

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22360346

研究課題名（和文）好熱菌亜リン酸デヒドロゲナーゼを用いたバイオ還元系の確立

研究課題名（英文）Development of NADH regeneration system by thermostable phosphite dehydrogenase

研究代表者

黒田 章夫 (KURODA AKIO)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・教授

研究者番号：50205241

研究成果の概要（和文）：亜リン酸デヒドロゲナーゼは、NAD の還元と同時に、ほぼ不可逆的に亜リン酸をリン酸に酸化する酵素で、工業的な NADH の再生酵素として期待されている。そこで熱安定性の高い亜リン酸デヒドロゲナーゼを取得するために、亜リン酸を唯一のリンとする最少培地を用い、45℃でも生育する *Ralstonia* sp. 4506 株を単離した。この株から得られた亜リン酸酸化酵素（RsPtxD）による NADH 再生系を用いて、医薬品合成の中間体である *L-tert*-ロイシン合成に応用することができた。次に部位特異的変異によって RsPtxD の NADP に対する基質特異性を向上させた。得られた RsPtxD-DM は、NADPH 再生系として、シキミ酸合成に応用することができた。

研究成果の概要（英文）：Phosphite dehydrogenase (PtxD), which catalyzes the nearly irreversible oxidation of phosphite to phosphate with the concomitant reduction of NAD⁺ to NADH, has great potential for NADH regeneration in industrial biocatalysts. In order to obtain a heat-stable PtxD, we isolated a *Ralstonia* sp. strain 4506 that can grow at 45 °C on a minimal medium containing phosphite as the sole source of phosphorus. NADH regeneration system using PtxD of this strain (RsPtxD) was successfully applied to the production of *L-tert*-leucine, an important chiral building block used in the pharmaceutical industry. Then RsPtxD was modified by site-specific mutation to increase the substrate specificity for NADP. The resultant enzyme RsPtxD-DM was successfully used for shikimic acid production as a NADPH regeneration system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2012 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、生物機能・バイオプロセス

キーワード：補酵素、リン酸、亜リン酸、NADH、デヒドロゲナーゼ

1. 研究開始当初の背景

メタゲノム解析により数々の新しい酵素が見つかりつつあり、環境対応型のクリーンな物質生産システムとして、その応用が期待されている。しかしながら、多くの有用な酵素は、ATP や NAD(P)H といったコファクター（補酵素）を要求する。これらコファクターを反応当量加えると膨大なコストがかかるため、実際工業レベルで利用されている酵素反応の約 65%は単純な加水分解反応であると言われている。

ポリリン酸とは、数十から数百の無機リン酸が高エネルギーリン酸結合で直鎖状につながった無機ポリマーである。ポリリン酸は加熱によるリン酸の脱水縮合で合成可能なため、最も安価な高エネルギーリン酸化合物である（ポリリン酸は ATP やその他のリン酸供与体と比較して 1/1000 以下の価格）。

ポリリン酸キナーゼはポリリン酸と ADP から ATP を合成する酵素である。我々は 2007 年、好熱菌ポリリン酸キナーゼ (PPK^I) を用いた耐熱性 ATP 再生系を発表した (Iwamoto, Kuroda, et al., Appl. Environ. Microbiol., 73, 5676-5678, 2007)。我々の開発した ATP 再生系は、驚くべきことに 70°C で 1 週間の使用に耐える系であることがわかった。

PPK^I を組み込んだ大腸菌に、さらに好熱菌のフルクトキナーゼ (fk) とホスホフルクトキナーゼ (pfk) を導入した。組み換え菌を約 70°C で 1 時間加熱後、ポリリン酸とフルクトースを与えると、反応産物であるフルクトース 1,6 二リン酸がほぼ 100% の効率で合成できた。大腸菌の膜が熱で部分的に破砕されているために、基質が透過するが、酵素は大腸菌内で固定されていた。加熱により大腸菌の本来の酵素が失活しているため、副産物の生成がほとんどない。大腸菌という狭い空間内に目的の耐熱性酵素だけが活性状態でつまこまれているため、高効率のバイオコンバージョンが可能となった。実際ポリリン酸からの ATP 再生系とフルクトキナーゼ、ホスホフルクトキナーゼを導入したものを独立に培養して混合するよりも、同一菌体内で発現させた場合、10 倍近い反応効率の向上が見られた。この系は、ATP を必要とするバイオプロセス構築の可能性を拡げ、同時に大幅なコスト削減をもたらすことが可能であると考えられた。

