

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) 実績報告書

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. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

2. 収支の状況

(単位:円)

	交付決定額	交付を受けた額	利息等収入額	収入額合計	執行額	未執行額	既返還額
直接経費	103,000,000	103,000,000		103,000,000	103,000,000	0	
間接経費	30,900,000	30,900,000		30,900,000	30,900,000	0	
合計	133,900,000	133,900,000	0	133,900,000	133,900,000	0	0

3. 執行額内訳

(単位:円)

費目	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	合計
物品費	180,904	17,806,977	12,628,674	8,103,392	38,719,947
旅費	0	766,500	494,200	1,004,093	2,264,793
謝金・人件費等	0	10,472,362	18,209,548	16,851,286	45,533,196
その他	19,096	6,726,351	6,114,565	3,622,052	16,482,064
直接経費計	200,000	35,772,190	37,446,987	29,580,823	103,000,000
間接経費計	30,000	1,375,544	3,992,590	25,501,866	30,900,000
合計	230,000	37,147,734	41,439,577	55,082,689	133,900,000

4. 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	1	4,976,370	4,976,370	2011/6/23	京都大学
Elix Advantage3	日本ミリポア(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
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
ハイクレーブ(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
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

5. 研究成果の概要

海洋バイオマス(巨大褐藻類)の主成分である酸性多糖アルギン酸やマンニトールをバイオ燃料(エタノール)などの有用物質に変換する新技術の確立が、広大な海域を有する我が国にとって急務である。本研究により、スフィンゴモナス属細菌A1株(A1株)によるアルギン酸からのエタノール生産過程の詳細な解析、A1株によるアルギン酸からのピルビン酸生産の発見(アルギン酸からのエタノール以外の有用物質生産の世界で初めての成功例)、出芽酵母へのマンニトール利用能の賦与の成功(マンニトール有効活用のブレークスルー)などの成果が得られた。本成果は、我が国の広大な海域の開発戦略の推進に寄与すると期待される。

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)
研究成果報告書**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名 (下段英語表記)	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
	Establishment of the practical ethanol-production system from marine biomass by utilizing the bacterium with regulated oxidation-reduction system
研究機関・部局・職名 (下段英語表記)	京都大学・農学研究科・助教
	Assistant Professor, Graduate School of Agriculture, Kyoto University
氏名 (下段英語表記)	河井重幸
	Shigeyuki Kawai

研究成果の概要

(和文): 海洋バイオマス(巨大褐藻類)の主成分(酸性多糖アルギン酸とマンニトール)をバイオ燃料(エタノール)などの有用物質に変換する新技術の確立が、広大な海域を有する我が国にとって急務である。本研究では、スフィンゴモナス属細菌 A1 株(A1 株)によるアルギン酸からのエタノール生産過程の詳細な解析、A1 株によるアルギン酸からのピルビン酸生産の発見(アルギン酸からのエタノール以外の有用物質生産の世界で初めての成功例)、出芽酵母へのマンニトール利用能の賦与の成功(マンニトール有効活用のブレークスルー)などの成果が得られた。本成果は、我が国の広大な海域の開発戦略の推進に大きく寄与すると期待される。

(英文): Establishment of a new technology to convert alginate and mannitol into valuable compounds such as ethanol is urgently needed for Japan that possesses a vast ocean area. Alginate (an acidic polysaccharide) and mannitol are the main components in marine biomass (brown macroalgae). In this study, the followings have been achieved; (i) a detailed analysis of ethanol production from alginate by a bacterium *Sphingomonas* sp. A1, (ii) a remarkable discovery of the production of pyruvate from alginate by this bacterium (the first success in the production of valuable compound other than ethanol from alginate in the world !), and (iii) a success in conferring the ability to utilize mannitol on a budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* (the break-through technology for the effective practical use of mannitol !). These results would greatly contribute to the promotion of the national strategy to develop our ocean area.

