

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

**平成27年度～平成29年度「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」
研究成果報告書概要**

- 1 学校法人名 東京薬科大学 2 大学名 東京薬科大学
- 3 研究組織名 生命科学研究科
- 4 プロジェクト所在地 東京都八王子市堀之内 1432-1
- 5 研究プロジェクト名 健康で豊かな生活を実現するスマートタンパク質工学戦略的研究拠点
- 6 研究観点 大学の特色を活かした研究

7 研究代表者

研究代表者名	所属部局名	職名
山岸 明彦	生命科学部	教授

- 8 プロジェクト参加研究者数
- 17
- 名

- 9 該当審査区分
- 理工・情報
-
- 生物・医歯
- 人文・社会

10 研究プロジェクトに参加する主な研究者

研究者名	所属・職名	プロジェクトでの研究課題	プロジェクトでの役割
山岸明彦	応用生命科学科・教授	酵素高活性化実証研究	全体総括および酵素高活性化実証研究
横堀伸一	応用生命科学科・講師	酵素安定化理論研究 酵素活性化理論研究	高安定高活性酵素理論研究
高須昌子	分子生命科学科・教授	バイオナノメカニクス理論研究	バイオナノメカニクス技術開発
宮川 毅	情報教育研究センター・助教	バイオナノエレクトロニクス理論研究	バイオナノエレクトロニクス技術開発
渡邊一哉	応用生命科学科・教授	バイオナノエレクトロニクス応用研究	バイオナノエレクトロニクス技術開発
太田敏博	応用生命科学科・教授	過酸化水素検出素子開発	高機能酵素開発
藤原祥子	応用生命科学科・教授	でんぷん改質酵素安定化	高機能酵素開発
梅村知也	分子生命科学科・教授	バイオナノメカニクス実証研究・バイオナノエレクトロニクス実証研究	バイオナノ技術実証
梅村真理子	応用生命科学科・助教	ROS 検出系の細胞応用	高機能酵素開発
井上英史	分子生命科学科・教授	活性酸素種 (ROS)検出・発生系の開発	高機能酵素開発

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

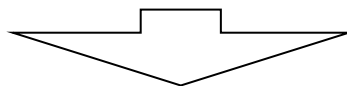
森本高子	分子生命科学科・准教授	ROS 検出・発生系の生体応用	高機能酵素開発
小林豊晴	分生命科学科・助教	過酸化水素発生素子開発	高機能酵素開発
大野尚仁	薬学部・教授	免疫アジュバント開発	高機能酵素開発
(共同研究機関等)			
藤田直子	秋田県立大・生物資源科学部・生物生産科学科・准教授	でんぷん改質	高機能酵素開発
加藤和喜	大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任教授	酵素安定化理論研究 酵素活性化理論研究	高安定高活性酵素理論研究

<研究者の変更状況(研究代表者を含む)>

旧

プロジェクトでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
		なし	

(変更の時期:平成 29 年 4 月 1 日)



新

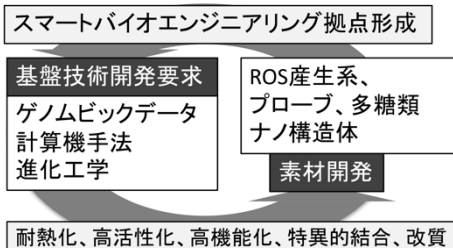
変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
東京薬科大学・応用生命科学科・助教	早稲田大学・人間科学学術院・准教授	赤沼哲史	高機能酵素開発
	秋田県立大学・名誉教授、東京薬科大学客員研究員	中村保典	高機能酵素開発

11 研究の概要(※ 項目全体を10枚以内で作成)

(1) 研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要

【目的】酵素の高安定化、高機能化、バイオナノ技術開発を目指したスマート(情報高度集約型)タンパク質工学の基盤技術開発をおこなう。理論研究から応用研究まで技術移転と課題対応のサイクルで結ばれた、研究拠点を創成する。

【意義】酵素は、生物がもつ天然のタンパク質性触媒であり、これまでタンパク質工学で多くの研究が行われてきた。タンパク質の自己組織化能は、バイオナノ素材として期待されているが、タンパク質相互作用の自由な設計は不可能であった。大量ゲノム情報の蓄積、計算能力の指数関数的増加から、タンパク質工学を情報高度集約的に行うことが可能となってきている。本計画ではゲノムビッグデータの活用と計算機手法を進化工学と組み合わせることから、本来環境低負荷で高機能の酵素(タンパク質)の設計技術の高度化、バイオナノ技術の開発



法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

研究拠点を形成する。これは健康で豊かな生活を実現するための技術革新となる。技術移転と課題対応のサイクルで、加速的に進化する研究拠点を形成する。

【計画】理論研究で課題対応、実証研究で検証、応用研究に技術移転する。テーマに対応して、各年度ステージを進める。

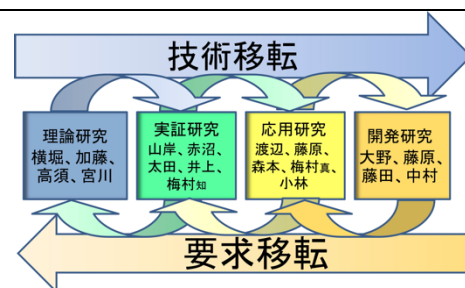
27 年度: 既に関済したタンパク質安定化技術を応用研究に移転する。低温適応化に関する理論研究を行う。ナノ技術は、金属結合および蛋白-蛋白結合の両開発に成功しているが、その理論化と実証研究を進める。

