支部茨城地区研究交流会、多賀	2009/11/
191	仁平裕子、大上理恵、高妻孝光	Ibaraki Univ.	ブルー銅タンパク質シュードアズリンMet16His 変異体の酸性条件下における構造転移.	第90回日本化学会年会、東大阪	2010/3/
192	富樫ひろ美、矢野淳子、Harris Travis V、Yachandra Vittal、Szilagyi Robert、高妻孝光	Ibaraki Univ.	オシダ由来プラストシアニンのX線吸収スペクトル.	第90回日本化学会年会、東大阪	2010/3/
193	平澤美佳、藤田晃優、David M. Dooley、高妻孝光	Ibaraki Univ.	亜酸化窒素還元酵素と生理的電子供与体シュードアズリンとの電子移動反応	第90回日本化学会年会、東大阪	2010/3/
194	Takamitsu Kohzuma, Yuko Nihei, Sayaka Asamura, Yuji	Ibaraki Univ.	Perturbation on the Active Site of a Blue Copper Protein, Pseudoazurin through Non-covalent Weak Interaction	10th European Conference of Biological Inorganic Chemistry	2010/2/
195	Takamitsu Kohzuma	Ibaraki Univ.	Structure and functions of non-covalent weak interaction in a blue copper protein, pseudoazurin	2010環太平洋国際化学会議、Honolulu, Hawaii, U.S.A.	2010/12/
196	Rika Takahashi, Takamitsu Kohzuma	Ibaraki Univ.	Two steps alkaline transition of stellacyanin revealed by resonance Raman and electrochemistry	2010環太平洋国際化学会議、Honolulu, Hawaii, U.S.A.	2010/12/
197	Yuji Obara, Marzena B. Fitzpatrick, Roman S. Czernuszewicz, Takamitsu	Ibaraki Univ.	Effect of Weak Interaction on the Electronic Structure and Electrochemical Properties of Pseudoazurin Met16X mutants	2010環太平洋国際化学会議、Honolulu, Hawaii, U.S.A.	2010/12/
198	Sayaka Asamura, Masaki Unno, Takamitsu Kohzuma	Ibaraki Univ.	X-ray crystal structure analyses of a blue copper protein, pseudoazurin from <i>Achromobacter cycloclastes</i> IAM1013 and its mutant proteins	2010環太平洋国際化学会議、Honolulu, Hawaii, U.S.A.	2010/12/
199	Akiko Takashina, Masaki Unno, Takamitsu	Ibaraki Univ.	Precise X-ray Crystallographic Analysis of a Cytochrome c' from <i>Alcalygenes xylooxidans</i> NCIMB	2010環太平洋国際化学会議、Honolulu, Hawaii, U.S.A.	2010/12/
200	Takamitsu Kohzuma, Masaki Unno	Ibaraki Univ.	Structure and Spectroscopic Properties of Non-covalent Interaction of Pseudoazurin	Gordon Research Conference, Metals in Biology, Ventura, U.S.A.	2011/1/
201	高妻孝光、仁平裕子、小原裕二、浅村紗矢香、海野昌喜	Ibaraki Univ.	弱い化学的相互作用によるタンパク質の電子状態制御	第4回日本化学会関東支部大会、つくば	2010/8/

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
202	高橋里佳、寺門秀人、室矢知徳、高妻孝光	Ibaraki Univ.	Two step alkaline transition of stellacyanin from <i>Rhus vernicifera</i>	第48回日本生物物理学会年会、仙台	2010/9/
203	平澤美佳、藤田晃優、David M. Dooley、高妻孝光	Ibaraki Univ.	<i>Achromobacter cycloclastes</i> 由来亜酸化窒素還元酵素の電子移動反応	第48回日本生物物理学会年会、仙台	2010/10/
204	Hiromi Togashi, Junko Yano, Travis V. Harris, Vittal Yachandra, Fuminori Yoshizaki, Takamitsu Kohzuma	Ibaraki Univ.	Cu K-edge X-ray Absorption Spectroscopic Studies of Blue Copper Protein, Plastocyanin from a Fern Plant, <i>Dryopteris crassirhizoma</i>	第48回日本生物物理学会年会、仙台	2010/10/
205	小原裕二、仁平裕子、大上利恵、高妻孝光	Ibaraki Univ.	Effect of Weak Interaction on the Electronic Structure and Electrochemical Properties of Pseudoazurin Met16His/His6Val double mutant	第48回日本生物物理学会年会、仙台	2010/10/
206	仁平 裕子、Duncan Sutherland, Martin Stillman, 高	Ibaraki Univ.	ブルー銅タンパク質シュウドアズリンの酸性条件下における構造転移	第48回日本生物物理学会年会、仙台	2010/10/
207	高階明子、海野昌喜、高妻孝光	Ibaraki Univ.	ブルー銅タンパク質シュウドアズリンの酸性条件下における構造転移	Atomic Resolution X-ray crystallographic Analyses a8nd Spectroscopic Studies of Cytochrome c' from <i>Alcaligenes</i>	2010/10/
208	浅村紗矢香、海野昌喜、高妻孝光	Ibaraki Univ.	X-ray crystal structure analysis of a blue copper protein, pseudoazurin at 1.35 Å resolution	Atomic Resolution X-ray crystallographic Analyses a8nd Spectroscopic Studies of Cytochrome c' from <i>Alcaligenes</i>	2010/10/
209	浅村紗矢香、海野昌喜、高妻孝光	Ibaraki Univ.	精密構造解析から見えるブルー銅タンパク質における弱い相互作用	第21回日本化学会関東支部茨城地区研究交流会	2010/11/
210	小原裕二、藤川和久、山崎和彦、高妻孝光	Ibaraki Univ.	ブルー銅タンパク質シュウドアズリンにおける弱い相互作用の効果	第21回日本化学会関東支部茨城地区研究交流会	2010/11/
211	高階明子、海野昌喜、高妻孝光	Ibaraki Univ.	超高分解能X線結晶構造解析によるヘムタンパク質シクロムc'の特異的構造変化	第21回日本化学会関東支部茨城地区研究交流会	2010/11/
212	Ogawa, J., N. Horinouchi, T. Kawano, T. Sakai, S. Matsumoto, M. Sasaki, Y. Mikami,	京都大学大学院農学研究科	Microrbial production of 2' - deoxyribonucleoside from glucose, acetaldehyde and nucleobase through retrosynthetic multi-step enzymatic reaction.	Multistep Enzyme Catalysed Processes (Austria)	2006/4/18
213	Ogawa, J., S. Kishino, K. Mihara, S. Shimizu	京都大学大学院農学研究科	Polyunsaturated fatty acid transformation by anaerobic bacteria.	96th AOCS Annual Meeting (USA)	2006/5/16
214	Ogawa, J.	京都大学大学院農学研究科	Unique fatty acid transformation catalyzed by anaerobic bacteria: novel isomerization, hydration, dehydration, and saturation	International Congress on Biocatalysis (Germany)	2006/9/4
215	Kataoka, M., S. Shimizu	京都大学大学院農学研究科	A novel bioreduction system for large-scale production of chiral compounds.	Japan-Korea Joint Seminar on Microbial and Plant Biotechnology (Japan)	2006/7

学会・シンポジウム(15/37)

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
216	清水昌	京都大学大学院農学研究科	微生物機能の探索・開発とバイオプロセス構築へのアプローチ	第58回日本生物工学会大会(大阪)	2006/9/11
217	Kataoka, M., S. Shimizu	京都大学大学院農学研究科	Old yellow enzyme catalyzes the asymmetric hydrogenation of the C=C bond of enone compounds: application to the synthesis of a doubly chiral compound, (4R,6R)-actinol, from ketoisophorone via (6R)-levodione.	10th Japanese-Swiss Meeting on Biotechnology and Bioprocess Development (Japan)	2006/9/19
218	Kataoka, M., A. Hoshino, R. Thiwthong, N. Higuchi, T. Ishige, S.	京都大学大学院農学研究科	NADPH-dependent menadione reductase from <i>Candida macedoniensis</i> .	Biocat 2006 (Germany)	2006/9/15
219	片岡道彦, 浦野信行, 川端潤, 清水昌	京都大学大学院農学研究科	キラルテクノロジーにおける進化工学的手法の利用	第58回日本生物工学会大会(大阪)	2006/9/13
220	Kataoka, M., S. Shimizu	京都大学大学院農学研究科	Old yellow enzyme catalyzes the asymmetric hydrogenation of the C=C bond of enone compound.	9th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering (Japan)	2006/10/30
221	Kataoka, M., S. Shimizu	京都大学大学院農学研究科	Production of chiral compounds by microbial enzymes.	International Symposium on Biocatalysis and Bioenergy (Taiwan)	2006/12/6
222	岸野重信, 小川順, 横関健三, 清水昌	京都大学大学院農学研究科	乳酸菌による共役リノール酸(CLA)生産および関与する酵素系の解明	日本農芸化学会2007年度大会(東京)	2007/3/27
223	Ogawa, J., S. Kishino, K. Tanabe, V. Urlacher, R.D. Schmid, S. Shimizu	京都大学大学院農学研究科	Introduction of hydroxyl groups into fatty acids by microbial reactions and engineering of the enzymes involved	98th AOCS Annual Meeting (Canada)	2007/5/13
224	Kataoka, M., F. Kuwabara, S. Shimizu	京都大学大学院農学研究科	Two novel old yellow enzymes catalyzing the asymmetric hydrogenation of C=C bond.	Biotrans 2007 (Spain)	2007/7/8
225	Ogawa, J., S. Kishino, A. Ando, and S. Shimizu	京都大学大学院農学研究科	Unique microbial reactions transforming carbon-carbon double bonds in fatty acids catalyzed by anaerobic bacteria.	Biotrans 2007 (Spain)	2007/7/8
226	Ogawa, J., N. Horinouchi, T. Kawano, T. Sakai, S. Matsumoto, M. Sasaki, Y. Mikami, S. Shimizu	京都大学大学院農学研究科	Microbial production of 2'-deoxyribonucleoside from glucose, acetaldehyde and nucleobase through multi-step enzymatic reactions.	SIM Annual Meeting (USA)	2007/8/2
227	Shimizu, S., J. Ogawa, E. Sakuradani	京都大学大学院農学研究科	Microbial and enzymatic processes for the production of functional lipids.	SIM Annual Meeting (USA)	2007/8/2
228	Ogawa, J., S. Kishino, A. Ando, S. Sugimoto, K. Mihara, K. Tanabe, M. Kawai, A. Murakami, Sakayu	京都大学大学院農学研究科	Unique microbial reactions useful for conjugated fatty acid production.	2nd International Congress on Conjugated Linoleic Acid (Italy)	2007/9/19
229	Shimizu, S.	京都大学大学院農学研究科	Microbial and enzymatic processes for the production of useful	Symbiosis: science, Industry & society; 13th	2007/9/16

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
230	Ogawa, J., V. Urlacher, R.D. Schmid, S. Shimizu	京都大学大学院農学研究科	Industrial Potential of microbial oxidizing enzymes: laccase in environmental biotechnology and cytochrome P450 monooxygenase in fine chemical synthesis.	2nd Kyoto-U.-Korea U. Joint Symposium on Microbiology and Biotechnology (Korea)	2007/10/26
231	Ogawa, J., V. Urlacher, R.D. Schmid, S. Shimizu	京都大学大学院農学研究科	Application of microbial oxidizing enzymes: laccase in environmental biotechnology and cytochrome P450 monooxygenase in fine chemical synthesis.	14th Japanese-German Workshop on Enzyme Technology (Japan)	2007/10/10
232	Ogawa, J., N. Horinouchi, S. Shimizu	京都大学大学院農学研究科	Retrobiosynthetic production of 2'-deoxyribonucleoside from glucose, acetaldehyde and nucleobase through multi-step enzymatic reactions	2007 International Symposium on Biocatalysis and Biotechnology (Taiwan)	2007/12
233	Shimizu, S.	京都大学大学院農学研究科	Yeasts as useful tools for aimed biotransformations-diversity of yeast carbonyl reductases and their use in chiral alcohol production.	36th Annual conference on yeasts (Slovakia)	2008/5/14
234	Hasegawa, J., Y. Yasohara., H. Nanba	(株)カネカ	Development of the versatile enzyme processes for the of the chiral industry.	10th Korea-China-Japan Joint Symposium on Enzyme Engineering (China)	2008/11/2
235	Yasohara, Y., S. Kawano, S., J. Hasegawa	(株)カネカ	Enzymatic synthesis of optically active alcohols by a novel carbonyl reductase	11th Swiss-Japanese Joint Meeting on Biotechnology and Bioprocess Development (Switzerland)	2008/10/27
236	小川順	京都大学大学院農学研究科	Enzymatic Synthesis of 4-Hydroxyisoleucine with Novel Dioxygenase and Aldlas	Biotrans 2009 (Switzerland)	2009/7/6
237	小川順	京都大学大学院農学研究科	A multi-component enzyme system for linoleic acid transformation to conjugated linoleic acid (CLA) in lactic acid bacteria	Enzyme Engineering XX (Netherlands)	2009/9/24
238	片岡道彦	京都大学大学院農学研究科	Two novel carbonyl reductases from yeast and bacterial strains, and their application to the stereoselective synthesis of (R)-3-quinuclidinol	Enzyme Engineering XX (Netherlands)	2009/9/24
239	日比慎	京都大学大学院農学研究科	Enzymatic Synthesis of 4-Hydroxyisoleucine with Novel Dioxygenase	Enzyme Engineering XX (Netherlands)	2009/9/24
240	清水昌	京都大学大学院農学研究科	Industrial microbial enzymes: their discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in Japan	15th German-Japanese Workshop on Enzyme Technology (Germany)	2009/9/26
241	小川順	京都大学大学院農学研究科	A multi-component enzyme system for linoleic acid transformation to conjugated linoleic acid (CLA) in lactic acid bacteria	15th German-Japanese Workshop on Enzyme Technology (Germany)	2009/9/26
242	片岡道彦	京都大学大学院農学研究科	Bioreduction system for chiral technology	15th German-Japanese Workshop on Enzyme Technology (Germany)	2009/9/26
243	日比慎	京都大学大学院農学研究科	Enzymatic Synthesis of 4-Hydroxyisoleucine with Novel Dioxygenase	15th German-Japanese Workshop on Enzyme Technology (Germany)	2009/9/26

学会・シンポジウム(17/37)

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
244	岸野重信	京都大学大学院農学研究科	Conjugated fatty acids production catalyzed by microorganisms	Italy-Japan Symposium, New Trends in Enzyme Science and technology	2009/10/28
245	小川順	京都大学大学院農学研究科	代謝的視点からの機能探索に基づく微生物酵素開発	日本農芸化学会大会	2010/3/30
246	日比慎	京都大学大学院農学研究科	カルボニル還元酵素を利用した4-ヒドロキシイソロイシンの立体選択的合成法の開発	日本農芸化学会大会	2010/3/28
247	岸野重信	京都大学大学院農学研究科	嫌気性細菌を対象とした新規カルボン酸変換反応の探索	日本農芸化学会大会	2010/3/28
248	安藤晃規	京都大学大学院農学研究科	高度不飽和脂肪酸生産性糸状菌 <i>Mortierella alpina</i> 1S-4のカルボキシン耐性遺伝子を利用した脂肪酸組成の改変	日本農芸化学会大会	2010/3/29
249	Ogawa, J., T. Kodera, S. V. Smirnov, N. N. Samsonova, M. Hibi, K. Yokozeki, S. Shimizu	京都大学大学院農学研究科	A Novel Aliphatic Amino Acid Metabolism in Bacteria Generating a Potential Insulinotropic and Antiobesity Amino Acid	101st AOCS (USA)	2010/5/17
250	Sakuradani, E., K. Kobayashi, J. Ogawa, S. Shimizu	京都大学大学院農学研究科	Screening of Microbial n-alkane Degradation through Subterminal Oxidation	101st AOCS (USA)	2010/5/17
251	Kishino, S., S.-B. Park, Y. Ishigaki, J. Ogawa, K. Yokozeki, S. Shimizu	京都大学大学院農学研究科	Linoleic Acid Isomerase in <i>Lactobacillus plantarum</i> AKU1009a is a Multi-component Enzyme System Requiring Oxidoreduction Cofactors	101st AOCS (USA)	2010/5/17
252	Ando, A., Y. Sumida, H. Negoro, D. A. Suroto, J. Ogawa, E. Sakuradani, S. Shimizu	京都大学大学院農学研究科	Eicosapentaenoic Acid Production by Molecular Breeding of Filamentous Fungus <i>Mortierella alpina</i>	101st AOCS (USA)	2010/5/17
253	川野茂	(株)カネカ	酵素を用いた有用キラル化合物の合成	日本化学会関西支部研究最前線講習会	2010/5/27
254	小川順	京都大学大学院農学研究科	バイオベースケミカルインダストリーを創出する有用微生物の設計・探索・開発	JBA新資源生物変換研究会シンポジウム『2020年のバイオインダストリー』	2010/6/17
255	小川順	京都大学大学院農学研究科	Diversification of fatty acid molecular species using microbial function	日本油化学会第49回年会 日台ジョイントシンポジウム「生体触媒と機能性脂質」	2010/9/16
256	日比慎	京都大学大学院農学研究科	微生物酵素を活用する機能性水酸化アミノ酸の生産	Bio Japan 2010 JBA3賞受賞者合同発表会	2010/9/29
257	小川順	京都大学大学院農学研究科	乳酸菌機能の新たな産業利用ー機能性食品素材開発ならびにバイオプロセス開発における展開ー	発酵と代謝シンポジウム 発酵ー日本の底カー	2010/10/1
258	小川順	京都大学大学院農学研究科	脂肪酸分子種を多様化するユニークな微生物代謝	第12回日本-スイスバイオテクノロジー・バイオプロセス会議	2010/10/11

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
259	日比慎	京都大学大学院農学研究科	機能性水酸化アミノ酸生産への微生物酵素の応用	第12回日本-スイスバイオテクノロジー・バイオプロセス会議	2010/10/11
260	Kanamaru, H., M. Ueda, H. Nanba	(株)カネカ	Enzymatic synthesis of chiral amino acids by deracemization.	12th Japanese-Swiss Meeting on Biotechnology and Bioprocess Development (Japan)	2010/10/11
261	Kishino, S., J. Ogawa, K. Yokozeki, S. Shimizu	京都大学大学院農学研究科	Analysis of enzymes in lactic acid bacteria involved in linoleic acid transformation to conjugated linoleic acid	Chinese Society for Enzyme Engineering, Korean Society of Enzyme Engineering (China)	2010/11/7
262	Ogawa, J., S. Kishino, S.-B. Park, K. Yokozeki, S. Shimizu	京都大学大学院農学研究科	Overview of fatty acid saturation metabolism, bihydrogenation, by lactic acid bacteria	2010 Annual Symposium of Asian Section of American Oil Chemists' Society	2010/11/17
263	小川順	京都大学大学院農学研究科	油脂生産性糸状菌 <i>Mortierella alpina</i> による機能性脂質生産	第10回糸状菌分子生物学コンファレンス(2010)シンポジウム「産業界で活躍する糸状菌たち」	2010/11/19
264	小川順	京都大学大学院農学研究科	微生物による脂肪酸分子種の多様性創出	第21回微生物ワークショップ「微生物によるものづくりの新展開」	2010/11/27
265	日比慎	京都大学大学院農学研究科	<i>Bacillus thuringiensis</i> 2e2株由来 L-isoleucine dioxygenase による有用アミノ酸の立体選択的合成	日本農芸化学会2011年度大会	2011/3/26
266	岸野重信	京都大学大学院農学研究科	乳酸菌における共役脂肪酸生産に関わる酵素群の同定および関連酵素による脂肪酸代謝の解明	日本農芸化学会2011年度大会	2011/3/27
267	西田洋巳	東京大学	ガンマブチロラクトン合成と受容の進化的関係	日本進化学会2006年度大会	2006/8/30
268	勝山陽平	東京大学	微生物による非天然型植物ポリケタイド(フラボノイド、スチルベン)の生産	日本農芸化学会関東支部2006年度大会	2006/9/30
269	堀之内末治	東京大学	コンビナトリアル生合成によるフラボノイドの発酵生産	平成18年度日本農学会シンポジウム「動物・微生物における遺伝子工学的研究の現状と課題」	2006/10/14
270	大西康夫	東京大学	微生物ホルモンA-ファクターに関する最近の話題	グラム陽性細菌のゲノム生物学研究会	2007/9/14
271	原啓文	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> におけるA-ファクター制御カスケードの網羅的解析	グラム陽性細菌のゲノム生物学研究会	2007/9/14
272	大西康夫	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> の全ゲノム解読	第1回日本ゲノム微生物学会年会	2007/3/1
273	大西康夫	東京大学	<i>Streptomyces griseus</i> の全ゲノム配列	2007年度日本農芸化学会大会	2007/3/24
274	平野節	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> のストレプトマイシン生合成制御遺伝子 <i>strR</i> の転写制御に関わるAtrA	2007年度日本農芸化学会大会	2007/3/24
275	鈴木宏和	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> のアリルアミンN-アセチルトランスフェラーゼ(NAT)に関する解析	2007年度日本農芸化学会大会	2007/3/24

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
276	加藤淳也	東京大学	AfsAはg-ブチロラクトン生合成の鍵酵素である	2007年度日本農芸化学学会大会	2007/3/24
277	小澤弘樹	東京大学	枯草菌 <i>Bacillus subtilis</i> 由来III型ポリケタイド合成酵素BcsAの機構解析	2007年度日本農芸化学学会大会	2007/3/24
278	淡川孝義	東京大学	アカパンカビ由来III型ポリケタイド合成酵素によるoxoalkylresorcylic acidの合成	2007年度日本農芸化学学会大会	2007/3/24
279	勝山陽平	東京大学	組換え大腸菌と出芽酵母の共培養によるイソフラボンの生産	2007年度日本農芸化学学会大会	2007/3/24
280	大西康夫	東京大学	グリキサゾン生合成経路の解明と3,4-AHBAの発酵生産	2007年度日本農芸化学学会大会シンポジウム	2007/3/24
281	鮎信学	東京大学	非天然型を含む植物ポリケタイドの微生物生産	2007年度日本農芸化学学会大会シンポジウム	2007/3/24
282	堀之内末治	東京大学	コンビナトリアル生合成と微生物	豊かな社会を創造する科学技術シンポジウム	2007/3/6
283	堀之内末治	東京大学	「非微生物型」物質の微生物による発酵生産	Arnold L. Demain 先生の傘寿を祝う講演会	2007
284	田中昌子	東京大学	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)の転写因子AfsRIによるafsS転写制御機構の解明: SARPの転写活性化機構	2007年度日本放線菌学会大会	2007/5/31
285	原啓文	東京大学	DNAマイクロアレイを用いた放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> におけるA-ファクター制御カスケードの網羅的解析	第2回日本ゲノム微生物学会年会	2008/3/6
286	大西康夫	東京大学	放線菌の形態分化・二次代謝に関わる遺伝子発現の網羅的解析	2008年度日本農芸化学学会大会シンポジウム	2008/3/26
287	赤沼元気	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> においてA-ファクターに依存する新規菌体外蛋白質の検索	2008年度日本農芸化学学会大会	2008/3/26
288	平野節	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> の気中菌糸形成に関わる新たな遺伝子 <i>SGR3340</i> についての解析	2008年度日本農芸化学学会大会	2008/3/26
289	宮永顕正	東京大学	脂溶性ポリケタイド生合成におけるI型脂肪酸合成酵素からIII型ポリケタイド合成酵素への基質の受け渡し	2008年度日本農芸化学学会大会	2008/3/26
290	手塚武揚	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> におけるsmall non-coding RNAの同定	2008年度日本農芸化学学会大会	2008/3/26
291	原啓文	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> におけるA-ファクター制御カスケードの網羅的解析	2008年度日本農芸化学学会大会	2008/3/26
292	淡川孝義	東京大学	<i>Aspergillus terreus</i> 由来I型ポリケタイド合成酵素によるemodin合成	2008年度日本農芸化学学会大会	2008/3/26
293	池 遠哉	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> の形態分化に関与する転写抑制因子DasRに関する解析	2008年度日本農芸化学学会大会	2008/3/26
294	丸島和也	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> の <i>cebR</i> 遺伝子産物はセロオリゴ糖の代謝をグローバルに制御する	2008年度日本農芸化学学会大会	2008/3/26
295	松沢未来	東京大学	クルクミノイド合成を司るイネ由来III型ポリケタイド合成酵素の発見	2008年度日本農芸化学学会大会	2008/3/26
296	勝山陽平	東京大学	イネ由来のクルクミノイド合成酵素(CUS)の機能解析	2008年度日本農芸化学学会大会	2008/3/26
297	鮎信学	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> の phenolic lipid 生合成経路とその生理機能	2008年度日本放線菌学会大会	2008/7/10

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
298	丸島和也	東京大学	<i>Streptomyces griseus</i> における <i>cebR</i> 遺伝子産物によるセロオリゴ糖代謝のグローバルな制御	2008年度日本放線菌学会大会	2008/7/10
299	平野節	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> の気中菌糸形成に関わる新たな遺伝子 <i>SGR3340</i> の解析	2008年度日本放線菌学会大会	2008/7/10
300	手塚武揚	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> における small non-coding RNA の同定	2008年度日本放線菌学会大会	2008/7/10
301	赤沼元気	東京大学	<i>Streptomyces griseus</i> における新規 A-ファクター依存性分泌タンパク質のプロテオーム解析	2008年度日本放線菌学会大会	2008/7/10
302	鮎信学	東京大学	<i>Azotobacter vinelandii</i> のフェノール性脂質の生合成	天然物討論会	2008/9/29
303	堀之内末治	東京大学	「非微生物型」機能性化合物の微生物による醗酵生産	加藤記念バイオサイエンス研究振興財団創立20周年記念講演会	2008
304	手塚武揚	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> における small non-coding RNA の同定	第3回日本ゲノム微生物学会大会	2009/3/5
305	鮎信学	東京大学	イネ <i>Oryza sativa</i> の III 型ポリケタイド合成酵素の網羅的機能解析	2009年度日本農芸化学学会大会	2009/3/27
306	林貴之	東京大学	<i>Myxococcus xanthus</i> 由来の III 型ポリケタイド合成酵素の fatty acyl AMP ligase 依存的 priming 機構	2009年度日本農芸化学学会大会	2009/3/27
307	松沢未来	東京大学	Alkylresorcylic acid を合成するイネ由来 III 型ポリケタイド合成酵素の機能解析	2009年度日本農芸化学学会大会	2009/3/27
308	勝山陽平	東京大学	ウコン由来の III 型ポリケタイド合成酵素によるクルクミンの生合成	2009年度日本農芸化学学会大会	2009/3/27
309	宮永顕正	東京大学	III 型ポリケタイド合成酵素による bis (dihydroxyalkylbenzene) の合成	2009年度日本農芸化学学会大会	2009/3/27
310	仲野千秋	東京大学	枯草菌 <i>Bacillus subtilis</i> 由来 III 型ポリケタイド合成酵素 BcsA の過剰発現株により生産される脂溶性ポリケタイドの構造解析	2009年度日本農芸化学学会大会	2009/3/27
311	淡川孝義	東京大学	b-ラクタマーゼによる I 型ポリケタイド合成酵素からの生成物の解離	2009年度日本農芸化学学会大会	2009/3/27
312	平野節	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> における 7 個の WhiB ホモログの解析	2009年度日本農芸化学学会大会	2009/3/27
313	赤沼元気	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> における <i>bldK</i> の機能解析	2009年度日本農芸化学学会大会	2009/3/27
314	野口秋雄	東京大学	<i>Streptomyces murayamaensis</i> の 4-hydroxy-3-nitrosobenzamide 生合成の解明	2009年度日本放線菌学会大会	2009/7/16
315	堀之内末治	東京大学	微生物のものづくり能力を利用した「非天然型」化合物の発酵生産	天然有機化合物討論会50周年記念講演会	2009/5/15

