

ERATO 浅野酵素活性分子プロジェクト事後評価（最終評価）報告書

【研究総括】浅野 泰久（富山県立大学 生物工学研究センター／教授）

【評価委員】（敬称略、五十音順）

加藤 博章（京都大学 大学院薬学研究科／教授）

木野 邦器（早稲田大学 先進理工学部／教授）

五味 勝也（委員長；東北大学 大学院農学研究科・農学部／教授）

須貝 威（慶應義塾大学 薬学部／教授）

高木 忍（ノボザイムスジャパン株式会社 研究開発部門／シニア マネージャー）

評価の概要

ERATO 浅野酵素活性分子プロジェクトは、酵素の利用分野を拡大するために、酵素を利用した新規有用物質生産あるいは生体成分分析の分野で必要な基礎的研究を行い、将来のホワイトバイオテクノロジーの発展に貢献することを目標とした。目標達成に向け、プロジェクトでは、新しい酵素分子や遺伝子資源の探索研究、新しい酵素利用技術の開発を行う探索研究、見出された酵素の応用利用に必要な支援技術の開発、さらに産業界との連携による実践的な研究を実施している。分子生物学、生物化学、生態学ならびに情報科学などの幅広い観点から取り組まれた融合的かつ挑戦的な構想であり、ある程度達成が見込まれる研究テーマと未知への挑戦の色彩が強い研究テーマとがバランス良く、合理的に計画された。運営面においてもプロジェクトグループを機能別に酵素工学、生物有機化学、生物資源探索（第2年度までは化学生態学）の3つに分け、専門分野の異なる若手研究員をグループリーダーに据えるなど、効率的・相乗的かつ人材育成に繋がるような工夫がなされており、独創的な成果に繋がったと思料する。

探索研究においては、微生物から広く動植物に探索範囲を広げるというチャレンジングな試みの結果、有用な新規酵素を見出し新たな産業酵素の発見の可能性、そして戦略の妥当性を示すこととなった。さらに、生物間における代謝経路の違いを上手く組み合わせた効率的な有用物質生産経路の提案により、バイオプロセス開発における新たな可能性を示すことにもなった。また、酵素の産業利用をさらに拡大するため、独創的な発想のもと、シアン化物を使用しないエナンチオ選択的ニトリル合成法の開発等、新規反応系や新規酵素反応の開発に成功している点は、学術的な意義も高く評価できる。また、従来のタンパク質工学の手法を組み合わせ、種々の応用に展開可能なことを示した点も評価できる。

支援技術開発においては、異種タンパク質の可溶化発現技術開発を目的とした研究が実施された。この研究開発では学術的かつ応用的に非常に有用な知見と成果が得られてきており、方法論の新規性とその実績の観点から高く評価したい。また、構造－機能特性解析を支援するソフトウェア INTMSAlign を開発し、酵素の *in silico* スクリーニングを可能にしたのみならず、可溶化発現のための変異アミノ酸の予測にも活用できることを示した成果は、生化学解析や構造生物学と計算科学の融合による新たな酵素研究手法とその有用性を提示したという点で、研究分野に与えるインパクトは大きいと考える。実用化を目指したさらなる改良と信頼性の向上に期待する。

プロジェクトが発足した平成 23 年度から平成 29 年 12 月までに、発表論文 54 報（投稿

中 4 報を含む）、特許出願 27 件（8 件の国際特許を含む）、書籍・総説 16 報、学会発表 265 件（45 件の招待講演を含む）など順調に成果を挙げた。

産業界との連携による実用化基盤研究においても、実用性が十分に検討された課題が設定されており、十分に進展していることが示されたと評価できる。酵素の可溶化発現達成といった支援技術での成果が実用化レベルで活かされたことやユニークなアミノ酸定量法も提案されており、研究成果の有用性が広まることが期待される。

本プロジェクトでは、酵素の産業利用に向けた高水準の研究が進められ、ホワイトバイオテクノロジーの確立に向けた進展が期待できることから、戦略目標である「二酸化炭素の効率的資源化の実現のための植物光合成機能やバイオマスの利活用技術等の基盤技術の創出」の達成に資する十分な成果をあげていると認めることができる。

## 1. 研究プロジェクトの設定および運営

### 1-1. プロジェクトの全体構想

本プロジェクトは、酵素応用の観点からより幅広い研究対象を設定し、新たな酵素分子の探索とそれらの機能解析、さらには産業への応用を目的とし、分子生物学、生物化学、生態学ならびに情報科学等の幅広い観点から研究に取り組んだ。これまでに蓄積された知見と技術を基盤としている点でダイナミックさや革新性にやや欠ける点もあるが、研究対象を拡大し、その利用可能性を着実に検証する方法論の確立と実証は今後の酵素工学の研究や産業利用に大いに参考となる構想になっていた。また、目的達成に向け、基盤研究と実用化基盤研究という 2 本柱のもとで研究が実施され、それぞれの研究から得られた成果や知見を互いに利用できる課題構成となっていた。

