

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2012

課題番号：21241019

研究課題名（和文）貧栄養環境下で芳香族環境汚染物質を分解する新規光合成微生物の改良と展開

研究課題名（英文）Improvement and development of novel photosynthetic microorganisms which degrade aromatic pollutants in oligotrophic environment

研究代表者

木村 成伸 (KIMURA Shigenobu)

茨城大学・工学部・教授

研究者番号：90291608

研究成果の概要（和文）：シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 に *Acidovorax* sp. KKS102 株ビフェニル分解酵素系遺伝子やラット肝臓シトクロム P4501A1 遺伝子を導入することにより、ビフェニルやダイオキシンを貧栄養環境下で水酸化できる新規シアノバクテリア株を作製した。芳香族環境汚染物質のバイオレメディエーションにおけるシアノバクテリアの有用性が確認できた。

研究成果の概要（英文）：Novel photosynthetic microorganisms, which oxygenize biphenyl and dioxin, were prepared by introducing biphenyl-degradation system genes from *Acidovorax* sp. KKS102 and rattus liver cytochrome P450 1A1 gene into cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 cells, respectively. It was confirmed that the cyanobacterium is useful for bioremediations of aromatic pollutants in oligotrophic environment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	15,500,000	4,650,000	20,150,000
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2012年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
総計	22,100,000	6,630,000	28,730,000

研究分野：蛋白質工学，微生物工学

科研費の分科・細目：環境学・環境修復技術・環境材料

キーワード：バイオレメディエーション，シアノバクテリア，ビフェニル，芳香族化合物，光合成，タンパク質工学，基質特異性

1. 研究開始当初の背景

PCB やダイオキシン類は残留性・毒性の高い環境汚染物質であり、その分解・浄化が求められている。特に土壤中など環境中に低濃度で広く残留している PCB の分解には微生物を用いたバイオレメディエーション（生物的環境浄化）が有効な方法であると考えられ、さまざまな芳香族化合物

分解微生物が見出され、改良されている。*Acidovorax* sp. KKS102 株は、PCB などのビフェニル化合物分解酵素系をもつ。この分解系において、ビフェニルはジオキシゲナーゼ複合体（BphA1A2）による酸素添加反応（水酸化）に始まる一連の反応によって酸化分解される。最初の BphA1A2 による酸素添加反応には NADH からの電子

供給が不可欠であり、電子は NADH 特異的な電子伝達系フラビン酵素である BphA4, Rieske 型フェレドキシンである BphA3 を経て BphA1A2 に供給される。水酸化されたビフェニルは、さらに BphB, BphC, BphD によって安息香酸にまで分解される。最初の酸素添加反応に必要な NADH は細胞内では主に TCA 回路などで生産される。したがって、糖などの炭素源が乏しい貧栄養環境下では PCB 分解効率が低く、低濃度の PCB 分解のためにわざわざ外部から炭素源を供給して分解を進めなければならない。したがって、この問題の解決は貧栄養環境下での効率的な生物的環境浄化実現に向けての重要なキーポイントのひとつである。

この問題を解決するために、報告者らは NADH 特異的なビフェニル分解代謝系を蛋白工学的的手法によって NADPH 依存的に作り変えて、独立栄養生物であり、酸素発生型光合成を行うシアノバクテリア (ラン藻) に組み込むことによって、光合成系で多量に生産される NADPH を利用して貧栄養環境下でも効率的に PCB を分解できる新規光合成細菌株の創出を着想し、これまでに (1) NADH 特異的な BphA4 を蛋白質工学的的手法によって NADPH 依存的な酵素に作り変えることができること、

(2) 作製した NADPH 依存的 BphA4 変異体遺伝子を、BphA3, A1A2 遺伝子と共にシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 株に組み込み込むことによってビフェニルを水酸化できること、および (3) *Synechocystis* sp. PCC6803 株では、BphA4 遺伝子を導入しなくても BphA3, BphA1A2 遺伝子を導入するだけでビフェニルが水酸化できること、を明らかにしてきた。

