

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14394

研究課題名（和文）耐熱性色素依存性D-乳酸脱水素酵素の機能・構造解析とバイオセンサー素子への応用

研究課題名（英文）Functional and structural analysis of heat-resistant dye-dependent D-lactate dehydrogenase and its application to biosensor devices

研究代表者

林 順司（HAYASHI, Junji）

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部（生物資源産業学域）・講師

研究者番号：20802101

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：色素依存性脱水素酵素(Dye-DH)は人工の酸化還元色素を電子受容体として利用できるため、バイオセンサー素子への応用が期待される。一方、Dye-DHは不安定な酵素であり、有用性に反して研究は殆ど進んでいない。本研究では、色素依存性D-乳酸脱水素酵素(DLDH)を超好熱菌に多数見出し、これら酵素の機能解析に成功した。超好熱菌のDLDHは全て高い耐熱性を示すことを明らかにした。この高度耐熱性DLDHを固定化した酵素電極の作製にも成功し、食品試料中のD-乳酸の検出にも成功した。本研究はD-乳酸の新規測定法開発において重要な役割を果たすと考えられる。また、DLDHの構造解析にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Dye-DHは不安定な酵素であり、有用性に反して研究例が少ない。そのため応用例は限定的であり、また酵素の機能改良に必須の構造情報も少ない。本研究により開発に成功したD-乳酸測定用バイオセンサーは、D-乳酸に対して特異的で、且つ長期間利用できることが明らかとなった。D-乳酸は診断用バイオマーカーや食品の品質管理の指標として有用であるが、これまでに簡便に測定する方法は無かった。本研究の成果はD-乳酸の新規測定法開発において重要な役割を果たすと考えられる。また、Dye-DHの構造情報の取得によりDye-DHの機能改良も可能となり、高性能センサーや電極の開発にも繋がる成果を得たといえる。

研究成果の概要（英文）：Dye-dependent dehydrogenase (Dye-DH) has a potential as a biosensor devices. However, Dye-DH is an unstable enzyme and there are few studies. In this study, we found a large number of dye-dependent D-lactate dehydrogenase (DLDH) in hyperthermophilic bacteria. All DLDHs from hyperthermophilic bacteria showed high thermostable. We succeeded in developing an enzyme electrode on which this high thermostable DLDH is immobilized. Using this electrode, we succeeded in detecting D-lactic acid in food samples. This study is considered to play an important role in the development of new measurement methods for D-lactic acid. We also succeeded in analyzing the X-ray crystal structure of DLDH.

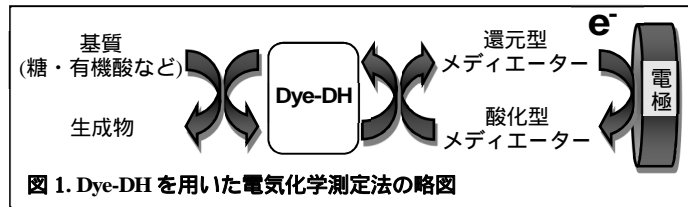
研究分野：酵素工学

キーワード：酵素工学 酵素 超好熱菌 構造生物学 FAD

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

色素依存性脱水素酵素 (Dye-DH) は FAD または FMN を補酵素として糖・有機酸・アミノ酸等の各種生体成分から電子を取り出し、最終的に酸素や硫黄に渡して ATP を生成する酵素複合体において機能する酵素群である。電子受容体として人工の酸化還元色素を利用でき、酸素を電子受容体とせず溶存酸素の影響を受けないため、センサーや酵素燃料電池への利用が期待されている (図 1)。



有用性が高い一方で、Dye-DH の研究と応用化は遅れている。その理由として、膜結合型酵素が多く詳細な解析が困難、常温菌酵素は極端に不安定なため可溶化または電極への固定化操作での失活などが挙げられる。我々は高い安定性を示す超好熱菌 Dye-DH を利用することで種々の課題を解決し、色素依存性 D-プロリン脱水素酵素、色素依存性 L-プロリン脱水素酵素を固定化したセンサーを開発し、その高い有用性を立証した。しかし、ゲノム情報から機能推定が可能な Dye-DH 遺伝子は限られており、見出した酵素は少なく応用展開が限定されている。さらに、Dye-DH の構造解析例は少なく、触媒機構・電子受容体特異性に関する構造的情報が少ないため基質特異性などの改変が困難な点も応用展開の妨げとなっている。