1. 執行金額 133,900,000 円

(うち、直接経費 103,000,000 円、 間接経費 30,900,000 円)

2. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

3. 研究目的

【背景】近年、国内外で海洋バイオマス、とりわけ生育速度が高く、巨大な藻体を形成する褐藻類に注目が集まっている。しかし、中性多糖(構成単糖はグルコース)を主たる成分とする陸上バイオマスと異なり、褐藻類は難分解性の酸性多糖(アルギン酸：構成単糖はウロン酸)を主成分(アルギン酸含量は褐藻類の30～60% [乾燥重量あたり]、セルロース含量は僅か10%程度)とするため、かかる難分解性酸性多糖をエタノールに変換する新技術の確立が急務である。

申請者所属の研究室で世界で初めて発見されたスフィンゴモナス属細菌 A1 株(以下 A1 株)は、アルギン酸を強力に代謝する。この代謝系を利用した海洋バイオマスからのエタノール生産システムが、当研究室で検討されている(Takeda et al. Energy Environ. Sci. 2011: 4, 2575–2581)。本システムは、アルギン酸からエタノールを高生産する、現在では世界で唯三つの系の内の一つである(他の系は米国のグループによる、大腸菌および出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を宿主とした系：各々 Science 2012: 335, 308–313, Nature 2014: 505, 239–243;ただし後者は後述するアルギン酸分解物 DEH を出発原料とする)。A1 株のアルギン酸代謝能ならびにエタノール生産能を高めることなどによる、実用的な「海洋バイオマスからのエタノール生産技術」の確立は、グリーン・イノベーションの中核技術として、さらには海洋国家・科学立国日本のエネルギー獲得手段として重要である。

A1 株において、アルギン酸は、アルギン酸分解物 DEH(4-デオキシ-L-エリスロ-5-ヘキソセウロース ウロン酸)を還元する NADPH 型 DEH レダクターゼによる還元反応ならびに Entner-Doudoroff に類似の反応により、ピルビン酸を経由してエタノールへと変換される。ピルビン酸脱炭酸酵素(PDC)およびアルコール脱水素酵素(ADH)は *Zymomonas mobilis* 由来の遺伝子を導入している。ただし、本代謝系の問題点として、少なくとも以下の二点が考えられた。(1) NAD(P)H のリサイクルが非効率であり、エタノール生産性向上の大きな律速になっている。(2) エタノール耐性能が酵母ほど高くない。

一方で、海洋バイオマス(褐藻類)はアルギン酸の他に、著量のマンニトールも含む(季節によるが乾燥藻体の30%程度)。マンニトールはグルコースよりも余分に還元された化合物であるため、その代謝過程では酸化還元のアンバランスが生じる。マンニトールを原料としたエタノールや有用物質生産例は殆ど無い。アルギン酸およびマンニトールからもエタノールや他の有用物質を生産できれば、海洋バイオマスの更なる総合的利用が可能になる。

【研究期間内に明らかにし、また達成する内容】海洋バイオマスからの、エタノール生産性 A1 株や特殊な酵母を用いた実用的なエタノールなどの有用物質の大量生産法を確立するために、以下の(1)～(6)を実施する。(1) A1 株の乳酸(不要な反応副産物)の生成系の遮断。(2) 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。(3) A1 株の NAD(P)H 供給系と再生系の代謝工学的強化。(4) 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。(5) A1 株のエタノール耐性能強化。(6) 酵母によるアルギン酸からのエタノール生産および海洋バイオマス

