

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 3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570143

研究課題名（和文）

ラジカル酵素システムの動作原理の解明－酵素研究の新しいパラダイムを求めて－

研究課題名（英文） Studies of action mechanisms of radical enzyme systems
for providing new paradigms of enzyme researches

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・特命教授

研究者番号：70026318

研究成果の概要（和文）：

これからの酵素科学はどこへ向かうのであろうか。本研究では、(1)生物の知恵に学ぶシステム酵素学と、(2)理論化学との連携による酵素学の非経験的学問化、が今後の酵素研究に重要なパラダイムであると考えて、ラジカル酵素システムを研究対象として、これらの方向への展開を目指した。酵素本体と(再)活性化蛋白質とを生化学、遺伝子工学、生物物理学、X線結晶学、理論化学の方法論を駆使して研究した結果、新しい眼界が拓かれた。

研究成果の概要（英文）：

Where should enzyme sciences be directed? I believe that (1) microbe-inspired system enzymology and (2) Non-empirical enzyme study in cooperation with theoretical chemists provide important paradigms of future enzyme researches. In this research project, our investigations of radical enzymes and their (re)activating proteins using the methodologies of biochemistry, genetic engineering, biophysics, X-ray crystallography, and theoretical chemistry opened a new horizon on enzyme sciences.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：(1)ラジカル酵素、(2)B₁₂補酵素、(3)*S*-アデノシルメチオニン、(4)酵素反応機構、(5)再活性化因子、(6)活性化蛋白質、(7)立体構造、(8)システム酵素学

1. 研究開始当初の背景

遺伝子工学と構造生物学の時代を経て、酵素学もまたこれまでにない発展と深化を遂げている。ではこれからの酵素科学はどこへ向かうのであろうか。本研究代表者は、(1)生物の知恵に学ぶシステム酵素学と、(2)理論化学との連携による酵素学の非経験的学問化、が2つの重要な方向であると考えている。本研

究では、酵素研究の新しいパラダイムを求めて、これらの方向への突破口を開くことを目指す。研究対象としたのは、まだ未解明の点が多いラジカル酵素システムである。ラジカルは反応性が極めて高く、制御困難な化学種とされているが、ある種の蛋白質はこれを利用して化学的に困難な反応を触媒している。これらはラジカル酵素と呼ばれ、反応性が高い反面、超活性種を含むため副反応により失

活し易い。生体内には、ラジカルを厳密に制御しつつ反応させる酵素本体に加えて、ラジカルの導入・再生に関与する蛋白質、さらにはラジカル反応のための補酵素を再生する蛋白質も存在し、これらが不安定なラジカル酵素の活性を維持するシステムを構成している。微生物では酵素本体と活性維持システムを構成する蛋白質が同じオペロンにコードされていることが多い。

2. 研究の目的

本研究では、生物の知恵に学ぶべく、ラジカル酵素本体と活性維持システムとから成るラジカル酵素システムの動作原理を深く解明すると共に、化学工業等においてラジカル酵素を活用するための基盤技術を開発する。具体的には、これまで深く研究してきたラジカル酵素の他に、未知のラジカル酵素も探索し、各型の代表的な酵素を研究対象とする。これらとその活性維持に関わる蛋白質群であるラジカル導入・再生蛋白質およびラジカル補酵素再生蛋白質とをシステムとして捉え、生化学および生物物理学の手法で機能を解析する。また、それら単独あるいは複合体の立体構造を解析し、システムの動作原理を立体構造に基づいて精密に解明する。さらに、ラジカル酵素の触媒機構を理論化学の手法を用いて検証し、分子工学的改変を行うための指針を非経験的に得る方法を開発する。これらにより、ラジカル酵素システム応用のための基盤技術と、酵素研究の新しいパラダイムが生まれることが期待される。

