

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：20380053

研究課題名(和文) 微生物および植物のアルドキシムニトリル経路上の酵素群のキラル合成への利用

研究課題名(英文) Use of the enzymes in the microbial and plant "aldoxime-nitrile pathway" for chiral synthesis

研究代表者

浅野泰久 (ASANO YASUHISA)

富山県立大学・工学部・生物工学科・教授

研究者番号：00222589

研究成果の概要(和文)：

(1) 植物酵素ヒドロキシニトリルリアーゼ(HNL)の開発と光学活性シアノヒドリンの合成に関する研究：多種類のHNLのライブラリーを構築する目的で、我々が発見した数種類のHNL遺伝子の異種宿主での発現を検討した。*P. mume*(梅)については、cDNAクローニング、一次構造の解明および*Pichia pastoris*における活性発現に成功した。*Baliospermum montanum*についてはcDNAクローニングしN末端にHis-Tagの付加、およびC末端の短縮化によって大腸菌で可溶性に発現できた。*B. montanum*由来HNLの酵素化学的諸性質、各種の芳香族、脂肪族の光学活性シアノヒドリンの不斉合成について明らかにした。*Manihot esculenta*(キャッサバ)、*Hevea brasiliensis*(ゴム)由来(S)-HNLを、大腸菌、酵母、原生動物*Leishmania tarentolae*(LEXSYシステム)、無細胞タンパク質合成システム、大腸菌由来*in vitro*タンパク質合成ピュアシステム等において発現を検討した。*assiflora edulis*(パッションフルーツ)からのHNLを精製し、酵素化学的諸性質を初めて明らかにした。有機溶媒二層系により(R)-マンデロニトリルを合成した。*Arabidopsis thaliana*由来(R)-HNLは、遺伝子クローニングし、大腸菌で発現し、Henry反応に応用した。*E. japonica*由来(R)-HNLの酵素化学的諸性質を明らかにすると共に、有機溶媒と水の二相系での合成反応を行い、各種芳香族や脂肪族のS光学活性シアノヒドリン合成法を完成した。

(2) 可溶性HNLの発現メカニズムの解明：*M. esculenta*由来HNL遺伝子の大腸菌における種々の発現条件を検討した。His103Leuの一点の変異や、3箇所Lys残基をProに変異させると、封入体の蛋白質がほぼ可溶性になる大量発現の現象を見出しているため、可溶性な活性蛋白質の酵素化学的諸性質と発現メカニズムの解明、可溶性となる変異の一般性についての検討を行った。*P*

(3) アミノ酸アミドやアミノニトリルのダイミックな光学分割：アミノ酸アミドラセマーゼの構造解析と進化分子工学については、名古屋大学工学部の山根隆教授らと共にACLラセマーゼの構造の解明に成功しており、基質特異性を左右する部位に特化して変異を行い、アミノ酸アミドに対する反応速度が向上した変異型酵素を得た。さらに、変異型酵素の速度論的検討を行った。土壌からのスクリーニングにより新しいアミノ酸アミドラセマーゼを得た。

研究成果の概要(英文)：

(1) Development of hydroxynitrile lyase (HNL) and its use in optically active cyanohydrin: To construct a library of HNLs, several HNL genes were expressed in heterogenous hosts. We succeeded in cDNA cloning, primary structure elucidation and expression of cDNA of *P. mume* (Plum) HNL in methanol yeast *Pichia pastoris*. Full-length cDNA and genomic DNA of a novel S-HNL from a plant, *Baliospermum montanum* were cloned and sequenced. The genomic DNA contained two introns and one ORF encoding a 263-residue protein (subunit: 29.5 kDa). C-terminal short truncations proved to be successful to access higher productivity in culture medium of *E. coli* up to 3-fold. The hnl gene was expressed in *E. coli* and the

enzyme was characterized including kinetic studies of 20 substrates for (*S*)-cyanohydrin synthesis. An *R*-HNL from *Arabidopsis thaliana* accepts nitromethane (MeNO₂) as a donor in a reaction with aromatic aldehydes to yield (*R*)-β-nitro alcohols (Henry reaction). This is the first example of the *R*-HNL-catalyzed synthesis of (*R*)-β-nitro alcohols. (*R*)-Mandelonitrile was successfully synthesized by an enzymatic transcyanation reaction of benzaldehyde and acetone cyanohydrin catalyzed by a HNL from *Eriobotrya japonica* (EjHNL) in an aqueous-organic biphasic system. An HNL from leaves of *Passiflora edulis* (PeHNL) was purified and characterized for the first time. Asymmetric synthesis of (*R*)-mandelonitrile in a biphasic system employing PeHNL as carried out.

(2) Mechanism of functional expression of HNL from *Manihot esculenta*: Functional expression of HNL from *M. esculenta*, MeHNL, was achieved in *E. coli*. The highly soluble mutant MeHNL-His103Leu were expressed in the systems such as *Pichia pastoris*, *Leishmania tarentolae* and two cell-free translation systems, such as *E. coli* PURE system and Wheat germ translation system. The phenomenon of the functional expression was proven to be specific to the *E. coli* system.

(3) Dynamic kinetic resolution of amino acid amide: The first crystal structures of a fold-type I racemase are solved for the native form and ε-caprolactam-complexed form of α-amino-ε-caprolactam racemase. Mutation was successfully done to affect the substrate specificity of the enzyme. Further screening for new amino acid amide racemase was carried out.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	5,500,000 円	1,650,000 円	7,150,000 円
平成 21 年度	4,700,000 円	1,410,000 円	6,110,000 円
平成 22 年度	4,700,000 円	1,410,000 円	6,110,000 円
年度			
年度			
総 計	14,900,000 円	4,470,000 円	19,370,000 円

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：酵素、応用微生物、植物、遺伝子、有機工業化学

1. 研究開始当初の背景

① 研究の学術的背景：国内外の研究動向及び位置づけ：I. ヒドロオキシニトリルリアーゼ (HNL) に関する研究としては、欧州を中心として植物酵素 HNL が触媒する不斉合成反応を用いて、光学活性シアノヒドリン製造する研究が進んでいる。我が国では、我々以外の研究はほとんど無かった。II. アミノ酸アミドやアミノニトリルのダイミク光学分割について、酵素を用いるキラル合成では、系内ラセミ化によって理論収率が 100% となるダイナミックな光学分割に関する研究に大きな焦点が当てられている。オランダの DSM 社もアミノ酸アミドラセマーゼを開発している。

