

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2016～2020

課題番号：16H06450

研究課題名(和文) 二次代謝経路の一次代謝化技術による稀少機能分子の高効率生産系の構築

研究課題名(英文) Evolving titer and regulations of the secondary metabolic pathways

研究代表者

梅野 太輔(Umeno, Daisuke)

千葉大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：00400812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 55,400,000円

研究成果の概要(和文)：宿主細胞には常在する代謝ネットワークがあり、人工生合成経路の導入は、両者の少なからぬ相互干渉を生じる。Design-abilityを第一義とする合成生物学では、この相互干渉の最少化のための様々な技術体系を生み出してきた。ただしこの、一種「アパルトヘイト的」な生合成工学の立場は、生合成経路の高効率な運転を二の次とするものである。入植者(人工経路)と先住民(宿主の代謝ネットワーク)とのよき関係を模索する、「融和主義的」生合成リデザイン学を目指し、以下2点における「二次代謝経路の一次代謝化」に挑戦する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高効率なテルペノイドの前駆体の供給経路を完成させることによって、さまざまな稀少テルペンの生合成研究が可能となるほか、産業的価値が認められる数多くの有価テルペンの高効率生産と社会実装に貢献できた。また、テルペン酵素そのものの活性改良や機能発散のスキームを完成させたことによって、テルペン生産のもう一つのボトルネックである酵素そのものの脆弱性・性能の低さを克服する足掛かりができた。また、任意性の高い生合成中間体のバイオセンサの製作技術を完成させ、それを使った生合成改良が可能となった。この手法を多用することで、生合成経路の再デザインの歩留まりが大きく高まるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Mix-and-match of biosynthetic genes, followed by extensive directed evolution round has enabled biosynthesis of various non-natural or even extra-natural compounds. To improve the titers of these artificial pathways, they should be nicely embedded into the metabolic networks of host organisms. In this project, (1) we tried to co-evolve exogenous terpenoid pathway and endogenous precursor pathway to improve both to the unprecedented level. Multi-round evolution isolated terpene synthase mutants with improved cellular activity, alongside with greatly improved precursor suppliers. Also, (2) we developed technology to create enzyme-based biosensors, which enable screening-based pathway design for various natural/unnatural compounds. Based on the evolutionary platform for sensors and enzymes, we have established pathways toward more than 50 novel compounds with unique biophysical/ photochemical properties.

研究分野：進化分子工学

キーワード：進化分子工学 合成生物学 生合成 ランダム変異 テルペノイド スクリーニング 共進化 酵素

1. 研究開始当初の背景

(1) 天然物(二次代謝物)は微量成分として合成されるため、二次代謝経路をなす生合成酵素は、同種反応を担う一次代謝酵素とくらべると、じつに平均30倍も活性が低いという(*Biochemistry*, 50, 4402 (2011))。このような「筋目の悪い」酵素を集めて生合成経路を再構成しても、宿主の内在酵素に競り負けてしまっただけでは効率的な生産は叶わない。このように、二次代謝酵素の活性改良の必要性は頻りに論じられるが、実際にそれを実施した例は殆ど例がない。骨格が複雑で各論性の高い天然物の活性スクリーニング手法の不在により放置されている状況にあった。一方、多様な分子骨格も、その原料レベルでは意外なほど少ない共通の前駆体を経るものである。

(2) 宿主に導入した人工経路(あるいは酵素)の活性があまりに高すぎると、細胞増殖に必要な前駆体を吸い上げることになり、基質枯渇毒が生じることになる。この問題を避けながら高出力経路を敷設する場合は、人工経路の吸い上げぶんを補償できる、より強い前駆体供給経路への逐次的な換装が、同時に行わねばならないはずである。このような状況はどの経路でも起こり得るはずであるが、現状ほとんど記述がなく、この想像上の未来課題への対処技術を志向した研究は報告がない。

(3) 宿主細胞には常在する代謝ネットワークがある。そして人工生合成経路の導入は、前駆体の奪い合いのみならず、コファクターバランスの崩れやプロダクトへの生理応答、酵素レベルでの副反応など、様々な相互干渉が生じることになる。予測可能な建設を第一義とする合成生物学では、この相互干渉の最少化のための様々な技術体系が生み出されてきた。しかし、この一種「アパルトヘイト的」な立場で行われる生合成工学は、資材とエネルギー供給者である宿主細胞との協奏的・共創的な関係を構築する要素を排除しており、生合成経路の高効率な運転を二の次とするものであった。高出力運転を指向した次世代の「生合成リデザイン」には、入植者(人工経路)と先住民(宿主の代謝ネットワーク)とのよき関係を模索する「融和主義的」生合成リデザイン学を目指す必要があるに違いない。

