

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06616

研究課題名(和文)合理的デザインによる芳香族有機酸反応性酵素の創成と有機溶剤健康診断への応用

研究課題名(英文)Creation of aromatic organic acid-reactive enzymes by rational design and their application to health examination for organic solvents

研究代表者

西矢 芳昭(Nishiya, Yoshiaki)

摂南大学・理工学部・教授

研究者番号：70612307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：健康被害予防のため、トルエンやキシレン、スチレンの尿中代謝産物である芳香族有機酸のハイスループット分析方法を開発した。まず、トルエン・キシレンの代謝産物である馬尿酸・メチル馬尿酸総量の新規酵素的測定法を考案した。使用酵素は構造情報に基づき反応機構を推定し、比活性が向上し、低温適正化あるいは基質阻害消失が達成された変異体を開発した。スチレン暴露の指標となるマンデル酸についても、新規測定法を考案した。乳酸オキシダーゼの立体構造に基づき、多重変異を合理的にデザインした。作成した変異体のL-マンデル酸に対する反応性は野生型に比べて約200倍向上し、マンデル酸オキシダーゼの開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有機溶剤取扱作業従事者は、健康被害予防のため特殊健康診断の受診が義務付けられている。現在の分析、診断手法は、操作が煩雑、スループットが低いなど課題が多い。本研究の成果は、これらの課題を解決する。既に馬尿酸・メチル馬尿酸測定の研究成果は検査企業に移管終了し、分析試薬が実用化の目処を得ている。マンデル酸測定の研究成果も企業移管中で、分析試薬開発が進められている。臨床検査などで普及している酵素的測定法は、既存酵素の組み合わせで測定系を構築している。本研究ではこのアプローチを逆転し、理想的な酵素的測定法を考案後、必要な新規酵素を合理的に開発した。今後、新たな開発手法となることを期待する。

研究成果の概要(英文)：To prevent health hazards, we developed high-throughput assay methods for urinary metabolites of toluene, xylene, and styrene, which are aromatic organic acids. First, we devised a new enzymatic assay to measure the total amount of hippurate and methyl hippurates, which are metabolites of toluene and xylene. The reaction mechanisms of the enzymes used were deduced based on structural informations, and mutants with improved specific activity and achieved low temperature optimization or disappearance of substrate inhibition were successfully developed. A new assay method for mandelate, an indicator of styrene exposure, was also devised. The enzyme used was rationally designed based on the tertiary structure of lactate oxidase to have multiple mutations. The reactivity of the prepared mutant to L-mandelate was improved about 200-fold compared with that of the wild type, and the development of mandelate oxidase was successfully achieved.

研究分野：酵素利用分析およびタンパク質工学関連

キーワード：トルエン キシレン スチレン 酵素的測定法 基質特異性 健康診断 ハイスループット タンパク質工学

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。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

有機溶剤として汎用されるトルエンは揮発性を有するため、主に吸入によって体内に取り込まれる。その後、シトクロム P450 やアルコールデヒドロゲナーゼの作用を受けて安息香酸となり、さらにグリシン抱合を受け馬尿酸として尿中に排出される。また、キシレンはトルエンにメチル基が1つ付加した化合物であり、トルエンと同様の代謝経路を辿る。キシレンには *o* 体、*m* 体、*p* 体が存在するため、代謝産物にも *o*-メチル馬尿酸、*m*-メチル馬尿酸、*p*-メチル馬尿酸がある。スチレンも同様に代謝され、マンデル酸やフェニルグリオキシル酸となる。

トルエンやキシレン、スチレンは塗装業などで大量に取り扱われている。これらの体内への蓄積は、疲労感やめまい、腎機能障害、肝機能障害、造血障害、神経障害など様々な生体機能障害を引き起こす。このような健康被害を予防するため、有機溶剤取扱い作業に従事する労働者には特殊健康診断の受診が義務付けられている。健康診断ではトルエン、キシレン、スチレンの尿中代謝産物である芳香族有機酸：馬尿酸、メチル馬尿酸、マンデル酸を測定する。受診者は平成30年度に約70万人、さらに受信者数が近年増加傾向で、それに伴い有所見者数も増加傾向にある。また、特殊健康診断は会社単位、事業所単位で受診するため測定が集中する。現在、高速液体クロマトグラフィーを用いて分析、評価・診断を行っているが、操作が煩雑・スループットが低い・高額という欠点が挙げられる。簡便かつ多検体迅速測定が可能な酵素的測定法による分析・評価系が開発できれば、上記の課題を解決できると思われる。

