

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2005～2008

課題番号：17370038

研究課題名（和文）

ラジカルの高い反応性を利用する酵素とその活性化蛋白質の構造生物化学

研究課題名（英文）

Structural biochemistry of radical-utilizing enzymes and their activating proteins

研究代表者

虎谷 哲夫（TORAYA TETSUO）

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：70026318

研究成果の概要：

ラジカル酵素は、生体内においてラジカルの高い反応性を制御しつつ利用することで化学的に困難な反応を触媒する。本研究では、B12関与酵素および他のラジカル酵素の結晶構造を解析し、各種の方法論を駆使して精密触媒機構を解明した。また、B12関与ラジカル酵素の再活性化蛋白質の結晶構造を解析し、それらの精密作用機作を明らかにした。さらに、両者の共発現により、ラジカル酵素の不安定性が克服でき、有用物質生産に有効であることを示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	6,500,000	0	6,500,000
2006年度	1,700,000	0	1,700,000
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
総計	11,400,000	960,000	12,360,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：(1)ラジカル酵素、(2)B12補酵素、(3)ジオールデヒドラターゼ、(4)グリセロールデヒドラターゼ、(5)再活性化因子、(6)分子シャペロン、(7)超分子複合体、(8)立体構造

1. 研究開始当初の背景

ラジカルは高い反応性を持ち、有機化学では制御困難な化学種とされているが、ある種の蛋白質は化学的に困難な反応を触媒するのにラジカルの高い反応性を利用している。これらはラジカル酵素と呼ばれ、種々の代謝や光合成、DNA修復など重要な生体機能に関与している。酵素科学の分野でこれまでに確立されてきた酵素触媒の化学機構の概念は、基本的に極性機構で触媒する酵素のためのものであり、ラジカル酵素のように非極性機構で触媒する酵素の反応機構の理解には新しい機構概念が必要である。本申請者は、ビタミンB12補酵素関与の酵素が最も早く発見された代表的なラジカル酵素であることに着目し、その反応機構の研究を徹底的に進めることで、ラジカル酵素一般に通用する触媒原理を解明しようとしてきた。

2. 研究の目的

本研究では、研究対象をラジカル酵素一般に広げて、新規ラジカル酵素を探索し、それらの立体構造を解析するとともに、生化学、分子生物学、有機化学、生物物理学等の強力な方法論を駆使して、化学の言葉による精密反応機構の解明を目指す。これにより、本申請者が提唱している酵素的ラジカル触媒という概念を検証し、教科書的な触媒原理として定着するよう一般化をはかる。さらに、これらのラジカル酵素に専属の活性化蛋白質が備わっているかどうかを検索し、もしあれば、それらの立体構造を解析し、活性化の精密な分子機構を解明する。すでに発見したB12酵素の再活性化因子については、酵素の再活性化に関わる新しい型の分子シャペロンなので、分子シャペロンの概念の拡張をはかる。これらの研究により、酵素・蛋白質が反

応性の高いラジカルを生成し、制御しつつ触媒に利用し、副反応により消滅したときはこれを再生する仕組みを立体構造に基づいて明らかにする。本研究では、ラジカル酵素が一般に酸素に不安定で不活性化され易いため、ラジカル酵素の前駆体および活性化蛋白質の両者をそれぞれ安定な蛋白質として発現・精製した後、ラジカル酵素を活性型に変換して研究するという独創的な戦略をとる。この新しい切り口からの研究により、生物の未知の反応機能を開発し、ラジカル酵素の物質生産等への応用にも途を拓きたい。