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
316	肥後明佳	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> のグローバル転写因子 AdpA の ChIP-seq 解析	第4回日本ゲノム微生物学会年会	2010/3/7
317	野口秋雄	東京大学	C-ニトロソ化反応を触媒する新規酸化酵素の機能解析	2010年度日本農芸化学会大会	2010/3/27
318	赤沼元気	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> における新規リボソーム結合蛋白質の探索と機能解析	2010年度日本農芸化学会大会	2010/3/27
319	手塚武揚	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> における small RNA 結合タンパク質の探索	2010年度日本農芸化学会大会	2010/3/27
320	手塚武揚	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> の生育に必須な新規 RNase に関する解析	2010年度日本農芸化学会大会	2010/3/27
321	植木正芳	東京大学	<i>Streptomyces griseus</i> の A-ファクター依存性分泌グリセロホスホジエステルアホスホジエステラーゼに関する解析	2010年度日本農芸化学会大会	2010/3/27
322	中村一成	東京大学	グリキサゾン生合成の経路特異的転写活性化因子に対するアンチアクチベータータンパク質の発見	2010年度日本農芸化学会大会	2010/3/27
323	関太ホン	東京大学	放線菌の菌糸成長と胞子形成における細胞壁加水分解酵素の局在と機能に関する解析	2010年度日本農芸化学会大会	2010/3/27
324	大谷啓志	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> の菌糸形成に関わる新規シグマ因子の解析	2010年度日本農芸化学会大会	2010/3/27
325	淡川孝義	東京大学	<i>Actinoplanes missouriensis</i> 由来の新規テルペノイドポリケタイド融合化合物合成に関わる遺伝子クラスターの機能解析	2010年度日本農芸化学会大会	2010/3/27
326	淡川孝義	東京大学	I型ポリケタイド合成酵素から生成物を解離する β -lactamase 型チオエステラーゼの機能解析	2010年度日本農芸化学会大会	2010/3/27
327	森田翔	東京大学	放線菌のカタボライト抑制に関するグルコースキナーゼの役割についての検討	2010年度日本農芸化学会大会	2010/3/27
328	肥後明佳	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> のグローバル転写因子 AdpA の ChIP-seq 解析	2010年度日本農芸化学会大会	2010/3/27
329	田中昌子	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) の二次代謝を制御する転写因子 AfsR の被リン酸化部位に関する解析	2010年度日本農芸化学会大会	2010/3/27
330	林貴之	東京大学	<i>Myxococcus xanthus</i> 由来の fatty acyl AMP ligase 依存的 priming 機構を持った III 型ポリケタイド合成酵素の機能解析	2010年度日本農芸化学会大会	2010/3/27
331	佐藤龍太郎	東京大学	窒素固定細菌由来 III 型ポリケタイド合成酵素の環化機構の解析	2010年度日本農芸化学会大会	2010/3/27
332	勝山陽平	東京大学	ウコン由来クルクミン合成酵素 (CURS) の結晶構造解析	2010年度日本農芸化学会大会	2010/3/27
333	勝山陽平	東京大学	組換え大腸菌と組換え酵母の共培養による非天然型イソフラボンの生合成	2010年度日本農芸化学会大会	2010/3/27
334	手塚武揚	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> の生育に必須な新規 RNase の解析	日本ゲノム微生物学会第4回若手の会	2010/10/1

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
335	大谷啓志	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> における主要シグマ因子を制御する新規 ECFシグマ因子の解析	日本ゲノム微生物学会第4回若手の会	2010/10/1
336	石垣祐二	東京大学	放線菌 <i>Streptomyces griseus</i> におけるリジンアセチル化タンパク質の同	2010年度日本放線菌学会大会	2010/9/2
337	Ohnishi, Yasuo	東京大学	The biosynthetic pathway for grixazone	The 3rd Japan-Finland Biotechnology Symposium	2006/8/9
338	Horinouchi, Sueharu	東京大学	Combinatorial biosynthesis of flavonoids in bacteria	The 3d Japan-Finland Biotechnology Symposium	2006/8/10
339	Ohnishi, Yasuo	東京大学	Cloning and characterization of the grixazone biosynthetic gene cluster.	Workshop on the Present and Future of Actinomycete Research	2006/9/22
340	Ohnishi, Yasuo	東京大学	AfsR recruits RNA polymerase on the afsS promoter - a model of transcriptional activation by SARPs	Workshop on the Present and Future of Actinomycete Research	2006/9/22
341	Horinouchi, Sueharu	東京大学	Fermentative production of natural and unnatural flavonoids by macroorganisms	The 10th Japanese-Swiss Meeting on Biotechnology and Bioprocess Development	2006/8/30
342	Ohnishi, Yasuo	東京大学	Regulation of grixazone biosynthesis by <i>Streptomyces griseus</i>	10th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms	2006/6/26
343	Ohnishi, Yasuo	東京大学	Complete genome sequence of <i>Streptomyces griseus</i> IFO13350	14th International Symposium on the Biology of Actinomycetes	2007/8/25
344	Funa, Nobutaka	東京大学	Chemical reactions and biological functions of type III polyketide synthases	7th US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products: Enzymology, Structural Biology, and Drug Discovery	2008/6/21
345	Awakawa, Takayoshi	東京大学	Pentaketide resorcylic acid synthesis by type III polyketide synthase from <i>Neurospora crassa</i>	7th US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products: Enzymology, Structural Biology, and Drug Discovery	2008/6/21
346	Miyanaga, Akimasa	東京大学	Direct transfer of starter substrates from type I fatty acid synthase to type III polyketide synthases in phenolic lipid synthesis in <i>Azotobacter vinelandii</i>	7th US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products: Enzymology, Structural Biology, and Drug Discovery	2008/6/21
347	Katsuyama, Yohei	東京大学	<i>In vitro</i> synthesis of curcuminoids by type III polyketide synthase from <i>Oryza sativa</i>	7th US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products: Enzymology, Structural Biology, and Drug Discovery	2008/6/21
348	Horinouchi, Sueharu	東京大学	Chemistry and biology of the streptomycin-producer <i>Streptomyces griseus</i>	2008 International Symposium on "Exploring the Forefront of Microbial	2008
349	Ohnishi, Yasuo	東京大学	Transcriptional analysis of the A-factor regulatory cascade in <i>Streptomyces griseus</i>	4th Japan-Finland Biotechnology Symposium	2008/10/2

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
350	Ohnishi, Yasuo	東京大学	Genome-wide analysis of the A-factor regulatory cascade	Japan-UK Workshop on <i>Streptomyces</i> Genome Biology: Genomics of Antibiotic-Producing Actinomycetes: Implications and	2008/10/31
351	Funa, Nobutaka	東京大学	Microbial production of non-bacterial compounds by combinatorial biosynthesis	Japan-UK Workshop on <i>Streptomyces</i> Genome Biology: Genomics of Antibiotic-Producing Actinomycetes: Implications and	2008
352	Marushima, Kazuya	東京大学	A copper-export system in <i>Streptomyces griseus</i>	Japan-UK Workshop on <i>Streptomyces</i> Genome Biology: Genomics of Antibiotic-Producing Actinomycetes: Implications and	2008
353	Funa, Nobutaka	東京大学	Microbial production of unnatural polyketides by exploiting plant type III polyketide synthases	2008 RIKEN Conference	2008
354	Ohnishi, Yasuo	東京大学	Regulation of gene expression by a microbial hormone in <i>Streptomyces</i>	International Symposium on "Bacteria made Organelles made Eukaryotic Cells"	2008/11/29
355	Ohnishi, Yasuo	東京大学	Genome-wide analysis of the A-factor regulatory cascade in <i>Streptomyces griseus</i>	International Symposium (Japanese Society for Bacteriology): Bacterial Genome Engineering	2009/3/3
356	Ohnishi, Yasuo	東京大学	The A-factor regulatory cascade in <i>Streptomyces griseus</i>	15th International Symposium on the Biology of Actinomycetes,	2009/8/23
357	Ohnishi, Yasuo	東京大学	Regulation of secondary metabolism and morphogenesis by A-factor in <i>Streptomyces griseus</i>	International Symposium in the JSBBA meeting	2010/3/10
358	Ohnishi, Yasuo	東京大学	Genome-wide analysis of the AdpA regulon in <i>Streptomyces griseus</i>	International Symposium in the KMB meeting	2010/1/25
359	Ohnishi, Yasuo	東京大学	Novel nitroso-forming σ -aminophenol oxidase involved in 4-hydroxy-3-nitrosobenzamide	International Chemical Congress of Pacific Basin Societies	2010/12/17
360	山崎秀司	バイオテクノロジー本部遺伝子解析課	タンパク質コード領域の精密予測とタンパク質プロファイリングのためのプロテオーム解析	NITE微生物資源シンポジウム	2007/10/26
361	西嶋桂子	バイオテクノロジー本部遺伝子解析課	網羅的プロテオーム解析によるアノテーションの精密化	第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会	2007/12/11
362	安宅花子	バイオテクノロジー本部遺伝子解析課	Protein Profiling of Escherichia coli Wild-Type Strain and Reduced-Genome Strain by Label-Free Quantitative Proteomics.	56th ASMS Conference on Mass Spectrometry	2008/6/2
363	佐々木和実	バイオテクノロジー本部遺伝子解析課	遺伝子大量削除Escherichia coli strain K-12 W3110の網羅的プロテオーム解析及び代謝変化の検討	日本農芸化学会2009年度大会	2009/3/27
364	福田 淳	バイオテクノロジー本部資源情報解析課	有機溶媒耐性菌Rhodococcus opacus B4株のプロテオーム解析について	環境バイオテクノロジー学会2009年度大会	2009/6/23

学会・シンポジウム(24/37)

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
365	Masayuki Inui, Alain A. Vertès, Shohei Okino, Takashi Watanabe and Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	The growth-independence bioprocess for ethanol production using <i>Corynebacterium glutamicum</i>	The 28th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals	2006/5
366	Shohei Okino, Alain A. Vertès, Masayuki Inui and Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Succinic Acid Production by genetically modified <i>Corynebacterium glutamicum</i> under Oxygen-Deprivation	The 28th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals	2006/5
367	Yota Tsuge, Nobuaki Suzuki, Masayuki Inui and	(財)地球環境産業技術研究機構	Random Genome Deletion Studies of <i>Corynebacterium glutamicum</i>	American Society for Microbiology 106th General Meeting	2006/5
368	Masayuki Inui, Nobuaki Suzuki, Yota Tsuge, Naoko Okai, Masako Suda, Alain A. Vertès and Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Genome engineering and analysis of <i>Corynebacterium glutamicum</i>	10th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms	2006/6
369	Masayuki Inui, Alain A. Vertès and Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Oxygen-Deprived Bioprocesses for Biorefining Mixed Sugars using Growth-Arrested <i>Corynebacteria</i>	The 3rd Annual World Congress on Industrial Biotechnology and Bioprocessing	2006/7
370	Sung Ok Han, Masayuki Inui, Roy H. Doi and Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Regulation of Expression of Cellulosomes in <i>Clostridium cellulovorans</i> During Growth on Different Composition Biomass	The 3rd Annual World Congress on Industrial Biotechnology and Bioprocessing	2006/7
371	Masayuki Inui, Shohei Okino, Masako Suda, Haruhiko Teramoto, Toru Jyojima, Alain A. Vertès and	(財)地球環境産業技術研究機構	A Simple, Robust, and Economical Process for Biorefineries: Efficient Production of Ethanol and Organic Acids by Growth-Arrested <i>Corynebacteria</i>	Society for Industrial Microbiology Annual Meeting and Exhibition 2006	2006/8
372	Masayuki Inui, Shohei Okino, Masako Suda, Haruhiko Teramoto, Toru Jyojima, Alain A. Vertès and	(財)地球環境産業技術研究機構	Towards biorefineries and cellulosic ethanol or organic acids: Efficient production from mixed sugars by growth-arrested bioprocesses using <i>Corynebacteria</i>	232nd ACS National Meeting	2006/9
373	荒井隆益、乾 将行、Roy H. Doi、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	<i>Clostridium cellulovorans</i> が生産する糖質分解酵素ファミリー9に属する酵素特性	日本生物工学会平成18年度大会	2006/9
374	酒井伸介、沖野祥平、吉良典子、川口秀夫、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌を用いたバイオエタノール生産プロセスの構築に関する基礎的検討	日本生物工学会平成18年度大会	2006/9
375	土田芳樹、酒井伸介、沖野祥平、渡辺隆司、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	リグノセルロース由来エタノール発酵阻害物質存在下におけるコリネ型細菌によるエタノール生産	日本生物工学会平成18年度大会	2006/9
376	Hideaki Yukawa, Masayuki Inui and Alain A. Vertès	(財)地球環境産業技術研究機構	Biorefining Mixed Sugars using High Densities of Growth-Arrested <i>Corynebacteria</i>	AIChE 2006 Annual Meeting	2006/11
377	Masayuki Inui, Hideo Kawaguchi, Shohei Okino, Masako Suda, Miho Sasaki, Alain A. Vertès and Hideaki	(財)地球環境産業技術研究機構	Conversion of Mixed Sugars into Ethanol by Recombinant <i>Corynebacterium glutamicum</i>	AIChE 2006 Annual Meeting	2006/11
378	Yota Tsuge, Masayuki Inui and Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Identification of a New Gene Required for Cell Wall Separation in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	American Society for Cell Biology 46th Annual Meeting	2006/12

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
379	Shohei Okino, Shinsuke Sakai, Hideo Kawaguchi, Miho Sasaki, Masako Suda, Masavuki Inui and	(財)地球環境産業技術研究機構	Ethanol Production from Mixed Sugars by Genetically Engineered <i>Corynebacterium glutamicum</i>	The 4th World Congress on Industrial Biotechnology and Bioprocessing	2007/3
380	酒井伸介、佐々木美穂、須田雅子、沖野祥平、川口秀夫、土田芳樹、乾将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌を用いた混合糖類からのバイオエタノール生産プロセスの構築	日本農芸化学会2007年度大会	2007/3
381	川口秀夫、沖野祥平、乾将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌におけるarabinose代謝経路の構築	日本農芸化学会2007年度大会	2007/3
382	沖部奈緒子、稲富健一、塚本 晃、乾将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌における人工セルロソームの発現・分泌の試み	日本農芸化学会2007年度大会	2007/3
383	田中裕也、岡井直子、乾将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌におけるPTS遺伝子の発現解析	日本農芸化学会2007年度大会	2007/3
384	荻野英賢、寺本陽彦、乾将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	SOS応答時におけるコリネ型細菌の細胞分裂阻害機構の解析	日本農芸化学会2007年度大会	2007/3
385	小柳喬、片山高嶺、鈴木秀之、熊谷英彦	石川県立大学	転写調節因子TyrRの変異体作成と分子機能解析	2006年度日本農芸化学会大会	2006/3
386	鈴木秀之、小柳喬、井塚俊介、大西晶子、熊谷英彦	石川県立大学	大腸菌のyliA, B, C, D遺伝子はABC型グルタチオンインポーターをコードしている	2006年度日本農芸化学会大会	2006/3
387	壺井雄一、栗原新、織田晋平、熊谷英彦、鈴木秀之	石川県立大学	大腸菌の新規プトレッシンインポーター・PuuPIに関する研究	2006年度日本農芸化学会大会	2006/3
388	栗原新、織田晋平、熊谷英彦、鈴木秀	石川県立大学	大腸菌の新規 γ -グルタミルプトレッシン合成酵素	2006年度日本農芸化学会大会	2006/3
389	洪ジョン、玉置尚徳、熊谷英彦	石川県立大学	<i>Thermoascus aurantiacus</i> 由来 β -glucosidase(BGL2)の有機溶媒による活性化	2006年度日本農芸化学会大会	2006/3
390	高木幸信、赤田倫治、熊谷英彦、玉置尚徳	石川県立大学	2006 LOHを利用したCandida albicans遺伝子欠損ライブラリーの開発	酵母遺伝学フォーラム	
391	S. Kurihara, S. Oda, H.G. Kim, H. Kumagai and H. Suzuki	石川県立大学	A novel γ -glutamylputrescine synthetase in the putrescine utilization pathway of <i>Escherichia coli</i> K-12	20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress	
392	H. Suzuki, S. Izuka, A. Onishi, T. Koyanagi and H. Kumagai	石川県立大学	A novel glutathione importer of <i>Escherichia coli</i> K-12 with an ATP-binding cassette	20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress	
393	T. Koyanagi, T. Katayama, H. Suzuki and H. Kumagai	石川県立大学	Isolation and characterization of mutant transcriptional regulator TyrR with an altered self-association ability	20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress	
394	H. Tamaki, J. Hong, T. Katayama and H. Kumagai	石川県立大学	Construction of thermo-tolerant yeasts expressing thermo-stable cellulase genes	The 5th JSPS-NCT Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Applications	
395	T. Katayama, A. Tsuchiya, H. Kumagai and K. Yamamoto	石川県立大学	1,2- α -L-fucosidase of <i>Bifidobacterium bifidum</i> -Structure and function-	The 10th Swiss-Japanese Joint Meeting on Biotechnology and Bioprocess Development	

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
396	T. Sakai, N. Kaga, G. Umitsuki and M. Wachi	東京工業大学	Fermentative production of pyruvate by <i>Escherichia coli</i> RNase G mutant	The 10th International Symposium on the GENETICS OF INDUSTRIAL	2006/6
397	佐藤裕紀、折下圭太、白井智量、永久圭介、平沢 敬、清水 浩、和地正明	東京工業大学	<i>Corynebacterium glutamicum</i> の持つ2つの補充経路のグルタミン酸生産における役割	日本生物工学会平成18年度大会	2006/9
398	A. Takada and M. Wachi	東京工業大学	Role of RNase E in oxidative-stress protection and acid tolerance of <i>Escherichia coli</i>	The 3rd International E. coli Alliance Conference on Systems Biology 2006	2006/10
399	辰巳涼子、和地正明	東京工業大学	大腸菌 TolC は 5-アミノレブリン酸の排出に関与する	日本分子生物学会2006フォーラム『分子生物学の未来』	2006/12
400	石渡 要、阿波雄基、和地正明	東京工業大学	5-アミノレブリン酸類似構造を有する新規抗生物質 Alaremycin の作用機構	日本分子生物学会2006フォーラム『分子生物学の未来』	2006/12
401	鈴木啓章、伊藤啓、田中 勲、和地正明	東京工業大学	コリネ型細菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i> の薬剤排出ポンプ-転写因子をコードする <i>cgl2611-cgl2612</i> オペロンの機能解析	日本分子生物学会2006フォーラム『分子生物学の未来』	2006/12
402	坂井太郎、和地正明	東京工業大学	大腸菌 RNase G の中央代謝系の制御機構の解析	日本農芸化学会2007年度大会	2007/3
403	中村 純、平野聖子、伊藤久生、和地正明	東京工業大学	グルタミン酸発酵成立機作の解明: 最近の進展を中心に	日本農芸化学会2007年度大会	2007/3
404	濱崎孝伸、Phoung Anh Thi, Nguyen, 栢森綾、和地正明	東京工業大学	大腸菌 RNase G による <i>adhE</i> mRNA の認識切断機構の解析	日本農芸化学会2007年度大会	2007/3
405	和地正明、高田綾子	東京工業大学	細菌のストレス応答における RNase E の役割	第80回日本細菌学会総会	2007/3
406	禪院 進、椎名 春樹、和田 大、横田	北海道大学	<i>Corynebacterium glutamicum</i> のピルビン酸キナーゼ欠損株の解析	日本農芸化学会2007年度大会	2007/3
407	Haruhiko Teramoto, Hideo Kawaguchi, Shohei Okino, Masayuki Inui and Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Improved ethanologenic <i>Corynebacterium glutamicum</i> strains for fuel ethanol production from lignocellulosic biomass	The 29th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals	2007/5
408	Yuya Tanaka, Naoko Okai, Haruhiko Teramoto, Masayuki Inui and Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Regulation of the Expression of Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase System (PTS) Genes in <i>Corynebacterium glutamicum</i> R	107th General Meeting	2007/5
409	Hidetaka Ogino, Haruhiko Teramoto, Masayuki Inui and Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Identification of a Novel SOS Inducible Cell-Division Inhibitor in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	American Society for Microbiology 107th General Meeting	2007/5
410	Taku Nishimura, Alain A. Vertès, Yoshifumi Shinoda, Masayuki Inui and Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Anaerobic Growth of <i>Corynebacterium glutamicum</i> Using Nitrate as a Terminal Electron Acceptor	American Society for Microbiology 107th General Meeting	2007/5
411	Shinsuke Sakai, Miho Sasaki, Masako Suda, Shohei Okino, Toru Jyojima, Yoshiki Tsuchida, Masayuki Inui and Hideaki	(財)地球環境産業技術研究機構	Efficient ethanol production from glucose and xylose mixture using growth-arrested <i>Corynebacteria</i>	234th ACS National Meeting	2007/8
412	Shohei Okino, Masako Suda, Masayuki Inui and Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Production of D-lactic acid by the RITE bioprocess using genetically engineered <i>Corynebacterium glutamicum</i>	234th ACS National Meeting	2007/8

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
413	Miho Sasaki, Hideo Kawaguchi, Shohei Okino, Toru Jyojima, Masayuki Inui and Hideaki	(財)地球環境産業技術研究機構	Engineering of an L-arabinose metabolic pathway in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	234th ACS National Meeting	2007/8
414	寺本陽彦、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌におけるC4-ジカルボン酸輸送体の探索	日本生物工学会平成19年度大会	2007/9
415	佐々木美穂、城島透、沖野祥平、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	組換えコリネ型細菌によるソフトバイオマス由来混合糖からの有機酸生産	日本生物工学会平成19年度大会	2007/9
416	Masako Suda, Shohei Okino, Hiroshi Nonaka, László G. Puskás, Alain A. Vertès, Masayuki Inui and	(財)地球環境産業技術研究機構	Transcriptional profiling of <i>Corynebacterium Glutamicum</i> metabolism during organic acid production under oxygen deprivation conditions	2007 AIChE Annual Meeting	2007/11
417	Kaori Yasuda, Toru Jyojima, Masako Suda, Shohei Okino, Masayuki Inui and Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Analyses and suppression of acetate formation for development of efficient biorefining process by growth-arrested corynebacteria	2007 AIChE Annual Meeting	2007/11
418	田中裕也、寺本陽彦、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌における共通pts遺伝子の発現制御機構	日本農芸化学会2008年度大会	2008/3
419	豊田晃一、寺本陽彦、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌におけるGAPDHの発現制御機構	日本農芸化学会2008年度大会	2008/3
420	西村 拓、寺本陽彦、A.A. Vertès, 乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌の <i>narKGHJI</i> オペロンの発現を抑制する新規な転写調節因子 ArnR	日本農芸化学会2008年度大会	2008/3
421	安田佳織、城島透、須田雅子、沖野祥平、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	酸素抑制条件下におけるコリネ型細菌の酢酸生成経路の解析	日本農芸化学会2008年度大会	2008/3
422	荻野英賢、柘植陽太、寺本陽彦、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌の細胞分離に関わる遺伝子群の解析	日本農芸化学会2008年度大会	2008/3
423	鈴木伸昭、渡辺恵郎、沖部奈緒子、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	2Dゲル電気泳動法を用いたコリネ型細菌の分泌タンパク質の解析	日本農芸化学会2008年度大会	2008/3
424	須田雅子、沖野祥平、野中 寛、L.G. Puskás, A.A. Vertès, 乾 将行、湯川英	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌の酸素抑制条件下における遺伝子発現解析	日本農芸化学会2008年度大会	2008/3
425	得平茂樹、寺本陽彦、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌におけるRNAポリメラーゼσ因子の機能解析	日本農芸化学会2008年度大会	2008/3
426	寺本陽彦、須田雅子、今宮隆志、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌におけるメチオニン合成系遺伝子群の発現制御機構	日本農芸化学会2008年度大会	2008/3
427	木村桜子、土田芳樹、鈴木伸昭、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌の新規プラスミドの研究 I 高コピー数プラスミドの単離と解析	日本農芸化学会2008年度大会	2008/3
428	土田芳樹、木村桜子、鈴木伸昭、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌の新規プラスミドの研究 II Large plasmidの単離と解析	日本農芸化学会2008年度大会	2008/3
429	佐々木美穂、川口秀夫、城島透、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	組換えコリネ型細菌によるソフトバイオマス由来混合糖の同時利用	日本農芸化学会2008年度大会	2008/3
430	沖野祥平、須田雅子、藤倉慶太郎、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌を用いたD-乳酸の生産	日本農芸化学会2008年度大会	2008/3

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
431	塚本 晃、荒井隆益、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	嫌気性 <i>Clostridium</i> 属細菌が産生するセルロソームによるバイオマス分解	日本農芸化学会2008年度大会	2008/3
432	藤井美帆、城島透、沖野祥平、乾将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	RITEバイオプロセスによるアラニン生産株の育種	日本農芸化学会2008年度大会	2008/3
433	城島透、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	遺伝子組換え大腸菌によるイソプロパノールの生産	日本農芸化学会2008年度大会	2008/3
434	Susumu Inamoto, Tomomi Makino-Watanabe, Michiyo Takayama and Michio Oishi	かずさDNA研究所	RecA-assisted PCR with CODEHOPs for efficient cloning of gene families from metagenomes	10th Anniversary of Kazusa ARC: International Symposium on Advanced Functional Genomics	2007/10
435	Susumu Inamoto, Tomomi Makino-Watanabe, Michiyo Takayama and Michio Oishi	かずさDNA研究所	Thermostable RecA-assisted PCR for efficient and specific amplification of genes from environmental DNA	BMB2007(第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会)	2007/12
436	稲本 進、高山道代、牧野(渡邊)友美、大石道夫	かずさDNA研究所	RecA蛋白質を用いたPCRによる環境試料からの糖化酵素遺伝子の効率の取得	日本農芸化学会2008年度大会	2008/3
437	玉置尚徳、島田篤、伊藤良浩、高瀬珠里、中山玲子、熊谷英彦	石川県立大学	出芽酵母PAF合成酵素遺伝子の同定	第49回日本脂質生化学会	2007/6
438	高木幸信、赤田倫治、熊谷英彦、山本憲二、玉置尚徳	石川県立大学	病原性真菌 <i>Candida albicans</i> におけるUV誘導型LOHの解析	酵母遺伝学フォーラム第40回研究報告会	2007/9
439	高瀬珠里、伊藤良浩、島田篤、中山玲子、熊谷英彦、玉置尚徳	石川県立大学	Lpt1の出芽酵母リン脂質組成に対する影響	酵母遺伝学フォーラム第40回研究報告会	2007/9
440	伊藤良浩、島田篤、高瀬珠里、中山玲子、熊谷英彦、玉置尚徳	石川県立大学	出芽酵母PAF合成酵素の新規リゾリン脂質アシル転移酵素としての機能解析	酵母遺伝学フォーラム第40回研究報告会	2007/9
441	玉置尚徳、伊藤良浩、島田篤、高瀬珠里、中山玲子、熊谷英彦	石川県立大学	出芽酵母PAF合成酵素遺伝子の同定	酵母遺伝学フォーラム第40回研究報告会	2007/9
442	H. Tamaki, J. Hong, T. Katayama and H. Kumagai	石川県立大学	Cloning of thermo-stable cellulase genes and their expression in thermo-tolerant yeast	JSPS-NRCT Concluding Joint Seminar "Development of Thermotolerant microbial resources and their	2007/10
443	伊藤良浩、島田篤、大家美穂子、高瀬珠里、野崎博之、中山玲子、熊谷英彦、玉置尚徳	石川県立大学	出芽酵母新規リゾリン脂質アシル転移酵素LPT1の解析	第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会	2007/12
444	玉置尚徳、島田篤、伊藤良浩、高瀬珠里、中山玲子、熊谷英彦	石川県立大学	出芽酵母新規リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼの機能解析	日本農芸化学会2008年度大会	2008/3
445	濱崎孝伸、Phoung Anh Thi Nguyen、栢森綾、雨貝郁、坂井太郎、和地正明	東京工業大学	大腸菌RNase Gによる <i>adhE</i> mRNA の認識切断機構の解析	日本生物工学会平成19年度大会	2007/9
446	和地正明、高田綾子	東京工業大学	細菌のアクチン様細胞骨格タンパク質MreBの転写における役割	第30回日本分子生物学会年会	2007/12
447	高田綾子、和地正明	東京工業大学	アクチン様タンパク質MreB阻害剤による遊走性の阻害	第2回日本ゲノム微生物学会年会	2008/3

