

平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書

◆記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字	SHIMIZU SAKAYU					
①研究代表者氏名	清水 昌		②所属研究機関・部局・職		京都大学・農学研究科・教授	
③研究課題名	和文	汎用型不斉還元酵素モジュールの開発とキラルアルコール生産システムへの応用				
	英文	Novel multi-purpose bioreduction system for the large-scale production of chiral alcohols				
④研究経費 金額単位：千円	平成13年度	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	総合計
	29,000	25,700	15,700	13,400	11,100	94,900
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
清水 昌	京都大学・農学研究科・教授	応用微生物学	カルボニル還元酵素と補酵素再生系酵素の探索と全体総括			
片岡 道彦	京都大学・農学研究科・助教授	応用微生物学	カルボニル還元酵素と補酵素再生系酵素の探索			
小川 順	京都大学・農学研究科・助手	応用微生物学	カルボニル還元酵素の探索と共発現系の改良			
喜多 恵子	京都大学・農学研究科・教授	分子生物学	カルボニル還元酵素遺伝子のクローニングと共発現系の改良			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）						
<p>近年、キラル化合物の需要は年々高まってきており、特に医薬品開発においては、キラル化合物の分析、解析およびその生産が世界的に必須なものとなってきている。このような情勢の中、いかに必要とするキラル化合物を創るかという問題は最も基本的な課題であり、これに関しては微生物、酵素、不斉合成、あるいはその組み合わせによる研究開発が盛んに行われている。これらの試みはいずれもそれぞれの長所・短所を有しており、その生産背景あるいは需要背景により、いずれが優れているとは決めがたく、また、お互いに深く関連していることもあり、万能な方法は存在しない。しかしながら、これらのうち光学的に純粋な合成ユニット（キラルビルディングブロック）を出発原料として目的物へ変換する方法は一般的であり、また効果的であるため古くから行われてきた重要な方法である。特に、キラルアルコール類はキラルビルディングブロックとして利用価値の非常に高い化合物である。</p> <p>本研究では、様々なキラルアルコール類の生産プロセスに利用可能な「汎用型不斉還元酵素モジュール」の開発を目的に、我々の見出したカルボニル還元酵素に関する酵素化学的情報および遺伝子情報をもとに不斉還元システムの構築を行っていく。具体的には、1) カルボニル還元酵素類の酵素化学的解析とキラルアルコール類生産への応用に関する評価、2) カルボニル還元酵素の遺伝子情報の解析、3) カルボニル還元酵素の大量発現系の構築、4) 補酵素再生系酵素の探索と検討、5) カルボニル還元酵素遺伝子および補酵素再生系酵素遺伝子の共発現微生物の育種、6) 遺伝子組換え共発現微生物による還元システムの構築、7) 汎用型還元酵素モジュールの構築、8) 実用生産レベルでの検討などを進めていく予定である。すなわち、スクリーニングによる新規で本質的に優れた特性の酵素を生産する微生物の開拓を行い、遺伝子組換え技術を応用し反応に必要な酵素のみを大量発現させた宿主菌体そのものを直接接触媒として用いる方法を試みる。そして、これらの酵素をモジュールとして取り揃え、それぞれの合成に必要な酵素のみを宿主にはめ込むことで、種々のキラルアルコール類の生産に対応できる汎用性の高い効率的生産システムの開発を目指す。</p>						

⑦研究成果の概要 (研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、簡潔に記入してください。)

本研究では、様々なキラルアルコール類の生産プロセスに利用可能な「汎用型不斉還元酵素モジュール」の開発を目的に、各種カルボニル還元酵素に関する酵素化学的情報および遺伝子情報をもとに効率的な不斉還元システムの構築を目指して研究を進めてきた。

