

平成22年 5月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19580092

研究課題名（和文）

巨大菌の塩応答型キラルナイロン生産：分子機構の解明と耐塩育種技術への応用

研究課題名（英文）

Salt-inducible chiral-nylon polymer from *Bacillus megaterium*: Synthesis and biochemical applications including an increase in halo-tolerance

研究代表者

芦内 誠 (ASHIUCHI MAKOTO)

高知大学・教育研究部自然科学系・准教授

研究者番号：20271091

研究成果の概要（和文）：立体規則性に優れたポリ- γ -グルタミン酸（PGA）の新たな生産菌として巨大菌（*Bacillus megaterium*）を見いだした。巨大菌のPGA生産特性を明確にするとともに、その代謝機構を調査するため、当該遺伝子クラスターの同定と配列解析を行った。さらに、立体規則性PGAの環境ストレス緩衝材料としての *in vivo* 及び *in vitro* での応用性についても調査した。

研究成果の概要（英文）：We identified the industrial strain of *Bacillus megaterium* as a novel producer of L-type stereo-regular poly- γ -glutamate (PGA). Advanced analysis about PGA production of *B. megaterium* and cloning and sequencing of the genetic cluster responsible for the polymer synthesis and degradation, to examine stereo-regular PGA metabolism, were performed in the study. Additionally, *in vivo* and *in vitro* applicability of stereo-regular PGA as extremolyte-like materials was investigated as well.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物遺伝・育種、環境材料、生体材料、生体機能利用、バイオテクノロジー、環境適応

1. 研究開始当初の背景

(1) 納豆の糸の主成分として有名なポリ- γ -グルタミン酸（PGA）は安全性の高い素材である。最近、カルシウムの吸収や唾液分泌の促進効果等の健康促進作用が備わっていることも分かってきた。

(2) PGAはアミノ酸のグルタミン酸を構成成分とするが、基本骨格は一般のタンパク質性ペプチドとは異なり、むしろ化成ナイロンと類似する。そのため、ナイロン様物性（柔

軟性、強靱性等）の発現も期待されている。

(3) 化成ナイロンがアキラルポリマーであるのに対し、PGAはキラルポリマーである。これにより、既存のナイロンでは実現できなかった特殊物性（(1)のような生体関連機能や生分解性のような環境関連機能等）の賦与まで期待できるようになった。

(4) ただし、納豆を起源とする（納豆菌由来）従来のPGAは立体化学上不規則なDL混成

型ポリマーであった。そのため、PGA素材に備わっているポテンシャルが十分に理解できていない可能性が高かった。

(5) 最近、高塩環境等に生息する極限環境微生物は新たな環境適応因子として立体規則性PGA、特にL型ポリマーを生産することも分かってきた。

(6) 立体規則性PGA (L型) の生合成機構については未だ不明な状態にある。

2. 研究の目的

申請者等は、立体規則性に優れたPGA (L型) の新たな生産菌として巨大菌 (*Bacillus megaterium*) を見いだした。巨大菌は以前、巨大枯草菌といわれていたことから分かるように、納豆菌等の近縁種と考えられている。本研究では、巨大菌のPGA生産特性を明確にするるとともに、その代謝機構を明らかにするため、当該関連遺伝子群のクローニングを行う。さらに、立体規則性PGA (L型) の環境ストレス緩衝材料としての *in vivo* 及び *in vitro* での応用性についても検討する。

3. 研究の方法

(1) 巨大菌細胞を用いたPGAのバイオ合成法: *B. megaterium* WH320 株 (MoBiTec 社製) の生細胞 (1 L 当たり 8 g 湿菌体) を標準液体培地 [5% スクロース、2% L-グルタミン酸、5% NaCl、1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.27% KH_2PO_4 、0.42% Na_2HPO_4 、0.5% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、MS 混合ビタミン溶液 (PhotoTechnology Laboratories 社製)] に加え、30°C で 5 日間インキュベートした。この間、バイオマス量はほぼ一定に保たれていたことから、添加したL-グルタミン酸及びスクロースは主にPGA合成の基質及びエネルギーとして利用されていると判断し、当該ポリマー合成能を比較、評価した。