2. 研究の目的

(1) 特定の生産物ではなく、この共通原料の消費活性を指標とした天然物骨格の合成酵素の汎用的な活性スクリーニング系によって、前駆体を共有する様々な酵素の活性改良を実現できないか。本研究では、テルペノイド・イソプレノイドの前駆体経路の代謝工学を通じて、その前駆体(イソペンテニルニリン酸)の蓄積毒性による増殖阻害(細胞死)を飛躍的に高めた。ここで実現する前駆体の異常蓄積から宿主をレスキューする効果をスクリーニング指標として、様々なテルペン骨格形成酵素の活性進化工学を行うことにした。

(2) 上の(1)の実験によって高活性化したテルペン酵素(具体的にはイソプレン合成酵素とグラニオール合成酵素の変異体)の強制発現によって、テルペノイド原料の枯渇状態を作り出すことができると期待される。この枯渇状態が強ければ、高い細胞増殖阻害を作り出すことができるだろう。この状態から宿主をレスキューする能力を指標とした、上流経路の活性に対する選抜系を確立すること、そして、その選抜系を用いて、実際に各種テルペノイド前駆体供給経路の活性改良を試みる。また、(1)テルペン酵素活性の進化工学と(2)上流経路の進化工学を交互に実施し、両者の「共進化」によるテルペン活性の超高効率化に挑戦した。

(3) 人工経路と宿主の代謝ネットワークの建設的・互恵的関係の進化デザインを歩留まり良いものとするためには、(1) 細胞の生理状態を適切に感知し、自らの出力調節を行う機能、(2) 自らの起動がもたらす代謝ネットワークへの摂動を軽減・補完する機能、の搭載が不可欠である。そして代謝ネットワークと生合成経路の相互作用は、予測不能かつ多点にわたるため、その「良き関係」は、コンビナトリアル試行のもとでこそ見つかるものと考えられる。本研究では、その第一歩として、細胞の各種内部状態を検知するセンサの高速開発技術の確立と、様々な重みづけでそれら複合情報を統合する「多入力演算機能」のシリーズ創出技術を確立した。

3. 研究の方法

① **上下流経路の共進化によるテルペン生合成経路の活性改良**: 本研究では、外来(人工)経路と内在経路の接点に着目し、内在酵素に競り勝ち、十分な前駆体を人工経路に引き込めるテルペン酵素の進化工学、テルペン酵素発現がもたらす原料(イソペンテニルニリン酸)枯渇を補償する高効率な上流経路の進化工学、を交互に行い、両者単独ではなし得ないレベルの高効率なテルペノイド細胞生産系を確立する。

② **宿主との対話機能を与える生合成リデザイン**：一次代謝経路は、ひとつひとつの酵素ステップが精密かつ多重な制御を受けている。そしてその制御プログラムの秀逸さこそが、高出力な生合成経路の安定な保有・運転を可能としている。本研究では、さまざまな代謝分子に対する複数のセンサの制御下に生合成経路をおくと同時に、生合成の起動と連動させて細胞生理にはたらきかける遺伝子機能をコンビナトリアル発現させる。細胞 \rightleftharpoons 生合成経路の多様な相互制御様式を生み出し、力価の高い人工生経路の安定運転を可能とするものを探索する。

