

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24688010

研究課題名(和文)水酸化アミノ酸をトレーサーとするペプチド生合成遺伝子資源の新規開拓

研究課題名(英文) Search for peptide-biosynthetic genes using hydroxy amino acid tracers

研究代表者

日比 慎(Hibi, Makoto)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30432347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではアミノ酸水酸化酵素(DO)を足掛かりとした遺伝子クラスター解析法により、新規ペプチド分子種の生合成経路解明を目指した。Burkholderia ambifaria AMMD株のゲノム中において発見したDOを含む非リボソームペプチド合成酵素(NRPS)様クラスターの各構成酵素の機能解析により新規ペプチドの生合成経路の一端を明らかにした。またペプチド分子中に多く見出される水酸化環状アミノ酸を生成する新規なDOを糸状菌類より見出し、詳細な酵素機能解析を進めた。これら成果を活かした酵素触媒法により同位体標識水酸化アミノ酸の生成に成功し、微生物代謝変換物のトレースを可能とした。

研究成果の概要(英文)：By the gene cluster analysis method based on amino acid hydroxylase (DO), biosynthetic pathway elucidation of novel peptide molecular species was carried out. A partial peptide biosynthetic pathway was revealed by functional analysis of each constitutive enzyme in non-ribosomal peptide synthesis (NRPS) cluster including a DO gene found in the genome of Burkholderia ambifaria AMMD. Also, novel DOs were found from filamentous fungi to generate hydroxy cyclic amino acids, which often constitute peptides, and were applied to detailed enzymatic characterization analysis. Taking advantage of these results, isotopically labeled hydroxy amino acids were successfully produced by enzyme catalytic processes, and were it possible to trace microbial metabolic intermediates in peptide biosynthesis.

研究分野：応用微生物学

キーワード：水酸化アミノ酸 ペプチド生合成 アミノ酸変換酵素

1. 研究開始当初の背景

ペプチドとは数個から数十個のアミノ酸が結合した化合物であり、動植物から微生物まで多種多様な生物が生産する重要な二次代謝物の一つである。ペプチドの中には抗菌作用や生理活性作用など有用な機能を保持するものが数多く知られており、その臨床的な利用が期待されている。既存の産業的なペプチド生産法としては抽出法と有機合成法が挙げられるが、収率が低い点や煩雑な保護・脱保護過程が必要である点などから低コストでの大量生産には不向きであった。そこでペプチド生合成酵素を利用した大量生産法の開発が期待されており、無細胞発現系や異種発現系を用いたペプチド生産技術の研究開発が盛んに行われている。

微生物の産出するペプチドの分子構造は特に多様性に富んでおり、その機能性も多岐に及んでいる。このような多様性を生み出す原因は微生物のペプチド生合成がリボソームではなく、複数のモジュールが連結した巨大な非リボソームペプチド合成酵素(NRPS)により行われるためである。NRPSの特徴の1つとしては20種類のタンパク質構成アミノ酸以外の特殊なアミノ酸でもペプチド分子中に取り込む事が可能であり、リボソームでは作れないユニークなアミノ酸組成を持ったペプチド分子を生合成できる点が挙げられる。非タンパク質構成アミノ酸を供給する修飾酵素類とNRPSの遺伝子は多くの場合ゲノム上で近傍に配置しており、ペプチド生合成遺伝子クラスターとして1つの転写ユニットを構成している場合が多い。アミノ酸水酸化酵素はこのような修飾酵素の1種であり、既知のペプチド生合成遺伝子セットにも数多く含まれる重要な修飾酵素である。ペプチド分子中に取り込まれた水酸化アミノ酸は、脂肪酸エステル化・糖付加・環化などさらなる修飾を受ける場合もあり、ペプチド分子の機能発揮において重要な構造形成に関わる部位となっている。ゲノムデータベースには数多くのNRPS型ペプチド生合成遺伝子セットが存在しているが、その多くは機能が未解明な状態である。NRPSモジュールの遺伝子配列情報のみからペプチド産物の構造を推定するのはほぼ不可能であることがその大きな原因である。また未知のペプチド生合成遺伝子セットの異種発現系を構築して新規ペプチド産物を得ようとしても、モジュール型巨大遺伝子であるNRPSの発現効率の問題や原材料が未知である事などが障壁となり困難であった。

