

課題番号	GS012
------	-------

先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 実施状況報告書(平成23年度)

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	酸化還元系制御細菌による海洋バイオマスからの実用的エタノール生産
研究機関・ 部局・職名	京都大学・農学研究科・助教
氏名	河井 重幸

1. 当該年度の研究目的

海洋バイオマス(褐藻類:主要成分はポリウロン酸[アルギン酸]、マンニトール、およびラミナリンなどであり、セルロース含量は陸上バイオマスより少ない)からの、エタノール生産性スフィンゴモナス属細菌 A1 株(以下、A1 株)や特殊な酵母を用いた実用的なエタノール大量生産法を確立するために、以下の(A)~(G)を実施する。(A) A1 株の乳酸(不要な反応副産物)の生成系の遮断。(B) NAD(H)のみで稼動するポリウロン酸からのエタノール合成系の構築。(C) A1 株の NAD(P)H 供給系と再生系の代謝工学的強化。(D) 培養工学的解析による実用的バイオエネルギー生産系の確立。(E) A1 株のエタノール耐性能強化。(F) 酵母によるポリウロン酸からのエタノール生産。(G) 海洋バイオマスの総合的利活用。

2. 研究の実施状況

(A) A1 株の乳酸生成系の遮断の有用性を確認した。(B) NAD(H)のみで稼動するエタノール合成系構築のために、タンパク質工学的手法による高活性の NADH 依存性 A1-R 取得を試みたが困難であった。平成 24 年度は手法を変更する。(C) A1 株の NAD(P)H 供給系と再生系の代謝工学的強化のため、NAD(P)H 供給系の各遺伝子[NADP および NADPH 合成酵素各遺伝子、NADPH 再生系遺伝子、NAD(P)トランスヒドロゲナーゼ(UdhA)遺伝子]の A1 株コドン利用頻度などに基づいた設計および合成を完了した。(D) A1 株のエタノール生産性に対する、エタノール生産遺伝子のコドンの至適化、オリゴアルギン酸と鉄、各々の影響を調べたが、エタノールの生産性の増大には至らなかった。また実験室スケールにおけるエタノール生産過程の解析を行ったところ、培地中に細胞の生育およびエタノール発酵を阻害する因子、および細胞を急激に死に至らしめる因子が分泌されることが示された。一方、京都府北部で採取された褐藻類(アカモク)からのエタノール生産至適条件も検討し、アカモクを乾燥後、粉末化して、アルギン酸リアーゼを作用させることにより、褐藻類中のアルギン酸が A1 株によりエタノールに変換されること、アカモク粉末をオートクレーブすると生育阻害因子が遊離することなどが明らかとなった。(E) エタノール耐性 A1 株 MK3813 株を得た。(F) 下記(G)に準じて、酵母へのポリウロン酸資化能の賦与を試みたが目的達成には至らなかった。(G) 酵母 *Saccharomyces paradoxus* NBRC0259 がマンニトールからエタノールを生産する優れた能力を有すること、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が自然にマンニトールからエタノールを生産する能力(マンニトール資化能: 図 1)とフロキュレーション(凝集)能を獲得することを見出した。また、アカモクの糖およびメタル成分の分析を実施した。