(2) PGAの組成分析及び定量: PGAは6M蒸留塩酸存在下、105°Cで8時間の加水分解に供した。発生したグルタミン酸モノマーはキラル分割液体クロマトグラフィーで分析した。この際、本プロファイルのピーク面積とグルタミン酸量を相関させた標準曲線 $[D\text{-グルタミン酸量}, y_{D\text{-Glu}} = 2.97x \text{ (fmol)}]$; $L\text{-グルタミン酸量}, y_{L\text{-Glu}} = 2.91x \text{ (fmol)}$; x 値はピーク面積に相当] を利用した。分析データから DL 含有比 (組成分析に相当) とグルタミン酸総量 (PGA定量に相当) を算出した。

(3) 巨大菌のメチレンブルー耐性試験: メチレンブルーは通常毒性の低い酸化型青色色素として存在するが、微生物酵素により毒性の強い還元型白色色素に変えられ、これが活性酸素を発生することで強い殺菌作用を示すとされている。一方、PGAはメチレンブルーとよく結合し青色色素のまま長期留めることができるため、PGA生産菌にはメチレンブルー耐性の発現が期待された。そこで、任意の濃度のメチレンブルー (0~10⁻²%) を添加した試験培地 [0.4%

グルコース、2% L-グルタミン酸、0.1% NaCl、0.2% NH_4Cl 、0.59% KH_2PO_4 、1.185% Na_2HPO_4 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $2.2 \times 10^{-3}\%$ CaCl_2 、 $1.95 \times 10^{-3}\%$ チアミン] を作製し寒天 (1.5%) で固化した固体培地上 (好気条件下) での生育状況について調査した。

(4) 巨大菌PGA合成関連遺伝子群の単離と配列解析: PGAのメチレンブルーに対する結合性は当該合成遺伝子群の迅速単離のためのファンクショナルクローニング法にも応用できる可能性が高かった。そこで、ショットガンクローニング法で構築した独立クローン約1万個からなる巨大菌ゲノムライブラリーを対象に、以下のような一次スクリーニングを実施した。すなわち、各ライブラリークローンを一次スクリーニング固体培地 [2% スクロース、2% L-グルタミン酸、0.5% NaCl、1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.5% KH_2PO_4 、0.6% K_2HPO_4 、0.5% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5% 酵母エキス、50 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリン、0.1 mM IPTG、1.5% 寒天] に移し、37°Cで48時間培養した。コロニー形成確認後、蒸留水で湿らせた酢酸セルロース膜を静かに被せ、PGAプロットティングを行った。酢酸セルロース膜は普通細胞や生物物質が付着しにくい材料とされているが、PGAはその高い接着性によりこの膜にさえ付着することが分かっていた。そのため、PGAか、あるいはその類似機能を示す生物物質が細胞表面で生産されると、当該膜表面にその痕跡を残すものと予想された。そこで、この痕跡を追跡し視覚化するため、PGAと強く結合するメチレンブルーによる染色法を利用した。このようにして得られた陽性クローン株中にライブラリー化されている巨大菌DNA断片については、本学共同利用施設・総合研究センターに設置のDNAシーケンサーを用い、その塩基配列を決定した。

(5) *In vivo* ストレス耐性化試験: ここでは大腸菌をモデル微生物とし、本試験に供した。LB液体培地中で定常期 (濁度 600nm、~2.0) に達した培養液 1 μl に対し 3 mg/ml の立体規則性PGA (L型) 溶液を 10 μl を加えた後、30分間室温でインキュベートすることによりマイクロセルコーティングを完了させた。続いて、種々の塩濃度 (1、2、4、6、8、10%) 及びアルカリ pH (7.4、8、9、9.3、9.5、9.8、10、11) に調製されたLB液体培地 500 μl に上記処理菌体を植菌した。37°Cで16時間培養した後、吸光波長 600 nm で培養液の濁度を測定した。得られた濁度を比較することにより、ストレス耐性効果の有無を評価した。

(6) *In vitro* ストレス耐性化試験: ここでは様々な環境ストレスに対して脆弱なDNAリガーゼ (TaKaRa Bio 社製) をモデル酵素とし、本試験に供した。本酵素溶液 (60 U/ μl) は様々な濃度に調製された立体規則性PGA (0~0.1 mg/ml) を含む標準希釈液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、50 mM KCl、10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1 mM EDTA、1 mM ジチオスレイトール] で 60 倍にまで希釈した後、37°Cで10分間のイン

