

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：32641

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580119

研究課題名(和文)リパーゼ超誘導の分子機構解明と高立体選択性リパーゼの創製

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism of lipase super-induction and creation of high stereo-selective lipase.

研究代表者

石塚 盛雄(Ishizuka, Morio)

中央大学・理工学部・教授

研究者番号：50168241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：安定かつ高立体選択的リパーゼは、工業的利用の観点から注目されている。ステアリルアルコールの添加は、オリーブ油で生育させた場合に比べて、熱安定・高立体選択的リパーゼ活性の数十倍以上の増強をもたらした。リパーゼのみならず表面活性タンパク質(EliA)が多量に強く誘導、分泌した。我々の実験結果から、ステアリルアルコールのような難水溶性のリパーゼ超誘導剤の添加、EliAの誘導と分泌、分泌EliAによるステアリルアルコールの乳化と細胞内への取り込み、リパーゼ大量誘導と分泌の機構を提案することができる。この機構の応用により高立体選択的リパーゼを大量に得ることが可能になった。

研究成果の概要(英文)：Stable and high stereo-selective lipase has attracted attention from the viewpoint of industrial usage. As compared with the case where it was olive growing, the addition of stearyl alcohol resulted in enhanced several tens folds of thermo-stable and high stereo-selective lipase activity. Not only lipase but also surface active protein (EliA) was strongly induced in a large amount and secreted. From our experimental results, We can propose a model of lipase super-production system as follows: uptake of a small amount of lipase super-inducer, induction of EliA and secretion, emulsification of stearyl alcohol by EliA, uptake of a large amount of lipase super-inducer, and strong induction of lipase and secretion. It has become possible to obtain a large amount of high stereo-selective lipase by application of the mechanism.

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：応用微生物学

キーワード：脂質代謝 リパーゼ リパーゼ超誘導剤 高級アルコール 界面活性タンパク質 ポリエステル プロテオミクス タンパク質工学

1. 研究開始当初の背景

Pseudomonas 類似細菌由来リパーゼの一連のスーパーインデューサー群(ステアリアルアルコール等の高級アルコール類や長鎖エステル等)を発見した。リパーゼ・スーパーインデューサーは、既知のオリーブ油等による誘導とは桁違いの効果がある。更に、平成18~20年度には文部科学省科学研究費「萌芽研究」助成により、リパーゼ・スーパーインデューサー添加によるリパーゼ大量分泌(最大 2,500 U/ml, 約 1g/L)菌株のスクリーニングの成功に加えて、リパーゼと同程度以上の15kDa タンパク質、17kDa タンパク質の分泌現象も発見した。15kDa タンパク質は長鎖炭化水素や脂質の分解促進作用(乳化作用)を有し、久塚らによって見出された Protein activator 類似物と推定されるが、17kDa タンパク質の機能は不明である。この現象は、転写におけるセンサーキナーゼとレスポンスレギュレーターからなる二成分制御システムだけでは十分な説明はできないことがわかった。

以上の研究を踏まえて、*n*-アルカン等資化システムの中間代謝産物の高級アルコールが、これとは異なったトリグリセリド資化システムにおいて、トリグリセリドや脂肪酸より格段に優れたリパーゼ超誘導剤であるという現象の分子機構解明は、細菌細胞内外脂質のリピッドメタボロームや転写におけるセンサーキナーゼとレスポンスレギュレーターからなる二成分制御システムも含めて、リパーゼ・スーパーインデューサー作用ネットワーク機構の総合的解明の総合的理解の糸口となると考えるに至った。

また、このリパーゼ・スーパーインデューサーシステムを利用した、改良型高立体選択性リパーゼ大量分泌生産への応用は極めて有用であろう。今までに蓄積したタンパク質の熱や有機溶媒耐性、高次構造を再構成に関するデータを活用しつつ、リパーゼ・スーパーインダクションシステムを適用すれば、リパーゼに加えて他の有用タンパク質の大量生産も可能になると考えるに至った。反応溶媒系の工夫、蛋白工学、ランダム変異技術による耐熱化や反応特異性の改良については、多くの研究者によって蓄積されてきているが、リパーゼ・スーパーインデューサーによる *Pseudomonas* 類似細菌(リパーゼやラクトン特異的エステラーゼ遺伝子解析等により帰属済の *Pseudomonas* sp. NT-92、*Ralstonia* sp. NT-80 (NT-40))を含む)の超分泌作用を活用した、有機溶媒中でも安定で、純粋な有用タンパク質を迅速かつ大量に生産する研究は始まったばかりである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が見出したステアリアルアルコール等の高級アルコール類や長鎖エステル等のリパーゼ分泌超誘導剤(スーパーインデューサー)による *Pseudomonas* 類似