の総合的利活用。

4. 研究計画・方法

- (1) 乳酸生成系の遮断（乳酸脱水素酵素遺伝子破壊）のアルギン酸からのエタノール生産に対する効果を調べる。
- (2) NADPH 型 DEH レダクターゼ A1-R をタンパク質工学的手法により NADH 型に改変し、当該改変 A1-R 遺伝子をエタノール生産性 A1 株の A1-R 遺伝子破壊株に導入し、NADH 依存型エタノール生産系を構築する。
- (3) エタノール生産系 A1 株の NAD(P)H 供給系と再生系の代謝工学的強化のため、NADP 合成酵素、NADPH 合成酵素、さらには NAD(P)トランスヒドロゲナーゼ、NADPH 再生系、および NADH 再生系各遺伝子を当該 A1 株へ導入し、NAD(P)H 供給系と再生系の代謝工学的強化行う。
- (4) A1 株のエタノール生産性に対する、様々な条件の影響を調べる。アルギン酸からのエタノール生産過程を解析する。ジャーファーメンターを用いたスケールアップ（2 L）も進める。
- (5) 高濃度エタノール耐性株を取得する。
- (6) アルギン酸、マンニトールやセルロースから、さらには褐藻類（アカモク、コンブ）から、エタノールや他の有用物質を生産する。エタノール生産菌として優れた特性を示す酵母も研究対象とし、酵母へマンニトールやアルギン酸の資化能を賦与する。

5. 研究成果・波及効果

- (1) A1 株の乳酸生成系の遮断のエタノール生産に対する有用性を確認した。目的は達成された。
- (2) 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。そこで、海洋細菌 *Croceibacter atlanticus* 由来 A1-R ホモログである新規酵素 CA-R が NADH 型 DEH レダクターゼであることを明らかにし、精製酵素の性質を明らかにした。さらに、予期せぬことに A1 株に NADH 型 DEH レダクターゼを新たに見出し、その精製酵素の性質を決定した。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。**これにより目標が達成され、次への研究展開に必須の重要な成果（新規 NADH 型 DEH レダクターゼの特定）も得られた。**
- (3) A1 株の NAD(P)H 供給系と再生系の代謝工学的強化のため、NADP 合成酵素（大腸菌由来 YfjB）、NADPH 合成酵素（出芽酵母由来 POS5）、さらには NAD(P)トランスヒドロゲナーゼ（大腸菌由来 *udhA*）、NADPH 再生系（*Burkholderia stabilis* 由来 NADPH 型ギ酸デヒドロゲナーゼ *mutBstFDH*）、NADH 再生系（*Micobacterium vaccae* 由来 NADH 型ギ酸デヒドロゲナーゼ *Mcfdh*）、および上記 CA-R 各遺伝子を A1 株のコードンに最適化した上で A1 株プロモーター *sph2987sp* に連結し、エタノール生産性 A1 株へ導入した。これにより NAD(P)H 供給系と再生系の代謝工学的強化を試みたが（再生系では培養系にギ酸を共存させた）、エタノール増産には至らなかった。他方、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、酸化ストレス応答、関連酵素の基質認識に関する知見など **関連分野において顕著な成果が得られた**。就中、ミトコンドリアの NADP 合成酵素（酸化還元系制御の鍵酵素）の発見は、ハイインパクトジャーナル（*Nature Communications* 3:1248 doi: 10.1038/ncomms2262 (2012)）に掲載され、新聞や web でも広く掲載された。

(4) 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、培地各成分、鉄など金属 18 成分、ビタミンなど 20 成分各々の影響を徹底的に調べたが、エタノールの生産性の増大には至らなかった。他方、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毒性因子が分泌されることが示された。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毒性因子を特定すべくメタボローム解析などを行った。毒性因子の除去に関しては、イオン交換体を用いた阻害成分の除去に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。しかし、**ブレークスルーとなり得る知見(pH 制御による毒性因子の弱毒化法)**を得ることができた。かかる pH 制御が後述する酵母 NBRC0259-3 株とエタノール生産性 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**であった。また、メタボローム解析は、後述するアルギン酸からのピルビン酸生産の発見という新しい成果につながった。ジャーファーマンターを用いたスケールアップ(2 L)も進め、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。このように、グリーン・イノベーションの推進に不可欠なアルギン酸からのエタノール生産に関して、重要な一定の成果が得られた。

(5) **高濃度(5.1% v/v [4% w/v])エタノール耐性 A1 株 MK4315 株を得ることができた。**目的は達成された。ただし、本耐性株にエタノール生産系遺伝子を導入するとエタノール耐性能が低下するという新しい問題に直面した。アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の A1 株への導入および同酵素の高発現による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。