2. 研究の目的

上記状況の下、本研究は酵素を利用した尿中芳香族有機酸のハイスループット分析方法の開発を最終目的とした。使用酵素は、新規な芳香族有機酸反応性酵素をプロテイン・エンジニアリング (PE) により創成することとした。臨床検査や食品分析などで普及している酵素的測定法は、既存酵素を組み合わせることにより、巧みに測定系を構築している。本研究ではこのアプローチを逆転し、まず理想的な酵素的測定法を考案後、必要な新規酵素の創成を試みた。これにより、新たな PE の活用分野の創出も期待した。

3. 研究の方法

われわれは既に、臨床検査用・食品分析用酵素や酵素的測定法の開発、酵素センサを用いた測定システムなどの研究を実施している。また、計算科学的研究を行う十分なソフトウェア環境があり、PE による変異酵素の作成や酵素特性の評価についても研究設備と方法が確立している。これまでの知識・経験に基づき、有機溶剤健診の測定対象化合物である3種の芳香族有機酸に対する簡便な(使用酵素3種類以内)酵素的測定法を考案した。そして、測定に必要な主反応酵素および追随酵素の課題を、PE により解決した。

主反応酵素を新規創成するに当たり、ベース酵素の設定、芳香族有機酸反応性(従来基質非反応性)変異酵素の設計を行った。具体的には、ドッキング・スタディおよび反応シミュレーションにより、本来の基質に替えて芳香族有機酸を用いた場合の活性中心アミノ酸残基を種々変化させ、モデル上で高選択性と反応性を具備した新たな変異酵素を設計した。

設計上の各種変異酵素を実際作成し、それらの特性評価によりデザイン方法の検証を行った。さらに、変異酵素評価結果のフィードバックに基づく変異デザインのブラッシュアップを実施した。これら研究成果に基づき、検査企業と共同で診断用試薬の開発と応用を進めている。

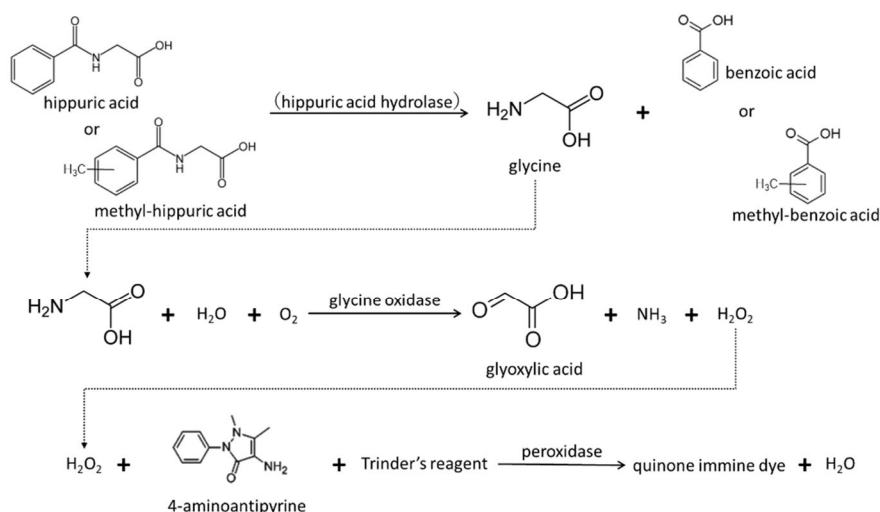


図1 馬尿酸・メチル馬尿酸総量酵素的測定法の原理

4. 研究成果

(1)馬尿酸・メチル馬尿酸総量の新規酵素的測定法

われわれは、馬尿酸とメチル馬尿酸の総量を酵素的に測定する簡便な方法を考案した。この方法はまず、馬尿酸またはメチル馬尿酸を馬尿酸加水分解酵素 (Hhase, EC3.5.1.32) でグリシンと安息香酸またはメチル安息香酸に分解する。次に、分解産物であるグリシンにグリシンオキシダーゼ (Gox, EC1.4.3.19) を追従させ、生じる過酸化水素を 4-アミノアンチピリンとトリンダー試薬、ペルオキシダーゼ (EC1.11.1.7) でキノン系色素として発色させる (図 1)。このキノン系色素の発色を吸光度測定することで、馬尿酸やメチル馬尿酸の定量を行うことができる (特許出願済)。