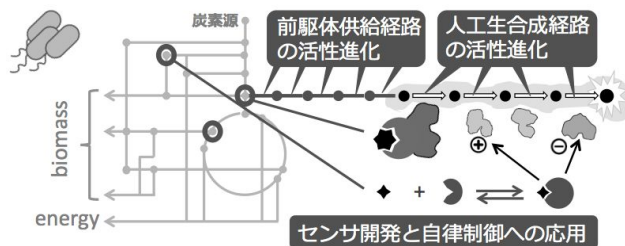


図 1. 本研究プロジェクトが目指すもの

4. 研究成果

(1) テルペン合成酵素と基質供給経路の「共進化」：

1-1. **基質の異常蓄積解消を指標としたテルペン酵素の活性改良**：イソプレノイド上流経路として特に強いのはメバロン酸経路であり、実際にこの経路を導入した細胞の生育が遅くなることが広く知られている。しかしこの最大活性の前駆体供給路でも、せいぜいその毒性は増殖速度が低下する程度であった。我々は、テルペン酵素の基質消費能に対する十分強いスクリーニング系の構築を目指している。ゆえに、最近報告された、イソペンテニルニリン酸キナーゼ(IPK)を用いたショートカット経路に着目した。この経路は、ジメチルアリルニリン酸(DMAPP)やイソペンテニルニリン酸(IPP)を、ジメチルアルコールおよびイソペンテニルアルコールからたった2ステップで合成する。IPKにいくつかのアミノ酸変異を導入し、非常に高い力価を持つDMAOH \rightarrow DMAPP経路を得た。十分量のDMAOHを培地添加すると、IPK変異体を発現する細胞が $> 10^4$ 倍もの効率で淘汰できるようになった。これだけ強い淘汰圧があれば、イソプレノ合成酵素の活性進化系を構築できる。実際に、イソプレノ合成酵素について、2世代にわたる進化工学を実施し、複数の活性変異体を取得することができた。

この基質消費能の選抜系は、生産物特異性を問わずあらゆるテルペン活性(原料消費能)に対して適用できる。そこで、微生物由来のワンドメイン型のテルペン酵素(シネオール合成酵素)を親とした各種ランダム変異体ライブラリを作製し、上記スクリーニングによって活性変異体を濃縮する実験を行なった。案の定、活性を失った「dead mutants」は淘汰され、活性維持あるいは改良された変異体だけを濃縮することができた。これらの中から、シネオールとは異なる様々なモノテルペンのピークを与える変異体が見つかった。この実験は、テルペン酵素の高い可塑性を示すとともに、筋目のよい(安定性が高く kcat / Km の高い)親酵素の「機能発散」によって、さまざまな分子骨格合成酵素を自前でシリーズ開発する道を拓くものである。今後も継続して、テルペン酵素の多世代機能発散実験を続けてゆく予定である。

1-2. **基質枯渇解消を指標とした上流経路の活性改良**：テルペン酵素の細胞活性改良が度を超すと、細胞のイソプレノイド原料が枯渇し、細胞のキノンや細胞壁合成が止まり、増殖不能に陥るはずである。実際に我々は、我々が取得したゲラニオール合成酵素の変異体を過剰発現させると、その生存率が 10^4 分の一以下にまで低下することを見出した。これにDMAPP/IPPの供給力を数倍程度向上する遺伝子(idiなど)を追加発現すると、細胞増殖能が復活することも確認できた。つまり、前駆体供給路の活性に対する高効率な選抜系が確立できた。本系を用いて、非メバロン酸経路を構成する生合成酵素をシステムチックに進化工学に供し、さまざまな活性変異体を取得した。その力価は、2021年3月現在で、野生型オペロンの170倍にまで向上することに成功した。

以上、テルペノイド酵素の進化工学系(1-1)、上流経路の進化工学系(1-2)を確立することができた。これらを交互に繰り返すことによって、両者の段階的「共進化」実験が可能となった。現状でまだ1ラウンドしか交互進化ラウンドを終えた段階であるが、すでにこれらは単独では強い細胞毒性を示しており、その安定維持には、互いの存在が必須(互いに addict した)というユニークな状況にある。もしかすると、15年もの間、あまりテルペンの微生物生産に大きな飛躍がない理由は、我々が今観察している事実に依るのかもしれない。すなわち、上流経路だけの改良、テルペン酵素だけの改良を独立して試みても、より活性の高い(最も望まれる最大活性の)変異体は、じつは致死性をもっておりクローニング不可であったり、ライブラリの中から強いカウンター選択によって淘汰消滅していたりしたのではないか。この先も我々は、この相互依存的に共存できる「強い原料供給路」と「強いテルペン合成酵素」の共進化実験を注意深く続け、いけるところまで両者の活性を高めてゆきたいと考えている。

(2) 生合成経路の自律制御機能のパーツラインナップの整備：

2-1. **転写因子の進化工学技術**：人工生合成経路の細胞内での発現を、宿主細胞の生理状態と連動させるかたちでダイナミック調節したい。そのデザイン自由度を確保するためには、数々の内部情報を感じ取り遺伝子発現量を調節する人工の転写因子のオンデマンド開発技術が必要となる。この目的のため、我々は以前から、転写因子の機能選抜技術の改良を続けてきた。さらなる効率化、普遍化、そして自動化を目指して、転写因子の出力状態に対する選抜系を見直した。まず、ネガティブ選択における選択率を高めるために、ヌクレオチド代謝遺伝子の欠損と過剰発現をシステムチックに組み合わせ、従来の 1/10 の選択試薬添加量で遺伝子スイッチ機能の選抜ができる系を確立し、スクリーニングにおける偽陽性を飛躍的に低減することに成功した。さらに、さまざまな人工ヌクレオチドを用いて選択圧を微調節可能とし、偽陰性を飛躍的に低減することに成功した。大腸菌にくらべて開発プラットフォームの確立が遅れていた酵母での遺伝子スイッチの迅速な進化リデザインが可能となった。以上、遺伝子スイッチ（転写因子）の進化工学系は、完成したものと判断した。

