

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24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(B)~(G)を実施する。(B) NAD(H)のみで稼動するアルギ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) 酵母によるアルギ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

(B)新規酵素 CA-R が NADH 型 DEH レダクターゼ (DEH : アルギン酸分解産物) であることを明らかにした。(C)NADP (H) 合成酵素、NAD (P) トランスヒドロゲナーゼ、NADPH 再生系、および CA-R 各遺伝子をエタノール生産性 A1 株 (MK3353 株) へ導入し、NAD(P)H 供給系と再生系の代謝工学的強化を試みたが、エタノール増産には至らなかった。ただし、酸化還元制御に重要な NAD や NADP の合成系の研究を推進した結果、ヒトミトコンドリア NADP 合成酵素の発見や同酵素への新規機能賦与、NAD 合成系や酸素応答に関する知見などの顕著な成果が得られた。(D) アルギン酸からのエタノール生産過程で培地中に分泌される生育阻害成分 (エタノール生産の律速) を特定すべくメタボローム解析などを行った。その結果、ブレークスルーとなり得る知見 (生育阻害成分の不活性化法) を得ることができた。ジャーファーメンターを用いたスケールアップも行い、エタノール生産反応の酸素要求性ならびに至適酸素供給量も明らかにした。(E) 高濃度 (4% w/v) エタノール耐性 A1 株 MK4315 株を得た。(F) アルギン酸資化遺伝子群を導入した出芽酵母の抽出物と A1-R の利用による、アルギン酸分解物 (DEH) からのエタノールやピルビン酸の生産に成功した。(G) 酵母 *Saccharomyces paradoxus* NBRC0259-3 のマンニトールからのエタノール生産における優良性を示すとともに出芽酵母のマンニトール資化機構の解明を進めた。他方、A1 株が著量のピルビン酸 (医薬品・化学品合成の原料として重要) を生産することを発見し、ピルビン酸生産条件を確立した。褐藻類 (アカモク) のセルラーゼによる糖化ならびにアカモクからのアルギン酸の抽出法も検討した。コンブやワカメもエタノール生産の原料として利用できることも分かった。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 6 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 2 件</p> <ol style="list-style-type: none"> Hiroki Fujiwara, <u>Shigeyuki Kawai</u>, & Kousaku Murata: Significance of sulfiredoxin/peroxiredoxin and mitochondrial respiratory chain in response to and protection from 100% O₂ in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. Mitochondrion, 13(1):52-58 (2013)., ISSN: 1567-7249 Kazuto Ohashi, <u>Shigeyuki Kawai</u>, & Kousaku Murata: Identification and characterization of a human mitochondrial NAD kinase. Nat. Commun., 3:1248 doi: 10.1038/ncomms2262 (2012). ISSN: 2041-1723, オープンアクセス URL http://www.nature.com/ncomms/journal/v3/n12/full/ncomms2262.htm <p>(掲載済み一査読無し) 計 1 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 河井重幸: キノリン酸の利用ならびに合成に着目した出芽酵母の新規 NAD 合成経路. Institute for Fermentation, Osaka, Research Communications, 26:195-196 (2012). <p>(未掲載) 計 3 件</p> <ol style="list-style-type: none"> Kazuto Ohashi, <u>Shigeyuki Kawai</u>, & Kousaku Murata: Secretion of quinolinic acid to reutilize for NAD⁺ biosynthesis in yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. Eukaryot. Cell, in press (2013). Mar 1. [Epub ahead of print] PMID: 23457190, ISSN: 1535-9778 Anri Ota, <u>Shigeyuki Kawai</u>, Hiroshi Oda, Keishi Iohara, & Kousaku Murata: Production of ethanol from mannitol by the yeast strain <i>Saccharomyces paradoxus</i> NBRC 0259. J. Biosci. Bioeng., in press (2013). DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.03.018, ISSN: 1389-1723 Mitsunori Yanagisawa, <u>Shigeyuki Kawai</u>, & Kousaku Murata: Strategies for the production of high concentrations of bioethanol from seaweeds. Bioengineered, in press (2013). Jan 11;4(4). [Epub ahead of print] PMID:23314751, ISSN: 1949-1018
<p>会議発表 計 15 件</p>	<p>専門家向け 計 13 件 学会</p> <ol style="list-style-type: none"> 日本ビタミン学会第 64 回大会(長良川国際会議場、岐阜市、2012 年 6 月 23 日)講演要旨集, p.270. ヒト由来新規ミトコンドリア局在性 NAD キナーゼ C5orf33 の機能 ○ <u>河井重幸</u>、大橋一登、村田幸作(京大院・農) 2012 年度日本農芸化学会 関西支部大会(第 476 回 講演会)(京都学園大学 バイオ環境館、京都府 亀岡市、2012 年 10 月 1 日)講演要旨集, p. 39. ヒトのミトコンドリア NADP⁺合成酵素発見のインパクト ○ <u>河井重幸</u>、大橋一登、川畑 豊、村田幸作(京大院・農) 日本生物工学会平成 24 年度大会(第 64 回)(神戸国際会議場、神戸市、2012 年 10 月 25 日)講演要旨集, p. 164. 出芽酵母の Cyc8-Tup1 転写コリプレッサー成分 Tup1 への一塩基変異が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を引き起こす ○ <u>河井重幸</u>、太田安里、三上真一、村田 幸作(京大院・農) 日本生物工学会平成 24 年度大会(第 64 回)(神戸国際会議場、神戸市、2012 年 10 月 25 日)講演要旨集, p. 127. 一残基のアミノ酸が NADP⁺合成酵素のポリリン酸利用能を決定する ○ 中道優介、<u>河井重幸</u>、村田幸作(京大院農)