3. 研究の方法

(1) ラジカル酵素本体と精密触媒機構に関する生化学的ならびに構造生物学的研究

コファクター由来ラジカル酵素として、 B_{12} 関与ラジカル酵素であるエタノールアミンアンモニアリアーゼ (EAL)、ジオールデヒドラーターゼ (DD)、および蛋白質由来ラジカル酵素として、新機能グリシルラジカル酵素であると予測されていたピルビン酸ギ酸リアーゼ関連蛋白質 Pf1D と Pf1F とを研究対象とする。触媒機構に関する情報を得るため、基質アナログや補酵素アナログが結合したリガンド結合型の結晶化を行い、X 線結晶解析を行う。その構造に基づいて、生成する触媒ラジカルの位置の推定を行う。必要なら変異型酵素も用いる。

これまで詳細に研究してきた B_{12} 関与酵素 DD に対してと同様に、生化学的研究法や、ラジカルに関して最も直接的な情報を与える電子スピン共鳴、ストップフロー法など生物

物理学的研究法を駆使してこれらのラジカル酵素の触媒機構を明らかにする。これらの結果と、立体構造およびモデリング、変異導入実験の結果を総合して、精密触媒機構と活性部位残基の機能を推定する。これまでの B_{12} 酵素に関する研究結果と本研究の成果とを総合して、ラジカル酵素一般に通用する触媒原理を確立する。活性型のラジカル酵素は酸素分子 O_2 と反応して不活性化されるものが多いが、本研究では、 B_{12} 酵素はアポ酵素として大量精製し、必要な時に補酵素を加えて活性型ホロ酵素に転換するので、不安定性の問題はない。グリシルラジカル酵素は前駆体蛋白質として精製し、別に精製した *S*-アデノシルメチオニン (SAM) 関与活性化蛋白質を作用させてラジカルを導入し活性測定や機能解析を行うので、この場合も不安定性の問題を回避できる。

(2) ラジカル酵素の反応機構と分子工学的改変に関する理論化学的研究

これまでに吉澤らとの共同研究により、活性部位アミノ酸残基は量子力学 (QM) 計算によって取り扱い、周辺環境は分子力学 (MM) 計算によって取り込むといういわゆる QM/MM 法による理論化学計算を B_{12} 関与ジオールデヒドラーターゼ (DD) 反応について行い、また、特定のアミノ酸残基を別の残基に置き換えて計算し、野生型の結果と比較するという手法 (計算化学的変異導入法と名付けた) を考案し、活性部位アミノ酸残基の機能を非経験的に解析できることを世界に先駆けて示してきた。本研究では、DD の基質結金属イオンの同定とその触媒における役割を理論化学的に検証する。また、理論化学との連携の次の段階として、酵素を分子工学的に改変するための指針を非経験的に得ることができかどうかを検討する。すなわち、全原子モデルを用いた計算により、ラジカルの反応性、安定性に対する活性部位アミノ酸残基の官能基の効果を予測し、その予測に基づいて計算化学的変異を導入し、変異型酵素の特異性や反応性、安定性を計算により非経験的に予測する。実際に変異型酵素を遺伝子工学的に調製してそれらの性質を実測し、予測値と実測値との比較により非経験的に得た指針の正しさを検証する。

(3) ラジカル酵素の(再)活性化蛋白質と活性維持システムの動作原理に関する生化学的研究

ラジカル酵素の(再)活性化蛋白質およびこれを含む活性維持システムの動作原理を精密

に解明することを目指す。B₁₂ 酵素再活性化蛋白質は、ホロ酵素が不活性化されたときに酵素に固く結合したままになっている損傷補酵素をインタクトな補酵素と交換させることで活性部位にラジカルを再生させる。我々が発見したジオールデヒドラターゼ再活性化因子 (DD-R) とエタノールアミンアンモニアリアーゼ再活性化因子 (EAL-R)、およびメチルマロニル CoA ムターゼの再活性化因子である可能性のある YgfD が主たる研究対象である。また、S-アデノシルメチオニン (SAM) 関与活性化蛋白質は、SAM から生じたラジカルが酵素前駆体のグリシン残基から水素原子を引き抜くことで、直接的にグリシルラジカルを導入する。この例として Pf1C と Pf1E とを対象として選ぶ。さらに、損傷補酵素を修復する B₁₂ 補酵素再生系酵素であるコバラミンレダクターゼ PduS およびアデノシル化酵素 PduO も研究対象とする。これらの活性維持蛋白質について、柴田との共同研究によりリガンド結合型の X 線結晶解析を目指すとともに、生化学および生物物理学の手法、変異導入実験等を駆使してラジカルの導入・再生機構を調べ、ラジカル酵素システムの精密動作原理を解明する。