応募者のこれまでの研究成果：I. 植物および微生物の「アルドキシム-ニトリル経路」を解明し、その代謝酵素を有用物質生産のた

めに開発して来た。すなわち、植物由来のヒドロキシニトリルリアーゼ (HNL) について応用微生物学的発想でスクリーニングを行い、7 種類の新しい HNL を発見し (世界の既知種の約 30%)、シアノヒドリンの不斉合成に利用した。また、微生物の新規酵素アルドキシム脱水酵素を見出し、ニトリルヒドラターゼの代謝の上流にあることを明らかにすると共に、ニトリルの世界初の酵素的合成に利用した。ニトリルヒドラターゼ、ニトリラーゼ、アミダーゼ等のニトリル分解酵素の遺伝子クラスターを解読し、「アルドキシム-ニトリル経路」が微生物界に普遍的に存在していることを解明した。II. 一方、*Achromobacter obae* 由来のα-アミノ-ε-カプロラクタム (ACL) ラセマーゼ (EC 5.1.1.15) に新規なアミノ酸アミドラセマーゼ活性を発見し、我々が開発して来たアミノ酸アミド

加水分解酵素類と組合せて用いることにより、アミノ酸アミドのダイミク光学分割を実現した。アミノ酸アミドを原料とする、光学活性なアミノ酸の定量的な合成を世界で初めて可能にした。また、非選択的なニトリルヒドラーゼを組合せると、合成アミノニトリルを原料とする、世界で最短の工程からなる光学活性アミノ酸合成法となる。

2. 研究の目的

(1) 植物酵素ヒドロキシニトリルリアーゼ (HNL) の開発と光学活性シアノヒドリンの合成に関する研究: 多種類の HNL のライブラリーを構築する目的で、新規な *Prunus mume* (梅) や *Eriobotrya japonica* (びわ) の (R)-HNL、並びに富山県中央植物園に見出した *Baliospermum montanum* の (S)-HNL 等計 6 種類 (アイソザイムを加え 9 種類) の HNL 遺伝子の大腸菌や酵母での発現を検討する。これらの cDNA クローニングの完成とゲノムからの直接シーケンシングによる構造確認を行う。それらの大腸菌や *Pichia pastoris* での発現を検討し、光学活性シアノヒドリンの合成に利用する。酵母での発現については、京都大学との共同研究を行う。

(2) 可溶性 HNL の発現メカニズムの解明: *Manihot esculenta* (キャッサバ) の (S)-HNL 遺伝子の進化分子工学により大腸菌での活性発現について検討する。予備的検討により、すでに封入体の蛋白質がほぼ可溶性酵素として大量発現する現象を見出している。可溶性な活性蛋白質の酵素化学的諸性質と発現メカニズムの解明、可溶性となる変異の一般性についての検討を行う。

(3) アミノ酸アミドやアミノニトリルのダイミク光学分割 (i) アミノ酸アミドラーゼの構造解析と進化分子工学 名古屋大学との共同研究によって、アミノ酸アミドラーゼの立体構造を解明する。大腸菌における酵素の大量発現を行う。結晶構造解析の結果を得て、コンピュータによる基質複合体のドッキングシミュレーションを行い、活性部位を探索する。活性中心近傍のアミノ酸残基に変異を与え、基質特異性および反応速度が増加した変異型酵素を得る。アミノ酸と基質のアミノ酸アミドを区別している残基を解明し、アミノ酸ラーゼと比較する。すでに確立したアミノ酸アミド加水分解酵素およびアミノ酸酸化酵素をカップルさせたハイスループットスクリーニング系を用いる。(ii) α -アミノニトリルのダイミク光学分割: アミノ酸アミドの合成の上流に位置する α -アミノニトリルを基質とするダイミク光学分割を検討する。この反応法では非立体選択的に α -アミノニトリルを水和するニトリルヒドラーゼの開発により、アミノ酸アミドを得、さらにアミノ酸ア

ミド加水分解酵素と ACL-ラーゼの都合 3 種類の酵素の共存により、ラーゼ体・アミノニトリルのダイミク光学分割を行い、光学活性アミノ酸を収率 100%、光学純度 100%で得る。

② 学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義: 多種類の HNL の可溶性酵素としてのライブラリーを作る研究は、世界でまだ行われていない。また、進化分子工学を用いて植物酵素 HNL が大腸菌で可溶性に発現される変異型酵素を得、大腸菌で可溶性に発現するこれらの変異型 HNL の工業用酵素としての利用は非常に有望である。それらの発現メカニズムと一般性の解明は、大腸菌を用いて HNL を始めとする異種蛋白質の工業利用のみならず、基礎的にも重要な知見を与えるものであり、その変異に一般則が見いだせれば、世界のバイオテクノロジー関連産業に大きなインパクトを与えることができる。基礎的側面としては、上記の変異酵素は、いずれも変性しにくい性質を持ち、封入体については変性剤で変性後、可溶性酵素への巻き戻しが容易になっていると考える。

3. 研究の方法

(1) 植物酵素 HNL の開発と光学活性シアノヒドリンの合成に関する研究: 多種類の HNL のライブラリーを構築する目的で、我々が発見した 3 種類 (アイソザイムを入れると 6 種類)、既知 3 種類、計 6 (9) 種類の HNL 遺伝子の大腸菌や酵母での発現を検討する。すなわち、*Prunus mume* (梅)、*Eriobotrya japonica* (びわ)、および *Prunus dulcis* (*amygdalus*、アーモンド) 由来 (R)-HNL、並びに *Baliospermum montanum*、*Manihot esculenta* (キャッサバ)、*Hevea brasiliensis* (ゴム) およびデータベースで類似性を確認した *Arabidopsis thaliana* 由来 (S)-HNL の cDNA クローニングを行う。すでに *Prunus mume* では精製酵素の N 末端アミノ酸配列の結果から、3 種類のアイソザイムの cDNA クローンを得ている。*Manihot esculenta*、*Prunus dulcis* および *Hevea brasiliensis* 遺伝子は、遺伝子オリゴマーの PCR 連結反応により合成が終了している。*Baliospermum montanum* 由来 (S)-HNL も精製酵素の N 末端アミノ酸配列の結果を基に cDNA クローニングに成功しており、さらにゲノムからの遺伝子クローニングから一次構造を確認する。*Arabidopsis thaliana* 由来 (S)-HNL は、市販の cDNA 遺伝子ライブラリーから PCR によりクローニングを行い、大腸菌での直接的な可溶性発現を検討する。これらの 6 種類の植物由来遺伝子は、しばしば大腸菌での発現が難航することから、各種プロモーター下流での発現や融合蛋白質としての発現を検討する。さらに遺伝子への部位特異的変異及びランダム変異の導

