

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目： 基盤研究（B）  
研究期間： 2006～2008  
課題番号： 18360401  
研究課題名（和文） アミノ酸水酸化酵素の効率的探索技術の開発と応用  
研究課題名（英文） Development and Application of Screening Methods for Amino Acid Hydroxylase  
研究代表者  
木野 邦器（KINO KUNIKI）  
早稲田大学・理工学術院・教授  
研究者番号： 60318764

研究成果の概要：医薬品として有用な化合物である 4-ヒドロキシ-L-イソロイシン（2 型糖尿病治療薬）、5-ヒドロキシ-L-トリプトファン（抗精神病薬）、*cis*-4-ヒドロキシ-L-プロリン（抗腫瘍剤）の工業的生産に応用可能な新規アミノ酸水酸化酵素の探索をおこなった。微生物ゲノム情報を活用して水酸化酵素発現ライブラリーを構築し、質量分析器および呈色反応を利用して効率的にアミノ酸水酸化活性を評価した。その結果、多様なアミノ酸水酸化酵素の取得に成功した。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	11,600,000	3,480,000	15,080,000

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：生体触媒工学、生物機能工学、バイオ生産プロセス、微生物ゲノム、ゲノム工学、酵素利用学、水酸化酵素、酸化還元酵素

## 1. 研究開始当初の背景

アミノ酸に水酸基が結合したヒドロキシアミノ酸は、種々の生理活性を有することが示唆されている。そのため、医薬品やその合成中間体としての用途が期待されている。例えば、4-ヒドロキシ-L-イソロイシンは2型糖尿病治療薬、5-ヒドロキシ-L-トリプトファンは抗精神病薬としての効能が明らかにされている。現在、これらヒドロキシアミノ酸の効率的生産法が望まれているが、化学合成法による生産は複雑なステップを必要とするため、実用化は困難である。一部は動植物細胞から抽出されているが、効率的とは言い難い。仮に、発酵法により安価に供給可能なアミノ酸を原料とし、酵素による一段階反応によりヒドロキシアミノ酸を効率的に生産する方法が確立されると、効率的かつ環境負荷の少ないバイオプロセスが構築可能となる。実際に、医薬品や化粧品原料として有用な *trans*-4-ヒドロキシ-L-プロリンは、従来動物のコラーゲンからの抽出とそれに続く複雑な精製により生産されていたが、L-プロリンを直接水酸化可能な酵素の発見とともに、酵素法で安価かつ大量に生産するプロセスが開発されている。しかし、前述のヒドロキシアミノ酸を効率的に合成可能かつ、工業利用可能なアミノ酸水酸化酵素は見出されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、アミノ酸誘導体の中でも特に有用なヒドロキシアミノ酸の効率的生産法を確立する。そのために、産業上有用な水酸化酵素の取得に関わる基盤技術の構築をおこない、それを利用した目的アミノ酸に対応する新規水酸化酵素の取得とヒドロキシアミノ酸の生産プロセスの確立を目的とする。

### (1) アミノ酸水酸化酵素ライブラリーの構築

はじめに、データベースを活用して候補遺伝子を探索する。プロリン水酸化酵素や芳香族アミノ酸水酸化酵素など、少数ながら報告されているアミノ酸水酸化酵素の遺伝子配列ならびにアミノ酸配列に基づき、公開データベースからアミノ酸水酸化酵素の候補となる遺伝子を選択する。続いて、その遺伝子をクローニングし、組換え大腸菌を用いたアミノ酸水酸化酵素遺伝子の発現ライブラリーを構築する。

### (2) アミノ酸水酸化酵素の効率的探索技術の開発

(1) で構築するアミノ酸水酸化酵素ライブラリーは、その多くが機能未知タンパク質

である。現在の技術では、一次構造から基質アミノ酸を予測することは困難である。そこで、各種分析法を利用して、当該酵素ライブラリーからアミノ酸水酸化活性を見出す。

### 質量分析計を用いた探索法

近年、質量分析器の性能は著しく向上しており、高精度、高分解能、高感度化され、メタボロミクス研究や環境中の微量物質の分析などに広く利用されている。特に、メタボロミクス研究においては、植物や動物の生体内代謝物質を一斉に解析可能であり、質量分析器はポストゲノム研究における重要なツールとなっている。申請者は、これらの概念を応用し、多成分の基質を含む混合溶液を酵素と反応させ、生成物を質量分析器により一斉解析して活性を評価する技術を開発している。具体的には、コンパクチンやステロイド化合物の新規水酸化酵素の取得に成功している。本研究においても、アミノ酸に特化した分析条件を確立することで、新規アミノ酸水酸化酵素の取得を試みる。