学会・シンポジウム(29/37)

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
448	辰巳涼子、和地正明	東京工業大学	TolCタンパク質を介したポルフィリンの排出	第81回日本細菌学会総会	2008/3
449	前田智也、坂井太郎、和地正明	東京工業大学	コリネ型細菌のRNase E/Gファミリー酵素の機能解析	日本農芸化学会2008年度大会	2008/3
450	辰巳涼子、和地正明	東京工業大学	TolCタンパク質を介したポルフィリンの排出	日本農芸化学会2008年度大会	2008/3
451	禪院 進、嘉藤由衣、和田 大、横田篤	北海道大学	<i>Corynebacterium glutamicum</i> のピルビン酸キナーゼ欠損がグルタミン酸発酵に与える影響	日本農芸化学会2008年度大会	2008/3
452	Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Production of biofuels/biochemicals from soft biomass by the RITE Bioprocess	The 5th World Congress on Industrial Biotechnology and Bioprocessing	2008/4
453	Hideo Kawaguchi, Masayuki Inui and Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Ethanol production from mixed sugars by genetically engineered <i>Corynebacterium glutamicum</i>	Imperial College—東大、早稲田学生交流会	2008/5
454	Yuya Tanaka, Haruhiko Teramoto, Masayuki Inui, Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Regulation of Expression of Genes Encoding General Components of the Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase System (PTS) in <i>Corynebacterium</i>	American Society for Microbiology 108th General Meeting	2008/6
455	荻野英賢、柘植陽太、寺本陽彦、乾将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌の細胞複製機構の解析	日本農芸化学会関東支部2008年度若手企画研究会第7回微生物研究会	2008/6
456	趙 雅蘋、杉浦純、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	未利用古紙からの酵素法による糖製造技術の開発	第75回紙パルプ研究発表会	2008/6
457	Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Biofuel production from mixed sugars derived from lignocellulosic biomass by the RITE Bioprocess	4th International Symposium on Energy, Informatics and	2008/7
458	Koichi Toyoda, Haruhiko Teramoto, Masayuki Inui, Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Transcriptional Regulation of the <i>gapA</i> Gene Encoding Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase in <i>Corynebacterium glutamicum</i> R	SIM Annual Meeting	2008/8
459	Taku Nishimura, Haruhiko Teramoto, Alain A. Vertès, Masayuki Inui, Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Transcriptional Regulation of the <i>narKGHJI</i> Operon Involved in Nitrate Respiration System in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	SIM Annual Meeting	2008/8
460	Shigeki Ehira, Haruhiko Teramoto, Masayuki Inui, Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	The Group 2 Sigma Factor SigB Positively Regulates Glucose Metabolism under Oxygen-deprived Conditions in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	SIM Annual Meeting	2008/8
461	渡辺恵郎、土田芳樹、沖部奈緒子、寺本陽彦、鈴木伸昭、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌における分泌シグナルの解析	日本生物工学会平成20年度大会	2008/8
462	Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Biofuel production by simultaneous utilization of C5&C6 sugars	2008 Pacific Rim Summit on Industrial Biotechnology and Bioenergy	2008/9
463	Susumu Inamoto, Michiyo Takayama, Michio Oishi	Kazusa DNA Research Institute	Isolation and Characterization of a Gene Encoding a Member of the Glycoside Hydrolase Family 6 from the Thermophilic Actinomycete <i>Thermobispora bispora</i> .	Mie Bioforum: Biotechnology of Lignocellulose Degradation, Biomass Utilization and Biorefinery	2008/9/1-5
464	Susumu Inamoto, Michiyo Takayama, Michio Oishi	Kazusa DNA Research Institute	Isolation and Characterization of Glycoside Hydrolase Genes from the Thermophilic Actinomycete <i>Thermobispora bispora</i> .	BMB2008(第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会)	2008/12/9

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
465	Hidehiko Kumagai, Hisanori Tamaki, Jiong Hong, Takane, Katayama	Ishikawa Prefectural University	Thermo-stable cellulases from thermotolerant fungi and their expression in thermo-tolerant yeast.	4th Japan-Finland Biotechnology Symposium	2008/9/30-10/4
466	Erina Yoshida, Takashi Koyanagi, Hiromichi Minami, Hisanori Tamaki, Takane, Katayama, Hidehiko Kumagai	Ishikawa Prefectural University	Molecular cloning and characterization of β -glucosidase from thermotolerant yeast <i>Kluyveromyces marxianus</i> .	Asian Core Program Joint Seminar on Capacity Building and Development of Microbial Potential and Fermentation Technology Towards New Era	2008/12/1-3
467	Hidehiko Kumagai	Ishikawa Prefectural University	Microbial Enzymes: From Basic Research to Applied Research.	Korea-Japan Joint Seminar on Biotechnology	2008/12/11-12
468	須田雅子、寺本陽彦、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌におけるメチオニン合成系遺伝子群のプロモーター解析	日本農芸化学会2009年度大会	2009/3/27-29
469	田中裕也、寺本陽彦、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌におけるPTS遺伝子の機能および発現制御機構の解析	日本農芸化学会2009年度大会	2009/3/27-29
470	豊田晃一、寺本陽彦、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌におけるGAPDH遺伝子の発現制御機構の解析	日本農芸化学会2009年度大会	2009/3/27-29
471	得平茂樹、寺本陽彦、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌の遺伝子発現制御におけるRNAポリメラーゼ σ 因子の役割	日本農芸化学会2009年度大会	2009/3/27-29
472	西村 拓、寺本陽彦、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌の嫌気硝酸呼吸条件下におけるトランスクリプトーム解析	日本農芸化学会2009年度大会	2009/3/27-29
473	荻野英賢、柘植陽太、寺本陽彦、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌の細胞複製に関わる遺伝子の機能解析	日本農芸化学会2009年度大会	2009/3/27-29
474	佐々木美穂、川口秀夫、城島透、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	L-arabinose資化性コリネ型細菌の単離および代謝遺伝子の機能解析	日本農芸化学会2009年度大会	2009/3/27-29
475	長谷川智、城島透、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	RITEバイオプロセスによるバリン生産の試み	日本農芸化学会2009年度大会	2009/3/27-29
476	田島誉久、白井智量、沖野祥平、城島透、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	RITEバイオプロセスシステムのメタボローム解析	日本農芸化学会2009年度大会	2009/3/27-29
477	城島透、佐々木美穂、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	RITEバイオプロセスによるキシリトール生産	日本農芸化学会2009年度大会	2009/3/27-29
478	渡辺恵郎、土田芳樹、沖部奈緒子、寺本陽彦、鈴木伸昭、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌における分泌シグナルの解析	日本農芸化学会2009年度大会	2009/3/27-29
479	沖部奈緒子、鈴木伸昭、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌における誘導プロモーターの単離と解析	日本農芸化学会2009年度大会	2009/3/27-29
480	澤田和典、和田大、横田 篤	北大大学院・農学院・応用生物科学専攻	<i>Corynebacterium glutamicum</i> のピルビン酸キナーゼ欠失株における代謝変化	日本農芸化学会2009年度大会	2009/3/29
481	稲本進、高山道代、大石道夫	かずさDNA研究所	耐熱性RecA蛋白質を用いたPCRによる好熱性放線菌 <i>Thermobispora bispora</i> のセルラーゼ遺伝子のクローニング及びその活性	日本農芸化学会2009年度(平成21年度)大会	2009/3/28

学会・シンポジウム(31/37)

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
482	Keiro Watanabe, Yoshiki Tsuchida, Naoko Okibe, Haruhiko Teramoto, Nobuaki Suzuki ¹ , Masayuki Inui, and Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Genome-Wide Systematic Screening of Signal Peptides from <i>Corynebacterium glutamicum</i>	American Society for Microbiology 109th General Meeting	2009/5/17-21
483	Koichi Toyoda, Haruhiko Teramoto, Masayuki Inui, and Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Transcriptional Regulation of the <i>gapA</i> Gene Encoding Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	American Society for Microbiology 109th General Meeting	2009/5/17-21
484	Hidetaka Ogino, Yota Tsuge, Haruhiko Teramoto, Masayuki Inui, and Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Identification of Genes Involved in Cell Separation in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	American Society for Microbiology 109th General Meeting	2009/5/17-21
485	得平茂樹、寺本陽彦、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	<i>Corynebacterium glutamicum</i> におけるRNAポリメラーゼσ因子の機能解析	第3回日本ゲノム微生物学会年会	2009/3/5-7
486	Haruhiko Teramoto and Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Biofuel and Biochemical Productions from Mixed Sugars Derived from Lignocellulosic Biomass by the RITE Bioprocess	2009 AIChE Spring National Meeting	2009/4
487	Kazumi Hiraga and Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Biofuel/Commodity Chemical Production by Simultaneous Utilization of Mixed Sugars	The 6th World Congress on Industrial Biotechnology and Bioprocessing	2009/7
488	Haruhiko Teramoto, Tomokazu Shirai, Masayuki Inui, and Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Search for transporters involved in C4-dicarboxylates utilization in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	SIM Annual Meeting	2009/7/26-30
489	Koichi Toyoda, Haruhiko Teramoto, Masayuki Inui, and Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Transcriptional regulation of the <i>ldhA</i> gene encoding L-lactate dehydrogenase in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	SIM Annual Meeting	2009/7/26-30
490	豊田晃一、寺本陽彦、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌の乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の発現制御機構	日本生物工学会2009年大会	2009/9/23-25
491	寺本陽彦、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌におけるヒドロ芳香族化合物資化遺伝子群の発現制御機構	日本生物工学会2009年大会	2009/9/23-25
492	得平茂樹、荻野英賢、寺本陽彦、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌におけるレドックス応答性転写因子QorRによる酸化ストレス応答制御	日本生物工学会2009年大会	2009/9/23-25
493	Susumu Inamoto, Noriko Utsumi, Michiyo Takayama, Michio Oishi	Kazusa DNA Research Institute	Isolation and Characterization of Genes Encoding Glycoside Hydrolases from Thermophilic Bacteria.	第32回日本分子生物学会年会	2009/12/12
494	稲本進、内海紀子、高山道代、大石道夫	かずさDNA研究所	耐熱性RecA蛋白質を用いたPCRによりクローニングした好熱性放線菌 <i>Thermomonospora chromogena</i> の糖質加水分解酵素ファミリー-6に属する蛋白質の解析	日本農芸化学会2010年度(平成22年度)大会	2010/3/28~30
495	田中裕也、寺本陽彦、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌beta-グルコシドPTSの解析	日本農芸化学会2010年度(平成22年度)大会	2010/3/28-30
496	豊田晃一、寺本陽彦、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌におけるL-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の発現制御機構	日本農芸化学会2010年度(平成22年度)大会	2010/3/28-30
497	西村 拓、寺本陽彦、豊田晃一、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌におけるcAMP結合性転写調節因子GlxRによる硝酸呼吸の発現制御	日本農芸化学会2010年度(平成22年度)大会	2010/3/28-30

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
498	山本省吾、坂井齊之、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	還元条件下におけるコリネバクテリウム近縁種の糖代謝解析	日本農芸化学会2010年度(平成22年度)大会	2010/3/28-30
499	長谷川智、平賀和三、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌を用いた還元条件下における効率的バリン生産	日本農芸化学会2010年度(平成22年度)大会	2010/3/28-30
500	佐々木美穂、城島透、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	組換えコリネ型細菌によるバイオマス由来混合糖の完全同時利用	日本農芸化学会2010年度(平成22年度)大会	2010/3/28-30
501	沖部奈緒子、鈴木伸昭、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌における効率的な染色体導入のための温度感受性プラスミドの開発	日本農芸化学会2010年度(平成22年度)大会	2010/3/28-30
502	Koichi Toyoda, Haruhiko Teramoto, Masayuki Inui and Hideaki Yukawa.	(財)地球環境産業技術研究機構	Involvement of L-lactate-responsive transcriptional regulator LldR in controlling of expression of the <i>ldhA</i> gene encoding L-lactate dehydrogenase in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	SIM Annual Meeting and Exhibition 2010	2010/8/1-2
503	Yuya Tanaka, Haruhiko Teramoto, Masayuki Inui and Hideaki Yukawa.	(財)地球環境産業技術研究機構	Identification of a second beta-glucoside phosphoenolpyruvate, carbohydrate phosphotransferase system in <i>Corynebacterium glutamicum</i> R	SIM Annual Meeting and Exhibition 2010	2010/8/1-2
504	Alain A. Vertès, Masayuki Inui, Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Setting Biorefinery Manufacturing Fundamentals to Produce a Portfolio of Commodity and Fine	AICHE 2011 Spring National Meeting	2011/3/15
505	Alain A. Vertès, Masayuki Inui, Hideaki Yukawa	(財)地球環境産業技術研究機構	Biorefinery Blue-Print: a Growth-Arrested Biotechnological Process for Manufacturing a Portfolio of Commodity and Fine Chemicals	ACS 241st National Meeting	2011/3/27~31
506	寺本陽彦、須田雅子、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌におけるNAD de novo 生合成経路遺伝子群の発現制御機構	日本農芸化学会2011年度(平成23年度)大会	2011/3/26-28
507	田中裕也、寺本陽彦、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌beta-グルコシドPTSのカタボライト抑制機構の解析	日本農芸化学会2011年度(平成23年度)大会	2011/3/26-28
508	豊田晃一、寺本陽彦、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌におけるグローバルレギュレーターGlxRの機能解析	日本農芸化学会2011年度(平成23年度)大会	2011/3/26-28
509	西村 拓、寺本陽彦、豊田晃一、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌における硝酸呼吸遺伝子の転写因子ArnRの活性調節機構	日本農芸化学会2011年度(平成23年度)大会	2011/3/26-28
510	沖部奈緒子、鈴木伸昭、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌由来pCGR2、pCG1プラスミドのコピー数制御機構	日本農芸化学会2011年度(平成23年度)大会	2011/3/26-28
511	北出幸広、沖野祥平、郡司 涉、平賀和三、須田雅子、鈴木伸昭、乾 将行、湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	コリネ型細菌におけるプラスミドの構造不安定性に関する研究	日本農芸化学会2011年度(平成23年度)大会	2011/3/26-28
512	前田智也、和地正明	東京工業大学	コリネ型細菌におけるRNase E/Gファミリー酵素の機能解析	日本農芸化学会2011年度(平成23年度)大会	2011/3/26-28
513	Tomoya Maeda and Masaaki Wachi	東京工業大学	Functional analysis of the Rnase E/G family endoribonuclease in an industrially important bacterium, <i>Corynebacterium glutamicum</i>	ASM Conference on Regulating with RNA in Bacteria	2011/3/7-11
514	Yoshida E, Hidaka M, Fushinobu S, Koyanagi T, Tamaki H, Katayama T, and Kumagai H.	石川県立大学	Structure and kinetics of a β -glucosidase from the Thermotolerant Yeast <i>Kluyveromyces marxianus</i> .	The Second Joint Seminar in Asian Core Program	2010/11/21

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
515	松崎千秋、田中孝二郎、小柳喬、南博道、玉置尚徳、片山高嶺、熊谷英彦	石川県立大学	耐熱性カビ由来のβ-グルコシターゼを発現させた組み換え酵母 <i>Kluyveromyces marxianus</i> によるセロピオースからの効率的なエタノール生産	日本農芸化学会2011年度(平成23年度)大会	2011/3/26-28
516	Susumu Inamoto, Noriko Utsumi, and Michiyo Takayama	かずさDNA研究所	Characterization of a Novel Glycoside Hydrolase Family 6 Enzyme from an Environmental	BMB2010(第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会)	2010/12/7-10
517	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	環境対応型生産技術としてのバイオリファイナリー	グリーンフォーラム21	2006/6/30
518	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオエタノール Today and Tomorrow	エネルギー・資源、モビリティ研究会	2006/7/18
519	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオリファイナリーの現状と将来	有機ビジネステクニカルセミナー	2006/7/27
520	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオリファイナリー: 早期産業化へ向けて	平成18年度 JBA新資源生物変換研究会シンポジウム	2006/9/12
521	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	21世紀の産業革命: バイオリファイナリー	経済同友会 産業懇談会 第2水曜グループ	2006/9/13
522	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオエタノールの生産性、製造コストと今後の課題	技術情報協会 エタノール燃料の市場動向と製造方法および自動車分野への	2006/9/25
523	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオリファイナリーによるエネルギー・化学品生産技術の開発	日本農芸化学会2006年度(平成18年度)関西支部大会 シンポジウム「農芸化学: 多様なアプローチとそ	2006/9/30
524	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	21世紀の産業革命: バイオリファイナリー	大分県バイオテクノロジー懇談会	2006/10/6
525	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	米国の国家科学戦略としてのバイオリファイナリー	第10回研究講演会/バイオマスエネルギーとライフサイクルアセスメント(LCA)	2006/11/10
526	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオリファイナリーの現状と将来像	廃棄物学会バイオマス系廃棄物研究部会小集会	2006/11/20
527	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	Efficient conversion of glucose and xylose mixtures by growth-arrested <i>Corynebacterium glutamicum</i> cells under oxygen-deprivation conditions	International Symposium on Biocatalysis and Biotechnology	2006/12/6
528	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオリファイナリーの現状と将来	平成18年度第2回かずさBTセミナー-バイオマスの生産と利用をめぐる植物と微生物	2006/12/21
529	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオ燃料は地球を救うか	東北バイオマスフォーラム	2007/1/17
530	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	RITE Bioprocessについて	国際バイオフューエル会議 2007	2007/2/2
531	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオエタノールの量産化-セルロースを原料にした新製法-	高分子同友会勉強会	2007/2/19
532	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	農業をベースとした産業の活性化のために ~バイオリファイナリーによる新規産業育成~	JA全農庄内 平成18年度実績検討会	2007/2/23
533	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	農業をベースとした産業の活性化のために ~バイオリファイナリーによる新規産業育成~	バイオマス産業事業化検討委員会	2007/3/2

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
534	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	Ethanol Producing using RITE Bioprocess	The 4th World Congress on Industrial Biotechnology and Bioprocessing	2007/3/22
535	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	21世紀の産業革命:バイオリファイナリー	日本化学会第87春季年会	2007/3/26
536	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオ燃料:現状と今後	燃料関連技術分野の技術戦略マップ策定調査の第3回資源燃料技術懇談会	2007/3/27
537	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	Ethanol Production from Mixed Sugars Derived from Lignocellulosic Biomass by the RITE Bioprocess	AIChE Spring National Meeting	2007/4/24
538	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	Ethanol Production from Lignocellulosic Biomass by the RITE Bioprocess	BIO 2007 International Convention	2007/5/7
539	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	RITEにおけるバイオ燃料技術開発への取り組み	セルロース学会関東支部ミニシンポジウム セルロース素材の新展開	2007/5/17
540	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	21世紀の産業革命:バイオリファイナリー	第31回九州紙パルプ研究会	2007/6/1
541	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオ燃料生産の現状と将来:利用可能バイオマス資源の考察	海洋資源・生物資源活用分科会	2007/7/5
542	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオエタノールの量産化ーセルロースを原料にした新製法ー	第24回高分子同友会総合講演会	2007/7/24
543	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオ燃料の現状と将来~国内産バイオ燃料への取り組み~	青森県バイオ燃料推進協議会	2007/7/25
544	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオエタノールの現状と展望	第14回環境セミナー	2007/7/26
545	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	パネルディスカッション	第23回エネルギー総合工学研究所シンポジウム パネルディスカッション	2007/9/11
546	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	RITEバイオプロセスによるバイオマスからの高効率物質生産	東海地域生物系先端技術研究会平成19年度第2回セミナー	2007/9/14
547	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	セルロース系バイオ燃料製造技術開発	2007年度日本生物工学会大会シンポジウム バイオマス利活用の最新技術	2007/9/27
548	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	新しいエネルギー源・バイオ燃料について	かずさDNA研究所 開所記念公開講座	2007/10/13
549	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオ燃料の現状と将来	滋賀バイオ産業推進機構 平成19年度第2回研究技術交流会	2007/10/25
550	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオ燃料の現状と展望	JBAバイオエンジニアリング研究会	2007/11/13
551	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	ソフトバイオマスからのバイオ燃料製造 現状と展望	日本エネルギー学会三部会合同シンポジウム	2007/11/14
552	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	Ethanol production from mixed sugars derived from lignocellulosic biomass by the "RITE-bioprocess" using corynebacteria	2007 Pacific Rim Summit on Industrial Biotechnology and Bioenergy	2007/11/14
553	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	Production of biofuels from soft biomass by the RITE Bioprocess	Asia Biofuels Conference & EXPO V	2007/12/13

学会・シンポジウム(35/37)

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
554	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	Bioethanol and biobutanol production from C6 and C5 sugars	Developing and Commercialising Next Generation Biofuels	2008/2/13
555	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	ソフトセルロースについて	近畿バイオマスシンポジウム in 京都 2008	2008/3/8
556	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	Growth-arrested corynebacteria as whole-cell biocatalysts for biochemicals/biofuels production	235th ACS National Meeting	2008/4/8
557	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオマスからのエネルギー・化学品の創製を目指して 研究の現状と今後の展望	2008年度 第2回REC BIZ-NET研究会	2008/7/11
558	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオリファイナリー産業の現状と将来展望	関西化学工業協会7月度定例理事会	2008/7/18
559	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	新規産業バイオリファイナリーの現状と将来展望	三菱UFJ証券 クリーンエネルギーカンファレンス	2008/8/27
560	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	新産業バイオリファイナリーの現状と今後	よこはまバイオマス研究会 発足記念シンポジウム“バイオマスとゲノム科学”	2008/9/16
561	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオリファイナリーを取り巻く世界の状況とRITEの研究開発	“未来へのバイオ技術”勉強会～新発想バイオものづくり技術開発～	2008/9/17
562	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	RITEバイオプロセスの特性と工業的利用の将来像	第2回GCOE学生・若手研究交流合宿	2008/9/24
563	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	Biofuel production from lignocellulosic biomass by the RITE bioprocess	Next Generation Biofuelmarkets	2008/10/7
564	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	Production of biofuels from C6 & C5 sugars by the RITE bioprocess	BIO KOREA 2008	2008/10/9
565	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	持続可能なバイオリファイナリー・バイオ燃料産業のテイクオフ・シナリオ(石油化学産業からの脱却)	移住百周年・日伯交流年記念環境フォーラム「地球温暖化対策と日伯協力」	2008/10/13
566	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	Production of biofuels/biochemicals from C6 & C5 sugars by the RITE bioprocess	The 13th International Biotechnology Symposium & Exhibition(IFS2008)	2008/10/15
567	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	Biofuels/Biochemicals Production from Mixed Sugars Derived from Lignocellulosic Biomass by the RITE Bioprocess	The 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology Thailand-Japan Joint Symposium on Bioproduction by Efficient	2008/10/16
568	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	ソフトバイオマスからのバイオ燃料・化学品製造の現状と将来展望	第193回ライフサイエンス技術部会講演会	2008/10/17
569	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	RITEのソフトバイオマス原料エタノール生産技術開発	エコテクノ2008 バイオマス・ニッポン in 九州セミナー～食料と競合しないバイオ燃料の推進～	2008/10/24
570	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	Production of Biofuels by Simultaneous Utilization of Mixed Sugars	AIChE Annual Meeting	2008/11/19
571	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオ燃料の現状と将来像	千里ライフサイエンスサロンフォーラム	2008/11/26
572	湯川英明	(財)地球環境産業技術研究機構	バイオリファイナリーと産業構造パラダイムシフト	次世代産業ナビゲーターズフォーラム	2008/12/9

学会・シンポジウム(36/37)

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
573	乾 将行	(財)地球 環境産業技 術研究機構	バイオリファイナリーを取り巻く世界 の状況とRITEの研究開発	セルロース学会第14回ミ クロシンポジウム「バイオリ ファイナリー」	2009/1/26
574	湯川英明	(財)地球 環境産業技 術研究機構	バイオ技術を応用した新化学産業の 展開	平成20年度第3回ちばバイ オ交流フォーラム～バイオ 技術の新産業応用につい	2009/1/26
575	湯川英明	(財)地球 環境産業技 術研究機構	新規産業“バイオリファイナリー”の 展望-バイオマスからのエネルギー・ 化学品製造-	日本学術振興会若手研究 者交流支援事業-東アジア 首脳会議参加国からの招	2009/3/5
576	湯川英明	(財)地球 環境産業技 術研究機構	Production of Biofuels/Biochemicals from Non-Food Based Biomass	Americana International Trade Show 2009	2009/3/17
577	湯川英明	(財)地球 環境産業技 術研究機構	Establishment of Secretary System for C. Glutamicum in Application of Heterologous Proteins	BIT Life Sciences' 2nd Annual World Congress of Industrial Biotechnology 2009 (ibio-2009)	2009/4/7
578	湯川英明	(財)地球 環境産業技 術研究機構	非食料資源からのバイオ燃料製造	環境バイオテクノロジー学 会2009年度大会第37回シ ンポジウム	2009/6/24
579	湯川英明	(財)地球 環境産業技 術研究機構	Biofuel and Biochemical Productions from Mixed Sugars Derived from Lignocellulosic Biomass by the RITE Bioprocess	2009 International Symposium & Annual Meeting of the Korean Society for Microbiology and Biotechnology	2009/6/25
580	湯川英明	(財)地球 環境産業技 術研究機構	Cellulosic bioethanol production by the RITE bioprocess	2009 SIM Annual Meeting	2009/7/29
581	乾 将行	(財)地球 環境産業技 術研究機構	システムバイオロジーと新産業バイ オリファイナリー	第82回日本生化学会大会 シンポジウム「天然物生合 成研究の新展開:生合成系 の分子解剖から分子構築	2009/10/21
582	乾 将行	(財)地球 環境産業技 術研究機構	バイオリファイナリーの現状と展望	第33回先端繊維素材研究 委員会講演会・繊維加工研 究委員会関西委員会講演 会 ―グリーン材料とその 繊維技術への展開―	2009/10/23
583	湯川英明	(財)地球 環境産業技 術研究機構	新規産業バイオリファイナリーの現 状と今後の展開	関西文化学術研究都市推 進機構・第2回特別フォー ラム	2009/11/26
584	湯川英明	(財)地球 環境産業技 術研究機構	Technology and Innovation for Production of Cellulosic Biofuels	UNEP-GEC Regional Workshop on Waste Agricultural Biomass	2010/3/4
585	湯川英明	(財)地球 環境産業技 術研究機構	バイオリファイナリー産業の未来像	JBA新資源生物変換研究 会シンポジウム-2020年の バイオインダストリー-	2010/6/17
586	湯川英明	(財)地球 環境産業技 術研究機構	バイオリファイナリー研究の状況と実 用化に向けて	慶應義塾「地球環境に優し い科学技術」シンポジウム- グリーンケミストリーとグ リーンバイオの連携-	2010/7/8
587	乾 将行	(財)地球 環境産業技 術研究機構	バイオリファイナリーの現状と展望; コリネ型細菌の潜在能力の活用	BioJapan2010 主催者セミ ナー「JBA・発酵と代謝研究 会主催「発酵 ―日本の底 力―」	2010/10/1
588	湯川英明	(財)地球 環境産業技 術研究機構	Biorefinery: Today and Tomorrow	2nd Asian Core Program Joint Seminar on Capacity Building and Development of Microbial Potential and Fermentation Technology	2010/11/20
589	湯川英明	(財)地球 環境産業技 術研究機構	新規産業バイオリファイナリーの将 来像	高分子同友会勉強会	2010/11/29
590	山田勝成他	東レ株式会 社	膜利用バイオプロセスによる発酵技 術の効率化	日本生物工学会大会	2009/8/29