4. 研究成果

(1) ラジカル酵素本体と精密触媒機構に関する生化学的ならびに構造生物学的研究

① ビタミン B₁₂ 補酵素関与エタノールアミンアンモニアリアーゼ

本研究の開始直前に我々は B₁₂ 補酵素関与ラジカル酵素である大腸菌エタノールアミンアンモニアリアーゼ (EAL) の遺伝子を高発現させて EAL を簡便に精製する方法を開発していた。野生型 EAL は溶解度が低く、高濃度で凝集し易いうえに不活性化を受け易かったので、結晶化が困難であった。しかし、アミノ (N) 末端側数十残基を欠失させた変異型 EAL は溶解度が高く、凝集や不活性化に抵抗性であった。そこで、この変異型 EAL とシアノコバラミンとの複合体を結晶化するための条件を検討し、確立した。

次に、この N 末端側数十残基欠失変異型 EAL とシアノコバラミンとの複合体の結晶構造解析に成功した。酵素は ($\alpha\beta$)₆ のサブユニット構造をとること、コバラミンは塩基配位型で結合することなどを示した。また、アデニルペンチルコバラミンとの複合体の構造も解き、モデリングにより補酵素の Co-C 結合活性化の機構やラジカルの基質への接近の機構を明らかにした。

EAL 反応の立体化学は実験的には他研究者により明らかにされていたが、その立体化学経路は長らく不明であった。本研究では、基質アナログである 2-アミノ-1-プロパノールの R 体および S 体と酵素との複合体の X 線構造を解析した。得られた立体構造と、モデリングによって求めた補酵素由来ラジカルの空間位置とを合わせて、標識実験の結果を説明できる EAL 反応の詳細な立体化学経路を解明することができた。

EAL の基質結合部位を構成するアミノ酸残基に部位特異的変異を導入した結果、Arg α 160、Gln α 162、Asn α 193、Glu α 287、Asp α 362 はいずれも触媒機能に必須の残基であることが分かった。変異型酵素を用いた生物物理学的測定により、補酵素の Co-C 結合の活性化や酵素反応中間体の安定化におけるこれらの残基の機能を解明した。

② ビタミン B₁₂ 補酵素関与ジオールデヒドラターゼ

B₁₂ 補酵素関与ジオールデヒドラターゼ (DD) は補酵素のアデニン部結合部位近傍と基質結合部位とに 2 つの金属イオンをもつ。本研究代表者らはこれらがどちらもカリウムイオンであると帰属していたが、後者の金属イオンは配位距離がむしろカルシウムイオンに近かった。原子吸光分析と詳細な生化学的解析の結果、基質結合に関与する金属イオンはカルシウムと再同定し、その役割を解明した。

DD はグリセロールにより機構依存的に不活性化を受ける。グリセロール結合型 DD-シアノコバラミン複合体の X 線結晶解析を行い、本酵素のグリセロールによる不活性化の詳細な機構を解明した。その結果に基づき、グリセロールによる不活性化を受け難い酵素を再設計した。実際に、設計通り活性部位残基である Ser α 301 あるいは Gln α 336 を Ala 残基で置換すると、グリセロールによる不活性化に抵抗性を示す酵素が得られた。また、これらの二重変異を導入した酵素は、より長鎖の 1,2-ジオールに作用するようになることを見出した。

③ ピルビン酸ギ酸リアーゼ関連グリシルラジカル酵素

B₁₂ 酵素以外の新機能ラジカル酵素として、ピルビン酸ギ酸リアーゼ関連ラジカル酵素と予測されていた大腸菌 Pf1D 蛋白質の大量調製法を確立した。その結晶化にも成功し、X 線構造を解析した結果、Pf1D はグリシルラジカル酵素であることが裏付けられた。

