

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05395

研究課題名（和文）祖先型L-アミノ酸酸化酵素を軸とするD-アミノ酸誘導体の大量生産に向けた基盤構築

研究課題名（英文）Development of D amino acid derivative synthetic method by ancestral L-amino acid oxidases

研究代表者

中野 祥吾（Nakano, Shogo）

静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

研究者番号：80748541

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,600,000円

研究成果の概要（和文）：独自開発した酵素アミノ酸配列分類法と祖先型再構成法を融合した手法を用いて、配列データベースから極めて高い耐熱性と耐久性を有する新規な祖先型L-アミノ酸酸化酵素（HTAncLAA02）を設計した。HTAncLAA02のX線結晶構造解析を行い、その構造を決定するとともに、本酵素の基質侵入経路ならびに基質認識機構を明らかにした。合理的設計によりL-Trpに高い活性を示すHTAncLAA02(W220A)変異体の取得に成功した。デザインした変異体を用いたD,L-Trp誘導体のD体への化学-酵素的変換に成功し、計3つのTrp誘導体について、高い単離収率かつ光学純度でD体を精製することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

データベースに登録されている配列の多くは、その機能が同定されておらず未利用資源として存在している。本研究を通してL-アミノ酸酸化酵素を題材としつつ、未利用資源の中から産業応用のポテンシャルを秘めた新規酵素の探索を可能にする技術開発を実現できた。今後ますます増大するであろう配列データの有効利用を実現可能にするための基盤となる研究成果であり、学術的にも社会的にも意義が高いものであると信じている。

研究成果の概要（英文）：Through the integration of an innovative enzyme classification method and ancestral sequence reconstruction, we engineered hyperthermostable ancestral L-amino acid oxidases (HTAncLAA02). Structural analysis, including crystallography, delineated the substrate entrance pathway and elucidated the mechanism of substrate recognition for HTAncLAA02. The HTAncLAA02(W220A) variant demonstrated heightened activity towards L-Trp, making it a promising candidate for the deracemization of D,L-amino acids to D-forms. Consequently, this enabled the establishment of a chemo-enzymatic system for the production of D-Trp derivatives from racemic mixtures, utilizing the HTAncLAA02(W220A) variant as a biocatalyst.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：祖先型再構成法 L-アミノ酸酸化酵素 X線結晶構造解析 光学分割 物質生産

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

産業革命から現在まで絶え間なく続いてきた科学技術の進展により、人類は自然災害を克服する術を得つつある。現在までに合成された多くの医薬品が、感染症を含む様々な疾病から人類を救ってきた功績は言うまでもない。これまで医薬品といえば、低分子医薬品が中心であったが、近年のバイオテクノロジーの発展は、中分子医薬品の開発を可能にしつつある。高い薬効と優れた体内動態を示す中分子医薬品は、従来薬に代わる新規薬剤として、今後の応用が期待されている。

中分子医薬品の一つであるペプチド医薬品を合成するには、原料となる D-及び L-アミノ酸誘導体を、高い光学純度 (>99% ee) かつ大量に合成する必要がある。今日までに多くの L-アミノ酸誘導体が、酵素法により合成されてきた。一例として、広い基質選択性を有する D-アミノ酸酸化酵素 (DAAO) を用いた D-アミノ酸主鎖アミドの特異的な酸化と、還元剤を用いた反応生成物のラセミ体アミノ酸への変換を組み合わせた動的光学分割法により、光学純度の高い L-アミノ酸誘導体を理論収率 100% で合成可能である。

一方で D-アミノ酸誘導体の酵素法による合成に関して、現在も多くの研究グループが開発を進めている。DAAO の代わりに広い基質選択性を有する L-アミノ酸酸化酵素 (LAAO) を使えば、光学純度の高い D-アミノ酸誘導体を合成できることは容易に推察できる。しかし本手法は HPLC スケール (数 mg オーダー) での適用に限定されていた。これは LAAO の発見から約 80 年が経過し、組み替えタンパク質発現技術は格段に向上したにも関わらず、今日まで大腸菌発現系を用いて本酵素を安価かつ大量に生産できていなかったことに起因する。