2. 研究の目的

申請者はアミノ酸水酸化酵素の一種である α -ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ(DO)に関する研究を実施してきた。申請者が独自に開発したDO検索メソッドを用いる事で、ゲノムデータベース中から新規DO遺伝子を数多く発見している。これら新規DO

遺伝子の中にはゲノム上で未知のNRPS遺伝子の近傍に配置するものも多数存在しており、ある種のペプチド生合成経路の一部を形成しているものと考えられる。また申請者は既にDOの酵素活性を簡便に評価する手法も確立しているため、ハイスループットな基質スクリーニングにより各新規DOがどのようなアミノ酸水酸化酵素であるかを容易に同定することができる。

本研究では有用な機能性を保持するペプチド分子種の新規探索法の開発を実施する。ゲノムデータベース中に埋れている未知のペプチド生合成遺伝子クラスターを有効に活用し、DOを用いて作成した同位体標識水酸化アミノ酸をトレーサーとして利用した新規ペプチド生合成経路の解析手法を開発する。

3. 研究の方法

(1)新規アミノ酸水酸化酵素類の取得と解析

現在までに幾つかのアミノ酸を水酸化するDO類が報告されており、例えばプロリン・アスパラギン・アルギニンなどの水酸化酵素が挙げられる。またこれ以外にも申請者はこれまでに数種類のアミノ酸を水酸化するDO類を独自に見出している。これら既知のDO類のアミノ酸配列を解析することにより、アミノ酸水酸化酵素間で保存されているアミノ酸配列を取得できる。次いでこの保存配列を基にしたゲノムデータベース検索により相同性の高い配列群を蓄積していく。この配列群の中よりDO類に特徴的な共通配列(His-Xaa-Asp-Xaa₅₀₋₁₅₀-His-Xaa₁₀₋₂₀-Arg/Lys)が保存されている配列のみを抽出することで新規アミノ酸水酸化DO候補群とする。さらにこれら新規DO遺伝子のゲノム上における周辺配列を解析する事で、近傍にNRPS遺伝子が存在するものを選別し、以下の詳細な酵素機能解析を行っていく。

各新規DO遺伝子の遺伝子配列よりプライマーを設計し、各遺伝子を保持する微生物株のゲノムから目的のDO遺伝子断片を増幅する。この設計の際には酵素末端にヒスチジンタグなどの適当なタグ配列を付加できるようにしておく。得られた遺伝子断片を適当な発現ベクターに組み込み、大腸菌や酵母などの宿主に導入する事で目的酵素の大量発現系を構築する。アフィニティーカラム等を用いて精製した新規DO類は、アミノ酸やアミノ酸誘導体に対する水酸化活性を評価する。反応条件は一般的なDO反応例に従って補因子(α -ケトグルタル酸、 Fe^{2+} 、アスコルビン酸)存在下、中性pH、好気的条件下で行なう。DO反応の成立により必ず生じるコハク酸をマイクロプレートリーダーを用いた分光学的手法により測定する事で、活性の有無を迅速に一括して検出する事ができる。以上の過程により基質アミノ酸が解明できたDO類を以降の実験に用いていく。

(2) 同位体元素による水酸化アミノ酸の標識

前項で見出した DO 類を用いて水酸化アミノ酸を作成するが、この際に安定同位体標識法により安定同位体元素を水酸化アミノ酸分子中へ導入する。分子骨格が ^{13}C で標識されたアミノ酸は容易に入手可能であり、この ^{13}C -アミノ酸を基質にして DO 反応を行なう事で ^{13}C -水酸化アミノ酸を取得する事ができる。安定同位体標識水酸化アミノ酸はイオン交換クロマトグラフィーや薄層クロマトグラフィー等を用いて分離する事が可能であり、またニンヒドリン発色法により非常に高感度で検出する事ができる。この手法を用いる事で同位体標識した水酸化アミノ酸を反応液中より簡便に精製する事ができる。