本プロジェクトの全体構想では、構造研究者や機能化学研究者等、複数分野の研究者が混じり合うヘテロな集団を組織し、日常的に多面的な議論を活性化させ、新しい研究を誘発することを目指した。従来の酵素科学研究において別々に実施されて来た分子構造の研究と酵素反応の機能研究が連携する体制の構築により、分子構造を機能研究に有効活用することを可能等にした点は特徴的であり、産業利用に必要な具体的酵素の詳細な基礎研究を実現している。さらに、化学生態学と生体触媒化学を組み合わせ、新しい研究を創発しようという試みも、これまで誰も発想しなかったアプローチである。異種タンパク質の可溶化発現に向けたタンパク質フォールディングや酵素開発研究支援プログラムソフトの開発など、目覚ましい技術の開発が行われた。

以上のように、本プロジェクトは、新たな視点が盛り込まれ、挑戦的かつ融合的な全体構想のもとで実施され、また着実に実を結んでいると評価できる。他の研究者等との連携や共同研究等、今後、外部とのより積極的な交流により、開発技術の効率的な普及・波及や外部からの情報取得によるさらなる研究加速が期待できる。

### 1-2. プロジェクトの目標・計画

本プロジェクトでは、従来から多くの研究が蓄積されている微生物に対象を限定せず、植物や動物（特に節足動物）まで拡大して、新たな酵素分子を探索しその機能を解明するとともに、見出された酵素機能を有用物質生産や疾病診断などに有効活用するための基盤技術の開発といった具体的な目標設定と計画の立案がなされた。この目標達成に向け、基盤研究と実用化基盤研究という 2 本柱のもとで研究が実施されており、基盤研究では「新規酵素およ

び酵素遺伝子資源の探索と発見」、「酵素を用いる新規有用物質生産技術の開発」を行う探索研究と、「新規可溶性発現技術の開発」、「情報科学の応用技術開発」を行う支援技術開発を行った。

探索研究、支援技術開発、実用化基盤研究というそれぞれのフェーズの中で、実用化に必要な研究項目が設定されているため、一見、ややオムニバスの印象を与えるが、ある程度達成が見込まれる目標と未知への挑戦の色彩が強い目標とがバランスよく計画され、また研究過程で得られた新規技術を研究技法として活用も視野に入れ、計画期間内に中核となる成果が得られる合理的な研究計画であった。

探索研究のテーマとして、第一に「新規酵素および遺伝子資源の探索と発見」が挙げられる。酵素探索の対象を微生物から動植物に拡大し、新規酵素・遺伝子資源としての産業利用に資するという目標達成に向けた探索課題として、特に「アルドキシムーニトリル経路関連酵素」の探索とその機能解析が計画された。この領域に関しては研究総括が築き上げてきた研究基盤を生かした研究が実施可能であり、世界的にも極めて優位性が高いと考えられる。また、新規酵素や生合成経路の解明に留まらず、基質特異性についても考慮しながら一般性の高い触媒創製をめざしている点は高く評価できる。探索研究の第二のテーマである「酵素を用いる有用物質生産技術開発」に関しては、研究総括の研究成果を基盤としてタンパク質工学による酵素機能の改変や新規酵素反応の開発、「酵素的結晶変換法」による物質生産技術の開発等といった実用化を目指した研究計画が組まれており、適切であると考えられる。

支援技術開発では、探索的な基盤研究をサポートするため、大腸菌での異種タンパク質の可溶化発現技術開発を目指す「新規可溶性発現の開発」として、実験科学的研究と理論的研究を組み合わせた研究が計画された。また、上記の研究領域から得られた成果や着想を基盤として、主に構造的側面から研究を支援する情報科学的な課題も設定されており、研究支援ソフトウェア INTMSAlign の開発等に繋がっている。新たに見出された酵素の機能解析のために必須な技術課題であり、また本プロジェクトの単なる支援技術としてだけでなく、より広範な酵素化学研究に利用されることが期待される重要な課題設定であると判断した。

実用化基盤研究においては、主に企業との共同研究を推進することで、有用性の高い酵素の物質生産への利用や実用化可能なアミノ酸定量法の開発を目指した。実用化が目標となっているため、対象とされる酵素の種類が様々であり、相互の関連性が見えにくい点はあるが、それぞれの開発目標に沿った研究が進められることにより、基盤研究で見出された酵素機能の産業への利用の課題が明らかにされることが期待できる。支援技術の有用性を企業との共同研究で示したのは意義深い。

酵素のさらなる産業利用を見据えて、これまでに無い新しい基盤技術の開発から実用化のための基盤技術開発まで、狙ったところは幅広く雄大で有意義だった。探索から実用化までの縦の道筋が確立されたので、今後はこれを横に太く育てていくことが望まれる。