28 年度: 安定化技術移転で見えてくる課題を理論研究で解決する。実証研究で明らかになった実証データをもとに安定化、金属結合、タンパク質結合理論の高度化を行う。安定化、活性化、結合理論を実証研究で検証し、応用研究で実際に応用する。すなわち、技術移転で応用研究を実施、課題を理論研究、実証研究で解決するサイクルをまわす。

29 年度: サイクルは2週目に入る。理論巧緻化と理論技術移転、設計された応用酵素を完成させる。開発された技術の公表を行い研究を広める。

(2) 研究組織

この分野の高い実績を持つ山岸(PNAS)が全体を統括する。実績ある研究者の理論研究から実証研究、応用研究へのサイクルで太く結ばれた加速的に進化する研究体制をとる。理論研究はゲノムデータの系統学的解析から、耐熱化設計と低温・常温での触媒活性向上に成功している横堀(NAR)が、最高性能の配列解析ソフト(MAFFT)を開発した加藤(MBE)、計算科学のエキスパート高須、宮川とともに実施する。実証研究を山岸、赤沼、太田とナノテク専門家梅村知(AdvMater)が担う。応用研究は、個々の酵素とその利用系の専門家井上、森本(CurrBio)の知識と経験を生かして若手と共に担当する。渡邊(ProNAS)がナノエレクトロニクス材料開発を、光合成専門家藤原、藤田、中村がデンプン改質酵素開発を行う。免疫専門家大野(NatureCom)が高機能アジャバント開発を行う。



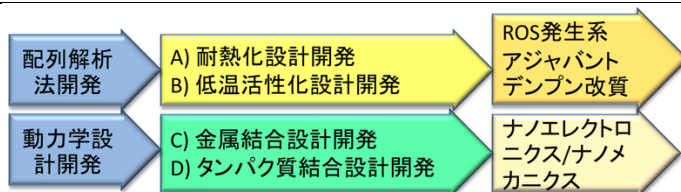
研究協力者当初 15 名(うち学外 2 名)に追加で学外 2 名。その他、学内研究協力者と共に研究する学内研究者 7 名の合計 24 名。学部学生 18 名大学院生 31 名、PD3 名(戦略 1 名、科研費 1 名、学振 1 名)、RA14 名。RA の内 2 名は期間中に PD となった。研究計画 A, B, C, D 何れも理論と実証・応用研究が相互に共同している。更に、A-2 は 4 つのグループで共同している。大学学務、経理、人事諸課が研究事務を支援した。アルバイトを 1 名雇用して研究支援した。早稲田大学、秋田県立大学、大阪大学と連携している。

(3) 研究施設・設備等

研究 3 号館(4,645m²) 研究者 40 名中 16 名が本戦略研究に参加。
 研究 4 号館(6,823m²) 研究者 29 名中 6 名が本戦略研究に参加。
 床置型超遠心機(27 年度購入)60 時間
 ジャーファーマンター(28 年度購入)450 時間
 キヤピラリー型 DNA シークエンサー(19 年度購入) 1,000 時間/年

(4) 研究成果の概要 ※下記、13及び14に対応する成果には下線及び*を付すこと。

本計画全体ではA~D、4つのテーマに取り組んだ。究めて優れた特性をもつタンパク質であるが一般に安定性が低い。一方、好熱菌酵素は安定であるが常温での活性が低い。安定性と高活性の両特性を併せ持つ理想的



法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

酵素の設計を A と B で行った。A と B では理論を応用して ROS 発生系、アジャバント、デンプン改質、プローブの開発研究を行った。

これまでタンパク質の改変は、試行錯誤の域を出なかった、ゲノムデータ大量蓄積と計算機の数関数的能力向上から、情報高度集約的にタンパク質を改変設計することのできる時代が来ている。ナノエレクトロニクスとナノメカニクスの基盤技術開発を C と D で行った。C ではナノエレクトロニクス開発の基礎研究として金属結合タンパク質設計を、D ではナノメカニクスの基礎研究としてタンパク質結合設計技術開発を行った。

研究成果発表は、雑誌論文 46 報、図書 6 報、国際学会 26 件、国内学会 96 件である。

A. ビックデータを用いた酵素高安定化設計方法の開発

(A-1 理論)蓄積しているゲノムデータを活用して酵素の安定化手法の巧緻化を図り、その理論を下記に応用した。(A-2)活性化酸素種(ROS)の発生系を開発し、それを生体内外で応用する。(A-3) ROS に反応してポリフェノールを合成することから新規免疫アジュバント開発を行う。(A-4) デンプン改質に用いるブランチング(枝作り)酵素の安定化を行う。

A-1 理論:酵素安定化理論の高度化:

【当初の目標】これまでのタンパク質安定化手法である理論的耐熱化手法は試行錯誤を必要とし、効率的な手法の開発が望まれていた。横堀ら(Akanuma et al. 2011 J. Mol. Biol. 412: 212-225; Akanuma et al. 2013. PNAS 110: 11067-11072)は配列データから系統解析によって安定化推定を行う画期的方法を開発した。この方法は、相同遺伝子の配列アライメントから、祖先生物がもっていた配列を推定するという方法である。祖先生物が高温に生息していたということが明らかとなっており、祖先生物が持っていた祖先配列を標的タンパク質に変異導入することによってタンパク質を高効率で安定化することに成功した。しかし、正確な配列アライメントに時間を要するという課題が明らかになった。そこで、本課題ではアライメントの高速高精度(巧緻化)技術を開発し、それを祖先型酵素再生で確認した。