2. 研究の目的

超安定なポリリン酸-ATP 再生系を開発し、またそれを利用したもの作りのための大腸菌プラットフォームを完成させることができた。しかしながら還元力を必要とするもの作りには対応できていない。多くの生合成反応に対応するためには、どうしても ATP だけではなく NAD(P)H を再生させる反応が工業レベ

ルで熱望されている。

もの作りのためのバイオ還元系として、幾つかの NAD(P)H 再生系が構築されている。現在ではギ酸・ギ酸デヒドロゲナーゼ、イソプロパノールデヒドロゲナーゼ、水素ヒドロゲナーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ系が存在する。*Candida boidinii* 由来ギ酸デヒドロゲナーゼ系は工業的にも利用されており、数トンレベルではあるがロイシンデヒドロゲナーゼと共役させて、医薬品合成の前駆体となる L-tert-ロイシンの合成に利用されている。これらバイオ還元系と比べて、亜リン酸と共役した NAD の還元 (図 1) は以下の 5 つの有利な点があることから最も優れた NAD(P)H 再生系になる可能性がある。①熱力学的に非常に有利な点である。多くの NAD 酸化還元酵素は平衡反応であるのに対し、亜リン酸と共役した NAD の還元酸化還元電位は +0.335 V (自由エネルギーに換算すると -63kJ/mol) であり、ほぼ不可逆的に NADH の合成に偏っている。

②亜リン酸が安価な原料であることがあげられる (亜リン酸は三塩化リンの加水分解で作られ、リン酸とほぼ同程度の価格)。③本

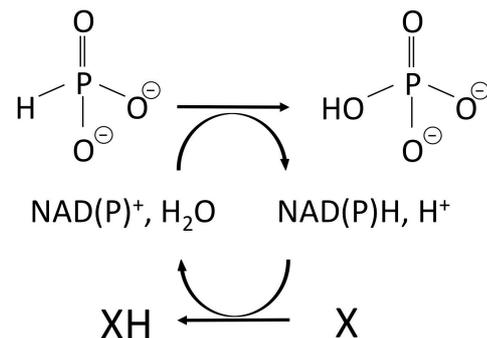


図 1、亜リン酸デヒドロゲナーゼ (PtxD) による NAD(P)H 再生系と共役したバイオ還元反応 (X→XH)。

反応後の副産物であるリン酸は毒性や阻害がない (亜リン酸は肥料としても用いられている)。実用化されているギ酸デヒドロゲナーゼの産物であるギ酸は毒性が強いなどの問題がある。また亜リン酸の中性付近の状態は HPO_3^{2-} であり、亜リン酸デヒドロゲナーゼで酸化されると HPO_4^{2-} となる。リン酸の二番目の解離の pKa は 7.21 であるので、若干 H_2PO_4^- にかたよることが予想されるが系全体の pH 変化に及ぼす影響はきわめて少ない。従って大量に副産物ができてもほぼ中性が保たれるので反応系を安定させることができる。④亜リン酸-NADH 再生系は、前述のポリリン酸-ATP 再生系と同じリン酸化合物であり、同副産物のリン酸はカルシウムで容易に回収できる。さらにリン酸は化学的にポリ

リン酸、亜リン酸に変換できる。⑤また、我々の強みとして、開発したポリリン酸蓄積微生物を利用して排水のリンをポリリン酸としてリサイクルするシステムをすでに構築しており (Morohoshi, Kuroda et al., Appl. Environ. Microbiol., 68, 4107-4110, 2002, Kuroda et al., Biotech. Bioeng., 78, 333-338, 2002)、全く廃棄物を出さないクリーンなシステムができることである。