### 1-3. プロジェクトの運営

研究総括の強力なリーダーシップによって着実に運営され、酵素工学、化学生態学、生物有機化学、構造生物学、生物情報学等バックグラウンドの異なる優秀な若手研究者を一カ所に集めて切磋琢磨させることにより、それぞれの専門を統合した理想的な酵素研究への取り組みが可能となり、独創的な成果を挙げたと評価できる。若手研究者に加え、豊かな経験を持つ総括補佐、研究員を招聘しアドバイザー的に機能させる等、プロジェクトの屋台骨を支える役割についても考慮した運営がなされた。また、それぞれの専門家が、同一の研究目標

の達成に必要な専門外の分野を学べる体制により、将来独立して研究運営を行う際には、複合的な研究グループをリードできると判断する。また、酵素の応用研究を分子構造の基礎から合理的に進めるための研究体制ができており、構造生物学のアプローチによる分子構造基盤から酵素の単離精製と機能解析、反応解析と利用法への技術展開を協奏的に実施する体制で運用された。今後は、異分野の知見等も積極的に取り込みながら、本研究グループでの経験を生かした新たな研究手法の開発・発展にも取り組むことを期待する。

一方、研究総括がこれまでに高い業績を上げた分野での研究テーマアップと研究実施であったため、従来と比較して挑戦的かつ創造的ではあったが、現時点ではイノベーション創出の途上であると考え。プロジェクトの成果を活かした国内外における大学・企業との共同研究は行われているが、より活発に研究成果を展開させ、拡がりを持たせる研究活動になると、さらなる発展が期待できる。近年では、微生物や植物の生合成系酵素を主たる対象として、生合成遺伝子クラスター内の一連の酵素遺伝子をクローニング・発現させると同時にそれらを組み合わせ、さらに非天然型基質から出発する「生合成工学」領域の研究が盛んに行われている。今後は薬学分野との共同研究にまで拡げることでより効果的な成果の実用化が期待できる。

本プロジェクトの実施機関である富山県立大学は ERATO のような大型研究プロジェクトを単独で運用する機関としては規模が小さいこともあり、プロジェクトヘッドクォーターが研究支援や知的財産権利化等の事務処理に果たす役割は大きい。少人数であるが専属のスタッフを確保し、大学の事務部と連携して研究実施にあたったことは研究遂行に有用であった。特に知的財産権利化については顕著な成果が認められ、それぞれの成果の知的財産権利化が着実に行われていることは高く評価できる。また、研究成果についても、国内外の学会等での発表をはじめ、シンポジウムや国際学会の開催にも積極的に取り組んでおり、特に国際学会では、発表内容に関して高い評価を得ていることが伺われる。

研究費の執行状況に問題は認められず、全体としてバランスの取れたものとなっていた。研究に必要な先端機器の導入も研究計画と合致するように行われており、それらを活用したことで成果が得られていると評価できる。導入された先端機器の多くは、当該地域において極めて利用価値が高く、富山大学等近隣機関の研究者からの利用要請にも応じることで、地域の高度機器センターの役割も担っていたと拝察される。

以上のように、効率的・相乗的であり、人材育成にも繋がる運営がなされていると評価できる。

[研究プロジェクトの全体構想] [研究プロジェクトの目標・計画] [研究プロジェクトの運営]

a+ (十分に的確かつ効果的である)

## 2. 研究の達成状況および得られた研究成果

### 2-1. 探索研究「新規酵素および遺伝子資源の探索と発見」

本研究では、培養という技術が適用できなかったため、ほとんど有用酵素の探索対象となつてこなかった動物（特に多様な種の存在が予想されている節足動物）や植物を産業用酵素の遺伝子資源の対象として、新規酵素分子の発見とその産業利用を目指しており、チャレンジングな取り組みとして評価できる。遺伝子組換え技術の発展により、動植物由来の酵素であっても微生物を宿主として大量生産が可能になったからこそ設定できた時宜を得た開

発課題であったといえる。

従来の方法とは異なり、研究総括がこれまでに成果を挙げてきたニトリル代謝酵素に着目し、節足動物や植物の化学生態学の研究成果を巧みに利用することで合理的な探索経路を組んで、粘り強く検討を実施し、新規反応酵素の発見に到達している点は、極めて新鮮で独創的であり、特筆に値する。また、本プロジェクトの推進によって、植物由来酵素研究の有用性が示された点は、これまで生理学・遺伝学が中心であった植物分野の研究への波及効果が大きいと判断する。また、ユニークな反応を触媒できる酵素を発見することのみに留まらず、発見した酵素の基質特異性と反応特異性のメカニズムについても X 線結晶解析を基盤とする解明に取り組んで、成果を挙げていること、また、その成果がタンパク質工学的研究での触媒設計合成の成功に結びついている点も高く評価できる。