キュベーションを基本条件とした。この条件を種々変えることにより、PGAのストレス緩衝効果の有効性を明らかにしようとした。具体的には、温度(4、16、30、37、50、70℃)、pH(3.8、5.6、7.4、8.4、9.5、11.4)、凍結融解(1、3、5、10、15回)、並びにプロテアーゼ作用(10^{-3} 、 10^{-2} 、 10^{-1} 、1、10 U)に対する耐性化効果が認められるかどうか調べた。また、コントロールについては、立体規則性PGAの代わりに蒸留水を加えた後、上述の処理工程に準じて調製した。酵素活性測定はTris-HCl(0.6 μ mol; pH 8.0)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.2 μ mol)、 MgCl_2 (80 nmol)、 NAD^+ (2 nmol)、EDTA(24 nmol)、ジチオスレイトール(20 nmol)、HindIII 処理 pUC18 DNA(25 ng)、及び上述処理後の酵素溶液(1 μ l; 1 U)からなる標準反応液(20 μ l)を用いて実施した。また、酵素液の代わりに蒸留水を加えたものをネガティブコントロールとし、本実験に用いた。16℃で30分間インキュベーションすることにより、反応液中のHindIII 処理 pUC18 DNAを再環状化させ、回復した形質転換能を指標にリガーゼ活性を評価した。この際、市販の大腸菌コンピテント細胞(TaKaRa Bio社製)を使うことで一定の転換能が保証できるようにした。基本的には、再環状化の処理を受けた1 μ gのpUC18でおおよそ 5.5×10^4 cfuの数値が得られることから、これを100%とし相対活性を求め、比較することにより、ストレス耐性効果の有無を評価した。ちなみに、ネガティブコントロールではPGAの有無に関わらず、この数値は1.5%を超えることはなかった。以上の方法は簡便且つ精度のよいDNAリガーゼの活性測定法の一つと判断した。

4. 研究成果

(1) 巨大菌のPGA生産特性：まず、ここで用いた巨大菌WH320株は好塩性ではないことが判明した。この点では一般的な納豆菌類に近かった。ただし、PGA生産性でいえば、明らかに異なっており、通常納豆菌類が好む低塩濃度(0.5% NaCl等)の液体培地では、ほとんどPGAを生産しなかった。本研究により、乾燥しやすい固体培養条件の他、高塩濃度の液体培地でもPGAが生産されることが判明した(図1)、この性質はむしろ好塩

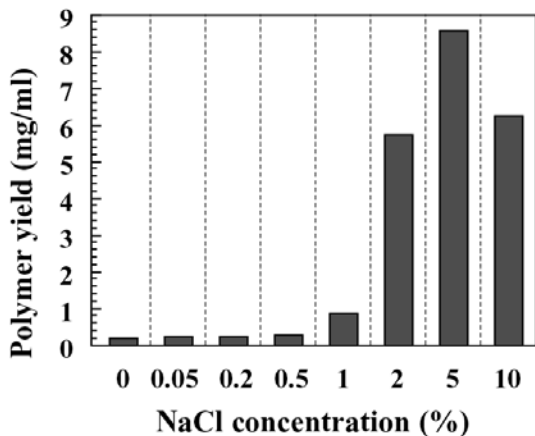


図1 巨大菌の塩誘導性PGA

古細菌の一部に見られる特徴とよく似ていた。さらに、塩濃度の上昇に伴ってPGAの分子サイズも巨大化するという新奇な現象も見られた(図2)。一方、塩類は本PGAの立体

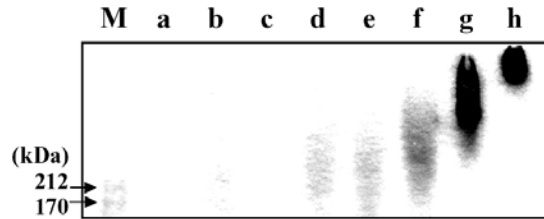


図2 巨大菌PGAの分子サイズに及ぼす塩の影響
レーンM、分子サイズマーカー;a, 0% NaCl;b, 0.05% NaCl;c, 0.2% NaCl;d, 0.5% NaCl;e, 1% NaCl;f, 2% NaCl;g, 5% NaCl;h, 10% NaCl存在下

