<table>
<thead>
<tr>
<th>タイトル</th>
<th>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</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>著者</td>
<td>清水 昌</td>
</tr>
<tr>
<td>発行年</td>
<td>2006-05</td>
</tr>
<tr>
<td>URL</td>
<td><a href="http://hdl.handle.net/2433/85076">http://hdl.handle.net/2433/85076</a></td>
</tr>
<tr>
<td>条件</td>
<td>学術雑誌掲載論文の抜き刷り、出版社に著作権許諾が得られていないため未掲載。</td>
</tr>
</tbody>
</table>

京都大学 学術情報リポジトリ
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

（研究課題番号 13853009）

平成１３年度～平成１７年度科学研究費補助金（基盤研究（S））
研究成果報告書

平成１８年５月
汎用型不斎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

（研究課題番号 13853009）

平成13年度～平成17年度科学研究費補助金（基盤研究（S））
研究成果報告書

平成18年5月

研究代表者 清水 昌
（京都大学農学研究科教授）
はしがき

本研究では、様々な光学活性アルコール類の生産プロセスに利用可能な「汎用型不斎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斎還元システムの構築を目指して研究を進めた。その結果、所期の目的を達したので本報告書を作成した。

研究組織

研究代表者：清水 昌（京都大学・農学研究科・教授）
研究分担者：片岡道彦（京都大学・農学研究科・助教授）
研究分担者：小川 順（京都大学・農学研究科・助手）
研究分担者：喜多恵子（京都大学・農学研究科・教授）
（研究協力者：長谷川淳三（株）カネカ）

交付決定額（配分額）

<table>
<thead>
<tr>
<th>年度</th>
<th>直接経費</th>
<th>間接経費</th>
<th>合計</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>平成13年度</td>
<td>29,000,000</td>
<td>8,700,000</td>
<td>37,700,000</td>
</tr>
<tr>
<td>平成14年度</td>
<td>25,700,000</td>
<td>7,710,000</td>
<td>33,410,000</td>
</tr>
<tr>
<td>平成15年度</td>
<td>15,700,000</td>
<td>4,710,000</td>
<td>20,410,000</td>
</tr>
<tr>
<td>平成16年度</td>
<td>13,400,000</td>
<td>4,020,000</td>
<td>17,420,000</td>
</tr>
<tr>
<td>平成17年度</td>
<td>11,100,000</td>
<td>3,330,000</td>
<td>14,430,000</td>
</tr>
<tr>
<td>総計</td>
<td>94,900,000</td>
<td>28,470,000</td>
<td>123,370,000</td>
</tr>
</tbody>
</table>

（金額単位：円）
研究発表

（1）学会誌等

4. 清水 昌. 微生物生産の将来を図る望. 「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)
5. 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)


26. 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解.
農化誌, 78 (1), 4-13 (2004)

27. 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 - とらし
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

Characterization of alkaliphilic laccase activity in the culture supernatant of
Myrothecium verrucaria 24G-4 in comparison with bilirubin oxidase.

Schmid, S. Shimizu. Metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins by
(2004)

Shimizu. Expression of the Fusarium oxysporum lactonase gene in Aspergillus
oryzae - molecular properties of the recombinant enzyme and its application-


cytochrome P450 BM-3 and modulation of activity by cumene hydroperoxide.
Biosci Biotechnol Biochem., 69 (2), 293-300 (2005)

33. Ogawa, J., S. Kishino, A. Ando, H. Sugimoto, K. Mihara, S. Shimizu. Production of
conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. J. Biosci. Bioeng., 100 (4), 355-364
(2005)

34. 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)

35. 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

Shimizu. Gene cloning of an NADPH-dependent menadione reductase from
Candida macedoniensis, and its application to chiral alcohol production. Enzyme

37. 片岡 達彦, 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)

Shimizu: A novel NADP+-dependent L-1-amino-2-propanol dehydrogenase from
Rhodococcus erythropolis MAK154: A promising enzyme for the production of