研究手法としては、ニトリル化合物を中間体として利用する代謝経路を有する植物や節足動物をターゲットとして、トランスクリプトーム解析から反応を触媒する可能性のある候補酵素遺伝子を探索する方法と、代謝経路の中間体を基質として酵素活性を指標にした酵素精製法というオーソドックスな方法を併用した。現在は前者の手法がより効率的であることから一般的かつ大多数で用いられているが、後者の方法を利用することがヤスデから既知の酵素の比活性や安定性を凌駕する新規のヒドロキシニトリアーゼ (HNL) を発見することに繋がった点は、酵素探索法として従来法が依然として有用であることを示したものと評価でき、波及効果が大きい成果であったと言える。あわせて、微生物から広く自然界の生物に探索範囲を広げて成果を得たことは、動植物が有用酵素の探索対象として非常に有用であることを示しており、新たな産業酵素の発見の可能性と共にその戦略の妥当性を裏付けるものとなった。さらに、生物間における代謝経路の違いを上手く組み合わせ、効率的な有用物質生産経路を提案することにもなり、バイオプロセス開発における新たな可能性を示すことにもなったと評価できる。

本研究では、植物や節足動物等から未知の機能を有する新規酵素が発見できる可能性を示した点で十分な成果が得られたと考えるが、今後、動植物から効率良く新規酵素を探索するための適切な方法を提示できるとより大きな波及効果が期待できる。今後、共同研究や委託研究を拡大することにより、ダイナミックな展開に繋がると期待される。

化成品原料としてのニトリル化合物は現実の工業生産において有用であることは評価できるが、将来の産業革新を考えると、これからニーズが期待される化合物や医薬品等の付加価値の高い化合物の生産を目標として、発見した合成経路や酵素の利用可能性を示すことが求められる。従来行ってきた酵素工学系学会等での成果発信に加え、薬学やプロセス化学といった分野への情報発信や専門家との議論により、本法の適用分野に新たな展開を図ることが期待できると考える。

## 2-2. 探索研究「酵素を用いる新規有用物質生産技術の開発」

本プロジェクトでは、酵素の産業利用をさらに拡大するため、有用物質生産に利用可能な酵素を自然界から探索するだけでなく、特異性や安定性等産業利用上の障害となる酵素の性質を改良することで、工業上利用可能な新規有用物質の生産を可能にしたと考えられる。また、新規酵素反応の開発、新たな物質生産技術としての「酵素的結晶変換法」の開発を行うことにより、従来は生産できなかった立体化学の化合物の生産を可能にすること、環境負荷の高いシアン化合物を用いることなく有用化合物の生産を行うこと、そして、天然の酵素では不可能とされていた反応を触媒できる酵素の創出といった成果を得ている。これらの研究

は、ユニークな発想をもとに進められており、学術的な意義も高く評価できる。また、従来のタンパク質工学の手法を組み合わせ、種々の応用に展開可能なことを示した点も評価できる。

本プロジェクトで試みたタンパク質工学による酵素機能の改変の成果の一つは天然型として報告のない *R*-選択的アミノ酸化酵素の創製である。プロジェクトはブタ腎臓由来 *D*-アミノ酸化酵素の立体構造に基づき、メチルベンジルアミンの結合様式を推定し基質の相互作用に関与すると考えられるアミノ酸をターゲットに部位特異的変異導入を合理的に行うことにより、基質特異性が異なり天然型として報告のない *R*-選択的アミノ酸化酵素を創製することに成功した。また、得られた変異型酵素をデラセミ化反応に利用して、光学活性アミンの合成に成功するとともに、ニトリラーゼと共役させることにより非天然型アミノ酸の合成にも成功している。本成果は X 線結晶構造解析による分子構造を基に、有機化学反応のメカニズムを明らかにして、合理的にタンパク質工学を実施した結果として得られたもので、変異を導入することで酵素の改変を実現する従来の方法とは異なり分子構造を基盤とする研究の有用性を示し、今後の方向性を照らす指針となることが期待できる。現時点ではメカニズムが完全に理解されたとは言えないが、その解明に必要な多くの構造学的データはすでに蓄積されており、その解析（分析）を究めることで同酵素の立体制御に関する化学的な法則性の解明が期待できる。

また、アルドキシム脱水素酵素を用いた新規反応開発においては、酵素反応の化学的メカニズムに対する洞察から、環境負荷の高いシアン化合物を使用せずにニトリル基を導入する反応経路の開拓に成功している。これにより、環境問題と工業生産の調和を図るための解決に資するモデルを提供できているといえる。さらに、置換基を有するより複雑な化合物で、医薬品の中間体等、付加価値の高い化合物は多いことから、酵素触媒の価格低下次第では新しい実用的ルートとして活用される可能性がある。