学会・シンポジウム(37/37)

番号	発表者	所属	発表タイトル	学会/シンポジウム名	発表年月日
591	耳塚孝他	東レ株式会社	膜利用発酵リアクターを用いたD-乳酸連続発酵(D-乳酸発酵酵母)	日本農芸化学会大会	2010/3/29
592	澤井健司他	東レ株式会社	新規な高活性D-乳酸脱水素酵素導入酵母によるD-乳酸発酵	日本農芸化学会大会	2010/3/29
593	羅景洙他	東レ株式会社	膜利用発酵リアクターを用いたD-乳酸連続発酵(D-乳酸菌)	日本農芸化学会大会	2010/3/29
594	澤井健司他	東レ株式会社	Novel membrane-integrated fermentation reactor (MFR): application to D-lactic acid production	日本-スイスバイオテクノロジー・バイオプロセス会議	2010/10/7

【プレス発表】

番号	題	媒体	年月日
1	大腸菌の遺伝子組み換え、アミノ酸を効率生産	日本経済新聞朝刊	2006/12/18
2	協和発酵、植物原料から多様な物質の生産を目指すプロジェクトを推進	日刊工業新聞朝刊	2007/11/26
3	協和発酵の大腸菌ミニマムゲノム、メタボロームで代謝の大幅な変化を確認	日経バイオテック(オンライン記事)	2008/4/18
4	人工生命もうすぐ出現？	日本経済新聞朝刊	2008/9/19
5	ミニマムゲノム最強遺伝子でものづくり	テレビ東京・ワールドビジネスサテライト	2009/5/20
6	人工細菌産業界が注視——バイオ燃料・薬製造に期待	日本経済新聞朝刊	2010/6/27
7	枯草菌ゲノム大領域欠失株の解析	日本農芸化学会:学会発表内容のプレス発表(トピックス発表)	2007/3/16
8	不要遺伝子除き「細胞向上」改善	日本経済新聞	2008/9/19
9	人工細菌 産業界が注視	日本経済新聞	2010/6/27
10	旭硝子がS.pombe酵母の数百kbpを削除、ミニマムゲノムファクトリーで成果	日経バイオテックオンライン版	2008/3/25
11	サイエンス・エッジ「最先端のミニマムゲノム研究」	テレビ東京系列「ワールドビジネスサテライト」	2009/5/20
12	旭硝子、酵母で中和処理なく乳酸効率生産	日経バイオテックオンライン版	2009/9/25
13	土壌細菌内で化学合成	日本経済新聞	2010/1/14
14	農学 電子工学を融合、新型電池や酵素技術基盤に期待	日経産業新聞	2010/1/20
15	土壌細菌で高純度アルコールを化学合成	化学, 65, 75	2010
16	e—バイオの試みに注目	環境新聞	2009/11/11
17	先端技術 未来プロジェクト動く微生物で化成品(上)、「生産、石化より安く簡単」	日経産業新聞	2008/10/2
18	先端技術 未来プロジェクト動く微生物で化成品(下)、「生産速度、化学合成並み」	日経産業新聞	2008/10/3
19	微生物で化成品-未来プロジェクト動く	日本経済新聞	2007/10/2
20	エネルギー 安全保障と環境のはざまで	日刊工業新聞	2006/7/18
21	バイオエタノール新製法開発を発表	読売新聞	2006/9/14
22	ホンダ 雑草からバイオ燃料	中部経済新聞	2006/9/15
23	車走らず雑草燃料!? ホンダ 新バイオ技術を開発	熊本日日新聞	2006/9/15
24	雑草もバイオ燃料 ホンダ、新技術開発	静岡新聞	2006/9/15

プレス発表(2/5)

番号	題	媒体	年月日
25	稲わらで新燃料 ホンダ技術開発	毎日新聞	2006/9/15
26	稲わらからもエタノール 2~3年で実用化 ホンダなど技術開発	産経新聞	2006/9/15
27	稲わらからバイオ燃料	東京新聞	2006/9/15
28	稲ワラなどから抽出 バイオエタノール燃料 技術基盤を確立	日刊自動車新聞	2006/9/15
29	ホンダ バイオエタノール新技術 稲わらから燃料	毎日新聞	2006/9/15
30	Honda to mass-produce bioethanol cars	THE DAILY YOMIURI	2006/9/15
31	Bio-ethanol from Honda	IHT/ASAHI	2006/9/15
32	Honda gets ethanol from plant waste	THE JAPAN TIMES	2006/9/15
33	ホンダが稲からバイオ燃料	東京中日スポーツ	2006/9/15
34	バイオエタノール効率生産 茎や葉のセルロース	フジサンケイビジネスアイ	2006/9/15
35	雑草でバイオ燃料製造	京都新聞	2006/9/15
36	ワラからエタノール ホンダとRITE 人工菌使い効率生産	日本経済新聞	2006/9/15
37	バイオマスエタノール 非食用系から効率転換	日刊工業新聞	2006/9/15
38	RITE-ホンダ エタノール新製法 確立	化学工業日報	2006/9/15
39	エタノール 稲わら・茎で生成	日経産業新聞	2006/9/15
40	燃費を考える 異業種のカ(下) 量産技術と原料確保 課題	日経産業新聞	2006/11/6
41	原油高でバイオマス脚光	日経産業新聞	2006/11/10
42	エコを競う 環境パワーゲーム(上) お家芸磨いて勝ち残る	日本経済新聞	2006/11/14
43	本田技術研とRITE 来春、パイロット設備	日刊工業新聞	2006/11/14
44	ブタノール研究へ移行	日刊工業新聞	2007/1/15
45	バイオ燃料 セルロース活用始まる 木くず・草など酵素分解	日本経済新聞	2007/2/2
46	メリット多いブタノール 米中心に基礎研究活発	日刊工業新聞	2007/2/28
47	木くずや雑草の繊維 全成分、エタノールに	日本経済新聞	2007/3/30
48	バイオ燃料 市販へ発進	日本経済新聞	2007/4/5
49	食べぬ部分でバイオエタノール	朝日新聞	2007/5/11
50	地球に優しいバイオエタノール 車も動かす植物の“お酒”	中日新聞	2007/5/20
51	穀物使わずバイオエタノール	読売新聞	2007/5/27
52	バイオエタノール 生産性10倍 稲わら+RITE菌	日刊工業新聞	2007/6/7
53	草木系セルロースへ原料転換急げ バイオエタノール	化学工業日報	2007/7/5
54	バイオ燃料に未来はあるか 真に持続可能な道探る	環境新聞	2007/7/4
55	省エネ立国 CO2削減への道=7= 『非食用植物で燃料』が	フジサンケイ新聞	2007/6/20

プレス発表(3/5)

番号	題	媒体	年月日
56	新エネルギー事業創出で先陣 RITEーホンダ 年内に量産化技術 2009年にも実用化	化学工業日報	2007/7/23
57	安価に有機酸取り出し 有機塩を電気透析 プロセス工業化に道 アストムとRITE	日刊工業新聞	2007/7/31
58	国内生産プラント始動 セルロース系が普及の中心 菌体使い生産効率アップ	日刊工業新聞	2007/7/31
59	エネルギーの地平を切り拓く人49 セルロースから高効率で燃料	環境新聞	2007/8/1
60	バイオ燃料に未来はあるか(6) “次の焦点”続々名乗り エタノールの問題点を解消	環境新聞	2007/8/8
61	糖から水素 高効率取り出し シャープとRITE 独自菌体で実証	日刊工業新聞	2007/8/14
62	地球環境機構が新技術 雑草からディーゼル燃料 3年後メ	日本経済新聞	2007/8/14
63	沸き立つバイオ燃料～環境とエネルギーのはざまで～7.セルロース系で 国産普及へ開発スタート	日刊工業新聞	2007/9/6
64	汎用樹脂ポリプロピレン 雑草から合成 CO2排出、石油の3	日本経済新聞	2007/9/7
65	沸き立つバイオ燃料～環境とエネルギーのはざまで～8.本命のセルロース 米国、5年後に本格生産	日刊工業新聞	2007/9/11
66	バイオ燃料車 国内各社、欧米を追撃	フジサンケイ新聞	2007/9/13
67	進化するバイオ技術 バイオ燃料すそ野拡大	日経産業新聞	2007/9/14
68	沸き立つバイオ燃料～環境とエネルギーのはざまで～12.CO2削減効果 20年後、1リットル30円目指す	日刊工業新聞	2007/9/18
69	バイオブタノール 3年以内に技術確立	化学工業日報	2007/9/25
70	微生物で化成品(下) 生産速度、化学合成並み	日経産業新聞	2007/10/3
71	バイオ燃料ブーム コーンベルト 潤う農家	読売新聞	2007/10/7
72	雑草などからバイオ燃料 (財)地球環境産業技術研究機構 実用化に乗り出す	循環経済新聞	2007/10/8
73	副作用への認識欠かせぬバイオ燃料	化学工業日報	2007/10/29
74	バイオエタノール 未来への挑戦2 稲わらは有望な原料 効率よい微生物開発	日本農業新聞	2007/10/30
75	植物から作る化学製品 「コリネ菌」で糖分を原料に	読売新聞	2007/12/17
76	自動車用新バイオ燃料 食用以外の原料を使用/すでに国際競争始まる	フジサンケイ新聞	2007/12/28
77	匠の時代 その1 バイオエタノール	日刊資源新報	2008/1/1

プレス発表(4/5)

番号	題	媒体	年月日
78	京都議定書 実行の年 温暖化止める技術の芽 バイオ燃料 進化中 穀物は使わず効率生産	日本経済新聞	2008/1/1
79	温暖化対策の有効手段になれるか バイオ燃料 光と影	京都新聞	2008/2/16
80	環境を考える 京都発 バイオ燃料技術に期待	京都新聞	2008/3/18
81	稲わらから自動車燃料	日経産業新聞	2008/4/4
82	ホンダ、植物廃材で量産 ガソリン代替のバイオエタノール	日本経済新聞	2008/4/30
83	非食料バイオ燃料量産 出光・三菱商事 稲わら・雑草活用 100億円投じ工場	日本経済新聞	
84	バイオエタノール生成に独自技術 食糧と燃料 両立に期待	けいはんなオブザーブ	2008/6/25
85	2008洞爺湖サミット 稲わら、木くず…有効活用 バイオ燃 料自給作戦	読売新聞	2008/7/3
86	三菱商事～出光興産ら4者、バイオエタノール計画のFS実施 —RITEとホンダが技術開発/海外にプラント建設—	重化学工業新報	2008/7/15
87	バイオ燃料「食料使わず」に活路 稲わら・雑草使う研究も需 要急伸で開発に熱	朝日新聞	2008/7/18
88	低炭素社会への挑戦 京滋企業の最前線 最高水準の太陽 光発電	京都新聞	2008/8/14
89	光合成活用、夢の技術探し 一代限り樹木・乾燥に強い 木…開発進む「スーパー樹木」	朝日新聞	2008/10/9
90	日経地球環境技術賞 大賞に地球環境機構「バイオエタ ノール 非食料で効率生産	日本経済新聞	2008/10/13
91	日経地球環境技術賞—受賞者の声「大賞 非食料バイオ燃 料、効率生産	日経産業新聞	2008/10/15
92	雑草から石化原料 米ダウと12年にも量産 パナソニックな ど出資のRITE	日本経済新聞	2008/10/17
93	日経地球環境技術賞の表彰式 地球環境機構に大賞	日本経済新聞	2008/11/13
94	地球環境技術賞 地球環境機構と東大・東レを表彰	日経産業新聞	2008/11/13
95	“追跡京都2008” 食料不足、エネルギー問題 実用化で一 挙解決へ RITE 12年の生産目指す稲わらから自動車燃料	毎日新聞	2008/11/23
96	危機の根源 解決に迫る 食料・水問題に挑む 日経地球環 境技術賞に3件 食料使わずバイオ燃料 世界市場視野に 開発 地球環境産業技術研究機構	日経産業新聞	2008/11/26
97	“新エネ事始め”バイオマス2 エタノール、原料多彩に	日経産業新聞	2008/11/28
98	2030年への挑戦 次世代産業技術 バイオマスから樹脂(上) ダウ、実用化研究開始	日経産業新聞	2009/1/6
99	生分解樹脂原料半額に RITEなど 水処理膜使い新技術	日本経済新聞	2009/1/12
100	ホンダ 千葉県に研究施設 バイオエタノール製造技術 3、4 年めど確立へ	日刊自動車新聞	2009/2/27
101	バイオエタノール技術 ホンダが新研究拠点 セルロース系 実用化へ 千葉・木更津に今秋	化学工業日報	2009/2/27
102	非食用植物のバイオ燃料 ホンダ、千葉に実験棟	日本経済新聞	2009/2/27
103	バイオ燃料 非食料由来、世界リード	日本経済新聞	2009/3/23
104	アミノ酸製造効率2倍 RITE遺伝子組み換え菌活用	日本経済新聞	2009/3/30
105	温暖化ガス 15%削減への道(下) 「50年に半減」へ官民総力	日本経済新聞	2009/7/6
106	バイオ化学品を共同開発 RITE-出光興産 非可食セルロ ース原料 エタノール、プロパノール量産	化学工業日報	2009/8/7

プレス発表(5/5)

番号	題	媒体	年月日
107	伝統と先端技術駆使 新産業創出へ/けいはんな学研都市 存在感高まるRITE	化学工業日報	2010/2/24
108	課題に挑戦続くバイオ燃料・化学品	化学工業日報	2010/3/10
109	高効率バイオ燃料 量産へ/出光など20年メド/エタノールより 低燃費	日本経済新聞	2010/8/14
110	Role of a PA14 domain in determining substrate specificity of a glycoside hydrolase family 3 β -glucosidase from <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Nature Functional Glycomics Gateway	2010/9/9
111	非可食バイオマスの膜利用バイオ変換技術への取り組みに ついて	日経新聞	2011/2/8

受賞リスト(1/1)

【受賞】

番号	授賞組織	受賞タイトル	受賞者	受賞日
1	日本農芸化学会	B.B.B.論文賞	溝口寛、榊田貴美枝、森英郎	2008/3/26
2	日本放線菌学会	2009年度日本放線菌学会大会ポスター賞	藤井良和、西村賢治、安武義晃、藤井匡、株本浩樹、田村具博、有澤章	2009/7/16
3	日本生物工学会 生物工学論文賞	有機溶媒中における Rhodococcus opacus B-4のアルカンモノオキシゲナーゼ遺伝子	鮫島結香、本田孝祐、加藤純一、大政健史、大竹久夫	2009/9/23
4	European Society of Computational Methods in Science and Engineering (ESCMSE)	欧州学会賞	Kizashi Yamaguchi	2008/9/25
5	文部科学大臣	新規な酵素法によるキラル化合物の工業的生産プロセスの開発	清水昌、片岡道彦、八十原良彦ら	2008/4/15
6	科学技術振興機構	微生物酵素を利用したD-パントラクトンの新規製造プロセス	清水昌ら	2008/7/9
7	日本農芸化学会「農芸化学奨励賞」	油糧微生物の代謝工学と機能性脂質生産への応用に関する研究	櫻谷英治	2009/3/27
8	International Enzyme Engineering Conference	2009 Enzyme Engineering Award	清水昌	2009/9/24
9	日本経済新聞社	2008年日経地球環境技術賞(第18回)大賞「セルロースからの混合糖同時変換によるエタノール製造技術」	地球環境産業技術研究機構・RITE-HONDA バイオグループ	2008/11/12
10	米国工業微生物学会	フェローシップアワード	湯川英明	2011/4
11	日本化学会技術進歩賞	膜利用発酵プロセスによる効率的なD-乳酸連続発酵技術の開発	耳塚孝他	2011/3/26
12	日本農芸化学会大会トピックス賞	新規な高活性D-乳酸脱水素酵素導入酵母によるD-乳酸発酵	澤井健司他	2010/3/29

特許数・論文数・プレス発表等
(1/4)

特許、論文、外部発表等の件数(プロジェクト計)

区分	特許出願			論文		その他外部発表 (プレス発表等)
	国内	外国	PCT※出願	査読付き	その他	
年度						
H18FY	16	0	1	42	12	138
H19FY	30	0	1	73	29	172
H20FY	26	3	7	55	14	154
H21FY	22	12	11	69	14	117
H22FY	17	0	6	73	27	120
計	111	15	26	312	96	701

高性能宿主

区分	特許出願			論文		その他外部発表
	国内	外国	PCT※出願	査読付き	その他	
年度						
H18FY	0	0	0	7	1	17
H19FY	9	0	1	14	5	20
H20FY	7	0	2	10	1	18
H21FY	8	2	3	15	1	21
H22FY	5	0	1	18	1	17
計	29	2	7	64	9	93

微生物反応

区分	特許出願			論文		その他外部発表
	国内	外国	PCT※出願	査読付き	その他	
年度						
H18FY	2	0	1	20	2	31
H19FY	5	0	0	27	7	54
H20FY	3	0	1	24	3	63
H21FY	5	0	3	40	5	60
H22FY	1	0	2	29	16	79
計	16	0	7	140	33	287

バイオリファイナー

区分	特許出願			論文		その他外部発表
	国内	外国	PCT※出願	査読付き	その他	
年度						
H18FY	14	0	0	15	9	90
H19FY	16	0	0	32	17	97
H20FY	16	3	4	21	10	73
H21FY	9	10	5	14	8	36
H22FY	11	0	3	26	10	24
計	66	13	12	108	54	320

特許数・論文数・プレス発表等
(2/4)

協和発酵キリン

区分	特許出願			論文		その他外部発表
	国内	外国	PCT [※] 出願	査読付き	その他	
年度						
H18FY	0	0	0	0	1	9
H19FY	0	0	0	3	0	3
H20FY	1	0	1	1	0	6
H21FY	1	2	1	4	0	3
H22FY	2	0	0	0	0	3
計	4	2	2	8	1	24

花王

区分	特許出願			論文		その他外部発表
	国内	外国	PCT [※] 出願	査読付き	その他	
年度						
H18FY	0	0	0	0	0	6
H19FY	9	0	1	5	2	11
H20FY	5	0	1	1	0	9
H21FY	3	0	0	2	1	7
H22FY	2	0	0	12	1	7
計	19	0	2	20	4	40

旭硝子

区分	特許出願			論文		その他外部発表
	国内	外国	PCT [※] 出願	査読付き	その他	
年度						
H18FY	0	0	0	7	0	2
H19FY	0	0	0	6	3	6
H20FY	1	0	0	8	1	3
H21FY	4	0	2	9	0	11
H22FY	1	0	1	6	0	7
計	6	0	3	36	4	29

ダイセル化学

区分	特許出願			論文		その他外部発表
	国内	外国	PCT [※] 出願	査読付き	その他	
年度						
H18FY 2006	0	0	0	3	0	3
H19FY 2007	0	0	0	2	0	6
H20FY 2008	0	0	0	1	0	9
H21FY 2009	1	0	0	2	1	4
H22FY 2010	0	0	0	3	2	9
計	1	0	0	11	3	31

特許数・論文数・プレス発表等
(3/4)

メルシャン

区分	特許出願			論文		その他外部発表
	国内	外国	PCT※出願	査読付き	その他	
年度						
H18FY	0	0	0	1	1	6
H19FY	0	0	0	3	2	15
H20FY	1	0	0	3	1	11
H21FY	1	0	0	4	2	11
H22FY	0	0	0	5	1	7
計	2	0	0	16	7	50

日本電気

区分	特許出願			論文		その他外部発表
	国内	外国	PCT※出願	査読付き	その他	
年度						
H18FY	0	0	0	0	0	1
H19FY	1	0	0	5	0	4
H20FY	2	0	0	4	0	7
H21FY	1	0	2	5	0	20
H22FY	1	0	0	3	0	20
計	5	0	2	17	0	52

カネカ

区分	特許出願			論文		その他外部発表
	国内	外国	PCT※出願	査読付き	その他	
年度						
H18FY	2	0	1	10	1	10
H19FY	2	0	0	10	5	12
H20FY	0	0	0	8	2	3
H21FY	1	0	1	16	2	9
H22FY	0	0	1	10	13	22
計	5	0	3	54	23	56

明治製菓

区分	特許出願			論文		その他外部発表
	国内	外国	PCT※出願	査読付き	その他	
年度						
H18FY	0	0	0	6	0	11
H19FY	1	0	0	7	0	15
H20FY	0	0	1	8	0	31
H21FY	1	0	0	13	0	15
H22FY	0	0	1	8	0	21
計	2	0	2	42	0	93

特許数・論文数・プレス発表等
(4/4)

N I T E

区分	特許出願			論文		その他外部発表
	国内	外国	PCT [※] 出願	査読付き	その他	
年度						
H18FY	0	0	0	0	0	0
H19FY	1	0	0	0	0	2
H20FY	0	0	0	0	0	2
H21FY	0	0	0	0	0	1
H22FY	0	0	0	0	0	0
計	1	0	0	0	0	5

J B A

区分	特許出願			論文		その他外部発表
	国内	外国	PCT [※] 出願	査読付き	その他	
年度						
H18FY	0	0	0	0	0	0
H19FY	0	0	0	0	0	1
H20FY	0	0	0	0	0	0
H21FY	0	0	0	0	0	0
H22FY	0	0	0	0	0	0
計	0	0	0	0	0	1

R I T E

区分	特許出願			論文		その他外部発表
	国内	外国	PCT [※] 出願	査読付き	その他	
年度						
H18FY	2	0	0	15	9	90
H19FY	3	0	0	32	17	97
H20FY	1	3	1	21	10	73
H21FY	2	10	3	14	8	32
H22FY	0	0	0	25	10	22
計	8	13	4	107	54	314

東レ

区分	特許出願			論文		その他外部発表
	国内	外国	PCT [※] 出願	査読付き	その他	
年度						
H18FY	12	0	0	0	0	0
H19FY	13	0	0	0	0	0
H20FY	15	0	3	0	0	0
H21FY	7	0	2	0	0	4
H22FY	11	0	3	1	0	2
計	58	0	8	1	0	6

(※ Patent Cooperation Treaty : 特許協力条約)

2. 分科会における説明資料

次ページより、プロジェクト推進・実施者が、分科会においてプロジェクトを説明する際に使用した資料を示す。

微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発 (事後評価)

2006年度～2010年度(5年間)

プロジェクトの概要

公開

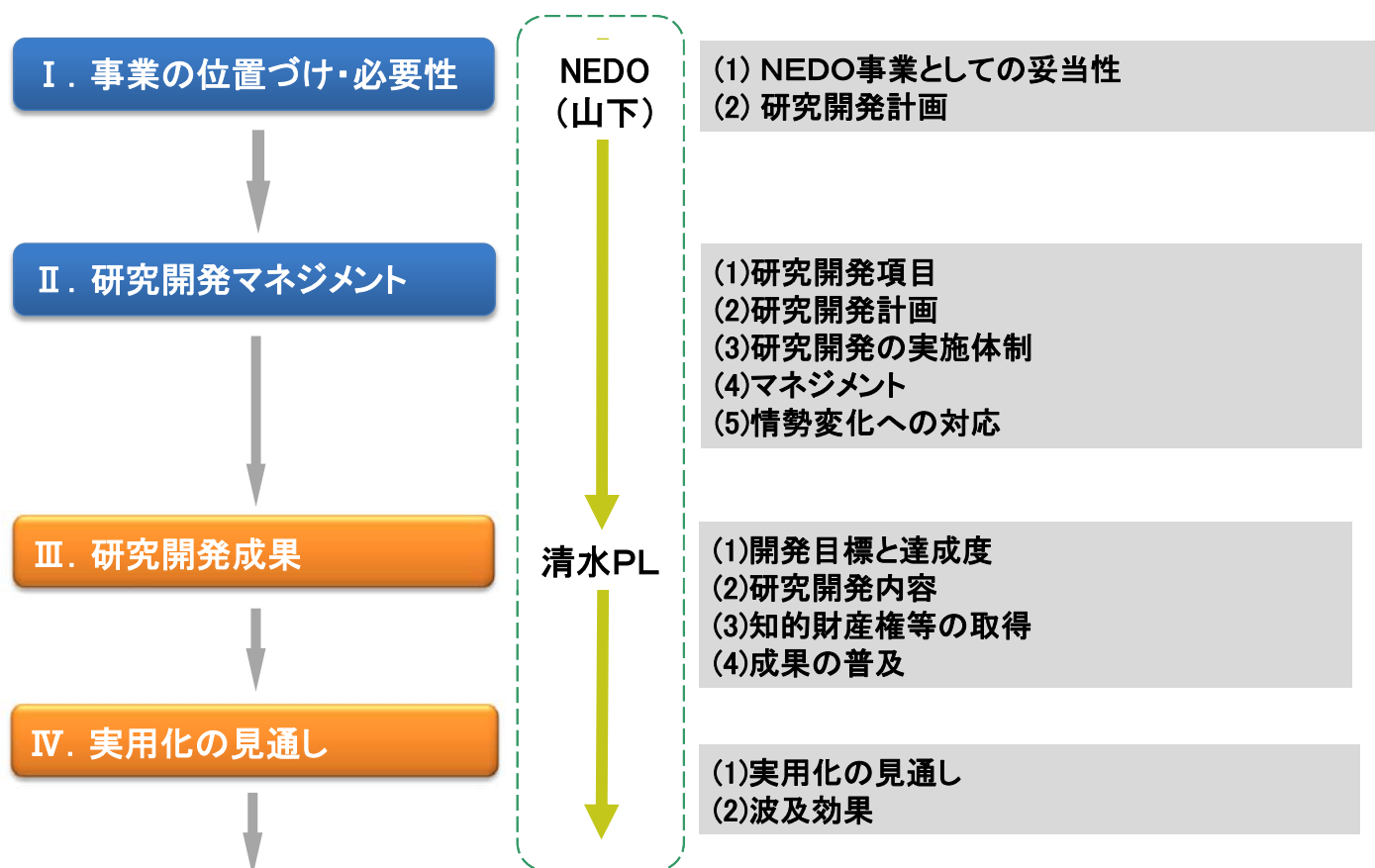
NEDO
バイオテクノロジー・医療技術部

2011年 4月 21日

01 / 51

発表内容

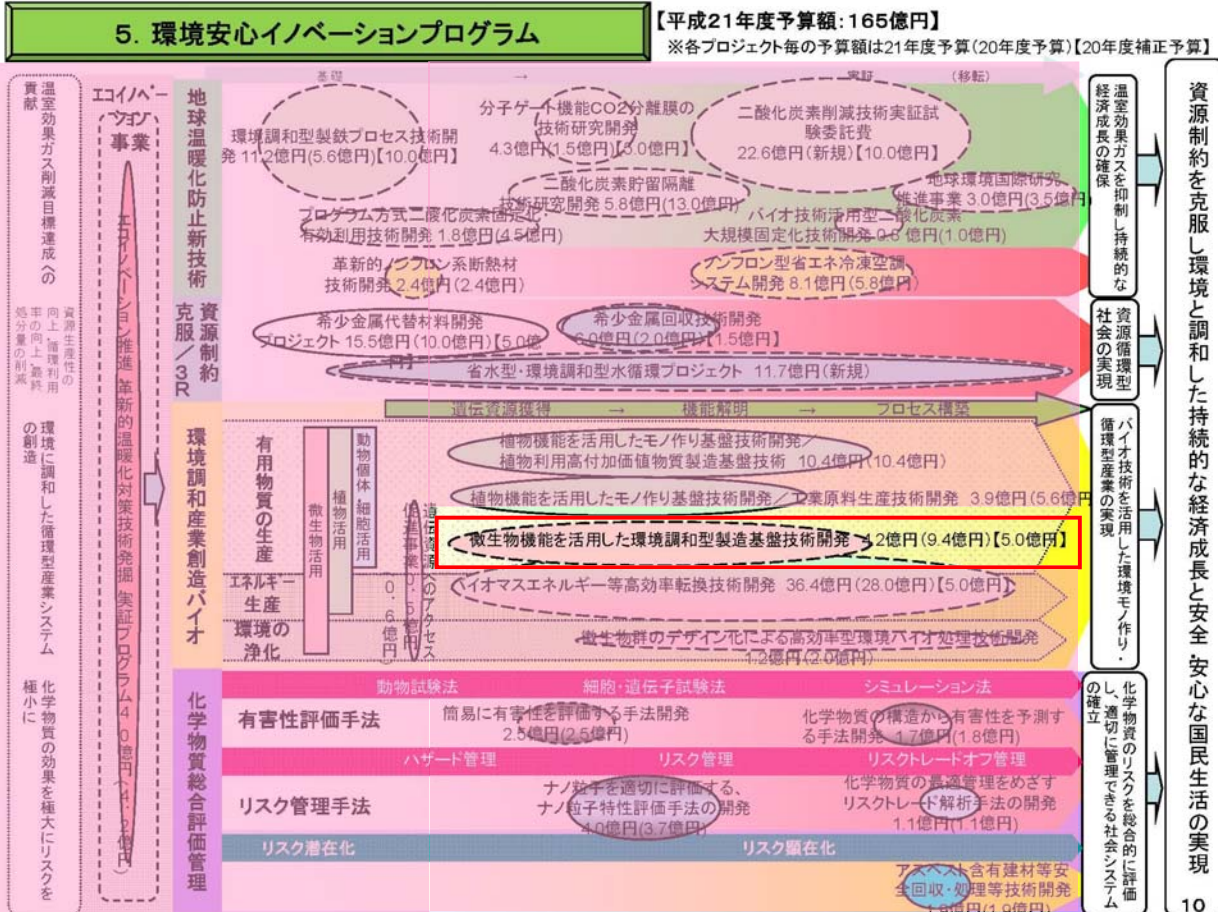
公開



02 / 51

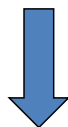
1.1 事業の背景・目的・位置付け

背景	<p>社会的背景: 資源枯渇やCO₂等排出物の環境への影響が懸念されている中、環境調和型循環産業システムの製造技術基盤が必要とされている。</p> <p>技術的背景: 発酵産業の伝統的な育種等の手法を基盤とした技術で優位。ゲノム科学の進展により、化学的方法を凌駕するバイオプロセス構築が可能となっている。</p>
目的	<p>①高性能宿主細胞創製技術の開発</p> <p>②微生物反応の多様化・高機能化技術の開発</p> <p>③バイオリファイナリー技術の開発</p> <p>⇒環境負荷の少ない微生物機能を活用した高度製造基盤技術を開発する。</p>
位置付け	「環境安心イノベーションプログラム」の一環