2. 研究の目的

上記背景を踏まえ、医療・食品分野において有用な Dye-DH の目指し、種々の Dye-DH ホモログに関して、大腸菌における発現系構築と活性スクリーニングを実施したところ研究開始以前に色素依存性 D-乳酸脱水素酵素 (DLDH) を発見した。D-乳酸は糖尿病ケトアシドーシスのバイオマーカーとして有用であり、その他にも微生物感染症の指標などに利用できる可能性がある。また、発酵食品中の D-乳酸濃度は腐敗において大きく上昇することが知られているため、D-乳酸測定は食品分野における品質管理にも有用である。DLDH の機能と構造を詳細に解析することで、新たな機能性電極の開発に期待できる。本研究では超好熱菌に見出した高度耐熱性 DLDH の機能と構造の解析を進め、DLDH を反応素子とする酵素電極型バイオセンサーの開発を進めることを主たる目的とした。

3. 研究の方法

(1) DLDH ホモログの推定と発現系の構築

DLDH と推定される 10 種類以上の遺伝子を PCR で増幅後、大腸菌における発現系を構築した。発現確認は SDS-PAGE によって行った。可溶性画分に産物の発現が見られたサンプルについて、熱処理を行い、大腸菌由来のタンパク質を変性させた。触媒活性の確認は、D-乳酸を基質とした活性染色法および分光光度計を用いた活性測定法により行った。

(2) DLDH の精製と機能解析

活性が確認された酵素を各種クロマトグラフィーにて単一に精製し、活性測定法により酵素化学的特徴を解析した。基質特異性、電子受容体特異性、カイネティクス、熱安定性、反応の温度依存性などを詳細に解析した。

(3) DLDH の結晶化と X 線結晶構造解析

酵素の結晶化条件を探索した。シットティングドロップ蒸気拡散法を基本にして、各種沈殿剤、無機塩、緩衝液を変化させることで酵素を結晶化させた。酵素の結晶化は、スクリーニングキットを用いて短時間に網羅的に行った。結晶が得られた場合、沈殿剤濃度を変化させることで結晶化条件の最適化を検討した。得られた結晶はインハウス型 X 線回折装置により、回折データを収集した。良好な回折データが得られたサンプルについて高エネルギー加速器研究機構にて高精度なデータを収集した。位相決定は分子置換法により行った。

(4) 酵素固定化電極の作製

グルタルアルデヒド法等の従来法に加え、高温条件下で溶液状にした寒天溶液または Carbon Nanotube-Ionic Liquid Gel を用いたスピンコーティング法による固定化を検討し、各酵素における最適条件を検討した。スピンコーティング法は高温状態で寒天溶液と酵素溶液を混合した溶液を、回転している電極に滴下しながら層状に固定化する方法であり、高度耐熱性酵素の実施可能な固定化法である。固定化電極の機能評価は、酸化電流もしくは還元電流を測定するクロノアンペロメトリーまたはクーロメトリー、サイクリックボルタンメトリー法にて行った。

4. 研究成果

(1) 超好熱菌 5 種、好熱菌 2 種の DLDH の機能解析に成功し、酵素化学的諸性質の解明に成功した。これら酵素は全て高い耐熱性を示し、特に超好熱菌より精製した酵素は 80 以上の熱処理でも約 90% 残存活性を有していた。また、機能解析および HPLC による解析の結果、全ての DLDH は補酵素として FAD を利用することが判明した。機能解析の結果、DLDH は FAD が結合した状態でのみ精製されるものと、FAD 非結合状態でのみ精製されるものに分かれることが判明した (表 1)。そのため、FAD 非結合の DLDH は活性測定時に反応溶液に FAD の添加を必要であった。これまでに、FAD 非結合状態で精製されるオキシダーゼの報告はあるが、それら酵素は FAD を含む緩衝液中で精製または透析処理することにより、酵素が FAD 結合状態へとフォールディングされる。我々が解析した DLDH についても同様の手法で FAD の結合を試みたが、FAD 非結合状態の酵素しか得られなかった。そこで、DLDH について系統的解析を実施した結果、FAD 非結合で精製される DLDH と結合状態で精製される DLDH は系統的に異なるグループに属することが判明した (図 2)。即ち、超好熱菌 DLDH は、既知 FAD 依存性酵素と同じく酵素中に FAD が強固に結合するグループ (tight グループ) と、結合力が非常に弱く容易に FAD が解離するグループ (loose グループ) の 2 つに大別できることが明らかとなった。本成果は国際学術誌 *Extremophiles* に掲載された。両グループの酵素は一次構造上で高い同一性を示すが、共に FAD 依存性酵素に典型的な FAD 結合モチーフ (GXGXXG モチーフ) を持たず、両グループの FAD 結合性の違いに關する要因をアミノ酸配列の比較から特定することは困難であった。現在、X 線結晶構造解析により超好熱菌 DLDH の FAD 結合力に關する構造的な要因の特定を進めている。