3. 研究の方法

(1) ラジカル酵素とその活性化蛋白質の探索と遺伝子解析および高発現

ラジカル酵素を演繹的手法により探索する。具体的には、これまでに知られているラジカル酵素の触媒する反応および有機化学におけるラジカルの反応とメタボリックマップとを参考にして、ラジカル反応によらなければ資化し得ないと想定される化合物を考察する。これを炭素源あるいは窒素源として生育する微生物は、これを分解するラジカル酵素をもつ可能性が高いと考えて自然界から単離し、その化合物の代謝経路を解明することにより、新規ラジカル酵素を発見するという新しい戦略をとる。この戦略により、一部の新規酵素はすでに発見済みである。新規ラジカル酵素をゲノム情報を利用して探索する方法もとる。活性な状態のラジカル酵素は一般に、ピラジカルである酸素分子と反応して酵素活性を失い易い。一方、ラジカル酵素はそれぞれに固有の活性化蛋白質因子をもつことが、我々のB12酵素に関する研究成果および文献調査の結果から強く示唆される。これまでの経験や文献調査の結果から考えると、ラジカル酵素の遺伝子は活性化蛋白質の遺伝子と近接して存在していることが多いため、両遺伝子を含むDNA断片を一举にゲノムDNAライブラリーからクローニングし、解析するという方法をとる。その後、ラジカル酵素を不活性な前駆体酵素として高発現させ、大量精製することで、不安定性の問題を解決する。

(2) ラジカル酵素の結晶化とX線構造解析および精密反応機構の解明

不活性な前駆体として精製した新規ラジカル酵素の結晶化条件を検討する。この際、反応機構に関する情報を得るため、基質や補酵素等が結合したリガンド結合型や変異型酵素の結晶化と構造解析を重視する。

ラジカル酵素は酸素分子に不安定なものが多いが、B12補酵素関与ラジカル酵素は不活性な補酵素アナログとの複合体として、新規ラジカル酵素であるピルビン酸ギ酸リアーゼ関連酵素PflDは触媒活性のない前駆体酵素としてそれぞれ結晶化し、X線構造解析によりそれらの立体構造を解明する。

得られる立体構造に基づき、化学の知識を総動員して精密反応機構を推定する。ラジカルに関して最も重要な情報を与える電子スピン共鳴(ESR)やその他の分光学的測定およびストップフロー法のような生物物理学的測定法、さらには部位特異的変異の導入により、活性部位残基の推定機能の妥当性を確かめる。これまでのB12酵素の研究結果と、

本研究で得られる成果とを総合して、ラジカル酵素に共通する一般的な触媒原理を確立する。

(3) (再)活性化蛋白質の結晶化とX線構造解析および精密作用機構の解明

活性化蛋白質の遺伝子を高発現させ、組み換え体蛋白質を簡便かつ大量に精製する方法を確立する。また、活性化蛋白質の結晶化条件を検討する。活性化蛋白質の作用機構に関する情報を得るため、リガンド結合型やラジカル酵素との複合体のX線構造解析による立体構造解析を試みる。活性化蛋白質の安定性は予測できないが、B12酵素の分子シャペロン様再活性化因子の場合は十分に安定である。ATP結合型とADP結合型の構造解析ができれば、再活性化機構の解明に極めて重要な知見となる。ATPはこの蛋白質により加水分解されてしまうので、加水分解抵抗性のATPアナログを用いる。

活性化蛋白質は直接的または間接的にラジカルを酵素蛋白質に導入する蛋白質であると考えられる。ラジカル酵素の活性化の本質を生化学および生物物理学的測定法により解明する。また、それらの立体構造とラジカル酵素の立体構造とに基づき、活性化の精密分子機構を推定する。さらに、活性化蛋白質およびラジカル酵素の双方に部位特異的変異を導入することにより、推定した活性化蛋白質の作用機構の妥当性を検証する。精製した活性化蛋白質と精製したラジカル酵素前駆体との反応により、酵素を活性化して活性を測定する。

(4) ラジカル酵素および活性化蛋白質の有用物質生産への応用

ラジカル酵素および活性化蛋白質の共発現により、ラジカル酵素の不安定性を克服できる系を確立し、ラジカル酵素系を実際に物質生産等に応用するための基礎研究を行う。当研究室で最も研究が進んでいるB12補酵素関与ジオールデヒドラターゼ、グリセロールデヒドラターゼについては、不活性化されたホロ酵素の再活性化に関わる分子シャペロン様再活性化因子を共発現することにより、すでに不安定性を克服できているので、トリメチレングリコールの酵素法による工業的生産のための基礎的検討を行う。この物質は、ナイロンとテトロンを長所を合わせもつ“夢の繊維”として期待されているポリトリメチレンテレフタレートモノマー原料の1つである。