入によって遺伝子レベルでの改変を行う。*Eriobotrya japonica* および *Passiflora edulis* (パッションフルーツ) の (R)-HNL については、植物体からの HNL の精製を行い、酵素化学的諸性質を解明する。一方、これらの遺伝子の *Arabidopsis thaliana* 由来 (S)-HNL 以外は、発現実験が当初の計画どおり進行しないことが予想される。そこで、京都大学の由里本博也准教授と *Pichia pastoris* を用いる相同組換え法により、酵母での発現についての共同研究を展開する。これらの多種類の HNL について可溶性の状態で作られた酵素を用いて、各種の芳香族、脂肪族の光学活性シアノヒドリンを不斉合成する。特に、我々が発見した *Eriobotrya japonica* および *Passiflora edulis* については、酵素化学的諸性質を明らかにすると共に、有機溶媒と水の二相系での合成反応を行い各種光学活性シアノヒドリン合成法を完成する。

(2) 可溶性 HNL の発現メカニズムの解明：アッセムブリー PCR 合成により得た *Manihot esculenta* (キャッサバ) HNL 遺伝子の *E. coli* における種々の発現条件を検討する。大腸菌が頻度高く使用するコドンを選んで遺伝子を設計し、合成 DNA オリゴマーの PCR 連結反応により合成すると共に、遺伝子への部位特異的変異及びランダム変異の導入によって遺伝子レベルでの改変を行い可溶性画分として発現させる。His103Leu の一点の変異により、培養当たり約 17 倍の活性を示し、封入体の蛋白質がほぼ可溶性になる大量発現の現象を見出している。また、20 個の Lys 残基の内、3 箇所の Lys 残基を Pro に変異させると、培養当たり約 10 倍の活性を示し、同様に可溶性となる。そこで、可溶性な活性蛋白質の酵素化学的諸性質と発現メカニズムの解明、可溶性となる変異の一般性についての検討を行う。また、得られた変異型 HNL を精製し、大腸菌プロテアーゼに対する安定性、温度耐性や変性剤に対する安定性を野生株と比較して明らかにする。また、この変異型酵素の封入体としてわずかに残存している蛋白質を回収し、変性剤で変性後、活性型への巻き戻しを行い、その挙動を CD スペクトル等を用いて検討し野生型酵素と比較する。His103Leu の変異型酵素の発現が最大限になる温度条件や、IPTG の添加条件を明らかにする。His103Leu 等の変異型酵素を精製し、酵素化学的諸性質、特に温度耐性や変性剤に対する安定性を野生株と比較して明らかにする。また、この変異型酵素の封入体としてわずかに残存している蛋白質を回収し、変性剤で変性後、活性型への巻き戻しを行い、その挙動を CD スペクトル等の情報を野生型酵素と比較する。これらの実験により、野生型および変異型酵素のミスフォールディングの

容易さを評価することが可能になり、活性型酵素の正常な発現メカニズムの解明に役立たせることができる。また、His103 残基に飽和変異を行い、どのようなアミノ酸残基群に変異した際に可溶性発現が起こるのかを明らかにする。さらに His103Leu の可溶性を打ち消すような変異型酵素を得、メカニズムの推定に役立たせる。すでに、そのような変異型酵素を多数得ている。His103Leu の変異では、塩基性が減少し、かつ水素結合が 1 個減少することになるが、これらの実験により、野生型および変異型酵素のミスフォールディングの容易さを評価できるので、この可溶性となる変異のメカニズムの推定に役立たせる。

Lys→Pro の変異型酵素についても同様に酵素化学的諸性質のデータ、特に温度耐性や変性剤に対する安定性を野生株と比較して明らかにする。3 点の Lys を飽和変異の後のスクリーニングで Pro への 1 点変異、2 点変異、3 点変異の酵素に変異させると、段階的、相乗的に可溶性発現が向上することを認めている。そこで、それぞれ封入体および可溶性酵素を分離し、封入体については、各種の変性剤で変性後、可溶性酵素として巻き戻す条件を検討する。すなわち、変性剤で処理後、良好な可溶性酵素に巻き戻しが起こるかについて検討する。一方、可溶性酵素については、特に温度耐性や変性剤に対する安定性を野生株と比較して明らかにする。得られた Lys→Pro の代表的な変異についても、それらの可溶性を打ち消す変異型酵素を得、対照として用いて変異のメカニズムを推定する。

Pichia pastoris および市販の *in vitro* 発現系などの大腸菌以外の発現系で、変異型酵素がどのような発現挙動を示すかについて検討する。すなわち、上記の検討で見出された変異型酵素のうち、大腸菌の系で良好に可溶性酵素として発現するもの、中程度のもの、さらに封入体としてしか発現しない野生型酵素などを選び検討を行う。*Pichia pastoris* は、真核生物であり、植物酵素の発現に適している。後者は菌体外に分泌発現を行う。市販の *in vitro* 発現系としては、*E. coli* S30 Extract System の大腸菌無細胞翻訳システムやコムギ胚芽蛋白質生合成系を対照実験として用いる。これらの実験で、変異型酵素あるいは発現系の、どの要素が可溶性発現を可能にしているのかを検討する。植物酵素が大腸菌で可溶性蛋白質として発現される現象に一般性があれば、遺伝子組換え技術の応用の範囲が一挙に広がる。そこで、類似酵素である *Hevea brasiliensis* (ゴム)、および我々が全く新しい HNL 生産植物として得、cDNA クローニングを済ませている、*Baliospermum montanum* について、His103Leu に相当する部分、および Lys の Pro への変異、

