

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25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:主要成分はアルギン酸、マンニトールなどであり、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ならびに有用物質の大量生産法を確立するために、当該年度は以下の(B)~(G)を実施する。(B) 新規 DEH レダクターゼの特定および性質決定、NADPH 型 A1-R 遺伝子の破壊による NADH 依存型エタノール生産系の構築、(C) NADH 依存型エタノール生産系[上記(B)で作成]への NADH 再生系の導入によるエタノール増産、(D) イオン交換体を用いた阻害成分の除去による高濃度エタノールの生産、阻害成分のさらなる特定、遺伝子工学的手法による本成分(特にアセトアルデヒド)の除去などによる、エタノール生産性の実用化レベルへの向上、(E) アセトアルデヒド除去によるエタノール耐性の向上、(F) アルギン酸、マンニトール、褐藻類からのピルビン酸および他の有用物質の生産条件の確立と最適化。海洋バイオマス資化性酵母の構築。最適 A1 株および当該酵母を併用して、アルギン酸や褐藻類(アカモク、コンブ)からの高濃度エタノール生産、マンニトール資化能獲得機序の解明。

2. 研究の実施状況

(B,C)新規 NADH 依存 DEH レダクターゼを特定し性質を決定した。A1 株の細胞内 NAD(P)H 濃度を決定したところ、本新規レダクターゼによる NADH 依存反応の進行が示され、結果的に NADH 依存型エタノール生産系が構築された。酸化還元制御に関する業績も顕著であった。(D, E)イオン交換体を用いた阻害成分の除去にはある程度成功したが、高濃度エタノールの生産には至らなかった。アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子を A1 株に導入し、同酵素を高発現させた。これによりアセトアルデヒドの除去を試みたが、エタノール生産能とエタノール耐性の向上には至らなかった。ただし馴養によるエタノール耐性 A1 株は取得できた。また、培地の pH 制御による毒性効果の緩和に成功し、かかる pH 制御が酵母と同 A1 株を用いた二段階発酵によるアルギン酸とマンニトールからのエタノール生産に顕著に有効であることを明らかにした。(F) pH 制御(pH7 への維持)によるピルビン酸生産能の向上を見出した。特許も日本国内と米国で出願した。他の化合物の生産系の確立には至らなかった。また、アルギン酸の資化に関わる 6 つの遺伝子のうち、4 つの遺伝子の出芽酵母での機能的発現に成功した。特に、新規 NADH 依存 DEHレダクターゼが効果的に機能した。さらに、出芽酵母の *CYC8* 遺伝子に自然変異が導入されたマンニトール資化能獲得株を新たに取得し、本株が凝集性を示さない、耐塩性を示す、塩存在下でも高いエタノール生産性を示す優れた株であることを突き止めた。A1 株と本株を用いたアカモクとコンブからのエタノール生産を試みた。また、A1 株へのマンニトール資化能の賦与にも成功した。他方、マンニトール資化能獲得機序の全容解明には至らなかったが、Cyc8 が同能獲得に関わることを明らかにした。また、エピジェネティックな修飾による同能獲得も示唆された。