酵素を用いた有用化合物の合成反応の効率化のために、溶解度が低い反応産物の特性に着目した「酵素的結晶変換法」による物質生産技術の開発にも取り組んだ。具体的には、基質として溶解度の低いリボフラビンから同様に溶解度の低い反応産物のルミクロムを生産する目的で、この変換能を有する細菌をスクリーニングし、リボフラビンを含む培地で培養または休止菌体を用いた反応を進めることにより非常に高い収率でルミクロムの結晶を得ることに成功した。これらは、当プロジェクトの開発した真に独創的な物質生産方法として評価することができる。高濃度の反応基質を用いることが可能であることから、小さな容器で大量の化合物の化学変換を有機溶媒なしで生産できる点で大きな有用性があり、プロセス化学のコンセプトとして魅力的である。例えば、溶解性が低く加水分解に不適な化合物群であるポリフェノール配糖体群へ適用し、糖部分を除去したアグリコンを得る等具体的な有用物質・医薬品中間体等の製造が可能であることを示すことができれば、従来の高温強酸性条件下での反応に変わる省エネルギー・低コスト・低環境負荷の製造工程を実現できると期待される。今後は、薬学会やプロセス化学会等での成果紹介や議論を通して、医薬品製造等の具体的な応用事例の実現へ繋げることが期待される。また、ルミクロムの生産については、簡便かつ高収率であることから、大規模試験の実施が望ましいと考える。さらに、実際の工業的生産技術として結晶体を取得する方法として成立させるためには、化学工学的な知識に基づく技術も必要になると考えられ、今後、企業との共同研究等を検討して、本技術のブラッシュアップを図ることも重要と考えられる。

一方、本技術の適用範囲を拡大させることを目的として、溶解度の低い反応産物を生じる酵素反応のデータベースの構築にも取り組み、プロトタイプのデータベースが構築できた。

本データベース化の取り組みは興味深く、今後、データベースを完成させ、利用例を増やすことにより、候補反応予測の有用性の実証に繋げていくことを期待したい。

### 2-3. 支援技術

本テーマでは、新規酵素の探索や有用物質生産技術の開発をサポートする技術開発として、大腸菌における異種タンパク質の可溶化発現技術開発を目的とした研究が実施された。この研究開発では学術的かつ応用的に非常に有用な知見と成果が得られてきており、方法論の新規性とその実績の観点から高く評価したい。

異種タンパク質の生産には大腸菌が用いられることが多いが、高発現させた場合に目的のタンパク質が不溶化して封入体となってしまいうという問題がある。これを回避するため、タンパク質の可溶化技術について様々な手法が検討されてきたが、適用可能なタンパク質に限られるといった限界があるため、適用範囲の広い新たな可溶化技術の開発が強く求められている。本プロジェクトでは製造過程への利用可能性を優先課題とし、立体構造の厳密な保持、天然型のタンパク質自身の機能解明を目的とした従来の構造生物学分野における可溶化技術開発とは異なる視点で、「化学反応に利用可能な酵素を得る」という明確な開発目的のもと、酵素利用の研究開発現場のニーズに合った技術開発が実施された。

タンパク質工学によって得られた変異型 HNL が可溶化発現するという発見をヒントとして、大腸菌で封入体を形成する酵素に対してランダム変異の導入を行い、取得された可溶化した変異型酵素のアミノ酸変異の情報を集積・解析することで、可溶化発現に重要な構造的特性を明らかにすることに成功した。また、変異導入により可溶化した酵素のスクリーニングに抗生物質耐性マーカーを利用している点も大変興味深い。

異種タンパク質生産においては分泌酵素（タンパク質）の効率的な発現・生産は産業上非常に重要な課題である。その点で今回開発された可溶化発現技術が大腸菌だけではなく酵母にも適用できたことは興味深い。酵母での効果は細胞内酵素で示されたものだが、分泌酵素についても分泌生産性の向上に繋がるようなタンパク質の構造上の特性が解明されれば、産業的に極めて大きなインパクトになると考えられる。

酵素タンパク質の一次配列情報をもとに構造-機能特性解析を支援するソフトウェアとして INTMSAlign を開発し、酵素の *in silico* スクリーニングを可能にした。本ソフトは、可溶化発現のための変異アミノ酸の予測にも活用されており、支援技術としての役割は十分に果たしている。タンパク質が折り畳まれる際の過程の物理化学的な原理に基づき、可溶化の予想的中率を現在の 50% からさらに向上させることが可能ではないかと考える。解析を進め、さらに多種の異種由来酵素が可溶化発現を可能とする法則を見出すとともに、実用化を目指した改良と利用者を増やすことによる経験値の蓄積により信頼性を向上し、実用的な製品へと育むことが期待される。近年データベースに蓄積されている大量のアミノ酸配列データと計算科学によるタンパク質の構造予測を融合し、実用性向上のための変異解析を行うという着眼点はユニークである。今後、ユーザーフレンドリーなソフトウェアとして公開され、広く利用されることが期待される。

産業界ではタンパク質工学により酵素の特性改変は日常的に行われているが、特性向上の理由を解明することは稀である。本研究のように学術的な裏付けとなる原理を結晶構造学等との連携研究により明らかにし、その裏付けをもって改変に成功した事例を積み重ね、公表することはタンパク質科学やタンパク質工学において重要であり、新規な学術領域の開拓に繋がるものと考えられる。上述のように本支援技術開発の意義と必要性は極めて高く、課題の抽