### 呈色法を用いた迅速評価法

目的のアミノ酸水酸化活性の評価法として、呈色法を用いた酵素の詳細な解析をおこなう。工業利用を考慮すると、所望する活性が低いことも予想されるため、必要に応じて酵素遺伝子に対してランダム変異を導入することや、部位特異的に変異を導入して基質特異性や水酸化活性が向上した工業利用に適したアミノ酸水酸化酵素の作製を図る。そこで、変異酵素のアミノ酸水酸化活性を迅速に評価するために、呈色法を利用する。

## 3. 研究の方法

### (1) 水酸化酵素ライブラリーの構築

申請者は、平成16年度地域新生コンソーシアム研究開発事業「最新型質量分析器を用いた有用水酸化酵素の高速探索法の開発」(平成18年終了)において水酸化酵素のデータベースと発現ライブラリーを構築した。

では、多様な水酸化酵素を活性中心のアミノ酸配列および反応様式から体系的に20ファミリー(P450モノオキシゲナーゼ、フラビン含有モノオキシゲナーゼなど)に分類し、それぞれのファミリーに属する酵素のアミノ酸配列をクエリーとして300種類を越える微生物ゲノム情報から約3,000種類の推定水酸化酵素遺伝子を見出し、データベース化した。

では、この分類に基づいて、微生物ゲノムを鋳型としたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によりクローニングし、発現ベクターに連結後、大腸菌に導入して約500種の水酸化酵素

発現ライブラリーを構築した。これらのうち、いくつかは新規アミノ酸水酸化酵素としての可能性があるため、本研究の探索候補とした。また、本研究においてもゲノム情報を活用して独自の水酸化酵素の候補となる遺伝子を順次追加し、水酸化酵素ライブラリーの充実化を図るとともに、新規アミノ酸水酸化酵素の取得を試みる。

#### (2) 変異酵素ライブラリーの構築

これまでに、少数ながらプロリン、フェニルアラニン、チロシンに対して水酸化活性を有する酵素が報告されている。これらの酵素遺伝子およびホモログ遺伝子に対してランダム変異や部位特異的変異を導入することにより、基質特異性あるいは酵素活性が改変され、工業利用に適した有効変異酵素を創製する。

#### (3) アミノ酸水酸化酵素の効率的探索技術の開発

##### アミノ酸水酸化反応系の構築

組換え大腸菌の破碎液、もしくは精製酵素をアミノ酸と反応させる系を構築する。基質としてはタンパク質構成性アミノ酸(20種類)のほか、D-アミノ酸などの非タンパク質構成性アミノ酸を用いる。また、必要に応じて電子伝達コンポーネントも添加する。多成分の基質を含む反応系では特定の基質により酵素反応が阻害される可能性があるため、基質濃度を低く設定する必要があるが、質量分析器では、高感度、高分解能という特性から低濃度サンプルの分析も十分可能である。

##### 質量分析器を用いたアミノ酸水酸化活性の評価

水酸化酵素を高生産する組換え大腸菌を調製し、アミノ酸と混合して反応させる。反応後、除タンパク処理し、反応液を必要に応じて誘導体化後、質量分析器に供する。アミノ酸のイオン化はエレクトロスプレー法を用いる。アミノ酸の水酸化に起因する質量数変化、すなわち、質量数16の増加によって水酸化活性を判別可能となる。

##### 呈色法によるアミノ酸水酸化酵素の効率的探索技術の開発

一部のヒドロキシアミノ酸は特定の化合物と化学的に反応して呈色することを確認している。また、反応に必要な還元力を供給するNAD(P)H(P450モノオキシゲナーゼ、フラビン含有モノオキシゲナーゼなど)、2-オキソグルタル酸(2-オキソグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼ)を呈色させる反応についても報告されており、これらを指標にしてアミノ酸