(3) の結果は、シアノバクテリア細胞内に BphA4 に代わる BphA3 への電子供給体が存在することを示しており、この電子供給系路が解明できれば、ビフェニル化合物等の芳香族性環境汚染物質分解性シアノバクテリアを作製する上で極めて興味深い知見が得られると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 株へのビフェニル分解系遺伝子導入に関するこれまでの研究成果をさらに発展させるとともに、他の芳香族環境汚染物質の貧栄養環境下での生物的環境浄化実現への展開に不可欠な基盤技術を確立することを目的とした。具体的には、

(1) ビフェニル化合物分解性シアノバ

クテリア株を改良するために必要な、NADPH に対する特異性が高い高活性型 BphA4 変異体の作製

- (2) BphA 遺伝子群導入シアノバクテリア株の芳香族化合物 (ベンゼン, トルエン) への酸素添加活性の確認
- (3) BphA, B, C, D 遺伝子群導入による、ビフェニルを安息香酸にまで分解できるシアノバクテリア株の作製
- (4) ダイオキシン類分解性新規シアノバクテリア株の作製等を目的とした。

3. 研究の方法

- (1) NADPH 特異的な高活性型 BphA4 変異体の作製と立体構造解析

NADPH 特異的な BphA4 変異体の作製は、これまでに作製した NADPH 依存的 BphA4 変異体の場合と同様、BphA4 分子中の NADH 結合部位中にあり NADH と NADPH とを識別していると考えられる NADH 中のリボースの 5'-OH 認識ループ上の連続する 3 残基 (Glu¹⁷⁵Thr¹⁷⁶Gln¹⁷⁷) にアミノ酸残基置換を導入して行った。

変異体 BphA4 遺伝子は、PCR を用いた部位特異的な変異導入法で作製した。変異体 BphA4 は、野生型 BphA4 (WT) の場合と同様、大腸菌 JM109 株を宿主として遺伝子を大量発現させ、ほぼ単一にまで精製した。

BphA4 の NAD(P)H 特異性は、フェリシアン化カリウムの還元反応における NAD(P)H に対するみかけの酵素動力学的パラメーター (K_m , k_{cat}) をミカエリスの式に従って算出して評価した。基質特異性は、NADPH と NADH に対する触媒効率 ($(k_{cat}/K_m)^{NADPH}$ および $(k_{cat}/K_m)^{NADH}$) の比、 $(k_{cat}/K_m)^{NADPH/NADH} = (k_{cat}/K_m)^{NADPH}/(k_{cat}/K_m)^{NADH}$ を基質特異性の尺度とした。

作製した変異体 BphA4 変異体と NAD(P)H との複合体の立体構造構造は、X 線結晶構造解析によって解析した。X 線結晶強度データは、高エネルギー加速器研究機構 (Photon Factory) で収集し、分子置換法で構造を決定した。

- (2) BphA 遺伝子群導入シアノバクテリア株のベンゼン, トルエン分解活性の確認

BphA3 及び BphA1A2 遺伝子を導入したビフェニル分解性シアノバクテリア株 *Synechocystis* PCC6803/pVEA123 株 (NITE P-748) の菌体を試験管 BG11 培地に懸濁し、ベンゼンまたはトルエン蒸気下、密

封容器内で 6 時間培養した。塩酸を加えて反応を停止した後に、培養液の酢酸エチル抽出物を減圧乾固し、トリシリルメチル (TMS) 化して、ベンゼンまたはトルエンの代謝物をガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) で分析した。

(3) BphA, B, C, D 遺伝子導入シアノバクテリア株の作製とビフェニル分解活性

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 株由来の光依存的 *psbE* プロモーター制御下に、BphA1A2, A3, B, C, D 遺伝子をこの順に配置した pVZ 系の発現プラスミドを作製し、Zinchenko らの方法によってシアノバクテリア株を形質転換して *Synechocystis* sp. PCC6803/pVABCD6 株 (NITE P-848) を作製した。660 nm での吸光度が 4.0 になるようにこの菌体を BG11 培地に懸濁し、100 nno1 のビフェニルを加えて 30°C で培養後、塩酸を加えて反応を停止し、遠心分離後の上清を逆相カラムを用いたセミマイクロ高速液体クロマトグラフィ (HPLC) にかけて、ビフェニルと安息香酸濃度の経時変化をしらべた。