この測定法には、馬尿酸や各種メチル馬尿酸に対して酵素法測定温度 (すなわち自動分析装置の分析温度) である 37 °C にて反応性の高い Hhase が必要である。本研究を始める前には、そのような酵素は知られておらず、酵素法の開発および実用化を進めるための課題であった。既に *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Paenibacillus macerans* など数十種の生物が Hhase を保有し、フェニルアラニン代謝に関わっていることが知られていた。*C.jejuni* 由来馬尿酸加水分解酵素については、触媒残基が推定されていた。しかし、酵素特性はあまり報告がなく、立体構造や反応機構なども不明であった。

本酵素的測定法に適用可能な Hhase を創成するためには、以下の 3 つの課題を解決する必要があった。

分析温度 (37 °C) において十分な活性を有すること

各種メチル馬尿酸に対する反応性の向上

測定用液状試薬中にて長期保存安定性の確保 (1 年間初期性能を維持)

また、追従酵素の Gox も、本酵素的測定法に適用するには以下の 2 つの課題を解決する必要があった。

グリシンに対する反応性の向上

グリシンに対する基質阻害の低減

(2)馬尿酸加水分解酵素 (Hhase) の開発

リアルタイムでの長期保存安定性確認が困難なため、われわれは十分な保存安定性を有することが知られている好熱性菌由来の酵素を対象とし、70 °C 付近での馬尿酸反応性スクリーニングを行った。その結果、超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* から馬尿酸加水分解能を有する酵素を見出した。当該酵素 (PH1043) は既に別酵素として報告されており、各種基質特異性をはじめ諸性質が分かっていたが、馬尿酸を加水分解することは知られていなかった。

PH1043 は安定性の課題を解決したが、分析温度では反応を検出できなかった。そこで、合理的デザインによる機能改変を行うことで PH1043 の低温適正化を試みた。また、馬尿酸のみならずメチル馬尿酸への反応性を高め、トルエンおよびキシレンの総合暴露量を評価する酵素的測定法への応用を目指した。構築した立体構造モデルに基づき変異箇所を絞り、部位特異的ランダム変異処理および変異体スクリーニングを行った。結果として、K193、P200、N307 をより小さなアミノ酸残基とした変異酵素で 37 °C における活性向上が確認されたが、*o*-メチル馬尿酸への反応性が不十分であった。

次に、基質を推定活性中心領域にフィッティングさせ、基質と W164 残基との間で立体障害

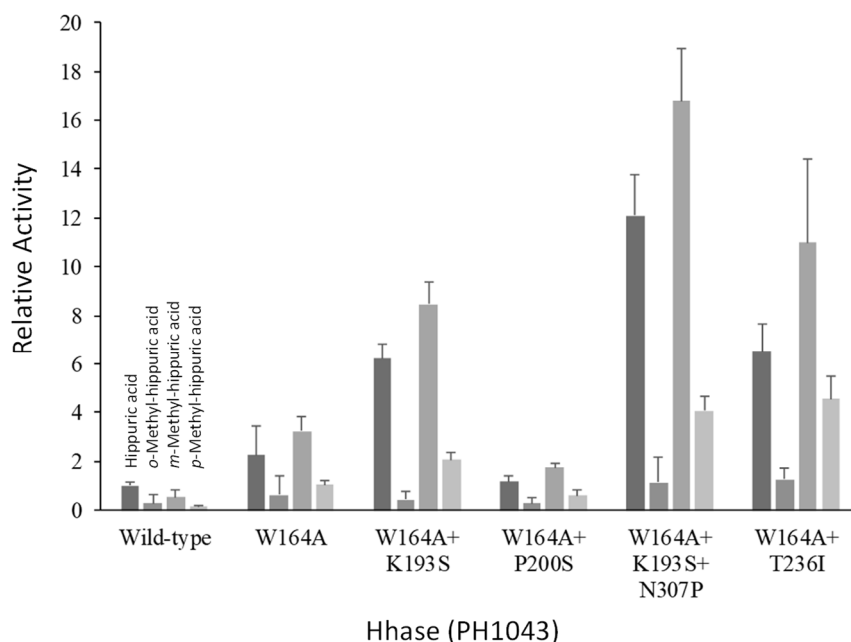


図2 変異酵素の活性向上

が生じるとの予測を得た。この立体障害の緩和を目的として W164 残基に変異導入を行った結果、*o*-メチル馬尿酸への反応性が向上した(図2)¹⁾。さらに、相加的な反応性向上を狙い、多重変異体を作成、特性評価を行った。その結果、各基質に対し 4~31 倍活性向上した多重変異体が得られ、W164 単変異体と比較して相加効果も認められた(図2)²⁾。