水酸化活性を評価する。そこで、生成物の呈色法を確立し、反応液をマイクロプレートリーダーにより一斉解析し、アミノ酸水酸化活性を評価する技術を確立する。

#### (4) 多様なアミノ酸水酸化酵素の網羅的探索

(1)および(2)において構築した水酸化酵素ライブラリーに対して、(3)で確立したアミノ酸水酸化酵素の効率的探索技術を適用し、多様なアミノ酸水酸化酵素を網羅的に探索する。取得したアミノ酸水酸化酵素については、酵素の特性を詳細に検討し、実用生産への基礎となる解析をおこない、バイオプロセスへの応用を検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 立体構造情報に基づく芳香族アミノ酸水酸化酵素の機能改変

5-ヒドロキシ-L-トリプトファン(5-HTP)は、高等動物の脳内セロトニン経路における中間体であり、抗精神病薬として効果が期待される有用化合物である。現在、5-HTPはマメ科植物グリフォニアから抽出されているが、安定した供給法とはいえず、効率的5-HTP生産法が求められている。そこで、発酵法により安価に供給可能なL-トリプトファンの5位を選択的に水酸化し、5-HTPを効率的に合成可能な酵素を探索した。

##### 立体構造モデリングによる有効変異部位の予測

L-トリプトファンを水酸化可能な酵素として、芳香族アミノ酸水酸化酵素(AAH)に着目した。AAHは微生物から高等動物まで広く存在しており、同一の起源から進化したと考えられている。実際に、高等動物は脳内でトリプトファン水酸化酵素によって5-HTPを合成しているが、微生物においては唯一、*Chromobacterium violaceum*のフェニルアラニン水酸化酵素(PAH)が報告されている。PAHは他のAAHと比較して酵素活性が高く、本来の基質であるL-フェニルアラニンに加え、L-トリプトファンも水酸化可能であるため、5-HTP合成に有用な酵素である。しかし、当該酵素のL-トリプトファン水酸化活性は工業利用が可能なほど高くないため、改変する必要がある。そこで、X線結晶構造が解明されている*C. violaceum*由来PAHとヒト由来AAHの立体構造モデリングを比較し、有効変異部位を予測した。*C. violaceum*のPAHにおいて、180位のトリプトファン残基は基質となるアミノ酸、101位のロイシン残基は補酵素プテリンの認識に関与すると推察した(Fig.

1)

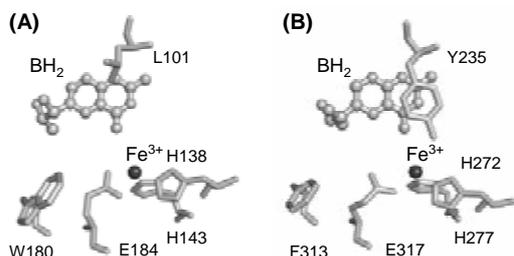


Fig. 1. Active sites of aromatic amino acid hydroxylases. (A) CviPAH (PDB code: 1LTZ) and (B) HumTPH (1MLW). Active site residues at the ligand-binding sites are shown as sticks, and 7,8-dihydrobiopterin (BH<sub>2</sub>) is shown as a sphere and stick. The ferric iron is shown in dark gray.

呈色法による L-トリプトファン水酸化活性評価

まず、101、180 位のそれぞれを 19 種類のアミノ酸に置換した変異酵素ライブラリーを作製した。変異酵素を生産する組換え大腸菌を培養し、休止菌体反応後、生成した 5-HTP を Gibbs 試薬による呈色法を用いて定量的に評価したところ、101 位ではロイシンからチロシン (L101Y)、180 位ではトリプトファンからフェニルアラニン (W180F) への置換で最も高い L-トリプトファン水酸化活性の向上が見られた。更なる詳細な解析のために、精製酵素系において反応速度論解析を実施した。これらの結果を踏まえ、二重変異酵素 (L101Y-W180F) を作製し、L-トリプトファン水酸化活性を評価したところ、酵素活性の指標となる  $k_{cat}$  が野生型酵素と比較して 5.2 倍向上していた (Table 1)。また、変異酵素を用いて反応系を詳細に検討し、最適化したところ、5 mM L-トリプトファンからの 5-HTP 合成収率は 0.1% から 16% にまで向上した (データ未提示)。本変異 PAH は既存の AAH と比較して、最も L-トリプトファン水酸化活性が高く、産業への応用が期待される有用酵素であるといえる。