1. カルボニル還元酵素の探索と機能解析：汎用型の還元酵素モジュールを構築していく上で最も重要な点のひとつとして、基質特異性・立体選択性において多種多様なカルボニル還元酵素を取り揃える必要がある。精力的なスクリーニングにより、25種類の異なるカルボニル還元酵素を見出すことに成功している。アルドケト還元酵素ファミリー、短鎖アルコール脱水素酵素／還元酵素ファミリー、ジヒドロフラボノール還元酵素ファミリー、中鎖アルコール脱水素酵素／還元酵素ファミリーなど、様々なファミリーに属するものであり、同じファミリーに分類されるものの中でも基質特異性や立体選択性が異なるものもある。*Rhodococcus erythropolis*に見出されたアミノアルコール脱水素酵素は、2位にアミノ基を有するカルボニル化合物に特異的に作用するが、このときカルボニル基の立体特異的還元だけでなく、アミノ基の立体配置をも認識する。このため、ジアステレオ選択的にキラルアルコールを生産することができる。例えば、ラセミ体のアミノケトン体基質からの α -ブソイドエフェドリン合成に利用できる。また、*Candida parapsilosis*からは、2種の共役ポリケトン還元酵素が得られている。これらは、アルドケト還元酵素ファミリーに属する酵素であるにもかかわらず、*p*-ニトロベンズアルデヒドなどの典型的なアルドケト還元酵素の基質を還元することができないことがわかっている。

2. カルボニル還元酵素の遺伝子クローニングと構造解析：スクリーニングにより見出された25種類の各種カルボニル還元酵素に関して遺伝子のクローニングを行い、15種類について塩基配列の決定に成功している。*Candida parapsilosis*の2種の共役ポリケトン還元酵素は、遺伝子の配列からも上述のようにアルドケト還元酵素ファミリーに属する酵素であることが判明した。しかし、その活性中心と考えられる領域は、通常アルドケト還元酵素ファミリーのもつ共通配列とは異なることがわかった。また、*Candida macedoniensis*の生産するカルボニル還元酵素の遺伝子解析の結果、本酵素はジヒドロフラボノール還元酵素ファミリーに属する酵素であり、これまで報告されている配列との比較から補酵素結合部位も保存されていた。本酵素は、イサチンやケトパントラクトンといった共役ポリケトン類やケトパントテン酸エステル類等に広く作用するカルボニル還元酵素であり、様々なキラルアルコールの生産プロセスへの応用が期待できる。さらに、*Rhodococcus erythropolis*のアミノアルコール脱水素酵素の遺伝子クローニングを行い、塩基配列・推定アミノ酸配列の解析から短鎖アルコール脱水素酵素／還元酵素ファミリーに属する酵素であることが判明した。また、残りの10種類の酵素についても、遺伝子クローニングの途上であり、おおよそ成功しつつある。

3. カルボニル還元酵素の大量発現：塩基配列の決定に成功した15種類の還元酵素について、大腸菌での大量発現系の構築を行った。各種プロモーターを有するプラスミドベクターのプロモーター下流に、各酵素遺伝子を挿入し、組換えプラスミドを構築した。これらの組換えプラスミドを用いて大腸菌を形質転換し、各酵素遺伝子の大量発現菌株を得ることに成功している。また、いくつかの酵素については*Rhodococcus*や*Pichia*などでの発現系を用いる大量発現も試みた。

4. 補酵素再生系酵素の探索：補酵素再生系酵素としては、*Bacillus*由来のグルコース脱水素酵素以外のものの探索を行った。副生物として容易に取り除ける炭酸ガスが生成する酵素、蟻酸脱水素酵素のスクリーニングを行った結果、*Ancylobacter aquaticus*より、NAD依存性の蟻酸脱水素酵素を見出した。また、高度好熱菌*Sulfolobus tokodaii*のグルコース脱水素酵素遺伝子を利用する試みも行った。現在のところ*Bacillus*由来のグルコース脱水素酵素が最も効率的であることが明らかとなっている。

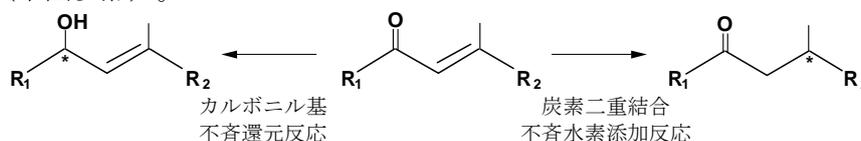
5. カルボニル還元酵素・補酵素再生系酵素遺伝子共発現システムのライブラリー化：大腸菌での大量発現に成功しているカルボニル還元酵素15種に関して、補酵素再生系酵素であるグルコース脱水素酵素遺伝子との大腸菌内における共発現システムの構築を行った。それぞれの共発現大腸菌において、酵素活性が最も高く得られる培養条件や菌体処理条件の検討を行った。また、菌体の触媒としての保存条件の検討も行った。これらの検討により、不斉還元触媒として利用できる汎用型の生体触媒ライブラリーの構築に成功した。実際に、これらの菌体を触媒として、いくつかの基質への反応性を検討し、反応性や立体選択性の指標となる結果を得ている。今後は、この不斉還元酵素触媒ライブラリーを用いて、ニーズに即した利用の仕方を検討していく。