（2）口頭発表

1. 中村幸宏、片岡道彦、桝谷英治、北伸二、津崎和也、坂本恵司、森川忠則、清水昌：Rhodococcus erythropolis MAK154からのも amino-alcohol dehydrogenase 遺伝子のクローニングと大腸菌での発現．平成13年度日本生物工学会大会，平成13年9月

2. 本田孝祐、片岡道彦、清水昌：Acinetobacter calcoaceticus F46由来3,4-dihydrocoumarin hydrolaseによる過酢酸の分解．平成13年度日本生物工学会大会，平成13年9月


4. 本田孝祐、片岡道彦、清水昌：Acinetobacter calcoaceticus F46の生産するDihydrocoumarin hydrolaseの機能解析と応用．酵素工学研究会第46回講演会，平成13年10月

5. 清水昌、片岡道彦：補酵素再生系と共役させたカルボニル還元酵素を用いる汎用型不斉還元システムの構築とキラルアルコール合成への利用．ビタミンB研究委員会第385回会議，平成13年12月

6. M. Kataoka, K. Mori, H. Kawabata, S. Shimizu: Alteration of stereospecificity of L-allo-threonine aldolase of Aeromonas jandaei. 3rd International Symposium on Vitamin B6, PQQ, Carbonyl Catalysis and Quinoproteins, 平成14年4月

7. 片岡道彦、小高敦史、長谷川晶子、清水昌：Candida属酵母由来の旧黄色酵素はモノニ重結合を不斉還元する．日本ビタミン学会第54回大会，平成14年4月

8. S. Shimizu, M. Kataoka, K. Honda: Lactonases, lipase-like enzymes, from microorganisms: Their properties and application to the synthesis of chiral compounds. 93rd AOCS Annual Meeting & Expo，平成14年5月

9. 坂本恵司、和田浩一、北伸二、森川忠則、片岡道彦、清水昌：新酵素法によるD-パントラクトンの工業生産：酵素工学研究会第47回講演会，平成14年5月

10. S. Shimizu, M. Kataoka: Construction of a novel bioreduction system for large-scale production of chiral alcohols. 9th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, 平成14年7月