数々のメリットを持つ亜リン酸のバイオ還元系の開発は、バイオ触媒の可能性を広げ、日本がバイオによるものづくりで優位に立つために、必要な研究であると考えられた。しかしながら、既存の *Pseudomonas stutzeri* の亜リン酸デヒドロゲナーゼは 45°C、数分の処理で失活することから、工業的には熱に安定な酵素の開発は必至である。そこで、本研究では、亜リン酸を唯一のリン源として生育する好熱菌を分離し、さらにその菌が保有する耐熱性の亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を取得し、超安定な亜リン酸-NAD(P)H 再生系を開発することである。

3. 研究の方法

3.1. 高温で増殖する亜リン酸酸化細菌の単離

予備実験において取得されていた 70°C で亜リン酸酸化活性を示す PT1 株は PtxD を保持していないことが分かったため、新たにスクリーニングを行った。0.5 mM 亜リン酸を唯一のリン源とする MOPS-グルコース最少培地を用いて 45°C、60°C でそれぞれ集積培養を行い、亜リン酸酸化細菌の単離を試みた。亜リン酸合成培地で 24 時間培養を行い、1% を植え継ぐという操作を 1 週間繰り返し、集積を行った。次に、得られたバクテリアの細胞粗抽出液を用いて、亜リン酸依存的な NADH 生成を示すものを PtxD 保有候補株として取得した。その結果、45°C で増殖し、亜リン酸依存的な NADH 生成活性を示す 4 株が得られた。これらの菌株の同定は、ゲノム DNA をテンプレートとしたダイレクト PCR により 16S rRNA 遺伝子配列を決定し、公的データベースのホモロジー検索により行った。

3.2. 耐熱性 PtxD の生化学的解析

得られた株から PtxD 遺伝子の取得を試みた。PCR による解析から、これらの *ptxD* は既存のものとは異なる事が示唆されたため、保存ドメインを対象とした縮重 PCR とインバース PCR によって全長遺伝子の取得に成功した。このうち、*Ralstonia* sp. 4506 株 (後述) の *ptxD* を pET21b にクローニングし、RsptxD/pET21b を作製した。このプラスミドを導入した *E. coli* Rossetta 2 (DE3) を 0.5 mM IPTG, 8 時間、28°C で培養しタンパク質発現を行った。得られた菌体の細胞粗抽出液をニッケルカラム

に供し、組換え PtxD (RsPtxD) を得た。

Pseudomonas stutzeri 由来 PtxD (PsPtxD) も同様に組換えタンパク質を作製した。これらの精製タンパク質を用いて生化学的解析を行った。活性測定は、精製タンパク質 (0.5 μg) を用いて 1 mM NAD⁺, 1 mM 亜リン酸, 20 mM MOPS-KOH buffer (pH 7.4) を含む溶液中で反応を行い、亜リン酸依存的に生じる NADH を吸光度 340 nm で測定した。吸光度値からの NADH 濃度の換算はモル吸光度係数 (6.3 × 10³ L · mmol⁻¹ · cm⁻¹) を用いて行った。

3.3. RsPtxD を用いた NADH 再生系の構築と L-tert-ロイシン合成

RsPtxD による NADH 再生反応をロイシンデヒドロゲナーゼによる NADH とトリメチルピルビン酸 (TMP) からの還元アミノ化反応と共役させ、L-tert-ロイシン (LTL) 合成を行った。50 mM TMP, 15 U/ml LeuDh, 1.5 U/ml 耐熱性 PtxD, 0.5 mM NAD, 75 mM 亜リン酸を混合し、45°C で反応を行った。LTL の測定には EZ:faast[™] amino acid analysis kit (Phenomenex, Torrance, CA, USA) による誘導体化を行い、水素炎イオン化型検出器を備えたガスクロマトグラフィー (GC-2010, Shimadzu, Kyoto, Japan) で測定した。分離カラムは ZB-AAA キャピラリーカラム (Phenomenex) を用いた。