(3) 水酸化アミノ酸をトレーサーに用いた微生物産出ペプチドのスクリーニング

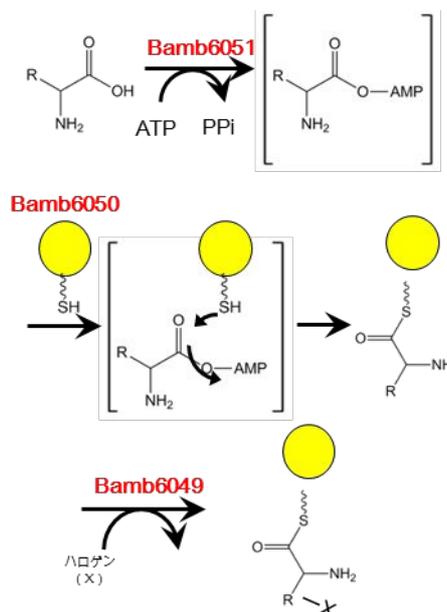
前項において水酸化アミノ酸の標識に用いた DO を含むペプチド合成遺伝子クラスターを保持する微生物株を、標識水酸化アミノ酸を添加した培地中で適切に培養する事でペプチドを十分量生産させる。標識水酸化アミノ酸をトレーサーとして利用する事で、この微生物が産出した幾つかのペプチド類の中から標的としたペプチド合成酵素群により生産されたペプチドの分子種を特定する事ができる。標識ペプチドの分離精製法を以下に示す。微生物培養液を遠心分離して培養上清と菌体に分離する。菌体は超音波破砕機やビーズミルを用いて破砕した後に遠心分離した上清を細胞破砕液とする。培養上清と細胞破砕液に含まれるペプチド類はそれぞれ限外濾過法、イオン交換樹脂、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などを用いて分離していく。各画分中の ^{13}C -ペプチドの検出には核磁気共鳴装置 (NMR) などを用いる事ができる。各精製段階におけるペプチドの精製度は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 法により確認していく。

4. 研究成果

(1) 新規アミノ酸水酸化酵素類の取得と解析

ゲノムデータベースを利用した *in silico* スクリーニングの実施により、アミノ酸の水酸化反応を触媒する新規な DO を複数取得することができた。*Burkholderia ambifaria* AMMD 株由来の SadA は *N*-スクシニル-L-ロイシンの 3 位水酸化酵素であり、本菌のゲノム中において 16 種類の遺伝子から構成される非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) 様クラスター構造の一部を形成している。本クラスターがある種のペプチド合成遺伝子群であることが示唆されたため、SadA 周辺遺伝子の機能解析を実施した。その結果 SadA (Bamb_6045) の上流にコードされている LasA (Bamb_6046) がアミノ酸のスクシニル化・脱スクシニル化活性を保持していることを明らかにした。さらに Bamb_6051 は NRPS の amino acid adenylation domain と高い相同性

を示しており、実際に L-Ala、L-Cys、L-Val、L-Ile、L-Leu に対してアデニル化活性を保持していることを示した。Bamb_6050 が peptidyl-carrier protein (PCP) であり、また Bamb_6049 がアミノ酸-PCP 複合体を基質とするハロゲナーゼであることから図 1 のような反応機構が想定される。以上の様にアミノ酸の *N*-スクシニル化、 β 位水酸化、そしてハロゲン化がこの生合成経路において一連の反応として起きていることがわかり、本ペプチドの生合成経路の一端を捉えることができた。



< 図 1 Bamb_6051、Bamb_6050、Bamb_6049 によるアミノ酸のハロゲン化機構 >

次に環状アミノ酸の水酸化反応を強く触媒する DO 類を多数見いだしており、この内 *Fusarium oxysporum* c8D 株由来の DO である Pip4H1、*Aspergillus nidulans* FGSC A4 株由来の DO である Pip4H8 に関して詳細な酵素機能解析を進めた。基質特異性解析の結果より、Pip4H1 は L-プロリン、L-ピペコリン酸に対して作用してトランス 4 位水酸化産物を生成し、さらに L-ロイシンにも作用して 4 位水酸化産物を生成する事が分かった。一方で Pip4H8 はさらに広範囲な基質と作用する事がわかり、環状アミノ酸としては L-プロリン、L-ピペコリン酸、D-プロリン、D-ピペコリン酸の水酸化反応を触媒し、また脂肪族アミノ酸としては L-ロイシン、L-バリン、L-ノルロイシン、L-ノルバリン、L-アミノ酪酸、D-バリン、D-ノルロイシン、D-ノルバリンの水酸化反応を触媒した。次に反応速度論的解析の結果から、Pip4H1 の速度パラメータは L-プロリンに対しては $K_m = 3.1 \text{ mM}$ 、 $V_{max} = 0.0090 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ であり、L-ピペコリン酸に対しては $K_m = 3.1 \text{ mM}$ 、 $V_{max} = 1.6 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ であった。一方で Pip4H1 の速度パラメータは L-プロリ