1.2 NEDOが関与することの意義

- 微生物を利用した物質生産技術は伝統的に我が国の得意領域
- 米国では微生物のゲノム解析等を精力的に推進、
欧州では環境負荷の少ない生物利用工業プロセス活用の動きが進展



本分野の国際的な優位性を確保し更に高めるために、
ゲノム情報等の最新の知見を適用した基盤技術の開発を強化・発展

- リスクの大きい技術開発である
→試行錯誤的な面を持ち合わせているため、
民間では開発費用を負担しきれない可能性がある。
- 国際競争力を高める必要がある
→我が国の得意としてきたバイオ産業の競争力を確保し
更に高めることができるような基盤技術開発を国が
促進する必要がある。

NEDOの関与が必要

1.3 実施の効果(費用対効果)

本事業により得られる高度製造基盤技術により
環境調和型循環産業システムへ

- ①バイオプロセスを利用した
化学品・医薬原料の生産拡大
- ②再生可能資源であるバイオマス利用

効果は製造産業全般へ波及

bio-based economy予測
over \$150 billion in the coming years (McKinsey)

プロジェクト予算(H18~H22)※ 51億円

※ 予算実績

2.1 事業の目標

<化学プロセス>

- ・反応速度が速い
- ・様々な反応が可能

<バイオプロセス>

- ・反応速度が遅い
- ・反応が限られている

大きい

環境負荷

小さい

・反応速度を格段に向上する革新的技術

・多様な反応を可能にする技術

環境負荷の少ない微生物機能を活用した
高度製造基盤技術を開発する。

<研究開発項目>

- ①高性能宿主細胞創製技術の開発
- ②微生物反応の多様化・高機能化技術の開発
- ③バイオリファイナリー技術の開発

2.2 事業の最終目標

①高性能宿主細胞創製技術の開発

微生物細胞への特異的遺伝子発現制御機能付与及び補酵素供給等のユーティリティー機能増強によって、プロジェクト開始時における**世界最高値の2倍以上**の生産性を達成する。

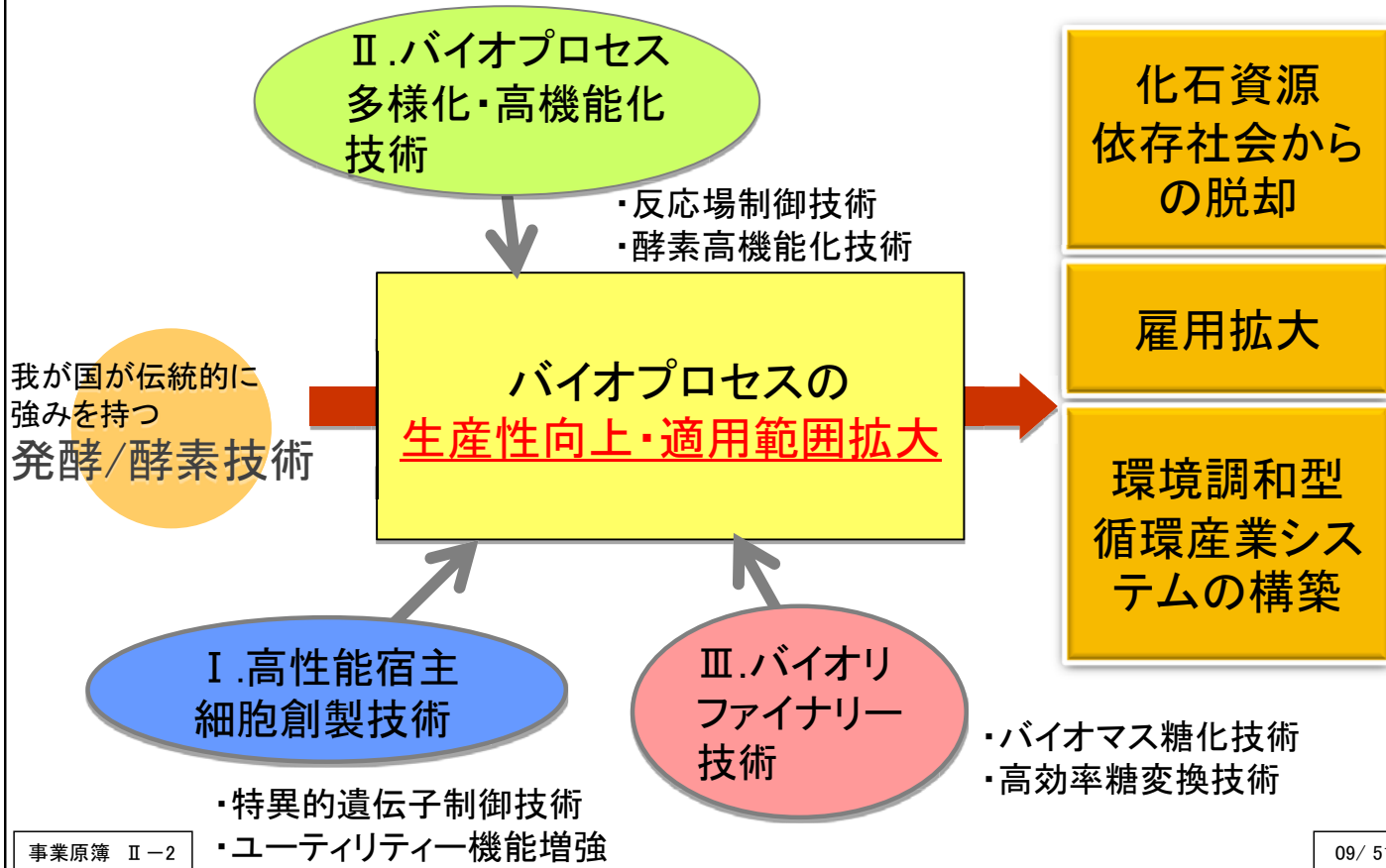
②微生物反応の多様化・高機能化技術の開発

バイオプロセス生産既知物質については**STY数g/L/h以上**、未知物質についてはその**10分の1以上**、**高付加価値品**については**(実用化に十分なSTYの数倍以上)**の生産を行うことにより、**バイオプロセスの実用化適用範囲を拡大**する。

③バイオリファイナリー技術の開発

草本系ソフトバイオマスについて、原料濃度10%にて1日で90%の糖化を行える技術を開発する。また、糖から新たに6種の基幹物質を**STY 10 g/L/h以上**で継続的に生産することのできる技術を開発する。

2.3 研究開発の内容



2.4 事業の計画内容・開発予算実績

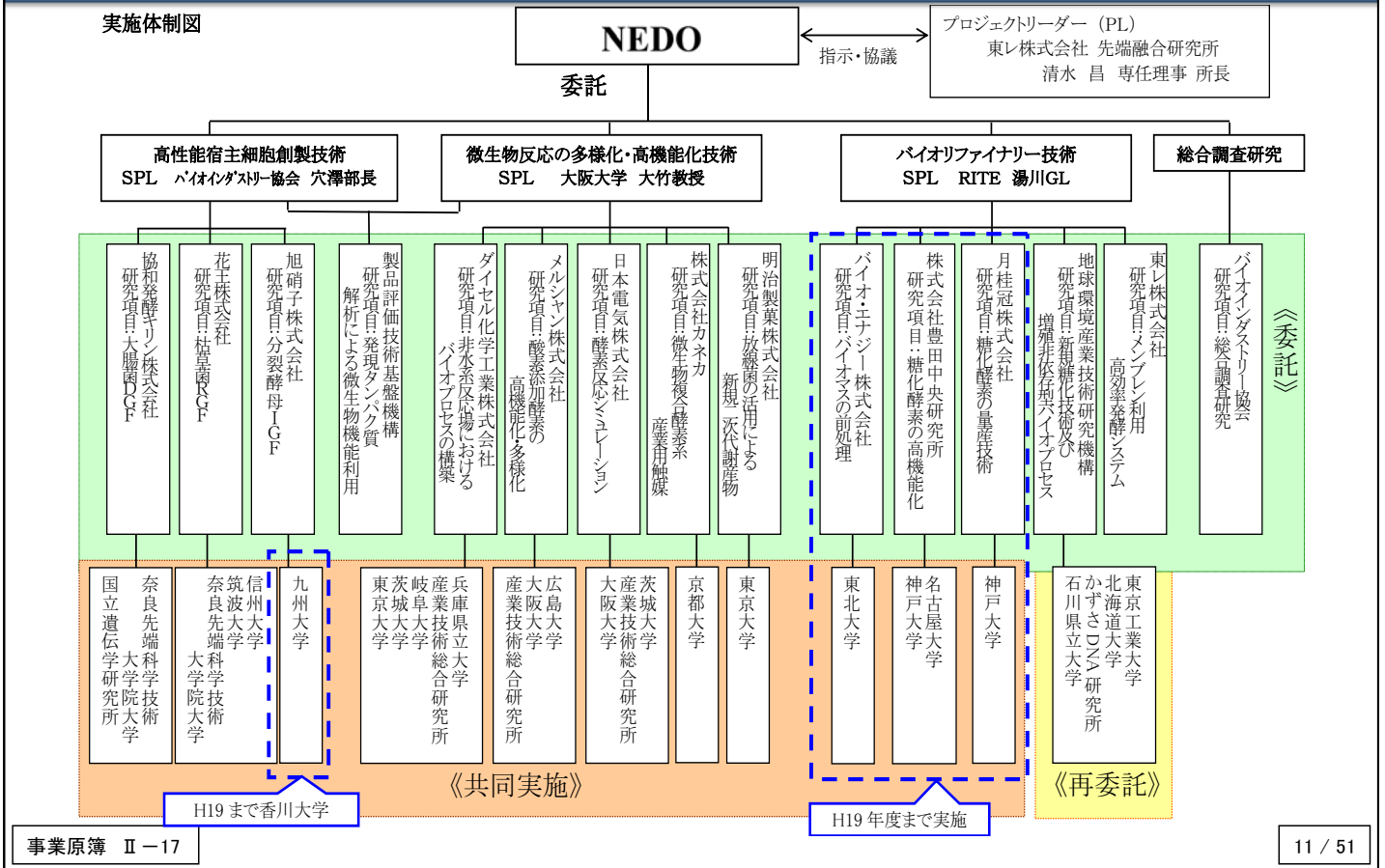
単位(百万円)

研究開発項目	H18 FY	H19 FY	H20 FY	H21 FY	H22 FY	計
高性能宿主細胞創製	304	275	188	182	82	1,031
微生物反応の多様化・高機能化	430	339	279	251	113	1,412
バイオリファイナリー	879	594	429	439	198	2,539
総合調査研究	32	27	21	20	9	109
総研究開発費	1,645	1,235	917	892	402	5,091

事後評価

◆研究開発費(実績) 計 5,091百万

2.5 研究開発の実施体制



2.6 事業体制の妥当性

● NEDO

外部の採択委員による厳正な公募により、事業化可能な企業を含む研究チームを構成、年度ごとに検査を行い適正な予算執行をマネジメント

全体会議を定期的に行い、全体進捗を管理するとともに、日々の進捗をマネジメントした。＜十分な情報交換を行い、効率的な研究を推進＞

● PL、SPL

全体を統括し、さらに、各企業の実施場所を訪問して具体的な助言を行った。

● 各チーム

産学連携の体制を構築し、知財のライセンス取得等を実施した。

● JBA

全実施者を包含する研究開発委員会を運営。また、大部分の実施者について、事務処理を行った。

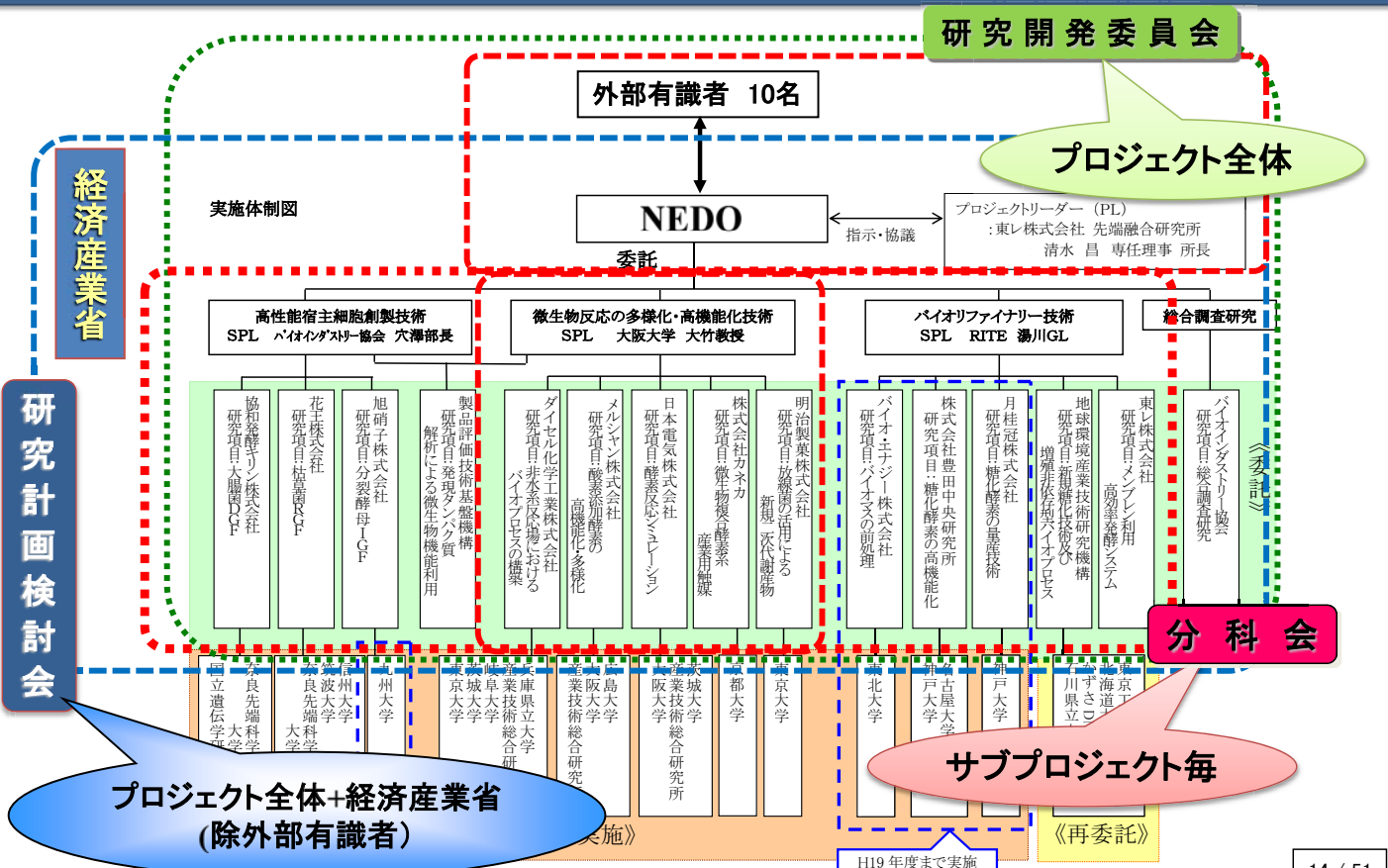
2.7 研究開発の運営管理

運営方針

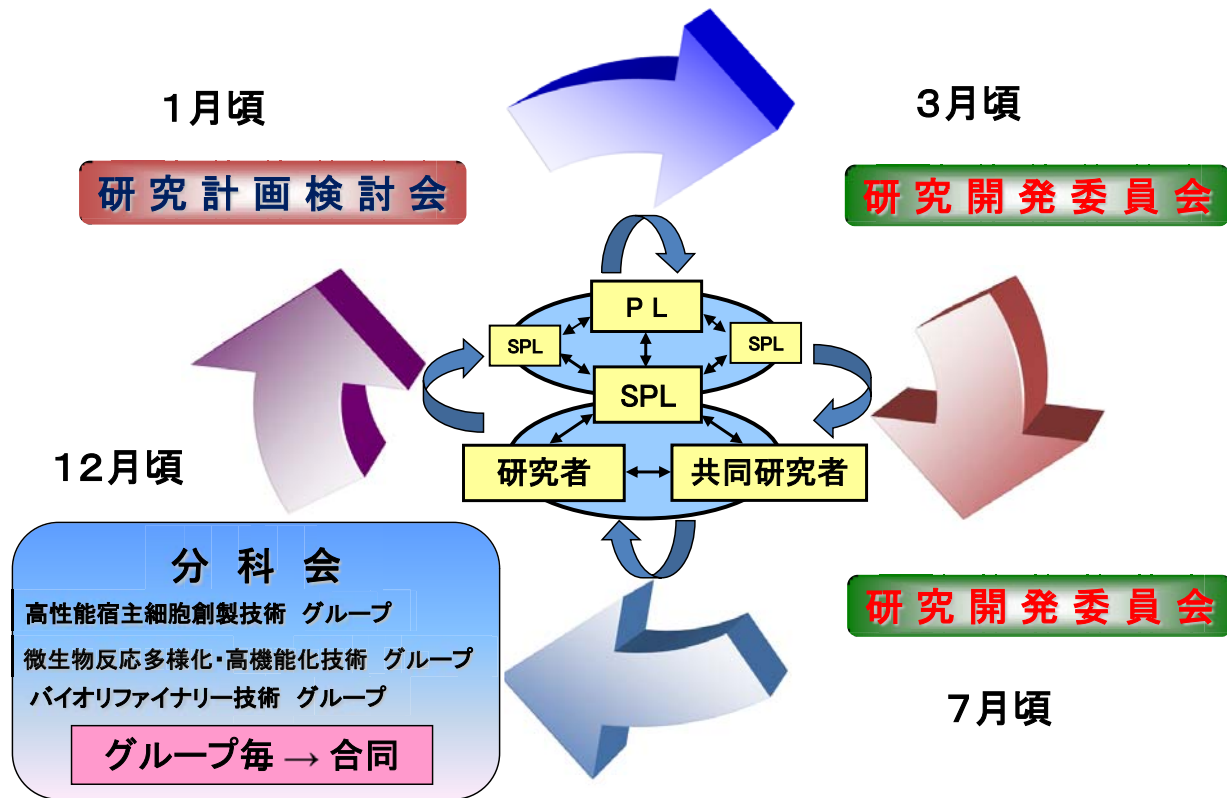
NEDOは、経済産業省及びプロジェクトリーダーと密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本研究開発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施する。

1. 研究開発委員会(外部委員10名、PL・SPL)
研究開発成果・方向性確認
2. 分科会(外部委員10名、PL・SPL)
サブプロジェクトテーマ毎に実施
3. 検討会(METI、PL・SPL、各研究実施者)
研究計画の確認・修正、今後の具体的実施方針策定

2.8 研究管理体制図



2.9 委員会等実施状況



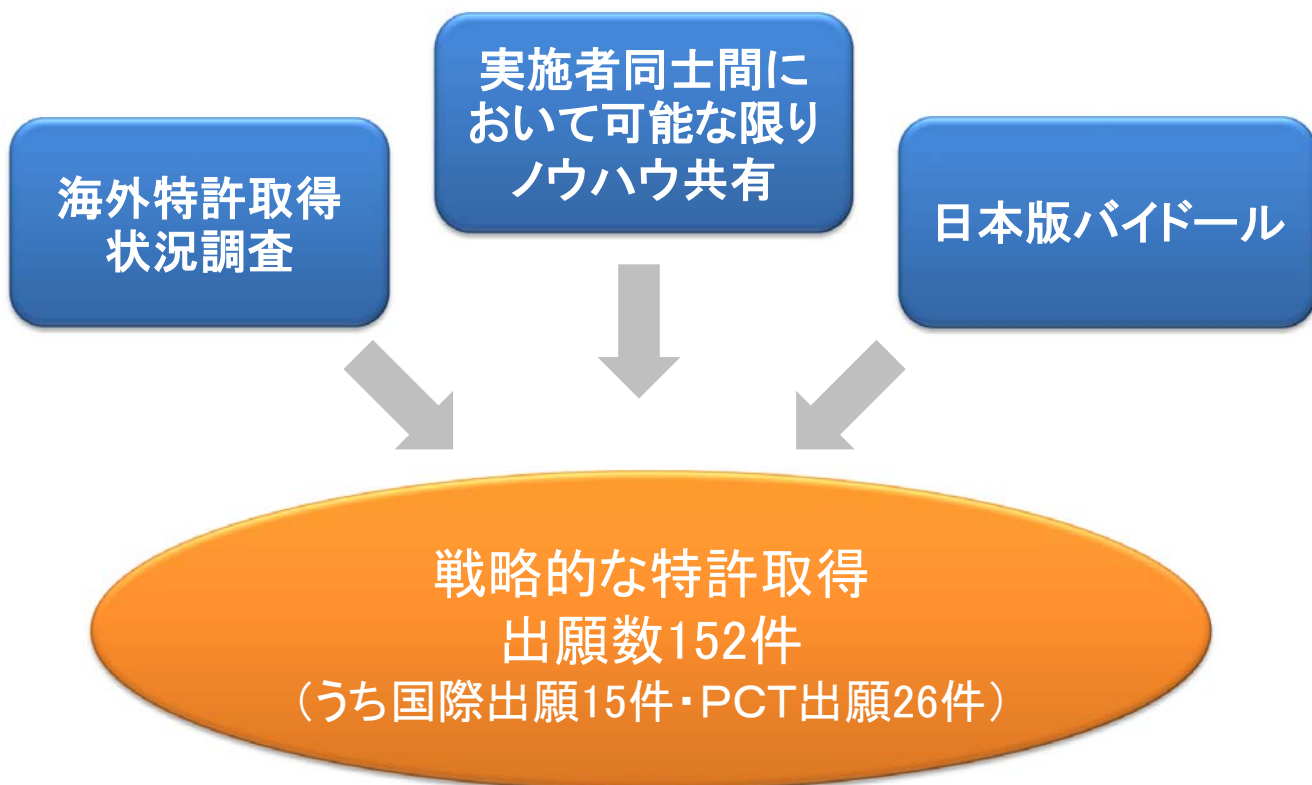
2.10 研究開発委員会等実施状況

委員会	実施内容	外部有識者参加
研究開発委員会	研究開発成果・方向性確認	9回
H18 4月	6/5 第1回	
H19 4月	2/28 第2回	
	6/29 第3回	
H20 2/26月	7/14 第4回	
	7/14 第5回	
H21 3/2月	7/31 第6回	
	7/31 第7回	
H22 3/4月	3/4月 第8回	
H23 12/31	12/31 第9回	
分科会	サブプロジェクトテーマ毎に実施	5回
H19 4月	12/1 第1回	
H20 12/25 4月	12/25 第2回	
H21 12/15 4月	12/15 第3回	
H22 12/25 4月	12/25 第4回	
H23 7/15 2月	7/15 第5回	
H19 12/18	12/18 第1回	
H20 12/26	12/26 第2回	
研究計画検討会	研究計画の確認・修正、今後の具体的実施方針策定	4回
H18 4月		
H19 1/31 4月	1/31 第1回	
H20 1/2 4月	1/2 第2回	
H21 2/2 4月	2/2 第3回	
H22 2/8 4月	2/8 第4回	
H23 2月		

2.11 研究開発委員リスト

		氏名(敬称略)	所属・役職
PL SPL	}	清水 昌	東レ(株) 専任理事 先端融合研究所長 (PL)
		穴澤 秀治	(財)バイオインダストリー協会 事業企画部長 (SPL)
		大竹 久夫	大阪大学大学院工学研究科教授 (SPL)
		湯川 英明	(財)地球環境産業技術研究機構 理事 バイオ研究グループリーダー (SPL)
外部有識者	}	浅野 泰久	富山県立大学 工学部生物工学科 教授
		太田 明德	東京大学大学院 農学生命科学研究科 教授
		勝亦 瞭一	東北大学 名誉教授
		工藤 俊章	長崎大学 水産学部海洋物質科学講座 教授
		小長谷明彦	東京工業大学 総合理工学研究科 教授
		中島 春紫	明治大学 農学部 教授
		森川 正章	北海道大学大学院 地球環境科学研究科 教授
		渡辺 隆司	京都大学 生存圏研究所 副所長 教授
		大島 桂典	(株)東レ経営研究所 特別研究員
		家山 一夫	日立造船(株) 事業・製品開発本部開発プロジェクト外部 部長