3.4. 部位特異的変異導入による RsPtxD の NADP に対する基質特異性向上

RsPtxD の NADP 利用能を向上させるため、部位特異的変異によって RsPtxD にアミノ酸置換を施した変異体を作製した。RsPtxD の NAD 結合領域であるロスマンフォールドドメイン中の β2 シート c-末端領域に位置する D175 をアラニンに置換した変異体 (D175A)、176 番目のプロリンをアルギニンに置換した変異体 (P176R)、両方の二重変異体

(D175A/P176R: DM) を、RsptxD/pET21 を対象とした PCR を用いた部位特異的変異導入により作製した。変異体精製タンパク質を上述の方法と同様に行い、NAD を NADP に置換した反応溶液を用いて同様に活性を測定した。

3.5. 変異型 RsPtxD を用いた NADPH 再生系の構築とシキミ酸合成反応における有効性の実証

a. シキミ酸デヒドロゲナーゼの取得と精製

Thermus thermophilus 由来のシキミ酸デヒドロゲナーゼ (TtSDH) 遺伝子を pET11a にクローニングし、発現用プラスミドを作製した。定法により TtSDH を発現させた菌体を Sonication バッファー (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl) に懸濁し細胞破碎した。超遠心 (80,000 rpm, 20 分, 4°C) した上清を AKTA を使用して精製した。カラ

ムには陽イオン交換カラム (PerSeptive Biosystems, PorosHS/M, 4.6mmD/100mL, #1-3322-26C) を使用し、バッファーA (50 mM HEPES-HCl, pH7.5, 15% Glycerol)、バッファーB (1.0 M NaClを含むバッファーA) を使用し、流速は 5 ml/min で精製を行った。

精製した TtSDH の活性は、100 mM HEPES-HCl (pH8.0)、2 mM 3-デヒドロシキミ酸 (3-DH)、1 mM NADPH、TtSDH を含む溶液を 45°C で反応させ、3-DH 依存的に減少する NADPH 量を測定して評価した。

b. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いたシキミ酸の検出

共役反応系におけるシキミ酸合成では、シキミ酸を直接 HPLC (Jasco, LC-2000 plus series) で定量した。カラムは C18 カラム (TOSOH, TSKgel ODS-80TM, 250×4 mm, 5µm internal diameter)、移動相には 100 mM リン酸、波長は 230 nm、流速は 0.5 ml/min で 20 分間測定した。この測定系における定量的な検出レンジは 0.01-1.0 mM であったため、高濃度のサンプルは適宜希釈して測定を行った。

c. 変異型 RsPtxD と TtSDH の共役反応によるシキミ酸合成

TtSDH、200 mM HEPES (pH 8.0)、100 mM 3-DH、150 mM Pt-KOH、0.2 mM NADP を含む反応液を作製し、そこに 480 µg/ml RsPtxD-DM、30 µg/ml TTHA1050 を添加した。このとき添加したそれぞれの酵素量は活性測定により求めたユニット値を基にして反応速度が同じになるようにした。45°C で反応を行い、経時的にサンプリングを行った。その際、20mM glycine バッファー (pH 2.0) を加え、反応を停止させた後に HPLC で解析を行った。

4. 研究成果

4.1. 高温で増殖する亜リン酸酸化細菌の単離

45°C で生育し、亜リン酸依存的な NADH 生成活性を示す 4 株の 16S rRNA シーケンスによる系統解析を行なったところ全て *Ralstonia* 属の細菌であることが分かった。このうち最も速い増殖を示す株は、*Ralstonia mannitolilytica* と 96% の相同性を示した。この株を *Ralstonia* sp. 4506 (以下 4506 株) とした。4506 株は、亜リン酸合成培地で良好な生育を示し、既知の亜リン酸酸化細菌として知られる *Pseudomonas stutzeri* WM536 株の 3.6 倍の増殖速度 (0.36 h^{-1}) を示した。

4.2. RsPtxD の生化学的解析

精製した PtxD タンパク質を用いて、RsPtxD の生化学的解析を行った。PtxD の活性は単位タンパク質量当たりの NADH 生成量を、分光光度計で測定することで評価した。RsPtxD は、45-50°C で最も高い活性を示した (図 1)。また、活性半減期 (ある温度で保温したとき