(4) ダイオキシン類分解性新規シアノバクテリア株の作製とダイオキシン類分解活性の確認

プラスミド pVZ321 を用いて NADPH 特異的なヒト肝臓由来シトクロム P450 還元酵素 (hCPR) 遺伝子とラット由来シトクロム P450 (rCYP1A1) 遺伝子を *psbE* 遺伝子のプロモーター制御下に共発現するプラスミドを構築し、Zinchenko らの方法によってシアノバクテリア株を形質転換して *Synechocystis* sp. PCC6803/pVLYPR 株を作製した。この株を BG11 培地中、光照射下で培養して得た菌体を BG11 培地に懸濁し、2-chlorodibenzo-*p*-dioxin (2-CDD) を添加して 30°C で培養した後、クロロホルム/メタノールを加えて反応を停止した。遠心分離後、上清中の 2-CDD とその水酸化物をセミマイクロ HPLC と GC-MS で分析した。

4. 研究成果

(1) NADPH 特異的高活性型 BphA4 変異体の作製と立体構造解析

本研究以前に報告者らは、BphA4 の 175 位と 177 位にランダム変異を導入して変異体をスクリーニングすることによって、NADH よりも約 20 倍 NADPH 特異的な E175C/Q177G 変異体 (CTG 変異体) を作製している。しかし、この変異体の NADPH に対する触媒効率は野生型 BphA4 (WT) の NADH に対するその約 10% 以下であった。さらに NADPH 特異的かつ NADPH に対して高い触媒効率を持つ変異体を作製するために、CTG 変異体の Thr¹⁷⁶ を Arg に置換することによって、NADH よりも NADPH に対して約 100

倍特異的で、かつ NADPH に対して野生型 BphA4 の NADH に対する触媒能力の 92% の触媒効率を持つ NADPH 特異的高活性型 E175Q/T176R/Q177G 変異体 (CRG 変異体) を作製することに成功した。この変異体では、わずか 3 残基のアミノ酸残基置換を導入によって、基質特異性を約 20 万倍逆転することができた。また、CRG 変異体中の 3 つのアミノ酸残基置換を組み合わせた変異体を作製して基質特異性の変化を解析し、これら 3 残基の置換効果がほぼ独立的事であること、E175C 変異が NADH による還元速度を低下させること、また、T176R 変異が NADPH による還元速度を増加させることを明らかにした。さらに、CRG 変異体の特異性変換機構を明らかにする目的で NADPH との複合体の X 線結晶構造解析解析を行った。その結果、Cys¹⁷⁵ 側鎖が、NADPH のリボースの 5' -リン酸基を許容するスペースを生み出し、Arg¹⁷⁶ 側鎖が、NADPH のアデニン環に結合すると同時に 5' -リン酸基の負電荷を中和していることが明らかとなった。また、これら 3 か所のアミノ酸残基置換効果の独立性を利用して変異体を設計し、ほぼ予想通りの NADPH 特異性を持つ 2 つの変異体 (ARG 及び QRG 変異体) を作製することができた。

これらの結果から、酵素分子、特に BphA4 と相同性の高いフェレドキシン還元酵素ファミリーのピリジンヌクレオチドに対する基質特異性的人為的変換を行う上で有用な知見が得られた。

(2) BphA 遺伝子群導入シアノバクテリア株のベンゼン、トルエン分解活性の確認

前記 2 (2) の方法で、BphA3 と BphA1A2 遺伝子を導入した *Synechocystis* PCC6803/pVEA123 株のベンゼンおよびトルエンの水酸化活性を GC-MS でしらべた。その結果、ベンゼンを基質とした場合には、水酸基が 2 つ導入されたジヒドロキシベンゼンの TMS 誘導体の分子量を示すガスクロマト (GC) ピーク、また、トルエンを基質とした場合には、水酸基が 2 つ導入されたジヒドロキシトルエンの TMS 誘導体の分子量を示すガスクロマト (GC) ピークがそれぞれ検出された。これによって、*Acidovorax* sp. KKS102 株の BphA 遺伝子をシアノバクテリアに導入することによってビフェニルだけでなく、ベンゼン、トルエンも水酸化できることが確認できた。