化学性には影響せず、実際に平均90%(n=10)、最大で95%に達する良好なL体占有率を維持していた。

生細胞は塩負荷によって浸透圧ストレスと過剰なイオンの毒性の双方を受けるとされ、各々異なる機構で適合・耐性化しているものと考えられる。このうち、浸透圧ストレスはソルビトールでも調査できることから、NaClの代わりにこれを利用した(0-1 M)。結果、ソルビトールには巨大菌PGAの誘導効果はなかった。巨大菌PGAは浸透圧変化に適應するためではなく、イオン毒性からの保護を目的とするバリア機能材料の一つであることが示唆された。このようなバリア効果は塩に限らず、幅広いストレス耐性化に繋がる可能性が高かった。事実、メチレンブルー色素の毒性に対しても耐性化することが判明した。実際、PGAの生産が可能な環境に置かれた巨大菌は生産していないものと比べ、1000倍以上の色素耐性を示すことまで確認された。ここで生育した細胞コロニーは青く染まっていたことから、毒性の強い色素が細胞に侵入する防ぐ色素結合性莢膜・緩衝帯として機能しているものと示唆された。巨大菌PGAの生化学的機能が明らかになるにつれて、未だ不明な状態にある生合成システム及び生産誘導の分子機構の解明は緊急を要する課題になってきた。そこで、巨大菌のPGA生合成遺伝子群の同定と解析に係る研究に着手した。

(2) 巨大菌PGA代謝関連遺伝子群の同定：今回、独立クローン1万株のうち、3113株がメチレンブルーを用いた一次スクリーニングに供試された。結果、35株の擬陽性クローン、3株の真性の陽性クローンが得られた。陽性クローンのコロニーが触れた酢酸セルロース膜上には濃い青色の痕跡が残された(図3)。

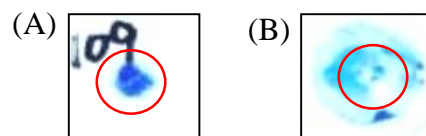


図3 陽性クローンの一次スクリーニング
Aは真性の陽性クローン、Bは陰性クローンを示す。各コロニーと膜が完全に接触した部分を赤丸で囲んだ。

続いて、陽性クローンに保存されていた DNA 断片に注目した。すなわち、PGA 生産に係る遺伝子群を含むと考えられた約 7 kb の領域について塩基配列を決定した。結果、図 4 に示すような遺伝子クラスター（オペ

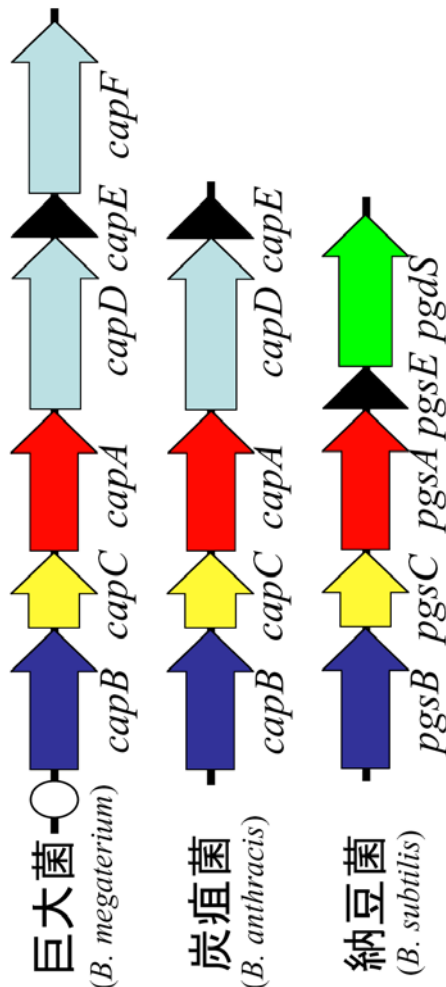


図 4 各 PGA 生産菌の関連代謝遺伝子クラスターに含まれる構造遺伝子群と遺伝子配置

ロン) が認められた。さらに、既知の納豆菌 DL 混成 PGA 代謝関連遺伝子クラスター及び炭疽菌の立体規則性 PGA (D 型) 代謝関連遺伝子クラスターと比較した。興味深いことに、分類学上巨大菌に近く、かつある程度の L 体含有率を示す PGA を作る納豆菌類の pgs クラスターよりも、各遺伝子の配列と配置の両面で、炭疽菌の cap クラスターに近かった。このことは、cap クラスターに対する理解の深化が立体規則性 PGA のバイオ合成のデザインに繋がる重要な洞察を与えることを暗示している。以後、巨大菌の PGA 関連遺伝子群は cap クラスターと称し、とり扱うことにした。立体規則性 PGA に合成に必須の 3 つの遺伝子は capB、-C、-A と呼ばれる。巨大菌と炭疽菌の capB 遺伝子産物 (CapB) 間の相同性は 87%、CapC では 81%、CapA では 68% であった。一方、分解系では、納豆菌の場合、PgdS というエンドペプチダーゼを持つが、cap