2.12 知財マネジメント



2.13 情勢変化への対応

■体制の再構築

3テーマを別プロジェクトへ移行して、より効率的に実施

より早期にバイオマス燃料生産技術としての実用化を目指して推進すべきと判断された3テーマ
(バイオエナジー、豊田中央研究所、月桂冠)



「バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発(先導技術開発)」プロジェクトへ移行して、新しい体制のもとでバイオマスエネルギー開発を集中的に実施

2.14 情勢変化への対応

■加速資金の活用1 — 分析機器の整備

年度	実施者	項目	効果
2006 (H18)	RITE	連続糖化試験装置、糖化解析システムの導入	高効率糖化プロセスの開発として、酵素再利用による 連続糖化システム を構築し、リグニン含有古紙の糖化では 糖化率80%を維持したまま、400時間超の連続糖化 を確認した。
2007 (H19)	協和発酵キリン	マイクロアレイ解析システムの導入	マイクロアレイ解析システム を導入したことにより、転写解析の スピードがアップ して、 溶菌関連遺伝子の同定 という成果につながった。
2007 (H19)	RITE	芳香族化合物分析・解析システムの導入	芳香族化合物生産の基盤技術の構築のため、キーとなる 芳香族化合物中間体の生産株 を構築し、当該代謝経路 改変に必要な関連遺伝子 に関する知見を得た。
2007 (H19)	カネカ	キャピラリー電気泳動装置、蒸発光散乱検出システムの導入	キャピラリー電気泳動装置及び蒸発光散乱検出システムを導入したことにより、複合酵素系を用いる光学活性アミン生産プロセスの 開発スピードが加速 され、実用化レベルの技術開発につながった。

2.15 情勢変化への対応

■加速資金の活用2ーパイロットスケール実証、評価試験

年度	実施者	項目	効果
2006 (H18)	花王	リボソーム機能改変及び評価	RNAオペロンの削除株を作成したタイミングで加速資金を投入し、 セルラーゼ生産培養評価や網羅的転写解析などの解析・評価、及び改変株の作成、評価を推進した。 この結果、2コピー削除しても細胞増殖やセルラーゼ生産性は野生株の80%程度を維持でき、更に削除改変による セルラーゼ生産性の20%向上 が可能となった。
2008 (H20)	メルシヤン	微生物ゲノムドラフト配列解析有用遺伝子評価試験	ゲノム配列データが得られたことで、 2年間を見込んでいた ビタミンD水酸化変換を効率化する遺伝子を 1年以内に 同定できた。この結果、水酸化ビタミンDの 生産性を3-4倍 に増加させることができた。
2008 (H20)	東レ	微生物連続培養追加装置、運転データ計測記録装置等の導入	微生物連続培養装置の追加仕様を施した 追加装置 、詳細な運転データ取得可能な記録装置を 導入できた ことで、メンブレン利用発酵リアクターの 試験が効率的 に行えるようになり、 検討加速 につながった。
2008 (H20)	RITE	ベンチスケール試験システムの導入など	増殖非依存型バイオプロセスの工業化に必須な基盤要素技術の実証のため、該プロセスの スケールアップ を検討し、 フラスコスケールレベルと同等以上の生産性 が得られた。

2.16 中間評価結果への対応

→「概ね現行通り実施して良い。」との評価

下記は、主な指摘事項に対する対応

指摘	対応
<u>グループ間の連携を強化すべきである。</u>	グループ間で有用な遺伝子と機能の情報を共有化し、各グループを連携させるべく、研究者間レベルの合同研究開発委員会及びPL・SPLクラスのテーマ検討会を開催した。
<u>汎用化学品(石化代替品)の大規模生産が前提となることから、技術移転・実用化の加速を図るために、スケールアップやダウンストリーム開発を更に充実させることが有効。</u>	バイオリファイナリーGでスケールアップ検討を行った。 ベンチスケール試験システムの導入 →増殖非依存型バイオプロセスのベンチスケールでの検討を行い、フラスコスケールと同等以上の生産性を達成(RITE) 微生物連続培養追加装置、運転データ計測記録装置等の導入 →MFRパイロット装置で検討を行い、1000時間の連続発酵を達成(東レ)

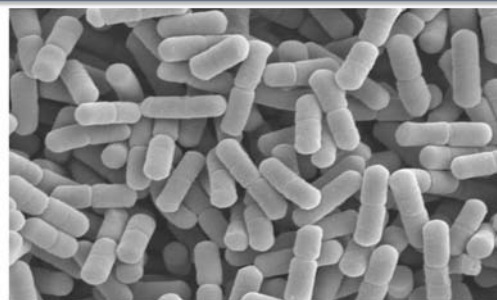
2. 17 広報の取り組み、受賞

・NEDO主催のシンポジウムの企画等、積極的な広報を行った。

→ プロジェクト関連の記事
計111件掲載

・プロジェクト関連で受賞多数

→ 2009 Enzyme Engineering Award (清水PL)、米国工業微生物学会フェローシップ・アワード (湯川SPL)、日経地球環境技術賞 (RITE)、学会賞 (多数) 等
計12件受賞



参加無料
要事前申込

N E D O グ リ ー ン バ イ オ シ ン ポ ジ ウ ム
微生物ものづくり新技術の開花
【日時】2011年3月22日(火)13:00-17:00
【場所】品川ココロホール (品川駅港南口(東口)から徒歩2分)
【参加費】無料。参加をご希望の方は、事前に下記URLよりお申込下さい
<https://app3.infoc.nedo.go.jp/gyouji/events/EK/nedoevent.2011-02-08.8475311255>

13:00 来賓挨拶・趣旨説明
13:20 『ニコロムゲルムプロジェクトが目指したもの』
宮澤 秀治 財団法人バイオインダストリー協会 事業企画部長
13:40 『ニコロムゲルムはどこまで進んだか』～精華章の場合～
坂 隆俊 花王株式会社 生物科学研究所 プロジェクトリーダー
14:00 『ニコロムゲルムはどこまで進んだか』～分裂酵母の場合～
栗田 良毅 旭硝子株式会社 ASPEX事業部 主任研究員
14:30 『ものづくりゲルム生物学への挑戦』
原島 俊 大阪大学 大学院工学研究科 教授
14:50 『ゲルム再構築技術の応用と課題』(汎用性、汎用性、コスト)
板谷 光孝 慶應義塾大学 先端生命科学研究所 教授
15:10 『代謝ネットワーク建設のための進化分子工学』
植野 大輔 千葉大学 工学研究科 准教授
15:50 『16元ディスプレイ』ニコロムゲルムとゲルム再構築
既存産業へのインパクトと新規産業創出の可能性

【お問合せ】(独) 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO)
バイオテクノロジー・医療技術部 / 担当: 山下・長谷川
TEL: 044-520-5231 / e-mail: greenbio2011@nedo.go.jp

3.1 研究開発成果について

<ものづくりバイオ(バイオプロセス)の課題>

- ・(微生物の)反応速度が遅く、化学プロセスに対抗できない
- ・コモディティケミカル(汎用化学品)領域への拡張

<欧米技術レベル・開発動向>

- ・最小遺伝子細胞合成の発想が出現
- ・酵素反応過程のコンピュータシミュレーションは我が国と同レベル
- ・DOE(米):バイオファイナリー技術開発を推進中だが、化学品開発はエタノール、1,3-プロパンジオール、L-乳酸止まり
- ・セルラーゼ組合せ効果の発見(活性4倍にUP)
- ・欧州バイオ産業協会を中心としたwhite Biotechnology構想が展開中

高性能宿主細胞創製技術の開発

(精密発現制御技術の確立)

- ・ゲノムのデファイン化・リファイン化・インテリジェント化
- ・遺伝子発現制御、細胞ユーティリティ機能増強

遺伝子多重削除によるゲノムのシンプル化及び負の制御ネットワーク削除という発想は本プロジェクトのみ

基礎技術開発

微生物反応の多様化・高機能化技術の開発

(反応場制御技術の確立)

- ・非水系反応場/複合酵素系機能発現制御
- ・酵素反応シミュレーション
- ・非天然物質合成遺伝子クラスター改変

これまで困難であった非水系酸化反応の主体であるP450複合酵素系の改良にコンピュータシミュレーションを導入するのは本プロジェクトのみのchallengingな試み

バイオリファイナー技術の開発

(環境調和型バイオマス糖化技術、高速物質生産技術の確立)

- ・超高速物質生産技術—増殖非依存型反応—の開発
- ・超高機能酵素触媒—セルロソーム—による糖化技術開発

増殖非依存型反応の反応速度は従来法の10倍超。セルロソームによる糖化技術開発は世界初(個別セルラーゼ混合物の数十倍の活性あり)
化学プロセスを凌駕する世界最高の高生産性を2種化合物で既実証済み

化学反応を凌駕する物質生産バイオプロセスの実現

=ものづくりバイオのパラダイムシフト=

出口・波及効果等

有用化学物質生産

古紙処理への応用

新規雇用促進

地球環境保全・循環型社会の構築に貢献

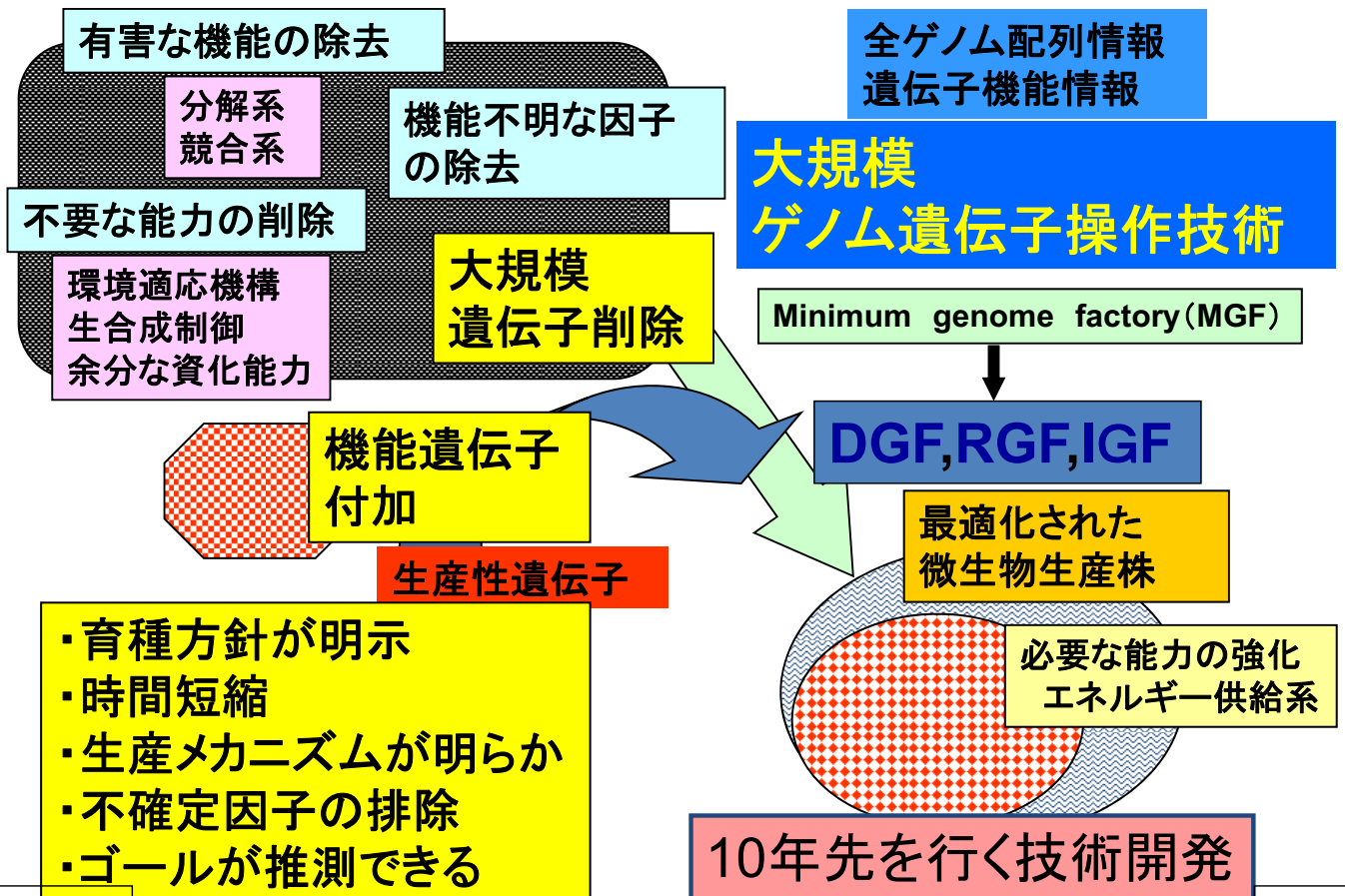
3.2 研究開発項目の目標と達成状況

研究開発項目	目標	成果	達成度
高性能宿主細胞創製技術	微生物細胞への特異的遺伝子発現制御機能付与及び補酵素供給等のユーティリティ機能増強によって、プロジェクト開始時における 世界最高値の2倍以上 の生産性を達成する。	世界最高値の2倍以上 の生産性を達成 アルギニン生産3.9倍 セルラーゼ生産2.5倍 ヒト成長ホルモン(hGH) 2.6倍	達成
微生物反応の多様化・高機能化技術	バイオプロセス生産 既知物質についてはSTY1g/L/h以上、 未知物質についてはSTY0.1g/L/h以上、 医薬品等の高付加価値品については (実用化に十分なSTYの数倍以上)生産を行うことにより、 バイオプロセスの実用化適用範囲を拡大 する。	以下の物質に関して 目標を達成 (R)-マンデル酸(RMA) 8.8g/L/h (S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸 2.1g/L/h ビタミンD 従来STYの3倍 非天然L体アミノ酸類 100g/L/h 非天然抗生物質 7.3mg/L/h	達成
バイオリファイナー技術	草本系ソフトバイオマスについて、 原料・濃度10%にて1日で90%の糖化 を行える技術を開発する。 糖から6種の 基幹物質をSTY 10 g/L/h以上で継続的に生産 することのできる技術を開発する。 実用的に利用可能なバイオマスを原料として高効率で糖化し、各種化成品等生産のための基幹物質を、生成した糖から高効率で生産するバイオプロセス体系を開発・構築する。	酵素再利用法により、リグニン含有古紙を 糖化率80%で400時間超の連続糖化を達成 。 STY10g/L/hを以下の物質で達成 D-乳酸 10g/L/h以上 L-アラニン 10.3g/L/h キシリトール 10g/L/h以上 パリン 10g/L/h以上	達成

3.3プロジェクト開発技術の海外優位性

研究開発項目	世界の技術レベル・開発動向	本プロジェクトの優位性
高性能宿主細胞創製技術	①合成ゲノムによる宿主細胞創製の研究が行われている。 ②欧州において枯草菌のシステムバイオロジープロジェクト「BaSysBio」の研究が動いている。 ③プロジェクト開始時は、ヒト成長ホルモン、ヒト血清トランスフェリンの生産性は同レベル	①遺伝子の多重削除によるゲノムシンプル化と特異的遺伝子発現制御機能付与やユーティリティ機能向上で菌株全体の能力を高めることを目指した取り組みは 本プロジェクト独自 である。 ②彼らは本プロジェクトの成果を見て軌道修正など行っている。 我々がトップランナー ③現在では、分裂酵母による 独自の生産システム で優位な生産性を保ち、 世界最高値に匹敵
微生物反応の多様化・高機能化技術	①有機溶媒耐性微生物を用いた バイオ変換プロセス の基礎的研究が欧米、インド、中国などで行われている。 ②酸素添加酵素を機能改変するアプローチはあるが、本プロジェクトのように電子伝達系を含めた マルチコンポーネント系の反応場 を定義し、最適化を実施する研究はない。 ③酵素反応過程の コンピュータシミュレーション は我が国と同レベル ④ 非天然型抗生物質の化学プロセス による生産は、多工程で収率が低く、製造コストが高い。	①非水系反応場で機能が発現する生体触媒を構築しバイオプロセスを開発するという 概念は新しく 、様々な難水溶性化合物の物質変換に応用可能となる有機溶媒耐性菌を見出している。 ②微生物変換法によるビタミンD水酸化体製造は 専有技術 であり、本酵素遺伝子ライブラリーや迅速スクリーニング系で 独自の技術 を有している。 ③これまで困難であった非水系での酸化反応の主体であるP450複合酵素系の改良にコンピュータシミュレーションを導入するのは 本プロジェクト独自 ④放線菌による非天然型二次代謝産物の 発酵生産に成功 し、律速となっている生合成酵素の基質特異性改良技術開発では 世界をリード
バイオリファイナリー技術	①米国DOEがバイオリファイナリー技術開発を推進中、開発化学品はエタノール、1,3-プロパンジオール、乳酸など DOE資金で、セルロース系バイオ燃料製造のためのスーパーセルラーゼを開発 ② 膜利用発酵リアクター によるD-乳酸発酵での好成績は報告されていない。	①超高機能酵素触媒「人工セルロソーム」による糖化技術の開発は 世界初で、我が国独自技術 増殖非依存型バイオプロセスは、我が国の至宝コリネ細菌の特有の代謝制御技術を利用した 独自技術 ②膜利用発酵リアクターによるD-乳酸発酵で、発酵継続時間、生産速度、光学純度の全ての面で 世界最高レベル の成績を達成

1. 高性能宿主細胞創製技術の開発



微生物を活用した高度製造基盤技術開発プロジェクト

1. 高性能宿主細胞創製技術の開発

協和発酵：大腸菌 Designed Genome Factory

花王：枯草菌 Refined Genome Factory

旭硝子：分裂酵母 Intelligent Genome Factory

製品評価技術基盤機構(NITE)：
発現タンパク質解析(網羅的プロテオーム解析)

1. 高性能宿主細胞創製技術の開発

共同実施先と研究課題

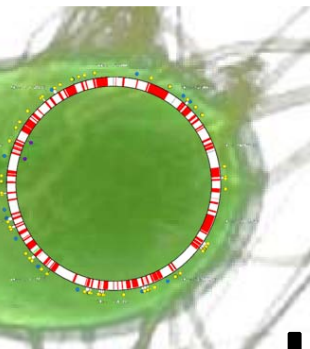
- ・国立遺伝学研究所 仁木 宏典 教授 「大腸菌機能未知遺伝子の機能解析」
- ・奈良先端科学技術大学院大学 小笠原 直毅 教授
「大腸菌染色体加工株のトランスクリプトーム解析」
「大腸菌発現制御系コレクション」
- ・奈良先端科学技術大学院大学 小笠原 直毅 教授
「枯草菌における特異的遺伝子発現制御技術」
- ・筑波大学大学院 中村 幸治 教授 「枯草菌細胞の異種タンパク質生産機能」
- ・信州大学 関口 順一 教授 「枯草菌細胞ユーティリティ機能増強技術」
- ・九州大学(前 香川大学) 竹川 薫 教授
「分裂酵母の細胞ユーティリティ機能増強技術」

高性能宿主細胞創製 大腸菌 Designed Genome Factory

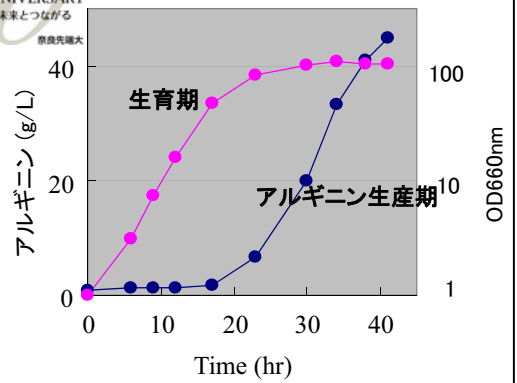
KYOWA KIRIN

染色体縮小化株作製

- 野生株染色体を35%削除
- 機能未知遺伝子の3.1%は削除不能 ⇒ 機能解明へ
- ATP供給能力が大幅に向上

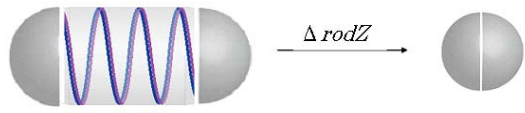


生育連動型プロモーター
アルギニン 3.29 g/L/hを達成!

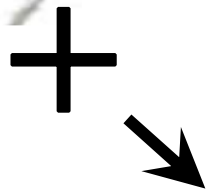


機能未知遺伝子機能解析

・ *yfgA=rodZ* 桿菌構造の形成に関与



・ *yhhK=panZ*
パントテン酸合成系活性化因子

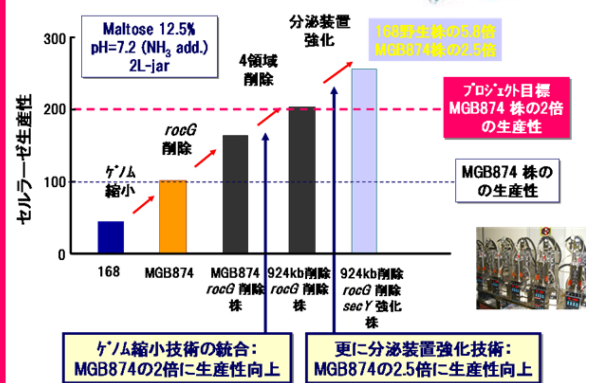
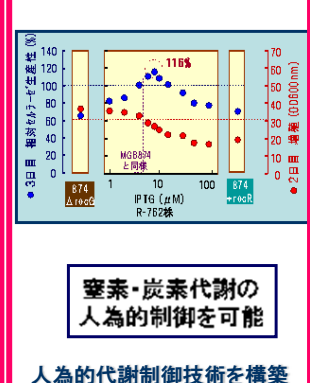
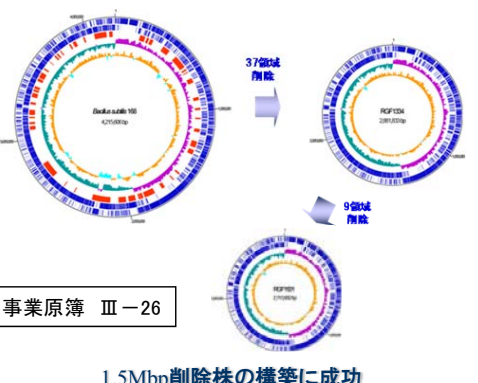
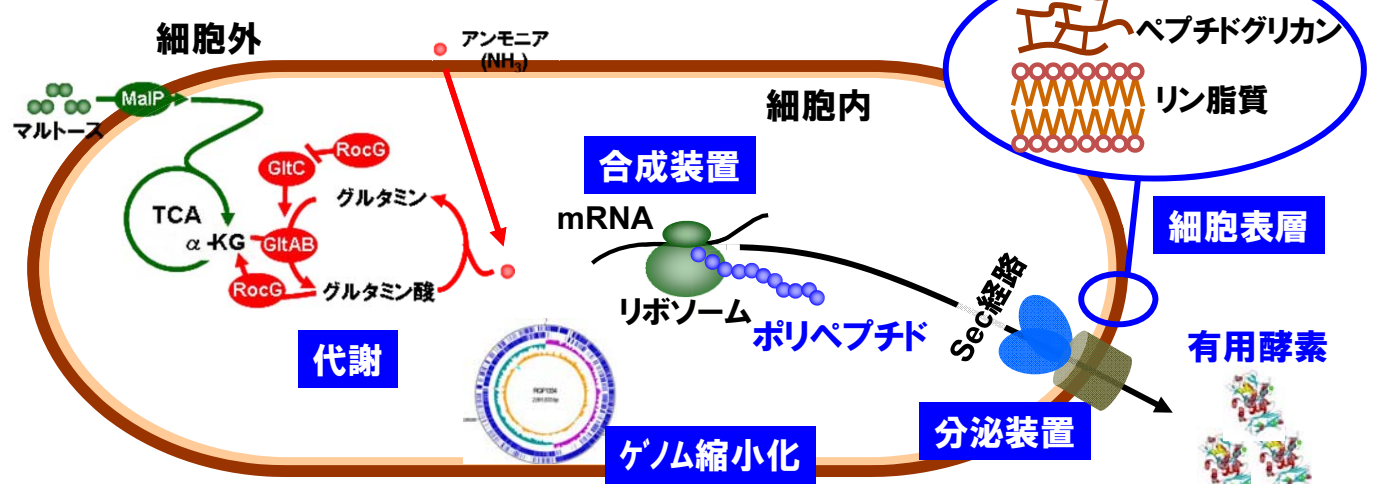


- 染色体縮小化株で生産系遺伝子を発現させ、目的化合物に応じてチューニングすることで、効率的な物質生産系を構築。
- 実用化・事業化に向け子会社で検討継続。積極的なライセンスアウトや共同研究により更なるブラッシュアップを予定。

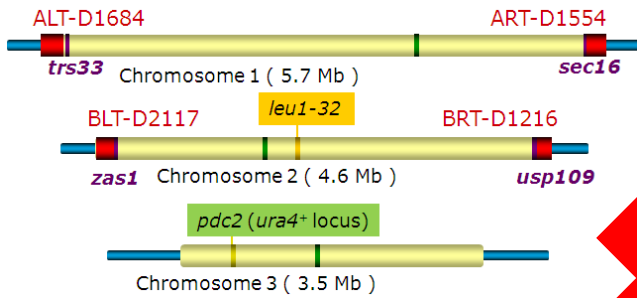


高機能性枯草菌宿主の開発

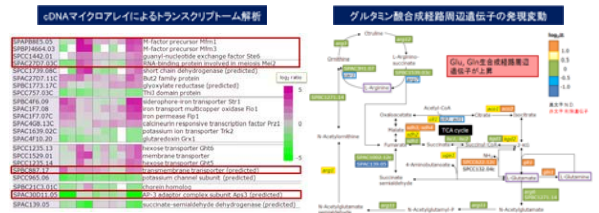
(Refined Genome Factory)