⑧特記事項 (この研究において得られた独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、当該研究分野及び関連研究分野への影響等、特記すべき事項があれば記入してください。)

これまでの研究により、25種類のカルボニル還元酵素を見出すことに成功している。いずれの酵素も新規な酵素であり、基質特異性、立体選択性においてそれぞれ異なっていることが明らかとなっている。また、これらの酵素に関する遺伝子クローニング、大量発現系の構築についても、現在のところ15種類について成功しており、今後の研究により、さらに種類が増えていくものと思う。現在ある15種類のカルボニル還元酵素遺伝子に関しては、補酵素再生系酵素遺伝子との共発現菌体を調製し、ライブラリー化に成功している。本研究の目的である「汎用型不斉還元酵素モジュール」の構築はほぼ成功したと見ている。

これまで発見したカルボニル還元酵素の中で、特に注目すべきものは *Rhodococcus erythropolis* の生産するアミノアルコール脱水素酵素である。本酵素は、2位にアミノ基を有するカルボニル化合物に対して作用するが、このときアミノ基の立体配座を認識しながら、カルボニル基の不斉還元を行う。この反応によりラセミ体のアミノカルボニル基質から、4種ある立体異性体のうちジアステレオ選択的に1種類のみが生成する。この反応は、応用面の新規性だけでなく、酵素反応機構等の基礎生化学的な面からも研究対象として非常に興味を持たれる酵素である。また、本酵素はアミノアルコール類により強く誘導されることがわかっている。誘導機構の解明・アミノアルコール代謝系の解析等についても研究が進められるべき存在である。さらに、アミノアルコール類の立体選択的生産に有効なカルボニル還元酵素を新たに探索し、いくつかの菌株を見出している。将来的には、4種ある立体異性体のいずれも生産できるものと期待している。

本研究の当初の目的としては、カルボニル還元酵素と補酵素再生系酵素を共役させて、プロキラルなカルボニル化合物をキラルアルコールに変換するプロセスのみを想定していた。しかし、様々なカルボニル化合物を基質として、カルボニル還元酵素のスクリーニングを行っている途上、ある種のエノン化合物を基質にした場合、カルボニル基の還元反応だけでなく、炭素二重結合の不斉水素添加も見られることがわかった(下図参照)。



そこで、炭素二重結合不斉水素添加反応を触媒する酵素の精製・単離を行い、基質特異性、アミノ酸1次構造等の解析を行ったところ、「旧黄色酵素」の一種であることが判明した。旧黄色酵素は、フラビン酵素として70年以上前に初めて報告された酵素であり、酵素化学的、タンパク質化学的な基礎研究は大変多くなされてきている。しかし、今回我々が見出したようなキラル化合物の合成に利用できるといった報告は全くなかったことから、フラビン酵素の基礎研究においても非常に強いインパクトを与えている。さらに、本研究の目的である補酵素再生系酵素との共役による物質生産という面から考えると、この共役システムはカルボニル不斉還元反応だけでなく、NADHあるいはNADPHといった還元型補酵素を要求する数多くの酸化還元酵素にも適用可能であることを示している。すなわち、本システムがより幅広く応用できる可能性を示したことになる。実際、旧黄色酵素遺伝子と補酵素再生系酵素(グルコース脱水素酵素)遺伝子を同時発現させた大腸菌を触媒とすることにより、効率的に炭素二重結合不斉水素添加反応を行うことに成功している。このことから、本システムには、旧黄色酵素以外の炭素二重結合不斉水素添加酵素やモノオキシゲナーゼ反応等、様々な種類の酸化還元酵素を当てはめることにより非常に幅広いキラル化合物の生産に応用できるものと考えられる。その意味から、現在ゲノム配列が明らかとなっている微生物からの旧黄色酵素遺伝子ライブラリーの構築に着手している。カルボニル還元酵素と同様に、炭素二重結合不斉水素添加触媒モジュールの構築も近い将来可能と考えている。