並びにランダム変異等を行い、同様に可溶性酵素としての発現を検討する。これらの大腸菌で可溶性に発現される HNL は、産業用酵素として利用価値が高いので企業との共同研究を進める。

(3) アミノ酸アミドやアミノニトリルのダイミックな光学分割 (i) アミノ酸アミドラセマーゼの構造解析と進化分子工学では、名古屋大学工学部の山根隆教授らと共に X 線構造解析研究を開始し、ACL ラセマーゼの構造を解明する。山根隆教授の研究グループと共に ACL ラセマーゼの構造のどの部分がアミノ酸アミドとアミノ酸を識別しているのか、また基質特異性に関わる部位について検討し、集中的にエラーブローン PCR 法を行う。すでに、統合計算化学システム (MOE) を用いて、基質との複合体を計算によって求め、活性中心の部位に効率的な変異を与えている。また、基質特異性を左右する部位に特化してエラーブローン PCR を行い、アミノ酸アミドに対する反応速度が向上した変異株を得る。ここでは、すでに確立したアミノ酸アミド加水分解酵素およびアミノ酸酸化酵素をカップリングする検出法を用いてハイスループットスクリーニングを行う。既知のアミノ酸ラセマーゼは多種類が知られており、一次構造上の相同性も高いので、それらをアミノ酸アミドラセマーゼに変異させる研究も行う。さらに、得られた知見をもとに、種々のアミノ酸アミドラセマーゼを創製する。それらの酵素工学上の利用価値は極めて高い。

(ii) α -アミノニトリルのダイナミックな光学分割：多くのラセミ体 α -アミノニトリルの酵素的変換法の研究は、ニトリラーゼを用いた光学アミノ酸への変換に関するものである。従来わずかに、微生物によるラセミ体 α -アミノニトリルの水和反応により理論収率 50% でアミノ酸を得る方法が研究されて来た。本研究では ACL-ラセマーゼを用いたラセミ体 α -アミノニトリルのダイナミックな光学分割によって光学活性アミノ酸を収率 100%、光学純度 100% で得ることを目的とする。この反応においては非立体選択的に α -アミノニトリルを水和するニトリルヒドラーゼが必要である。そこで、立体選択性の低いニトリルヒドラーゼを生産する微生物を選択する。非立体選択的にラセミ体 α -アミノ酪酸アミドへと水和する微生物は、土壌サンプルより分離する。分離した微生物由来のニトリルヒドラーゼは精製し酵素化学的諸性質の検討を行う。非立体選択的ニトリルヒドラーゼ、ACL-ラセマーゼそして L-アミノ酸アミダーゼまたは、D-アミノペプチダーゼを含む 3 つの精製酵素を用いて、一つの反応槽でそれぞれ S 体あるいは R 体アミノ酸を収率 100% で合成する。目的に合致する非立体選択的ニトリルヒドラーゼを得、一次構造の

解明、3 種類の酵素の同時発現を検討し、合成した α -アミノニトリルに直接作用させ、都合 2 段階で光学活性アミノ酸を定量的に合成する究極のアミノ酸合成法を確立する。

上記の研究に対して、次の研究体制を組織する。(1) 博士課程学生が植物酵素 HNL の開発と光学活性シアノヒドリンの合成に関する研究を担当する (平成 20 年度)。(2) イランイスラム共和国からの文部科学省国費留学生、博士課程学生が、可溶性 HNL の発現メカニズムの解明を担当する (平成 20~21 年度)。(3) 平成 20 年度より 3 箇年雇用予定のポストドクター 1 名が、アミノ酸アミドやアミノニトリルのダイミックな光学分割 (i) アミノ酸アミドラセマーゼの構造解析と進化分子工学を担当する。(ii) 博士課程学生が、 α -アミノニトリルのダイナミックな光学分割を担当する (平成 20~21 年度)。ポストドクター 1 名は、順次博士課程を修了する学生が残す実験を完成する。浅野教授は、これらの研究を総括し、学生 3 名およびポストドクターに対して直接研究指導を行う。米田講師は彼らに遺伝子実験実技の指導支援を行う。富宿賢一助教が、基質合成や生成物の同定等の有機化学的側面から支援を行う。京都大学由里本准教授は、京都大学を訪問する学生に指導し、富山県立大学で行う HNL の酵母での発現実験について助言と指導を行う。名古屋大学山根教授は、富山県立大学で精製した ACL ラセマーゼの X 線構造解析を行い、富山県立大学でのドッキングシミュレーション実験などに助言と指導を行う。

4. 研究成果

(1) 植物酵素 HNL の開発と光学活性シアノヒドリンの合成に関する研究：多種類の HNL のライブラリーを構築する目的で、我々が発見した数種類の HNL 遺伝子の異種宿主での発現を検討した。*P. mume* (梅) については、cDNA クローニング、一次構造の解明および *Pichia pastoris* における活性発現に成功した。*Baliospermum montanum* については cDNA クローニングし N 末端に His-Tag の付加、および C 末端の短縮化によって大腸菌で可溶性に発現できた。*B. montanum* 由来 HNL の酵素化学的諸性質、各種の芳香族、脂肪族の光学活性シアノヒドリンの不斉合成について明らかにした。*Manihot esculenta* (キャッサバ)、*Hevea brasiliensis* (ゴム) 由来 (S)-HNL を、大腸菌、酵母、原生動物 *Leishmania tarentolae* (LEXSY システム)、無細胞タンパク質合成システム、大腸菌由来 *in vitro* タンパク質合成ピュアシステム等によって発現を検討した。*Arabidopsis thaliana* 由来 (R)-HNL は、遺伝子クローニングし、大腸菌で発現し、Henry 反応に応用した。

(2) 可溶性 HNL の発現メカニズムの解明：*M.*

esculenta 由来 HNL 遺伝子の大腸菌における種々の発現条件を検討した。His103Leu の一点の変異や、3 箇所の Lys 残基を Pro に変異させると、封入体の蛋白質がほぼ可溶性になる大量発現の現象を見出しているので、可溶性な活性蛋白質の酵素化学的諸性質と発現メカニズムの解明、可溶性となる変異の一般性についての検討を行った。