様式19 別紙1
3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 9 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 6 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Mari Fujii, Shiori Yoshida, Kousaku Murata, & <u>Shigeyuki Kawai</u>: Regulation of pH attenuates toxicity of a byproduct produced by an ethanologenic strain of <i>Sphingomonas</i> sp. A1 during ethanol fermentation from alginate. Bioengineered, 5(1):38–44 (2014). ISSN: 2165–5979 2. <u>Shigeyuki Kawai</u>, Kazuto Ohashi, Shiori Yoshida, Mari Fujii, Nobuyuki Sato, & Kousaku Murata: Bacterial pyruvate production from alginate, a promising carbon source from marine brown macroalgae. J. Biosci. Bioeng., 117(3):269–274 (2014). ISSN 1389–1723 3. Yusuke Nakamichi, Aya Yoshioka, Shigeyuki Kawai, & Kousaku Murata: Conferring the ability to utilize inorganic polyphosphate on ATP-specific NAD kinase. Sci. Rep., 3, 2632;DOI:10.1038/srep02632 (2013). ISSN (online): 2045–2322 オープンアクセス URL: http://www.nature.com/srep/2013/130911/srep02632/full/srep02632.html 4. 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, 12(5):648–653 (2013). ISSN: 1535–9778 5. 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., 116(3):327–332 (2013). ISSN: 1389–1723 6. Mitsunori Yanagisawa, <u>Shigeyuki Kawai</u>, & Kousaku Murata: Strategies for the production of high concentrations of bioethanol from seaweeds. Bioengineered, 4(4):224–235 (2013). ISSN: 1949–1018 <p>(掲載済み一査読無し) 計 1 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 7. <u>河井重幸</u>: 海洋バイオマス(大型褐藻類)からのエタノールとピルビン酸の生産. 化学工業, 64(12):36–40, 60 (2013). <p>(未掲載) 計 2 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 8. Aya Yoshioka, Kousaku Murata, & <u>Shigeyuki Kawai</u>: Structural and mutational analysis of amino acid residues involved in ATP specificity of <i>E. coli</i> acetate kinase. J. Biosci. Bioeng., in press (2014). ISSN 1389–1723 9. Nao Idogawa, Ryuta Amamoto, Kousaku Murata, & <u>Shigeyuki Kawai</u>: Phosphate enhances levan production in the endophytic bacterium <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5. Bioengineered, 5(3) in press, published online, doi: 10.4161/bioe.28792 (2014). (N. Idogawa and R. Amamoto equally contributed to this work.) ISSN: 1949–1018
<p>会議発表 計 16 件</p>	<p>専門家向け 計 13 件</p> <p>学会</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 日本ビタミン学会 第 65 回大会(一橋大学一橋講堂、東京都、2013 年 5 月 17 日) ヒト由来ミトコンドリア局在性 NAD キナーゼ (C5orf33) の生理機能 川畑 豊, 大橋一登, 村田幸作, ○河井重幸(京大院・農) 2. 日本農芸化学会 関西支部 第 481 回講演会(県立広島大学 広島キャンパス、広島市、2013 年 9 月 6