【得られた成果】加藤が開発した最高性能ソフト(MAFFT: MBE、HotPaper 引用率上位 0.1%)でも、配列類似性の低い配列部分のアライメントが問題となった。そこで、配列の領域ごとに区切る手法により、時間の短縮に成功した。アライメント検証のために全生物が持つアミノアシル tRNA 合成酵素(ARS)の複合アライメントを行い、配列類似性の低い配列に関して満足のいく配列アライメントを得ることができ検証できた(*5, 31,32)。

これまでに祖先配列再生に用いられたのは 400 残基以下の真正細菌祖先以降の配列であった。今回は 700 残基以上の、かつ、全生物共通祖先の挑戦的アライメントを行った。すなわちバリンを tRNA に結合する酵素 ValRS とイソロイシンを tRNA に結合する酵素 IleRSI、それぞれの共通祖先タンパク質配列(ValRS-com、IleRS-com)を推定した。推定した遺伝子を合成し、大腸菌内で発現、タンパク質精製を行った。その結果、ValRS-com と IleRS-com はバリンとイソロイシンをそれぞれ特異的に tRNA に結合する反応を触媒することがわかった(*35)。IleRS-com は、これまで復元された中で最も長く(757 アミノ酸長)、このような大きなタンパク質の酵素活性を保持した復元が可能となったのは、アライメント作製技術巧緻化成功の証拠と言える。初期の目標を 100%達成した。

A-2 活性化酸素種(ROS)発生系と検出蛍光タンパク素子の開発

4つの研究室が共同で、高機能化酵素の応用として活性化酸素種(Reactive oxygen species; ROS)発生系とそれを細胞内外で検出する蛍光タンパク質素子の開発を実施した。

A-2-1 ROS 産生系および ROS 検出蛍光タンパクの開発

【当初の目標】好気性生物の呼吸鎖等で「活性化酸素種(Reactive oxygen species; ROS 主にスーパーオキシドや H_2O_2)」が発生することが知られている。ROS は「レドックスシグナリング」を担う分子として認知されるようになってきた。しかし、既存の方法では、 H_2O_2 の発生場所・量・タイミングを制御できない。本研究では、D-アミノ酸と赤色酵母由来 D-アミノ酸オキ

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

シダーゼ(rgDAAO)の組み合わせを改変することによって、生体への影響の少なく量的・時間的にH₂O₂発生するシステムの構築を目的とした。また、これまで生体内での検出が非常に困難であったスーパーオキシドを検出できる蛍光タンパクの開発を目的とした。

【得られた成果】1) 有用な rgDAAO 変異体:まず高い触媒回転を有する *Rhodotorula gracilis* 由来の DAAO (rgDAAO) を用い、高選択的に合成 D-アミノ酸と反応する rgDAAO 変異体の開発を行った。野生型 rgDAAO^{WT} の M213 および近傍アミノ酸の種々の変異酵素を作成し、その中から M213 を V に変換した rgDAAO^{MV} を得た、この改変体と低い K_m 値を持つ D-アミノ酸のペアを得ることに成功した。つまり当初の目的である有用な rgDAAO 変異体-基質ペアを得ることができた(*4,6)。2) ついでこの変異体を線虫に導入する検討を行った。線虫の餌として利用する大腸菌は、細胞壁成分として D-Ala を含む。そこで D-Ala に対する K_m 値が大きく H₂O₂ 産生能が低い変異型 rgDAAO^{MV} を用いることで、D-Ala の代謝を最低限に抑えることができる。コドン線虫に最適化した rgDAAO^{MV} の DNA 配列を線虫にインジェクションし、rgDAAO^{MV} 発現トランスジェニック線虫を得ることに成功した。現在までに、咽頭筋・体壁筋・神経組織に rgDAAO が発現した 3 種類のトランスジェニック線虫を得ることに成功した。3) ついで、細胞内局所で機能する D-アミノ酸-DAO システムを構築した。まず rgDAAO^{WT} 安定発現細胞を取得した。これらの rgDAAO^{WT} 発現細胞に D-アミノ酸を添加して時空間的制御可能な H₂O₂ 産生レドックス擾動系を構築出来た(*5,7,8)。4) スーパーオキシド特異的に不均化反応を触媒し H₂O₂ を産生するスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)を、H₂O₂ 検出蛍光プローブ roGFP2-Orp1 と融合するという分子デザインに基づき、細胞内スーパーオキシドの検出を可能とする蛍光プローブ N-SOD を開発した。N-SOD は、phenazine methosulfate(PMS)によって、細胞内で発生したスーパーオキシドを検出できる蛍光プローブとして機能することを明らかにした。以上、当初の目標を 100%達成した。

A-2-2 過酸化水素発生素子となる D-アミノ酸の合成

【当初の目標】細胞内局所的に発生可能な H₂O₂ の産生系の構築を目指し、rgDAAO を用い、1)rgDAAO 変異体と高選択的に応答する合成 D-アミノ酸の開発を行った。2)また H₂O₂ の発生を蛍光としてリアルタイムに観察するための蛍光色素の開発を行った。

【得られた成果】1) 生体内で H₂O₂ 発生系に利用する非天然型 D-アミノ酸の開発:基質特異性の広い rgDAAO M213A 変異体(A-2-1 班の成果)をターゲットとして非天然型 D-アミノ酸として①フェニルグリシン誘導体を候補化合物として合成した。その結果 D-1-ナフチルグリシンを合成することに成功した。②またトリアゾール誘導体の合成を試み、メチル基を有する 1,2,3-トリアゾール誘導体を合成した。2) 細胞内局所的な H₂O₂ 発生確認をモニタリングできる D-アミノ酸の開発:Weber と Farris によって開発された prodon はナフタレン環の 2 位にジメチルアミノ基、6 位にカルボニル基を有する環境応答型蛍光分子である。そこでナフタレン環上 2 位にピロリジン基を有する 2-ナフチルグリシン由来のケト酸を合成し、メタノール溶液に 365 nm の紫外線を照射することで青色の蛍光を発することを確認した。すなわち、目的とする化合物の合成を 100%達成した。