2. 研究の目的

本研究では、第一に独自開発した酵素アミノ酸配列分類法と祖先型再構成法 (ASR) を組み合わせた手法を用いて、配列データベース上に登録されたフラビン依存型アミノ酸化酵素 (FAO) スーパーファミリーの中から、新規 LAAO を取得することを目的として研究を実施した。第二に取得した新規 LAAO の X 線結晶構造解析と変異体の機能解析を行い、基質認識機構や反応機構の分子レベルでの解明を目指した。第三に新規 LAAO の基質認識能を合理的設計により改変したのち、これまで達成が難しかった D-アミノ酸誘導体の大量合成を可能にする化学-酵素合成系ならびに微生物生産系の構築を行った。

3. 研究の方法

祖先型 LAAO2 (HTAncLAAO2) のデザイン

HTAncLAAO2 について、以下の手順でデザインを行った。*Caulobacter radius* 由来 Hypothetical protein (CaHyp) の配列を鋳型とし、Blastp によりそのホモログ配列を 228 個取得した。CaHyp の配列とホモログ配列を独自開発したアミノ酸配列解析プログラムで解析したのち、3, 213, 355, 398, 514, および 564 位の 6 残基 (CaHyp に対応) をモチーフ配列候補として同定した。6 残基の組み合わせが Ile, Ser, Thr, Ile, Ser, Phe となっているホモログ配列を選抜き、4 配列を得た。この 4 配列を入力データとし、MAFFT2ASR.py を用いて HTAncLAAO2 をデザインした。MAFFT2ASR.py は ASR 法によるデザインを自動化するために開発した独自スクリプトであり、a. MAFFT によるアラインメント、b. PhyML を用いた最尤法による系統樹作成、c. PAML を用いた祖先型配列の再構成を実行可能である。

HTAncLAAO2 の大量発現・精製

HTAncLAAO2 をエンコードする DNA 配列を人工遺伝子合成したのち、pET28a にサブクローニング (*NcoI/XhoI* サイト) することで発現プラスミドを作成した。作成したプラスミドを BL21(DE3) 株に形質転換したのち、これを発現ホストとして利用した。LB 培地を用いた菌体の培養と IPTG による遺伝子発現誘導を行ったのち、菌体を回収した。菌体を BufferA (20 mM リン酸カリウム (pH 7.0), 10 mM NaCl) に懸濁し、超音波による菌体破砕を行ったのち、その上清 (細胞抽出液) を遠心分離により回収した。細胞抽出液を HisTrap-HP カラムに供し、目的タンパク質をカラムに吸着させた。BufferA および 40 mM imidazole を含む BufferA でカラム洗浄を行ったのち、100 mM imidazole を含む BufferA にてサンプル溶出を行った。回収したサンプルは、陰イオン交換クロマトグラフィー (MonoQ 4.6/100 PE カラム) およびゲル濾過クロマトグラフィー (Superdex 200 Increase) による精製を行うことで、HTAncLAAO2 の精製サンプルを取得した。精製 HTAncLAAO2 を用いて以後の実験を実施した。

HTAncLAAO2 の結晶化と構造解析

精製 HTAncLAAO2 を限外濾過濃縮したのち、PEG-ION screening キットを用いて結晶化条件の探索を行った。リザーバー条件の検討と Additive 条件の最適化を経たのち、最終的に 10% (w/v) PEG3350, 0.2 M クエン酸アンモニウム, 4 % (v/v) 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノールをリザーバーとして用いた条件にて良好な HTAncLAAO2 結晶を得ることに成功した。得られた

結晶を 20% (v/v) グリセロールを添加したりザーバーにてクイックソークしたのち、X 線回折実験に利用した。BL5A ビームライン (KEK, 筑波) にて X 線回折実験を行い、XDS および SCALA によるスケーリング、PHASER による分子置換法 (AlphaFold2 で予測した HTAncLAAO2 構造を鋳型とした)、COOT による構造構築、Refmac による構造精密化を経て、最終的に 2.2Å 分解能 ($R/R_{\text{free}} = 0.169/0.200$) で構造決定に成功した。