クラスターには存在しない。代わりに、CapD というエキソペプチダーゼが存在している。当該遺伝子は巨大菌にも存在した。巨大菌の場合、さらにそのアイソザイムである CapF まで見いだされた。この結果、現在知られている PGA 代謝関連遺伝子クラスターの中で巨大菌のものが最長であることが判明した。

当該遺伝子クラスターにはもう一つ極めて重要な働きをする遺伝子を保持していることが最近になって分かってきた。納豆菌類では pgsE と呼ばれ、亜鉛存在下で DL 混成 PGA の細胞当たりの生産能を 6 倍にまで増大させることができる。炭疽菌では capE と呼ばれ、立体規則性 PGA (D 型) の生産に必須とされている。capE 遺伝子は巨大菌のクラスターにも存在した。いずれも 50~60 アミノ酸でなる小型タンパク質因子をコードしており、分子機構上、不明な部分を多く残すものの、PGA の増産遺伝子として極めて重要な位置にある。巨大菌等が生産する利用価値の高い立体規則性 PGA (L 型) の増産に決定的に重要な役割を果たす有用遺伝子を突き止めた。巨大菌 capE 遺伝子については独立先行して DDBJ 遺伝子バンクに登録した (AB544060)。

(3) 立体規則性 PGA の応用：立体規則性に優れた L 型 PGA には環境ストレス緩衝材料 (エクストリモライト) としての機能が備わっているとされているが、実際にその応用性を検討した例は乏しい。そこでまず、*In vivo* での効果を調査した。図 5 に示したように、

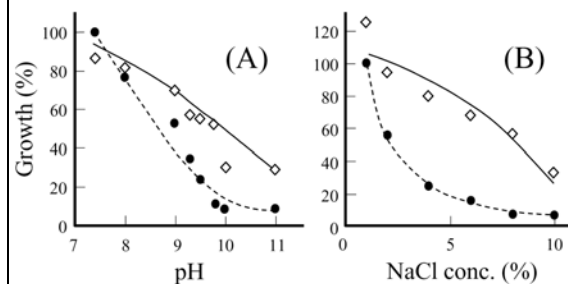


図 5 立体規則性 PGA のストレス保護効果

A はアルカリ環境下での生育、B は高塩環境下での生育曲線を示す。任意の pH 及び塩濃度を含む LB 培地を用い、PGA 添加 (◇) 及び無添加 (●) の条件で菌体を培養した。最適培養条件での菌体濁度を生育率 100% とし他の条件での生育率を算出した。

モデル微生物 (大腸菌) が本来生育できない高塩環境 (4~7%) やアルカリ環境 (pH9~10) でも、PGA が共存することで生育 (増殖) 可能になることが示された。以上の結果は、微生物の耐塩化・アルカリ耐性化に繋がる新たな分子育種法の開発に PGA が極めて重要な役割を果たすことを示唆している。

一般に、環境ストレスから細胞を保護するエクストリモライトは酵素等のような脆弱なバイオ分子の安定化にも利用できるとされている。そこで、モデル酵素 (DNA リガーゼ) の活性を半減させる様々な要因・条件を指標に立体規則性 PGA (0.1 mg/ml) の安定化効果を調査し、その結果を表 1 にまとめた。

表1 モデル酵素の活性が半減する条件

変性要因	活性半減条件	
	PGAなし	PGAあり
温度	44℃	62℃
pH	8.4	~11でも 100%活性
凍結融解	1回	5回
プロテアーゼ	0.025 U	1.1 U