染色体大規模削除株△657.3kbpを完成



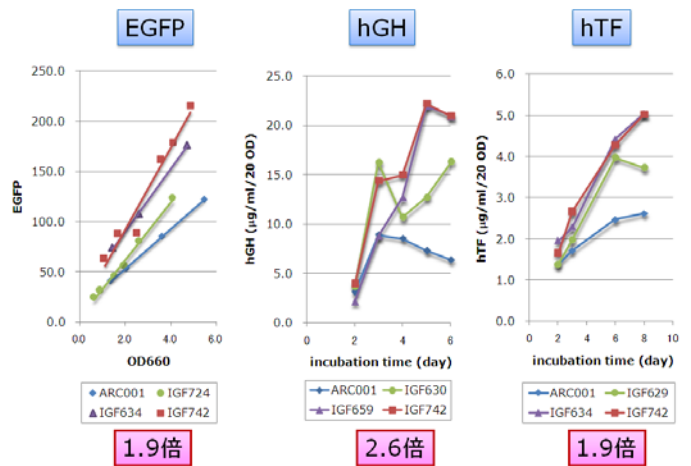
窒素飢餓検知・代謝変動解析



異種タンパク質生産効率が2倍に向上

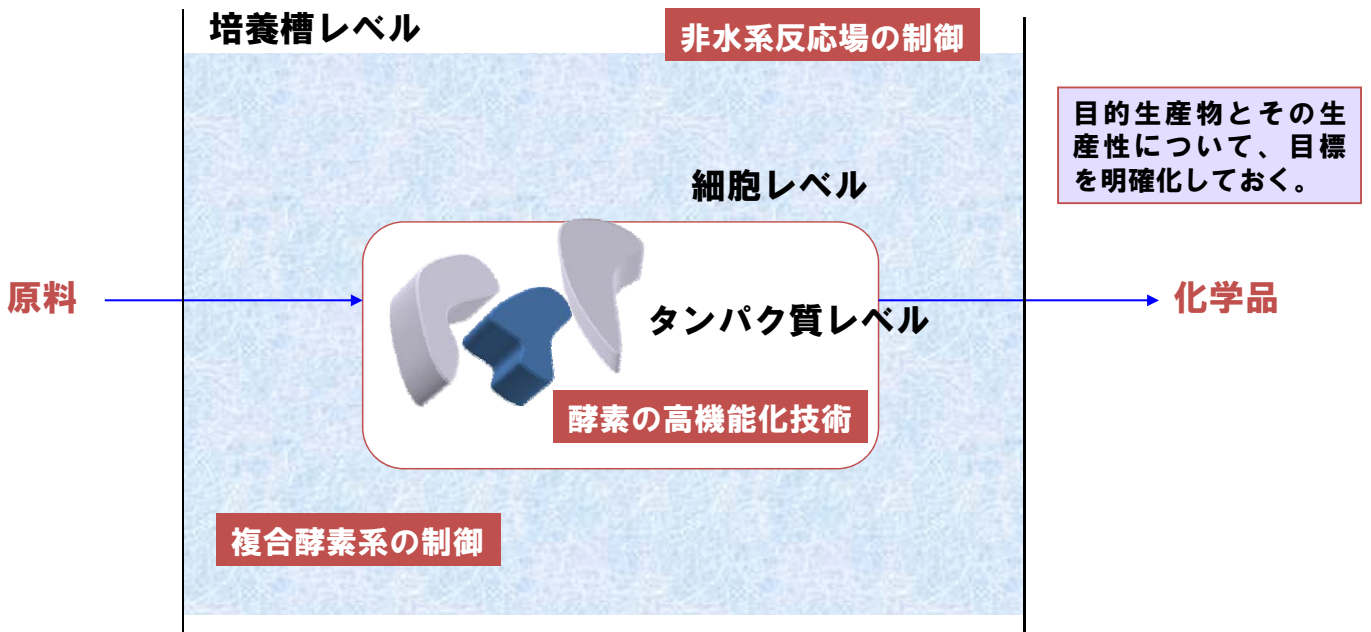
関連技術の進展

1. 多座組込型発現システム (5ユニット同時Tf2座分散組込可能)
2. 外部制御型誘導発現システム (増殖依存後期プロモーターihc取得)
3. 分泌生産性向上技術開発 (外来因子利用分泌量増大)
4. 糖鎖構造最小化技術開発 (ヒト型糖鎖基本構造構築終了)



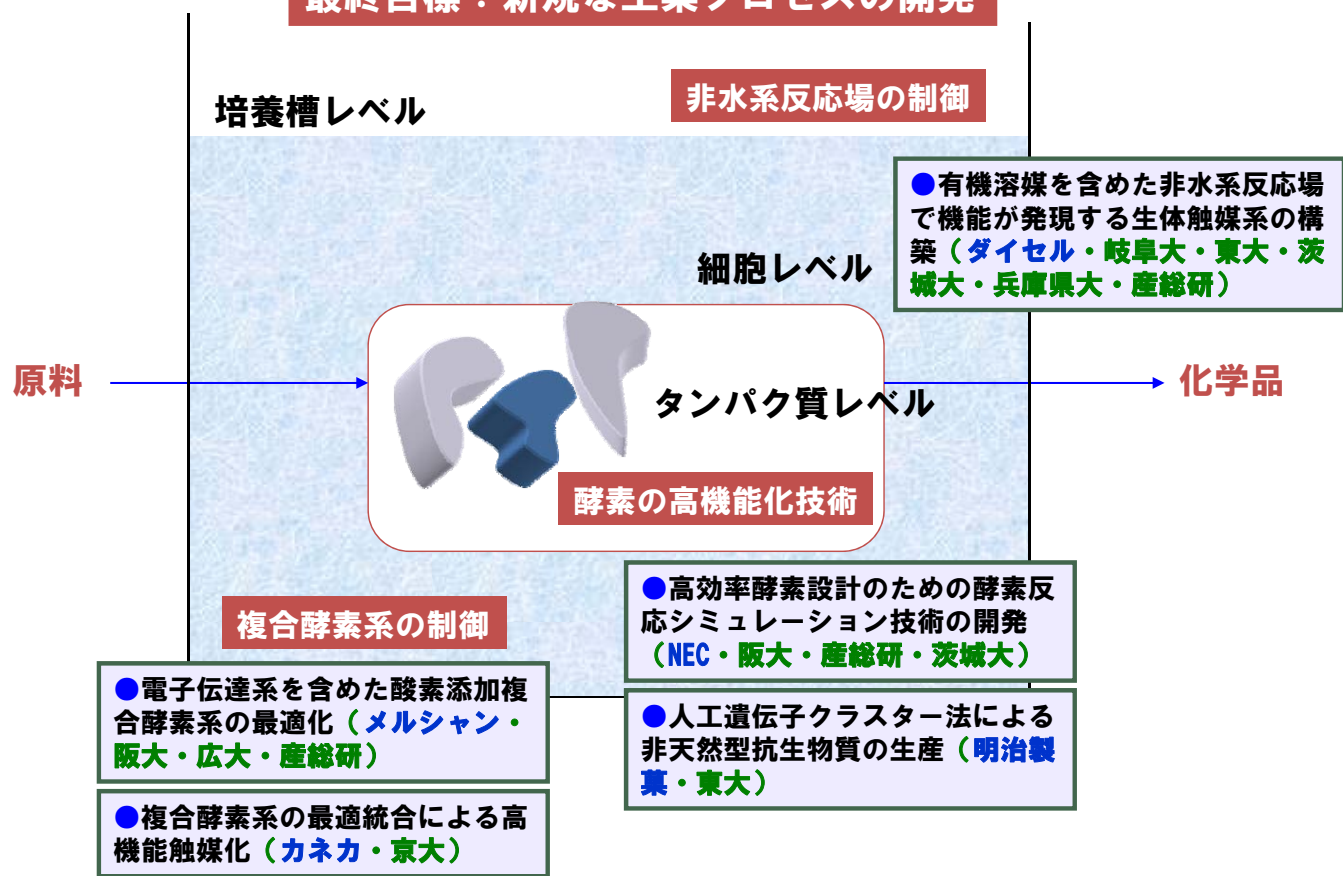
2. 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発

公開



複合酵素系や非水系などにおける反応場制御技術の開発と、遺伝子改変等による酵素の高機能化技術の開発を行い、既にバイオプロセスにより生産できることが知られている物質についてはSTY (Space/Time/Yield: 反応容器の時間あたりの生産量) 数g/L/h以上、バイオプロセスによって生産できることが知られていない物質についてはその10分の1以上(医薬品等の高付加価値品については実用化に十分なSTYの数倍以上)の生産を行うことにより、バイオプロセスの実用化適用範囲を拡大する。

最終目標：新規な工業プロセスの開発



2. 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発

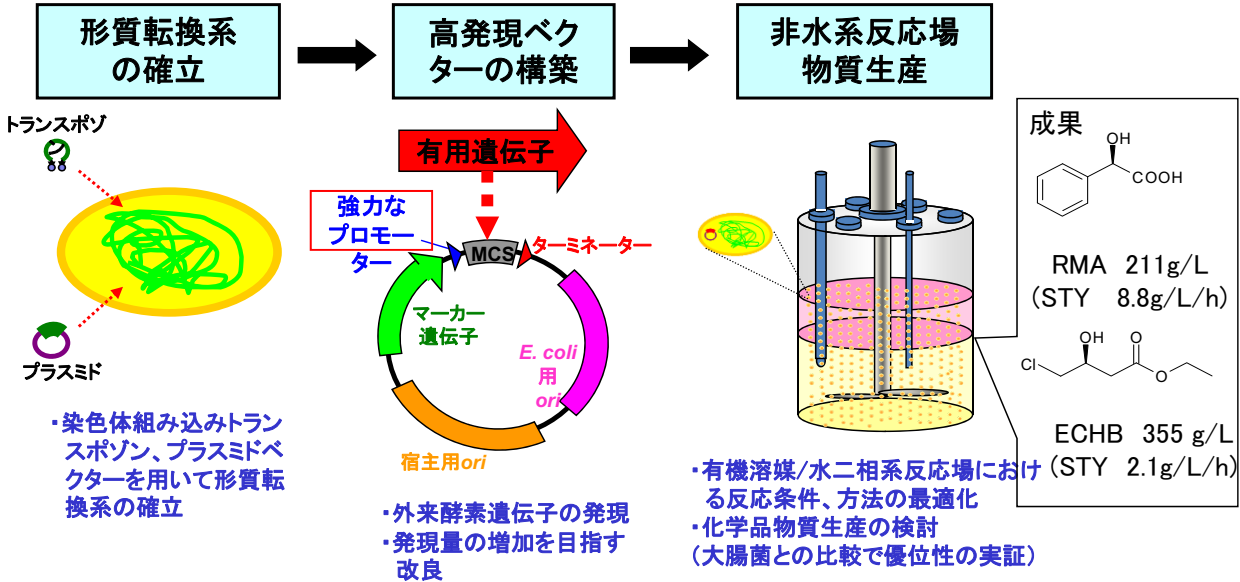
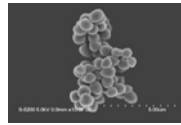
共同実施先と研究課題

- ・**東京大学大学院** 石井 正治 准教授 「非水系生体触媒への水素酸化能付与」
- ・**茨城大学** 西原 宏史 准教授 「水素利用微生物触媒の開発と反応」
- ・**岐阜大学** 長澤 透 教授 「酵素タンパク質の有機溶媒耐性機構と疎水性化合物変換酵素」
- ・**産業技術総合研究所** 宮崎 健太郎 グループ長 「メタゲノム手法による複合反応システムデザイン技術」
- ・**兵庫県立大学大学院** 樋口 芳樹 教授 「有機溶媒耐性酵素等有用酵素の精製・結晶化・構造化学的研究」
- ・**産業技術総合研究所** 田村 具博 グループリーダー 「酸素添加酵素の結晶構造解析技術」
- ・**大阪大学大学院** 大竹 久夫 教授 「Whole cell catalyst における酵素反応場の解析・制御技術」
- ・**広島大学大学院** 加藤 純一 教授 「マルチコンポーネント酸化酵素系の反応場制御基盤技術」
- ・**大阪大学** 奥村 光隆 教授 「密度汎関数法(CAS-DFT法)による酵素反応シミュレーション高信頼化技術」
- ・**産業技術総合研究所** 福西 快文 主任研究員 「酵素反応シミュレーションのための自由エネルギー計算手法」
- ・**茨城大学大学院** 高妻 孝光 教授 「ラマン分光法による酵素反応シミュレーション評価技術」
- ・**京都大学大学院** 小川 順 教授 「複合酵素系微生物触媒の基盤技術」
- ・**東京大学大学院** 大西 康夫 教授 「放線菌による非天然型二次代謝産物生合成の制御」

目標：現在のバイオプロセスは、水反応場で用いられるものがほとんどであり、化学工業において利用される疎水性化合物を原料とする生産への応用は困難である。そこで、各種有機溶媒中で細胞構造を維持することのできる微生物を宿主とするベクター系を開発し、非水系反応場で利用可能なバイオプロセスを確立することを目標とする。

成果：

有機溶媒耐性菌
***Kocuria rhizophila* DC2201**



実用化の見通し：有機溶媒耐性*K. rhizophila* DC2201に各種の反応を触媒する酵素遺伝子を導入することによって有機溶媒反応場で難水溶性化合物を原料にした医薬品中間体等の化学品生産を3~5年後の実用化を目指して、検討して行く。

酸素添加酵素の高機能化・多様化技術の開発

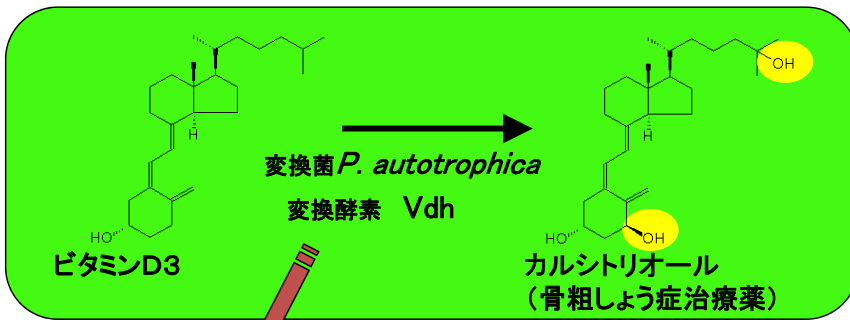
公開



メルシヤン株式会社

共同実施機関
産業技術総合研究所、大阪大学、広島大学

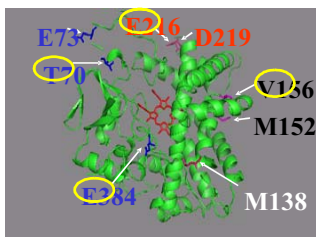
目的：高度水酸化バイオプロセスの開発



他の有用P450酵素変換系にも応用展開

有用水酸化化合物 (医薬・化学品)の開発
受託製造

酵素機能改変および構造解析



酵素機能改変で活性20倍
副反応1/6に

ゲノムデータを利用した
反応場促進因子の探索

マルチコンポーネント最適化
その他の宿主改良

遺伝子ライブラリー

従来の3倍以上の
生産性向上を達成!



ビタミンD水酸化体製造

酵素機能・反応機構の理解

① P450水酸化酵素の一連の反応プロセスをシミュレーション

ビタミンD3の取込 → 水素引抜 → 水酸化ビタミンD3の放出

量子化学の高度な計算手法の開発に基づく

反応場の詳細を説明

② 改変ホットスポットの予測に応用

予測法1: 活性向上 (角度変化) vs 予測法2: 副反応抑制 (相互作用エネルギー)

RC

188, L171

接触アミノ酸番号

③ 新変異体設計に成功
メルジャン社の新規基質
副反応を1/3に抑制に成功
ランダム変異に比べて遥かに高い成功率

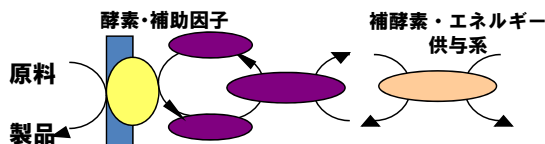
④ 実用化見通し
抗体や酵素を利用した分子センサの高度化

事業原簿 III-124

大阪大学 OSAKA UNIVERSITY | BIRC | 京大 51

微生物複合酵素系の産業用触媒

(カネカ、京都大学)



Integrated-Bio-Factory (IBF)
複数の機能素子(酵素など)を統合した(Integrated)生物工場(Bio-Factory)

代謝利用生産系には本質的限界 → 構成酵素系の最適統合化による高機能触媒化 → バイオプロセスの幅広い実用化

実用化レベルの生産プロセス開発

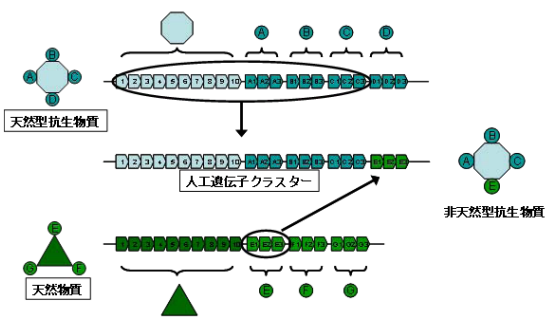
- 4酵素酸化還元複合酵素系によるL体非天然アミノ酸の安価生産プロセスを開発した(100 g/L、高収率、高純度)
- 4酵素酸化還元複合酵素系によるキラルジオール類の安価生産プロセスを開発した。(100 g/L、高収率、高純度)
- 4酵素酸化還元複合酵素系による複不斉キラルアルコールの生産プロセスを開発した。(50 g/L、高収率、高純度)
- アミノ基転移・酸化還元複合酵素系によるキラルアミン類の生産プロセスを開発した。(50 g/L、高収率、高純度)
- ATP産生・炭素-炭素結合複合酵素系によるリン酸化糖類の生産プロセスを構築した。(50 g/L、高収率、高純度)
- 炭素-炭素結合・アミノ基転移複合酵素系によるヒドロキシアミノ酸類の生産プロセスを開発した。(30 mM、高純度)
- ジオキシゲナーゼ複合酵素系を用いるヒドロキシアミノ酸類の生産プロセスを開発した。(70 g/L、高収率、高純度)
- 異性化複合酵素系を用いる共役脂肪酸類の生産プロセスを開発した。(50 mg/mL、高収率、高純度)
- 水和複合酵素系を用いるキラル水酸化脂肪酸類の生産プロセスを開発した。(25 g/L、高収率、高純度)

複合酵素系活用のための基盤技術開発

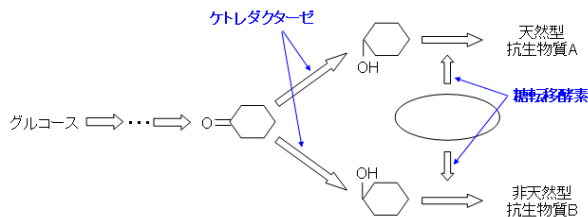
- スーパーオキシドディスムターゼがシクロクロムP450水酸化酵素の安定化及び活性化に寄与することを示した。
- 各種の微生物二次代謝産物や合成化合物に、ラッカーゼメディエーター活性を発見した。
- アルコール脱水素酵素の補酵素依存性を改変する手法を開発した。
- カルボニル還元酵素、オレフィン還元酵素、アミノ基転移酵素、炭素-炭素結合形成酵素、ラッカーゼ、P450モノオキシゲナーゼ、脂肪酸共役化酵素系(飽和化、不飽和化、異性化)などの新たな機能をもつ酵素を発見し、これらを用いる酵素的生産プロセスの基盤を築いた。

放線菌の活用による新規二次代謝産物の開発 (明治製菓株式会社・東京大学)

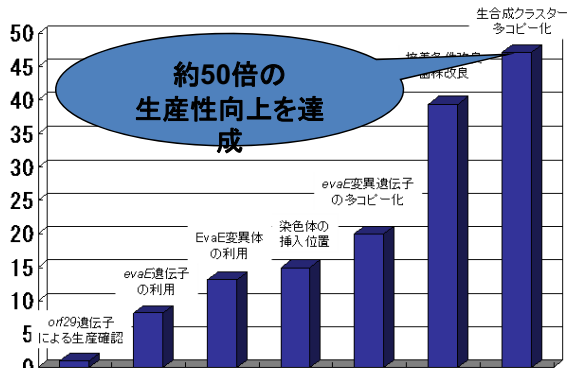
研究開発の概要



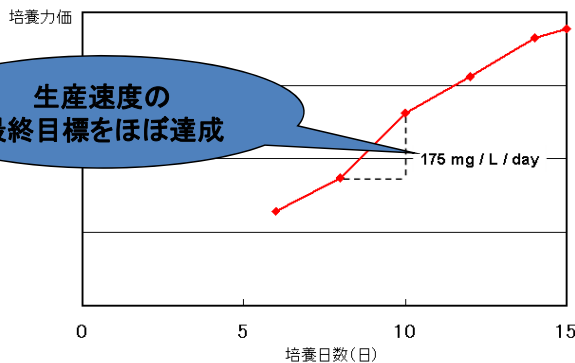
非天然型抗菌物質Bの発酵戦略



非天然型抗菌物質Bの生産性向上



ジャーフェンターによる培養生産性評価



発現タンパク質解析による微生物機能利用のための技術基盤の研究開発



高性能宿主細胞 DGF
有機溶媒耐性菌
・*R. opacus* B4株
・*K. rhizophila* DC2201株

産業利用

網羅的プロテオーム解析の開発・実施
定量的プロテオーム解析の開発・実施



- ・ショットガンプロテオーム
- ・ペプチドマスフィンガープリント
- ・多次元クロマトグラフ
- ・エドマン分解
- ・統計的定量法
- ・二次元電気泳動光学定量
- ・膜タンパク質検出



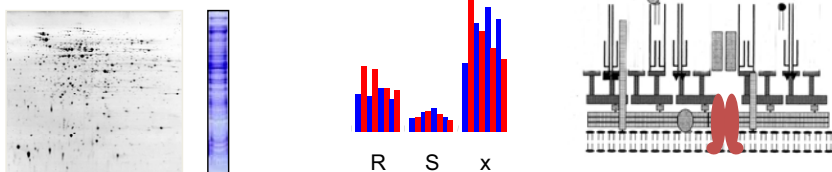
高機能性株

比較



野生株、機能欠損株

プロテオーム解析結果



DGF 同定タンパク質数: 1382
R. opacus B4株 同定タンパク質数: 3159
K. rhizophila DC2201株 同定タンパク質数: 1446

代謝変化、高性能機能の解析

プロテオーム解析を終了。最終目標を達成。

新規バイオプロセスの実現

- ・新規バイオプロセスにおける菌体の機能・代謝状態データの提供
- ・NBRCによる保存・提供

3. バイオリファイナリー技術の開発

ソフトバイオマス糖化技術の開発

- ・地球環境産業技術研究機構 (RITE)
- ・バイオ・エナジー [平成18～19年度]
- ・月桂冠 [平成18～19年度]
- ・豊田中央研究所 [平成18～19年度]

バイオコンバージョン技術の開発

- ・地球環境産業技術研究機構 (RITE)
- ・東レ

3. バイオリファイナリー技術の開発

共同実施先と研究課題

〔RITE 再委託〕

- ・石川県立大学 熊谷 英彦 教授 「スーパーセルラーゼの創製」
- ・カリフォルニア大学デービス校 Roy H. Doi 教授 (平成18～19年度)
「セルロソーム構造の発現・機能解析」
- ・かずさDNA研究所 大石 道夫 所長
「メタゲノム的手法によるバイオリファイナリー酵素」
- ・北海道大学 横田 篤 教授
「*C. Glutamicum* におけるピルビン酸キナーゼ活性変異株の取得と解析」
- ・東京工業大学 和地 正明 准教授
「コリネ型細菌 *C. Glutamicum* の細胞増殖機構の解析」

〔平成18～19年度〕

- ・東北大学 阿尻 雅文 教授 「環境調和型ソフトバイオマス前処理技術」
- ・神戸大学 福田 秀樹 教授
「酵母によるHTS法の高効率化とセルラーゼの高機能化」
- ・名古屋大学大学院 中野 秀雄 教授
「SIMPLEX法の高効率化と新規スクリーニング法」
- ・神戸大学 近藤 昭彦 教授
「麹菌の組換えタンパク質の分泌生産と高密度培養に関する基盤技術」

バイオマス由来
混合糖
(C6, C5糖)

C₃~C₆化合物の生産システムの構築

- 有機酸(D-乳酸)
- アミノ酸(L-アラニン、バリン)
- 糖アルコール(キシリトール)

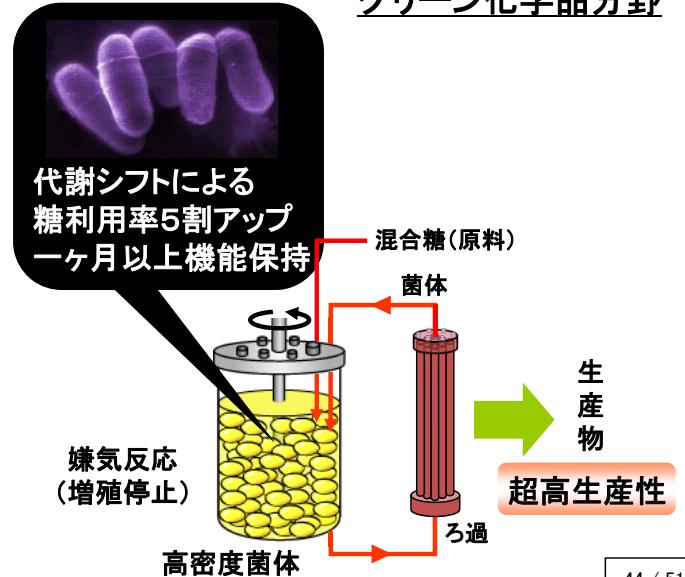
増殖非依存型バイオプロセス
~コリネ型細菌の代謝改変~

工業化研究
民間企業との共同開発

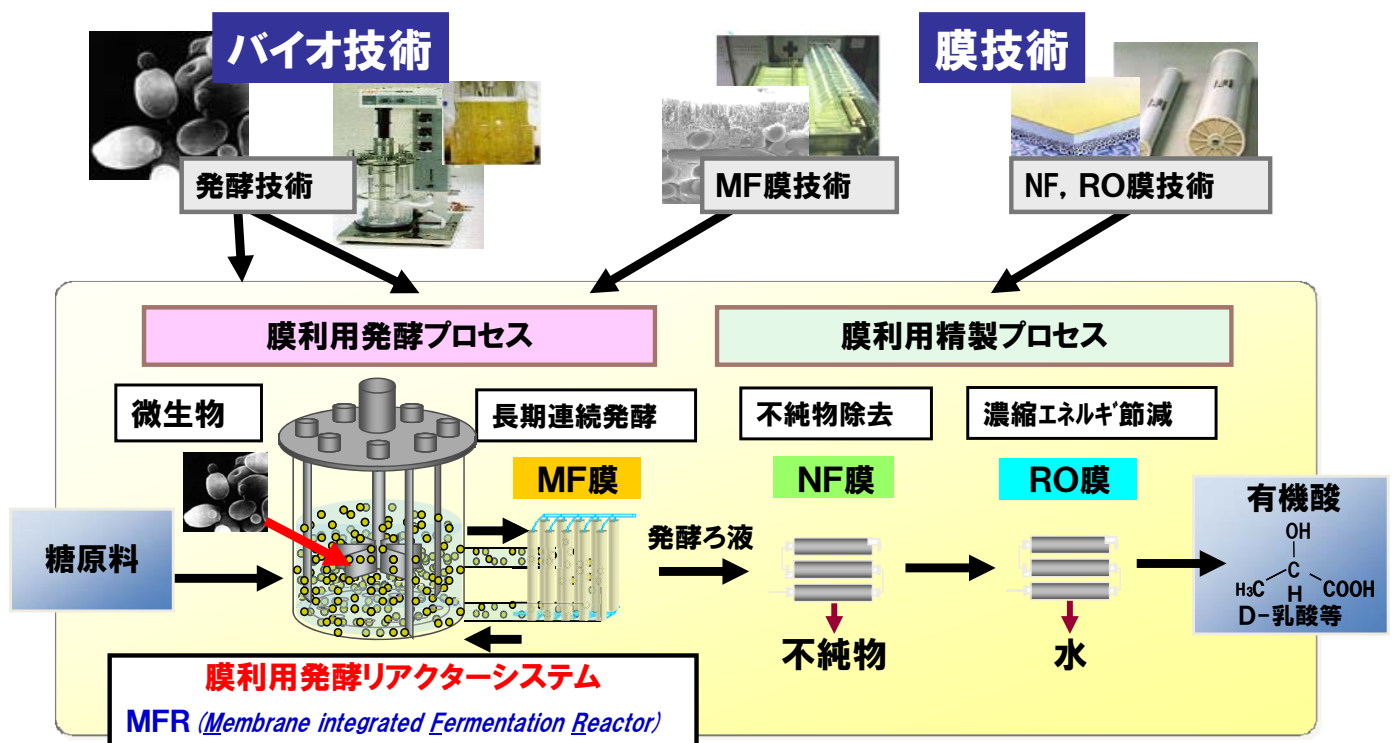
基盤要素技術の確立

グリーン化学品分野

- バイオマス原料有効利用
 - 混合糖(C₆、C₅糖)の完全同時利用
 - “醗酵阻害物質”に対する耐性
- 革新的生産性向上
 - 糖代謝機能の強化
 - 代謝遺伝子発現レベルの最適化
- 細胞機能の統合的解明
 - 糖取り込み・代謝系の解析
 - 遺伝子ネットワークの解析
 - 細胞増殖に関する解析