Table 1. Steady-state kinetic parameters of wild-type and mutant PAH for L-tryptophan

Enzyme	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (s <sup>-1</sup> ·mM <sup>-1</sup> )
Wild-type	3.44	0.40	0.12
L101Y	3.54	1.02	0.29
W180F	1.00	0.51	0.51
L101Y-W180F	4.06	2.08	0.51

(2) 新規プロリン水酸化酵素の探索と特性解析

天然に存在するヒドロキシプロリン (Hyp)

には 4 種類の異性体が存在する (Fig. 2)

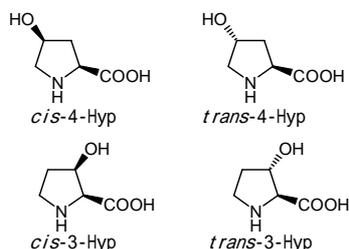


Fig. 2. Regio- and stereoisomers of hydroxyprolines.

このうち、*trans*-4-Hyp と *cis*-3-Hyp はそれぞれ、*Dactylosporangium* sp. RH1 および *Streptomyces* sp. TH1 より対応する水酸化酵素遺伝子がクローニングされ、組換え大腸菌によって工業的生産プロセスが確立されている。しかし、*cis*-4-Hyp や *trans*-3-Hyp は対応する水酸化酵素が存在しないため、工業的生産には至っていない。とくに、*cis*-4-Hyp は抗腫瘍剤としての効果が期待されるため、工業的に有用な化合物である。そこで、*cis*-4-Hyp を L-プロリンから一段階で位置および立体選択的に水酸化可能な酵素の探索を試みた。

L-プロリン *cis*-4-水酸化活性の検出

先行研究において構築した水酸化酵素ライブラリー、ならびに既報の L-プロリン *cis*-3-水酸化酵素に特徴的なドメイン (Pfam:PF05373) を有する機能未知タンパク質を L-プロリン *cis*-4-水酸化活性の評価対象とした。当該タンパク質をコードする遺伝子を組換え大腸菌内で高発現させ、休止菌体を用いた L-プロリン水酸化反応に供した。反応条件として、5 mM L-プロリン、10 mM 2-オキソグルタル酸、1 mM アスコルビン酸、0.5 mM 硫酸鉄(II)、50 mM リン酸緩衝液 (pH7.5) を含む 1 ml の溶液に組換え大腸菌を混合し、25 °C、10 分間往復振とう反応をおこなった。反応液中に含まれるアミノ酸を 1-フルオロ-2,4-ジニトロフェニル-5-L-ロイシナムドにより誘導体化し、*cis*-4-Hyp の合成量を高速液体クロマトグラフィーまたは質量分析計によって定量した。その結果、*Mesorhizobium loti* の mlr6283 タンパク質および *Sinorhizobium meliloti* の SMC03253 タンパク質 (それぞれ MIP4H、SmP4H と命名) に L-プロリン *cis*-4-水酸化活性が見られた。両酵素を精製し、酵素の反応特性を詳細に解析したところ、L-プロリンを位置および立体選択的に水酸化し、異性体を副生せずに *cis*-4-Hyp のみを生成する酵素であることが明らかになった。また、本反応は 2-オキソグルタル酸依存的に進行し、

アスコルビン酸と2価鉄イオンの添加により反応が加速するため、当該酵素は2-オキソグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼであることがわかった (Fig 3)。

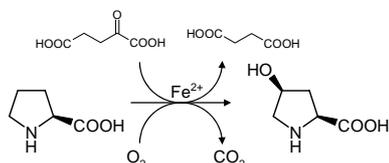


Fig. 3. The reaction catalyzed by L-proline *cis*-4-hydroxylase.