本不斉カルボニル還元システムの応用例としては、研究協力者の長谷川淳三が所属する(株)カネカにおいて、キラルアルコールの1種である(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルの生産が開始されている。現在、年間約数十トンの規模で生産が続けられている。このことは、本システムが実際のキラルアルコール生産に利用可能であるということを十分に証明している。また、NADHやNAPDH等の補酵素を必要とする酸化還元酵素を利用した物質生産プロセスの中で初めて工業化された例として世界的にも注目を集めている。さらに、公表の段階ではないが、他の数社において本システムを利用したキラルアルコールの生産が実用化されつつある。

- ⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

発表論文

Hidalgo, A.-R. G. D., M. A. Akond, K. Kita, M. Kataoka and S. Shimizu. Isolation and primary structural analysis of two conjugated polyketone reductases from *Candida parapsilosis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65** (12), 2785-2788 (2001).

Kataoka, M., M. Sasaki, A.-R. G. D. Hidalgo, M. Nakano and S. Shimizu. Glycolic acid production using ethylene glycol-oxidizing microorganisms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65** (10), 2265-2270 (2001).

- Kizaki, N., Y. Yasohara, J. Hasegawa, M. Wada, M. Kataoka and S. Shimizu. Synthesis of optically pure ethyl (*S*)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by *Escherichia coli* transformant cells coexpressing the carbonyl reductase and glucose dehydrogenase genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**, 590-595 (2001).

清水 昌. 微生物生産の将来を囑望する、「高分子科学とバイオテクノロジーとのキャッチボール-21世紀における高分子とバイオテクノロジーの融合とその将来-」社団法人高分子学会編、エヌ・ティー・エス、東京、pp. 47-64 (2001).

清水 昌. 生体触媒とバイオプロセス・スーパー生体触媒の探索と開発. 触媒. **43**, 190-195 (2001).

Shimizu, S. Vitamins and related compounds: microbial production. *Biotechnology*, vol. 10, Reed, G., Rehm, H.-J., eds., VCH, Weinheim, 320-340 (2001).

清水 昌、小林達彦、片岡道彦、小川 順. アクリルアミド発酵、アデノシルホモシステイン発酵、アデノシルメチオニン発酵、カプロン酸発酵、グリセロール発酵、CoA発酵、多価不飽和脂肪酸発酵、ニコチンアミド発酵、D-パントラクトン発酵、「発酵ハンドブック」柄倉辰六郎、山田秀明、別府輝彦、左右田健次監修、共立出版、東京、pp. 7-9, 26, 27, 112, 127-128, 161-162, 267-271, 313, 325-326, 660-661 (2001).

Yasohara, Y., N. Kizaki, J. Hasegawa, M. Wada, M. Kataoka and S. Shimizu. Stereoselective reduction of alkyl 3-oxobutanoate by carbonyl reductase from *Candida magnoliae*. *Tetrahedron: Asymmetry*, **12**, 1713-1718 (2001).

Yoshizumi, A., M. Wada, H. Takagi, S. Shimizu and S. Nakamori. Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding monovalent cation-activated Levodione reductase from *Corynebacterium aquaticum* M-13. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65** (4), 830-836 (2001).

本田孝祐、片岡道彦、清水 昌. 化学品の製造に有用な生体触媒の探索と開発. ケミカルエンジニアリング, **47** (5), 345-351 (2002).

Kataoka, M., A. Kotaka, A. Hasegawa, M. Wada, A. Yoshizumi, S. Nakamori, S. Shimizu. Old yellow enzyme from *Candida macedoniensis* catalyzes stereospecific reduction of C=C bond of ketoisophorone. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66** (12), 2651-2657 (2002).

Ogawa, J., S. Shimizu. Industrial microbial enzymes: their discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in Japan. *Curr. Opinion Biotechnol.*, **13**, 367-375 (2002).

Ogawa, J., W. T. Sulistyaningdyah, H. Tanaka, K. Kano, T. Ikeda, S. Shimizu. Bilirubin dehydrogenase, an enzyme in *Aspergillus ochraceus* IB-3 useful for diagnostic measurement of Bilirubin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66** (11), 2376-2381 (2002).

清水 昌. 第1章 第4編 4. 物質生産のための生体触媒の探索と開発. 微生物利用の大展開 (今中忠行監修), エヌ・ティー・エス, 東京, pp. 964-969 (2002).

