

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580279

研究課題名(和文)低温菌由来酵素の低温高活性構造の解明と安定な酵素への改良

研究課題名(英文)Cold-active structure of the psychrophile enzymes

研究代表者

石田 真巳 (ISHIDA, Masami)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・准教授

研究者番号：80223006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：酵素の低温適応の分子機構を明らかにするため、低温菌 *Shewanella frigidimarina* K14-2 のトリプトファン合成酵素 サブユニットを結晶化して立体構造を調べ、物理化学的性質も調べて常温菌 *E. coli* の同酵素と比較した。低温菌酵素の方が熱や変性剤に不安定なのは変性速度が速くて再生速度が遅いためであった。変性は二状態転移で共同性が高かった。他種の同酵素と比べて、分子内空洞が大きく、イオン対が少なかった。触媒残基を含むループ近傍の水素結合が欠けていた。これらの特徴によって配座柔軟性が与えられ、低温で高い活性がもたらせられると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To investigate the molecular basis of cold adaptation of enzymes, we determined the crystal structure of the tryptophan synthase alpha subunit from the psychrophile *Shewanella frigidimarina* K14-2 and also examined its physicochemical properties. The lower stabilities against heat and denaturation of the psychrophile enzyme originated from both a faster unfolding rate and a slower refolding rate. The two-state transition of denaturation for the enzyme was highly cooperative. Relative to tryptophan synthases from other species, the psychrophile enzyme exhibited an increase in cavity volume and a decrease in the number of ion pairs. The enzyme also lacks a hydrogen bond near a loop related to catalytic function. These characteristics of the psychrophile enzyme might provide the conformational flexibility required for catalytic activity at low temperatures.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：低温適応 低温菌 トリプトファン合成酵素 結晶構造 タンパク質の変性・再生 低温高活性

1. 研究開始当初の背景

(1) 低温菌酵素の研究・利用・改変例

寒海、極海、などの低温環境に生息する低温菌の酵素は低温でも活性が高いため、発酵産業・環境浄化・研究試薬などへの利用可能性が大きい生物資源である。従来、低温菌酵素が低温高活性であるなどの酵素的性質の報告は膨大な数におよぶ。しかし、低温高活性をもたらす構造を解明した報告は非常に少なく、なぜ低温で活性が維持できるのか、構造の一般的特徴は分かっていない。低温高活性化の仕組みが分かれば、低温で活性が下がってしまう有用酵素を改良するための指針にもなると期待される。

また、低温菌酵素は安定性が低いために失活しやすく、実用化された例はほとんどない。宮崎ら (Miyazaki et al. 2006 J. Biol. Chem. 281, 10236-10242) は進化工学という方法を使ってキシラナーゼの熱安定化に成功し、安定性に寄与するアミノ酸残基を特定している。低温菌酵素においても安定化が可能になれば、利用への道が開かれると思われるが、実用化につながる改良の例は未だない。

(2) 研究材料として優れた低温菌酵素

低温高活性の仕組みを解明するためには、低温菌酵素自体の立体構造解析だけでなく、低温での活性が低い常温菌や好熱菌の酵素との厳密な構造比較が必須である。そこで、微生物界に広く分布するトリプトファン合成酵素 (以下、TS と表記) を研究材料とした。TS は生命活動に必須のアミノ酸であるトリプトファンを生合成する酵素である。常温菌由来 TS や超好熱菌由来 TS などの立体構造が既に決定されており、耐熱性をもたらす構造の特徴も解明されている。そこで、研究代表者らは、低温高活性の仕組みを解明するために、低温菌 *Shewanella frigidimarina* K14-2 由来 TS (以下、低温菌 TS) の遺伝子を大腸菌にクローニングして高発現化した。大腸菌 TS は 20°C 以下では活性が著しく低下するが、低温菌 TS は 10°C まで比活性が著しく低下することはない。

また、実用的に低温高活性が望まれる酵素として、タンパク質、核酸などの生体高分子や脂質を加水分解するプロテアーゼ、ヌクレアーゼ、リパーゼなどの加水分解酵素が考えられる。食品工場の排水処理、研究試薬などにおいては、低温で酵素を使用したい。そこで、研究代表者らは、こうした生体成分の分解酵素を生産する種々の低温菌を単離した。これらの内、*Vibrio* sp. Pr21 由来プロテアーゼは既に大腸菌にクローニングして高発現化した。この酵素は低温高活性だったが、安定性は常温菌由来酵素に劣る。安定性を改良できれば、実用化に近付くと期待される。