(2) ラジカル酵素の反応機構と分子工学的改変に関する理論化学的研究

① B₁₂ 補酵素関与ジオールデヒドラターゼ反応における金属イオンの触媒的役割

ジオールデヒドラターゼ (DD) の X 線結晶解析において、基質が直接配位している金属イオンは当初カリウムイオンと帰属された。しかし、全酵素モデルを用いた量子力学 (QM) / 分子力学 (MM) 計算の結果、配位距離からこれをカルシウムイオンとした方が X 線構造とよく合致することが理論的に予測された。カルシウムイオンはルイス酸性が強く、移動しない方の水酸基の Glu α 170 による脱プロトン化を促進し、Asp α 335 の反触媒的効果に打ち勝つことで、水酸基移動を促進することが理論計算により裏付けられた。

② ジオールデヒドラターゼのグリセロールによる機構依存的な不活性化の機構

ジオールデヒドラターゼ (DD) がグリセロールによって機構依的に不活性化されることが理論的に予測できるかどうかを調べた。グリセロールは DD に G_R コンホメーションで結合すると触媒作用を受け、G_S で結合すると DD の機構依的な不活性化を引き起こす。基質ラジカルから生成物ラジカルへの転位反応の活性化エネルギーは G_S の場合の方が高かった。また、Ser α 301 との水素結合により G_R からの遷移状態が安定化された。これらのことから、不活性化は G_S から起こることが理論化学的に説明できた。

(3) ラジカル酵素の(再)活性化蛋白質と活性維持システムの動作原理に関する生化学的研究

① ジオールデヒドラターゼの再活性化因子

我々が発見したジオールデヒドラターゼ再活性化因子 (DD-R) の作用機構を生化学的に詳細に解析し、DD-R が複数の酵素 (DD) 分子から損傷補酵素を解離させることにより触媒的に再活性化することを示す証拠を得た。よって、DD-R は「再活性化酵素 (reactivase)」とも呼ぶべき酵素であると結論した。また、酵素 DD と DD-R との間の複合体形成はサブユニットスワッピングによって起こることも明らかにした。

DD-R は 2 つの機能部位をもつ。すなわち、マグネシウムイオン結合部位は 2 つのサブユニットの界面にあり、サブユニット間の相互作用に関与する。また、ADP (ATP) 結合部位はヌクレオチドスイッチに関与する。これらの機能部位の構成アミノ酸残基に変異を導入すると、いずれの場合も再活性化因子としての機能が失われたことから、再活性化における両部位の重要性が明らかとなった。

② 活性維持システムによる B₁₂ 補酵素のリサイクリング

ジオールデヒドラターゼ (DD) には損傷補酵素の交換による再活性化機構とは別に、損傷補酵素の修復 (再生) による再活性化機構も存在することを発見した。これは交換促進因子であるジオールデヒドラターゼ再活性化因子 (DD-R) と補酵素再生系酵素 (コバラミンレダクターゼとアデノシル化酵素) とから構成されるシステムによるものであり、補欠分子族型補酵素である B₁₂ 補酵素 (アデノシルコバラミン; AdoCbl) がリサイクルして DD 活性が維持されることが明らかとなった。

③ メチルマロニル CoA ムターゼの再活性化因子

ヒトの B₁₂ 代謝システムの機能不全による代謝異常症は 8 つのクラスに分けられており、その中の 1 つである MMAA の遺伝的欠損はメチルマロン酸尿症を引き起こす。MMAA とホモロジーの高い大腸菌 YgfD 蛋白質が B₁₂ 補酵素関与メチルマロニル CoA ムターゼ (MCM) の再活性化因子 (MCM-R) として働くかどうかを調べた。その結果、YgfD は B₁₂ 補酵素、GTP、Mg²⁺ 存在下で不活性な MCM-メチルコバラミン (MeCbl) 複合体を再活性化すること、その際に、MCM と強固な複合体を形成して MeCbl を解離させることなどから、YgfD は MCM-R として働くことと結論した。したがって、ヒトでも YgfD のホモログである MMAA 蛋白質が MCM を再活性化することが強く示唆された。