八十原良彦、長谷川淳三、清水 昌: 酵素法による高効率カルボニル不斉還元システムの構築と実用化. バイオサイエンスとインダストリー, **60** (9), 604-605 (2002).

Honda, K., M. Kataoka, E. Sakuradani, S. Shimizu. Role of *Acinetobacter calcoaceticus* 3,4-dihydrocoumarin hydrolase in oxidative stress defence against peroxyacids. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 486-494 (2003).

- ⑨研究成果の発表状況(続き) (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付けてください。)
- Kataoka, M., K. Kita, M. Wada, Y. Yasohara, J. Hasagawa, S. Shimizu, Novel bioreduction system for the production of chiral alcohols. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **62** (5-6), 437-445 (2003).
- 水上 透, 清水 昌: バイオプロセスの構造改革を目指して. バイオサイエンスとインダストリー, **61** (11), 735-738 (2003).
- 清水 昌. ビタミン研究のブレークスルー: 「パントテン酸」(I) (1) パントテン酸およびコエンチムAの生合成と製造に関する研究の展開. ビタミン, **77** (2), 95-99 (2003).
- 清水 昌. 微生物によるビタミン類の生産に関する基盤的研究. ビタミン, **77** (3), 131-145 (2003).
- Sogabe, S., A. Yoshizumi, T.A. Fukami, Y. Shiratori, S. Shimizu, H. Takagi, S. Nakamori, M. Wada. The crystal structure and stereospecificity of levodione reductase from *Corynebacterium aquaticum* M-13. *J. Biol. Chem.*, **278** (21), 19387-95 (2003).
- Wada, M., A. Yoshizumi, Y. Noda, M. Kataoka, S. Shimizu, H. Takagi, S. Nakamori. Production of a doubly chiral compound, (4*R*,6*R*)-4-hydroxy-2,2,6-trimethylcyclohexanone, by two-step enzymatic asymmetric reduction. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69** (2), 933-937 (2003).
- Delacruz-Hidalgo, A.-R. G., M. Kataoka, S. Shimizu. Biochemical and applied studies of microbial oxidoreductases. 応用微生物学研究, **2** (1), 39-46 (2004).
- Kataoka, M., A.-R. Delacruz-Hidalgo, M.A. Akond, E. Sakuradani, K. Kita, S. Shimizu. Gene cloning and overexpression of two conjugated polyketone reductases, novel aldo-keto reductase family enzymes, of *Candida parapsilosis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64** (3), 359-366 (2004).
- Kataoka, M., A. Kotaka, R. Thiwthong, M. Wada, S. Nakamori, S. Shimizu. Cloning and overexpression of the old yellow enzyme gene of *Candida macedoniensis*, and its application to the production of a chiral compound. *J. Biotechnol.*, **114** (1-2), 1-9 (2004).
- Ogawa, J., S. Shimizu. Enzymes. Bioprocesses and Biotechnology for Functional Foods and Nutraceuticals, ed. by J.-R. Neese, J. Bruce German, Marcel Dekker, New York-Basel, pp.197-205 (2004).
- 清水 昌. 有用物質生産のための微生物プロセスの開発に関する基盤的研究. 農化誌, **78** (1), 4-13 (2004).
- 清水 昌. 第VI部生物工場へのアプローチ(第11章) 微生物工場- 暮らしに役立つ微生物の話. 京大人気講義シリーズバイオサイエンスの新戦略- 京都大学農学部編-, 丸善, pp.146-160 (2004).
- Sulistyaningdyah, W.T., J. Ogawa, H. Tanaka, C. Maeda, S. Shimizu. Characterization of alkaliphilic laccase activity in the culture supernatant of *Myrothecium verrucaria* 24G-4 in comparison with bilirubin oxidase. *FEMS Microbiol. Lett.*, **230** (2), 209-214 (2004).
- Sulistyaningdyah, W.T., J. Ogawa, Q.S. Li, R. Shinkyo, T. Sakaki, K. Inouye, R.D. Schmid, S. Shimizu. Metabolism of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins by cytochrome P450 BM-3 and its mutant. *Biotechnol. Lett.*, **26** (24), 1857-1860 (2004).
- Honda, K., H. Tsuboi, T. Minetoki, H. Nose, K. Sakamoto, M. Kataoka, S. Shimizu. Expression of the *Fusarium oxysporum* lactonase gene in *Aspergillus oryzae* -molecular properties of the recombinant enzyme and its application-. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **66** (5), 520-526 (2005).
- Ishige, T., K. Honda, S. Shimizu. Whole organism biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **9** (2), 174-180 (2005).
- Li, Q.S., J. Ogawa, R.D. Schmid, S. Shimizu. Indole hydroxylation by bacterial cytochrome P450 BM-3 and modulation of activity by cumene hydroperoxide. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **69** (2), 293-300 (2005).
- Ogawa, J, S. Kishino, A. Ando, S. Sugimoto, K. Mihara, S. Shimizu. Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *J. Biosci. Bioeng.*, **100** (4), 355-364 (2005).