5. 日本生物工学会平成24年度大会(第64回)(神戸国際会議場、神戸市、2012年10月26日)講演要旨集, p. 244. NAD(H)駆動型エタノール生産性 *Sphingomonas* 属細菌 A1 株の構築
○ 高瀬 隆一、橋本 渉、河井重幸、村田幸作(京大院農)
6. 日本生物工学会平成24年度大会(第64回)(神戸国際会議場、神戸市、2012年10月26日)講演要旨集, p. 244. エタノール生産性 *Sphingomonas* sp. A1 によるアルギン酸からのエタノール生産過程で生成する生育阻害物質
○ 藤井麻理、吉田志織、柳澤満則、河井重幸、村田幸作(京大院・農)
7. 第85回日本生化学会大会(福岡国際会議場、福岡市、2011年12月15日)プログラム, p. 60. 口頭発表 ミトコンドリアの還元力供給の鍵酵素:ヒトのミトコンドリア局在性 NADP⁺合成酵素の同定
○ 河井重幸、大橋一登、川畑 豊、村田幸作(京大院・農)
8. 第85回日本生化学会大会(マリンメッセ福岡、福岡市、2011年12月16日)プログラム, p. 148. ポスター ミトコンドリアの還元力供給の鍵酵素:ヒトのミトコンドリア局在性 NADP⁺合成酵素の同定
○ 河井重幸、大橋一登、川畑 豊、村田幸作(京大院・農)
9. 日本農芸化学会2013年度大会(東北大学 川内北キャンパス、仙台、2013年3月25日)大会プログラム集, p. 29. エタノール生産性 *Sphingomonas* sp. A1 株によるアルギン酸からのエタノール生産に対する溶存酸素濃度の影響
○ 吉田志織、藤井麻理、大橋一登、三上真一、河井重幸、村田幸作(京大院・農)
10. 日本農芸化学会2013年度大会(東北大学 川内北キャンパス、仙台、2013年3月25日)大会プログラム集, p. 29. (大会トピックス賞 受賞) マリンバイオリファイナリー: *Sphingomonas* sp. A1 株によるアルギン酸からのピルビン酸の生産
○ 河井重幸¹、大橋一登¹、吉田志織¹、藤井麻理¹、佐藤信行²、村田幸作¹(京大院・農¹、マルハニチロ²)
11. 日本農芸化学会2013年度大会(東北大学 川内北キャンパス、仙台、2013年3月25日)大会プログラム集, p. 54. ヒト由来ミトコンドリア局在性 NAD キナーゼ遺伝子のノックダウンの影響
○ 川畑 豊、大橋一登、河井重幸、村田幸作(京大院・農)