A-2-3 ROS 発生系の細胞応用

【当初の目標】本課題では、細胞内で安定的発現し、活性が高い rgDAAO の変異型を開発し H₂O₂ の発生系を構築して、H₂O₂ の発生を評価すること、また、構築した H₂O₂ 発生系を用いて ROS 発生による生体への影響を解析することを目的とした。

【得られた成果】1) rgDAAO の細胞内発現系の構築: rgDAAO を pcDNA3.1 ベクターに挿入した rgDAAO 発現ベクターを構築し、培養細胞を用いた rgDAAO の発現系を構築した。2) rgDAAO 変異体の作成: rgDAAO は立体構造および基質との結合解析が行われている(*Adv. Synth. Catal.* 2006, 348, 2183 - 2190)。非天然 D 型アミノ酸である D-ナフチルグリシンのナフタレンと rgDAAO213 番目のメチオニン(M213)が立体障害を起こすことが予想さ

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

れている。そこで、本研究では A-2-1 で作成した rgDAAO の M213 および近傍アミノ酸の変異酵素をヒト乳腺癌細胞 MCF-7 細胞で発現させた。この中で M213V や M213H が安定発現し、野生型比べて、D 型メチオニンに対する特異性が高くなっていた。3) H_2O_2 検出および、 H_2O_2 暴露の表現型解析方法の確立: アクチンは、真核生物に多量に存在し球状アクチンが重合して、繊維状アクチン(F-アクチン)を形成する。アクチンの構造変化に H_2O_2 が関与しており、 H_2O_2 酸化ストレスにより、細胞形態が変化する。そこで、アクチンを指標にして、 H_2O_2 の細胞内の影響を解析した。まず、酸化ストレス応答に重要な役割を果たす ATF5 の解析を通して、酸化ストレス応答検出系を構築した。つまり ATF5 の発現を Neuro2a 細胞において抑制すると、神経突起の伸長が抑制された(*1-3)。 H_2O_2 暴露した Neuro2a 細胞においてアクチンを Actin-stain488 で染色し観察したところ、神経突起の伸長が阻害され、アクチン骨格が減少し、成長円錐の減少が見られた。この方法で H_2O_2 の影響を神経培養細胞において解析できる。4) 神経細胞における H_2O_2 発現系の構築: 蛍光タンパク質 mCherry 融合型 rgDAAO- M213V 変異体(rgDAAO^{MV})発現ベクターを Neuro2a 細胞に導入し、分化誘導後 D 型メチオニン(D-Met)を添加したところ、rgDAAO^{MV} 発現した Neuro2a 細胞において H_2O_2 の発生が検出された。つまり、利用しやすい過酸化水素発生系が構築できた。5) 過酸化水素発生系を用いた細胞への影響解析: 構築した新規細胞内過酸化水素発生系を用いて過酸化水素の細胞への影響を解析した。Neuro2a 細胞に rgDAAO^{MV} 発現ベクターを導入し、分化誘導後 D-Met を添加し、 H_2O_2 発生を誘導すると、細胞周辺に局在する F-アクチンが消失し、成長円錐への F-アクチンの集積も減少していた。この時、他の影響(アポトーシスやオートファジーなどの細胞死へと繋がる細胞ダメージ)は引き起こさず過酸化水素の影響を調べることができた。すなわち ROS 発生による生体への影響を解析する目標を 100%達成した。

A-2-4 ROS 検出・発生系の生体応用

【当初の目標】1) ショウジョウバエを用いて、ROS を発生する実験系を検討すること。2) その実験系を用い、寿命と ROS 発生量との関係を調べることから、ショウジョウバエ個体内での、ROS のレドックスシグナル分子としての機能や、酸化ストレスの個体に対する影響、特に、老化と脳機能への関わりについて明らかにすることを目的とした。

【得られた成果】1) ショウジョウバエ ROS 発生システムの構築: ショウジョウバエの外来蛋白質発現システムとして、Gal4-UAS システムが広く使われている。このシステムは、酵母由来転写因子 GAL4 と GAL4 結合制御配列 UAS を組み合わせる。UAS 配列の下流に目的遺伝子を持つトランスジェニックハエ(UAS 系統)と、組織特異的に Gal4 を発現する系統を交配させるだけで、目的の部位に目的の蛋白質を発現させることができる。本研究では、まず UAS 配列の下流に野生型 DAAO の遺伝子配列をもつトランスジェニックハエを作成し、Gal4-UAS 法を用いて、光受容器細胞に DAAO を発現させ、えさに、D-アミノ酸を添加した。目が小さくなる等のマクロなレベルでの変化は見られなかったが、D-アミノ酸の添加で神経突起が細くなっている様子が観察された。さらに、筋肉細胞に DAAO を発現させたところ、幼虫の動き方の違いなどが見られた。すなわち、局所的 ROS 産生に成功した。2) ROS 産生の影響を調べるための行動実験系の確立: ROS による酸化ストレスは、細胞の老化を引き起こすと考えられている。細胞の老化と脳機能低下の関係はよくわからない点も多い。また、ROS が様々な脳疾患、例えば、記憶障害や精神疾患などに関与する可能性も考えられる。まず、視運動反応を定量化する実験系を確立し報告した(*1)。次に、老化により失われる機能として学習・記憶について検討できる実験系を構築した。PPI は、パルス音などによる驚愕反応が直前の弱いパルス音により抑制される現象である。これまで、ショウジョウバエで、PPI が起こる事が報告されていなかったが、我々は、幼虫の驚愕反応において PPI が起こることを見出した(*11,16)。さらに、幼虫の意思決定を調べる実験系も