4. 研究成果

研究の主な成果は以下の通りである。

(1) 立体構造解析に基づく活性部位の精密機能解析

① ジオールデヒドラターゼの活性部位残基の機能解析

ジオールデヒドラターゼの活性部位アミノ酸残基を1つずつAlaに置換し、触媒機能に対する影響を調べた。その結果、Glu170、Asp335、His143が触媒機能に必須の残基であることが分かった。これらの残基は基質や中間体の結合に関与し、また、Glu170はC1上の水酸基のプロトンを受容することにより、C2からC1への水酸基転移における遷移状態

を安定化することが示唆された。

② AdoCbl 関与ジオールデヒドラターゼの His143 残基の機能解析

本酵素の His143 残基は活性部位に存在し、基質の 2 位水酸基と水素結合して存在する。この残基を他のアミノ酸残基に置換して、変異型酵素の触媒機能を調べた結果、His143 は触媒機能に必須であるばかりでなく、ラジカル中間体の副反応防止にも重要であることが分かった。基質の 2 位水酸基が His143 と水素結合することで、C2 から C1 への水酸基転移における遷移状態が安定化されること、重水素同位体効果の測定により初めて実験的に示された。

③ B12 補酵素結合部位におけるアデニンアンカーとイオン対の役割

ジオールデヒドラターゼ-アデニルペンチル B12 複合体の立体構造から、B12 補酵素は活性部位においてアデニン N3 と Ser224 の水酸基が水素結合し、リン酸基が Lys135 のプロトン化したアミノ基とイオン対を形成して結合していることが示された。酵素のこれらの残基を他のアミノ酸残基に置換して、変異型酵素の触媒機能を調べた結果、Ser224 は Co-C 結合の開裂と不活性化の防止に、Lys135 の正電荷は補酵素の結合に重要であることが明らかになった。

(2) 酵素の溶解性など物性の改変

① ハイブリッドデヒドラターゼの構築と酵素化学的性質

ジオールデヒドラターゼおよび類似酵素であるグリセロールデヒドラターゼは共に ($\alpha\beta\gamma$)2 の分子構造をとる。そこで、これらを種々の組み合わせで含むハイブリッド酵素を作成した結果、基質特異性や 1 価陽イオン特異性などの性質は α サブユニットにより決定されることが分かった。

② B12 補酵素関与グリセロールデヒドラターゼの低溶解性化

ジオールデヒドラターゼとグリセロールデヒドラターゼは等機能で立体構造も類似しているが、前者は溶解度が低く、後者は高い。前者の β サブユニットにのみ存在する N 末端領域約 34 残基と低ホモロジー領域合わせて 60 残基、および前者の γ サブユニットにのみ存在する N 末端領域約 33 残基とを後者の β および γ サブユニットの N 末端に融合すると、低溶解性のグリセロールデヒドラターゼが得られた。蛋白質の低溶解性化の一般的な戦略として使える可能性がある。

(3) 補酵素や基質のアナログを用いた反応機構の研究

① ホモアデノシルコバラミンを用いた B12 酵素の活性部位の検索

ジオールデヒドラターゼ、エタノールアミンアンモニアリアーゼにおいて、B12 補酵素のコバルトとリボース部 C5' との間にメチレン鎖を 1 個挿入したホモログは 1% 以下の補酵素活性を示したが、極めて高い頻度で自殺不活性化を引き起こした。メチレン鎖を 2 個挿入したものは両酵素に対して補酵素活性を示さず、コバルト-炭素結合の開裂も認められなかった。これらは酵素によりコバルト-炭素結合の開裂を受けるための距離を知る上でプローブとして有用である。