(3) NADPH 特異的高活性型 CRG 変異体遺伝子によるビフェニル水酸化活性の改善効果

BphA1A1, A3 に加えて、CRG 変異体遺伝子導入したシアノバクテリア株を作製してビフェニルの水酸化活性を測定したが、活性に大きな改善は見られなかった。シアノ

バクテリアを用いてビフェニル分解を行うためには、NADPH 特異的 BphA4 変異体を導入するよりも、シアノバクテリア細胞内の BphA3 への電子供給系を利用するほうが実際的であることが判明した。

(4) BphA, B, C, D 遺伝子導入シアノバクテリア株の作製とビフェニル分解活性

上記 1 で述べたように、ビフェニル分解菌 *Acidovorax* sp. KKS102 株ではビフェニルは BphA, B, C, D によって安息香酸にまで分解されて代謝される。シアノバクテリアを用いてビフェニルを安息香酸まで分解できるかどうかを検証するために、シアノバクテリアに BphA, B, C, D 遺伝子を組み込んだ *Synechocystis* sp. PCC6803/pVABCD6 株を作製して、上記 3(3)の方法で培養液中のビフェニルと安息香酸濃度の経時変化をしらべた。その結果、ビフェニル添加後約 30 min でビフェニルは消失し、安息香酸濃度が 120 min 後まで徐々に増加した。この結果から、シアノバクテリアに Bph 遺伝子群を導入することにより、ビフェニルを安息香酸まで分解できることが明らかとなった。

(5) ダイオキシン類分解性新規シアノバクテリア株の作製とダイオキシン類の分解活性の確認

ダイオキシン類の水酸化活性を持つラットシトクロム P450 (rCYP1A1) 遺伝子と、CYP1A1 による水酸化に必要な電子を供給するための NADPH 特異的ヒトシトクロム P450 還元酵素 (hCPR) 遺伝子を導入して発現させた大腸菌の膜画分に NADPH を添加することによってダイオキシン類を水酸化することができることが知られている。この分解系シアノバクテリアに組み込めば、NADPH 添加なしで貧栄養環境下でのダイオキシン分解が可能になると考えられる。そこで、シアノバクテリアにおいてもこれらの遺伝子に導入によってダイオキシン類を水酸化できるかどうかを明らかにするために、hCPR と rCYP1A1 遺伝子を導入したシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803/pVLYPR 株を作製して、ダイオキシン類のひとつである 2-CDD が水酸化されるかどうかをしらべた。その結果、2-CCD を添加した PCC6803/pVLYPR 株培養液中に、水酸化 2-CDD の分子量と一致する 234 m/z のピークが GC-MS で観測され、2-CDD の水酸化が確認できた。これにより貧栄養環境下でシアノバクテリアを用いてダイオキシン類を効率的に分解できることを明らかにした。また、以外にも rCYP1A1 遺伝子のみを導入したシアノバクテリアでは、hCPR 遺伝子が無いにも関わらず、2-CDD の水酸化物が検出された。このことからシアノバク

テリア細胞中に CYP1A1 への電子供給経路の存在が示唆された。

(6) シアノバクテリア細胞内にある BphA3 への電子供給体の探索

上記 1 で述べたように、シアノバクテリア *Synechocystis* PCC6803 細胞中には、*Acidovorax* KKS102 株由来 BphA3 への電子供給系が存在する。そこでまず、シアノバクテリアの光合成系フェレドキシン還元酵素 (FNR) が BphA3 に電子を供給できるかどうかをしらべた。シアノバクテリア FNR には長鎖型の FNR_L と、FNR_L の N 末端側が欠失した短鎖型 (FNR_S) とが存在する。大腸菌を用いて遺伝子組換え型 FNR_L と FNR_S を作製して BphA3 還元活性をしらべた。その結果、両者とも BphA3 還元活性を示すものの、電子伝達効率は BphA4 の 1/100 程度であった。このことは、FNR 以外にも BphA3 への電子供給体が存在する可能性を示唆している。引き続き FNR 以外の電子供給系の探索・同定を進める必要がある。