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

確立できた(*4)。神経細胞に野生型 DAAO を発現させ、D-アミノ酸を添加したエサで飼育したショウジョウバエ幼虫を用いた場合には ROS 産生による PPI の変化は検出できなかった。一方、全細胞に DAAO を発現させ、D-アミノ酸を添加したエサで飼育したショウジョウバエの生育速度を調べたところ、生育の遅れが観察できた。つまり、**個体の生育に対する ROS の効果を見ることに成功した。**

A-3 免疫アジュバント開発

【当初の目標】大野(NatureCom)は免疫の専門家であり、腐朽菌由来のラッカーゼの単離を行った。それをもとに**万能高安定ラッカーゼを安定化設計する**。その万能ラッカーゼを用いて、重合ポリフェノールを基盤にした**新規免疫アジュバントの開発**を行い評価を行う。

【得られた成果】様々な自然免疫活性化物質の中で、免疫学教室では薬用茸として知られている、*Agaricus brasiliensis* の生理活性作用の解析を行ってきた。*A. brasiliensis* のポリフェノール類が酵素により酸化重合した、重合ポリフェノールに着目し解析を進めてきた。しかし、重合ポリフェノールは複雑な構造であるために、構造の細部や機能解析は未だ不明な点が多く、また、天然から高純度の重合ポリフェノール(リグニン)を抽出、精製することは困難である。そこで、A-3 で *A. brasiliensis* のポリフェノール酸化酵素の一種であるラッカーゼの遺伝子をクローニングし、発現させて重合ポリフェノールを合成することをめざした。**天然型の発現は極めて困難であったが、遺伝子を祖先型に改変することで、ピキア酵母にタンパク質発現させることに成功した(*1,6,7)**。さらに、**改変ラッカーゼを酸化重合触媒として高純度な重合ポリフェノール (mL2a-pCA) の合成に成功した**。mL2a-pCA の免疫賦活化作用の解析ならびに免疫賦活化剤としての応用について検討した。その結果、マウス腹腔内におけるマクロファージの形態変化や増殖といった他の免疫賦活化剤にはない特徴的な作用が観察された。さらに mL2a-pCA の生理活性作用の詳細な解析によって、マクロファージからのケモカインやサイトカインなどを産生誘導していることを明らかにした。これらの活性は細胞内のシグナル伝達に参与する Rac1 と呼ばれる細胞内タンパク質のリン酸化によって引き起こされていることを明らかにした。これまで、重合ポリフェノールの免疫賦活化作用の詳細なメカニズムは明らかになっていなかったが、**祖先型改変ラッカーゼを用いて初めて重合ポリフェノールの免疫賦活化作用(アジュバント)の作用機序の一部を明らかにすることに成功した(*2-5,8)**。すなわち当初の目標を 100%達成した。

A-4 でんぷん改質酵素安定化

【当初の目標】生物の貯蔵多糖のなかでもグリコーゲン、デンプン等の α -グルカン食品や工業原料としても注目される。 α -グルカンは、 α -1,4 結合からなる直鎖と α -1,6 結合の枝分かれからなる構造をもつが、その枝分かれの頻度・分布により、グリコーゲン、アミロペクチン、アミロース、と大きく物性の異なるグルカンとなる。この構造は、伸長酵素、ブランチングエンザイム、デブランチングエンザイムにより形作られるが、なかでも枝分かれ構造を作るブランチングエンザイムにより、水への溶解度等の物性を大きく変化させることができ、デンプンから高分子高分岐グルカンや高度分岐環状デキストリンといった水に溶解性の様々な物性の多糖類を製造できる。しかし、ブランチングエンザイムの耐熱性は概して低く、その工業利用には耐熱化が強く望まれている。そこで、本研究では、ビッグデータを用いた安定化設計方法の開発を応用し、イネ、原始紅藻、シアノバクテリアのブランチングエンザイムの系統解析手法による高安定化設計を行うことを目的とした。

【得られた成果】約 1300 種のグリコーゲン/デンプンブランチングエンザイムのなかから、約 250 種類のデータを選別した。アラインメントの確認・改良を行い、ブランチングエンザイムの祖先型酵素配列の推定を行った。そして、シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 と原始紅藻シソンのブランチングエンザイムへの祖先型配列の導入を設計し、G339N、A343P、S349T の 3 種類の変異を導入した。3 種類の変異体の内、A343P 変異体は、

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

50℃でも高い活性を持つことが確認され、耐熱化が期待された。しかしより正確な解析からは両者の高温耐性はほぼ同程度で、明確な耐熱性向上には至らなかったが、**系統樹利用耐熱化設計を試み、解析し耐熱化設計に反映するという当初の目標は 100%達成した。**

B. ビックデータを用いた好熱菌安定酵素の高活性化技術の確立

本研究課題では、配列情報をもとに好熱菌がもつ安定酵素を低温あるいは常温で高活性化する技術開発を行い。その技術を過酸化水素検出素子開発に応用する。

B-1 理論・実証: 好熱菌酵素の汎用的な低温高活性化改変技術の確立

【当初の目標】酵素利用では、しばしば安定性の悪さが問題となる。一方、好熱菌が持つ酵素は高い耐熱性を持つが、常温や低温での活性が著しく低い。そこで本課題では、好熱菌酵素の高い耐熱性を損ねることなく、常温・低温活性を改善することを試みる。