(3) アミノ酸アミドやアミノニトリルのダイミク光学分割：アミノ酸アミドラセマーゼの構造解析と進化分子工学 名古屋大学工学部の山根隆教授らと共に ACL ラセマーゼの構造の解明に成功し、基質特異性を左右する部位に特化して変異を行い、アミノ酸アミドに対する反応速度が向上した変異型酵素を得た。さらに、変異型酵素の速度論的検討、および野生型では合成できなかった D-フェニルアラニン等の合成に成功した。土壌からのスクリーニングにより新しいアミノ酸アミドラセマーゼを得た。

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 16 件)

- ① Y. Asano, M. Yamazaki, M. Dadashpour, N. Doi, and H. Komeda, Functional expression of a plant hydroxynitrile lyase in *Escherichia coli* by directed evolution: Creation and characterization of highly in vivo soluble mutants, *Protein Engineering*, accepted.
- ② M. Dadashpour, Y. Fukuta, and Y. Asano, Comparative expression of wild-type and highly soluble mutant His103Leu of hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* in prokaryotic and eukaryotic expression systems, *Protein Expr. Purif.*, **77 (1)**, 92-97 (2011).
- ③ Y. Fukuta, S. Nanda, Y. Kato, H. Yurimoto, Y. Sakai, H. Komeda, and Y. Asano, Characterization of a new (*R*)-hydroxynitrile lyase from Japanese apricot *Prunus mume* and cDNA cloning and secretory expression of one of the isozymes in *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **75 (2)**, 214-220 (2011).
- ④ Y. Fukuta, S. Koizumi, H. Komeda, and Y. Asano. A new aryl acylamidase from *Rhodococcus* sp. strain Oct1 acting on ω -lactams: its characterization and gene expression in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.*, **46 (3-4)**, 237-24 (2010).
- ⑤ T. Ueatrongchit, K. Tamura, T. Ohmiya, A. H-Kittikun, Y. Asano. Hydroxynitrile lyase from *Passiflora edulis*: characteristics and application in asymmetric synthesis of (*R*)-mandelonitrile. *Enzyme Microb. Technol.*, **46 (6)**, 456-465 (2010).
- ⑥ S. Okazaki, A. Suzuki, T. Mizushima, T. Kawano, H. Komeda, Y. Asano and T. Yamane. The novel structure of a pyridoxal-5' -phosphate-dependent fold-type I racemase, α -amino- ϵ -caprolactam racemase from *Achromobacter obae*. *Biochemistry*, **48 (5)**, 941-950 (2009).
- ⑦ I. Kira, Y. Asano and K. Yokozeki. Screening, purification, and identification of the enzyme producing N-(L- α -L-aspartyl)-L-phenylalanine methyl ester from L-isoasparagine and L-phenylalanine methyl ester. *J. Biosci. Bioeng.*, **108 (3)**, 190-193 (2009).
- ⑧ H. Sawai, H. Sugimoto, Y. Kato, Y. Asano, Y. Shiro, and S. Aono. X-ray crystal structure of the Michaelis complex of aldoxime dehydratase. *J. Biol. Chem.*, **284 (46)**, 32089-32096 (2009).
- ⑨ T. Ueatrongchit, A. Kayo, H. Komeda, Y. Asano and A. H-Kittikun. Molecular properties of a novel (*R*)-hydroxynitrile lyase from *Eriobotrya japonica* (loquat). *J. Molec. Catal. B: Enzymatic*, **56 (4)**, 208-214 (2009).
- ⑩ Y. Fukuta, H. Komeda, Y. Yoshida and Y. Asano. High yield synthesis of 12-aminolauric acid by "Enzymatic transcrystallization" of ω -laurolactam using ω -laurolactam hydrolase from *Acidovorax* sp. T31. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **73 (5)**, 980-986 (2009).
- ⑪ T. Ueatrongchit, A. Kayo, H. Komeda, Y. Asano and A. H-Kittikun. Purification and characterization of hydroxynitrile lyase from *Eriobotrya japonica*. *Biosci. Biotech. Biochem.*,

- 72 (6)**, 1513-1522 (2008).
- ⑫ H. Komeda and Y. Asano. A novel D-stereoselective amino acid amidase from *Brevibacterium iodinum*: gene cloning, expression and characterization, *Enzyme Microb. Technol.*, **43 (3)**, 276-283 (2008).
- ⑬ N. Wehofsky, A. Pech, S. Liebscher, S. Schmidt, H. Komeda, Y. Asano and F. Bordusa. D-Amino acid specific proteases and native all-L-proteins: A convenient combination for semisynthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **47 (29)**, 5456-5460 (2008).
- ⑭ Y. Asano, Y. Fukuta, Y. Yoshida and H. Komeda. A new enzymatic synthesis of 12-aminolauric acid -Screening, characterization and the use of ω -laurolactam hydrolase-. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **72 (8)**, 2141-2150 (2008).
- ⑮ S. Okazaki, A. Suzuki, H. Komeda, Y. Asano, T. Yamane, Deduced catalytic mechanism of D-amino acid amidase from *Ochrobactrum anthropi* SV3, *J. Synchrotron Rad.*, **15**, 250-253 (2008).
- ⑯ S. Okazaki, A Suzuki, T. Mizushima, H. Komeda, Y. Asano, T. Yamane, Crystal structures of D-amino acid amidase complexed with L-phenylalanine and with L-phenylalanine amide: Insight into D-stereospecificity of D-amino acid amidase from *Ochrobactrum anthropi* SV3, *Acta Cryst.*, **D64**, 331-334 (2008).

[学会発表] (計 56 件)

国際会議発表

1. Y. Asano, Dynamic kinetic resolution of aminonitrile and amino acid amide to form chiral amino acids, Gordon Conferences on Biocatalysis, Jul 7, 2008 (Rhode Island, USA)
2. Y. Fukuta, H. Komeda, Y. Yoshida, and Y. Asano, A new enzymatic synthesis of 12-aminolauric acid from ω -laurolactam using omega-laurolactam hydrolase, 4th International Congress on Biocatalysis, 2008.9.1 (Hamburg, Germany)
3. M. Dadashpour, M. Yamazaki, K. Momonoi, K. Tamura, H. Komeda, and Y.