以上のように本研究では、シアノバクテリア *Synechocystis* PCC6803 株に、ビフェニル分解酵素群遺伝子や rCYP1A1 遺伝子を導入して、ビフェニル、ベンゼン、トルエンやダイオキシン類を水酸化できることを明らかにした。この結果は、貧栄養環境下でのバイオレメディエーションにシアノバクテリアが有用であることを示すものである。また、*Synechocystis* PCC6803 株細胞中には、BphA3 や CYP への電子供給系が存在しており、FNR は BphA3 への電子供給体のひとつであることが示唆された。今後、この電子供給系の全貌を解明して利用することができれば、さらに多様な芳香族性環境汚染物質を効率的に分解できる新規シアノバクテリア株を作製できると期待される。

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 3 件)

- ① Hasegawa, M., Nishizawa, A., Tsuji, K., Kimura, S., Harada, K. (2012) Volatile Organic Compounds Derived from 2-Keto-acid Decarboxylase in *Microcystis aeruginosa*. *Microbes and Environment*, **27**, 525-528, 査読有 doi:10.1264/jsme2.ME12099
- ② Nishizawa, A., Nakayama, M., Uemura, T., Fukuda, Y., Kimura, S. (2010) Ribosome-binding site interference caused by Shine-Dalgarno-like nucleotide sequences in *Escherichia coli* cells. *J. Biochem.* **147**, 433-443, 査読有

doi: 10.1093/jb/mvp187

- ③ 西澤明人, 千田美紀, 千田俊哉, 菓子野康浩, 福田雅夫, 木村成伸「貧栄養下で芳香族化合物を分解できる新規光合成微生物」ケミカルエンジニアリング, 54巻, 785-791, 2009, 査読無
URL:<http://www.kako-sha.co.jp/volchem.html>

[学会発表] (計28件)

- ① 立原由佳, 西澤明人, 原田彩佳, 千田美紀, 千田俊哉, 福田雅夫, 木村成伸, 「NADH認識ループへの独立的変異の組み合わせ導入によるBphA4の特異性変換」, 第85回日本生化学会大会, 2012.12.16 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
- ② 池田未来, 大塚朱理, 根本紘和, 西澤明人, 木村成伸, 「シアノバクテリアのSD配列非依存的遺伝子の5'-非翻訳領域コンセンサス塩基配列の遺伝子発現への影響」, 第85回日本生化学会大会, 2012.12.15 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
- ③ 池田未来, 大塚朱理, 木村成伸, 「シアノバクテリアのSD非依存的遺伝子発現用プラスミドの作製」第23回日本化学会関東支部茨城地区研究交流会, 2012.11.30, 日立シビックセンター
- ④ 立原由佳, 森重政, 西澤明人, 千田美紀, 千田俊哉, 木村成伸, 「部位特異的ランダム変異導入によるNADPH特異的BphA4の探索」第23回日本化学会関東支部茨城地区研究交流会, 2012.11.30, 日立シビックセンター
- ⑤ 山田貢, 玉田太郎, 松本富美子, 竹田一旗, 木村成伸, 黒木良太, 三木邦夫, 「シトクロム b_5 還元酵素反応中間体のX線結晶構造解析」第12回日本蛋白質科学会年会, 2012.06.22, 名古屋国際会議場
- ⑥ 大塚朱理, 中山実樹, 西澤明人, 千田美紀, 千田俊哉, 菓子野康浩, 福田雅夫, 木村成伸, 「NADPH特異的高活性BphA変異体導入*Synechocystis* sp. PCC6803株のビフェニル分解活性」, 第22回日本化学会関東支部茨城地区研究交流会, 2011.11.04, いばらき量子ビーム研究センター
- ⑦ 木村成伸, 西澤明人, 杉山敬亮, 森成政, 千田美紀, 千田俊哉, 福田雅夫, 「NADH認識ループ変換によるフェレドキシン還元酵素BphA4のNADH/NADPH特異性の逆転」, 第22回日本化学会関東支部茨城地区研究交流会, 2011.11.04, いばらき量子ビーム研究センター
- ⑧ 原田彩佳, 千田美紀, 杉山敬亮, 西澤明人, 福田雅夫, 木村成伸, 千田俊哉, 「フェレドキシン還元酵素BphA4のNADH/NADPH特異性的変換の構造的基盤」, 第84回日本生化学会大会, 2011.09.23,