細菌(リパーゼやラクトン特異的エステラーゼ遺伝子解析等により帰属済の *Pseudomonas* sp. NT-92、*Ralstonia* sp. NT-80 (NT-40))を含む)のリパーゼ超分泌現象の分子機構解明とそれを活用した高立体選択性リパーゼの大量創製システムを構築することである。

研究期間内に明らかにしようとするのは以下の点である。

第1段階: リパーゼ・スーパーインデューサー作用ネットワーク機構の総合的解明

- 1) リパーゼ、P15 界面活性タンパク質超誘導(転写、翻訳、分泌レベル)の詳細を明らかにする。
- 2) リパーゼ、P15 タンパク質の発現・分泌効率制御因子と相互の関連性を解明する。
- 3) P17 タンパク質の機能同定と遺伝子の発現調節機構を解明する。

第2段階: このシステムを利用した、改良型高立体選択性リパーゼや他の一般有用タンパク質の大量分泌システム(コンビナトリアルシステム)確立

- 1) タンパク質工学や進化分子工学による改良型高立体選択性リパーゼの創製
- 2) 改良型高立体選択性リパーゼ遺伝子の本システムへの導入による大量分泌生産の確立
- 3) 既に改良に成功した熱安定・ラクトン特異的エステラーゼの大量分泌生産の確立

3. 研究の方法

(平成23年度)

1) リパーゼ超発現・分泌機構の解明:

Pseudomonas 類似細菌(リパーゼやラクトン特異的エステラーゼ遺伝子解析等により帰属済の *Pseudomonas* sp. NT-92、*Ralstonia* sp. NT-80 (NT-40))を含む)由来リパーゼ超発現・分泌への一連のスーパーインデューサー群の作用機構を分子レベルで明らかにする。リパーゼ遺伝子発現レベル(転写、翻訳)、膜の透過性等への寄与を特定する。研究分担者(赤沼)の研究の中心となる。二成分系転写制御に関わると考えられる転写活性化因子(TAF)の寄与度を調べる。並行して一成分系、ECF (extra cytoplasmic function) σ 因子の寄与度も測定する。翻訳レベルにおいては、リパーゼ遺伝子の非翻訳領域を付加した *gfp* 遺伝子の mRNA を *in vitro* で翻訳して GFP 蛍光検出により寄与度を調べる。膜の透過性については、誘導剤と転写・翻訳阻害剤存在下でリパーゼの分泌量の変動を調べる。

2) P15 界面活性タンパク質超発現・分泌機構の解明: (1) と同様に、*Pseudomonas* 類似細菌(リパーゼやラクトン特異的エステラーゼ遺伝子解析等により帰属済の *Pseudomonas* sp. NT-92、*Ralstonia* sp. NT-80 (NT-40))を含む)由来 P15 (15kDa) タンパク質超発現・分泌への一連のスーパーインデューサー群の作用機構を分子レベルで明らかにする。P15 タンパク質遺伝子発現レベル(転写、翻訳)、膜の透過性等への寄与を特定する。長鎖アルカンや

脂質の乳化作用を有するP15タンパク質の他の機能の有無も調べる。

3)リパーゼとP15界面活性タンパク質との共超発現・分泌ネットワークの予備検討：スーパーインデューサーによるリパーゼと界面活性保有P15(15kDa)タンパク質の共超分泌システムの検討を行い、次年度の詳細な解析に繋げる。

4)P17機能未知タンパク質の機能解明：酸素限定培養条件下で、リパーゼ・スーパーインデューサーの添加によって菌体外に大量分泌される機能未知のP17(17kDa)タンパク質の機能を解明する。

5)蛋白質工学による高立体選択性リパーゼの創製：部位特異的変異法により高立体選択性リパーゼの創製を試みる。この方法で十分な結果が得られない場合は、次年度に予定している分子進化工学的手法による高立体選択性リパーゼの創製を試みる。

(平成24年度)