2. 研究の目的

(1) 低温高活性の仕組みの解明

以上の背景から本研究課題では、低温高活

性の仕組みの解明を第一の目的とする。低温菌 *S. frigidimarina* K14-2 由来 TS を結晶化して立体構造を解析する。次に、既に立体構造が分かっている常温菌 TS や好熱菌 TS と低温菌 TS の立体構造を比較する。これによって、低温菌酵素の特徴を解析すると共に、低温高活性に関与する部位を探索する。候補の部位についてはタンパク質工学によってアミノ酸置換で確認し、低温高活性に寄与する構造を明確にする。

(2) 低温菌酵素の安定化

本研究課題の第二の目的は、一般に安定性が低い低温菌酵素の安定化である。不安定な酵素の安定化には、酵素科学の基礎研究の意義も、酵素の応用研究の意義もある。実験材料として、(1) の構造や性質の詳細が解明されれば安定化の実験がしやすくなるので、低温菌 TS を対象とする。他の実験材料としては、既に組換え体で高発現化している低温菌プロテアーゼを対象とする。プロテアーゼには実用的な応用研究としての魅力もあると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 組換え体の培養、酵素の精製

低温菌 *S. frigidimarina* TS の遺伝子発現のためには、*E. coli* JM109 (pASA1) を 1mM IPTG と 50 μ M Ap を含む YT 培地で 37°C、20h 培養した。遠心分離で細胞を収集し、超音波細胞破碎し、遠心上清を粗酵素液として回収した。目的酵素を SuperQ-toyopearl、Sephacryl S-300、MonoQ のクロマトグラフィーで精製した。低温菌 *Vibrio* sp. Pr21 プロテアーゼの遺伝子発現のためには、*E. coli* JM109 (pCMP10) を 1mM IPTG と 50 μ M Ap を含む YT 培地で 25°C、24h 培養した。遠心分離で細胞を収集し、超音波細胞破碎し、遠心上清を粗酵素液として回収した。必要な場合は目的酵素を SuperQ-toyopearl と Sephacryl S-300 のカラムクロマトグラフィーで精製した。

(2) トリプトファン合成酵素の結晶化および X 線結晶解析

TS (α サブユニット) の結晶化と X 線解析の詳細は発表論文①に記載されている。種々の溶媒で結晶化や結晶成長の条件を調べ、Crystal Screen I (PEG) 400 and 2.0M ammonium sulfate で結晶が得られた。結晶の X 線回折データは SPring-8 (兵庫県佐用郡) のビームライン BL44XL にて収集した。TS には α サブユニット以外に β サブユニット、 $\alpha 2\beta 2$ 複合体などがあるので、比較可能な他菌種でのデータが豊富な α サブユニットの結晶化に続いて、 β サブユニットや複合体の結晶化も同様の方法で試験した。

低温菌 TS の立体構造決定には MOLREP module や CCP4i プログラムを用いて大腸菌 TS を初期構造とする分子置換法を使用した

(立体構造決定に用いた他のプログラムは発表論文①を参照)。

(3) 酵素活性の測定

TS の酵素反応で生成するグリセルアルデヒド 3-リン酸とインドールを測定する 2 種の方法を用いた。グリセルアルデヒド 3-リン酸の定量は正確だが測定できる温度範囲が狭い。インドール測定は正確さで劣るが、測定温度にはほとんど制限はない。詳細は発表論文①に記載されている。

プロテアーゼ反応は主に 20~30°Cで行い、活性は、アゾコール基質については吸収 (Abs 520 nm) の増加、蛍光合成ペプチドについては蛍光強度 (Ex 328 nm, Em 398 nm) の増加を追跡して求めた。天然コラーゲンの分解活性については、仔牛真皮 I 型コラーゲンを基質にし、分解は SDS-PAGE で追跡した。

(4) 酵素の物理化学的性質の測定

TS の熱測定は MicroCal VP-DSC または Nano DSC を用い 1K/min のスキャン速度で測定した。変性剤 GuHCl による変性の平衡測定は pH 7.0、25°C で 222 nm の CD を Jasco J-725 で測定した。変性と再生の速度測定は、酵素液の 10 または 20 倍体積の GuHCl などと CD 測定用セル内で急速混合して、pH 7.0、25°C で 222 nm の CD を Jasco J-725 で測定した。これらの測定の詳細は発表論文①に記載されている。