- Asano, Cloning and expression of a novel (S)-hydroxynitrile lyase from plant *Baliospermum montanum* in *Escherichia coli*, 4th International Congress on Biocatalysis, 2008.9.3 (Hamburg, Germany)
4. Y. Asano, Enzymatic processes which replaced some of already established chemical processes, BioKorea2008, 2008.9.9 (Osong, Korea)
 5. H. Komeda and Y. Asano, Functional analysis and application of D-stereoselective peptidases and amidases from microorganisms, The tenth Korea-China-Japan Joint Symposium on Enzyme Engineering 2008.11.4 (Busan, Korea)
 6. S. Okazaki, A. Suzuki, H. Komeda, Y. Asano, and T. Yamane, The novel structure and function of pyridoxal-5' -phosphate-dependent Fold type I racemase, α -amino- ϵ -caprolactam racemase from *Achromobacter obae*, The tenth Korea-China-Japan Joint Symposium on Enzyme Engineering 2008.11.4 (Busan, Korea)
 7. Y. Asano, K. Yasukawa, S. Maruyama, R. Hasemi, S. Okazaki, T. Yamane, S. Yamaguchi, H. komeda, Dynamic kinetic resolution of α -aminonitriles and amino acid amides, The 1st International Conference of D-amino acid Research, 2009.7.1 (淡路島)
 8. Y. Asano, K. Yasukawa, S. Maruyama, R. Hasemi, S. Okazaki, T. Yamane, S. Yamaguchi, H. Komeda, Dynamic kinetic resolution of α -aminonitriles and amino acid amides, Biotrans 2009, 2009.7.7 (Berne, Switzerland)
 9. T. Ueatrongchit, K. Tamura, H. Komeda, Y. Asano, A. H-Kittikun, Asymmetric transcyanation synthesis of (R)-mandelonitrile by using a novel (R)-hydroxynitrile lyase from *Passiflora edulis*, Biotrans 2009, 2009.7.9 (Berne, Switzerland)
 10. K. Yasukawa, R. Hasemi, H. Komeda, Y. Asano, Dynamic kinetic resolution of racemic α -aminonitriles to form chiral amino acids, Biotrans 2009, 2009.7.9 (Berne, Switzerland)
 11. Y. Asano, Enzymatic

- Transcrystallization” of ω -Lauro lactam to 12-Aminolauric acid by ω -lauro lactam hydrolase from *Acidovorax* sp. T31, Enzyme Engineering XX, 2009.9.23 (Groningen, The Netherlands)
12. K. Fuhshuku, Y. Fukuta, S. Nanda, Y. Asano, Expanding the Synthetic Applicability of Hydroxynitrile Lyase-catalyzed Reaction, Enzyme Engineering XX, 2009.9.23 (Groningen, The Netherlands)
 13. Y. Asano, Use of penicillin recognizing enzymes in L-peptide and D-amino acid synthesis, 15th German-Japanese Workshop in Enzyme Technology, 2009.9.26 (Rostoc, Germany)
 14. Y. Asano, Use of penicillin-recognizing enzymes in L-and D-peptides, and D-amino acid syntheses, Italy-Japan symposium, new trends in enzyme science and technology, 2009.10.26 (Naples, Italy)
 15. K. Fuhshuku and Y. Asano, Asymmetric Henry Reaction Catalyzed by (*R*)-Hydroxynitrile Lyase from *Arabidopsis thaliana*, Biocat2010 国際会議, 2010.8.30 (Hamburg, Germany)
 16. I.G. Khaliullin, D. Suplatov, V. Svedas, Y. Asano, M. Otsuka, and D. Shalaeva, The Role of Lys65 Residue in Catalytic Triad of D-aminopeptidase from *Ochrobactrum anthropi* Revealed by Bioinformatic Analysis and Molecular Modeling, Biocat2010 国際会議, 2010.8.30 (Hamburg, Germany)
 17. Y. Asano, Development of enzymes for industrial and diagnostic uses, 第11回日中韓酵素工学会議, 2010.11.7 (Chengdu, China)
 18. K. Yasukawa, R. Hasemi, Y. Asano, Dynamic kinetic resolution of racemic α -aminonitriles to form chiral α -amino acids, 第11回日中韓酵素工学会議, 2010.11.7 (Chengdu, China)
 19. Y. Asano and M. Dadashipour, Functional Expression of a Plant Enzyme *S*-Hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* in *Escherichia coli*, The 12th Japanese-Swiss Meeting on Biotechnology and Bioprocess Development. 2010.10.11-12 (富山) .
 20. M. Dadashipour, Y. Fukuta, and Y. Asano: Functional expression of a plant *S*-hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* in *Escherichia coli*. The 12th Japanese-Swiss Meeting on Biotechnology and Bioprocess Development. 2010.10.11-12 (富山)
 21. Y. Asano, Enzymatic Processes which Replaced Some of Already Established Chemical Processes Symposium on Biomass to Fuels & Chemicals, 2011.1.13 (Singapore)

国内講演発表

1. 福田泰久、米田英伸、吉田洋一、浅野泰久、*Acidovorax* sp. T31 由来 omega-ラウロラクタム加水分解酵素を用いた 12-アミノラウリン酸の酵素的合成、第 60 回日本生物工学会大会 (2008 年)、2008.8.27 (仙台市)
2. 岡崎誠司、鈴木淳巨、米田英伸、浅野泰久、山根隆、 α -アミノ- ϵ -カプロラクタムラセマーゼの立体構造と、推定上の基質認識機構、第 4 回 D-アミノ酸研究会学術講演会、2008.9.19 (名古屋市)
3. 米田英伸、浅野泰久、*Brevibacterium iodinum* 由来の新規 D-アミノ酸アミダーゼの遺伝子クローニング、酵素精製及び諸性質の解明、第 4 回 D-アミノ酸研究会学術講演会、2008.9.20 (名古屋市)
4. 浅野泰久、新しい酵素反応の開発と産業利用に関する研究 (バイオインダストリー協会賞受賞講演)、Bio Japan 2008、2008.10.15 (横浜市)
5. 浅野泰久、有用酵素の新機能開拓と産業利用、酵素工学研究会 30 周年記念シンポジウム、2008.11.13 (木更津市)
6. 浅野泰久、新しい酵素機能の開拓と産業利用に関する研究、京都大学大学院農学研究科発酵生理学特別セミナー「バイオ戦略と研究開発」、2008.11.27 (京都)
7. 米田英伸、浅野泰久、D-立体選択的ペプチダーゼ類の機能解析と応用、石川県立大学・富山県立大学合同シンポジウム、2008.11.29 (氷見)
8. 浅野泰久、福田泰久、S. Nanda、富宿賢一、植物酵素ヒドロキシニトリルリアーゼが触媒する有機合成、石川県立大学・富山県立大学合同シンポジウム、2008.11.29 (氷見)
9. 安川和志、長谷見隆司、米田英伸、浅野泰久、ラセミ体アミノニトリルから光学