1)共超発現・分泌ネットワークの統一的理解：平成23年度に判明したスーパーインデューサーによるリパーゼと界面活性保有P15(15kDa)タンパク質の相互関連性に、機能未知のP17(17kDa)タンパク質を加えて同様の検討を行い、超共分泌システムの統一的分分子機作を解明する。

2)分子進化工学による高立体選択性リパーゼの創製：平成23年度の部位特異的変異法で十分な高立体選択性リパーゼの創製を試みる。結果が得られない場合は、分子進化工学的手法による高立体選択性リパーゼの創製を試みる。本研究室では既にこの手法を用いた耐熱性ラクトン特異的エステラーゼの創製に成功している。改変リパーゼの不斉反応解析は牛尾連携研究者に協力してもらう。

3)超発現・分泌システムを用いた改良リパーゼの大量生産：リパーゼ超発現・分泌制御領域を付加した発現ベクターを構築して、改良された高立体選択性リパーゼ遺伝子を組み込み、アフィニティによる精製の為の工夫も行って、大量生産コンビナトリアルシステムを構築する。改変リパーゼの不斉反応解析は牛尾連携研究者に協力してもらう。

(平成25年度)

1)エステラーゼ等の非分泌タンパク質への超発現・分泌システムの応用：*Pseudomonas* 類似細菌由来のラクトン特異的エステラーゼは既に分子進化工学的手法により12°Cの熱安定性向上に成功しているため平成24年度の(3)で構築したリパーゼ超発現・分泌システムを適用する。改変エステラーゼ等の不斉反応解析は牛尾連携研究者に協力してもらう。

2)余裕があれば、超発現・分泌システムの大腸菌等の他菌種への移植を試みる。

4. 研究成果

平成23(2011)年度の研究成果は以下のと

おりである。リパーゼ(LipA)超誘導発現において、難水溶性のstearyl alcohol及び水溶性のBrij 98を培地に添加すると、LipA遺伝子の転写活性が非常に増大することが確認された。Brij 98の方がstearyl alcoholより早い段階でLipA遺伝子の転写が増加していた。LipA遺伝子転写促進因子が結合すると推定される反復配列を見出し、反復配列破壊実験による転写活性の減少が見出された。転写促進因子遺伝子候補のうちの1つの機能解析に成功した。翻訳阻害剤存在下で、Brij 98がLipAの菌体外への分泌を促していることが確認できた。P15界面活性タンパク質(EliA(effector protein of lipase induction)と命名)遺伝子の転写活性も、超誘導剤によって非常に高くなることが確認された。P15(EliA)遺伝子破壊株ではLipA分泌量が低下したが、精製P15(EliA)添加によりLipA生産が相補できることがわかった。P15(EliA)遺伝子とLipA遺伝子の転写調節領域の塩基配列相同性がほとんどないことから別の転写制御を受けていることが考えられる。P15(EliA)の機能を解明するため、P15(EliA)を大量発現させて精製し、その特性を評価した結果、溶液の表面張力を低下させる能力を確認した。LipAとP15(EliA)との共超発現・分泌ネットワークの予備検討のために、stearyl alcoholとBrij 98を用いて培養し、分泌タンパク質のプロテオーム解析を行った。LipA超誘導剤の添加によって菌体外に分泌される機能未知タンパク質(P17)についても、その機能の特定を試みた。部位特異的変異法によりLipAの熱安定性に関与すると推定されるアミノ酸残基の特定を行った。また、LipA特異的シャペロン固定化カラムを用いた相互作用によるLipA精製法を確立して、至適温度、至適pH、熱安定性を決定した。高立体選択性LipA創製が成功すれば、改変LipAの迅速な精製が可能になると期待できる。上記のように、平成23(2011)年度はおおむね順調に進行した。「研究の目的」の達成度について、平成23(2011)年度の研究実施計画に基づいて、リパーゼ、P15(EliA)界面活性タンパク質超誘導(転写、分泌レベル)の詳細が明らかになった。翻訳レベルについても検討した。リパーゼ遺伝子発現制御因子の1つを見出すことに成功した。超誘導剤を用いた培養分泌外液のプロテオーム解析を行い、「第1段階：リパーゼ・スーパーインデューサー作用ネットワーク機構の総合的解明」に向けた第1年目の結果を得ることができた。部位特異的変異法によりリパーゼの熱安定性に関与すると推定されるアミノ酸残基の特定を行った。また、リパーゼ特異的シャペロン固定化カラムを用いた相互作用によるリパーゼ精製法を確立して、至適温度、至適pH、熱安定性を決定した。次年度の高立体選択性リパーゼ創製の試みが成功すれば、迅速な精製が可能になると期待できる。これにより「第2段階：このシステムを利用した、改良型高