② ジョールデヒドラターゼの基質アナログによる機構依存的な不活性化

ジオールデヒドラターゼが 3-不飽和-1,2-ジオールやチオグリセロールにより機構依存的に不活性化されることを見出した。前者の場合は、生成物ラジカルが 5' -デオキシアデノシンから水素原子を引き抜き返せないため、後者の場合は、生成物ラジカルから脱離反応が起こるため不活性化されることが示唆された。

(4) ラジカル酵素反応の理論化学的研究

① B12 関与炭素骨格組み換え反応における cob(II)alamin の役割の研究

密度汎関数法による理論計算で、①協奏的 Co-C 結合ホモリシスにおける遷移状態の構造、および②cob(II)alamin の存在による水素引き抜きの遷移状態の安定化の可能性を検証した。その結果、Co-C 結合の開裂と水素引き抜きが協奏的に起こる場合、cob(II)alamin は遷移状態のエネルギー障壁を 7 kcal/mol 低下させ、単なる傍観者ではなくコンダクターとして働くことが示唆された。

② ジョールデヒドラターゼの計算化学的変異によるアミノ酸残基の機能解析

理論化学計算の特長を生かして、計算化学的変異という新しい試みにより、活性部位アミノ酸残基の機能解析と変異型酵素の活性予測を非経験的に行った。その結果、密度汎関数法による理論計算からの予測値と遺伝子工学実験による実測値とがかなりよく一致したことより、本解析法が将来的には判定量的に行える可能性が示された。これらの事実を踏まえて、酵素科学と理論化学の連携により酵素研究に新しいパラダイムが生まれることを提唱した。

③ 活性部位金属イオンの妥当性の計算化学的再評価

ジオールデヒドラターゼの結晶構造解析によれば、活性部位では基質の水酸基がカリウムイオンに配位しているとされている。QM/MM 法による理論計算で最適化された金属-リガンド距離の値が、むしろカルシウム-リガンド距離に近いことから、基質が配位している金属イオンはカルシウムであることが示唆された。

(5) 再活性化因子の研究

① ジョールデヒドラターゼ再活性化因子の結晶化と予備的 X 線解析

ジオールデヒドラターゼの分子シャペロン様再活性化因子を大腸菌で高発現させ、精製後 ADP 存在下と非存在下で結晶化した。結晶はよい回折像を与え、空間群と格子定数とを決定できた。

② ジョールデヒドラターゼ再活性化因子の立体構造と精密作用機構の解析

ジオールデヒドラターゼは生理的な基質の 1 つであるグリセロールによって機構依存的に不活性化を受ける。この不活性化は、副反応のためにラジカル中間体が消滅する結果、補酵素の Co-C 結合が不可逆的に開裂し、損傷を受けたコファクターが酵素から離れないために起こる。我々は先にジオールデヒドラターゼ再活性化因子を発見し、それが ATP 依存的に損傷コファクターを酵素から解離させることにより酵素を再活性化することを示した。本研究では、この因子の結晶構造を多波長異常分散法によって初めて解明し、その構造に基づいて、損傷コファクターを酵

素から解離させる精密分子機構を明らかにした。

③ 再活性化因子の特異性の分子的基礎の解明

ジオールデヒドラターゼと類似酵素のグリセロールデヒドラターゼおよび両酵素の再活性化因子の精製蛋白質を用いて調べたところ、ジオールデヒドラターゼ再活性化因子はグリセロールデヒドラターゼを再活性化できるが、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子はジオールデヒドラターゼを再活性化できないという再活性化因子の特異性は、酵素との複合体形成能によって決定されていることが強く示唆された。これは立体構造に基づく両者の接触面積の計算結果からも支持された。よって、再活性化には安定な酵素-再活性化因子複合体の形成が不可欠であると結論できた。

④ メチオニンシンターゼレダクターゼの分子シャペロン様作用

B12 メチオニンシンターゼは、酵素反応中に超活性種である cob(I)alamin を生成するため酸化失活を受け易いが、メチオニンシンターゼレダクターゼによって還元的に再活性化される。この再活性化蛋白質は不安定なアポ酵素を安定化し、分子シャペロン様の作用を示した。