表 1. 精製 DLDH の熱安定性と FAD 結合性.

菌種	ORF	熱安定性	FAD 結合
<i>Aeropyrum pernix</i>	APE_0487	80°C	なし
<i>Thermoproteus tenax</i>	TTX_0794	80°C	なし
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	PAE2013	90°C	なし
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	GK3215	60°C	有り
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AF0394	90°C	有り
<i>Sulfolobus tokodaii</i>	ST0649	80°C	有り
<i>Candidatus Caldiarchaeum subterraneum</i>	CSUB_C1080	70°C	有り

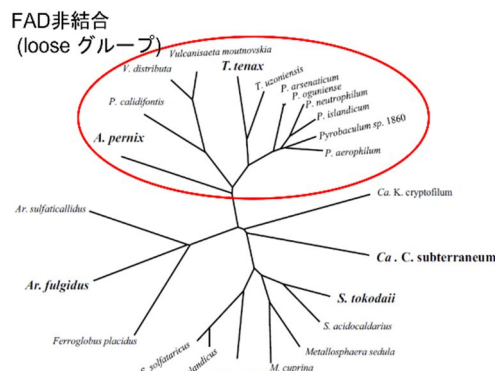


図 2. DLDH の系統解析. 図中の赤丸は FAD 非結合 (loose) グループを示す。表 1 における *A. pernix*, *T. tenax*, *P. aerophilum* の DLDH は loose グループに属している。

(2) 機能解析に成功した各種 DLDH の結晶化スクリーニングを実施した結果、loose グループ DLDH である超好熱菌 *Aeropyrum pernix* DLDH (ApeDLDH) の FAD 非結合型の X 線結晶構造解析に成功した。ApeDLDH は *Penicillium simplicissimum* 由来 Vanillyl-alcohol oxidase (Fraaije et al., JBC, 2000) の FAD 結合型 (pdb: 1e8g) および非結合型 (pdb: 1e8f) と立体構造的に高い類似性を示した。この既知酵素も ApeDLDH と同じく FAD 結合モチーフは GXGXXG と完全に一致しない。一方、構造比較により、既知酵素の loop100-117 に相当する ApeDLDH の loop67-84 は、既知酵素の FAD 結合部位から大きく外側に離れた場所に位置していた (図 3)。既知酵素のこのループ構造は、FAD の結合の有無に関わらず FAD のピロリン酸近傍に位置している。このことから ApeDLDH は FAD のピロリン酸との相互作用に關する構造が既知酵素と比較して非常に柔軟性が高く、それが FAD の結合ポケットの形成に影響し、FAD の結合性が極端に弱くなることが示唆された。現在、loose グループ DLDH の触媒機構および FAD 結合様式の解明を目指し、酵素/FAD/D-乳酸複合体の結晶化と構造解析を進めている。また、他の loose グループ DLDH についても、この loop 構造が補酵素結合に關与することが予想される。今後、loose グループおよび tight グループの立体構造を比較し、超好熱菌の DLDH に見出した補酵素結合の特徴を構造的に解明していく。

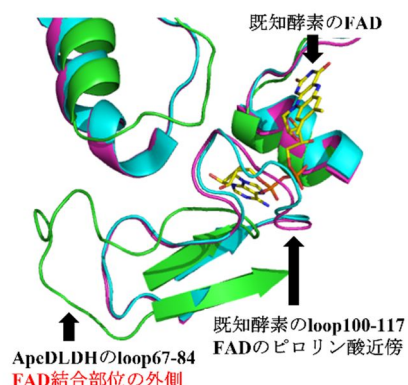


図 3. ApeDLDH と既知酵素との構造比較. 緑: ApeDLDH, 水色: 既知酵素 (FAD 非結合型), 紫: 既知酵素 (FAD 結合型)