(3) グリシンオキシダーゼ (Gox) の開発

Gox - グリシン複合体の結晶構造³⁾より、グリシンが反応部位以外にもう 1 分子、非反応部位に確認され、基質阻害との関連が予想された。また、Open 構造と Closed 構造の比較を行ったところ、触媒部位近傍の large loop に存在する E55 側鎖の配向に変化が見られたため、変異体解析を行った。その結果、基質阻害が消失し比活性が野生型の約 2 倍向上した E55A の開発に成功した(図3)。

Gox の活性中心には、小さな loop 構造 (mobile loop) も存在した。これが Open 構造から Closed 構造への移行で外側にシフトし、非反応性グリシンの結合空間を形成した。そこで、mobile loop のヒンジに位置する G251 をより高いアミノ酸に置換したところ、基質阻害が消失し比活性が野生型の約 4 倍向上した G251H の開発に成功した(図3)。更なる変異体解析により、Gox の低比活性および基質阻害は、E55 と非反応性グリシンの協同効果による Closed 構造の安定化が原因と示唆され、Gox の反応機構の一端が明らかとなった。

(4) マンデル酸の新規酵素的測定法とマンデル酸オキシダーゼの開発

スチレン暴露の指標となるマンデル酸分析については、図4に示す酵素的測定法を考案した。L-マンデル酸に対しオキシダーゼを反応させ、生じる過酸化水素を 4-アミノアンチピリンとトリンダー試薬、ペルオキシダーゼでキノン系色素として発色させる。同時に、D-マンデル酸はマンデル酸ラセマーゼ (EC5.1.2.2) により L 体に変換する。

本酵素的測定法に適用可能な新規酵素マンデル酸オキシダーゼを開発するため、まず乳酸オキシダーゼ (Lox) の立体構造を基に、L-マンデル酸との間に生じる立体障害を確認した。活性部位周辺の疎水ポケットを広げ、立体障害を軽減すると予想される二重変異 (M2: A88G+Y117A) および三重変異 (M2+Y207A・V・L) をそれぞれデザインした。野生型 Lox の L-マンデル酸に対する反応性は著しく低く (乳酸の 0.01% 未満)、触媒効率は検出限界以下であった。一方、M2 及び M2+Y207V の L-マンデル酸に対する反応性は、野生型に比べてそれぞれ約 290 倍、約 200 倍に向上した。さらに、L-乳酸に対する触媒効率が検出限界以下になった。M2+Y207V は、すべての変異体の中で L-マンデル酸に対する親和性及び触媒効率が最も優れ、マンデル酸と十分反応し乳酸とは殆ど反応しないマンデル酸オキシダーゼへの改変に成功した⁴⁾。本酵素により、マンデル酸の酵素的測定が可能となった。