- 活性アミノ酸へのダイナミックな光学分割、石川県立大学・富山県立大学合同シンポジウム、2008. 11. 29 (氷見)
10. 浅野泰久、新しい酵素反応の開発と産業利用に関する研究、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、2008. 12. 11 (神戸)
 11. 小泉真平、福田泰久、米田英伸、浅野泰久、 ω -オクタラクタム加水分解酵素の精製と酵素化学的諸性質、2009年農芸化学学会大会、2009. 3. 28 (福岡)
 12. 安川和志、長谷見隆司、米田英伸、浅野泰久、ニトリルヒドラーゼの大腸菌内での発現と光学活性アミノ酸合成への利用、2009年農芸化学学会大会、2009. 3. 28 (福岡)
 13. Techawaree UEATRONGCHIT, Kenichirou TAMURA, Hidenobu KOMEDA, Yasuhisa ASANO, Aran H-KITTIKUN, A novel (*R*)-hydroxynitrile lyase from *Passiflora edulis* and asymmetric transcyanation synthesis of (*R*)-mandelonitrile、2009年農芸化学学会大会、2009. 3. 28 (福岡)
 14. ケトキシムの転位反応を触媒する微生物の探索、富宿賢一、浅野泰久、2009年農芸化学学会大会、2009. 3. 28 (福岡)
 15. D-アミノペプチダーゼの発見とD-アミノ酸合成への応用、浅野泰久、2009年農芸化学学会大会、2009. 3. 28 (福岡)
 16. 福田泰久、米田英伸、浅野泰久、ウメ (*Prunus mume*)由来(*R*)-hydroxynitrile lyaseの遺伝子解析、2009年農芸化学学会大会、2009. 3. 29 (福岡)
 17. Mohammad DADASHIPOUR、金瀬由梨奈、富宿賢一、米田英伸、浅野泰久、Characterization of a novel (*S*)-Hydroxynitrile lyase from plant *Baliospermum montanum* expressed in *E. coli*、2009年農芸化学学会大会、2009. 3. 29 (福岡)
 18. 浅野泰久、D立体選択的ペプチダーゼ類のD-アミノ酸およびペプチド合成への利用、第82回日本生化学会大会、2009. 10. 22 (神戸)
 19. 富宿賢一、福田泰久、Samik Nanda、浅野泰久、植物酵素ヒドロキシニトリルリアーゼが触媒する光学活性物質合成、酵素工学会 第62回講演会、2009. 11. 13 (東京)
 20. 福田泰久、小泉真平、吉田洋一、米田英伸、浅野泰久、酵素的結晶変換による12-アミノラウリン酸の新しい合成法の開発に関する研究、酵素工学会 第62回講演会、2009. 11. 13 (東京)
 21. 浅野泰久、山根隆、B6酵素 α -アミノ- ϵ -カプロラクタムラセマーゼの構造機能解析と応用、日本ビタミン学会、ビタミンB委員会、2009. 11. 28 (京都)
 22. 富宿賢一、福田泰久、Samik Nanda、浅野泰久、植物酵素ヒドロキシニトリルリアーゼが触媒する光学活性物質の合成、富山・福井・石川県立大学合同シンポジウム、2009. 12. 18 (福井)
 23. 福田泰久、米田英伸、吉田洋一、浅野泰久、酵素的結晶変換法による12-アミノラウリン酸の大量合成、富山・福井・石川県立大学合同シンポジウム、2009. 12. 18 (福井)
 24. 丸山沙都子、大塚稔、福田泰久、徳南宏祐、岡崎誠司、山根隆、米田英伸、浅野泰久、*Achromobacter obae*由来アミノ酸アミドラーセマーゼの基質特異性の改変、2010年度農芸化学学会大会、2009. 3. 28 (東京)
 25. P. KAUL, M. OTSUKA, Y. ASANO, Enzymatic racemisation of amino acid amides: Screening, purification and characterization of racemase from *Ensifer adhaerens*、2010年度農芸化学学会大会、2009. 3. 28 (東京)
 26. 福田泰久、米田英伸、浅野泰久、ウメ (*Prunus mume*)由来(*R*)-hydroxynitrile lyaseの*Pichia pastoris*による分泌発現、2010年度農芸化学学会大会、2009. 3. 29 (東京)
 27. M. Dadashipour, M. Yamazaki, H. Komeda, Y. Asano, Functional expression of cassava plant enzyme (*S*)-hydroxynitrile lyase in *E. coli*-Comparative studies on the selected mutants created by directed-evolution, 2010年度農芸化学学会大会、2009. 3. 29 (東京)
 28. 富宿賢一、浅野泰久、ヒドロキシニトリルリアーゼが触媒する光学活性な β -ニトリアルコールの合成、2010年度農芸化学学会大会、2009. 3. 29 (東京)
 29. M. Dadashipour, Y. Asano, Studies on the plant enzyme hydroxynitrile lyase from *Baliospermum montanum* and *Manihot esculenta*: characterization and mechanism of functional expression、日本生物工学会2010年度中部支部例会、2010. 8. 2 (名古屋)
 30. 安川和志、長谷見隆司、浅野泰久、非