	<p>日) 細菌のアルギン酸代謝に関わる新規な NADH 要求性 α-ケト酸還元酵素 ○高瀬隆一, 河井重幸, 橋本 渉, 村田幸作(京大院・農)</p> <p>3. 第 86 回日本生化学会大会(パシフィコ横浜、横浜市、2013 年 9 月 12 日) ヒトの NAD キナーゼのグル タチオン化 ○川畑 豊、村田幸作、河井重幸(京大院・農)</p> <p>4. 日本生物工学会平成 25 年度大会(第 65 回)(広島国際会議場、広島市、2013 年 9 月 19 日) 酢酸キナ ーゼのリン酸供与体選択性を決定する要因 ○吉岡 彩、村田幸作、河井重幸(京大院農)</p> <p>5. 日本生物工学会平成 25 年度大会(第 65 回)(広島国際会議場、広島市、2013 年 9 月 19 日) アルギ ン酸からのエタノール生産過程で分泌される毒性物質 ○藤井麻理, 吉田志織, 村田幸作, 河井重幸(京大院・農)</p> <p>6. 日本生物工学会平成 25 年度大会(第 65 回)(広島国際会議場、広島市、2013 年 9 月 19 日) 海洋バ イオマス主成分アルギン酸からのピルビン酸生産性の向上 ○吉田志織¹, 三上真一¹, 織田浩司², 村田幸作¹, 河井重幸¹(¹京大院・農, ²マルハニチロ)</p> <p>7. 日本生物工学会平成 25 年度大会(第 65 回)(広島国際会議場、広島市、2013 年 9 月 19 日) 出芽酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> によるアルギン酸からのエタノールの生産 ○三上真一, 高瀬隆一, 村田幸作, 河井重幸(京大院・農)</p> <p>8. 第 36 回日本分子生物学会年会(神戸ポートアイランド、神戸市、2013 年 12 月 4 日) 出芽酵母コリブ レッサー-Tup1 のマンニトール資化能獲得における役割 ○中條 萌絵子、村田幸作、河井重幸(京大院・農)</p> <p>9. 第 4 回リン化合物討論会(第 31 回 C-P 化合物研究会)(滋賀大学、大津市、2013 年 12 月 14 日) ヒ トのミトコンドリア局在性 NAD キナーゼの発見 ○河井重幸、川畑 豊、村田幸作(京大院・農)</p> <p>10. 第 4 回リン化合物討論会(第 31 回 C-P 化合物研究会)(滋賀大学、大津市、2013 年 12 月 14 日) 植 物内生窒素固定細菌のリン酸に依存した細胞外多糖レバン合成とその生理的意義 ○井戸川奈生、村田幸作、河井重幸(京大院・農)</p> <p>11. 日本農芸化学会 2014 年度大会(明治大学 生田キャンパス、川崎、2014 年 3 月 28 日) 出芽酵母の Cyc8-Tup1 転写コリプレッサーへの自然変異がマンニトール資化能獲得と耐塩性に与える影響 中條 萌絵子, 村田幸作, ○河井重幸(京大院・農)</p> <p>シンポジウム</p> <p>12. 日本農芸化学会 2014 年度産学官学術交流委員会フォーラム(明治大学 生田キャンパス、川崎、 2014 年 3 月 29 日) 第 11 回 農芸化学研究企画賞受賞者研究企画発表会 巨大褐藻類を原料とす る有用バルクケミカル発酵生産技術の開発 ○河井重幸(京大院・農)</p> <p>国際会議(招待講演)</p> <p>13. FASEB Science Research Conference, NAD Metabolism & Signaling (Eaglewood Resort & Spa, Chicago, IL, USA, 2013 年 7 月 15). (国際学会、招待講演) NAD(H) kinase: the key enzyme for NAD(H) &</p>
--	---

様式19 別紙1

	<p>NADP(H) cross-talk</p> <p>○Shigeyuki Kawai (Kyoto University, Japan)</p> <p>一般向け 計3件</p> <p>14. 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、2013年11月20日 対象:大学、企業、一般。参加者約200名)「海洋バイオマスからの有用物質ピルビン酸の生産」</p> <p>○吉田志織, ○藤井麻理, ○河井重幸(京大院・農)</p> <p>15. 京都大学アカデミックデー-京都大学の研究者とあなたで語り合う日-(京都大学百周年時計台記念館、京都市、2013年12月21日 対象:一般。来場者のべ529名) 最先端の「海の幸」</p> <p>○中條 萌絵子、○藤井麻理、○吉田志織、○河井重幸(京大院・農)</p> <p>16. FIRST シンポジウム「科学技術が拓く2030年」(ベルサール新宿グランド、新宿区、対象:大学、企業、一般。参加者のべ327名、2014年3月1日) 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</p> <p>○河井重幸(京大院・農)</p>
<p>図書</p> <p>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;バイオテクノロジーシリーズ ISBN978-4-7813-0800-5)シーエムシー出版, 東京, 43-49 (2013) 総ページ数 239頁.</p>
<p>産業財産権 出願・取得状況</p> <p>計2件</p>	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計2件</p> <p>1. 発明の名称 アルギン酸からのピルビン酸の生産法</p> <p>出願番号 14/189513(アメリカ合衆国)</p> <p>出願日 2014年2月25日</p> <p>発明者 村田幸作、<u>河井重幸</u>、佐藤信行</p> <p>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>2. 発明の名称 アルギン酸からのピルビン酸の生産法</p> <p>出願番号 特願2013-173668</p> <p>出願日 2013年8月23日</p> <p>発明者 村田幸作、<u>河井重幸</u>、佐藤信行</p> <p>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. ATP 特異性の獲得メカニズムの解明～新薬と新しい物質生産系の開発に期待～, 京都大学 HP, http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2013/130911_1.htm</p> <p>2. Elucidation of the mechanism underlying the acquisition of specificity for ATP, opening the way to the development of new antibiotics and production systems, 京都大学 HP, http://www.kyoto-u.ac.jp/en/news_data/h/h1/news6/2013/130911_1.htm</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>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～(2013年11月20日 大阪科学技術センター、大阪市、対象:大学、企業、一般。参加者約200名)</p> <p>(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)主催の企画で、補助事業者は「海洋バイオマスからの有用物質ピルビン酸の生産」の演題名でポスター展示、発表、交流を行った。</p>