(3) *Candidatus Caldiarchaeum subterraneum* (CcsDLDH) をグラッシーカーボン電極上に Carbon Nanotube と Nafion を混合した溶液で固定化した DLDH/CNT/Nafion 修飾電極を作製した。電子受容体としてカルボン酸フェロセンを選択し、サイクリックボルタムメトリーにて D-乳酸測定用センサーとしての機能評価を行った。本電極は D-乳酸に対して最も高い電流応答を示した。また D-2-ヒドロキシ酪酸も D-乳酸に対して 67% の電流応答を示した。一方、L-乳酸、L-アスコルビン酸、エタノール、D-グルコース、ピルビン酸では電流応答は認められなかった。

この特異性は素子として利用した酵素の性質とも一致していた。本電極の 30 における D-乳酸の検出限界及び直線性を求めた結果、検出限界は 30 μ M、直線性は 30 ~ 2500 μ M であり、広範囲の D-乳酸濃度を測定することが可能であることが判明した (図 4)。作製した電極の保存安定性を評価するため 50 日間モニターした結果、50 日後の電流応答は作製初期の 90% 以上を保持していた。*Hansenula polymorpha* の DLDH 固定化電極では、作製 10 日後の電流応答は 71% まで低下することが報告されている (Smutoket al., Talanta, 2014)。このことから、我々が開発した電極は、これまでに報告された DLDH 固定化電極の中で最も高い安定性と長期保存性を有することが明らかとなった。さらに、本電極を用いて、食品サンプル中の D-乳酸の測定にも成功した。本電極を用いて測定した白ワイン中の D-乳酸濃度は 3.12 ± 0.12 mM であり、これは市販キットを使用して分光光度的に測定した値 (3.05 ± 0.09 mM) とほぼ一致した。本研究により、センサー素子として高度耐熱性の DLDH に着目することで、D-乳酸に対し特異的に作用し、少なくとも 50 日以上に渡り使用できる新規センサーの開発に成功した。今後、臨床検体や食品中の D-乳酸の迅速測定に展開が期待できる。本成果は国際学術誌 Journal of Bioscience and Bioengineering に掲載された。