研究発表会

12. 京都大学農学研究科 2012 シーズ発表会(農林水産技術会議事務局筑波事務所、つくば市、2012年11月30日)、総勢40名、海洋バイオマスからのバイオエタノールの生産戦略
○ 河井重幸、村田幸作(京大院・農)

シンポジウム

13. 日本農芸化学会2013年度大会(東北大学 川内北キャンパス、仙台、2013年3月27日)大会プログラム集, p. 105. シンポジウム(招待講演) グリーンポリマー関連酵素における分子機能創出の方法と応用 リン酸化酵素の先祖返り ~化石ポリマー(ポリリン酸)利用能の産業への応用~
○ 河井重幸、中道優介、吉岡 彩、村田幸作(京大院・農)

一般向け 計2件

14. 京都大学アカデミックデイ-みんなで対話する京都大学の日-(京都大学百周年時計台記念館、京都

様式19 別紙1

	<p>市、来場者 531 名、2012 年 9 月 2 日) 微生物のちからで海藻から燃料をつくる～ ○河井重幸、藤井麻理、吉田志織(京大院・農)</p> <p>15. ネイチャー・インダストリー・アワード～若手研究者からの発信～(大阪科学技術センター、大阪市、総勢 240 名、2012 年 11 月 20 日)主催(一財)大阪科学技術センター 共催 日刊工業新聞社(モノづくり日本会議)海洋バイオマスからの実用的エタノール生産 ○河井重幸、太田安里、藤井麻理、吉田志織(京大院・農)</p>
<p>図書 計 1 件</p>	<p>河井重幸、村田幸作:大型海藻(褐藻類)からのエタノール生産 リサイクルバイオテクノロジーの最前線(植田充美 監修)シーエムシー出版,印刷中 B5判 約250頁</p>
<p>産業財産権 出願・取得状況 計 2 件</p>	<p>1. 国 日本 発明の名称 ATP 依存キナーゼにポリリン酸を付与する方法 出願番号 特願 2013-006341 出願日 2013 年 1 月 17 日 発明者 村田幸作、河井重幸、中道優介、内田浩二、野々部 昌継 出願人 国立大学法人京都大学、オリエンタル酵母工業株式会社</p> <p>2. 国 日本 発明の名称 アルギン酸からのピルビン酸の生産法 出願番号 特願 2013-034710 出願日 2013 年 2 月 25 日 発明者 村田幸作、河井重幸、佐藤信行 出願人 国立大学法人京都大学、株式会社マルハニチロ食品</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>1. 研究者所属の分野のホームページ http://www.molbiotech.kais.kyoto-u.ac.jp</p> <p>2. 京都大学ホームページ「京都大学アカデミックデイ」 http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news4/2012/120902_1.htm</p> <p>3. ネイチャー・インダストリー・アワード ポスター発表課題一覧 http://www.ostec.or.jp/tec/nature_theme.pdf</p> <p>4. 京都大学ホームページ「ヒトのミトコンドリアにおける NADP 供給源の特定とその意義」 http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2012/121205_2.htm</p> <p>5. 日本農芸化学会 2013 年度大会ホームページ「トピックス賞」 https://jsbba.bioweb.ne.jp/cgi-bin/jsbba2013/jsbba_table.cgi?topics=1</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>1. 京都大学アカデミックデイみんなで対話する京都大学の日-(京都大学百周年時計台記念館、京都市、対象者:一般など、来場者 531 名、2012 年 9 月 2 日) 演題「微生物のちからで海藻から燃料をつくる」ちゃぶ台を囲んで、コンブ、海苔、アオサ、試験管立て、アルギン酸溶液など一般の方の興味を引きそうな道具を駆使して、和やかな雰囲気の中で、主に一般参加者に本課題内容を説明させて頂いた。説明者:河井重幸、藤井麻理、吉田志織(京大院・農)</p> <p>2. ネイチャー・インダストリー・アワード～若手研究者からの発信～(大阪科学技術センター、大阪市、産業界および公的機関関係者ならびに一般、総勢 240 名、2012 年 11 月 20 日)主催(一財)大阪科学技術センター 共催 日刊工業新聞社(モノづくり日本会議) 演題「海洋バイオマスからの実用的エタノール生産」丸一日ポスターを貼り、興味を示して下さった方々に説明させて頂いた。飲食可ということもあり、和やかな雰囲気の中で活発な議論ができた。説明者:河井重幸、太田安里、吉田志織(京大院・</p>