研究期間開始以前に、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* が持つイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素(以下 TtIPMDH)を対象に、進化分子工学手法により多くの常温・低温高活性化型変異体を獲得した。さらに、アミノ酸置換を組み合わせることで多重アミノ酸置換変異体の獲得を試みたが、むしろ活性が低下する 경우가多く、常温菌酵素並の活性をもつ変異体は得られなかった。そこで、1) *T. thermophilus* IPMDH と常温菌である大腸菌由来 IPMDH のアミノ酸配列の比較をおこない、アミノ酸置換を好熱菌野生型 IPMDH に導入することによって、大腸菌 IPMDH に近い常温・低温活性を持つ変異型酵素を創出すること。2) 低温高活性化型変異体の低温高活性化の熱力学的な機構を明らかにすること。3) 耐熱性とトレードオフ無しに低温・常温活性の改善が可能かを明らかにすることを目標とした。

【得られた成果】1) 本研究では、TtIPMDH の活性部位近傍のアミノ酸を網羅的に大腸菌由来 IPMDH の同じ部位に見られるアミノ酸に置換した。18 個の変異体を作製し触媒活性の解析をおこなった結果、9 変異体で 25℃での比活性が向上し、最大で好熱菌野生型 IPMDH の 7.6 倍にまで高活性化した。これらのアミノ酸置換を複数組み合わせることで好熱菌野生型 IPMDH と比べて 25℃での比活性が 14 倍向上した変異体(mut9/21)を獲得した(*1-3)。2) その活性化機構の解明を行い、ミカエリス複合体と遷移状態との間の自由エネルギー変化が小さいと反応速度が速く、低反応温度でのミカエリス複合体の不安定化が低温高活性化機構であることが明らかになった。3) 低温活性化 mut9/21 変異体の熱変性温度を求めた。その結果、変異体の熱変性温度はわずかに2℃だけ野生型より低い 85℃であった。つまり酵素活性と耐熱性のトレードオフは必然ではないことを明らかにした(*4,5)。以上のように、当初の研究目的を 100%達成した。さらに、活性上昇した好熱菌 IPMDH の変異アミノ酸を共通祖先アミノ残基を比較したところ、好熱菌 IPMDH のアミノ酸が共通祖先配列のアミノ酸と一致する場合、25℃の比活性が2倍以上向上する確率が高いことが明らかとなった。以上、実証データを収集し、理論研究に反映し、目標を 130%達成した。

B-2 過酸化水素検出素子開発

【当初の目標】過酸化水素は環境負荷が低い酸化剤であり、パルプ漂白、排水処理、半導体洗浄、飲料容器殺菌剤として広く利用されている。そこで過酸化水素の残存量の簡便な検出法が必要となっている。現在は主に電流検出型化学センサーが用いられているがバイオセンサーとして大腸菌の過酸化水素に特異的なセンサータンパク質 OxyR と 緑色蛍光タンパク質 GFP を用いた過酸化水素素子が開発されている。そこで高度好熱菌 *T. thermophilus* のタンパク質を用いて安定高活性過酸化水素素子の開発を目的とした。

【得られた成果】1) 高度好熱菌 OxyR 遺伝子の同定:ゲノム配列のデータベース検索および系統樹による解析から、TTC1871 遺伝子を OxyR であると推定した。その欠損株が野生株より過酸化水素に対して高い感受性を示すことから、TTC1871 が OxyR をコードしていると結論した(*3)。つぎに、OxyR に保存されていた過酸化水素の受容に重要なシス

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

テイン残基をアラニンに置換した変異体 *oxyR* (*oxyR* C88A, *oxyR* C199A, *oxyR* C208A) を作製した。高度好熱菌の *OxyR* は 208 番目のシステインが過酸化水素受容に重要な働きを担っていることを明らかにした(*1)。2) *OxyR* 標的遺伝子の探索: *OxyR* 欠損株が野生株と比較して高い過酸化水素感受性を示しことから、細胞抽出液中に含まれるタンパク質を変性2次元ゲル電気泳動により解析した。5スポットが野生株/ Δ *oxyR* 株比で増加、同様に5スポットで減少が認められた。そのプロモーター上流には大腸菌や *Pseudomonas* の *OxyR* 結合配列に類似した配列が存在した(*3)。3) *OxyR* 標的遺伝子の発現と機能解析: *bfr* 遺伝子、*mn-cat* 遺伝子の *oxyR* 依存の発現変化をレポーターアッセイにより解析した。その結果、両遺伝子とも *oxyR* に依存した発現の減少が認められた。以上: 過酸化水素素子の開発には至らなかったが、*OxyR* レポーターアッセイ系作製の基礎となる *OxyR* 結合配列の同定に成功した。達成率は 80%程度と言える。

C. 金属(金、白金等)と特異的に結合するタンパク質設計技術の開発

本課題では金属に特異的に結合するタンパク質の設計技術の開発を行った。実験研究では、ファージディスプレイを用いてランダム配列の中から、金属結合配列の選択をおこない、その特徴を抽出する。理論研究では、実験により明らかになった白金電極に野生型に比べ強く結合する LARFH タンパク質を分子動力学法に基づき解析した。

C-1 金属(金、白金等)と特異的に結合するタンパク質設計技術の開発(理論)

【当初の目標】これまでの実験研究によって、LARFH タンパク質と呼ばれるタンパク質のループ部分にランダム配列を導入したライブラリーから白金に強く結合する配列が選択された。その配列はアミノ酸の 1 文字表記で YKRGYK という配列を持っていた(詳細は C-2)。実験から得られたペプチドと白金の結合解離定数から結合エネルギーは水素結合(生体分子における水素結合)未満であると推定された。そこで、本研究課題では LARFH タンパク質の変異型を分子動力学法で解析し、特異的に白金に結合する機構を解明する。