11. M. Wada, A. Yoshizumi, M. Kataoka, S. Shimizu, S. Nakamori: Production of optically active alcohol using levodione reductase and old yellow enzyme. 9th
International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, 平成 14 年 7 月
16. 小高敦史、長谷川晶子、片岡道彦、和田 大、今住あゆみ、中森 茂、清水 昌: 酵母の Old Yellow Enzyme の諸性質と不斉還元反応への利用. 日本農芸化学会 2002 年度関西支部大会, 平成 14 年 10 月
17. 小高敦史、片岡道彦、橋谷英治、和田 大、今住あゆみ、中森 茂、清水 昌: Candida macedoniensis の old yellow enzyme 遺伝子のクローニング. 平成 14 年度日本生物工学会大会, 平成 14 年 10 月
18. 片岡道彦、長谷川晶子、清水 昌: Candida macedoniensis AKU4588 由来の carbonyl reductase 遺伝子のクローニング. 平成 14 年度日本生物工学会大会, 平成 14 年 10 月
20. 片岡道彦: 微生物の生産する β-ヒドロキシ-α-アミノ酸アルドラーーゼの立体選択性変動と構造機能解析. 第 28 回日本応用酵素協会研究発表会, 平成 14 年 11 月
21. 清水 昌、片岡道彦、和田 大: 不斉還元触媒としての Old Yellow Enzyme. ビタミン B 研究委員会第 390 回会議, 平成 14 年 12 月
22. 長谷川晶子、小高敦史、片岡道彦、清水 昌: Candida macedoniensis 由来の 2 種の ketoisophorone reductase に関する研究. 日本農芸化学会 2003 年度大会, 平成 15 年 3 月
23. 森 孝司、斎藤英樹、片岡道彦、清水 昌: L-allo-Threonine aldolase の立体選択性変動と変異酵素の解析. 日本農芸化学会 2003 年度大会, 平成 15 年 3 月
24. 本田孝祐、片岡道彦、清水 昌: Fusarium oxysporum 由来ラクトナーーゼ遺伝子の麹菌内での発現と組換え酵素の解析および DL-バントラクトン不斉加水分解への応用. 日本農芸化学会 2003 年度大会, 平成 15 年 3 月
25. 清水 昌、片岡道彦、和田 大: 一価カチオンで活性化される NADH-依存性 Levodione Reductase: 諸性質の解明と 4R,6R-actinol 生産への利用. ビタミン B 研究委員会第 392 回会議, 平成 15 年 5 月
29. 本田孝祐, 片岡道彦, 清水 昌: *Fusarium oxysporum* 由来ラクトナーゼの *Acremonium chrysogenum* による分泌生産. 平成 15 年度日本生物工学会大会, 平成 15 年 9 月
31. 片岡道彦: 工業用触媒として期待される「ラクトナーゼ」の新機能開発. 第 29 回日本応用酵素協会研究発表会, 平成 15 年 11 月
32. 本田孝祐, 片岡道彦, 清水 昌: *Acinetobacter calcoaceticus* の生産する芳香族ラクトン加水分解酵素. 第 2 回脂質工学研究部会講演会, 平成 15 年 12 月
34. M. Kataoka: Lactonases and carbonyl reductases useful for large-scale production of chiral alcohols. BioCat 2003, 平成 15 年 12 月
35. 片岡道彦: 2つのキラル中心を持つ化合物の酵素的合成. 21 世紀 COE 第 1 回産学官ミニシンポジウム, 平成 16 年 2 月
36. 片岡道彦: キラル化合物生産のための微生物酵素の探索と機能開発. 21 世紀 COE 国際シンポジウム「京大農学研究科における微生物機能の開発研究」, 平成 16 年 3 月
37. 松永亜希子, 本田孝祐, 片岡道彦, 清水 昌: *Pseudomonas* sp. 3-1 株由来(R)-δ-decanolactone 加水分解酵素の精製とその諸性質の解明. 日本農薬化学会 2004 年度大会, 平成 16 年 3 月
38. 本田孝祐, 野崎晋也, 片岡道彦, 清水 昌: *Rhodococcus erythropolis* 由来の FMN 依存性 L-パントラクトンデヒドロゲナーゼ遺伝子のクローニングと大腸菌における発現させの構築. 日本農薬化学会 2004 年度大会, 平成 16 年 3 月
39. 片岡道彦, 岡 哲大, 浦野信行, M. A. Akond, 清水 昌: *Mucor ambiguus* 由来の NADPH 依存性共役ポリケトン還元酵素の構造解析と遺伝子クローニング. 日本農薬化学会 2004 年度大会, 平成 16 年 3 月
40. 石毛たける, 浦野信行, 福井聡子, 北 伸二, 津崎和也, 坂本恵司, 森川忠則, 片岡道彦, 清水 昌: 補酵素再生系導入による d-ephedrine 高効率生産株の構築. 日本農薬化学会 2004 年度大会, 平成 16 年 3 月
41. 石毛たける, 福井聡子, 浦野信行, 北 伸二, 津崎和也, 坂本恵司, 森川忠

43. 和田 大、片岡道彦、清水 弘、横田 篤: *Corynebacterium glutamicum* 中での発現と立体選択性. 日本農芸化学会 2004 年度大会, 平成 16 年 3 月

44. 本田孝祐、片岡道彦、倉原 信、小林達彦、清水 昌: *Agrobacterium tumefaciens* 由来 L-パントラクトン加水分解酵素遺伝子の発現系の構築とその応用. 日本農芸化学会 2004 年度大会, 平成 16 年 3 月


47. S. Shimizu, M. Kataoka, K. Honda: Microbial Lactonases: Screening and application to the large-scale production of chiral alcohols. biocat 2004, 平成 16 年 8 月


49. 石毛たる、福井聡子、浦野信行、北 伸二、津崎和也、坂本恵司、森川忠則、片岡道彦、清水 昌: *Rhodococcus* 由来カルボニル還元酵素を用いた *d*-pseudoephedrine の 生産. 平成 16 年度日本生物工学会大会, 平成 16 年 9 月