(6) ① 酵母 *Saccharomyces paradoxus* NBRC0259-3 株が、これまで知られていたマンニトールからエタノールを生産する微生物 (*Pichia angophorae* と大腸菌 KO11) よりも、マンニトールからエタノールを生産する上でより優良な特性を示すことを明らかにした。本成果により、マンニトールからの実用的エタノール生産への途が大きく拓けた。**本成果に基づき、特許を出願した(10, 11 頁 出願中特許 4, 5)。**

② *S. paradoxus* 株は遺伝子工学手法による機能向上(分子育種)において、宿主として利用できないという問題点があった(宿主ベクター系が開発されていない)。一方で、出芽酵母 *S. cerevisiae* は、宿主ベクター系が完備しており、安全でかつ高いエタノール生産性とエタノール耐性を示し、さらに基礎ならびに応用研究の膨大な蓄積もあるため、エタノールを含む有用物質の生産系としては理想的な生物であるが、マンニトール資化性を示さないという致命的な欠点があった。しかし本研究により、出芽酵母が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)とフロキュレーション(凝集)能を自然に獲得すること、すなわちこれらの能力を出芽酵母に簡単に賦与できることを見出し、当該能力獲得酵母を用いたマンニトールからのエタノール生産が可能であることを実証した(*S. paradoxus* に匹敵する能力であった)。また、この獲得が転写調節複合体 Tup1-Cyc8 コリプレッサーへの自然変異によることも明らかにした。特に *TUP1* 遺伝子でなく *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 (MK4416 株) は、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。マンニトール資化能獲得機序に関しては、エピジェネティックな修飾による同能獲得を示唆する結果も得られた。**これらの成果により、世界中で開発されている様々な物質生産系で、宿主として利用されている出芽酵母にマンニトール資化能を簡便に賦与することが可能になる。すなわち本成果は、マンニトールの更なる利活用への途を拓く画期的かつブレークスルーとなり得る成果である。これらの成果はハイインパクトジャーナル(IP 6.9)に投稿中である。**

③ アルギン酸資化遺伝子群(エキソ型リアーゼ、エンド型リアーゼ、DEH レダクターゼ、キナーゼ、アルドラーゼ: 出芽酵母はこれらの遺伝子を有さない)を出芽酵母型コドンに至適化した上で人工合成し、出芽酵母に導入し、エキソ型リアーゼ以外の全遺伝子の機能的発現に成功した。これは、出芽酵母へのアルギン酸資化能の賦与技術の確立にとって着実かつ大きな前進であった。**本成果により、出芽酵母へのアルギン酸利用能の賦与に目処がついた。**出芽酵母にラミナリン資化能を賦与することにも成功した。

④ A1株培養液のメタボローム解析の過程で、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。これにより、アルギン酸から様々な有用化合物を生産する途が拓けた。これは、**アルギン酸からのエタノール以外の有用物質生産の世界で初めての発見例となった。本成果に基づき、特許を出願した(10頁 出願中特許 1, 2)。**

⑤ 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。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。アカモクの糖およびメタル成分の分析も実施した。また、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。エタノール生産性A1株と上記MK4416株を用いたアカモクとコンブからのエタノール生産も試みた。

波及効果

日本は海に囲まれた島国であり、この海域で得られる海洋資源の有効活用は日本にとって切実な問題の一つである。我が国の1年間の使用ガソリン量(約0.5億kL)の1/10量(E10ガソリンを想定)に匹敵するバイオエタノールをトウモロコシでまかなうためには、日本の全国土面積(山林、居住区も含めて)の約6.7%が必要、コメなら約8.8%が必要と試算される。一方、コンブからの場合、日本の国土面積の約5.6%必要だが、これは日本の排他的経済水域の約0.47%であり、試算上は充分にこれだけ著量の「国産」海洋バイオマスの確保が可能である。