以上、立体規則性PGAは様々な変性・失活要因から酵素を守る優れた保護材料になると示唆された。

(4) まとめと展望：PGAは産業用途展開が望まれているバイオ新素材である。その構造特性から化成ナイロン様の材料物性まで期待できる「バイオナイロン」という位置づけにある。PGAはキラルポリマーであるため、D型、L型、DL混成型が考えられるが、このうちでL型の生合成経路は本研究によるまで不明であった。立体規則性PGA(L型)はさらにエクストリモライト様機能まで備えていた。そのため、該ポリマーは高塩や強アルカリ等の環境ストレスに対し細胞レベルでの耐性化をもたらす新たな分子ツールとして期待できる。本研究で得られた遺伝子レベルの見解はまた、該有用バイオ素材の増産基盤の構築に役立つものになる。今後、巨大菌capクラスターから広く生物種に対応できる分子育種ツールを設計し新たな環境ストレス耐性生物の創成に繋げていくことが求められる。

最近、立体規則性PGA(L型)に水分を含む対象に接着性を示す「湿潤接着」という特性が認められた。この性質を利用することで膜や無生物材料表面に様々な生物機能や触媒性を導入することが可能になる。図6には、

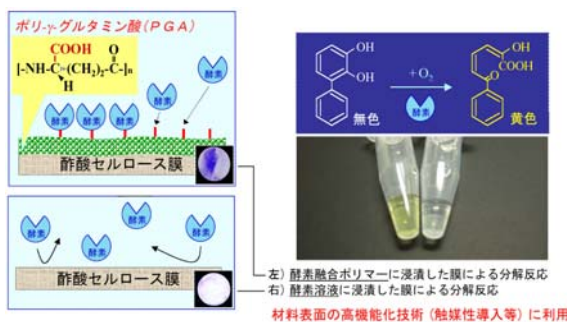


図6 PGAの湿潤接着性を利用した材料表面加工

ここで試作した「特定の環境汚染物質を分解する機能膜」を例示した。今後、立体規則性PGAを環境・医用分野で実用可能なバイオ新材料にまで機能強化(改質)していくことが増々求められるようになっていくだろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- ① M. Ashiuchi et al. (5人中5番目)、Identification and biochemical characterization of membranous short-chain polyglutamate from *Bacillus subtilis*, *Chem. Biodiv.*、査読あり、2010年、印刷中
- ② M. Ashiuchi et al. (3人中3番目)、Extremolyte-like applicability of an archaeal exopolymer, poly-γ-L-glutamate, *Environ. Technol.*、査読あり、2010年、印刷中
- ③ 荻内 誠、ポリ-γ-グルタミン酸の新用途展開、*BIO INDUSTRY*、査読なし、27巻、49-55頁、2010年
- ④ 荻内 誠、D-グルタミン酸とポリ-γ-グルタミン酸合成システム、*生化学会誌*、査読なし、80巻、316-323頁、2008年
- ⑤ 荻内 誠、バイオキラルナイロンの生産に関する微生物化学的基礎研究、*生物工学会誌*、査読なし、86巻、73-79頁、2008年
- ⑥ M. Ashiuchi et al. (6人中1番目)、Genetic design of conditional D-glutamate auxotrophy for *Bacillus subtilis*: Use of a vector-borne poly-γ-glutamate synthetic system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*、査読あり、362巻、646-650頁、2007年
- ⑦ M. Ashiuchi et al. (3人中3番目)、Salt-inducible bionylon polymer from *Bacillus megaterium*, *Appl. Environ. Microbiol.*、査読あり、73巻、2378-2379頁、2007年

[学会発表] (計13件)

- ① 平沖敏文ほか、固体13CNMRによるラセミ化率が異なるポリ-γ-グルタミン酸の研究、日本高分子学会年次大会、2010. 5. 26~28、横浜市・パシフィコ横浜
- ② 吉岡 恵ほか、ポリ-γ-グルタミン酸を基盤とする制菌プラスチック新素材、日本農芸化学会年次大会、2010. 3. 27~30、東京都・東京大学
- ③ M. Ashiuchi et al.、Identification of a Membranous short-chain poly-γ-glutamate from *Bacillus subtilis* and its biochemical characteristics、日本生化学会年次大会、2009. 10. 21~24、神戸市・神戸ポートアイランド
- ④ 荻内 誠ほか、立体規則性ポリ-γ-グルタミン酸のバイオプラスチック化、第58回高分子討論会、2009. 9. 16~18、熊本県・熊本大学
- ⑤ M. Ashiuchi et al.、Moonlighting function of the *pgsE*-gene product, a novel member of the membranous enzyme complex responsible for the synthesis of D-glutamate-containing poly-γ-glutamate, The first International