⑤ 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

本研究により、立体構造を踏まえた B12 関与ラジカル酵素の精密触媒機構が明らかとなった。我々はこの結論を他のラジカル酵素にも拡張して、ラジカル触媒 (radical catalysis) と呼ぶ新しい触媒原理を提唱している。今後はさらに多くのラジカル酵素についてこの触媒原理が一般化できるかどうかを検証していく必要がある。また、全原子モデルを用いた理論計算や計算化学的変異導入が、それぞれ反応機構の研究や活性部位アミノ酸残基の機能解析において新しくかつ強力な方法論を提供することが示された。理論化学との連携は、今後の酵素研究において重要な潮流の 1 つになると考えられる。さらに、不安定なラジカル酵素は専属の (再) 活性化蛋白質と共発現させて用いることにより不安定性を克服でき、有用物質の生産に応用できる可能性が示された。ラジカル酵素は、今後は酵素本体だけではなく (再) 活性化蛋白質や補酵素再生系も含めたシステムとして研究され、物質生産への応用が推進されることが期待される。

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 15 件)

① Kamachi T, Takahata M, Toraya T, Yoshizawa K, What is the Identity of the Metal Ions in the Active Sites of Coenzyme B(12)-Dependent Diol Dehydratase? A Computational Mutation Analysis, *Journal of Physical Chemistry B*, 査読有, 印刷中, 2009.

② Ogura K, Kunita S, Mori K, Tobimatsu T, Toraya T, Roles of adenine anchoring and ion pairing at the coenzyme B12-binding site in diol dehydratase catalysis, *FEBS Journal*, 査読有, 275(24), 2008, 6204-6216

③ Toraya T, Tamura N, Watanabe T, Yamanishi M, Hieda N, Mori K, Mechanism-based inactivation of coenzyme B12-dependent diol dehydratase by 3-unsaturated 1,2-diols and thioglycerol, *Journal of Biochemistry*, 査読有, 144(4), 2008, 437-446

④ Matsumoto M, Toraya T, cDNA cloning, expression, and characterization of methyl-CpG-binding domain type 2/3 proteins from starfish and sea urchin, *Gene*, 査読有, 420(2), 2008, 125-134

⑤ 虎谷哲夫、蒲池高志、吉澤一成、酵素科学と理論化学との連携 -酵素研究の新しいパラダイムを求めて-, *生化学*, 査読有, 80(2), 2008, 132-138

⑥ Kinoshita K, Kawata M, Ogura K, Yamasaki A, Watanabe T, Komoto N, Hieda N, Yamanishi M, Tobimatsu T, Toraya T, Histidine-al43 Assists 1,2-Hydroxyl Group Migration and Protects Radical Intermediates in Coenzyme B12-Dependent Diol Dehydratase, *Biochemistry*, 査読有, 47(10), 2008, 3162-3173

⑦ Kajiura H, Mori K, Shibata N, Toraya T, Molecular basis for specificities of reactivating factors for adenosylcobalamin-dependent diol and glycerol dehydratases, *FEBS Journal*, 査読有, 274(21), 2007, 5556-5566

⑧ Kamachi T, Toraya T, Yoshizawa K, Computational mutation analysis of hydrogen abstraction and radical rearrangement steps in the catalysis of coenzyme B12-dependent diol dehydratase, *Chemistry*, 査読有, 13(28), 2007, 7864-7873

⑨ Sakai T, Yamasaki A, Toyofuku S, Nishiki T, Yunoki M, Komoto N, Tobimatsu T, Toraya T, Construction and Characterization of Hybrid Dehydratases between Adenosylcobalamin-dependent Diol and Glycerol Dehydratases, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 53(2), 査読有, 2007, 102-108

⑩ Yamada K, Kawata T, Wada M, Mori K, Tamai H, Tanaka N, Tadokoro T, Tobimatsu T, Toraya T, Maekawa A., Human methionine synthase reductase is a molecular chaperone for human methionine synthase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 査読有, 103(25), 2006, 9476-9481