HTAncLAAO2 およびその変異体の酵素特性の分析

HTAncLAAO2 およびその変異体の酵素活性は、酵素反応進行により生じる H_2O_2 をトリンダー試薬により呈色、およびその色素を定量することで測定した。反応 Buffer (終濃度: 10 mM L-Met, 100 mM bis-tris HCl (pH 7.0), 1.5 mM 4-アミノアンチピリン, 2.0 mM TOOS, 50 U/mL 西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ) に酵素液を添加して反応を開始した。なお酵素液について、耐熱性を計測する場合は 30-95 度の範囲で 10 分加熱したものを、耐久性を測定する場合は 30 度にて 0-7 日間加熱したものを利用した。酵素学的パラメータの決定は、5 つの L-アミノ酸を基質として利用することで行った。

HTAncLAAO2(W220A)変異体を用いた *rac*-Trp 誘導体の D 体への光学分割

HTAncLAAO2(W220A)変異体を用いた化学-酵素合成法による *rac*-Trp 誘導体の D 体への変換を実施した。200 mL の反応溶液 (100 mM リン酸カリウム (pH 8.0), 150 mM $\text{NH}_3\text{:BH}_3$, 40 kU カタラーゼ, 5 mM D,L-Trp 誘導体) に 0.4 mg の HTAncLAAO2(W220A)変異体を添加し、40 度の条件にて反応を実施した。反応開始前 (0 h) および反応終了後 (24 h) の反応溶液を回収、1.15% HClO_4 を添加して反応停止後、HPLC 分析により反応進行を確認した。なお D および L 体の Trp 誘導体の分離にはキラルカラム (CROWNPACK CR-I(+)) を、アミノ酸の検出は 210 nm の吸収スペクトル変化をモニターすることで実施した。D-Trp 誘導体は陽イオン交換樹脂 (DOWEX 50WX8 100-200) を用いた精製により取得した。

4. 研究成果

HTAncLAAO2 の X 線結晶構造解析

HTAncLAAO2 の全体構造を Fig. 1A に示す。HTAncLAAO2 はモノマー単位 (緑色で表示) が 8 つ、規則的に結合した Octamer 構造を持つことが判明した。HTAncLAAO2 の特徴的なオリゴマー構造が結晶パッキングに由来するものではないことを証明するため、ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量推定を実施した (Fig. 1B)。結果、HTAncLAAO2 は溶液中で 544 kDa の分子量を有しており、これは HTAncLAAO2 が 8 量体構造を形成している際の分子量と一致していた。またクライオ電子顕微鏡を用いた負染色による HTAncLAAO2 の単粒子解析の結果は、本酵素が Fig. 1A で示したような構造を有することを示していた (Fig. 1C)。

以上の結果から HTAncLAAO2 は溶液中にて手裏剣状の 8 量体構造を持つことが判明した。なお HTAncLAAO や L-アルギニン酸化酵素など、HTAncLAAO2 と配列類似性を有するいくつかの FAO スーパーファミリー内の酵素において、多量体構造の形成が確認されており、これら酵素群の高い耐熱性が報告されている。このような特徴的なオリゴマー構造の形成が、本酵素群の安定性向上に寄与していることが考えられた。

L-Trp への活性を強化した HTAncLAAO2 変異体のデザイン

酵素特性の解析の結果、HTAncLAAO2 は非常に高い耐熱性 ($T_{1/2} = 85^\circ\text{C}$) と耐久性 (30 $^\circ\text{C}$ 、7 日間のインキュベーション後の残存活性が 95%以上) を示すなど、生体触媒として優れた性質を有していることが判明した。一方で HTAncLAAO2 の基質選択性は比較的狭いことが判明した。事実、HTAncLAAO2 は 4 種類の疎水性 L-アミノ酸 (L-Phe, L-Leu, L-Ile および L-Met) に対しては高い活性を示す一方、その他の L-アミノ酸に対しては活性を示さない、あるいは微弱な活性しか示さなかった。HTAncLAAO2 を生体触媒として応用利用するには、本酵素の基質選択性を拡張し、多様な L-アミノ酸を酸化できるように改変する必要がある。