Conference of D-Amino Acid Research (IDAR)、2009.7.2~4、淡路市、夢舞台国際会議場

- ⑥ 吉岡 恵ほか、巨大菌 *Bacillus megaterium* におけるポリ- γ -グルタミン酸の生産特性、日本農芸化学会年次大会、2009.3.27~29、福岡市・マリンメッセ福岡
- ⑦ M. Ashiuchi et al.、*Bacillus subtilis ywtC (edmS)* is an unexpected plasmid-maintenance gene in the poly- γ -glutamate biosynthetic operon、BMB2008、2008.12.9~12、神戸市・神戸ポートアイランド
- ⑧ M. Ashiuchi、Biochemical synthesis of stereo-regular poly- γ -Glutamate、The 4th Japan-Netherlands Joint Seminar、2008.9.28~30、福岡市・九州大学
- ⑨ 福島賢三ほか、立体規則性ポリ- γ -グルタミン酸の効率的な化学改質法、日本生物工学会年次大会、2008.8.27~29、仙台市・東北学院大学
- ⑩ 菅内 誠、ポリ- γ -グルタミン酸：生合成機構から応用まで、日本農芸化学会年次大会、2008.3.26~29、名古屋市・名城大学
- ⑪ M. Ashiuchi et al.、Salt-inducible bionylon polymer: Microbial synthesis and biochemical application、The 10th Pacific Polymer Conference (PPC10)、2007.12.4~7、神戸市・神戸国際会議場
- ⑫ M. Ashiuchi、Study on a bionylon polymer、poly- γ -glutamate、KSBB International Symposium、2007.10.18~19、韓国大邱市
- ⑬ 菅内 誠、バイオキラルナイロンの生産に関する微生物化学的基礎研究、日本生物工学会年次大会、2007.9.25~27、広島県・広島大学

[図書] (計4件)

- ① M. Ashiuchi、Springer-Verlag (Heidelberg)、Occurrence and biosynthetic mechanism of poly- γ -glutamic acid. In: Amino-Acid Homopolymers Occurring in Nature、*Microbiol. Monogr.*、2010年、印刷中
- ② 菅内 誠、シーエムシー出版、産業用酵素の応用技術と最新動向、272-284頁、2009年
- ③ 菅内 誠、シーエムシー出版、ホワイトバイオテクノロジー；エネルギー・材料の最前線、272-284頁、2008年
- ④ M. Ashiuchi、H. Misono.、Nova Science Publishers、Micro-purification and structural assays of poly- γ -glutamate, a D-amino acid-containing biopolymer、In: D-Amino Acids: A New Frontier in Amino Acid and Protein Research-Practical Methods and Protocols、403-407頁、2007年

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

- ①名称：PGAイオンコンプレックス
発明者：菅内 誠、福島賢三
権利者：高知大学
種類：特許
番号：特願 2009-072596
出願年月日：2009.3.24
国内外の別：国内
- ②名称：ポリ- γ -グルタミン酸架橋体の製造方法およびポリ- γ -グルタミン酸架橋体からなる成形体
発明者：菅内 誠、福島賢三
権利者：高知大学
種類：特許
番号：特開 2009-209362
出願年月日：2009.2.5
国内外の別：国内
- ③名称：Process for producing poly- γ -glutamic acid having high optical purity
発明者：M. Ashiuchi, K. Shimizu
権利者：Kochi University
種類：Patent
番号：EP07 707 809.5-1521
出願年月日：2008.7.15
国内外の別：International

[その他]

- ① 国際バイオフィォーラム ~ バイオ アカデミック フォーラム ~ (主催：エグジビジョンジャパン)、参加・技術説明、2009.7.1~3、東京都・東京ビックサイト
- ② イノベーションブリッジ四国地区四大学研究発表会 (主催：JST)、参加・技術説明、2007.12.14、東京・秋葉原

6. 研究組織

(1)研究代表者

菅内 誠 (Makoto Ashiuchi)
高知大学・教育研究部自然科学系・准教授
研究者番号：20271091

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

永田 信治 (Shinji Nagata)
高知大学・教育研究部自然科学系・教授
研究者番号：60180494