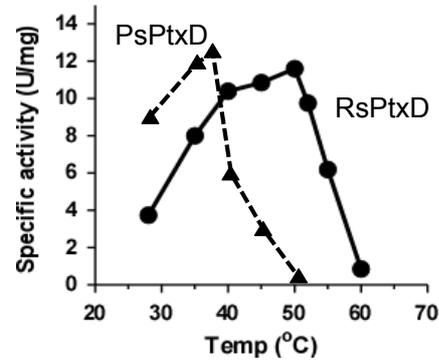


図1: RsPtxD の至適温度

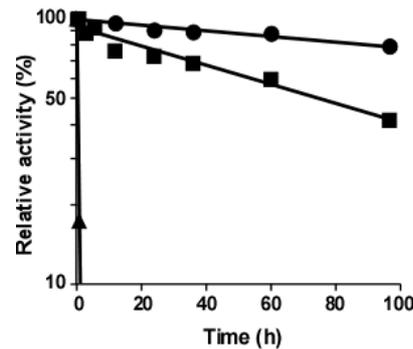


図2: RsPtxD の熱安定性

Property	RsPtxD	PsPtxD
Assay temp. 30°C		
Apparent K_m for P_i (mM)	10 ± 1.9	73 ± 1.9
V_{max} (U/mg)	3.4 ± 0.1	4.2 ± 0.6
V_{max}/K_m	0.331	0.058
Assay temp. 40°C		
Apparent K_m for P_i (mM)	24 ± 1.3	276 ± 8.1
V_{max} (U/mg)	5.9 ± 0.6	7.0 ± 0.5
V_{max}/K_m	0.25	0.025

表1: RsPtxD と PsPtxD の V_{max} , K_m

に活性が 50% に低下するまでの時間) は、45°C でおよそ 80 時間であった (図 2)。これは PsPtxD の 3,750 倍であった。至適 pH は、7.0-7.5 であった。次に、速度論的解析によって亜リン酸と NAD に対する K_m と V_{max} の測定を行い、PtxD の触媒活性の評価を行った。様々な基質濃度における反応速度を測定し、Lineweaver-Burk プロットを作成し、PsPtxD と RsPtxD の K_m と V_{max} をそれぞれ決定した。その結果、酵素の触媒活性を表す V_{max}/K_m 値で比較すると、RsPtxD は PsPtxD に対して、30°C では 6.7 倍、40°C では 10 倍高い活性を示した (表 1)。

次に、PtxD に対する反応阻害物質の影響を調べた。PtxD 活性測定反応液に、終濃度 4 mM になるように各種阻害物質を添加し、NADH 生成量の比較により阻害効果を調べた。その結果、RsPtxD は PsPtxD よりも阻害剤による影響が小さいことが分かった (図 3)。これは RsPtxD の基質に対する特異性の高さ起因するものと考えられる。この特徴は、PtxD を

様々な条件の反応溶液において用いる際に有利になるものと考えられる。

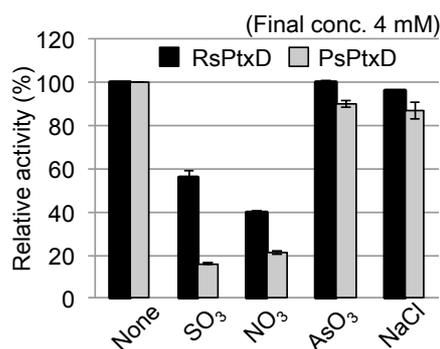


図3: 阻害物質の影響

4. 3. RsPtxDの可溶性発現レベル

発現タンパク質の可溶性レベルを調べるため、粗抽出液を遠心分離して得られた上清、沈殿物それぞれの画分をSDS-PAGEに供し、全タンパク質に占める可溶性PtxDタンパク質量の割合を画像解析ソフトImageJを用いて定量化した。その結果、PsPtxD およびRsPtxDの可溶性タンパク質の割合は、それぞれ18.4%と91.4%であり、RsPtxDはPsPtxDの約5倍の可溶性レベルを示すことが明らかとなった(図4)。実際この可溶性の高さが実際の収量にどれほど影響するかを調べるため、1 Lの培養液からタンパク質抽出を行い、ニッケルカラムを用いてタンパク質を精製し収量を比較した。その結果、PsPtxDは7.5 mgであったのに対し、RsPtxDは42 mgのタンパク質が得られた。つまり、大腸菌における発現系で、RsPtxDはPsPtxDよりも5.6倍高い収量で組換えタンパク質を生産できることが分かった。