ンに対しては $K_m = 1.4 \text{ mM}$ 、 $V_{max} = 1.4 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 、D-プロリンに対しては $K_m = 3.8 \text{ mM}$ 、 $V_{max} = 1.6 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ であり、L-ピペコリン酸に対しては $K_m = 1.4 \text{ mM}$ 、 $V_{max} = 0.76 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ であった。さらに酵素特性解析の結果、Pip4H1 は pH 4 - 8 という幅広い範囲で高い安定性を示した。

(2) 同位体元素による水酸化アミノ酸の標識

DO 類を酵素触媒として利用することで、同位体標識した水酸化アミノ酸の作成を試みた。まず安定同位体 ($U\text{-}^{13}\text{C}_6$) 標識 L-ロイシンを無水コハク酸とアルカリ性で混和することで $U\text{-}^{13}\text{C}_6\text{-N}$ -スクシニル-L-ロイシンを得た。次に SadA を酵素触媒として利用した $U\text{-}^{13}\text{C}_6\text{-N}$ -スクシニル-L-ロイシンの水酸化反応により、 $U\text{-}^{13}\text{C}_6\text{-N}$ -スクシニル-L-threo-3-ヒドロキシロイシンを光学純度よく (>99% e.e.) 著量 (約 1 グラム) 取得できた。

また Pip4H1 を酵素触媒として利用した L-ピペコリン酸の水酸化反応プロセスの条件検討を実施し、既にトランス 4 位水酸化 L-ピペコリン酸を 10 g/L、99%以上の光学純度で生成することに成功している。すなわち Pip4H1 および Pip4H8 を酵素触媒として利用した水酸化反応により、同位体標識環状アミノ酸基質から様々な同位体標識水酸化環状アミノ酸の生産が可能となっている。

(3) 水酸化アミノ酸をトレーサーに用いた微生物産出ペプチドのスクリーニング

前項で合成した同位体標識水酸化アミノ酸類を微生物と反応させることで、二次代謝物の生合成経路解析を試みた。 $U\text{-}^{13}\text{C}_6\text{-N}$ -スクシニル-L-threo-3-ヒドロキシロイシンを *Burkholderia ambifaria* AMMD 株の培養液中に投入し、経時的に培養液をサンプリングした。各培養液は酢酸エチルで抽出した後に溶媒を除去し、重水に溶解して ^{13}C -NMR 解析に供した。その結果、培養時間の経過に従って新規なピークの出現が複数確認できた。この結果は水酸化アミノ酸が微生物菌体に取り込まれて代謝されている事を示しており、ペプチド生合成の原料として供給されうると強く示唆された。現在までに新規生成物の構造決定までには至っていないが、培養条件の検討や抽出法の改善などにより $U\text{-}^{13}\text{C}_6\text{-N}$ -スクシニル-L-threo-3-ヒドロキシロイシン代謝変換物の同定が可能であると考えられる。

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 10 件)

M. Hibi, T. Kasahara, T. Kawashima, H. Yajima, S. Kozono, S.V. Smirnov, T. Kodera, M. Sugiyama, S. Shimizu, K. Yokozeki, J. Ogawa. Multi-Enzymatic Synthesis of Optically Pure β -Hydroxy α -Amino Acids.

Adv. Synth. Catal., 357, 767-774 (2015).

査読有 DOI: 10.1002/adsc.201400672

M. Hibi, J. Ogawa. Characteristics and biotechnology applications of aliphatic amino acid hydroxylases belonging to the Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenase superfamily. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98, 3869-3876 (2014). 査読有 DOI: 10.1007/s00253-014-5620-z

H.M. Qin, T. Miyakawa, A. Nakamura, M. Hibi, J. Ogawa, M. Tanokura. Structural optimization of SadA, an Fe(II)- and α -ketoglutarate-dependent dioxygenase targeting biocatalytic synthesis of N-succinyl-L-threo-3,4-dimethoxyphenylserine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 450, 1458-1461 (2014). 査読有 DOI: 10.1007/s00239-014-9656-6