- 立体選択的ニトリルヒドラーターゼを利用した α -アミノニトリルのダイナミックな光学分割、第6回D-アミノ酸研究会学術講演会、2010.9.17 (富山)
31. 福田泰久、米田英伸、浅野泰久、 ω -ラクタムの「酵素的結晶変換法」による12-アミノラウリン酸の大量合成、第14回生体触媒化学シンポジウム、2010.9.23 (静岡)
 32. 徳南宏祐、浅野泰久、*Achromobacter obae* 由来 α -アミノ- ϵ -カプロラクタムラセマーゼの基質特異性の改変、北陸合同バイオシンポジウム、2010.11.12日 (福井)
 33. 氷見茉莉子、浅野泰久、Mutation of D-aminopeptidase from *Ochrobactrum anthropi*、北陸合同バイオシンポジウム、2010.11.12日 (福井)
 34. 浅野泰久、 α -アミノ- ϵ -カプロラクタムラセマーゼの基質特異性の改変、第422回ビタミンB研究協議会、2010.11.27 (京都)
 35. 富宿賢一、浅野泰久、 α -アミノ- ϵ カプロラクタム (ACL) ラセマーゼの機能解明を志向した ACL アナログの合成、2011年度農芸化学会大会、2011.3.26 (京都)
- [図書] (計 20 件)
1. Y. Asano, A new (*R*)-hydroxynitrile lyase from *Prunus mume* for the asymmetric synthesis of cyanohydrins, John Whittall and Peter Sutton (eds.). *In Practical Methods in Biocatalysis and Biotransformations, Catalysts for the Fine Chemical Industry*, pp 269-272 (2010).
 2. Y. Asano. Tools for Enzyme Discovery - "Industrial enzymes, biocatalysis and enzyme evolution" - *In "Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology"* (3rd Edition), Ed.: R. H. Baltz, J. E. Davies, and A. Demain (American Society for Microbiology), pp 441-452 (2010).
 3. 浅野泰久、酵素法によるD-アミノ酸の製造、微生物によるものづくりー化学法に代わるホワイトバイオテクノロジーの全てー、pp 68-77、CMC出版 (2008). (出版日 2008年6月)
 4. 浅野泰久 : 酵素ハンドブック、p 774、朝倉書店 (2008) (EC 4.1.2.10) Mandelonitrile lyase (出版日 2008年5月30日)
 5. 浅野泰久 : 酵素ハンドブック、p 774、朝倉書店 (2008) (EC 4.1.2.11) Hydroxynitrile lyase
 6. 浅野泰久 : 酵素ハンドブック、p 792、朝倉書店 (2008) (EC 4.2.1.31) Maleate hydratase
 7. 浅野泰久 : 酵素ハンドブック、p 793、朝倉書店 (2008) (EC 4.2.1.32) L(+)-Tartrate dehydratase
 8. 浅野泰久 : 酵素ハンドブック、p 793、朝倉書店 (2008) (EC 4.2.1.33) 3-Isopropylmalate dehydratase
 9. 浅野泰久 : 酵素ハンドブック、p 793、朝倉書店 (2008) (EC 4.2.1.34) (S)-2-Methylmalate dehydratase
 10. 浅野泰久 : 酵素ハンドブック、p 794、朝倉書店 (2008) (EC 4.2.1.35) (R)-2-Methylmalate dehydratase
 11. 浅野泰久 : 酵素ハンドブック、p 799、朝倉書店 (2008) (EC 4.2.1.65) 3-Cyanoalanine hydratase
 12. 浅野泰久 : 酵素ハンドブック、p 852、朝倉書店 (2008) (EC 5.3.3.6) Methylitaconate Δ -isomerase
 13. 浅野泰久、米田英伸 : 酵素ハンドブック、p 799、朝倉書店 (2008) (EC 4.2.1.66) Cyanide hydratase
 14. 浅野泰久、米田英伸 : 酵素ハンドブック、p 800、朝倉書店 (2008) (EC 4.2.1.69) Cyanamide hydratase
 15. 浅野泰久、米田英伸 : 酵素ハンドブック、p 800、朝倉書店 (2008) (EC 4.2.1.70) Pseudouridylate synthase
 16. 浅野泰久、米田英伸 : 酵素ハンドブック、p 800、朝倉書店 (2008) (EC 4.2.1.73) Protoaphilin-aglucone dehydratase (cyclizing)
 17. 浅野泰久、米田英伸 : 酵素ハンドブック、p 803、朝倉書店 (2008) (EC 4.2.1.85) Dimethylmalate hydratase
 18. 浅野泰久、加藤康夫 : 酵素ハンドブック、p 817、朝倉書店 (2008). (EC 4.3.1.2) Methylaspartate ammonia-lyase
 19. 浅野泰久、D-アミノ酸の酵素的合成、酵素利用技術大系、NTS 出版 pp 623-631 (2010).
 20. 浅野泰久、「アクリルアミド」、「イノシン

酸」「グアニル酸」、生物学辞典、東京化学同人、P10, P96, P334 (2010).

[産業財産権]

○取得状況 (計6件)

発明者：浅野泰久

番号：特許 4116798

取得年月日：平成20年7月9日

国内外の別：国内

2. 名称：(R)ーヒドロキシニトリルリアーゼ及びその利用方法

発明者：浅野泰久

番号：特許 4266662

取得年月日：平成21年5月20日

国内外の別：国内

3. 名称：(R)ー体のアミド結合を選択的に加水分解するアミダーゼ遺伝子及びその利用

発明者：阪本剛、上田誠、浅野泰久

番号：特許 4274767

取得年月日：平成21年6月10日

国内外の別：国内

4. 名称：Lーペニシラミンの製造方法

発明者：浅野泰久、田村豊、田中昭宣

番号：特許 4296388

取得年月日：平成21年7月15日

国内外の別：国内

5. 名称：(S)ーヒドロキシニトリルリアーゼ

発明者：浅野泰久、

番号：特許 4361742

取得年月日：平成21年11月11日

国内外の別：国内

6. 名称：L体アミノ酸アミド不斉加水分解酵素及びそれをコードするDNA

発明者：浅野泰久、井上敦

番号：特許 4650421

取得年月日：平成23年3月16日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.pu-toyama.ac.jp/BR/asano/homepage.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅野 泰久 (ASANO YASUHISA)

富山県立大学・工学部・教授

研究者番号：00222589

(2)研究分担者

米田 英伸 (KOMEDA HIDENOBU)

富山県立大学・工学部・准教授

研究者番号：50285160

富宿 賢一 (KENICHI FUHSHUKU)

富山県立大学・工学部・助教

研究者番号：70392090

山根 隆 (YAMANE TAKASHI)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：

(H21→H22：連携研究者)

由里元 博也 (YURIMOTO HIROYA)

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻

研究者番号：00283648

(H21→H22：連携研究者)