国立京都国際会館

- ⑨ 千田美紀, 西澤明人, 木村成伸, 石田哲夫, 福田雅夫, 千田俊哉, 「フェレドキシン還元酵素BphA4の反応サイクルの解析」, 第84回日本生化学会大会, 2011.09.23, 国立京都国際会館
- ⑩ 大塚朱理, 中山実樹, 西澤明人, 千田美紀, 千田俊哉, 菓子野康浩, 福田雅夫, 木村成伸, 「NADPH特異的高活性BphA変異体遺伝子導入*Synechocystis* sp. PCC6803株のビフェニル分解活性」, 第84回日本生化学会大会, 2011.09.22, 国立京都国際会館
- ⑪ Kimura, S., Nishizawa, A., Sugiyama, K., Mori, S., Senda, M., Senda, T., Fukuda, M., Inversion of NADH/NADPH-specificity of an oxygenase-coupled NADH-dependent ferredoxin reductase BphA4 by replacing successive three amino acid residues on the NADH-recognition loop, 17th International Symposium on Flavins and Flavoproteins, IUBMB S13/2011, 2011.07.28, UC Berkeley, USA
- ⑫ 杉山敬亮, 西澤明人, 千田美紀, 千田俊哉, 福田雅夫, 木村成伸, 「E175C/T176R/Q177G-BphA4変異体のNADPH特異性獲得機構」, 第11回日本蛋白質科学会年会, 2011.06.07, ホテル阪急エキスポパーク
- ⑬ 中山実樹, 西澤明人, 千田美紀, 千田俊哉, 菓子野康浩, 福田雅夫, 木村成伸, 「ビフェニル分解性シアノバクテリア*Synechocystis* sp. PCC6803株細胞内でのBphA3への電子伝達経路の探索」, 第33回日本分子生物学会年会第83回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010), 2010.12.09, 神戸国際会議場
- ⑭ 西澤明人, 中山実樹, 千田美紀, 千田俊哉, 菓子野康浩, 福田雅夫, 木村成伸, 「貧栄養環境下で芳香族化合物を分解できる新規光合成微生物」, 第33回日本分子生物学会年会第83回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010), 2010.12.09, 神戸国際会議場
- ⑮ 杉山敬亮, 西澤明人, 千田美紀, 千田俊哉, 福田雅夫, 木村成伸, 「*Acodovorax* KKS102株由来BphA4のGlu¹⁷⁵, Thr¹⁷⁶, Gln¹⁷⁷の置換の組み合わせがNADPH/NADH特異性の変化に及ぼす影響」, 第21回日本化学会関東支部茨城地区研究交流会, 2010.11.05, 日立市多賀市民会館
- ⑯ 中山実樹, 西澤明人, 浅井翔太, 千田美紀, 千田俊哉, 菓子野康浩, 福田雅夫, 木村成伸, 「シアノバクテリア*Synechocystis* sp. PCC6803株細胞内におけるBphA3への電子伝達経路の探索」, 第21回日本化学会関東支部茨城地区研究交流会, 2010.11.05,