⑨研究成果の発表状況(続き) (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

Ogawa, J., S. Shimizu. Screening for Unique Microbial Reactions Useful for Industrial Applications. Handbook of Industrial Biocatalysis, ed. by Ching T. Hou, Taylor & Francis, Boca Raton, pp.2-1-2-21(2005).

Sulistyaningdyah, W.T., J. Ogawa, Q.-S. Li, C. Maeda, Y. Yano, R.D. Schmid, S. Shimizu. Hydroxylation activity of P450 BM-3 mutant F87V towards aromatic compounds and its application to the synthesis of hydroquinone derivatives from phenolic compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **67** (4), 556-562 (2005).

Kataoka, M., A. Hoshino-Hasegawa, R. Thiwthong, N. Higuchi, T. Ishige, S. Shimizu. Gene cloning of an NADPH-dependent menadione reductase from *Candida macedoniensis*, and its application to chiral alcohol production. *Enzyme Microb. Technol.*, **38**, 944-951 (2006).

Honda, K., T. Ishige, S. Shimizu. Microbial and enzymatic processes for the production of chiral compounds. Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnological Industries (ed by R.T. Patel), Marcel Dekker, New York, in press (2006)

片岡道彦, 清水 昌. 旧黄色酵素の再発見: 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, 印刷中 (2006).

国際会議発表 (いずれも研究代表者が招待講演を行ったもの)

Shimizu, S. "Production of Useful Chemicals by Microbial and Enzymatic Processes", 4th International Symposium on Green Chemistry in China, China (2001)

Shimizu, S. "Construction of a novel bioreduction system for the synthesis of chiral alcohols", The 11th German-Japanese Workshop on Enzyme Technology, Germany (2001)

Shimizu, S. "Industrial Biocatalysis -The Asian View from Academia- Microbial Enzymes: New Industrial Applications from Traditional Screening Methods", Enzyme Engineering Conference XVI, Germany (2001)

Shimizu, S. "Novel bioreduction system for the large-scale production of chiral alcohols", Japan-Italy Symposium New Trends in Enzyme Science and Technology, Kyoto (2001)

Shimizu, S., M. Kataoka. "Construction of a Novel Bioreduction System for large-scale Production of Chiral Alcohols", 9th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, Korea (2002)

Shimizu, S., M. Kataoka. "A Novel Biocatalytic Reduction System for Large-scale Production of Chiral Alcohols", International Congress on Biocatalysis "biocat2002", Germany (2002)

Hasegawa, J., Y. Yasohara, N. Kizakim S. Takahashi, M. Wada, M. Kataoka, S. Shimizu. "Novel Bioreduction System for Large-scale Synthesis of Optically Active Alcohols", The 8th Japanese-Swiss Joint Meeting on Bioprocess Development, Takayama (2002)

Shimizu, S., M. Kataoka. "The novel reductases catalyzing the stereospecific reduction of C=C and C=O bonds, and their application", Italy-Japan Symposium New Trends in Enzyme Science and Technology, Italy (2003)

Shimizu, S., M. Kataoka. "Lactonase and carbonyl reductases useful for large-scale production of chiral alcohols", BioCat2003, Spain, (2003)

Shimizu, S., M. Kataoka, K. Honda. "Microbial lactonases: Screening and application to the large-scale production of chiral alcohols", biocat2004, Germany (2004)

Shimizu, S., M. Kataoka, J. Ogawa. "Screening and development of unique microbial reactions useful for large-scale production of chiral compounds", BIOTRANS 2005, The Netherlands, (2005)

Shimizu, S., M. Kataoka, J. Ogawa. "Screening and applications of unique microbial enzymes useful for the production of chiral compounds", Enzyme Engineering XVIII (2005)