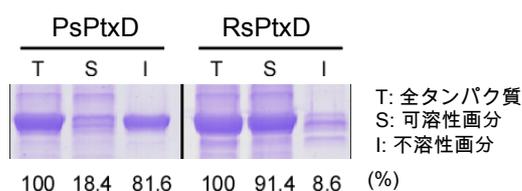


図4: RsPtxDの可溶性発現レベル

4. 4. RsPtxD を使った NADH 再生系の構築と L-tert-ロイシン(LTL)合成

得られた耐熱性 PtxD を用いて NADH 再生系を構築し、その有効性評価を行った。抗ウイルス薬の前駆体として使用される LTL は、ロイシンデヒドロゲナーゼ(LeuDh)によって NADH 依存的な立体選択的還元のアミノ化によって生成する。そこで、耐熱性 PtxD を用いた NADH 再生系をこの反応と共役させて、LTL 合成を行った。50 mM の TMP が、およそ 3 時間ではほぼ 100% LTL に変換された。この際の NAD の回転数は 100 であった(図 5)。これ

は 1/100 量の補酵素を用いて 50 mM の TMP が完全変換できたことを意味しており、このことから RsPtxD の NADH 再生系が NADH 依存性の酵素反応の効率を高めるために有効であることが確認できた。

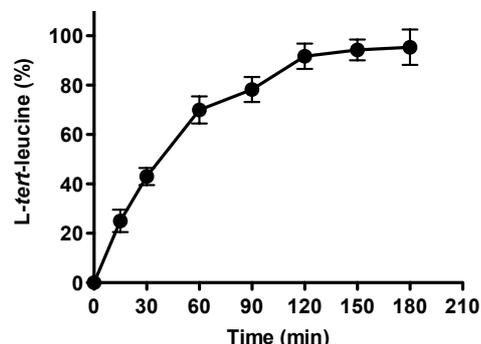


図5: RsPtxDとLeuDhの共役反応系によるLTL合成

4. 5. 部位特異的変異による NADP 利用型 RsPtxD の作製

部位特異的変異により作製した 3 種類の変異体 (D175A, P176R, DM) を精製し、NAD, NADP をそれぞれ基質とした場合の活性を測定した。20 mM MOPS, 1 mM NAD(P), 1 mM 亜リン酸存在下、45°C で反応を行い、比活性を測定した。その結果、D175A, D176R は NADP に対する特異性が 2-3 倍程度上昇した。DM では 3.6 倍の比活性を示した。NAD を基質とした場合は、P176R ではほとんど活性に変化は見られず、D175A では 60%程度に低下した。DM では約 5%程度に大きく低下した。

NADP に対する活性は DM が最も高かったため、野生型と DM の速度論的解析により NADP に対する K_m と V_{max} の測定を行った。その結果、野生型の K_m が 2,472 μ M であったのに対し、DM では 103 μ M であり、NADP に対する特異性が大きく向上していることが分かった。また、 V_{max}/K_m 値は野生型の約 170 倍であり触媒活性も大きく向上していることが明らかになった。