- 日立市多賀市民会館
- ⑰ 杉山敬亮, 西澤明人, 千田美紀, 千田俊哉, 福田雅夫, 木村成伸, 「*Acidovorax* KKS102株由来BphA4のGlu¹⁷⁵, Thr¹⁷⁶, Gln¹⁷⁷の置換の組み合わせがNADPH/NADH特異性の変化に及ぼす影響」, 第21回日本化学会関東支部茨城地区研究交流会, 2010. 11. 05, 日立市多賀市民会館
- ⑱ 千田美紀, 西澤明人, 木村成伸, 福田雅夫, 石田哲夫, 千田俊哉, 「フェレドキシン還元酵素BphA4のpHに依存した構造変化の違い」, 第10回日本蛋白質科学会年会, 2010. 06. 18, 札幌コンベンションセンター
- ⑲ 中山実樹, 西澤明人, 浅井翔太, 千田美紀, 千田俊哉, 菓子野康浩, 福田雅夫, 木村成伸, 「*Synechocystis* sp. PCC6803株由来フェレドキシン還元酵素によるBphA3の還元」, 第10回日本蛋白質科学会年会, 2010. 06. 17, 札幌コンベンションセンター
- ⑳ 杉山敬亮, 西澤明人, 千田美紀, 千田俊哉, 福田雅夫, 木村成伸, 「*Acidovorax* sp. KKS102株由来BphA4のThr¹⁷⁶置換がNADPH/NADH特異性に及ぼす影響」, 第10回日本蛋白質科学会年会, 2010. 06. 17, 札幌コンベンションセンター
- ㉑ 西澤明人, 杉山敬亮, 有川淳, 千田美紀, 千田俊哉, 菓子野康浩, 福田雅夫, 木村成伸, 「貧栄養環境下で芳香族化合物を分解できる新規光合成微生物」, 第32回日本分子生物学会年会, 2009. 12. 12, パシフィコ横浜
- ㉒ 中山実樹, 西澤明人, 木村成伸, 「RBS干渉による遺伝子組み換え型不溶性タンパクの減少」, 第32回日本分子生物学会年会, 2009. 12. 10, パシフィコ横浜
- ㉓ 有川淳, 西澤明人, 生城真一, 木村成伸, 「CYP1A1およびCPR遺伝子発現*Synechosystis* sp. PCC6803株によるダイオキシンの水酸化」, 第32回日本分子生物学会年会, 2009. 12. 10, パシフィコ横浜
- ㉔ 中山実樹, 西澤明人, 木村成伸, 「リボソーム結合部位 (RBS) 干渉による大腸菌での発現制御」, 第20回日本化学会関東支部茨城地区研究交流会, 2009. 11. 06, 日立市多賀市民会館
- ㉕ 西澤明人, 杉山敬亮, 有川淳, 千田美紀, 千田俊哉, 福田雅夫, 木村成伸, 「フェレドキシン還元酵素BphA4のNADH結合ループへの変異導入による補酵素特異性の変換」, 第82回日本生化学会大会, 2009. 10. 22, 神戸市ポートアイランド
- ㉖ 有川淳, 西澤明人, 飯泉佳子, 千田美紀, 千田俊哉, 福田雅夫, 木村成伸, 「*Acidovorax* sp. KKS102由来BphA4二量体のサブユニット間接触部位改変による単量体化」, 第82回日本生化学会大会, 2009. 10. 22, 神戸市ポートアイランド

- ㉗ 中山実樹, 西澤明人, 木村成伸, 「リボソーム結合部位 (RBS) 干渉による大腸菌での遺伝子発現阻害」, 日本生化学会関東支部例会, 2009. 06. 20, つくば国際会議場
- ㉘ 西澤明人, 中山実樹, 福田 祥之, 上村卓哉, 佐野智亜記, 上野恵理, 木村成伸, 「リボソーム結合部位 (RBS) 干渉による大腸菌での遺伝子発現制御」, 第9回日本蛋白質科学会年会, 2009. 05. 22, 熊本全日空ホテルニュースカイ

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: 芳香族化合物分解能を有する光合成生物および芳香族化合物の分解方法

発明者: 木村成伸, 西澤明人, 菓子野康浩, 福田雅夫

権利者: 国立大学法人茨城大学

種類: 特許

番号: 特願2010-13334

出願年月日: 平成22年1月22日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページアドレス

<http://info.ibaraki.ac.jp/Profiles/12/0001143/profile.html>

http://www.biochem.ibaraki.ac.jp/05_kimura.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 成伸 (KIMURA SHIGENOBU)

茨城大学・工学部・教授

研究者番号: 90291608

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

五十嵐 淑郎 (IGARASHI SYUKUROU)

茨城大学・工学部・教授

研究者番号: 70150258

生城 真一 (IKUSHIRO SHIN-ICHI)

富山県立大学・工学部・准教授

研究者番号: 50244679

千田 俊哉 (SENDA TOSHIYA)

高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・教授

研究者番号: 30272868