(5) 遺伝子の部位指定変異・ランダム変異

TS の部位指定変異は、pASA1 を鋳型として 2 本の相補的変異プライマーによる PCR 介在法を PrimeSTAR mutagenesis basal kit (Takara) で行った。変異酵素遺伝子は塩基配列分析で確認した。

プロテアーゼの成熟領域を切り抜くための制限酵素部位の導入は、上の TS と同様の部位指定変異法によった。遺伝子へのランダム変異導入には酵素の成熟領域の両側に結合するプライマーを用いて MnCl 添加や dCTP + dTTP の過剰添加によるエラー誘発 PCR を用いた。エラー誘発 PCR 後の増幅 DNA を、制限酵素で成熟領域を切除したプラスミドと連結して変異導入プラスミドを作成し、*E. coli* JM109 に導入して寒天培地でコロニー形成させた。活性測定には Microplate reader SH-9000 (Corona electric) を用いた。

4. 研究成果

(1) 低温菌 *S. frigidimarina* TS の中温菌 TS との比較

① アミノ酸組成

低温菌 TS は 2 種の常温菌 (*E. coli* および *Salmonella typhimurium*) 由来 TS と 62.2% および 61.4% のアミノ酸配列相同性を有していた。荷電アミノ酸と極性アミノ酸の比を表わす CvP-bias は一般に好熱菌タンパク質では中温生物より高い。そこで、本低温菌 TS と 2 種の中温菌 TS、2 種の好熱菌 TS の間で

CvP-bias を比較したところ、変性温度が高い酵素ほど CvP-bias が高い相関が得られ、低温菌 TS は 5 種酵素の中で最も低い CvP-bias (荷電アミノ酸が最少で、極性アミノ酸が最多) となった。疎水性アミノ酸は他種 TS と同程度 (超好熱菌 TS はやや低い) であった。

② 低温菌 TS と常温菌 TS の活性の温度依存性

低温菌 TS と常温菌 TS の 5~55°C における比活性の温度依存性を分析した結果を Fig. 1A に示す。両者の最適温度は 42.5°C~45°C でほぼ同じであったが、低温菌 TS の比活性は全温度範囲で常温菌 TS より高く、最適温度付近の 43°C では約 2 倍高かった。比活性の温度依存性をより明確にするため、7.5°C~35.0°C の範囲で両酵素の Arrhenius プロットを作成した (Fig. 1B)。Arrhenius プロットは、低温菌 TS では約 13.5°C で傾きが変わって二つの温度領域に分かれたのに対して、常温菌 TS では 22.2°C で二つの温度領域に分かれた。これらの温度領域で活性化エネルギー E_a を計算すると低温菌 TS が高温側 61.5 ± 5.7、低温側 200.6 ± 8.4 kJ/mol、また常温菌 TS が高温側 84.1 ± 0.8 kJ/mol、低温側 218.4 ± 41.3 kJ/mol となった。これらの結果は、常温菌 TS に比して低温菌 TS が低温高活性であることを示している。

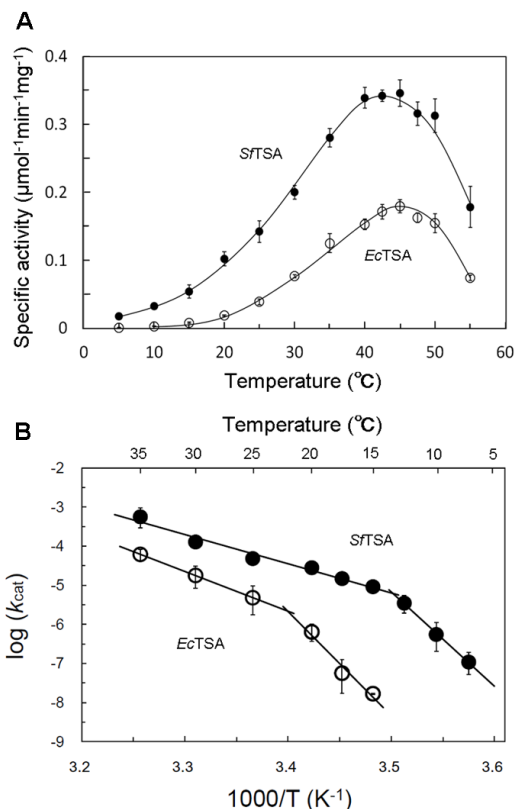


Fig. 1 低温菌 TS と常温菌 TS の活性の温度依存性 (A) 5°C~55°C における比活性 (B) 分子活性 k_{cat} の Arrhenius プロット 図中で SfTSA は低温菌 TS、EcTSA は常温菌 TS を表す (以下の図も同様に表示)。