メンブレン利用高効率発酵システムによる有機酸製造基盤技術(東レ)



微生物分離膜・有機酸分離膜を組み込んだ高効率膜利用発酵・精製プロセスを開発

4.1 主な特許

研究開発項目	国内	外国・PCT
①高性能宿主細胞創製技術	<ul style="list-style-type: none"> ・有用物質製造法 ・工業的有用微生物 ・異種タンパク質の製造法 ・細菌の溶菌抑制方法 	<ul style="list-style-type: none"> ・工業的有用微生物 改変微生物 ・異種タンパク質の製造法 ・乳酸製造法
②微生物反応の多様化・高機能化技術	<ul style="list-style-type: none"> ・新規発現ベクター ・水酸化酵素改良 ・分子シミュレーションプログラム ・新規脱水素酵素 ・酸化還元酵素変異体 	<ul style="list-style-type: none"> ・分子シミュレーションプログラム ・新規脱水素酵素 ・非天然型抗生物質製造方法
③バイオリファイナリー技術	<ul style="list-style-type: none"> ・有機化合物製造方法 ・細菌形質転換体 ・連続発酵による化学品製造方法 	<ul style="list-style-type: none"> ・細菌形質転換体 ・連続発酵による化学品製造方法

4.2 特許、論文、学会発表・プレス発表の実績

研究開発項目	特許 (国内)	特許 (外国)	特許 (PCT)	論文 (査読付)	外部発表等
①高性能宿主細胞創製技術	30	2	7	64	93
②微生物反応の多様化・高機能化技術	14	0	7	140	287
③バイオリファイナリー技術	66	13	12	108	320
合計	111	15	26	312	701

4.3 実用化・事業化の見通しについて(1)

1. 高性能宿主細胞創製技術の開発

協和発酵キリン	<ul style="list-style-type: none"> ・大腸菌DGF染色体縮小化株で物質生産 ・外部へライセンスアウト ・アカデミアのグループへの分与を計画
花王	<ul style="list-style-type: none"> ・枯草菌RGF高機能性宿主細胞でセルラーゼ、プロテアーゼなどの産業用酵素や異種タンパク質の工業生産 ・外部へライセンスアウト
旭硝子	<ul style="list-style-type: none"> ・分裂酵母IGFで異種タンパク質生産受託ビジネス ・外部へライセンスアウト ・公的・民間菌株分譲機関を活用して宿主や周辺ライブラリーを恒久的に保管・分譲

4.4. 実用化・事業化の見通しについて(2)

2. 微生物反応の多様化・高機能化技術の開発

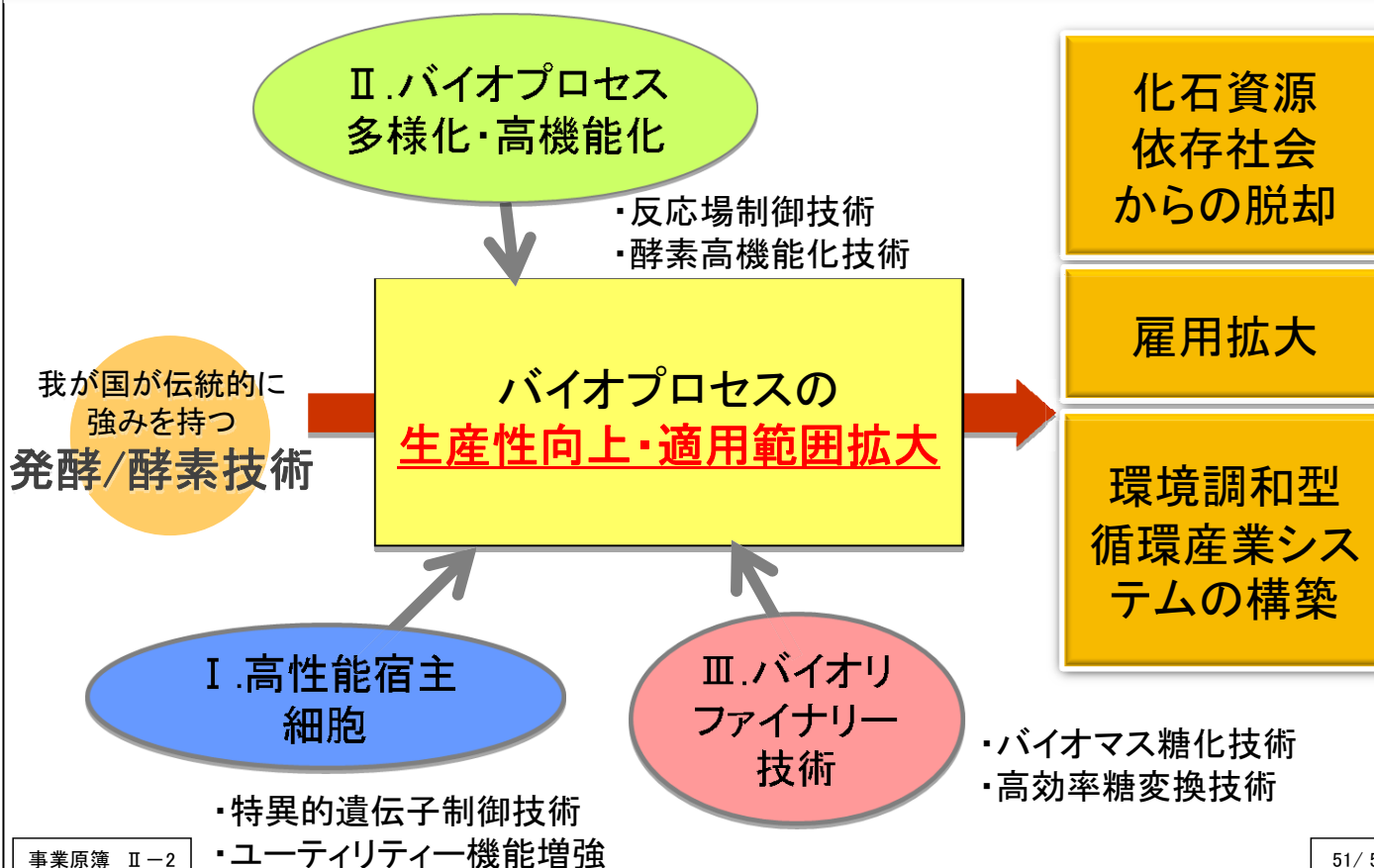
ダイセル化学	<ul style="list-style-type: none"> ・有機溶媒耐性DC2201に各種酵素遺伝子を導入し、有機溶媒反応場で難水溶性化合物を原料にした医薬品中間体等の生産を3~5年後に実用化
メルシャン	<ul style="list-style-type: none"> ・水酸化ビタミンD誘導体の製造 ・独自に保有するP450水酸化酵素遺伝子ライブラリーを活用し、各種有用水酸化化合物の受託製造へ展開
NEC	<ul style="list-style-type: none"> ・抗体、酵素、アプタマーを利用したバイオセンサー(開発中)の高感度化へ利用 ・製薬企業や化学関連企業に向けた解析サービスやコンサルティング事業を展開
カネカ	<ul style="list-style-type: none"> ・非天然アミノ酸生産プロセスなど実用化レベルに達したプロセスをプロジェクト終了後数年以内に工業規模で実用化
明治製菓	<ul style="list-style-type: none"> ・非天然型抗生物質の培養生産について、精製プロセス開発後、3年後以降に生産実用化

4.5 実用化・事業化の見通しについて(3)

3. バイオリファイナリー技術の開発

RITE	<ul style="list-style-type: none"> ・国内企業と、増殖非依存型バイオプロセスによる各種化学品・燃料の工業化研究を実施中。数年以内に実用化予定。
東レ	<ul style="list-style-type: none"> ・膜利用発酵精製システムを有機酸以外へも応用可能な汎用性の高い発酵生産システムとしての展開を検討 ・段階的なスケールアップ実証を行い、実用化・事業化へ

4.6 波及効果について

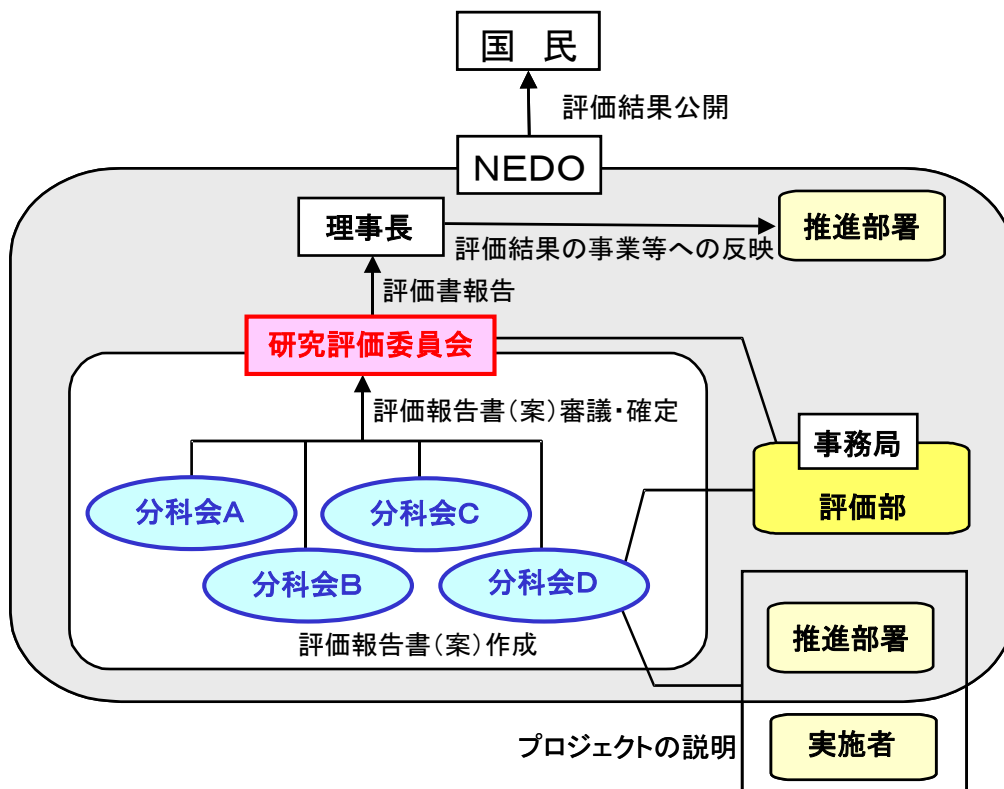


参考資料 1 評価の実施方法

本評価は、「技術評価実施規程」（平成 15 年 10 月制定）に基づいて研究評価を実施する。

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）における研究評価の手順は、以下のように被評価プロジェクトごとに分科会を設置し、同分科会にて研究評価を行い、評価報告書（案）を策定の上、研究評価委員会において確定している。

- 「NEDO 技術委員・技術委員会等規程」に基づき研究評価委員会を設置
- 研究評価委員会はその下に分科会を設置



1. 評価の目的

評価の目的は「技術評価実施規程」において。

- 業務の高度化等の自己改革を促進する
- 社会に対する説明責任を履行するとともに、
経済・社会ニーズを取り込む
- 評価結果を資源配分に反映させ、資源の重点化及び業務の効率化を
促進する

としている。

本評価においては、この趣旨を踏まえ、本事業の意義、研究開発目標・計画の妥当性、計画を比較した達成度、成果の意義、成果の実用化の可能性等について検討・評価した。

2. 評価者

技術評価実施規程に基づき、事業の目的や態様に即した外部の専門家、有識者からなる委員会方式により評価を行う。分科会委員選定に当たっては以下の事項に配慮して行う。

- 科学技術全般に知見のある専門家、有識者
- 当該研究開発の分野の知見を有する専門家
- 研究開発マネジメントの専門家、経済学、環境問題、国際標準、その他社会的ニーズ関連の専門家、有識者
- 産業界の専門家、有識者
- ジャーナリスト

また、評価に対する中立性確保の観点から事業の推進側関係者を選任対象から除外し、また、事前評価の妥当性を判断するとの側面にかんがみ、事前評価に関与していない者を主体とする。

これらに基づき、分科会委員名簿にある7名を選任した。

なお、本分科会の事務局については、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構評価部が担当した。

3. 評価対象

平成18年度に開始された「微生物機能を活用した環境調和型製造基盤技術開発／微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発」プロジェクトを評価対象とした。

なお、分科会においては、当該事業の推進部署から提出された事業原簿、プロジェクトの内容、成果に関する資料をもって評価した。

4. 評価方法

分科会においては、当該事業の推進部署及び研究実施者からのヒアリングと、それを踏まえた分科会委員による評価コメント作成、評点法による評価及び実施者側等との議論等により評価作業を進めた。

なお、評価の透明性確保の観点から、知的財産保護の上で支障が生じると認められる場合等を除き、原則として分科会は公開とし、研究実施者と意見を交換する形で審議を行うこととした。

5. 評価項目・評価基準

分科会においては、次に掲げる「評価項目・評価基準」で評価を行った。これは、研究評価委員会による『各分科会における評価項目・評価基準は、被評価プロジェクトの性格、中間・事後評価の別等に応じて、各分科会において判断すべきものである。』との考え方に従い、第1回分科会において、事務局が、研究評価委員会により示された「標準的評価項目・評価基準」（参考資料1-7頁参照）をもとに改定案を提示し、承認されたものである。

プロジェクト全体に係わる評価においては、主に事業の目的、計画、運営、達成度、成果の意義や実用化への見通し等について評価した。各個別テーマに係る評価については、主にその目標に対する達成度等について評価した。

評価項目・評価基準

1. 事業の位置付け・必要性について

(1) NEDOの事業としての妥当性

- ・ 「環境安心イノベーションプログラム」の目標達成のために寄与しているか。
- ・ 民間活動のみでは改善できないものであること、又は公共性が高いことにより、NEDOの関与が必要とされる事業か。
- ・ 当該事業を実施することによりもたらされる効果が、投じた予算との比較において十分であるか。

(2) 事業目的の妥当性

- ・ 内外の技術開発動向、国際競争力の状況、エネルギー需給動向、市場動向、政策動向、国際貢献の可能性等から見て、事業の目的は妥当か。

2. 研究開発マネジメントについて

(1) 研究開発目標の妥当性

- ・ 内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・ 具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定しているか。
- ・ 目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

(2) 研究開発計画の妥当性

- ・ 目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマ毎の配分を含む）となっているか。
- ・ 目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・ 研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。
- ・ 継続プロジェクトや長期プロジェクトの場合、技術蓄積を、実用化の観点から絞り込んだうえで活用が図られているか。

(3) 研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・ 適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか。
- ・ 真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。
- ・ 全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環

境が整備されているか。

- ・ 目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携が十分に行われる体制となっているか。
- ・ 実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、関与を求める体制を整えているか。

(4) 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性

- ・ 成果の実用化につなげる戦略が明確になっているか。
- ・ 成果の実用化につなげる知財マネジメントの方針が明確に示され、かつ妥当なものか。

(5) 情勢変化への対応等

- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向に機敏かつ適切に対応しているか。
- ・ 計画見直しの方針は一貫しているか（中途半端な計画見直しが研究方針の揺らぎとなっていないか）。計画見直しを適切に実施しているか。

3. 研究開発成果について

(1) 目標の達成度

- ・ 成果は目標値をクリアしているか。
- ・ 全体としての目標達成はどの程度か。
- ・ 目標未達成の場合、目標達成までの課題を把握し、課題解決の方針が明確になっているか。

(2) 成果の意義

- ・ 成果は市場の拡大或いは市場の創造につながることを期待できるか。
- ・ 成果は、世界初あるいは世界最高水準か。
- ・ 成果は、新たな技術領域を開拓することが期待できるか。
- ・ 成果は汎用性があるか。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 成果は、他の競合技術と比較して優位性があるか。

(3) 知的財産権等の取得及び標準化の取組

- ・ 知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、または実用化計画に

沿って国内外に適切に行われているか。

(4)成果の普及

- ・ 論文の発表は、研究内容を踏まえ適切に行われているか。
- ・ 成果の受取手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

4. 実用化の見通しについて

(1)成果の実用化可能性

- ・ 実用化イメージ・出口イメージが明確になっているか。
- ・ 実用化イメージ・出口イメージに基づき、開発の各段階でマイルストーンを明確にしているか。それを踏まえ、引き続き研究開発が行われる見通しは立っているか。

(2)波及効果

- ・ 成果は関連分野への波及効果（技術的・経済的・社会的）を期待できるものか。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果を生じているか。

標準的評価項目・評価基準（事後評価）

2010. 3. 26

【事後評価 標準的評価項目・評価基準の位置付け（基本的考え方）】

標準的評価項目・評価基準は、第25回研究評価委員会（平成22年3月26日付）において以下のとおり定められている。（本文中の記載例による1…、2…、3…、4…が標準的評価項目、それぞれの項目中の(1)…、(2)…が標準的評価基準、それぞれの基準中の…が視点）

ただし、これらの標準的評価項目・評価基準は、研究開発プロジェクトの事後評価における標準的な評価の視点であり、各分科会における評価項目・評価基準は、被評価プロジェクトの性格等に応じて、各分科会において判断すべきものである。

1. 事業の位置付け・必要性について

(1) NEDOの事業としての妥当性

- ・ 特定の施策（プログラム）、制度の下で実施する事業の場合、当該施策・制度の目標達成のために寄与しているか。
- ・ 民間活動のみでは改善できないものであること、又は公共性が高いことにより、NEDOの関与が必要とされる事業か。
- ・ 当該事業を実施することによりもたらされる効果が、投じた予算との比較において十分であるか。

(2) 事業目的の妥当性

- ・ 内外の技術開発動向、国際競争力の状況、エネルギー需給動向、市場動向、政策動向、国際貢献の可能性等から見て、事業の目的は妥当か。

2. 研究開発マネジメントについて

(1) 研究開発目標の妥当性

- ・ 内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・ 具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定しているか。
- ・ 目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

(2)研究開発計画の妥当性

- ・ 目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマ毎の配分を含む）となっているか。
- ・ 目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・ 研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。
- ・ 継続プロジェクトや長期プロジェクトの場合、技術蓄積を、実用化の観点から絞り込んだうえで活用が図られているか。

(3)研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・ 適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか。
- ・ 真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。
- ・ 研究管理法人を経由する場合、研究管理法人が真に必要な役割を担っているか。
- ・ 全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環境が整備されているか。
- ・ 目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携 and/or 競争が十分に行われる体制となっているか。
- ・ 実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、関与を求める体制を整えているか。

(4) 研究開発成果の実用化、事業化に向けたマネジメントの妥当性

- ・ 成果の実用化、事業化につなげる戦略が明確になっているか。
- ・ 成果の実用化、事業化につなげる知財マネジメントの方針が明確に示され、かつ妥当なものか。

(5)情勢変化への対応等

- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向に機敏かつ適切に対応しているか。
- ・ 計画見直しの方針は一貫しているか（中途半端な計画見直しが研究方針の揺らぎとなっていないか）。計画見直しを適切に実施しているか。

3. 研究開発成果について

(1)目標の達成度

- ・ 成果は目標値をクリアしているか。（※）

（※事後評価前倒し実施の場合は、「成果は目標値をクリアする見込みか。」）

- ・ 全体としての目標達成はどの程度か。
- ・ 目標未達成の場合、目標達成までの課題を把握し、課題解決の方針が明確になっているか。

(2)成果の意義

- ・ 成果は市場の拡大或いは市場の創造につながる事が期待できるか。
- ・ 成果は、世界初あるいは世界最高水準か。
- ・ 成果は、新たな技術領域を開拓する事が期待できるか。
- ・ 成果は汎用性があるか。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 成果は、他の競合技術と比較して優位性があるか。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

- ・ 知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、または実用化計画に沿って国内外に適切に行われているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、得られた研究開発の成果に基づく国際標準化に向けた提案等の取組が適切に行われているか。

(4)成果の普及

- ・ 論文の発表は、研究内容を踏まえ適切に行われているか。
- ・ 成果の受取手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

4. 実用化、事業化の見通しについて

(1)成果の実用化可能性

- ・ 産業技術としての見極め（適用可能性の明確化）ができているか。
- ・ 実用化に向けて課題が明確になっているか。課題解決の方針が明確になっているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、国際規格化等、標準整備に向けた見通しが得られているか。

(2)事業化までのシナリオ

- ・ N E D O 後継プロジェクト、N E D O 実用化助成、企業内研究等、プロジェクト終了後の事業化までの道筋は明確か。
- ・ 市場の規模や成長性、コストダウン、競合技術との比較、導入普及、事業化までの期間、事業化とそれに伴う経済効果等の見通しは立っているか。

(3)波及効果

- ・ 成果は関連分野への波及効果（技術的・経済的・社会的）を期待できるものか。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果を生じているか。

※基礎的・基盤的研究及び知的基盤・標準整備等の研究開発の場合は、以下の項目・基準による。

*基礎的・基盤的研究開発の場合

2. 研究開発マネジメントについて

(1)研究開発目標の妥当性

- ・ 内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・ 具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定しているか。
- ・ 目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

(2)研究開発計画の妥当性

- ・ 目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマ毎の配分を含む）となっているか。
- ・ 目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・ 研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。
- ・ 継続プロジェクトや長期プロジェクトの場合、技術蓄積を、実用化の観点から絞り込んだうえで活用が図られているか。

(3)研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・ 適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか。
- ・ 真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。
- ・ 研究管理法人を経由する場合、研究管理法人が真に必要な役割を担っているか。
- ・ 全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環境が整備されているか。
- ・ 目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携 and/or 競争が十分に行われる体制となっているか。
- ・ 実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、関与を求める体制を整えているか。

(4) 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性

- ・ 成果の実用化につなげる戦略が明確になっているか。
- ・ 成果の実用化につなげる知財マネジメントの方針が明確に示され、かつ妥当なものか。

(5)情勢変化への対応等

- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向に機敏かつ適切に対応しているか。
- ・ 計画見直しの方針は一貫しているか（中途半端な計画見直しが研究方針の揺らぎとなっていないか）。計画見直しを適切に実施しているか。

3. 研究開発成果について

(1)目標の達成度

- ・ 成果は目標値をクリアしているか。（※）
（※事後評価前倒し実施の場合は、「成果は目標値をクリアする見込みか。」）
- ・ 全体としての目標達成はどの程度か。
- ・ 目標未達成の場合、目標達成までの課題を把握し、課題解決の方針が明確になっているか。

(2)成果の意義

- ・ 成果は市場の拡大或いは市場の創造につながる事が期待できるか。
- ・ 成果は、世界初あるいは世界最高水準か。
- ・ 成果は、新たな技術領域を開拓することが期待できるか。
- ・ 成果は汎用性があるか。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 成果は、他の競合技術と比較して優位性があるか。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

- ・ 知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、または実用化計画に沿って国内外に適切に行われているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、得られた研究開発の成果に基づく国際標準化に向けた提案等の取組が適切に行われているか。

(4)成果の普及

- ・ 論文の発表は、研究内容を踏まえ適切に行われているか。
- ・ 成果の受取手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

4. 実用化の見通しについて

(1)成果の実用化可能性

- ・ 実用化イメージ・出口イメージが明確になっているか。
- ・ 実用化イメージ・出口イメージに基づき、開発の各段階でマイルストーンを明確にしているか。それを踏まえ、引き続き研究開発が行われる見通しは立っているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、国際規格化等、標準整備に向けた見通しが得られているか。

(2)波及効果

- ・ 成果は関連分野への波及効果（技術的・経済的・社会的）を期待できるものか。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果を生じているか。

* 知的基盤・標準整備等の研究開発の場合

2. 研究開発マネジメントについて

(1)研究開発目標の妥当性

- ・ 内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・ 具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定しているか。
- ・ 目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

(2)研究開発計画の妥当性

- ・ 目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマ毎の配分を含む）となっているか。
- ・ 目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・ 研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。
- ・ 継続プロジェクトや長期プロジェクトの場合、技術蓄積を、実用化の観点から絞り込んだうえで活用が図られているか。

(3)研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・ 適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか。
- ・ 真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。
- ・ 研究管理法人を経由する場合、研究管理法人が真に必要な役割を担っているか。

るか。

- ・ 全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環境が整備されているか。
- ・ 目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携 and/or 競争が十分に行われる体制となっているか。
- ・ 実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、関与を求める体制を整えているか。

(4) 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性

- ・ 成果の実用化につなげる戦略が明確になっているか。
- ・ 成果の実用化につなげる知財マネジメントの方針が明確に示され、かつ妥当なものか。

(5) 情勢変化への対応等

- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向に機敏かつ適切に対応しているか。
- ・ 計画見直しの方針は一貫しているか（中途半端な計画見直しが研究方針の揺らぎとなっていないか）。計画見直しを適切に実施しているか。

3. 研究開発成果について

(1) 目標の達成度

- ・ 成果は目標値をクリアしているか。（※）
（※事後評価前倒し実施の場合は、「成果は目標値をクリアする見込みか。」）
- ・ 全体としての目標達成はどの程度か。
- ・ 目標未達成の場合、目標達成までの課題を把握し、課題解決の方針が明確になっているか。

(2) 成果の意義

- ・ 成果は市場の拡大或いは市場の創造につながることが期待できるか。
- ・ 成果は、世界初あるいは世界最高水準か。
- ・ 成果は、新たな技術領域を開拓することが期待できるか。
- ・ 成果は汎用性があるか。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 成果は公開性が確保されているか。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

- ・ 研究内容に新規性がある場合、知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、または実用化計画に沿って国内外に適切に行われているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、得られた研究開発の成果に基づく国際標準化に向けた提案等の取組が適切に行われているか。

(4)成果の普及

- ・ 論文の発表は、研究内容を踏まえ適切に行われているか。
- ・ 成果の受取手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

4. 実用化の見通しについて

(1)成果の実用化可能性

- ・ 整備した知的基盤についての利用は実際にあるか、その見通しが得られているか。
- ・ 公共財として知的基盤を供給、維持するための体制は整備されているか、その見込みはあるか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、国際規格化等、標準整備に向けた見通しが得られているか。
- ・ J I S化、標準整備に向けた見通しが得られているか。注）国内標準に限る
- ・ 一般向け広報は積極的になされているか。

(2)波及効果

- ・ 成果は関連分野への波及効果（技術的・経済的・社会的）を期待できるものか。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果を生じているか。

参考資料 2 評価に係る被評価者意見

研究評価委員会（分科会）は、評価結果を確定するにあたり、あらかじめ当該実施者に対して評価結果を示し、その内容が、事実関係から正確性を欠くなどの意見がある場合に、補足説明、反論などの意見を求めた。研究評価委員会（分科会）では、意見があったものに対し、必要に応じて評価結果を修正の上、最終的な評価結果を確定した。

評価結果に対する被評価者意見は全て反映された。

本研究評価委員会報告は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）評価部が委員会の事務局として編集しています。

平成23年10月

NEDO 評価部

部長 竹下 満

主幹 三上 強

担当 梶田 保之

* 研究評価委員会に関する情報は NEDO のホームページに掲載しています。

(http://www.nedo.go.jp/introducing/iinkai/kenkyuu_index.html)

〒212-8554 神奈川県川崎市幸区大宮町1310番地

ミュージア川崎セントラルタワー20F

TEL 044-520-5161 FAX 044-520-5162