⑪ Kozlowski PM, Kamachi T, Toraya T, Yoshizawa K, Does cob(II)alamin act as a conductor in coenzyme B(12) dependent mutases?, *Angewante Chemie International Edition*, 査読有, 46(6), 2006, 980-983

⑫ Kawata M, Kinoshita K, Takahashi S, Ogura K, Komoto N, Yamanishi M, Tobimatsu T, Toraya T, Survey of catalytic residues and essential roles of glutamate-al70 and aspartate-a335 in coenzyme B12-dependent diol dehydratase, *Journal of Biological Chemistry*, 査読有, 281(27), 2006, 18327-18334

⑬ Mori K, Hieda N, Yamanishi M, Shibata N, Toraya T, Crystallization and preliminary X-ray analysis of molecular

chaperone-like diol dehydratase-reactivating factor in ADP-bound and nucleotide-free forms, Acta Crystallographica, 査読有, F61(6), 2005, .603-605

⑭ Shibata N, Mori K, Hieda N, Higuchi Y, Yamanishi M, Toraya T, Release of a damaged cofactor from a coenzyme B12-dependent enzyme: X-ray structures of diol dehydratase-reactivating factor, Structure, 査読有, 13(12), 2005, 1745-1754

⑮ Fukuoka M, Nakanishi Y, Hannak RB, Kräutler B, Toraya T, Homoadenosylcobalamins as probes for exploring the active sites of coenzyme B12-dependent diol dehydratase and ethanolamine ammonia-lyase, FEBS Journal, 査読有, 272(18), 2005 4787-4796

〔学会発表〕(計40件)

(1) 虎谷哲夫, B12 補酵素関与エタノールアミンアンモニアリアーゼの性質と蛋白質工学的改変および結晶構造解析, 第415回ビタミンB研究協議会, 2009.2.13, 東京都千代田区

(2) 虎谷哲夫, はたらくB群ビタミンと健康, 平成20年度「ビタミンの日」講演会, 2008.12.13, 岡山県岡山市

(3) 江本竜哉, 大腸菌ピルビン酸ギ酸リアーゼ関連蛋白質 Pf1D の遺伝子クローニングと高発現および立体構造解析, 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会合同大会, 2008.12.9, 兵庫県神戸市

(4) 虎谷哲夫, B12 酵素研究における理論化学との連携(その3) 計算化学的変異による活性部位残基の機能解析, 第414回ビタミンB研究協議会, 2008.11.15 京都府京都市

(5) 虎谷哲夫, ビタミンB12 関与ラジカル酵素の構造と機能, 九州大学先導物質化学研究所講演会, 2008.11.6, 福岡県福岡市

(6) 森光一, ジオールデヒドラターゼによる3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド生成に対するジオールデヒドラターゼ再活性化因子の効果, 第60回日本生物工学会大会, 2008.8.28, 宮城県仙台市

(7) T. Toraya, Preparations, properties, and active-site structure of *Escherichia coli* ethanolamine ammonia-lyase, 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference, 2008.6.30, Greece (Athens)

(8) 小倉謙一, B12 補酵素再生系の構築とジオールデヒドラターゼ系への組み込みの効果, 日本ビタミン学会第60回大会, 2008.6.14, 宮城県仙台市

(9) 森光一, ビタミンB12 補酵素関与酵素の再活性化蛋白質に関する研究, 日本ビタミン学会第60回大会 平成20年度日本ビタミン学会奨励賞受賞講演, 2008.6.13, 宮城県仙台市

(10) 柴田直樹, エタノールアミンアンモニアリアーゼのX線結晶構造解析, 第8回日本蛋白質科学会年会, 2008.6.10, 東京都江戸川区

(11) 虎谷哲夫, B12 酵素研究における理論化学との連携: 全酵素モデルを用いたQM/MM計算による精密反応機構研究, 第411回ビタミンB研究協議会, 2008.2.19, 大阪府豊中市