2-2. **転写因子の超高速開発と生合成スクリーニングへの応用**：もし、ユニークな生合成中間体すべてをハイスループットに検出するバイオセンサを作る技術があれば、「稀少な分子をたくさんつくる」という領域の目標の達成に大きな貢献ができるはずである。最近我々が開発した新しいセンサ機構を利用すれば、酵素を分子認識素子として使い、それぞれの基質レベルを検知するバイオセンサを作ることができる。本研究では、コデイン脱メチル化酵素に本技術を適用し、稀少分子テバイン（モルヒネの生合成中間体であり、複数の次世代鎮痛薬の合成前駆体）のバイオセンサを開発した。

得られた「テバインセンサ」をうまく用いれば、その上流の生合成経路の性能スクリーニングが可能となるはずである。実際に我々は、サリタルジンからテバインまでの3酵素経路のオペロンライブラリを作製し、テバインセンサの蛍光応答値を指標としたスクリーニングに供した。蛍光出力と変換効率にはよき相関が見られた。そして、より蛍光出力の強いクローンの中から、サリタルジンからテバインまでを効率的に変換する人工オペロンを迅速に選抜取得できた（**図2**）。

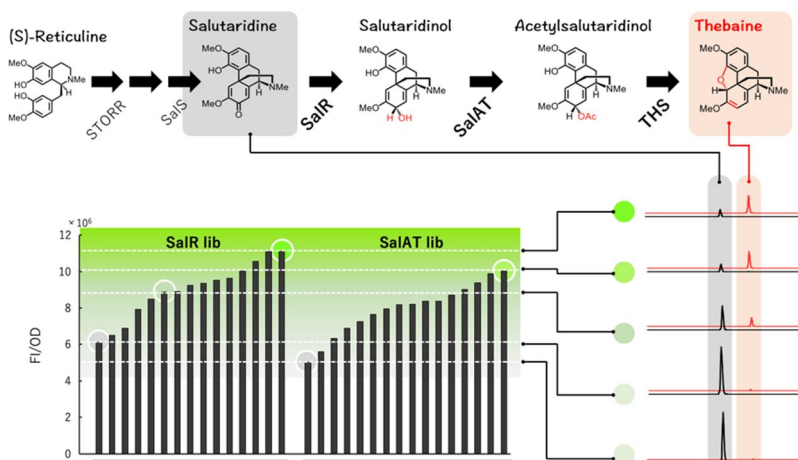


図2. バイオセンサを用いた生合成工学のニューロジック

このほかにも、イソメラーゼを分子認識素子として用いた IPP/DMAPP センサ、など、様々な基質代謝物センサを試作し、それらを使った上流ステップの活性改良スクリーニングが可能であることを確認した。

異種環境における生合成酵素の機能不全など、人工生合成経路の敷設と開通を阻む要素は無数にある。本技術は、ステップ毎の中間体レベルをハイスループットにモニタリングするセンサ系を迅速にオンデマンド提供できるため、1 ステップ下流の酵素を部材としたセンサを使うことによって、一つ一つの生合成酵素の活性改良を、スクリーニングベースで逐次実施できる可能性がひらけたものと考えている。

2-3. **細胞の内部情報の統合形式2つ**：本研究によって、細胞の任意の代謝物のレベルと人工生合成経路の起動状態を直接リンクさせることが可能となった。我々は、本研究で生み出したセンサ構築技術が、複数の分子情報を演算・統合し、任意性高く多入力応答する生合成経路を創るのに非常に適していることを発見した（たとえば**図3**）。こうして、代謝ネットワークに部分的な摂動を与える種々の遺伝子機能を多様なかたちで集積した「人工経路 宿主」方向の制御回路をコンビナトリアル製作できる素地が揃った。