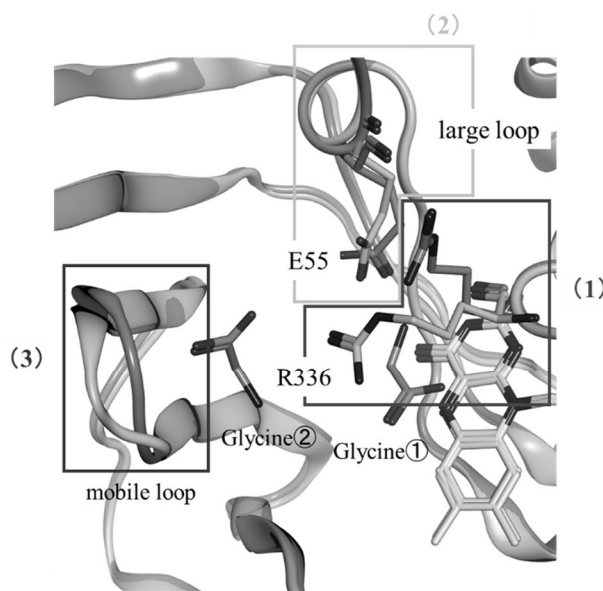


図3 Goxの活性中心構造

Open構造：濃い灰色 Closed構造：薄い灰色
Glycine①：反応性 Glycine②：非反応性
(1)~(3)：Open-Closed構造間の違い

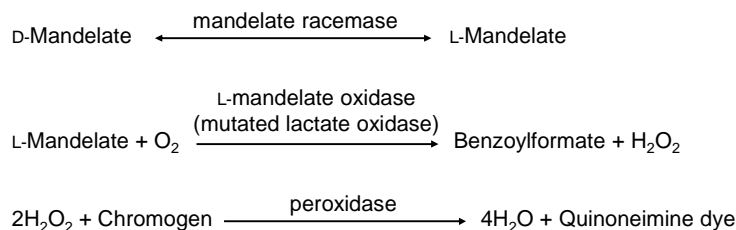


図4 マンデル酸酵素的測定法の原理

(5) 実用化と今後の展望

現在、馬尿酸・メチル馬尿酸総量測定の研究成果は検査企業に移管終了し、既に分析試薬開発

が達成されており、実用化の目処を得ている。マンデル酸測定も研究成果を検査企業に移管中で、分析試薬開発が進められている。適当なマンデル酸ラセマーゼを開発できれば、健康診断への活用の目処がつくと期待している。一方、馬尿酸を単独測定可能な酵素的測定法は検査企業にて開発されており、この方法との組み合わせでメチル馬尿酸のみの測定も可能である。しかし、この方法は系が複雑で使用酵素の安定性が低いという課題がある。今後は、簡便な馬尿酸単独測定法および高安定な測定用酵素を開発し、実用性を高めたい。また、マンデル酸同様フェニルグリオキシル酸もスチレン代謝産物として分析のニーズがあり、新規測定方法および酵素の開発を進めたい。