【得られた成果】1) 一分子 LARFH および一分子ペプチドの水溶液中でのシミュレーション: 白金結合型 LARFH および YKRGYK、のうちの一残基をアラニンに置換した アラニン置換 LARFH のモデル構造を作成し初期構造とした。白金結合型ペプチドとアラニン置換型ペプチドに対しては直鎖状のモデル構造を作成し、分子動力学シミュレーションの初期構造とした。分子動力学シミュレーションから LARFH タンパク質の全体構造の安定性を解析した結果、アラニン置換型 LARFH の結合力の構造要因が特定された(*1-5)。2) 一分子ペプチドの水-金界面への接着のシミュレーション: 白金結合型ペプチドとアラニン置換ペプチドに対して、金表面とアミノ酸、炭化水素相互作用を表す力場 GoIP を用いて、金表面-水-ペプチド系での分子動力学シミュレーションを行った。アンブレラサンプリング法を用いて結合自由エネルギーをそれぞれ計算し、白金結合型ペプチドでは 30.54 kcal/mol、Y5A ペプチドでは 45.60 kcal/mol という値を得た。この結果から、水溶液中では Y5A ペプチドの方が白金結合型ペプチドよりも強く金表面と結合するといえる。3) 一分子 LARFH の水-金界面への接着のシミュレーション: 白金結合型 LARFH とアラニン置換型 Y5A LARFH に対しても、GoIP を用いて、金表面-水-ペプチド系での分子動力学シミュレーションを行った。これにより白金結合型 LARFH では 13.52 kcal/mol、Y5A LARFH は 36.15 kcal/mol という値を得た。この結果から、水溶液中において Y5A LARFH は白金結合型 LARFH に比べて接着面積が大きいいため、より強く金表面と結合するといえる。以上、金属(金、白金等)と特異的に結合するタンパク質の計算機での評価を行うことに成功し目標を 100%達成した。

C-2 実証(梅村知、宮川): 白金と結合する多種の配列の取得と解析

【当初の目標】タンパク質や酵素のバイオセンサーやバイオデバイスとしての用途には、タンパク質を他の分子(金属材料や他のタンパク質)と相互作用させる必要がある。従来のセンシングタンパク質の電極への結合方法として、ポリアクリルアミドを接着剤として用

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

いる方法や、タンパク質末端にタグを付ける方法が採用された。本研究では、タンパク質表面の任意の領域に、**白金結合部位を創出する設計手法**を開発することを目的とした。

【得られた成果】 1) **白金結合型タンパク質の創出**: これまでに、人工 four-helix bundle タンパク質 LARFH(Akanuma *et al.*, *J. Biochem.* 2010)のループの一つに白金結合部位を創出した白金結合型 LARFHを開発した。LARFHを構成する4本の α ヘリックスを連結する3つのループのうちの一つに含まれる SGQGGs 配列(アミノ酸一文字表記で)をランダム配列に置換したライブラリーを作製し、T7 フェージディスプレイ法を用いて白金結合能を有する LARFH 改変体を選択し 97 クローンの配列確認を行なったところ、50 クローンが YKRGYK 配列をループ上に持っていた(*1-8)。2) LARFH 改変体と白金との相互作用解析:そこで、YKRGYK 配列を持つ LARFH 改変体と白金との結合をフロー型水晶振動子マイクロバランス(F-QCM)測定によって解析した。その結果、**白金結合型 LARFH 改変体は親和性が3倍向上しており、金との結合も観察された(*1-8)**。3) **白金結合型ペプチドの解析**:白金結合アミノ酸配列 YKRGYK と野生型 LARFH のループ配列 SGQGGs 配列を含む 10 アミノ酸ペプチドの白金との結合を F-QCM によって測定した。野生型ペプチドは白金との結合は見られなかった。一方、YKRGYK ペプチドでは、解離定数は 5.9 μ M であった。すなわち、YKRGYK 配列はペプチドそのものが白金結合特性を持つことを明らかにした(*1-8)。4) YKRGYK 配列中の一つのアミノ酸をアラニンに置換し、その白金結合特性を解析するアラニンスキニング解析をおこなった。その結果、ペプチドの Lys や Arg 等の正電荷アミノ酸の存在が白金との相互作用に重要であることが示された(*1-8)。

以上の様に、白金と強く結合する LARFH タンパク質改変体を得て、その YKRGYK が白金と結合すること、YKRGYK 配列の正電荷アミノ酸が白金との結合に大きく寄与していることを見出した。以上、**白金結合部位を創出する目標を 100%達成した**。

C-3 応用:導電性タンパク質を利用した新規バイオプロセスの開発

【当初の目標】近年、電極との電子授受(電流)を介してエネルギーを獲得し、増殖する微生物(electrochemically active bacteria; EAB)が相次いで発見されている。EAB には *Shewanella* 属の金属還元菌や *Acidithiobacillus* 属の鉄酸化細菌等が含まれ、これらの微生物はシトクロム c 等の導電性タンパク質から構成される電子伝達経路(細胞外電子伝達経路)を介して電極と電子の授受を行い、電極を電子供与体、もしくは電子受容体として増殖に必要なエネルギーを獲得する。そこで、EAB の有する導電性タンパク質を利用し、**新たな有用ナノバイオエレクトロニクスプロセスを構築**することを最終目標とした。