出と解決に注力する価値がある。今後は、大腸菌・酵母以外の宿主にも適用可能な汎用性の高い可溶性発現技術の開発も期待したい。

#### 2-4. 実用化基盤研究

本テーマでは、基盤研究とは別に酵素の産業利用を促進することを目的として、開発された成果の実用性と汎用性を検証するために、民間企業との共同研究による実用化基盤研究が立案された。産業界からの要望を加味していることもあり、対象となった酵素の種類も様々であるが、植物から探索された酵素を用いた有用物質生産技術が開発されており、新たな酵素探索源としての植物の有用性が示された。

もう一つの実用化基盤研究として、アミノ酸定量用酵素の探索と定量法の開発を行った。微生物から基質特異性の高い酵素をスクリーニングし、タンパク質工学や進化分子工学的的手法による酵素機能の改変を行うことにより、特異性の高いアミノ酸定量法を開発することに成功した。また、それとは別にアミノアシル tRNA 合成酵素のアミノ酸特異性に着目した高精度なアミノ酸定量法や乳酸菌のアミノ酸要求性と発光法を利用した迅速なアミノ酸定量法の開発にも成功した。技術的にも独創性の高い、新たな考えに基づく内容で、研究総括の研究の強みが十分に発揮されていると評価できる。今後、自動化等に対応した技術開発がなされれば、新たな定量法として普及する可能性があると考えられる。

ムスク類生産用酵素の開発においては、新たに見いだされた酵素を用いた  $\beta$ -置換大環状エノンの還元によるムスコンの不斉合成へのアプローチは有用であるが、目下のところ逆の面選択性を示す還元系のみが得られている。ムスコンは絶対立体配置が香気に大きく影響するため、目的とする還元酵素の開拓は非常に大切であるため、さらなる検討が望まれる。

本研究において取り組まれた研究は、いずれも実用性が十分に検討された課題が設定されており、十分に進展していることが示されたと評価できる。

#### 2-5. プロジェクト全体

本プロジェクトは研究総括が築いてきた酵素化学分野における優れた実績と強力なリーダーシップのもと、効果的に研究資源が活用され、プロジェクトが基盤研究における探索の目標として掲げた「新規酵素および酵素遺伝子資源の探索と発見」、「酵素を用いる新規有用物質生産技術の開発」、ならびに支援技術開発の目標である「新規可溶性発現技術の開発」、「情報科学の応用技術開発」について、それぞれ中心となる画期的な、当初の期待以上の成果が得られと判断する。また、企業との共同研究を含む「実用化基盤研究」においても、着実に進展したと考える。研究は全般的に高い水準にあり、短い期間で成果を出していることから、精力的に研究が進められたと思われる。使用した技術は必ずしも新しいものばかりではないが、研究のアプローチが大変ユニークである。経験の無い研究員には難しい技術も含まれているが、上手に使いこなしていることから、本プロジェクトチームの技術の高さが窺える。

基盤研究における具体的な取り組みとしては、従来の対象とされていた微生物から未開拓な探索源である動植物、特に節足動物等に対象を広げ、新たな酵素分子の探索とそれらの機能解析、さらには産業への実用化を目指して、分子生物学、生物化学、生態学ならびに情報科学等の幅広いアプローチで研究を実施した。基盤研究においては、探索研究からこれまで報告のない新規な酵素が動植物から見出され、当初の目的通り、動植物が有用酵素の探索源



として極めて有用であることを実証することができた。本研究では、機能性の異なる酵素を異種生物から見出すことに成功し、また生物間における代謝経路の違いを上手く組み合わせ、効率的な有用物質生産経路の提案もしており、バイオプロセス開発において新たな可能性を示すと共に、酵素活性分子の統合利用の優れた成果が得られている。即ち、本研究プロジェクトの方法論は、従来の方法とは異なり、化学生態学等との協奏により科学的な研究展開が図られたことによる成果で有り、今後の酵素工学の研究や産業利用に大いに参考となると考えられる。大腸菌に代わる遺伝子発現宿主としてメタノール資化性酵母の大量発現系を利用することにより、困難だった新規遺伝子資源の活用が可能となり、応用範囲の拡大と実用化に道が開けている。

また、タンパク質工学等の手法を活用して、酵素の基質特異性や安定性等の改変を行うことにより、新たな反応特性を有する酵素の創出や産業上利用価値の高い酵素機能の付与にも成功した。さらに大腸菌による異種タンパク質発現において可溶化タンパク質として発現させるためのアミノ酸変異部位の予測を可能とした方法は、帰納法による大量データの解析や詳細な立体構造解析等を基盤とした極めて独創的であり、実用性も期待できる。本技術へのニーズの高さから、この技術のブラッシュアップは是非とも必要であり、今後も発展・継続してもらいたい。

また、実用化基盤研究においても、様々な酵素を用いて有用物質生産やアミノ酸定量法の開発を可能としており、学術研究だけでなく産業的な酵素利用の領域に対しても大きく貢献することが期待される成果を得た。