(発表論文① *J. Biochem.* (2014) 155,

③ 低温菌 TS の配座安定性

天然酵素のペプチド鎖は各アミノ酸残基が一定の配座（角度）に保持されている。この配座が崩れてペプチド鎖がほどけるのが変性である。以下のように低温菌 TS の配座安定性を比較した（詳細は発表論文①）。

まず熱安定性を DSC で調べた。その結果、低温菌 TS の変性温度は pH 7.0 で約 56°C であり、pH 7.0~9.5 の範囲で常温菌 TS より約 3°C 変性温度が低かった。また、低温菌 TS の熱変性は可逆的で、pH 7.0 でも変性後に再生することが分かった。次に変性剤安定性を種々の濃度の変性剤 GuHCl 存在下で調べた。その結果、Fig. 2 に示すように、常温菌 TS の変性は中間状態がある三状態転移だが、低温菌 TS は単純な二状態転移であることが分かった。変性エネルギー ΔG を計算すると、低温菌 TS が 22.6 kJ/mol、常温菌 TS が 36.8 kJ/mol であった。これら熱安定性、変性剤安定性の結果は、低温菌酵素の方が常温菌酵素より安定性が低く、変性過程は単純であることを示している。この安定性の違いの原因を調べるため、両酵素の GuHCl に対する変性速度と再生速度を CD 変化で追跡して調べた。その結果、Fig. 3 に示すように、低温菌 TS の変性速度は常温菌 TS より速く、低温菌 TS の再生速度は常温菌 TS より遅いことが分かった。

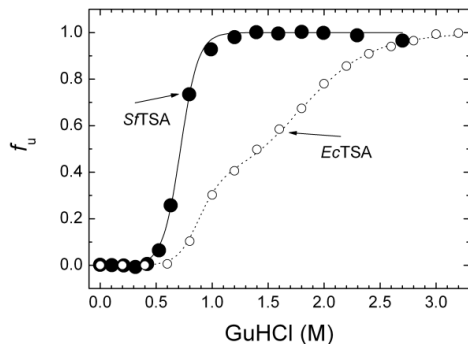


Fig. 2 低温菌 TS と常温菌 TS の pH 7.0、25°C における GuHCl 変性曲線

（発表論文① *J. Biochem.* (2014) 155, 73-82)

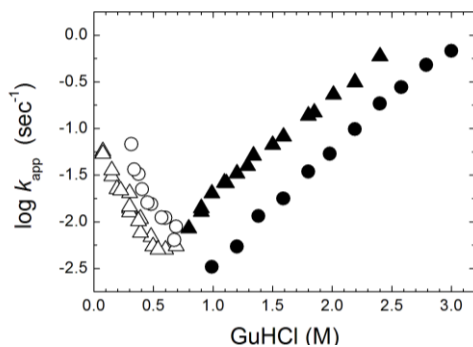


Fig. 3 低温菌 TS と常温菌 TS の pH 7.0、25°C における見かけの変性・再生速度

低温菌 TS の再生△と変性▲、常温菌 TS の再生○と変性●

（発表論文① *J. Biochem.* (2014) 155, 73-82)

④ 低温菌 TS の結晶構造

X線結晶解析によって低温菌 TS (α サブユニット) の結晶構造を 2.6Å の解像度で得た。Fig. 4A に低温菌 TS の結晶構造と既知の常温菌 TS の立体構造を重ねて示した。アミノ酸配列の相同性が高い両酵素は全体の構造も良く似ていた。両酵素の構造で大きく異なっていたのは、loop B と呼ばれる領域であった。TS の触媒反応に必要な主要なアミノ酸残基は Glu50、Asp60、Thr183 (残基番号は低温菌 TS の場合) の三つある。この内、Asp60 は loop A、Thr183 は loop B と呼ばれる可動性ループ中に存在する。低温菌 TS と常温菌 TS の間で、loop A の構造は互いに良く似ていたが、loop B は構造が固定されていないため、両者とも loop B の大部分は構造が見えなかった。しかし、loop B の付け根の部分は構造が見えており、両者の間で非常に異なっていた。