(12) 西木恒雄, 低溶解性グリセロールデヒドラターゼの創製と機能解析, 第30回日本

分子生物学会年会・第80回日本生化学会合同大会, 2007.12.13, 神奈川県横浜市

(13) 吉澤一成, 量子化学計算によるB12依存ジオールデヒドラターゼのミュートーション解析, 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会合同大会, 2007.12.11, 神奈川県横浜市

(14) 稗田直樹, β サブユニットのN末端領域を欠失したエタノールアミンアンモニアリアーゼの調製と性質, 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会合同大会, 2007.12.11, 神奈川県横浜市

(15) 森光一, B12 補酵素関与ジオールおよびグリセロールデヒドラターゼに対する再活性化因子の特異性の分子基盤, 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会合同大会, 2007.12.11, 神奈川県横浜市

(16) 西木恒雄, ジオールデヒドラターゼの溶解性決定部位の同定と低溶解性グリセロールデヒドラターゼの創製, 2007年度酵素・補酵素研究会, 2007.11.9, 岡山県倉敷市

(17) Toraya T, Mechanism-based inactivation of coenzyme B12-dependent diol dehydratase by 3-unsaturated 1,2-diols and thioglycerol, Gordon Research Conference on Vitamin B12 and Corphins, 2007.7.4, USA (Biddeford)

(18) 虎谷哲夫, 不飽和1,2-ジオール類によるジオールデヒドラターゼの自殺不活性化とその機構, 日本ビタミン学会第59回大会, 2007.5.25, 長崎県佐世保市

(19) 森光一, ATPの遷移状態アナログを用いたジオールデヒドラターゼ再活性化因子の作用機作の解析, 日本ビタミン学会第59回大会, 2007.5.25, 長崎県佐世保市

(20) 森光一, B12 補酵素関与ジオールデヒドラターゼの再活性化機構: 酵素-再活性化因子複合体の生成と役割, 特定領域研究「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」第3回公開シンポジウム, 2006.12.12, 茨城県つくば市

(21) 虎谷哲夫, B12 補酵素関与ジオールデヒドラターゼ反応におけるラジカル転移の機構と活性部位残基の役割, ビタミンB研究委員会第406回研究協議会, 2006.11.25, 京都市左京区

(22) 森光一, B12 補酵素関与ジオールデヒドラターゼの再活性化機構: 酵素-再活性化因子複合体の生成と役割, 平成18年度酵素・補酵素を楽しむ会, 2006.10.7, 大分県別府市

(23) 虎谷哲夫, B12 補酵素関与ジオールデヒドラターゼの精密触媒機構: ラジカル転移における活性部位残基の役割, 平成18年度酵素・補酵素を楽しむ会, 2006.10.7 大分県別府市

(24) 虎谷哲夫, B12 酵素の分子シャペロン様再活性化因子 特定領域研究「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」第2回ワークショップ, 2006.8.9 神奈川県三浦郡葉山町

(25) Y. Hosokawa, Roles of E β 97 of coenzyme B12-dependent diol dehydratase and E β 31, T α 105, D α 166, and D α 183 in the Mg²⁺-bindingsite of diol dehydratase-reactivating factor for reactivation of inactivated holoenzyme, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and

11th FAOBMB Congress、2006. 6. 19、Kyoto, Japan

(26) T. Toraya, Radical catalysis and reactivation of B12-dependent diol and glycerol dehydratases, Radicals in enzymatic catalysis, 2006. 3, Margurg, Germany

(27) 虎谷哲夫, ビタミン B12 酵素および関連金属イオンの生化学ビタミン B 研究委員会平成 17 年度シンポジウム、2006. 2. 10、大阪市阿倍野区旭町

(28) T. Toraya, Molecular chaperone-like reactivating factors for coenzyme B12 dependent enzymes, Pacificchem 2005, Activating and Reactivating Proteins for B12 and Radical Enzymes, 2005. 12. 19, USA (Honolulu)