上記の背景から、HTAncLAAO2 の基質選択性拡張を目指した変異体デザインを実施すること

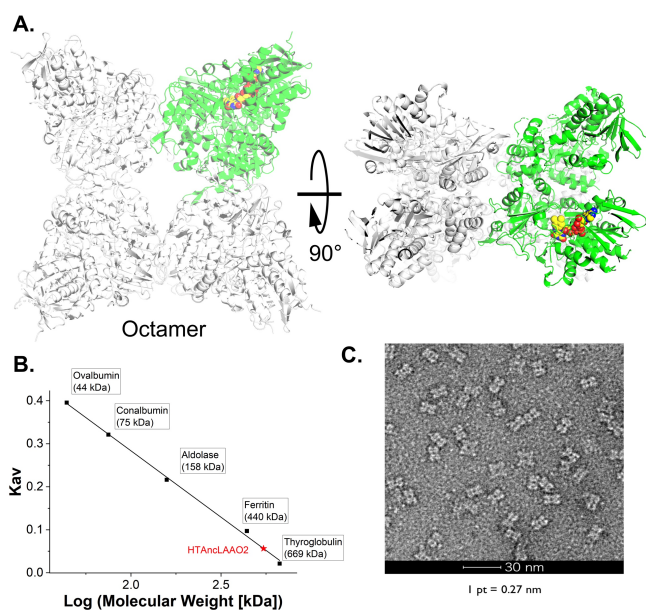


Fig. 1 A). HTAncLAAO2 の全体構造。B). ゲル濾過クロマトグラフィーによる HTAncLAAO2 の分子量推定。C). HTAncLAAO2 の負染色法による単粒子解析 (文献 a)

とした。HTAncLAAO2 が反応を効率よく進行させるには「活性中心への基質の取り込み」と「基質を活性中心に正確に配置させる」を実現する必要がある。まず前者について解明するため、HTAncLAAO2 の基質侵入を CAVER を用いて探索した (Fig. 2A)。結果、基質侵入経路は主に芳香族アミノ酸 (W220, F225, Y383 および W520) で構成されることが判明した。後者についても同様に解析を行ったところ、基質 (L-Trp, 橙色で表示, Fig. 2B) の正確な配置について、活性中心に存在する芳香族アミノ酸 (W220, W520, W483, Y383) が重要な役割を担うことが示唆された。そこで基質の正確な配置に関わる 4 つの芳香族アミノ酸に加え、L320 について Ala 変異体を作成し、酵素精製と活性測定を行った (Fig. 2C)。精製酵素が取得できた 3 つの変異体 (L320A, Y383A および W220A) について、5 つの L-アミノ酸を基質として用いて酵素学的パラメータを決定した (Fig. 2C)。デザインした変異体の中で唯一 W220A について、L-Trp への反応性が改善していることが判明した (Fig. 2C および D)。以後 HTAncLAAO2(W220A)変異体を用いて実験を実施した。