本助成の成果に基づく更なる研究による、この広大な日本の海域で海洋バイオマス(藻類)を適切に栽培し(このための技術も開発される必要がある)、得られたバイオマスから微生物の力でバイオ燃料や素材系有用物質を生産する技術(補助事業者はかかる技術を「マリンバイオリファイナリー技術」と称している)を確立するという新しい海洋資源活用技術の確立が期待される。かかる新技術の実用化により、海洋バイオマス(藻類)の栽培量が増大する。その結果、海洋における二酸化炭素吸収(固定)の増大による低炭素化社会の構築への寄与が期待できる。さらに、藻場効果(褐藻類が海洋環境を改善し、魚介類の産卵場や揺籃場を提供し、魚介類の生産量が増大する効果)による魚介類生産高の向上および水産業・食品産業の振興という波及効果も期待できる。

6. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 12 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 8 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 オープンアクセス URL: https://www.landesbioscience.com/journals/bioe/article/27397/ 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, <u>Shigeyuki Kawai</u>, & 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 7. 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 8. 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 2 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 9. <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). 10. <u>河井重幸</u>: 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 2 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 11. 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
------------------------	---

	<p>12. 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>
<p>会議発表 計 36 件</p>	<p>(○;発表者) 専門家向け 計 30 件 国内会議(一般講演)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 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、○<u>河井重幸</u>(京大院・農) 2. 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、<u>河井重幸</u>(京大院・農) 3. 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 ○<u>河井重幸</u>、川畑 豊、村田幸作(京大院・農) 4. 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) 出芽酵母コリプレッサー 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、<u>河井重幸</u>(京大院・農) 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) 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、<u>河井重幸</u>(京大院・農) 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、<u>河井重幸</u>¹(¹京大院・農、²マルハニチロ) 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) 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、<u>河井重幸</u>(京大院・農) 8. 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、<u>河井重幸</u>(京大院農) 9. 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、<u>河井重幸</u>(京大院・農) 10. 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 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、<u>河井重幸</u>、橋本 渉、村田幸作(京大院・農) 11. 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、○<u>河井重幸</u>(京大院・農) 12. 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) 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

	<p>登, <u>河井重幸</u>, 村田幸作(京大院・農)</p> <p>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 25 日) マリンバイオリファイナー: <i>Sphingomonas</i> sp. A1 株によるアルギン酸からのピルビン酸の生産 ○<u>河井重幸</u>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)</p> <p>14. 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) 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、<u>河井重幸</u>、村田幸作(京大院・農)</p> <p>15. 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) 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 ○<u>河井重幸</u>、大橋一登、川畑 豊、村田幸作(京大院・農)</p> <p>16. 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) 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 ○<u>河井重幸</u>、大橋一登、川畑 豊、村田幸作(京大院・農)</p> <p>17. 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) エタノール生産性 <i>Sphingomonas</i> 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、<u>河井重幸</u>、村田幸作(京大院・農)</p> <p>18. 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) NAD(H)駆動型エタノール生産性 <i>Sphingomonas</i> 属細菌 A1 株の構築 ○高瀬 隆一、橋本 渉、<u>河井重幸</u>、村田幸作(京大院農)</p> <p>19. 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) 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)</p> <p>20. 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) 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)</p> <p>21. 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) 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)</p> <p>22. 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) 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)</p> <p>23. 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) 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 ○<u>河井重幸</u>、太田安里、柳澤満則、村田幸作(京大院農・食品生物)</p> <p>24. 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) 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、<u>河井重幸</u>、村田幸作(京大院農・食品生物)</p>
--	--