M. Hibi, T. Kawashima, H. Yajima, S.V. Smirnov, T. Kodera, M. Sugiyama, S. Shimizu, K. Yokozeki, J. Ogawa. Enzymatic synthesis of chiral amino acid sulfoxides by Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenase. *Tetrahedron: Asymmetry*, 24, 990-994 (2013). 査読有 DOI: 10.1271/bbb.130182

M. Hibi, T. Kawashima, P. M. Sokolov, S. V. Smirnov, T. Kodera, M. Sugiyama, S. Shimizu, K. Yokozeki, J. Ogawa. L-Leucine 5-hydroxylase of *Nostoc punctiforme* is a novel type of Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenase that is useful as a biocatalyst. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97, 2467-2472 (2013). 査読有 DOI: 10.1007/s00253-012-4136-7

H.M. Qin, T. Miyakawa, M.Z. Jia, A. Nakamura, J. Ohtsuka, Y.L. Xue, T. Kawashima, T. Kasahara, M. Hibi, J. Ogawa, M. Tanokura. Crystal structure of a novel N-substituted L-amino acid dioxygenase from *Burkholderia ambifaria* AMMD. *PLOS ONE*, 8, e63996 (2013). 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0063996

S.V. Smirnov, P.M. Sokolov, V.A. Kotlyarova, N.N. Samsonova, T. Kodera, M. Sugiyama, T. Torii, M. Hibi, S. Shimizu, K. Yokozeki, J. Ogawa. A novel L-isoleucine-4'-dioxygenase and L-isoleucine dihydroxylation cascade in *Pantoea ananatis*. *MicrobiologyOpen*, 2, 471-481 (2013). 査読有 DOI: 10.1002/mbo3.87

M. Hibi, T. Kawashima, T. Kasahara, P.M. Sokolov, S.V. Smirnov, T. Kodera, M. Sugiyama, S. Shimizu, K. Yokozeki, J. Ogawa. A novel Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenase from *Burkholderia ambifaria* has β -hydroxylating activity of N-succinyl L-leucine. *Letts. Appl.*

Microbiol., 55, 414-419 (2012). 査読有
DOI: 10.1111/j.1472-765X.2012.03308.x
H.M. Qin, T. Miyakawa, A. Nakamura, Y. L. Xue, T. Kawashima, T. Kasahara, M. Hibi, J. Ogawa, M. Tanokura. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of a novel *N*-substituted branched-chain L-amino-acid dioxygenase from *Burkholderia ambifaria* AMMD. *Acta Cryst.* F68, 1067-1069 (2012). 査読有 DOI: 10.1107/S1744309112031508
S.V. Smirnov, P.M. Sokolov, T. Kodera, M. Sugiyama, M. Hibi, S. Shimizu, K. Yokozeki, J. Ogawa. A novel family of bacterial dioxygenases that catalyse the hydroxylation of free L-amino acids. *FEMS Microbiol. Lett.*, 331, 97-104 (2012). 査読有 DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02558.x

〔学会発表〕(計18件)

福田大, 日比 慎, 森 亮輔, 三宅 良磨, 川端 潤, 高橋 里美, 小川 順. L-ピペコリン酸 4 位水酸化酵素の機能解析と *trans*-4-ヒドロキシ-L-ピペコリン酸生産プロセスの開発. 日本農芸化学会 2015 年度大会 2015 年 3 月 28 日 岡山大学 (岡山)

M. Hibi, R. Mori, R. Miyake, H. Kawabata, S. Takahashi, J. Ogawa. Cyclic amino acid hydroxylases found in filamentous fungi. *Active Enzyme Molecule 2014* 2014 年 12 月 17 日 富山国際会議場 (富山)

M. Hibi, S. Shimizu, S. Takahashi, J. Ogawa. Bioconversion of amino acids with whole-cell biocatalysts. *Enzyme Engineering XXII* 2013 年 9 月 26 日 富山国際会議場 (富山)

日比 慎, 森 亮輔, 福田大, 三宅 良磨, 川端 潤, 高橋 里美, 小川 順. 糸状菌に由来する新規環状アミノ酸水酸化酵素群の機能解析. 第 66 回日本生物工学会大会 2014 年 9 月 10 日 札幌コンベンションセンター (札幌)