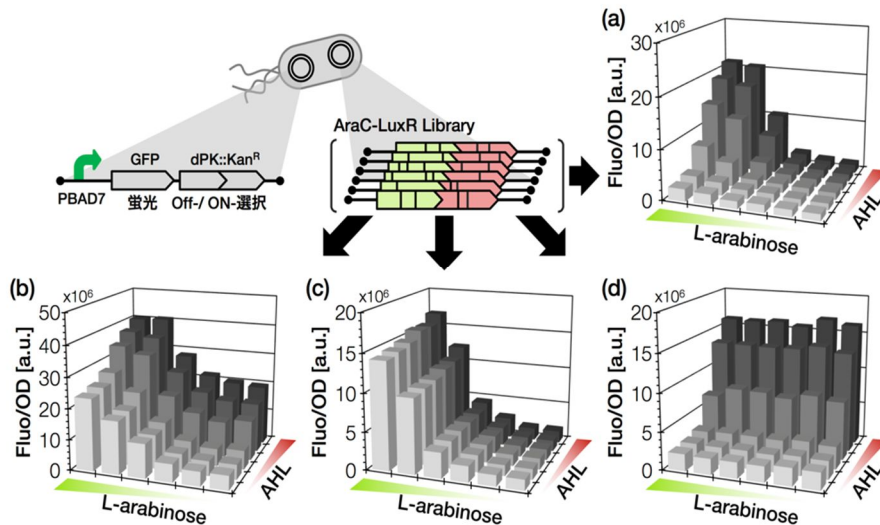


図 3.二入力演算応答の例

また、部分重複したオペレータ配列に転写因子が競合作用する、特殊な複合化形式を様々に試し、2-1 のプラットフォームを用いて様々な機能選抜を実施した。その結果、この形式は、(1) 建設不能とされてきた XNOR/ XOR 回路などをわずか 100 塩基で実現する画期的なフォーマットが完成し、しかも、(2) わずか1~2塩基置換の導入によって、それが存在し得る全ての論理ゲートに変換できる万能性をもつことを確認した。

(3) 超天然天然物へ？

十分な前駆体の供給経路が実現し(1-2)、かつ、任意性の高い酵素活性のスクリーニング技術(2-2)が確立したとなると、自然界に存在しない数多くの非天然天然物の経路が、既知の天然物合成酵素の進化リデザインによって確立可能となる。本研究では、進化分子工学を駆使することによって、天然のカロテノイド・トリテルペンなどがカバーする物性限界を超えた様々な非天然天然物 ~これを「超天然(extra-natural)天然物」と呼ぶことにしよう~ 化合物の生合成経路を合計~50ほど開通させることができた。これらの中には、

- 蛍光性を持つカロテノイド色素
- 連続的に細胞外に抽出できるタイプのカロテノイド色素
- エネルギー伝達効率の高い、電子分極の大きな非対称カロテノイド色素
- 親疎水性に大きな傾斜性をもつ非対称カロテノイド色素
- 複合化起点としてエポキシ基を持つカロテノイド色素
- 燃料特性・特殊潤滑油としてのオイル物性の異なる様々なスクアレン・ポトリオコッセン様の炭化水素各種、およびそれらの環化産物群