#### 酵素の諸性質の検討

反応温度と pH が MIP4H と SmP4H の酵素活性に及ぼす影響を *cis*-4-Hyp 合成量を指標として評価した。その結果、MIP4H は 25 °C、pH6.5、SmP4H は 25 °C、pH7.0 が最適反応条件であった。両酵素のアミノ酸に対する基質特異性を検討した結果、比較的厳密で、L-プロリンの他、構造類似体である 3,4-デヒドロ-L-プロリンや L-ピペコリン酸に対する水酸化活性も有していた。

また、両酵素を SDS-PAGE により解析し、比較したところ、ともに組換え大腸菌において良好に発現するものの、大部分が不活性な封入体を形成していた。しかし、MIP4H と比較して SmP4H の方がわずかに可溶化量が上回っていた。また、酵素の比活性も MIP4H は 684 (nmol/min/mg) であるのに対し、SmP4H は 707 であった。以上の結果から、実用生産プロセスにおいては SmP4H がより適していると考えられる。

#### *cis*-4-Hyp 生産プロセスの構築

前述の酵素特性を踏まえ、SmP4H 遺伝子を高発現する組換え大腸菌を利用して、L-プロリンからの *cis*-4-Hyp の工業的生産プロセスの検討をおこなった。

反応条件として、100 mM L-プロリン、200 mM 2-オキソグルタル酸、4 mM アスコルビン酸、0.1 mM 硫酸鉄(II)、100 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) を含む 5 ml の溶液に組換え大腸菌を O.D.<sub>660</sub>=40 となるように混合し、25 °C で振とう反応をおこなった。また、大腸菌の主要なプロリン分解酵素であるプロリンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子 (*putA*) の破壊株を作製し、検討をおこなった。その結果、反応 22 時間後の対消費 L-プロリン収率は野生型大腸菌を用いた場合が 33% (31 mM) であったのに対し、*putA* 破壊株を用いた場合、83% (46 mM) に達した (Table 2)。この結果から、*putA* を破壊することにより基質 L-プロリンと生成物 *cis*-4-Hyp の分解が抑えられることが判明した。

さらに、工業的生産プロセスの課題となる高価な 2-オキソグルタル酸の供給をより安価な糖質から大腸菌の代謝活性を利用して供給可能とを考え、検討した。本プロセスは *trans*-4-Hyp の工業的生産に適用されている実績がある。反応条件は前述の系における 2-オキソグルタル酸を 2% グルコースで代替した。その結果、反応 22 時間後の対消費 L-プロリン収率は 42% (15 mM) であった。

*trans*-4-Hyp 生産における 2-オキソグルタル酸供給プロセスが *cis*-4-Hyp 生産においても同様に有効であった (Table 2)。

Table 2. Summary of *cis*-4-hydroxy-L-proline production using recombinant *Escherichia coli*

Host	Substrate	<i>cis</i> -4-Hyp (mM)	Yield <sup>a</sup> (%)
<i>E. coli</i>	L-Pro, 2-OG <sup>b</sup>	31	33
<i>E. coli (putA)</i>	L-Pro, 2-OG <sup>b</sup>	46	83
<i>E. coli</i>	L-Pro, Glc	8.6	32
<i>E. coli (putA)</i>	L-Pro, Glc	15	42

<sup>a</sup> Yield of *cis*-4-Hyp against the consumed L-proline

<sup>b</sup> 2-Oxoglutarate

#### (3) 脂肪族アミノ酸水酸化酵素の探索と特性解析

4-ヒドロキシ-L-イソロイシン (4-HI) は、マメ科植物フェヌグリークの種子に存在し、2型糖尿病治療薬として期待される有用化合物である。4-HI は植物中にのみ見出されている特殊なアミノ酸であり、効率的生産法は確立されていない。近年、一部の *Bacillus* 属細菌由来イソロイシン水酸化酵素 (IDO) が報告された。当該酵素は L-イソロイシンを水酸化し、4-HI を生成する 2-オキソグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼであった。しかし、基質特異性は L-イソロイシン特異的であり、医薬品のキラルブロックとして有用な脂肪族ヒドロキシアミノ酸を合成することはできない。そこで、既存の IDO よりも広範な基質特異性を有する新規脂肪族アミノ酸水酸化酵素の取得を試みた。