(29) 虎谷哲夫, B12 補酵素関与ジオールデヒドラターゼの再活性化因子: 結晶構造と精密作用機作, 第 402 回ビタミン B 研究委員会、2005. 11. 26、京都市左京区

(30) T. Toraya, X-ray structure and action mechanism of molecular chaperone-like reactivating factor for coenzyme B12-dependent diol dehydratase International Interdisciplinary Conference on Vitamins, Coenzymes, and Biofactors 2005, 2005. 11. 11, Japan (Awaji)

(31) T. Tobimatsu, Protein engineering of adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase for less susceptibility to glycerol, International

Interdisciplinary Conference on Vitamins, Coenzymes, and Biofactors 2005, 2005. 11. 11, Japan (Awaji)

(32) K. Mori, Mechanism of action of reactivating factor for adenosylcobalamin dependent diol dehydratase: Evidence for displacement of DdrB by diol dehydratase and catalytic turnovers, International Interdisciplinary Conference on Vitamins, Coenzymes, and Biofactors 2005, 2005. 11. 10, Japan (Awaji)

(33) N. Hieda, Purification and properties of the reactivating factor for coenzyme B12-dependent ethanolamine ammonia-lyase, International Interdisciplinary Conference on Vitamins, Coenzymes, and Biofactors 2005, 2005. 11. 8, Japan (Awaji)

(34) K. Obayashi, Roles of D α 8, D α 413, G α 556, and G α 557 in the ATPase domain of the reactivating factor for coenzyme B12-dependent diol dehydratase, 第 78 回日本生化学会大会、2005. 10. 20、神戸市中央区港島中町

(35) N. Shibata, How a damaged dc of actor is released from a coenzyme B12 dependent enzyme: Crystal structures of diol dehydratase-reactivating factor, 第 78 回日本生化学会大会、2005. 10. 20、神戸市中央区港島中町

(36) K. Mori, Characterization of the complexes between coenzyme B12-dependent diol dehydratase and its reactivating factor, 第 78 回日本生化学会大会、2005. 10. 20

(37) N. Hieda, Characterization and action of a reactivating factor for

adenosylcobalamin-dependent ethanolamine ammonia-lyase, 第 78 回日本生化学会大会、2005. 10. 20、神戸市中央区港島中町

(38) T. Toraya, Radical B12 enzymes (eliminating) and their reactivating factors, Gordon Research Conference on Vitamin B12 & Corphins, 2005. 9. 18, UK (Oxford)

(39) T. Toraya, Crystallization and structure analysis of molecular chaperone-like reactivating factor for coenzyme B12 dependent diol dehydratase, 30th FEBS Congress-9th IUBMB Conference, 2005. 7. 3, Hungary (Budapest)

(40) 木下宏一郎, B12 補酵素関与ジオールデヒドラターゼ反応における His α 143 残基の役割, 第 57 回日本ビタミン学会大会、2005. 5. 27 三重県志摩市

[図書] (計 2 件)

① 虎谷哲夫, 朝倉書店、酵素ハンドブック、2008、1-996 (共著者多数のため、本人担当分の抽出不能)

② 虎谷哲夫, 化学同人、タンパク質科学、2005、431-445

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

①名称: 親水性ジオールデヒドラターゼ及び疎水性グリセロールデヒドラターゼを製造する方法

発明者: 向山正治・虎谷哲夫・飛松孝正・川田真裕・安田信三・堀川洋

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: 特許出願 2006-78916

出願年月日: 2006年3月22日

国内外の別: 国内

②名称: グリセリンから 3-ヒドロキシプロピオン酸を製造する方法

発明者: 向山正治・虎谷哲夫

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: 特許出願 2005-276016

出願年月日: 2005年9月22日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ

<http://www.okayama-u.ac.jp/labs/toraya/TOP.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

虎谷 哲夫 (TORAYA TETSUO)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号: 70026318

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 (平成 18, 19 年度は分担者)

飛松 孝正 (TOBIMATSU TAKAMASA)

岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授
研究者番号: 30188768

森 光一 (MORI KOICHI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教
研究者番号: 50379015