などが含まれる。さらには、これらの生合成経路の進化デザインの過程で、

- 前駆体のサイズによってカロテノイド+スクアレンをつくり分けるテルペン酵素
- 前駆体サイズによってポトリオコッセン+スクアレンを作り分けるテルペン酵素、

などの構築にも成功した。

これらはすべて、自然界には見られない新規なものであり、かつ、天然物ラインナップのカバーする物理・機能物性を明らかに逸脱したものである。進化合成生物学によって作られるこれら「超天然物」の生合成経路はすべて DNA 配列の中に不足なく Scripting されたものであり、その導入によって、微生物に新たな機能や特性を賦与するものである。今後も本研究をさらに発展させ、天然物経路が提供できる機能空間の指向性高い拡張を目指してゆく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計30件（うち査読付論文 24件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Kimura, Y., Kawai-Noma, S., Saito, K., Umeno, D.	4. 巻 9
2. 論文標題 Directed evolution of stringency of the LuxR <i>Vibrio fischeri</i> quorum sensor without Off-state selection.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Synth. Biol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.9b00444	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimada, N., Okuda, Y., Maeda, K., Umeno, D., Takaichi, S., Ikeuchi, M.,	4. 巻 -
2. 論文標題 Astaxanthin production in a model cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Gen. Appl. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mu, T., Toyoda, H., Kimura, Y., Yamada, M., Utoh, R., Umeno, D., Seki, M.	4. 巻 92
2. 論文標題 Laborless, automated microfluidic tandem cell processor for visualizing intercellular molecules of mammalian cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anal. Chem.	6. 最初と最後の頁 2580-2588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.9b04288	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takemura, M., Kubo, A., Higuchi, Y., Maoka, T., Sahara, T., Yaoi, K., Ohdan, K., Umeno, D., Misawa, N.	4. 巻 103
2. 論文標題 Pathway engineering for efficient biosynthesis of violaxanthin in <i>Escherichia coli</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Appl. Microbiol. Biotech.	6. 最初と最後の頁 9393-9399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-019-10182-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Li, L., Furubayashi, M., Wang, S., Maoka, T., Kawai-Noma, S., Saito, K., Umeno, D.	4. 巻 14
2. 論文標題 Construction a pathway to C50-e-carotene.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS One.	6. 最初と最後の頁 e0216729
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0216729	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 関貴洋, 小林一幾, 梅野太輔	4. 巻 77
2. 論文標題 メタボライトセンサの製作	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリ	6. 最初と最後の頁 516-517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大谷悠輔, 関貴洋, 梅野太輔	4. 巻 55
2. 論文標題 二次代謝経路の一次代謝化技術-融和的入植と高出力化のための生合成リデザイン学	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 658-661
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.55.7_658	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Li, L., Furubayashi, M., T., Otani, Y., Maoka, T., Misawa, N., Kawai-Noma, S., Saito, K., Umeno, D.	4. 巻 127
2. 論文標題 Non-natural biosynthetic pathway for 2-hydroxylated xanthophylls with C50-carotenoid backbone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J.Biosci. Bioeng.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2019.04.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Li, L., Furubayashi, M., Wang, S., Maoka, T., Kawai-Noma, S., Saito, K., Umeno, D.	4. 巻 9
2. 論文標題 Genetically engineered biosynthetic pathways for non-natural C60 carotenoids using C5-elongase and C50-cyclases in Escherichia coli	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 2982
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-39289-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Li, L., Furubayashi, M., Hosoi, T., Seki, T., Otani, Y., Kawai-Noma, S., Saito, K., Umeno, D.	4. 巻 8
2. 論文標題 Construction of a non-natural C60 carotenoid biosynthetic pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Synth. Biol.	6. 最初と最後の頁 511-520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.8b00385	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松崎優香, 板橋長史, 河合 (野間) 繁子, 梅野太輔, 斎藤恭一	4. 巻 67
2. 論文標題 アクリル酸グラフト繊維を用いた高濃度なリン酸緩衝液中でのリゾチームの高容量吸着	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Radioisotopes	6. 最初と最後の頁 321-328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 川村竜之介, 後藤聖太, 松浦佑樹, 河合 (野間) 繁子, 梅野太輔, 斎藤恭一, 藤原邦夫, 須郷高信, 矢島由莉佳, 木下亜希子, 工藤あずさ, 日置淳平, 若林英行	4. 巻 44
2. 論文標題 N-ビニルピロリドン (NVP) グラフト重合繊維を用いた緑茶抽出液中のカテキンの吸着および水酸化ナトリウム水溶液を用いたカテキンの溶出	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 化学工学論文集	6. 最初と最後の頁 99-102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 梅野太輔	4. 巻 73
2. 論文標題 実験室内「定向進化」による酵素の改良・創出技術	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 化学	6. 最初と最後の頁 12-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 梅野太輔	4. 巻 36
2. 論文標題 「進化」が可能にした新しい酵素や抗体の超高速開発	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 3265-3267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 梅野太輔	4. 巻 20
2. 論文標題 ノーベル化学賞；進化のプロセスを模したタンパク質機能のデザイン手法	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 パリティ	6. 最初と最後の頁 12-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tashiro, M., Ono, K., Kimura, O., Kawai-Noma, S., Saito, K., Umeno, D.:	4. 巻 未定
2. 論文標題 Tweezing the cofactor preference of gymnosperm pinene synthase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biosci. Biochem. Bioeng.	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 工藤大樹, 松崎優香, 河合繁子, 梅野太輔, 斎藤恭一	4. 巻 66
2. 論文標題 放射線乳化グラフト重合方法を用いた抗体精製のためのアニオン交換繊維の作製	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Radioisotopes	6. 最初と最後の頁 243-249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松崎優香, 工藤大樹, 小島 隆, 河合繁子, 梅野太輔, 斎藤恭一	4. 巻 43
2. 論文標題 放射線前照射乳化グラフト重合法を適用したタンパク質を高容量に吸着するためのカチオン交換繊維の作製	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 分離工学	6. 最初と最後の頁 88-94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tashiro, M., Fujii, A., Kawai-Noma, S., Saito, K., Umeno, D.	4. 巻 63
2. 論文標題 Directed evolution and expression tuning of geraniol synthase for efficient geraniol production in Escherichia coli.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Gen. Appl. Microbiol.,	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Y., Tashiro Y., Saito K., Kawai-Noma S., Umeno, D.	4. 巻 122
2. 論文標題 Directed evolution of Vibrio fischeri LuxR signal sensitivity	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J. Biosci. Bioeng.	6. 最初と最後の頁 533-538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tashiro Y., Kimura Y., Saito K., Kawai-Noma S., Umeno, D.	4. 巻 62