立体選択性リパーゼや他の一般有用タンパク質の大量分泌システム確立」に向けて第1歩を踏み出すことができた。

平成24(2012)年度は前年度までに解析されたリパーゼ超誘導剤添加時におけるリパーゼ(LipA)と界面活性保有15kDaタンパク質(EliA(effector protein of lipase induction))と命名)の相互関連性に、機能未知の17kDaタンパク質(P17)を加えて、超共分泌システムの統一的分子機作を解明するために、難水溶性高級アルコールのstearyl alcohol(SA)あるいは水溶性長鎖エーテルのpolyoxyethylene(20)oleyl ether(Brij 98)を添加して培養し、分泌タンパク質と膜タンパク質のプロテオーム解析を行った。二次元電気泳動とPeptide Mass Fingerprinting(PMF)法により各誘導条件下で特異的に発現する幾つかのタンパク質を同定することができ、この共超発現・分泌ネットワークの統一的理解が可能になると考えられる。P17については、タンパク質の分泌装置を構成するパーツと示唆されているタンパク質と高相同性があった。熱安定性を有するLipAはtert-butyl-3-acetoxybutanoateやphenethyl butanoate等に対する基質特異性が高かったが、部位特異的変異法に加えて分子進化学的手法による、更なる高立体選択性LipAの創製を試みている。遺伝子操作技術によりLipA高活性発現株の作製に成功した。この高発現株はstearyl alcoholあるいはBrij 98の添加により、野生株とほぼ同量のLipA超発現・分泌能力を有するが、SAの添加で超発現・分泌された高発現株由来LipAの比活性は野生株由来LipAの約15倍に達したことから、SAによってLipAの活性を高める新たな因子が誘導されていることが示唆され、LipA超発現・分泌システムとLipA高活性化システムの組み合わせによる大量生産コンビナトリアルシステム構築の目的が立ったと言える。上記のように、平成24(2012)年度はおおむね順調に進行した。「研究の目的」の達成度について、平成24(2012)年度の研究実施計画に基づいてリパーゼ(LipA)と界面活性保有15kDaタンパク質(EliA)の超誘導システムの詳細と相互の関連性に加えて、17kDaタンパク質(P17)の機能の一端が明らかになった。超誘導剤を用いた培養分泌外液と膜タンパク質のプロテオーム解析を行い「第1段階：リパーゼ・スーパーインデューサー作用ネットワーク機構の総合的解明」に向けた第2年目の結果を得ることができた。更に、遺伝子操作技術により作製したLipA高活性発現株では、stearyl alcohol(SA)の添加で超発現・分泌された高発現株由来LipAの比活性は野生株由来LipAの約15倍に達したことから、SAによってLipAの活性を高める新たな因子が誘導されていることが示唆され、超発現・分泌システムと高活性化システムによる大量生産コンビナトリアルシステム構築の目的が立ったと言える。これにより「第2段階：

このシステムを利用した、改良型高立体選択性リパーゼや他の一般有用タンパク質の大量分泌システム確立」への着実な進展があった。

平成25(2013)年度は前年度までの研究成果に加えて、以下の研究成果を得た。難水溶性の高級アルコールを誘導剤として用いた場合、P15界面活性タンパク質(EliA)遺伝子破壊株ではリパーゼ分泌量が著しく低下したが、P15(EliA)遺伝子補完株では回復した。このP15界面活性タンパク質(EliA)がEliA(effector protein of lipase induction)の名称で、FEMS Microbiology Letter誌に掲載されたが、更にEliA(P15)の構造と機能の詳細を明らかにするために、ドイツ、フライブルク大学のOliver Einsle教授とEliA(P15)の結晶化と構造解析に関する共同研究を開始した。EliA(P15)の結晶を得ることが出来、X線回折実験により2.1~3.0Åの解像度を得られた。高相同性配列を有するタンパク質あるいはペプチドのX線結晶解析がなされていないので、位相を特定するために重原子置換法、あるいはSe-Met置換タンパク質創製法を試みている。リパーゼ遺伝子とEliA遺伝子(eliA)の転写調節領域の塩基配列相同性がほとんどないことから別の転写制御を受けていると示唆された。リパーゼ超誘導剤添加時におけるLipA(リパーゼ)とEliA(P15)の超共分泌システムの統一的分子機作を解明するために、難水溶性高級アルコールあるいは水溶性長鎖エーテルを添加して培養し、分泌タンパク質、膜タンパク質、細胞質タンパク質のプロテオーム解析を行った。二次元電気泳動とPeptide Mass Fingerprinting(PMF)法により各誘導条件下で特異的に発現する幾つかのタンパク質を同定することができ、この共超発現・分泌ネットワークの統一的理解が可能になると考えられる。Stearyl alcohol(SA)などの難水溶性高級アルコールを誘導剤として用いて、*Ralstonia* sp. NT-80菌を培養した場合には、ポリエステルの(PHB)と多糖が蓄積したが、EliA欠損(eliA)株では蓄積しなかったため、脂質代謝におけるEliAの更なる重要性が示唆された。