< 引用文献 >

- 1) Nishiya, Y., Nagoshi, K., Shinki, S., Imai, S., and Baba, T.: Development of a hippuric acid-hydrolysing enzyme for monitoring toluene exposure. *Int. J. Anal. Bio-Sci.*, 9, 15-21 (2021).
- 2) Nishiya, Y., Imai, S., Shinki, S., and Baba, T.: Improvement of the *Pyrococcus* hippurate hydrolase for monitoring toluene and xylene exposure. *Int. J. Anal. Bio-Sci.*, 10, in press (2022).
- 3) Shiono, T., Nomura, T., Nishiya, Y., and Arai, R.: Crystal structure of glycine oxidase from *Geobacillus kaustophilus*. *Photon Factory Activity Report 2014*, #32 (2015).
- 4) Hiruta, M. and Nishiya, Y.: Creation of an L-mandelate oxidase via structure-guided design of engineered lactate oxidase. *Int. J. Anal. Bio-Sci.*, 6, 25-29 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 西矢芳昭	4. 巻 44
2. 論文標題 ヒト膀胱 -アマラーゼと合成基質2-chloro-4-nitrophenyl-4-O- -D-galactopyranosylmaltosideとの反応性結合の構造的予測.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物試料分析	6. 最初と最後の頁 83-88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Yoshiaki Nishiya, Kentaro Nagoshi, Shota Shinki, Satsuki Imai, Toshiaki Baba	4. 巻 9
2. 論文標題 Development of a hippuric acid-hydrolysing enzyme for monitoring toluene exposure.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Analytical Bio-Science	6. 最初と最後の頁 15-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Yuya Shimosawa, Tomoki Himiyama, Tsutomu Nakamura, Yoshiaki Nishiya	4. 巻 170
2. 論文標題 Structural analysis and reaction mechanism of malate dehydrogenase from Geobacillus stearothermophilus.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 97-105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab027	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 Yoshiaki Nishiya, Gento Torii, Muneyuki Suginaka, Satsuki Imai, Toshiaki Baba	4. 巻 9
2. 論文標題 Analysis of a hippurate hydrolase homolog from Acetomicrobium mobile.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Analytical Bio-Science	6. 最初と最後の頁 30-35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Kohei Sasamoto, Tomoki Himiyama, Kunihiko Moriyoshi, Takashi Ohmoto, Koichi Uegaki, Yoshiaki Nishiya, Tsutomu Nakamura	4. 巻 F77
2. 論文標題 Crystal structure of acetylxlylan esterase from <i>Caldanaerobacter subterraneus</i> subsp. <i>tengcongensis</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica	6. 最初と最後の頁 399-406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2053230X21009675	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 Yuya Shimozawa, Tomoki Himiyama, Tsutomu Nakamura, Yoshiaki Nishiya	4. 巻 34
2. 論文標題 Increasing loop flexibility affords low-temperature adaptation of a moderate thermophilic malate dehydrogenase from <i>Geobacillus stearothermophilus</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Protein Engineering Design and Selection	6. 最初と最後の頁 gzab026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/protein/gzab026	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 下澤勇弥, 氷見山幹基, 中村努, 西矢芳昭	4. 巻 45
2. 論文標題 臨床検査用酵素の立体構造的解釈: リンゴ酸デヒドロゲナーゼと乳酸デヒドロゲナーゼの基質特異性の違いについて.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物試料分析	6. 最初と最後の頁 151-159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Yuya Shimozawa, Hiroshi Aiba, Yoshiaki Nishiya	4. 巻 8
2. 論文標題 Structural prediction and analysis of the highly reactive alkaline phosphatase from <i>Shewanella</i> sp. T3-3.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Analytical Bio-Science	6. 最初と最後の頁 39-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Yuya Shimozawa, Saki Yoshida, Kazuya Ikeda, Yuri Kato, Fuka Toyama, Yoshiaki Nishiya	4. 巻 8
2. 論文標題 Easy preparation of a stable membrane-bound lactate dehydrogenase for application on lactate biosensor.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Analytical Bio-Science	6. 最初と最後の頁 65-70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Hiruta, M., Yoshida, S., Shimozawa, Y., and Nishiya, Y.	4. 巻 7
2. 論文標題 Altered substrate specificities of mandelate oxidase generated by site-directed mutagenesis of L-lactate oxidase.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Analytical Bio-Science	6. 最初と最後の頁 35-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Misaki Hiruta, Yoshiaki Nishiya	4. 巻 6
2. 論文標題 Creation of an L-mandelate oxidase via structure-guided design of engineered lactate oxidase.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Analytical Bio-Science	6. 最初と最後の頁 25-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 西矢芳昭	4. 巻 41
2. 論文標題 酵素立体構造および反応予測に基づく尿素窒素のダブルカイネティックアッセイの考察.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生物試料分析	6. 最初と最後の頁 162-167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 西矢芳昭	4. 巻 41
2. 論文標題 検査薬の改良に役立つホモロジーモデリング: その境界の把握.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生物試料分析	6. 最初と最後の頁 229-235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