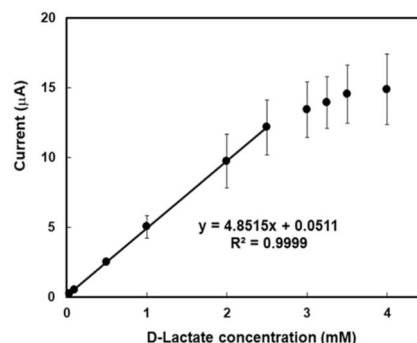


図 4. D-乳酸センサーの性能 (D-乳酸濃度と測定電流の直線性)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計18件（うち査読付論文 17件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Itoh Takafumi, Panti Niphawan, Hayashi Junji, Toyotake Yosuke, Matsui Daisuke, Yano Shigekazu, Wakayama Mamoru, Hibi Takao	4. 巻 533
2. 論文標題 Crystal structure of the catalytic unit of thermostable GH87 -1,3-glucanase from <i>Streptomyces thermodiastaticus</i> strain HF3-3	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1170 ~ 1176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.09.133	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 Sano Chiharu, Itoh Takafumi, Phumsombat Putthapong, Hayashi Junji, Wakayama Mamoru, Hibi Takao	4. 巻 534
2. 論文標題 Mutagenesis and structure-based analysis of the role of Tryptophan525 of - glutamyltranspeptidase from <i>Pseudomonas nitroreducens</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 286 ~ 291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.093	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 Ohshida Tatsuya, Hayashi Junji, Yoneda Kazunari, Ohshima Toshihisa, Sakuraba Haruhiko	4. 巻 88
2. 論文標題 Unique active site formation in a novel galactose 1 phosphate uridylyltransferase from the hyperthermophilic archaeon <i>Pyrobaculum aerophilum</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 669 ~ 678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/prot.25848	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 Itoh Takafumi, Intuy Rattanaporn, Suyotha Wasana, Hayashi Junji, Yano Shigekazu, Makabe Koki, Wakayama Mamoru, Hibi Takao	4. 巻 287
2. 論文標題 Structural insights into substrate recognition and catalysis by glycoside hydrolase family 87 1,3 glucanase from <i>Paenibacillus glycanilyticus</i> FH11	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 2524 ~ 2543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15161	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 Hayashi Junji, Ichiki Yoshiaki, Kanda Akiko, Takagi Kazuyoshi, Wakayama Mamoru	4. 巻 67
2. 論文標題 Identification, characterization, and cloning of a novel aminoacylase, L-pipecolic acid acylase from <i>Pseudomonas</i> species	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 186 ~ 194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2020.12.001	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 Kawakami Ryushi, Ohshida Tatsuya, Hayashi Junji, Yoneda Kazunari, Furumoto Toshio, Ohshima Toshihisa, Sakuraba Haruhiko	4. 巻 208
2. 論文標題 Crystal structure of a novel type of ornithine -aminotransferase from the hyperthermophilic archaeon <i>Pyrococcus horikoshii</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 731 ~ 740
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijbiomac.2022.03.114	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 Kawakami Ryushi, Kinoshita Chinatsu, Kawase Tomoki, Sato Mikio, Hayashi Junji, Sakuraba Haruhiko, Ohshima Toshihisa	4. 巻 85
2. 論文標題 Characterization of a novel moderate-substrate specificity amino acid racemase from the hyperthermophilic archaeon <i>Thermococcus litoralis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1650 ~ 1657
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab078	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 Satomura Takenori, Hayashi Junji, Ohshida Tatsuya, Sakuraba Haruhiko, Ohshima Toshihisa, Suye Shin-ichiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Enzymological characteristics of a novel archaeal dye-linked d-lactate dehydrogenase showing loose binding of FAD	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Extremophiles	6. 最初と最後の頁 975 ~ 981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00792-018-1054-3	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 Ohshida Tatsuya, Koba Kohei, Hayashi Junji, Yoneda Kazunari, Ohmori Taketo, Ohshima Toshihisa, Sakuraba Haruhiko	4. 巻 82
2. 論文標題 A novel bifunctional aspartate kinase-homoserine dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium, <i>Thermotoga maritima</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2084 ~ 2093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1511365	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 Akita Hironaga, Hayashi Junji, Sakuraba Haruhiko, Ohshima Toshihisa	4. 巻 9
2. 論文標題 Artificial Thermostable D-Amino Acid Dehydrogenase: Creation and Application	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	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) 10.3389/fmicb.2018.01760	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 Satomura Takenori, Hayashi Junji, Sakamoto Hiroaki, Nunoura Takuro, Takaki Yoshihiro, Takai Ken, Takami Hideto, Ohshima Toshihisa, Sakuraba Haruhiko, Suye Shin-ichiro	4. 巻 126
2. 論文標題 d-Lactate electrochemical biosensor prepared by immobilization of thermostable dye-linked d-lactate dehydrogenase from <i>Candidatus Caldiarchaeum subterraneum</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 425 ~ 430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2018.04.002	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 Intuy Rattanaporn, Itoh Takafumi, Suyotha Wasana, Hayashi Junji, Yano Shigekazu, Makabe Koki, Wakayama Mamoru, Hibi Takao	4. 巻 74