なお、低温菌 TS の β サブユニットや $\alpha_2\beta_2$ 複合体の結晶化については、解析できるレベルの結晶が得られなかった。そのため、低温高活性構造の研究は結晶が得られた α サブユニットで行うこととした。

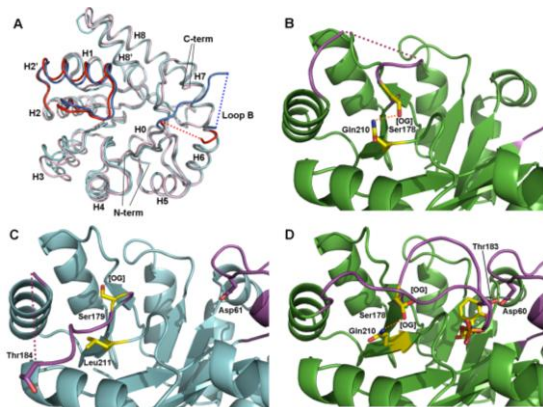


Fig. 4 (A) 低温菌 TS と常温菌 TS の全体構造の重ね合わせ表示による比較

アミノ酸主鎖のみを模式的に示した。水色：低温菌 TS、ピンク色：常温菌 TS、青色：低温菌 TS の loop A と loop B、赤色：常温菌 TS の loop A と loop B

(B)~(D) TS loop B 周辺の構造 (B) 常温菌 TS の loop B、(C) 低温菌 TS の loop B、(D) 基質類似体が結合した常温菌 TS の loop B (発表論文① *J. Biochem.* (2014) 155, 73-82)

この両酵素の結晶構造比較から、低温菌 TS の構造の特徴が推定された。主なものを二つ挙げると、まずイオン結合の少ないことである。距離 $< 5 \text{Å}$ のイオン結合数は、常温菌 TS は 51 だったのに対して低温菌 TS は 23 と少なかった (超好熱菌 TS では 63)。次に分子内空洞が大きいことである。常温菌 TS では 318Å^3 だったのに対して低温菌 TS では 393Å^3 に

増加していた（超好熱菌 TS では 282\AA^3 ）。これらの違いが低温菌 TS の構造の柔軟性と不安定性につながっていると推定される。

⑤ 可動性 loop A と loop B の構造比較

(1) ④で示したように低温菌 TS と常温菌 TS で大きく構造が違う loop B の付け根の部分拡大したのが Fig. 4 (B) と (C) である。結晶構造既知の TS では、どれも loop B は構造が見えない（動いている）。しかし、常温菌 TS に酵素の基質類似体が結合すると、Fig. 4 (D) に示す通り loop B は蓋が閉じるように活性中心に接近する。常温菌 TS は基質が結合していない場合 (Fig. 4 (B)) には loop B が活性中心から遠く開いたような位置にあり、開いた構造を付け根 (Gln210 と Ser178 の間) の水素結合が固定しているように見える。低温菌 TS (Fig. 4 (C)) では、同じ部位は Gln でなく Leu211 に置換されているため、水素結合は欠けている。loop B は酵素反応のために開いたり閉じたり動いていると考えられており、この loop B の動きを固定する水素結合が欠けているのは、低温での高活性さに寄与していると考えられると推定された。

(2) 低温菌 *S. frigidimarina* TS の低温活性に関与するアミノ酸残基の変異分析

① 結晶構造から推測される低温活性に関わるアミノ酸残基の候補

(1) ⑤で示した loop B の付け根に位置する Leu211 に加えて、低温菌 TS の活性に関わる可能性があり、常温菌 TS と異なるアミノ酸残基を探索した。その結果、Phe53, Ser72, Thr77 を候補とした。Phe53 は loop A の付け根に位置し、周辺二次構造と芳香族-芳香族相互作用で結合していると推定された（常温菌 TS では Val）。また loop A の付け根の Ser72 は周辺の Thr77 などと水素結合していると推定された（常温菌 TS では Ala と Val）。