④ ピルビン酸ギ酸リアーゼ関連グリシラジカル酵素の活性化蛋白質

ピルビン酸ギ酸リアーゼ関連新機能ラジカル酵素と予測されていた大腸菌 Pf1D、Pf1F のそれぞれの S-アデノシルメチオニン関与活性化蛋白質と予測された Pf1C、Pf1E の大量調製法を確立した。Pf1D と Pf1C の共発現株において、Pf1C により Pf1D へラジカルが導入されることが実証できた。

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)

① Yamanishi M, Kinoshita K, Fukuoka M, Tanokuchi A, Saito T, Ikeda Y, Shibata N, Tobimatsu T, Toraya T, Redesign of coenzyme B₁₂ dependent diol dehydratase to be resistant to the mechanism-based inactivation by glycerol and act on longer chain 1,2-diols, FEBS Journal, 査読有, 279, 2012, 793-804

DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08470.x.

② Doitomi K, Kamachi T, Toraya T, Yoshizawa K, Inactivation mechanism of glycerol dehydration by diol dehydratase from combined quantum mechanical/molecular mechanical calculations, *Biochemistry*, 査読有, 51, 2012, 9202-9210

DOI: 10.1021/bi300488u.

③ Shibata N, Higuchi Y, Toraya T, How coenzyme B₁₂-dependent ethanolamine ammonia-lyase deals with both enantiomers of 2-amino-1-propanol as substrates: structure-based rationalization, *Biochemistry*, 査読有, 50, 2011, 591-598
DOI: 10.1021/bi101696h.

④ Kamachi T, Doitomi K, Takahata M, Toraya T, Yoshizawa K, Catalytic roles of the metal ion in the substrate-binding site of coenzyme B₁₂-dependent diol dehydratase, *Inorganic Chemistry*, 査読有, 50, 2011, 2944-2952
DOI: 10.1021/ic102352b.

⑤ 虎谷 哲夫, 生物は超活性種をいかに活用するか: ビタミンB₁₂関与酵素とその活性維持システム、生化学、査読有、83, 2011, 591-608
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21866870> (PMID: 21866870)

⑥ Shibata N, Tamagaki H, Ohtsuki S, Hieda N, Akita K, Komori H, Shomura Y, Terawaki S, Toraya T, Yasuoka N, Higuchi Y, Expression, crystallization, and preliminary X-ray crystallographic study of ethanolamine ammonia-lyase from *Escherichia coli*, *Acta Crystallographica Section F*, 査読有, 66, 2010, 709-711
DOI: 10.1107/S1744309110014478.

⑦ Shibata N, Tamagaki H, Hieda N, Akita K, Komori H, Shomura Y, Terawaki S, Mori K, Yasuoka N, Higuchi Y, Toraya T, Crystal structures of ethanolamine ammonia-lyase complexed with coenzyme B₁₂ analogs and substrates, *Journal of Biological Chemistry*, 査読有, 285, 2010, 26484-26493
DOI: 10.1074/jbc.M110.125112.

⑧ Toraya T, Honda S, Mori K, Coenzyme B₁₂-dependent diol dehydratase is a potassium ion-requiring calcium metalloenzyme: evidence that the substrate-coordinated metal ion is calcium, *Biochemistry*, 査読有, 49, 2010, 7210-7217
DOI: 10.1021/bi100561m.

⑨ Mori K, Hosokawa Y, Yoshinaga T, Toraya T, Diol dehydratase-reactivating factor is a reactivase - evidence for multiple turnovers and subunit swapping with diol dehydratase, *FEBS Journal*, 査読有, 277, 2010, 4931-4943

DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07898.x.