様式19 別紙1

	<p>京都大学アカデミックデー-京都大学の研究者とあなたで語り合う日-(2013年12月21日 京都大学百周年時計台記念館、京都市、対象:一般。来場者のべ529名)</p> <p>市民や研究者、文系、理系を問わず、誰もが学問の楽しさ・魅力に気付くことができる「対話」の場となることを目指している。国民と科学・技術に関わる本学の研究者が直接対話することで、本学の研究活動をわかりやすく説明するとともに、国民の声を本学における研究活動に反映させることを1つの目的としている。京都大学からは49組の研究プロジェクト、約200名の研究者(大学院生含む)が参加すると共に、近隣の高校等からも7組の出展が行われた。補助事業者は「最先端の「海の幸」」という演題名でポスター展示、発表、交流を行い、研究内容を一般の方へ分かり易くお伝えすることに努めた。</p> <p>FIRST シンポジウム「科学技術が拓く2030年」(2014年3月1日 ベルサール新宿グランド、新宿区、対象:大学、企業、一般。参加者のべ327名)</p> <p>科学技術による日本発のイノベーション創出が加速する「科学技術が拓く2030年」を未来像として、FIRST中心研究者や若手研究者・様々な立場から、プログラムの成果やFIRST・NEXT実施から見てきた研究現場におけるさらなる課題を共有し、今、取り組むべき改善策を検討した。NEXT研究者はポスター展示と発表を行った。補助事業者は「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」の演題名でポスター展示、発表、交流を行った。</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載計1件</p>	<p>日経産業新聞 2013年4月25日 朝刊 「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」</p>
<p>その他</p>	<p>該当無し。</p>

4. その他特記事項

- ・上記雑誌論文4. は **Global Medical Discovery** (<http://globalmedicaldiscovery.com>) に掲載。
- ・投稿中の査読付き原著論文1報と印刷中の図書2件有り。
- ・2014年3月27日 「巨大褐藻類を原料とする有用バルクケミカル発酵生産技術の開発」で第11回農芸化学研究企画賞を受賞。

実施状況報告書(平成25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	74,736,000	28,264,000	0	0
間接経費	30,900,000	22,420,800	8,479,200	0	0
合計	133,900,000	97,156,800	36,743,200	0	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	1,316,823	28,264,000	0	29,580,823	29,580,823	0	0
間接経費	17,022,666	8,479,200	0	25,501,866	25,501,866	0	0
合計	18,339,489	36,743,200	0	55,082,689	55,082,689	0	0

3. 当該年度の執行額内訳 (単位:円)

	金額	備考
物品費	8,103,392	紫外可視分光光度計・実験器具・試薬等
旅費	1,004,093	研究成果発表旅費(アメリカ・東京都・広島市・神戸市・大津市・川崎市)等
謝金・人件費等	16,851,286	博士研究員人件費・非常勤職員人件費
その他	3,622,052	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	29,580,823	
間接経費計	25,501,866	
合計	55,082,689	

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
紫外可視分光光度 計一式	島津製作所製 UV-2600	1	1,410,150	1,410,150	2013/8/2	京都大学
				0		
				0		