② 低温高活性に関わる候補のアミノ酸の置換

先ず各候補アミノ酸残基を対応する常温菌 TS のアミノ酸残基に置換した変異酵素 F53V, F53A, S72A, T77V, L21Q を作成した。各変異酵素の低温高活性度の指標として、 30°C の比活性に対する 20°C の比活性の比率 (%) を調べた。その結果、野生型の低温菌 TS では 36% (常温菌 TS では 23%) に対して、F53V では 16%, S72A では 24%, T77V では 36%, L21Q では 10% であり、また F53A は変異酵素自体が生産されなかった。この結果から、L211Q 変異酵素が最も低温活性の比率が低下しており、Leu211 が低温での活性維持に貢献していると推定された。この結果は学会発表⑤で公表した。

そこで、Leu211 に的をしぼり、常温菌型の Gln (L211Q)、同属アミノ酸である Ile (L211I) と Asn (L211N)、体積などが Gln と類似する Glu (L211E) に置換した変異酵素を作成した。

各変異酵素の比活性の $20^\circ\text{C}/30^\circ\text{C}$ 比率を指標として調べたところ、野生型の低温菌 TS では 29%、L211Q では 19%、L211I では 32% であり、L211N と L211E では活性が検出されなかった。これらの結果は、Leu211 が疎水性アミノ酸であることが低温での活性に重要であることを示している。この結果は学会発表④で公表した。

Leu211→Gln 変異酵素の比活性の温度依存性をインドール測定法によって $5^\circ\text{C}\sim 55^\circ\text{C}$ で調べた。その結果、最適温度は 45°C 付近であり、 55°C 以上で著しく活性が低下し、野生型の低温菌 TS と類似していた。常温での活性に対する低温での相対的活性は低温菌 TS と常温菌 TS の中間程度で、Leu211 が低温での活性に寄与していることを示していた。しかし、変異酵素の比活性は全温度範囲で野生型の低温菌 TS の $1/3$ 程度に低下していた。

(3) 低温菌 TS の低温高活性構造のまとめ

以上の結果から、低温菌 TS では、分子全体として極性アミノ酸の増加、荷電アミノ酸の減少によるイオン結合の減少、分子内空洞の増加などによって、安定性のある程度犠牲にして分子の柔軟性を確保していると考えられる。これによって低温域はもちろん、常温域でも高い比活性を発揮することができると推定される。局所的に低温高活性に寄与するアミノ酸残基の一つとして Leu211 を挙げることができた。しかし、Leu211 も低温高活性への寄与のみでなく、比活性の高さにも関係していた。これらの結果は、分子構造、酵素活性、物理化学的性質から低温菌酵素と常温菌酵素（一部は好熱菌酵素まで含む）を細かく比較した重要な研究成果として、今後、酵素の低温適応機構の理解のためにも、種々の有用酵素の改良のためにも有益なものとなるであろう。

(4) 低温菌 *Vibrio* sp. Pr21 由来 PR プロテアーゼの進化学による安定化

① 低温菌 PR プロテアーゼの一次構造

海洋低温菌 *Vibrio* sp. Pr21 が生産する PR プロテアーゼはアゾコールなどのコラーゲン系の基質をよく分解する低温高活性な酵素である。最大活性を示す温度が 35°C 付近で、熱安定性を上げることで実用的な使用範囲が広がると期待されるが、立体構造が未知なので安定化には進化学が適していた。低温菌 PR プロテアーゼの一次構造を Fig. 5 に示す。この酵素は 67kDa の前駆体として生合成され、両端のプロ領域が切除されて 37kDa の成熟酵素になる。

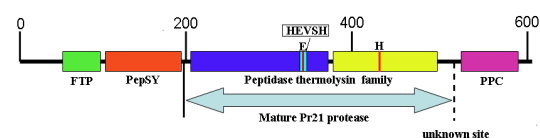


Fig. 5 低温菌 PR プロテアーゼの一次構造
水色の両矢印で示す領域が成熟型酵素

② 低温菌 PR プロテアーゼの進化学

進化学はランダム変異を行う領域が短い方が実験上有利なので、PR プロテアーゼ前駆体から切除されるプロ領域の内、N末端の領域を遺伝子工学で除去した。その結果、活性がない不溶性タンパク質が生産されて PR プロテアーゼは生産されなくなり、プロ領域が成熟酵素の立体構造形成に必要なことが分かった。この結果は学会発表③で公表した。そこで部位指定変異法で、成熟酵素領域の遺伝子を簡単に着脱できるように両側に制限酵素サイトを導入した。