#### 脂肪族アミノ酸水酸化活性の検出

先行研究において構築した水酸化酵素ライブラリー、ならびに既報の IDO に特徴的なドメイン (Pfam: DUF2257) を有する機能未知タンパク質を脂肪族アミノ酸水酸化活性の評価対象とした。当該タンパク質をコードする遺伝子を組換え大腸菌内で高発現させ、休止菌体を用いた脂肪族アミノ酸の水酸化反応に供した。反応条件として、5 mM L-イソロイシン、10 mM 2-オキソグルタル酸、1 mM アスコルビン酸、0.1 mM 硫酸鉄(II)、50 mM リン酸緩衝液 (pH7.5) を含む 1 ml の溶液に組換え大腸菌

を混合し、25、30分間往復振とう反応をおこない、高速液体クロマトグラフィーまたは質量分析計によって生成物を確認した。その結果、*C. violaceum*のCV\_3308タンパク質( ID0との類似性23%)、*Gloeobacter violaceus*のglr2602タンパク質(19%)、*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*のPSPPH\_3986タンパク質(39%)にID0と同様にL-イソロイシン水酸化活性を見出した。また、本酵素も2-オキソグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼであった。

#### 酵素的諸性質の検討

取得した3種類の酵素を精製し、反応温度とpHが酵素活性に及ぼす影響を4-HI合成量を指標として評価した。その結果、CV\_3308は25、pH7.0、glr2602は45、pH5.5、PSPPH\_3986は50、pH4.5が最適反応条件であった。既報のID0の最適値は25、pH6.0であったことから、性質の異なるアミノ酸水酸化酵素である可能性が示唆された。

#### 基質特異性解析

上記3種類の水酸化酵素のアミノ酸に対する水酸化活性を検討した。反応条件として、5 mM アミノ酸、10 mM 2-オキソグルタル酸、1 mM アスコルビン酸、0.1 mM 硫酸鉄(II)、リン酸緩衝液(pH7.5)を含む1 mlの溶液に精製酵素を添加し、25、8時間往復振とう反応をおこない、高速液体クロマトグラフィーまたは質量分析計によって生成物を確認した。その結果、いずれの水酸化酵素もL-イソロイシン以外の脂肪族アミノ酸に対する水酸化活性を有していた。中でも、glr2602は最も基質特異性が広く、L-バリン、L-ロイシン、L-ノルバリン、L-ノルロイシンに対する水酸化活性を有していた。さらに、3種類の酵素はD-アミノ酸も水酸化していることが明らかになった(Table 3)。アミノ酸関連酵素は、キラリティーの認識が厳密であることが一般的であり、当該酵素のD-アミノ酸水酸化活性は極めて興味深い結果であるといえる。

Table 3. Substrate specificities of aliphatic amino acid hydroxylases

Substrate	CV_3308	glr2602	PSPPH_3986
L-Isoleucine	+	+	+
L-Leucine	+	+	+
L-Valine	n.d.	+	n.d.
L-Norleucine	+	+	+
L-Norvaline	+	+	+
D-Isoleucine	n.d.	+	n.d.
D-Leucine	+	+	+
D-Valine	n.d.	+	n.d.
D-Norleucine	+	+	+
D-Norvaline	n.d.	+	+

n.d., not detected

#### 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3件)

Kuniki Kino, Ryorato Hara, Ai Nozawa, Enhancement of L-tryptophan 5-hydroxylation activity by structure-based modification of L-phenylalanine 4-hydroxylase from *Chromobacterium violaceum*, *J. Biosci. Bioeng.*, in press.

DOI:10.1016/j.jbiosc.2009.04.002 (査読あり)

Ryotaro Hara, Kuniki Kino, Characterization of novel 2-oxoglutarate dependent dioxygenases converting L-proline to *cis*-4-hydroxy-L-proline, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 379(4), 882-886, (2009) (査読あり)

Toshiki Furuya, Tatsunari Nishi, Daisuke Shibata, Hideyuki Suzuki, Daisaku Ohta, Kuniki Kino, Characterization of orphan monooxygenases by rapid substrate screening using FT-ICR mass spectrometry, *Chem. Biol.*, 15(6), 563-572, (2008) (査読あり)