日比 慎, 堀之内 伸行, 木村 隆利, 小川 順. 代謝共役型酵素合成プロセスの有用物質生産への展開. 日本農芸化学会 2014 年度大会 新資源生物変換研究会シンポジウム「電子の流れを基に、紐解く・利用する微生物代謝」 2014 年 3 月 30 日 明治大学 (川崎)

日比 慎, 富田 弥生, 矢島 紘子, 高橋 里美, 小川 順. アミノ酸水酸化反応に有用な α -ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼの補基質供給系の開発. 日本農芸化学会 2014 年度大会 2014 年 3 月 28 日 明治大学 (川崎)

森 亮輔, 日比 慎, 三宅 良磨, 川端 潤, 高橋 里美, 小川 順. 新規環状アミノ酸水酸化酵素の探索と機能解析. 日本

農芸化学会 2014 年度大会 2014 年 3 月 28 日 明治大学 (川崎)

日比 慎. 新規微生物酸化酵素群の産業利用に向けた基盤技術開発. 酵素工学研究会第 70 回講演会 2013 年 10 月 25 日 東京大学 (東京)

M. Hibi, S. Shimizu, S. Takahashi, J. Ogawa. Asymmetric monooxygenation of amino acids by Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *The 17th Japanese-German Workshop on Enzyme Technology* 2013 年 7 月 26 日 ハンブルグ (ドイツ)

M. Hibi. Microbial Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenases for valuable amino acid productions. *Biotrans 2013* 2013 年 7 月 23 日 マンチェスター (イギリス)

日比 慎. 不斉変換触媒として有用なアミノ酸酸素原子添加酵素の開発. 第 14 回酵素応用シンポジウム 2013 年 6 月 14 日 メルパルク NAGOYA (名古屋)

日比 慎, 笠原 拓也, 河嶋 隆志, 高橋 里美, 小川 順. Whole-cell biocatalyst を用いた立体選択的アミノ酸酸素添加反応の検討. 日本農芸化学会 2013 年度大会 2013 年 3 月 25 日 東北大学 (仙台)

石 玄, 宮川 拓也, 中村 顕, 候 峰, 日比 慎, 小川 順, 田之倉 優. 4-HIL 合成に有用な AMKP 還元酵素の X 線結晶構造解析. 日本農芸化学会 2013 年度大会 2013 年 3 月 25 日 東北大学 (仙台)

M. Hibi, S. Shimizu, K. Yokozeki, J. Ogawa. Microbial Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenases for valuable amino acid productions. *13th Swiss Japanese Conference on Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2012 年 11 月 4 日 ヴァルツェンハウゼン (スイス)

M. Hibi. Novel microbial enzyme systems for future industry. *Wageningen University and Research Centre/Kyoto University Joint Workshop* 2012 年 10 月 31 日 京都大学 (京都)

日比 慎, 清水 昌, 横関 健三, 小川 順. アミノ酸不斉酵素触媒としての Fe(II)/ α -ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ. 酵素工学研究会第 68 回講演会 2012 年 10 月 5 日 東京大学 (東京)

日比 慎, 笠原 拓哉, 河嶋 隆志, 横関 健三, 清水 昌, 小川 順. *Burkholderia ambifaria* AMMD 由来 *N* 置換アミノ酸 β 位水酸化酵素の機能解析. 2012 年度日本農芸化学会関西支部大会 2012 年 9 月 29 日 京都学園大学 (京都)

M. Hibi, S. Shimizu, K. Yokozeki, J. Ogawa. Novel dioxygenases for useful amino acid production. *The 12th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering* 2012 年 5 月 30 日 金沢エクセルホテル東急 (金沢)

M. Hibi, S. Shimizu, K. Yokozeki, J. Ogawa. Novel dioxygenases for useful amino acid production. *The 12th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering* 2012 年 5 月 30 日 金沢エクセルホテル東急 (金沢)

M. Hibi, S. Shimizu, K. Yokozeki, J. Ogawa. Novel dioxygenases for useful amino acid production. *The 12th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering* 2012 年 5 月 30 日 金沢エクセルホテル東急 (金沢)

M. Hibi, S. Shimizu, K. Yokozeki, J. Ogawa. Novel dioxygenases for useful amino acid production. *The 12th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering* 2012 年 5 月 30 日 金沢エクセルホテル東急 (金沢)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

日比 慎 (HIBI, Makoto)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：30432347