本助成研究により、リパーゼ・スーパーインデューサー作用のより詳細な分子機構解明と応用への糸口を開くことができた。

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5件)

- 1) Genki Akanuma, Shota Suzuki, Koichi Yano, Hideaki Nanamiya, Yousuke Natori, Eri Namba, Kazuya Watanabe, Kazumi Tagami, Takuya Takeda, Yuka Iizuka, Ako Kobayashi, Morio Ishizuka, Hirofumi Yoshikawa, and Fujio Kawamura: Single mutations introduced in the essential ribosomal proteins L3 and S10 cause sporulation defect

- in *Bacillus subtilis*. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, 59(2), 105-117, 2013.
- 2) Genki Akanuma, Hayato Ishibashi, Takahiro Miyagawa, Rie Yoshizawa, Sarotu Watanabe, Yu Shiwa, Hirofumi Yoshikawa, Kazutoshi Ushio, and Morio Ishizuka: EliA facilitates the induction of lipase expression by stearyl alcohol in *Ralstonia* sp. NT80. **FEMS Microbiol. Lett.**, 339(1), 48-56, 2013.
 - 3) Genki Akanuma, Hideaki Nanamiya, Yoshihiro Mouri, Morio Ishizuka, and Yasuo Ohnishi: Proteomic analysis of the *Streptomyces griseus* ribosomal fraction. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 76(12), 2267-2274, 2012.
 - 4) Genki Akanuma, Hideaki Nanamiya, Yousuke Natori, Koichi Yano, Shota Suzuki, Shuya Omata, Morio Ishizuka, Yasuhiko Sekine, and Fujio Kawamura : Inactivation of ribosomal protein genes in *Bacillus subtilis*: importance of each ribosomal protein for cell proliferation, as well as cell differentiation. **J. Bacteriol.**, 194(22), 6282-6291, November 2012.
 - 5) Jumpei Hayakawa and Morio Ishizuka : Temperature-dependent self-splicing group I introns in the flagellin genes of the thermophilic *Bacillus* species. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 76(2), 410-413, 2012.
- [学会発表](計 24件)
- 1) Tomohiko Ohta, Yusuke Iwama, Wataru Tsukimura, Genki Akanuma, and Morio Ishizuka : Functional analysis of the lactone-specific esterase in *Ralstonia* sp. NT80. The 5th Congress of European Microbiologists (FEMS 2013), Leipzig, Germany, July 21-25, 2013
 - 2) Yuuki Mizuno, Mami Sekiya, Genki Akanuma, Kazutoshi Ushio and Morio Ishizuka : Transcriptional analysis of lipA and eliA genes induced by stearyl alcohol in *Ralstonia* sp. NT80. The 5th Congress of European Microbiologists (FEMS 2013), Leipzig, Germany, July 21-25, 2013