[学会発表] 計47件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐々本康平、下澤勇弥、氷見山幹基、森芳邦彦、大本貴士、上垣浩一、西矢芳昭、中村努
2. 発表標題 糖脱アセチル化酵素TTE0866の構造・機能解析
3. 学会等名 産総研・産技連LS-BT合同研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下澤勇弥、佐々本康平、西矢芳昭、氷見山幹基、中村努
2. 発表標題 Structural change of malate dehydrogenase upon substrate-binding contributes to substrate selectivity
3. 学会等名 産総研・産技連LS-BT合同研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東浦優希、小田龍佑、川崎大志、西矢 芳昭
2. 発表標題 Reaction mechanism of glycine oxidase based on the substrate inhibition
3. 学会等名 日本蛋白質科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々本康平、下澤勇弥、氷見山幹基、森芳邦彦、大本貴士、上垣浩一、西矢芳昭、中村努
2. 発表標題 Structure determination and reactivity evaluation of TTE0866 acetylxylylan esterase
3. 学会等名 日本蛋白質科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下澤勇弥、中村努、佐々本康平、氷見山幹基、西矢芳昭
2. 発表標題 Contribution to substrate recognition of malate dehydrogenase by its catalytic loop switching
3. 学会等名 日本蛋白質科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東浦優希、川崎大志、小田龍佑、西矢芳昭
2. 発表標題 酵素特性の改良を目指したグリシン酸化酵素の機能解析
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥迫拓也、今井臯、東浦優希、西矢芳昭
2. 発表標題 実用的な有機溶剤暴露測定法の開発
3. 学会等名 摂南大学融合科学研究所発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々本康平、下澤勇弥、氷見山幹基、森芳邦彦、大本貴士、上垣浩一、西矢芳昭、中村努
2. 発表標題 酢酸セルロース分解酵素の構造・機能解析
3. 学会等名 SATテクノロジー・ショーケース2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥迫拓也、大西諒、巽謙太、矢倉一樹、西矢芳昭
2. 発表標題 尿中馬尿酸・メチル馬尿酸の酵素的測定法に用いる酵素の改良
3. 学会等名 生物試料分析科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東浦優希、小田龍佑、川崎大志、西矢芳昭
2. 発表標題 検査用酵素グリシンオキシダーゼの反応機構解析と特性改良
3. 学会等名 生物試料分析科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下澤勇弥、佐々本康平、氷見山幹基、中村努、西矢芳昭
2. 発表標題 リンゴ酸デヒドロゲナーゼおよび乳酸デヒドロゲナーゼの基質選択機構の違い
3. 学会等名 生物試料分析科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武田悠杜、佐々本康平、下澤勇弥、氷見山幹基、森芳邦彦、大本貴士、上垣浩一、西矢芳昭、中村努
2. 発表標題 好熱菌由来アセチルキシランエステラーゼの触媒反応と基質認識に関する機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下澤勇弥、西矢芳昭、佐々本康平、氷見山幹基、中村努
2. 発表標題 The structural change mechanism in the catalytic cycle of malate dehydrogenase
3. 学会等名 日本蛋白質科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西矢芳昭、下澤勇弥
2. 発表標題 安定性の高い膜結合型乳酸脱水素酵素の簡便な調製法
3. 学会等名 日本臨床化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東浦優希、小田龍佑、川崎大志、西矢芳昭
2. 発表標題 The analysis of reaction mechanism on glycine oxidase and improvement of enzymatic function (グリシンオキシダーゼの反応機構の解析と機能改良)
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 下澤勇弥、中村努、佐々本康平、氷見山幹基、西矢芳昭
2. 発表標題 Substrate recognition of malate dehydrogenase divided by evolution in its active site
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 外山二卯佳、木村太紀、西矢芳昭
2. 発表標題 SH基化学修飾によるオキシダーゼの酸素反応性低減
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東浦優希、小田龍佑、川崎大志、西矢 芳昭
2. 発表標題 グリシンオキシダーゼの構造・機能解析と酵素特性改良
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下澤勇弥、中村努、佐々本康平、氷見山幹基、西矢芳昭
2. 発表標題 リンゴ酸デヒドロゲナーゼの構造変化による触媒残基のswitchingと基質特異性への寄与
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 外山二卯佳、木村太紀、西矢芳昭
2. 発表標題 SH基化学修飾によるオキシダーゼのデヒドロゲナーゼへの改変
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿部幸浩、庄司光男、西矢芳昭
2. 発表標題 FMO法とQM/MM法によるサルコシンオキシダーゼの反応機構の検討
3. 学会等名 生体分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下澤勇弥、西矢芳昭、佐々本康平、氷見山幹基、中村努
2. 発表標題 リンゴ酸デヒドロゲナーゼの基質特異性と構造変化メカニズムの関係
3. 学会等名 日本蛋白質科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東浦優希、小田龍佑、川崎大志、野村隆臣、新井亮一、西矢芳昭
2. 発表標題 Geobacillus kaustophilus由来グリシンオキシダーゼの基質阻害および基質特異性の改変グリシンオキシダーゼ