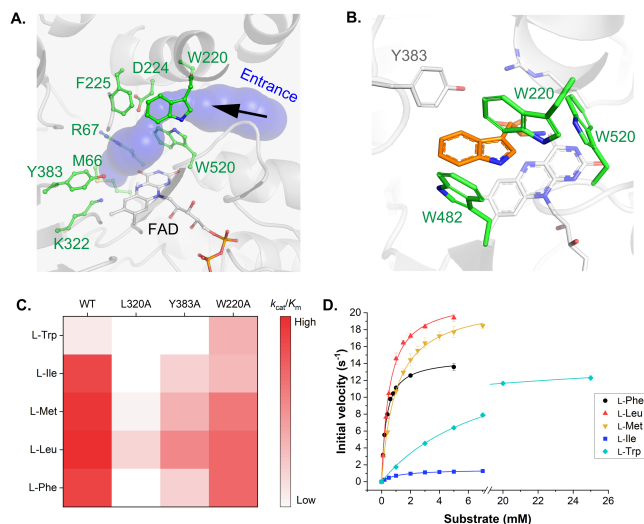


Fig. 2 A). HTAncLAAO2 の基質侵入経路。B). HTAncLAAO2 の活性中心構造。C). HTAncLAAO2 および変異体の活性値ヒートマップ (k_{cat}/K_m 値)。D). HTAncLAAO2(W220A)変異体の酵素 kinetic プロット。(文献 a)

HTAncLAAO2(W220A)変異体を用いた D,L-Trp 誘導体の D 体への化学-酵素的変換

HTAncLAAO2(W220A) 変異体の広い基質選択性により、これまで難しかった D,L-Trp 誘導体の D 体への変換が可能になると考えた。そこで HTAncLAAO2(W220A) を触媒として利用し、Fig. 3A に示した化学-酵素反応系を用いて D-Trp 誘導体の合成に取り組んだ。結果、3 つの D,L-Trp 誘導体 (7-フルオロ Trp, 5-フルオロ Trp, 5-メトキシ Trp) を基質として用いた反応条件にて、高い単離収率 (53% ~ 93%) かつ光学純度 (いずれも >99% ee) で D-Trp 誘導体を合成することに成功した (Fig. 3B-D)。なおこれまでに HTAncLAAO2, D-アミノ酸脱水素化酵素, ならびにグルコース脱水素化酵素を利用した酵素反応系を構築しており、微生物合成系でも D-アミノ酸誘導体を効率よく合成できることを確認している (文献 b)。

本成果については 2 つの論文誌にて掲載されている (文献 a: Y. Kawamura et al., *Commun. Chem.*, 6, 200, 2023, および 文献 b: H. Araseki et al., *ChemBioChem*, e202400036, 2024)。その他共同研究を通して複数の成果を得た。