 - 3) Genki Akanuma, Hayato Ishibashi, Takahiro Miyagawa, Rie Yoshizawa, Satoru Watanabe, Yu Shiwa, Hirofumi Yoshikawa, Kazutoshi Ushio, and Morio Ishizuka : EliA facilitates the induction of lipase expression by stearyl alcohol in *Ralstonia* sp. NT80. The 5th Congress of European Microbiologists (FEMS 2013), Leipzig, Germany, July 21-25, 2013
 - 4) Ishizuka, M., Ishibashi, H., Miyagawa, T., Osawa, R., Sekiya, M., Katagiri, R., Yoshizawa, R., Sato, N., Yamaguchi, M., Akanuma, G., and Ushio, K. : Role of lipase super-inducers in co-super-production system of lipase and surface-active protein from *Pseudomonas*-like bacteria. World Congress on Oleo Science (WCOS 2012) & 29th ISF Congress-JOCS / AOCS / KOCS / ISF Joint Meeting, Sasebo, Japan, September 30 – October 4, 2012
 - 5) M. Ishizuka, H. Ishibashi, T. Miyagawa, R. Osawa, M. Sekiya, R. Katagiri, R. Yoshizawa, N. Sato, M. Yamaguchi, G. Akanuma and K. Ushio : Molecular mechanism of co-super-production system of lipase and surface-active protein from *Pseudomonas*-like bacteria. FEBS Journal, 279 (sup.1), 348, 2012 : Special Issue of 22nd IUBMB & 37th FEBS Congress, Seville, Spain, September 4-9, 2012
 - 6) Ishizuka, M., Ishibashi, H., Miyagawa, T., Akanuma, G., and Ushio, K.: Co-super-production system of lipase and surface-active protein from *Pseudomonas*-like bacteria. Cell Signaling Networks Conference (CSN2011) : 13th IUBMB Conference, 1st PABMB Conference and 3rd Meetings of the Signal Transduction Branch & Oxidative Stress Branches of SMB, Merida, Yucatan, Mexico, October 22-27, 2011
 - 7) 大塚拓、永倉茉莉、吉澤梨絵、赤沼元気、志波優、渡辺智、吉川博文、牛尾一利、石塚盛雄、*Ralstonia* sp. NT80 において高級アルコール添加に应答して発現するタンパク質群のプロテオーム解析、日本農芸化学会 2014 年度(平成 26 年度)大会(明治大学等) , 2014 年 3 月 27 ~ 30 日
 - 8) 赤沼元気、多勢真大、鈴木優美、渡辺智、志波優、吉川博文、牛尾一利、石塚盛雄、高級アルコールによるリパーゼ・PHB 生産誘導を促進する分泌タンパク質 EliA の機能解析、日本農芸化学会 2014 年度(平成 26 年度)大会(明治大学等) , 2014 年 3 月 27 ~ 30 日
 - 9) 永倉茉莉、吉澤梨絵、大塚拓、赤沼元気、志波優、渡辺智、吉川博文、牛尾一利、石塚盛雄、*Ralstonia* sp. NT80 において高級アルコール添加に应答して発現するタンパク質群のプロテオーム解析、第 8 回日本ゲノム微生物学会年会(東京農業大学大学), 2014 年 3 月 7 ~ 9 日
 - 10) 永倉茉莉、吉澤梨絵、大塚拓、赤沼元気、志波優、渡辺智、吉川博文、牛尾一利、石塚盛雄、*Ralstonia* sp. NT80 において高級アルコール添加に应答して発現するタンパク質群のプロテオーム解析、第 36 回日本分子生物学会年会(神戸国際会議場他), 2013 年 12 月 3 ~ 6 日
 - 11) 赤沼元気、吉澤理絵、永倉茉莉、大塚拓、志波優、渡辺智、吉川博文、牛尾一利、石塚盛雄、高級アルコールによるリパーゼ・PHB 生産誘導とその促進因子 EliA の解析、第 36 回日本分子生物学会年会(神