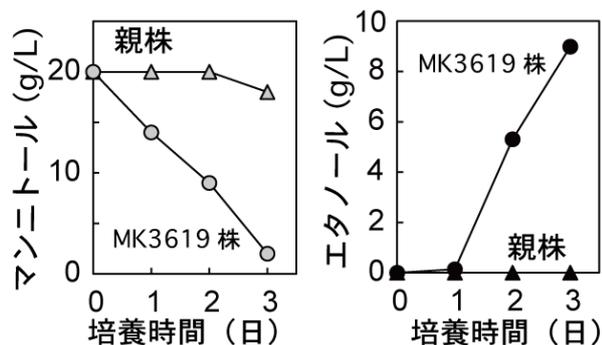


図 1 マンニトール資化能を獲得した MK3619 株は、親株と異なり、マンニトールを消費して(左)、エタノールを生産する(右)。

3. 研究発表等

雑誌論文 計 0 件	(掲載済み一査読有り) 計 0 件 (掲載済み一査読無し) 計 0 件 (未掲載) 計 0 件
会議発表 計 5 件	専門家向け 計 4 件 ①International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011; 国際微生物学連合 2011 会議) XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (Sapporo Convention Center, Sapporo, 2011 年 9 月 8 日) Final Program, p. 176 (P-BR05-2) Production of the third generation bioethanol from mannitol, a promising renewable carbon source in marine biomass. ○Shigeyuki Kawai, Anri Ota, Kousaku Murata (Kyoto University, Japan) ②日本生物工学会平成 23 年度大会(第 63 回)(東京農工大学 小金井キャンパス、東京都小金井市、2011 年 9 月 27 日)講演要旨集, p. 114. 酵母によるマンニトールからのバイオエタノールの生産 ○太田安里、藤井麻里、河井重幸、村田幸作(京大院・農) ③日本農芸化学会 2012 年度大会(京都女子大学、京都市、2012 年 3 月 25 日)大会プログラム集, p. 107. エタノール生産性 <i>Sphingomonas</i> sp. A1 株によるアルギン酸からのバイオエタノール生産過程 ○藤井麻理、柳澤満則、河井重幸、村田幸作(京大院農・食品生物) ④日本農芸化学会 2012 年度大会(京都女子大学、京都市、2012 年 3 月 25 日)大会プログラム集, p. 107. (大会トピックス賞 受賞) 出芽酵母のマンニトール資化能とフロキュレーション能の自然獲得 ○河井重幸、太田安里、柳澤満則、村田幸作(京大院農・食品生物) 一般向け 計 1 件 ①科学・技術フェスタ in 京都 2011 (国立京都国際会館、京都市、2011 年 12 月 16 日) 海藻からバイオ燃料を大量につくる ○河井重幸 (京大院・農)
図書 計 0 件	該当無し。
産業財産権 出願・取得状 況 計 2 件	(取得済み) 計 0 件 (出願中) 計 2 件 発明の名称 酵母を用いたマンニトールからのエタノール生産 出願番号 特願 2011-191971 出願年月日 平成 23 年 9 月 2 日 発明者 村田幸作、河井重幸、織田浩司、庵原啓司 出願人(権利者) 株式会社マルハニチロホールディングス 国内外 国内

様式19 別紙1

	発明の名称 酵母を用いたマンニトールからのエタノール生産 出願番号 13/408,489 出願年月日 平成24年2月29日 発明者 村田幸作、河井重幸、織田浩司、庵原啓司 出願人(権利者) 株式会社マルハニチロホールディングス 国内外 アメリカ合衆国
Webページ (URL)	研究者所属の分野のホームページ http://www.molbiotech.kais.kyoto-u.ac.jp 京都大学ホームページ「京都大学が「科学・技術フェスタ in 京都 2011」に出展します」 http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news7/2011/111212_1.htm 日本農芸化学会 2012 年度大会ホームページ「トピックス賞」 https://jsbba.bioweb.ne.jp/cgi-bin/jsbba2012/jsbba_table.cgi?topics=1
国民との科学・技術対話の実施状況	科学・技術フェスタ in 京都 2011 (国立京都国際会館、京都市、2011 年 12 月 16 日、参加者数 延べ 5,090 人 [2 日間、関係者含む])において、京都大学出展企画(http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news7/2011/111212_1.htm)において「海藻からバイオ燃料を大量につくる」のタイトルで、国民との科学・技術対話を実施した。 http://www.pbi.co.jp/kagakugijutsu-festa/
新聞・一般雑誌等掲載 計 0 件	該当無し。
その他	該当無し。

4. その他特記事項

本研究に関する内容は、2大会連続で日本農芸化学会トピックス賞を受賞した。査読有り英文原著論文3報および査読有り英文総説1報準備中である。

実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	103,000,000	43,565,000	0	59,435,000	0
間接経費	30,900,000	13,069,500	0	17,830,500	0
合計	133,900,000	56,634,500	0	77,265,500	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	43,365,000	0	0	43,365,000	35,772,190	7,592,810	0
間接経費	13,039,500	0	0	13,039,500	1,375,544	11,663,956	0
合計	56,404,500	0	0	56,404,500	37,147,734	19,256,766	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	17,806,977	示差屈折率検出器等備品、実験試薬
旅費	766,500	Spring8、学会(研究成果発表・情報収集)、研究打ち合わせ
謝金・人件費等	10,472,362	博士研究員及び非常勤職員人件費
その他	6,726,351	英文校正費、外注費、機器修理費、学会参加費
直接経費計	35,772,190	
間接経費計	1,375,544	
合計	37,147,734	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
示差屈折率検出器	島津製作所製 RID-10A	1	787,500	787,500	2011/4/21	京都大学
Gene Pulser Xcell コンプリートシステム	バイオラッド 165-2660J1	1	1,370,250	1,370,250	2011/5/26	京都大学
インフィニット F200 Pro	テカンジャパン株式会社 干渉フィルター方式	1	4,976,370	4,976,370	2011/6/23	京都大学
Elix Advantage3	日本ミリポリア(株)製 ZRXV003JP	1	584,010	584,010	2011/10/24	京都大学
紫外可視分光光度計	島津製作所製 UV-1800	1	945,000	945,000	2011/12/7	京都大学