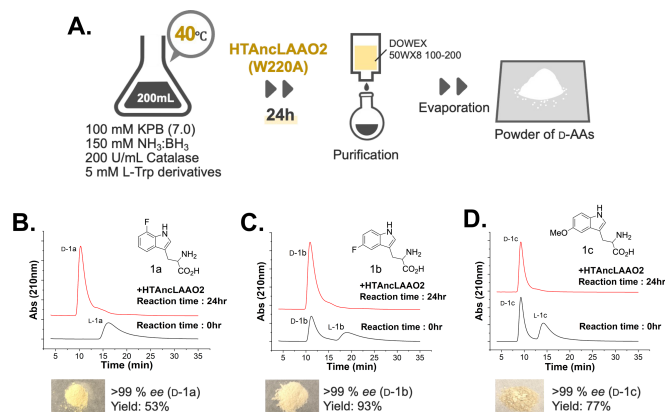


Fig. 3 A). HTAncLAAO2(W220A)を用いた D-Trp 誘導体の分取スケールでの合成スキーム。B-D). 反応前 (黒) および反応後 (赤) における反応溶液の HPLC 分析。D, C, D はそれぞれ 7-フルオロ, 5-フルオロ, 5-メトキシ Trp のデータに該当する。(文献 a)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Araseki Hayato, Kawasaki Mayu, Kambe Akira, Kozuka Kohei, Ito Sohei, Nakano Shogo	4. 巻 24
2. 論文標題 Definition of an Index Parameter To Screen Highly Functional Enzymes Derived from a Biochemical and Thermodynamic Analysis of Ancestral meso Diaminopimelate Dehydrogenases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 e202200727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.202200727	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 Masuda Miyu, Terada Yuko, Tsuji Ryoki, Nakano Shogo, Ito Keisuke	4. 巻 12
2. 論文標題 Time-Series Sensory Analysis Provided Important TI Parameters for Masking the Beany Flavor of Soymilk	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 2752 ~ 2752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/foods12142752	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 Kawamura Yui, Ishida Chiharu, Miyata Ryo, Miyata Azusa, Hayashi Seiichiro, Fujinami Daisuke, Ito Sohei, Nakano Shogo	4. 巻 6
2. 論文標題 Structural and functional analysis of hyper-thermostable ancestral L-amino acid oxidase that can convert Trp derivatives to D-forms by chemoenzymatic reaction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42004-023-01005-1	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 Miura Kizuku, Fujihara Michiko, Watanabe Masaki, Takamura Yuta, Kawasaki Mayu, Nakano Shogo, Kakuta Hiroki	4. 巻 96
2. 論文標題 Direct evaluation of polarity of the ligand binding pocket in retinoid X receptor using a fluorescent solvatochromic agonist	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 129536 ~ 129536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2023.129536	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 Ozawa Hiroki, Unno Ibuki, Sekine Ryohei, Chisuga Taichi, Ito Sohei, Nakano Shogo	4. 巻 5
2. 論文標題 Development of evolutionary algorithm-based protein redesign method	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Reports Physical Science	6. 最初と最後の頁 101758 ~ 101758
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xcrp.2023.101758	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 Terada Yuko, Akimoto Masanobu, Sakoda Hirofumi, Yamamoto Shunsuke, Kubota Mayuka, Motoyama Tomoharu, Imanaka Yo, Nakano Shogo, Ito Sohei, Kato Shigeki, Ito Keisuke	4. 巻 13
2. 論文標題 Comprehensive Epitope Analysis of Monoclonal Antibodies Binding to Hen Egg Ovalbumin Using a Peptide Array	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 407 ~ 407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/foods13030407	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 Araseki Hayato, Sugishima Narumi, Chisuga Taichi, Nakano Shogo	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of an Enzyme Cascade System for the Synthesis of Enantiomerically Pure D Amino Acids Utilizing Ancestral L Amino Acid Oxidase	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 e202400036
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.202400036	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 Miyata Azusa, Chisuga Taichi, Kambe Akira, Miyata Ryo, Kawamura Yui, Takeda Hiroyuki, Ito Sohei, Nakano Shogo	4. 巻 14
2. 論文標題 Design of Ancestral Sortase E that is Applicable in Protein Biomaterial Synthesis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 ACS Catalysis	6. 最初と最後の頁 3514 ~ 3523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscatal.4c00487	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 Motoyama Tomoharu, Yamamoto Yuta, Ishida Chiharu, Hasebe Fumihito, Kawamura Yui, Shigeta Yasuteru, Ito Sohei, Nakano Shogo	4. 巻 7
2. 論文標題 Reaction Mechanism of Ancestral L-Lys -Oxidase from Caulobacter Species Studied by Biochemical, Structural, and Computational Analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 44407 ~ 44419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.2c06334	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 Kajimoto Shohei, Ohashi Miwa, Hagiwara Yusuke, Takahashi Daisuke, Mihara Yasuhiro, Motoyama Tomoharu, Ito Sohei, Nakano Shogo	4. 巻 88
2. 論文標題 Enzymatic Conjugation of Modified RNA Fragments by Ancestral RNA Ligase AncT4_2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e01679-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/aem.01679-22	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 Kawasaki Mayu, Motoyama Tomoharu, Yamada Shoya, Watanabe Masaki, Fujihara Michiko, Kambe Akira, Nakano Shogo, Kakuta Hiroki, Ito Sohei	4. 巻 14