- 戸国際会議場他),
2013年12月3~6日
- 12) 島村浩成, 鈴木詠美, 赤沼元気, 牛尾一利, 石塚盛雄, *Ralstonia* sp. NT80 由来耐熱性リパーゼの精製と特性理解, 第36回日本分子生物学会年会(神戸国際会議場他), 2013年12月3~6日
 - 13) 赤沼元気, 吉澤理絵, 永倉茉莉, 大塚拓, 志波優, 渡辺智, 吉川博文, 牛尾一利, 石塚盛雄, 高級アルコールによるリパーゼ・PHB生産誘導とその促進因子EliAの解析, グラム陽性菌ゲノム機能会議(筑波), 2013年9月7~9日
 - 14) 水野佑貴, 石橋隼, 関谷麻美, 吉澤梨絵, 赤沼元気, 牛尾一利, 石塚盛雄, *Ralstonia* sp. NT80におけるリパーゼとその誘導促進因子の発現制御解析, 日本農芸化学会2013年度(平成25年度)大会(東北大学等), 2013年3月24日~27日
 - 15) 赤沼元気, 石橋隼, 宮川貴裕, 吉澤梨絵, 渡辺智, 志波優, 吉川博文, 牛尾一利, 石塚盛雄, *Ralstonia* sp. NT80におけるリパーゼ発現誘導促進因子EliAの解析, 日本農芸化学会2013年度(平成25年度)大会(東北大学等), 2013年3月24~27日
 - 16) 太田友彦, 岩間佑介, 並木謙太, 月村亘, 赤沼元気, 牛尾一利, 石塚盛雄, *Ralstonia* sp. NT-80由来ラクトン特異的エステラーゼの機能解析, 日本農芸化学会2013年度(平成25年度)大会(東北大学等), 2013年3月24~27日
 - 17) 赤沼元気, 石橋隼, 宮川貴裕, 吉澤理絵, 渡辺智, 志波優, 吉川博文, 牛尾一利, 石塚盛雄, *Ralstonia* sp. NT-80におけるリパーゼ発現誘導促進因子EliAの同定と解析, 第35回日本分子生物学会年会(福岡国際会議場・マリンメッセ福岡), 2012年12月11~14日
 - 18) 吉澤梨絵, 赤沼元気, 志波優, 渡辺智, 吉川博文, 牛尾一利, 石塚盛雄, *Ralstonia* sp. NT-80におけるリパーゼ生産誘導時に分泌されるタンパク質のプロテオーム解析, 第35回日本分子生物学会年会(福岡国際会議場・マリンメッセ福岡), 2012年12月11~14日
 - 19) 赤沼元気, 関谷麻美, 吉澤梨絵, 牛尾一利, 志波優, 渡辺智, 吉川博文, 石塚盛雄, *Pseudomonas* sp. NT-80における耐熱性リパーゼ発現誘導機構の解析, 第6回日本ゲノム微生物学会年会(立教大学), 2012年3月10~12日
 - 20) 岩間佑介, 太田友彦, 並木謙太, 月村亘, 赤沼元気, 石塚盛雄, *Pseudomonas* sp. NT-40由来エステラーゼの精製と機能解析, 第84回日本生化学会大会(国立京都国際会館), 2011年9月21~24日
 - 21) 関谷麻美, 佐藤ななえ, 赤沼元気, 牛尾一利, 石塚盛雄, *Pseudomonas* sp. NT-80株におけるリパーゼ転写制御因子の機能

- 解析, 第84回日本生化学会大会(国立京都国際会館), 2011年9月21~24日
- 22) 大澤力, 赤沼元気, 牛尾一利, 石塚盛雄, *Pseudomonas* sp. NT-80由来リパーゼの分子シャペロンを利用した精製と機能解析, 第84回日本生化学会大会(国立京都国際会館), 2011年9月21~24日
 - 23) 赤沼元気, 宮川貴裕, 山口麻衣, 石橋隼, 牛尾一利, 石塚盛雄, *Pseudomonas* sp. NT-80株における界面活性作用蛋白質P15の機能解析, 第84回日本生化学会大会(国立京都国際会館), 2011年9月21~24日
 - 24) 片桐龍之介, 大森結加, 高取令依, 赤沼元気, 牛尾一利, 石塚盛雄, *Pseudomonas* sp. NT-80におけるリパーゼ発現制御因子探索と高生産株の作製, 第84回日本生化学会大会(国立京都国際会館), 2011年9月21~24日

〔図書〕(計1件)

- 1) Jumpei Hayakawa and Morio Ishizuka: Flagellar Glycosylation: Current Advances (Chapter 6, pp.127-152). In "Glycosylation" 436 pages, ed. by Petrescu, S., InTech, September 26, 2012.

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)

〔その他〕

- ホームページ等
<http://www.chem.chuo-u.ac.jp/~celltech/>
- 日経産業新聞(掲載記事)
2013年8月5日(月) 11面(先端技術)「ラクトン」作製速度3倍 薬や香料の原料 中大が酵素開発 50度でも壊れず

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
石塚 盛雄 (ISHIZUKA MORIO)
中央大学・理工学部・教授
研究者番号: 50168241
- (2) 研究分担者
赤沼 元気 (AKANUMA GENKI)
中央大学・理工学部・助教
研究者番号: 30580063
- (3) 連携研究者
牛尾 一利 (USHIO KAZUTOSHI)
新居浜工業高等専門学校・生物応用化学科・教授
研究者番号: 30203508