50. 石毛たる、福井聡子、浦野信行、北 伸二、津崎和也、坂本恵司、森川忠則、片岡道彦、清水 昌: *Rhodococcus erythropolis* 由来のアミノアルコール脱水素酵素の機能解析と不斉還元反応への利用. 日本農芸化学会 2004 年度関西支部大会, 平成 16 年 10 月


52. 松永亜希子、本田孝祐、片岡道彦、清水 広: *Pseudomonas* sp. 3-1 株由来 (R)-8-decanolactone 加水分解酵素の精製、諸性質の解明および遺伝子クローニング. 酵素工学研究会第 52 回講演会, 平成 16 年 11 月

53. 浦野信行、石毛たる、福井聡子、片岡道彦、北 伸二、坂本恵司、清水 昌: 組換え大腸菌を利用した *d*-pseudoephedrine 高効率生産法の開発. 酵素工学研究会第 52 回講演会, 平成 16 年 11 月

Development of Thermotolerant Microbial Resources and Their Applications,
平成 16 年 11 月
55. 片岡道彦: 古くて新しい酵素「茶黄色酵素」の新規触媒機能の開発と応用—第 30 回日本応用酵素協会研究発表会, 平成 16 年 11 月
56. 松永亜希子、本田孝祐、片岡道彦、清水 卿：8属細菌由来(R)-8-デカノラクトン加水分解酵素の構造・機能解析. 第 3 回脂質工学研究会部講演会, 平成 16 年 12 月
57. 浦野信行、石毛猛、福井聡子、片岡道彦、北 伸二、坂本恵司、清水 卿: Rhodococcus erythropolis MAK154 株における aadA 遺伝子周辺領域の解析. 日本農芸化学会 2005 年度大会, 平成 17 年 3 月
58. R. Thiwthong, 星野昌子, 樋口七生, 石毛たける, 片岡道彦, 清水 卿: Candida macedonensis 由来のカルボニル還元酵素遺伝子の大量発現とキラーールコースの生産プロセスへの利用. 日本農芸化学会 2005 年度大会, 平成 17 年 3 月
59. 本田孝祐、松永亜希子、片岡道彦、清水 卿: Pseudomonas sp. 3-1 由来 (R)-8-decanolactone hydrolase の遺伝子解析と応用 1. 日本農芸化学会 2005 年度大会, 平成 17 年 3 月
60. 松永亜希子、本田孝祐、片岡道彦、清水 卿: Pseudomonas sp. 3-1 由来 (R)-8-decanolactone hydrolase の遺伝子解析と応用 2. 日本農芸化学会 2005 年度大会, 平成 17 年 3 月
61. 礦部公安, 佐々木康孝, 尾野紀夫, 岩崎 晃, 長谷川淳三, 小川 順, 片岡道彦, 清水 卿: Pseudomonas 属細菌が産生する新規アルデヒドオキシダーゼの精製と酵素質. 日本農芸化学会2005年度大会, 平成 17 年 3 月
62. 野崎晋也, 本田孝祐, 橋本義輝, 小林達彦, 片岡道彦, 清水 卿: Rhodococcus erythropolis における L-ベントラクトンデヒドログナーゼの発現とその解析. 日本農芸化学会 2005 年度大会, 平成 17 年 3 月
63. 坂本恵司, 和田浩一, 北 伸二, 津崎和也, 能勢英恵, 峰時俊貴, 坪井宏和, 本田孝祐, 片岡道彦, 清水 卿: ラクトナーゼによる D-ベントラクトンの工業生産. 日本農芸化学会 2005 年度大会, 平成 17 年 3 月
64. 清水 卿, 小川 順, 櫻谷英治, 片岡道彦: 炭素間 2 重結合の変換に関わる微生物反応の探索と開発. 日本農芸化学会 2005 年度大会, 平成 17 年 3 月
65. 片岡道彦: 微生物酵素の機能開発とキラーインダストリーへの利用. 酵素工学研究会第 53 回講演会, 平成 17 年 4 月
66. S. Shimizu, M. Kataoka, J. Ogawa: Screening and development of unique microbial reactions useful for large-scale production of chiral compounds. BIOTRANS 2005, 平成 17 年 7 月