2. 論文標題 Directed evolution of <i>Vibrio fischeri</i> LuxR signal specificity	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J. Gen. Appl. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 240-247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saeki, K., Tominaga M., Kawai-Noma S, Umeno, D.	4. 巻 5
2. 論文標題 Rapid Diversification of BetI-Based Transcriptional Switches for the Control of Biosynthetic Pathways and Genetic Circuits	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 ACS Synth. Biol.	6. 最初と最後の頁 1011-1020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tashiro, M., Kiyota H., Kawai-Noma S., Saito K., Ikeuchi M., Iijima Y., Umeno, D.	4. 巻 5
2. 論文標題 Bacterial production of pinene by laboratory-evolved pinene synthase:	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 ACS Synth. Biol.,	6. 最初と最後の頁 201-1210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 梅野太輔	4. 巻 75
2. 論文標題 進化分子応用技術による遺伝子誘導系の開発	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリ	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 田代美希, 梅野太輔	4. 巻 54
2. 論文標題 テルペノイド合成酵素の機能進化デザイン	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 562-567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tominaga, M., Nozaki, K., Umeno, D., Ishii, J., Kondo, A	4. 巻 12
2. 論文標題 Robust and flexible platform for directed evolution of yeast genetic switches	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications,	6. 最初と最後の頁 1846
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22134-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawai-Noma, S., Saeki, K., Yumoto, T., Minakata, K., Saito, K., Umeno, D	4. 巻 130
2. 論文標題 Improvement of the dP-nucleoside mediated herpes simplex virus thymidine kinase negative selection system by manipulating dP metabolism genes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biosci. Bioeng.	6. 最初と最後の頁 121-127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2020.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Seki, T., Ichikawa, T., Ojima, T., Kawai-Noma, S., Umeno, D.	4. 巻 24
2. 論文標題 Molecular breeding of a biosynthetic pathway to C60 phytoene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carotenoid Sci.	6. 最初と最後の頁 18-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Umeno, D., Kimura, Y., Kawai-Noma S	4. 巻 37
2. 論文標題 Transcriptional factors as evolvable biosensors.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 699-705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.20SCR12	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 梅野太輔	4. 巻 30
2. 論文標題 非天然カロテノイド生合成経路の進化分子工学	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 光合成研究	6. 最初と最後の頁 110-124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計26件 (うち招待講演 25件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 梅野太輔
2. 発表標題 センサータンパク質の進化デザインによる多入力・多出力化
3. 学会等名 日本分析化学会特別シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅野太輔
2. 発表標題 進化工学による未踏カロテノイド空間の探索
3. 学会等名 IFIA JAPAN (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅野太輔
2. 発表標題 二次代謝経路の一次代謝化のための代謝物応答センサの製作技術
3. 学会等名 新学術領域研究「生合成リデザイン」第4回公開シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Umeno
2. 発表標題 Re-Designing carotenoid biosynthetic pathways
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Carotenoids (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅野太輔
2. 発表標題 非天然トリテルペノイド生合成経路の進化デザイン
3. 学会等名 ポリマーフロンティア21講演会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅野太輔
2. 発表標題 「情報処理機能の「創発」と生合成工学への応用
3. 学会等名 細胞を創る研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅野太輔
2. 発表標題 たんぱく質を試験管内で「進化」させる？
3. 学会等名 科学技術館公開講義「ユニバース」（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Umeno
2. 発表標題 Directed evolution of carotenoid/ terpenoid biosynthetic pathways
3. 学会等名 9th US-Japan Symposium on the Biosynthesis of Natural Products (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 梅野太輔
2. 発表標題 トリテルペノイド生合成経路の進化能の探索
3. 学会等名 新学術領域研究（研究領域提案型）生物合成系の再設計による複雑骨格機能分子の革新的創成科学（生合成リデザイン）第2回公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 梅野太輔
2. 発表標題 カロテノイド生合成経路の「進化能」の探索
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 梅野太輔
2. 発表標題 テルペノイド生合成経路の兵站体系を再検討する
3. 学会等名 日本生物工学会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Daisuke Umeno
2. 発表標題 Laboratory evolution of triterpenoid biosynthetic pathways
3. 学会等名 1st China-Japan Symposium on Natural Product Biosynthesis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 梅野太輔
2. 発表標題 センサと制御ネットワークの進化デザイン
3. 学会等名 第3回九州大学産学連携・分子組織シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅野太輔
2. 発表標題 情報処理機能の実験室内「創発」
3. 学会等名 第43回生命の起源および進化学会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅野太輔
2. 発表標題 非天然トリテルペノイド生合成の進化合成生物学
3. 学会等名 日本農芸化学会2018大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅野太輔
2. 発表標題 生体分子の協働機能形式を進化デザインする
3. 学会等名 生物工学会夏のセミナー2016（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 梅野太輔
2. 発表標題 分子スイッチ機能 進化から創発へ
3. 学会等名 生命の起源および進化学会 & 日本アストロバイオロジーネットワークジョイント夏の学校（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 梅野太輔
2. 発表標題 人工生合成経路の進化デザイン
3. 学会等名 新学術領域研究（研究領域提案型）生物合成系の再設計による複雑骨格機能分子の革新的創成科学（生合成リデザイン）キックオフシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 梅野太輔
2. 発表標題 生体高分子の協働様式の進化分子工学
3. 学会等名 酵素工学研究会第76講演会(招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Daisuke Umeno
2. 発表標題 Evolutionary design of biosynthetic pathways and regulatory networks
3. 学会等名 OIST seminar series.(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 梅野太輔
2. 発表標題 カロテノイド・テルペノイドの「リデザイン」技術
3. 学会等名 かずさDNA研究所公開セミナー(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Daisuke Umeno
2. 発表標題 Rapid Diversification and Compression of the Genetic Networks via Directed Evolution.
3. 学会等名 Biosystems Design 3.0(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Daisuke Umeno
2. 発表標題 Directed Evolution of caerotenoid/terpenoid biosynthesis
3. 学会等名 Fusion Conference on Synthetic Biology for Natural Products, (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 梅野太輔
2. 発表標題 トリテルペン生合成経路を実験室内で「進化」させる
3. 学会等名 JBA発酵と代謝研究会セミナー (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 梅野太輔
2. 発表標題 二次代謝経路の一次代謝化技術
3. 学会等名 新学術第9回シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梅野太輔
2. 発表標題 酵素というソフト界面を利用したセンサ構築技術
3. 学会等名 日本化学会春季年会特別シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 梅野太輔	4. 発行年 2018年
2. 出版社 幻冬舎	5. 総ページ数 200
3. 書名 生物を作る～新薬を生み出すスーパー酵母を創る」, バイオベンチャーの冒険者たち	