2. 論文標題 Ligand Screening System for the RXR Heterodimer Using the Fluorescence RXR Agonist CU-6PMN	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 291 ~ 296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.2c00509	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 Yamamoto Yuta, Nakano Shogo, Shigeta Yasuteru	4. 巻 96
2. 論文標題 Dynamical Interaction Analysis of Proteins by a Random Forest-Fragment Molecular Orbital (RF-FMO) Method and Application to Src Tyrosine Kinase	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 42 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20220304	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 Ishida Chiharu, Miyata Ryo, Hasebe Fumihito, Miyata Azusa, Kumazawa Shigenori, Ito Sohei, Nakano Shogo	4. 巻 13
2. 論文標題 Reconstruction of Hyper Thermostable Ancestral L Amino Acid Oxidase to Perform Deracemization to D Amino Acids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemCatChem	6. 最初と最後の頁 5228 ~ 5235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cctc.202101296	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 Sugiura Sayaka, Nakano Shogo, Niwa Masazumi, Hasebe Fumihito, Matsui Daisuke, Ito Sohei	4. 巻 297
2. 論文標題 Catalytic mechanism of ancestral L-lysine oxidase assigned by sequence data mining	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101043 ~ 101043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101043	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 Takagi Hiroshi, Kozuka Kohei, Mimura Kenta, Nakano Shogo, Ito Sohei	4. 巻 -
2. 論文標題 Design of a Full Consensus Glutamate Decarboxylase and Its Application to GABA Biosynthesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemBioChem	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) 10.1002/cbic.202100447	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11件（うち招待講演 9件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 中野 祥吾
2. 発表標題 ネットワーク理論に基づく酵素ホモログ配列分類法の開発と応用
3. 学会等名 「高速分子動画」若手シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中野 祥吾
2. 発表標題 進化的計算法による高機能化タンパク質のデザイン
3. 学会等名 第23回蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shogo Nakano
2. 発表標題 Design of Ancestral Sortase E that can apply to synthesize protein materials
3. 学会等名 The 67th annual meeting of Australian Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB2023)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中野 祥吾
2. 発表標題 配列データベースから取得した祖先型Sortase Eの機能解析と応用
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中野 祥吾
2. 発表標題 アミノ酸配列に刻まれた進化情報を利用した高機能化タンパク質の創出
3. 学会等名 新資源生物変換研究会 第3回公開勉強会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中野 祥吾
2. 発表標題 タンパク質インシリコ分子進化法の開発と実験的検証
3. 学会等名 予知生成 第三回公開シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 中野 祥吾
2. 発表標題 ファインケミカル合成に応用可能な祖先型酵素群の開発
3. 学会等名 日本薬学会第144回年会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 中野祥吾
2. 発表標題 遺伝的アルゴリズムと立体構造を用いた高機能化酵素デザイン
3. 学会等名 物性研短期研究会「理論タンパク質物性科学の最前線：理論と実験との密な協働」 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shogo Nakano
2. 発表標題 Development of genetic algorithm-based consensus protein design method to generate highly functional enzymes
3. 学会等名 Active Enzyme Molecule 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shogo Nakano
2. 発表標題 Design of artificial L-amino acid oxidases generated by ancestral sequence reconstruction which can apply to deracemize to aromatic D-amino acid derivatives
3. 学会等名 Pacifichem2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野 祥吾
2. 発表標題 インシリコでの人工酵素配列設計と酵素探索
3. 学会等名 第61回 澱粉研究懇談会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 改変グルタミン酸デカルボキシラーゼ	発明者 伊藤 創平, 中野 祥吾, 他4名	権利者 静岡県立大学法人、他1社
産業財産権の種類、番号 特許、特開2023-027835	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 ロドプシンの新規変異体	発明者 原 清敬, 原(弘埜) 陽子, 伊藤 創平, 中野 祥吾, 他6名	権利者 静岡県立大学法人
産業財産権の種類、番号 特許、特開2023-057064	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 熱安定性に優れた逆転写酵素	発明者 横江 奨, 中野 祥吾, 伊藤 創平	権利者 静岡県立大学法人、他1社
産業財産権の種類、番号 特許、特開2023-090534	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 ペプチドライゲーション活性を有するポリペプチド及びその利用	発明者 竹田 浩之, 中野 祥吾, 伊藤 創平, 宮田 梓	権利者 国立大学法人愛媛大学、静岡県立大学法人
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-066172	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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
---------	---------