2. 論文標題 X-ray crystallographic analysis of the catalytic domain of α -1,3-glucanase FH1 from <i>Paenibacillus glycanilyticus</i> overexpressed in <i>Brevibacillus choshinensis</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications	6. 最初と最後の頁 770 ~ 773
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2053230X18013109	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 Hossain Md Saddam, Tanaka Takahiro, Hayashi Junji, Takagi Kazuyoshi, Takeda Yoichi, Wakayama Mamoru	4. 巻 66
2. 論文標題 Characterization and Thermal Denaturation Kinetic Analysis of Recombinant L-Amino Acid Ester Hydrolase from <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 11064 ~ 11072
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.8b04573	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 Take Keitaro, Fujiki Hidehisa, Suyotha Wasana, Hayashi Junji, Takagi Kazuyoshi, Yano Shigekazu, Wakayama Mamoru	4. 巻 64
2. 論文標題 Enzymatic and molecular characterization of an acidic and thermostable chitinase 1 from <i>Streptomyces thermodiastaticus</i> HF 3-3	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 190 ~ 197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2017.12.002	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 Hasi Rumana Yesmin, Miyagi Makoto, Morito Katsuya, Ishikawa Toshiki, Kawai-Yamada Maki, Imai Hiroyuki, Fukuta Tatsuya, Kogure Kentaro, Kanemaru Kaori, Hayashi Junji, Kawakami Ryushi, Tanaka Tamotsu	4. 巻 166
2. 論文標題 Glycosylinositol phosphoceramide-specific phospholipase D activity catalyzes transphosphatidylolation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 441 ~ 448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz056	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 HASI Rumana Yesmin, MIYAGI Makoto, KIDA Takashi, FUKUTA Tatsuya, KOGURE Kentaro, HAYASHI Junji, KAWAKAMI Ryushi, KANEMARU Kaori, TANAKA Tamotsu	4. 巻 65
2. 論文標題 Quantitative Analysis of Glycosylinositol Phosphoceramide and Phytoceramide 1-Phosphate in Vegetables	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 S175 ~ S179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3177/jnsv.65.S175	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 Hasi Rumana Yesmin, Majima Dai, Morito Katsuya, Ali Hanif, Kogure Kentaro, Nanjundan Meera, Hayashi Junji, Kawakami Ryushi, Kanemaru Kaori, Tanaka Tamotsu	4. 巻 1152
2. 論文標題 Isolation of glycosylinositol phosphoceramide and phytoceramide 1-phosphate in plants and their chemical stabilities	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography B	6. 最初と最後の頁 122213 ~ 122213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jchromb.2020.122213	査読の有無 無
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 Ali Hanif, Morito Katsuya, Hasi Rumana Yesmin, Aihara Mutsumi, Hayashi Junji, Kawakami Ryushi, Kanemaru Kaori, Tsuchiya Koichiro, Sango Kazunori, Tanaka Tamotsu	4. 巻 1867
2. 論文標題 Characterization of uptake and metabolism of very long-chain fatty acids in peroxisome-deficient CHO cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 159088 ~ 159088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2021.159088	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7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 林 順司, 大志田達也, 川上竜巳, 里村武範, 若山 守, 大島敏久, 櫻庭春彦
2. 発表標題 超好熱菌由来色素依存性D-乳酸脱水素酵素のX線結晶構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第58回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長濱伸哉, 林順司, 里村武範, 若山守, 大島敏久, 櫻庭春彦
2. 発表標題 D-乳酸分析用酵素の探索と機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部例会 (第507回講演会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上 竜巳, 林 順司, 木下 千夏, 河瀬 智紀, 佐藤 樹夫
2. 発表標題 超好熱アーキア <i>Thermococcus litoralis</i> DSM5473 のアミノ酸ラセマーゼ BAR2 の機能解析
3. 学会等名 日本ビタミン学会第 72 回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大志田 達也, 林 順司, 米田 一成, 大島 敏久, 櫻庭 春彦
2. 発表標題 超好熱アーキア <i>Pyrobaculum aerophilum</i> 由来新規ガラクトース1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼに関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大志田 達也, 林 順司, 米田 一成, 大島 敏久, 櫻庭 春彦
2. 発表標題 超好熱アーキア <i>Pyrobaculum aerophilum</i> 由来新規ガラクトース 1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼの構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2019 年度 西日本・中四国支部合同沖縄大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林順司, 大志田達也, 川上竜巳, 里村武範, 若山守, 大島敏久, 櫻庭春彦
2. 発表標題 超好熱アーキア由来色素依存性 D-乳酸脱水素酵素の構造解析
3. 学会等名 日本ビタミン学会第 74 回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Intuy Rattanaporn, Takafumi Itoh, Wasana Suyotha, Junji Hayashi, Shigekazu Yano, Koki Makabe, Yosuke Toyotake, Mamoru Wakayama and Takao Hibi
2. 発表標題 Reaction mechanism and crystallization of catalytic -1,3-gluconase from Paenibacillus glycanilyticus FH11
3. 学会等名 Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	櫻庭 春彦 (SAKURABA Haruhiko)		
研究協力者	大島 敏久 (OHSHIMA Toshihisa)		
研究協力者	里村 武範 (SATOMURA Takenori)		
研究協力者	若山 守 (WAKAYAMA Mamoru)		
研究協力者	川上 竜巳 (KAWAKAMI Ryushi)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	金丸 芳 (KANEMARU Kaori)		
研究協力者	田中 保 (TANAKA Tamotsu)		

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