PR プロテアーゼ遺伝子にランダム変異を導入するため、成熟酵素領域を挟む2本のプライマーで変異誘発 PCR を行った。得られた変異を含む成熟酵素領域を野生型のプロ領域と連結し、大腸菌に導入してアゾコール分解活性を指標に耐熱温度の異なる変異酵素を探索した。しかし、対照とした野生型 PR でも測定結果がバラツキ、アゾコールを基質とする反応系が微量多検体分析装置での分析に適していないと考えられた。

そこで、PR プロテアーゼの基質特異性を明確にするため、本来の基質と考えられる天然の三重らせんコラーゲンなどを基質として PR プロテアーゼによる分解パターンを調べた。その結果、PR プロテアーゼはコラーゲンの構造が緩んだ架橋部分を選択的に切断することが分かった。この結果は学会発表①で公表した。また、種々の合成基質も検討し、PR プロテアーゼが蛍光標識合成ペプチドを切断することが分かった。蛍光標識合成ペプチドを基質として微量多検体分析装置で野生型 PR プロテアーゼの活性を測定した結果、バラツキは改善され、ランダム変異集団の分析に適した系になった。

低温菌 PR プロテアーゼの安定化については、研究期間内には変異酵素を作成するに至らなかったが、新たに見つかった実験上の障害を改善することができた。今後、安定化変異 PR プロテアーゼの作成を続けていく。

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 1 件)

① Daisuke Mitsuya, Shun-ichi Tanaka, Hiroyoshi Matsumura, Naoto Urano, Kazufumi Takano, Kyoko Ogasahara, Michiyo Takehira, Katsuhide Yutani, Masami Ishida, Strategy for cold adaptation of the tryptophan synthase subunit from the psychrophile *Shewanella frigidimarina* K14-2: crystal structure and physicochemical properties. *The Journal of Biochemistry*, 査読有 (2014) **155**, 73-82

DOI: 10.1093/jb/mvt098

[学会発表] (計 5 件)

① 山本 仁、浦野直人、石田真巳、海洋低温菌 *Vibrio* sp. Pr21 由来メタロプロテアーゼの基質特異性—三重らせんコラーゲンの分解活性—、平成 25 年度日本水産学会秋季大会 (2013 年 9 月 21 日) 三重大学 (三重県津市)

② 三矢太亮、竹平美千代、浦野直人、小笠原京子、油谷克英、石田真巳、低温菌 *Shewanella frigidimarina* K14-2 由来トリプトファン合成酵素 α サブユニットの低温適応の戦略：物理化学的解析、第 13 回極限環境生物学会年会 (2012 年 12 月 1 日) 日本大学文理学部 (東京都世田谷区)

③ 山本 仁、吉田千恵、浦野直人、石田真巳、樺澤 洋、海洋低温菌 *Vibrio* sp. Pr21 由来メタロプロテアーゼの組換え体内での生産とプロ領域の役割、平成 24 年度日本水産学会秋季大会 (2012 年 9 月 15 日) 独立行政法人水産大学校 (山口県下関市)

④ 三矢太亮、松村浩由、高野和文、浦野直人、石田真巳、低温菌 *Shewanella frigidimarina* K14-2 トリプトファン合成酵素の低温活性に関与する Leu211 残基の変異分析、平成 23 年度日本水産学会春季大会 (2012 年 3 月 27 日) 東京海洋大学 (東京都港区)

⑤ 三矢太亮、松村浩由、高野和文、浦野直人、石田真巳、低温菌 *Shewanella frigidimarina* K14-2 トリプトファン合成酵素の低温活性に関与するアミノ酸残基の変異、第 12 回極限環境生物学会年会 (2011 年 11 月 27 日) 長崎大学 (長崎県長崎市)

[その他] (計 1 件)

データバンクに登録

①低温菌 *S. frigidimarina* K14-2 由来トリプトファン合成酵素 α サブユニットの原子座標 : Protein Data Bank アクセス・コード 3vnd

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 真巳 (ISHIDA, Masami)
東京海洋大学・海洋科学技術研究科・准教授
研究者番号 : 80223006

(2) 研究分担者

高野 和文 (TAKANO, Kazufumi)
京都府立大学・生命環境化学研究科 (系)・教授
研究者番号 : 40346185