⑩ 虎谷 哲夫, 微生物に学ぶビタミンB₁₂代謝のシステム酵素学、薬学雑誌、査読有、130, 2010, 1453-1462

https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/130/11/130_11_1453/_article

[学会発表] (計12件)

① 森 光一, ビタミンB₁₂補酵素関与エタノールアミンアンモニアリアーゼの基質結合アミノ酸残基の機能解析 (発表確定)、日本ビタミン学会第65回大会、2013年5月18日、一橋大学一橋講堂 (東京都)

② 飛松 孝正, 3種類の*Klebsiella oxytoca*コバラミン・アデノシルトランスフェラーゼに関する酵素化学的研究 (発表確定)、日本ビタミン学会第65回大会、2013年5月18日、一橋大学一橋講堂 (東京都)

③ 虎谷 哲夫, ジオールデヒドラターゼの活性維持システムによる補欠分子族型補酵素のリサイクリング、ビタミンB研究委員会第431回研究協議会、2013年2月2日、大阪大学中之島センター (大阪府)

④ 虎谷 哲夫, B₁₂補酵素関与ジオールデヒドラターゼのグリセロールによる不活性化の機構と不活性化抵抗性酵素の再設計、ビタミンB研究委員会第427回研究協議会、2012年2月4日、京都市国際交流会館 (京都府)

⑤ 田野口 亜耶, ジオールデヒドラターゼ活性維持システムの一員としてのPduO蛋白質の機能解析、第84回日本生化学会大会、2011年9月22日、国立京都国際会館 (京都府)

⑥ 大岩 敏宏, B₁₂補酵素関与エタノールアミンアンモニアリアーゼの活性部位アミノ酸残基の機能解析、第84回日本生化学会大会、2011年9月22日、国立京都国際会館 (京都府)

⑦ 森 光一, 大腸菌YgfD蛋白質のB₁₂補酵素関与メチルマロニルCoAムターゼの再活性化因子としての機能解析、日本ビタミン学会第63回大会、2011年6月5日、安田女子大学 (広島県)

⑧ 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精密触媒機構と立体化学経路、ビタミンB研究委員会第423回研究協議会、2011年2月5日、東京商工会議所ビル (東京都)

⑨ 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立体構造に基づく立体化学経路の解明、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、2010年12月7日、神戸国際展示場（兵庫県）

⑩ 森 光一、大腸菌YgfD蛋白質はB₁₂ 補酵素関与メチルマロニルCoAターゼの再活性化因子である、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、2010年12月7日、神戸国際展示場（兵庫県）

⑪ 虎谷 哲夫、B₁₂ 補酵素関与ジオールデヒドラターゼはカリウムイオン依存性のカルシウムメタロエンザイムである：基質結合金属イオンの再同定、ビタミンB研究委員会第422回研究協議会、2010年11月27日、京都市国際交流会館（京都府）

⑫ 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立体構造と変異導入に基づく触媒機構の解析、日本ビタミン学会第62回大会、2010年6月12日、いわて県民情報交流センター（岩手県）

〔図書〕（計3件）

① 虎谷 哲夫、講談社、改訂 酵素-科学と工学、2012、1-157

② 虎谷 哲夫、エヌ・ティー・エス、酵素利用技術大系、2010、99-105

③ 虎谷 哲夫、朝倉書店、ビタミン総合事典、2010、320-324、326-330、349-354

〔その他〕

<http://www.biotech.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・特命教授 (H22：教授)
研究者番号：70026318

(2) 研究分担者

飛松 孝正 (TOBIMATSU TAKAMASA)
(H22→H23, 24：連携研究者)
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)
(H22→H23, 24：連携研究者)
岡山大学・大学院自然科学研究科・助教
研究者番号：50379015

世良 貴史 (SERA TAKASHI)
(H23, 24)
京都大学・大学院工学研究科・准教授
(H23.5より岡山大学・大学院自然科学研究科・教授)
研究者番号：10362443

(3) 連携研究者

吉澤 一成 (YOSHIZAWA KAZUNARI)
九州大学・先導物質化学研究所・教授
研究者番号：30273486

柴田 直樹 (SHIBATA NAOKI)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准教授
研究者番号：30295753