<p>25. 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) 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、<u>河井重幸</u>、村田幸作(京大院・農)</p> <p>研究発表会</p> <p>26. 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) 海洋バイオマスからのバイオエタノールの生産戦略 ○<u>河井重幸</u>、村田幸作(京大院・農)</p> <p>シンポジウム</p> <p>27. 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 ○<u>河井重幸</u>(京大院・農)</p> <p>28. 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) 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~ ○<u>河井重幸</u>、中道優介、吉岡 彩、村田幸作(京大院・農)</p> <p>国際会議(招待講演)</p> <p>29. FASEB Science Research Conference, NAD Metabolism & Signaling (Eaglewood Resort & Spa, Chicago, IL, USA, 2013 年 7 月 15 日) NAD(H) kinase: the key enzyme for NAD(H) & NADP(H) cross-talk. ○<u>Shigeyuki Kawai</u> (Kyoto University, Japan)</p> <p>国際会議(一般講演)</p> <p>30. International 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) Production of the third generation bioethanol from mannitol, a promising renewable carbon source in marine biomass. ○<u>Shigeyuki Kawai</u>, Anri Ota, Kousaku Murata (Kyoto University, Japan)</p> <p>一般向け 計 6 件(下記、「国民との科学・技術対話」と重複)</p> <p>31. 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 ○<u>河井重幸</u>(京大院・農)</p> <p>32. 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」 ○中條 萌絵子、○藤井麻理、○吉田志織、○<u>河井重幸</u>(京大院・農)</p> <p>33. 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、対象: 大学、企業、一般。参加者約 200 名、2013 年 11 月 20 日) 「海洋バイオマスからの有用物質ピルビン酸の生産」 ○吉田志織、○藤井麻理、○<u>河井重幸</u>(京大院・農)</p> <p>34. 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</p>

	<p>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>35. 京都大学アカデミックデー-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、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>36. 科学・技術フェスタ in 京都 2011 (国立京都国際会館、京都市、参加者数 延べ 5,090 人[2 日間、関係者含む]、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)</p>
<p>図書 計 1 件</p>	<p>1. 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 計 5 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件</p> <p>(出願中) 計 5 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 出願番号 14/189513(アメリカ合衆国) 出願日 2014 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>2. 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 2013-173668 出願日 2013 年 8 月 23 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>3. 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>4. 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 (アメリカ合衆国) 出願日 2012 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 株式会社マルハニチロホールディングス</p> <p>5. 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 出願日 2011 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 株式会社マルハニチロホールディングス</p>

<p>Webページ (URL)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 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 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 3. 京都大学アカデミックデイ, 京都大学 HP, http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news4/2012/120902_1.htm 4. 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, 一般財団法人 大阪科学技術センターHP, http://www.ostec.or.jp/tec/nature_theme.pdf 5. 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, 京都大学 HP, http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2012/121205_2.htm 6. トピックス賞, 日本農芸化学会 2013 年度大会 HP, https://jsbba.bioweb.ne.jp/cgi-bin/jsbba2013/jsbba_table.cgi?topics=1 7. 京都大学が「科学・技術フェスタ in 京都 2011」に出展します, 京都大学 HP, http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news7/2011/111212_1.htm 8. トピックス賞, 日本農芸化学会 2012 年度大会 HP, https://jsbba.bioweb.ne.jp/cgi-bin/jsbba2012/jsbba_table.cgi?topics=1 9. 京都大学 農学研究科 生物機能変換学分野、研究者所属の分野 HP, http://www.molbiotech.kais.kyoto-u.ac.jp
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 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) 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更なる課題を共有し、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。 2. 京都大学アカデミックデイ-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) 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。 3. 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) (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>4. 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～(2012年11月20日 大阪科学技術センター、大阪市、対象:産業界および公的機関関係者ならびに一般。参加者約240名) 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」という演題で、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。</p> <p>5. 京都大学アカデミックデーみんなで対話する京都大学の日(2012年9月2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。)「微生物のちからで海藻から燃料をつくる」という演題で、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。</p> <p>6. 科学・技術フェスタ in 京都 2011(2011年12月16日、国立京都国際会館、京都市、対象:一般。参加者数 延べ5,090人[2日間、関係者含む])「海藻からバイオ燃料を大量につくる」という演題で、京都大学出展企画で、ちゃぶ台を挟んで国民との科学・技術対話を実施した。</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載計7件</p>	<p>1. 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>2. 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」</p> <p>3. 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</p> <p>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</p> <p>5. 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」</p> <p>6. 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</p> <p>7. 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」</p>
<p>その他</p>	<p>該当無し。</p>

7. 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])。
- ・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。
- ・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 本研究成果を基礎とした発展研究「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。