##### [学会発表](計11件)

原良太郎、木野邦器、新規なL-プロリン *cis*-4-水酸化酵素遺伝子の活性発現、日本農芸化学会、講演要旨集p.36、2009年3月、福岡

原良太郎、野澤あい、木野邦器、*Chromobacterium violaceum*由来 L-phenylalanine hydroxylaseの L-tryptophan水酸化活性向上、酵素工学研究会30周年記念シンポジウム、講演要旨集p.36、2008年11月、千葉

Toshiki Furuya, Daisuke Shibata, Kuniki Kino, Characterization of P450 monooxygenases by rapid substrate screening using FT-ICR mass spectrometry, 13th International Biotechnology Symposium and Exhibition, IBS2008, 136, p.S387, October 2008, Dalian (China)  
Ryotaro Hara, Ai Nozawa, Kuniki Kino, Modification of L-tryptophan hydroxylation activity of L-phenylalanine hydroxylase from *Chromobacterium violaceum*, 4th

International Congress on Biocatalysis, abstract p.107, August 2008, Hamburg (Germany)

原良太郎、野澤あい、木野邦器、部位特異的変異導入によるL-フェニルアラニン水酸化酵素の基質特異性改変、日本生物工学会、講演要旨集p.160、2008年8月、宮城

野澤あい、原良太郎、木野邦器、改変型L-phenylalanineによる

5-hydroxy-L-tryptophanの合成、日本農芸化学会大会、講演要旨集p.23、2008年3月、愛知

古屋俊樹、柴田大輔、木野邦器、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析装置を利用した酸化酵素の効率的基質探索法の開発、酵素工学会第58回講演会、講演要旨集 p.77、2007年10月、東京

古屋俊樹、柴田大輔、木野邦器、FT-ICR MSを利用した酸化酵素の効率的基質探索法の開発、日本化学会 第10回バイオテクノロジー部会シンポジウム：化学と生命科学の融合、講演要旨集p.80、2007年9月、東京

Toshiki Furuya, Daisuke Shibata, Kuniki Kino, A simple and rapid method for hunting substrates of monooxygenases using fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, 8th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, Abstract p.123, July 2007, Oviedo (Spain)

古屋俊樹、柴田大輔、木野邦器、FT-ICR MSを利用した酸化酵素活性の一斉スクリーニング法の開発、日本生物工学会、講演要旨集 p.113、2006年9月、大阪

Toshiki Furuya, Daisuke Shibata, Kuniki Kino, A high-throughput screening method for monooxygenase activity by use of fourier transform ion cyclotron mass spectrometry, 3rd International Congress on Biocatalysis, Abstract P017, p. 50, September 2006, Hamburg (Germany)

〔図書〕(計3件)

木野邦器(分担執筆) 特集 キラルテクノロジーの新しい展開：アミノ酸水酸化酵素の開発と応用、ファインケミカル, 38(5), pp.56-63, (全101頁)、シーエムシー出版、2009年

木野邦器(分担執筆) 特集 化学品量産

プロセスを志向する酵素研究：ゲノム情報を利用した新しいパイプロセス開発、バイオインダストリー, 25(7), pp.41-51, (全99頁)、シーエムシー出版、2008年

木野邦器、共著(分担執筆)、メタボロミクスの先端技術と応用 第21章 メタボロミクスとゲノム情報を活用した有用酵素の探索、pp.249-259, (全299頁)、シーエムシー出版、2008年

〔産業財産権〕  
出願状況(計3件)

名称：シス-4-ヒドロキシ-L-プロリンの製造方法

発明者：木野邦器、原良太郎

権利者：同上

種類：

番号：PCT/JP2009/58808

出願年月日：2009年5月12日

国内外の別：国内外

名称：L-及びD-脂肪族アミノ酸水酸化物の製造方法

発明者：木野邦器、原良太郎

権利者：同上

種類：

番号：2008-271675

出願年月日：2008年10月22日

国内外の別：国内

名称：シス-4-ヒドロキシ-L-プロリンの製造方法

発明者：木野邦器、原良太郎

権利者：同上

種類：

番号：2008-125213

出願年月日：2008年5月12日

国内外の別：国内

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木野 邦器 (KINO KUNIKI)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：60318764