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒部督恵、松本美徳、山本真由香、中嶋義隆、西矢芳昭
2. 発表標題 サルコシンオキシダーゼの各種環状イミノ酸に対する反応特異性および立体選択性
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下澤勇弥、西矢芳昭、佐々本康平、氷見山幹基、中村努
2. 発表標題 リンゴ酸デヒドロゲナーゼの基質特異性と立体構造解析に基づく構造変化メカニズムの考察
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西矢芳昭、相場洋志
2. 発表標題 Shewanella属T3-3株由来の新規な高性能アルカリホスファターゼの立体構造予測に基づく免疫検査への応用
3. 学会等名 日本臨床化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井臯、名越健太郎、新木翔太、馬場利明、西矢芳昭
2. 発表標題 実用化に向けた馬尿酸加水分解酵素の機能改良
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒部督恵、松本美徳、山本真由香、中嶋義隆、西矢芳昭
2. 発表標題 サルコシンオキシダーゼの活性中心構造と基質特異性の関係
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下澤勇弥、西矢芳昭、佐々本康平、氷見山幹基、中村努
2. 発表標題 リンゴ酸デヒドロゲナーゼの構造変化による基質認識メカニズム
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下悠華、泊直宏、山本佳宏、高田慎一、西矢芳昭
2. 発表標題 信号累積型イオン感応性電界効果トランジスタを用いたラッカーゼおよびピリルビンオキシダーゼ反応の検出
3. 学会等名 生物試料分析科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤優里、池田和也、吉田早希、下澤勇弥、川端隆、松尾康光、西矢芳昭
2. 発表標題 膜結合型乳酸脱水素酵素の開発および乳酸センサーへの応用
3. 学会等名 生物試料分析科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村太紀、西矢芳昭
2. 発表標題 サルコシンオキシダーゼにおけるメチルイソチアゾリノンの 阻害機構の解明
3. 学会等名 生物試料分析科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東浦優希、小田龍佑、川崎大志、野村隆臣、新井亮一
2. 発表標題 検査用酵素グリシンオキシダーゼの基質阻害の改変
3. 学会等名 生物試料分析科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 泉智仁、下澤勇弥、西矢芳昭
2. 発表標題 乳酸脱水素酵素の実用的課題に対する考察～進化的側面から～
3. 学会等名 生物試料分析科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 下澤勇弥、西矢芳昭、泉智仁、佐々本康平、氷見山幹基、中村努
2. 発表標題 乳酸脱水素酵素の実用的課題に対する考察～構造・機能的側面から～
3. 学会等名 生物試料分析科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今井阜、名越健太郎、新木翔太、馬場利明、西矢芳昭
2. 発表標題 トルエンおよびキシレンの総合暴露量を評価する酵素的測定法の開発(1)
3. 学会等名 生物試料分析科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉中崇倅、鳥居絃人、今井阜、馬場利明、西矢芳昭
2. 発表標題 トルエンおよびキシレンの総合暴露量を評価する酵素的測定法の開発(2)
3. 学会等名 生物試料分析科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々本康平、下澤勇弥、氷見山幹基、森芳邦彦、大本貴土、上垣浩一、西矢芳昭、中村努
2. 発表標題 Caldanaerobacter subterraneus由来CE-4酵素のX線結晶構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 下澤勇弥、西矢芳昭、佐々本康平、氷見山幹基、中村努
2. 発表標題 リンゴ酸デヒドロゲナーゼの結晶構造に基づく動的反応メカニズムの考察
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今井臯、名越健太郎、新木翔太、馬場利明、西矢芳昭
2. 発表標題 馬尿酸加水分解酵素の機能改良
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下澤勇弥、西矢芳昭、佐々本康平、氷見山幹基、中村努
2. 発表標題 リンゴ酸デヒドロゲナーゼの構造変化と基質認識メカニズムの関係
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井臯、名越健太郎、新木翔太、馬場利明、西矢芳昭
2. 発表標題 馬尿酸の酵素的測定法と測定用酵素の開発
3. 学会等名 生物試料分析科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西矢芳昭
2. 発表標題 酵素立体構造および反応予測に基づく尿素窒素のダブルカイネティックアッセイの考察
3. 学会等名 生物試料分析科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井阜、名越健太郎、新木翔太、馬場利明、西矢芳昭
2. 発表標題 Pyrococcus horikoshii由来馬尿酸加水分解酵素の機能改変
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下澤勇弥、西矢芳昭
2. 発表標題 リンゴ酸デヒドロゲナーゼのClosed構造不安定化による比活性の向上および低温適性化
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒部督恵、西矢芳昭
2. 発表標題 環状イミノ酸に対する反応性が向上したサルコシンオキシダーゼ変異体
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本美德、西矢芳昭
2. 発表標題 Chloroflexus aurantiacus由来のサルコシンオキシダーゼのN-メチルアミノ酸に対する反応性
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 アミノアシラーゼを用いた物質検出方法	発明者 西矢芳昭、巽謙太、 矢倉一樹	権利者 学校法人常翔学 園、ニプロ株式 会社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-118420	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 グリシンオキシダーゼを用いた物質検出方法	発明者 野村隆臣、西矢芳 昭、馬場利明	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特開2019-187285	出願年 2018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
---------	---------