1. 著者名 Sakurai T, Tsujikawa T, Umeno D.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer International	5. 総ページ数 -
3. 書名 Propagation and aggregation of motile cells of Escherichia coli pattern	

1. 著者名 斎藤恭一, 梅野太輔	4. 発行年 2017年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 145
3. 書名 アブストラクトで学ぶ理系英語	

〔出願〕 計6件

産業財産権の名称 変異型イソプレレン合成酵素およびそのスクリーニング方法	発明者 梅野太輔, 荒木道備	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-036812	出願年 2020年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 代謝物センサ及び酵素活性のスクリーニング方法	発明者 梅野太輔, 木村友紀, 野々下芽以	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-034548	出願年 2020年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 化合物およびトラクション油の製造法	発明者 浅野真菜, 久野育, 梅野太輔, 李伶, 眞岡孝至	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-045352	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 多入力・多出力型遺伝子スイッチおよびその製造方法	発明者 梅野太輔, 木村友紀, 大内恭平, 河合繁子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-057314	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 スクアレン消費酵素のスクリーニング法およびスクアレン-ホペン環化酵素	発明者 梅野太輔, 大谷悠介, 河合繁子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-066299	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 1. カロテノイド化合物、該化合物の製造方法、並びに、酸化スクアレン環化酵素変異体のスクリーニング方法	発明者 梅野太輔, 大谷悠介	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021- 61647	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>バイオマテリアル研究室 http://chem.tf.chiba-u.jp/gacb02/dna.html</p>

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------