68. 浦野信行, 石毛たける, 福井聡子, 片岡道彦, 北 伸二, 坂本恵司, 清水 卿: Rhodococcus erythropolis MAK154 株由来アミノアルコール脱水素酵素遺伝子の解析と有用物質生産への応用. 日本農芸化学会 2005 年度関西・中四国・西日本支部合同大会, 平成 17 年 10 月
69. S. Shimizu, M. Kataoka, J. Ogawa: Screening and applications of unique microbial
enzymes useful for the production of chiral compounds. Enzyme Engineering XVIII,平成 17 年 10月
70. M. Kataoka, A. Hoshino, R. Thiwthong, N. Higuchi, T. Ishige, S. Shimizu: Carbonyl reductase from Candida macedoniensis: Gene cloning, and application to the bioreduction system. Enzyme Engineering XVIII, 平成 17 年 10月
71. 浦野信行、福井聡子、片岡道彦、北 伸二、坂本恵司、清水 昌: Rhodococcus erythropolis MAK154 株由来アミノアルコール脱水素酵素遺伝子の解析. 酵素工学研究会第 54 回講演会, 平成 17 年 10月
72. 野崎晋也、本田孝祐、橋本義輝、小林達彦、片岡道彦、清水 昌: Rhodococcus erythropolis における L-パントトラクトンデヒドロゲナーゼ遺伝子の発現と解析. 酵素工学研究会第 54 回講演会, 平成 17 年 10月
73. M. Kataoka: Biocatalytic resolution of racemic pantoyl lactone for industrial production of D-pantothenate. Pacific Rim Summit on Industrial Biotechnology and Bioenergy, 平成 18 年 1月
74. 片岡道彦、杉山典子、松永亜希子、本田孝祐、清水 昌: 微生物によるラクトン化合物の生成および分解反応の探索. 日本農芸化学会 2006 年度大会, 平成 18 年 3月
75. 野崎晋也、本田孝祐、橋本義輝、小林達彦、片岡道彦、清水 昌: Rhodococcus erythropolis による L-パントイルラクトンの立体反転. 日本農芸化学会 2006 年度大会, 平成 18 年 3月
76. 浦野信行、石毛たける、福井聡子、片岡道彦、北 伸二、坂本恵司、橋本義輝、小林達彦、清水 昌: Rhodococcus erythropolis MAK154 株におけるアミノアルコール脱水素酵素の発現と d-pseudoephedrine の生産. 日本農芸化学会 2006 年度大会, 平成 18 年 3月
77. 福井聡子、浦野信行、石毛たける、北 伸二、坂本恵司、片岡道彦、清水 昌: ランダム変異導入による高安定型 amino-alcohol dehydrogenase の取得. 日本農芸化学会 2006 年度大会, 平成 18 年 3月
78. 片岡道彦、桑原ふみ、R. Thiwthong, 清水 昌: Torulopsis sp.由来の Old yellow enzyme の機能解析. 日本農芸化学会 2006 年度大会, 平成 18 年 3月
79. 礦部公安、加藤彩子、若尾紀夫、岩崎 晃、長谷川淳三、小川 順、片岡道彦、清水 昌: Aspergillus ochraceus AIU031 が産生するアルコール酸化酵素の精製と諸性質. 日本農芸化学会 2006 年度大会, 平成 18 年 3月
80. 礦部公安、加藤彩子、鈴木脩也、若尾紀夫、岩崎 晃、長谷川淳三、小川 順、片岡道彦、清水 昌: Paenibacillus 属細菌が産生する新規アルコール酸化酵素の精製と諸性質. 日本農芸化学会 2006 年度大会, 平成 18 年 3月
81. 礦部公安、佐々木康孝、三坂裕一、若尾紀夫、岩崎 晃、長谷川淳三、小川 順、片岡道彦、清水 昌: Burkholderia 属細菌が産生するアルデヒドオキシダーゼの精製と諸性質. 日本農芸化学会 2006 年度大会, 平成 18 年 3月

研究成果 別添の通り