4. 6. 変異型 RsPtxD (DM) を用いた NADPH 再生系とシキミ酸合成反応における有効性の評価

DM による NADPH 再生系の効果を検証するため、DM と TtSDH のシキミ酸合成反応との共役反応を行った。まず、132 μ g/ml (0.36 U) DM, 7.35 μ g/ml (0.023 U) TtSDH, 10 mM 3-DH, 15 mM Pt, 0.2 mM NADP を加え、反応液を 45°C に保持し反応を行った。その結果、50 分で反応が完結し、全ての 3-DH をシキミ酸に変換することが出来た。この反応における NADP の回転数 (Total turnover number: TTN) は、50、生産性は 2.1 g/L/h であった。次に、さらに TTN を高めた生産が可能か調べるために、性を、480 μ g/ml (1.32 U) DM, 29.4 μ g/ml (0.94 U) TtSDH, 100 mM 3-DH, 150 mM Pt, 0.2

mM NADP を加え、反応を行った。その結果、3 時間で 78.4 mM のシキミ酸が合成された (図 6)。生産性は 4.5 g/L/h まで増加させることに成功した。TTN は 392 に向上した。以上の結果より RsPtxD-DM を用いた NADPH 再生系は有用である事が明らかになった。

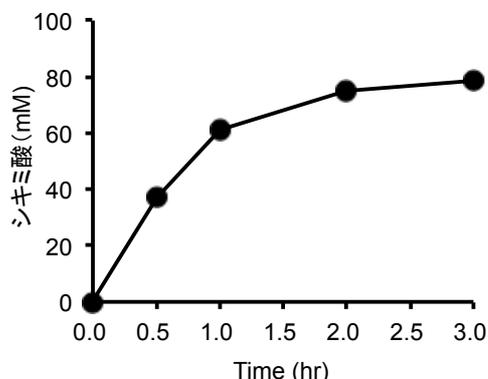


図6: RsPtxD-DMとTtSDHの共役反応系によるシキミ酸合成

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 5 件)

1. R. Hirota, S. Yamane, T. Fujibuchi, K. Motomura, T. Ishida, T. Ikeda, A. Kuroda. Isolation and characterization of a soluble and thermostable phosphite dehydrogenase from *Ralstonia* sp. strain 4506 J. Biosci. Bioeng., 113, 445-450 (2012) 査読あり
2. K. Motomura, R. Hirota, N. Ohnaka, M. Okada, T. Ikeda, T. Morohoshi, H. Ohtake, A. Kuroda. Overproduction of YjbB reduces the level of polyphosphate in *Escherichia coli*: a hypothetical role of YjbB in phosphate export and polyphosphate accumulation FEMS Microbiol. Lett., 320, 25-32 (2011) 査読あり
他 3 件

[学会発表] (計 7 件)

1. 亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を選択マーカーとした微生物大量培養法の開発、小野敏志、廣田隆一、池田丈、黒田章夫、日本農芸化学会 2013 年度大会 (仙台) 2013年3月24日~28日 他6件

[図書] (計 3 件)

1. 黒田章夫、廣田隆一、リン酸の無機化学とバイオテクノロジー、生物工学会誌 (特集)、90(8)、473-476 (2012).
2. 廣田隆一、黒田章夫、排水からのリン資

源の回収-基礎-微生物によるリン資源の効率的回収に関わる遺伝子 バイオ活用による汚染・廃水の新処理法 (倉根隆一郎監修), CMC 出版, 第 8 章(2012)
他 1 件

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称: ATP の製造方法およびその利用
発明者: 黒田章夫、廣田隆一、本村圭、
権利者: 国立大学法人広島大学
種類: 特許
番号: 特願 2011-159349
出願年月日: 平成 23 年 7 月 20 日
国内外の別: 国内

名称: 形質転換植物および形質転換植物の育成方法

発明者: 黒田章夫、廣田隆一
権利者: 国立大学法人広島大学
種類: 特許
番号: 特願 2011-144911
出願年月日: 平成 23 年 6 月 29 日
国内外の別: 国内

名称: 亜リン酸デヒドロゲナーゼタンパク質の製造方法およびその利用

発明者: 黒田章夫、廣田隆一
権利者: 国立大学法人広島大学
種類: 特許
番号: 特願 2011-98670
出願年月日: 平成 23 年 4 月 26 日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/akbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 章夫 (Akio KURODA)
広島大学・大学院先端物質科学研究科・教授
研究者番号: 50205241

(2) 研究分担者

廣田 隆一 (Ryuichi HIROTA)
広島大学・大学院先端物質科学研究科・助教
研究者番号: 90452614

(3) 連携研究者

なし