研究成果については、54 報の論文が公表されている。ほとんどの研究がプロジェクトで開始されたものであることを考えると、十分な論文発表数であると判断できる。国際的に評価の高いジャーナルに掲載されている論文もあり、海外への研究成果の発信も十分行われている。また、大腸菌での可溶化発現技術に関する論文が日本農芸化学会発行の *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* に掲載され、平成 28 年度の論文賞を受賞するなど、専門領域の学会や会合等において高い評価が得られている。知的財産権の取得も精力的に行われている。今後、開発された生産技術の有効性を高めるためには、適用範囲の拡大や改良が必要となることから、研究によって開発された技術を利用する側の専門家等に向けて発表や議論を行うことで、開発技術の応用範囲の拡大を目指すことを期待する。

〔研究の達成状況および得られた研究成果〕 a+（十分に高い水準にある）

### 3. 研究成果の科学技術、社会・経済への貢献

#### 3-1. 科学技術への貢献

本プロジェクトにおいて、これまでに無い基盤技術の開発や動植物を対象とした産業用酵素の探索等これまで行われて来なかった試みを始めとするユニークなアプローチにより成果を出してきた事は、これまでの酵素研究の進め方に対して一石を投じるものであり、他の多くの研究者を刺激すると思われる。酵素を巧みに利用した化合物の生産技術を開発する専門領域において、当プロジェクト研究グループの成果は、国内外の当該領域の研究と比較して突出しており、国際的にも高い評価が得られるものと期待できる。

これまで報告のない新規な酵素が、探索対象となっていなかった植物や節足動物から見出され、微生物のみならず、植物や動物が新規酵素の探索源として極めて有用であることが明

らかとなり、今後の有用酵素探索に新たな道を開くことに繋がった。特にヤスデの生活環からニトリル代謝経路に着目して目的の活性タンパク質を得ようとした発想は、極めて新鮮で独創的であり、粘り強く検討を実施した結果の新規酵素の発見は、波及効果が大きい成果であったといえる。雑誌 *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America (PNAS)* の表紙を飾る等国際専門誌やマスコミでも注目され大きく取り上げられたこともそれを物語っており、当該研究分野のステータスを高める等、大きく貢献したものと判断できる。今回探索で取り上げた酵素は、動植物の生体防御に係る物質の合成経路に関するものであり、生理学的にも有用な知見が得られている。酵素は反応特異性を持つことにその特徴があるが、特異性を意図的に改変できることを示したのは、後続にとって良い参考例となる。今回開発された可溶性発現技術は、幅広く多様なタンパク質に応用可能であることが示され、意義深い。異種タンパク質の大腸菌による発現において可溶化タンパク質として発現させる技術開発は、帰納法による大量データの解析を駆使するという、従来とは異なるコンセプトに立脚しており、極めて独創的で、産業利用への大きな貢献が期待される成果である。構造に基づく部分的特異的改変や、データベースを活用した酵素タンパクの可溶化のように、研究グループの予想をはるかに超える成功を的確に活かして、さらに成果を高めていると判断する。

今後、すでに存在する生産系の改良だけでなく、将来的に需要が見込まれる新たな製品開発への応用展開の可能性を示すことができれば、さらに成果の付加価値を高めることができると考える。また、研究成果のみではなく、学会等における生物化学分野や生命情報科学分野との連携、企業との情報交換推進の提言や、国際シンポジウムの開催等を通じて、広い分野の研究発展に貢献したといえる。

### 3-2. 社会・経済への貢献

現代社会の課題である、省エネルギー・省資源・低環境負荷の有用物質生産を実現するために、優れた科学技術基盤が明らかにされている。これら社会的課題の解決に、有用酵素の応用利用が有効であることを具体的に示した点は、プロジェクトの貢献として高く評価できる。

特に支援技術として開発中の異種タンパク質の可溶化発現技術は、タンパク質を扱う研究や産業に大きな期待と可能性を示すものであり、あらゆるタンパク質に応用可能な技術に発展させられれば、酵素産業だけでなく医薬品産業にも活用できる可能性が高い。また、実用化基盤研究で実施したアミノ酸定量用酵素による新規なアミノ酸定量法の確立についても、アミノ酸の定量キットや「アミノインデックス」に繋がる技術として、社会・経済への貢献度も高いと思われる。

今回の研究対象には産業界上に有用であると考えられるものもあるが、産業上のインパクトについては今後、この技術が普及するについて次第に明らかになると思われる。今後、開発された基盤技術をよりインパクトの高い分野に還元することにより、社会・経済に大きな影響を及ぼす応用に繋がることが期待される。国内外への積極的な成果の発信によって、本研究成果の有用性が明らかになり、国際的専門誌やマスコミにも注目されより多くの共同研究への展開も進められた。当該研究分野の重要性が示され、科学技術の発展のみならず社会・経済へ大きく貢献したと考える。