様式19 別紙1

	農)
新聞・一般雑誌等掲載 計6件	<ol style="list-style-type: none"> 1. 朝日新聞 2012年9月3日 京都市内版掲載「研究者と「ちゃぶ台」座談会」 2. 京都新聞 2012年12月5日掲載「京大 人間細胞内ミトコンドリア 補酵素作る機構解明 神経疾患治療応用に期待」 3. 日本経済新聞 電子版 2012年12月5日「京大、ヒトのミトコンドリアでNADPを合成する酵素を特定しNADPの供給源を解明」 http://release.nikkei.co.jp/detail.cfm?relID=325608&lindID=5 4. マイナビニュース 電子版 2012年12月6日「京大、不明だったヒトミトコンドリア内の「NADP」の供給源を発見」 http://news.mynavi.jp/news/2012/12/06/146/index.html 5. 化学工業日報 2013年3月25日掲載「ピルビン酸 アルギン酸から生産 京大-マルハニチロHDが技術確立 国産原料で低コスト」 6. 化学工業日報 電子版 2013年3月25日掲載「京大/マルハニチロHD アルギン酸からピルビン酸生産」 http://www.kagakukogyonippo.com/headline/2013/03/25-10594.html
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、3大会連続で日本農芸化学会トピックス賞を受賞した(2012年度および2013年度大会においては本補助事業の内容で受賞 [ともに補助事業者が筆頭発表者])。査読有り英文原著論文 1報を投稿中。査読有り英文原著論文 2報を準備中。

上記、朝日新聞 2012年9月3日 京都市内版掲載「研究者と「ちゃぶ台」座談会」のカラー写真で「ちゃぶ台中央で話をする」研究者が補助事業者。

実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

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	31,171,000	28,264,000	0
間接経費	30,900,000	13,069,500	9,351,300	8,479,200	0
合計	133,900,000	56,634,500	40,522,300	36,743,200	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	7,592,810	31,171,000	0	38,763,810	37,446,987	1,316,823	0
間接経費	11,663,956	9,351,300	0	21,015,256	3,992,590	17,022,666	0
合計	19,256,766	40,522,300	0	59,779,066	41,439,577	18,339,489	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	12,628,674	培養装置・高圧蒸気滅菌器・フリーザー・遠心機・実験器具・試薬等
旅費	494,200	研究成果発表旅費(岐阜市・亀岡市・神戸市・大阪科学技術センター・東北大学)等
謝金・人件費等	18,209,548	博士研究員人件費・非常勤職員人件費
その他	6,114,565	成分分析費・DNA合成委託料・機器修理代・DNAシーケンス委託解析料・学会参加費等
直接経費計	37,446,987	
間接経費計	3,992,590	
合計	41,439,577	

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
ベンチトップファーマンターシステム	BioFlo115	1	3,187,800	3,187,800	2012/5/23	京都大学
ハイクレープ(高圧蒸気滅菌器)	HV-110	1	638,662	638,662	2012/5/10	京都大学
超低温フリーザー	MDF-U384-PJ	1	1,200,675	1,200,675	2012/6/27	京都大学
微量高速遠心機	CF15RX II	1	806,400	806,400	2012/10/4	京都大学