〔科学技術への貢献〕〔社会・経済への貢献〕 a+（十分な貢献が期待できる）

#### 4. その他特記すべき事項

##### 4-1. 若手研究者支援

人材雇用に決して有利とは言えない地域において、多くの若手研究者を採用し、研究グループとして生物学、有機化学、情報科学というヘテロな研究集団の中で連携して研究を推進することにより、十分な研鑽が積まれ、人材育成に大いに貢献していると考えられる。6名の正規の大学教員や特任教員、公設試験場の研究員等を排出していること、また各研究グループリーダーにも若手研究者を任命し、その結果、それぞれに重要なアカデミアポストを獲得しており、本研究プロジェクトは人材育成やキャリア支援に大いに貢献したと言える。人材育成は一日で成るものではないが、数年後には数多くの発展例を見ることが期待される。若手研究者支援は研究総括が最も心を砕いた分野ではないかと思われ、本 ERATO プロジェクトのメンバーの系譜を見ると、非常に柔軟な人材交流が良好な結果を生んだと思われる。

##### 4-2. アウトリーチ活動

研究成果の発信は極めて積極的に行われており、国際専門誌への論文掲載や国内外の学会での発表、国際会議やシンポジウムの開催等を実施した。成果を公表する学会等の領域が従来よりも拡大され、日本蛋白質科学会や日本分子生物学会などにおいても開発された技術の基盤となる学術的成果発表や討論が行われ、各専門領域との交流や学術評価を受けるに至っていることから、開発された研究手法や応用技術の利用促進や改良がさらに拡大されるものと期待される。なお、日本農芸化学会で2年連続でトピックス賞を受賞したのは特記に値する。

一般向け研究活動紹介についても、これまで8回実施しており、地元新聞紙との協力体制も確立されている。また、毎年開催されるアジア最大の展示イベントである BioJapan をはじめ、これまでに8回の展示出展を行いプロジェクトの成果を発信する等、十分なアウトリーチ活動を行ってきていると評価できる。今後、開発された技術の利用者となる可能性のある専門家や企業技術者に向けた紹介活動を行うことにより、応用範囲がさらに広がることが期待できる。本プロジェクトでは優れた成果を得たので、今後の研究も含め、社会に対して幅広く成果を伝えるように積極的に活動していただくことを期待する。

#### 5. 総合評価

本プロジェクトは、研究総括の専門分野を内容濃く展開し、新規な酵素分子探索と酵素機能の活用による有用物質生産に向けた基盤技術開発に挑んだものである。卓越した研究総括のもと、構造生物学、化学生態学、有機化学、酵素工学、生物情報学等、異なる専門分野を習得した若手を一同に集め、幅広いアプローチにより酵素科学とその応用に関する優れた研究体制を構築し、完成度の高い、実用的な酵素とそれを利用した反応系を創出することに成功した。特に、異なる分野の若い専門家が日常的に議論を行える研究環境を実現することにより、従来の専門研究室間の共同研究では実現できなかった詳細なメカニズムの解明を、有用物質生産に用いる個々の具体的な酵素分子に対して達成できている点は特筆に値する。

研究総括のバックグラウンドを活かした研究であり、研究内容が十分にブラッシュアップ

され、有用性が高く評価された一方で、従来技術の組み合わせもあったため、すべての成果が大きなイノベーションを引き起こす革新的な成果であったとは言えないが、それぞれの研究において提案される戦略や考え方には独創性や新規性が認められる。

生物の多様性に期待して、その生活環と生存戦略に着目した新規有用酵素の探索はこれまでも試みられているが、酵素・遺伝子資源を植物や動物（節足動物）に求めた点はチャレンジングな取り組みと考える。ニトリル代謝酵素に着目し、生物界におけるこの代謝系の意義を踏まえつつ、具体的な酵素の発見に至った点は高く評価できる。また、微生物以外の生物に探索範囲を広げて成果を得たことは、新たな産業酵素の発見の可能性を示し、その戦略の妥当性を裏付けるものとなった。さらに、生物間における代謝経路の違いを上手く組み合わせ、効率的な有用物質生産経路を提案することにもなり、バイオプロセス開発における新たな可能性を示すことにもなった。帰納法による大量データの解析を駆使して基本開発に成功したタンパク質の可溶化発現の技術は、従来とは異なるコンセプトに立脚しており、極めて独創的で高い実用性が期待できる成果であると考えられる。

本研究プロジェクトは多くの高評価論文を公表しており、研究成果の広範囲な研究領域への情報発信の努力もなされている。また、大学や企業との共同研究も積極的に取り組んでいることが十分に窺われる。その方法論と併せ、科学技術の発展に大きな貢献をしたと判断する。実用化基盤の創出という本プロジェクトの思想をより明確に打ち出していくことで、本プロジェクトの成果はより際立ってくるものと思われる。高水準の酵素技術の開発に成功しており、今後の進展への期待は非常に大きい。今後は、プロジェクトで開発された技術を基幹問題解決に活用すること、また現時点では未開拓の分野での酵素の利用を進めることで、環境負荷の低減を考慮した新たな産業を生み出し社会経済の持続的な発展に寄与することが期待される。

以上より、戦略目標である「二酸化炭素の効率的資源化の実現のための植物光合成機能やバイオマスの利活用技術等の基盤技術の創出」の達成に資する十分な成果が得られると評価する。

〔総合評価〕 A+（戦略目標の達成に資する十分な成果が得られた）

以上