【得られた成果】 (1) *Shewanella*を用いた電気化学的脱窒プロセスの構築:脱窒能力を持つ *Shewanella loihica* PV-4 株に電極から電子を与え、硝酸から窒素ガスへの変換反応が生じることを実証した。(2) *Acidithiobacillus*を用いた電気化学的窒素固定プロセスの構築:*Acidithiobacillus ferrooxidans*において窒素固定酵素(ニトロゲナーゼ)を高発現させ、電極から電子を与えることにより、窒素ガスからアンモニアへの変換反応が生じることを実証した(*1,2)。またアンモニアの同化反応の阻害剤を添加することにより、アンモニアの合成量を顕著に増加させることに成功した(*3)。以上の成果により、**電気活性微生物の導電性タンパク質と酸化還元酵素を活用することで、化学的な電極反応だけでは実現困難な有用プロセスを構築**できることが示された。目的を 100%達成した。

D. タンパク質-タンパク質接合面設計法の開発

バイオナノテクノロジーではタンパク質の自己組織化能力を、ナノマシンやナノエレクトロニクス作製に応用しようというのが大きな目標である。その最大の基本技術は任意のタンパク質と任意のタンパク質間に新たに接合面を設計するという技術である。本研究計画では、タンパク質-タンパク質接合面の設計法を理論と実験の両面から開発する。

D-1 理論:タンパク質-タンパク質接合面設計法の開発

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

【当初の目標】八木らはタンパク質分子スレリスリンおよび LARFH に相互作用面を設計し、両者を結合させることに成功した(D-2)。八木らは、疎水性アミノ酸ロイシンをスレリスリンおよび LARFH のに導入した。また、負電荷アミノ酸アスパラギン酸をスレリスリンに導入し(スルエリスリン変異型 I)、正電荷アミノ酸アルギニンを LARFH に導入した。こうして、疎水性相互作用および静電的相互作用によってスレリスリン変異型 I と LARFH の特異的結合を実現した。D-1 では、動力学シミュレーションでこの二つのタンパク質分子を出発構造とし粗視化モデルを用いて計算を行い、**接合面設計技法の改良**をおこなった。

【得られた成果】(1)スレリスリン変異型 I と LARFH のシミュレーション:スレリスリン変異型 I および LARFH の祖視化モデルを作製し、動力学計算によって両タンパク質の結合を模擬した。その結果、設計部位で接合することがわかった。また、LARFH の設計部位がスレリスリン変異型 I の持つグルタミン酸とよく接合していることが判明した(*2,4,5,6)。(2) スレリスリン変異型 II と LARFH のシミュレーション:グルタミン酸を他のアミノ酸に変えたスレリスリン変異体 II と LARFH 変異体各1分子の場合、および、スレリスリン変異体 II が2分子の場合について、粗視化モデルを用いた計算を行った。その結果、いずれの場合も、スレリスリン変異体 I を用いた場合と比べて、スレリスリン変異体が設計箇所で結合する頻度が増加しており、より効率的な線維化が可能であることがシミュレーションで確認できた。

以上の様に、スレリスリンと LARFH の動力学計算により、両タンパク質の結合が模擬できた。**両タンパク質が結合する際、結合に関与するアミノ酸の種類が特定され、より繊維作製に適した構造を推定できた。以上のように当初の目標を 100%達成した。**

D-2 実証:タンパク質-タンパク質結合法の開発

【当初の目標】タンパク質表面改変によって自己組織化を誘発しタンパク質線維など、幅広い産業分野への応用展開が期待できる。汎用的な**タンパク質-タンパク質結合面設計方法を開発し、2つのタンパク質が交互に結合したタンパク質線維を構築**することを目標とした。

【得られた成果】1)まずスルエリスリンの2本の平行 α ヘリックスにロイシン残基を6つと負電荷アミノ酸を導入することで接合面を設計した(6L 型結合面)(*3)。もう一つのタンパク質 LARFH の1本の α ヘリックスにロイシン残基を3つと正電荷アミノ酸を導入することで結合面を設計した(3L 型結合面)。両者の混合で、**静電相互作用と疎水性相互作用による結合を想定した。実際、両タンパク質の特異的なタンパク質間相互作用が確認できた(*2)。**その結合の解離定数は $0.42 \mu\text{M}$ であった。つまり、**本技術で十分強い結合力を持つタンパク質タンパク質結合を創りだした(*2)。**2)結合面を分子両端に導入したスルエリスリン改変体と LARFH 改変体を作成し混合すると、両者が共重合したタンパク質繊維を観察することができた。つまり、**本技術で自己組織化繊維構造を構築した(*2,4-6,12-20)。**3)非特異的な分子間相互作用の排除:2)で構築したタンパク質線維には枝分かれ構造や凝集体も多かった。すなわち、改変したタンパク質分子間で非特異的に結合が生じていた。そこで、分子表面の正電荷アミノ酸を1つずつ中性もしくは負電荷アミノ酸へと置換したスルエリスリン改変体を計 19 個作製した。これらのうち 6 個は非特異的な相互作用が減少していた(*9)。また、動力学(MD)シミュレーション(D-1)で特定された非特異的結合残基と実験で見出した変異を総合し、**非特異的な相互作用をほぼ抑制**できた。4)タンパク質間結合面の最適化:スルエリスリン接合面の6つの Leu を Val に置換した変異体を作製した。結合面は Val よりも Leu の方が適していることが分かった。また、負電荷アミノ酸も Glu よりも Asp の方が適していることが分かった(*8)。また、LARFH に結合面として導入した 3L 型結合面の最適化にも取り組んだ。始めに、3つの Leu 残基を疎水性アミノ酸(LIMFV)へランダムに置換し 125 通りの LARFH 遺伝子ライブラリーを作製し Pull-down 法(*7)で解析した。その結果 5.4 倍(Leu-Phe-Ile)、4.7 倍(Leu-Met-Val)、3.6 倍(Leu-Leu-Phe)**結合力が上昇した改変体を得た。**5)結合面の移植可能性の検証:タンパク質の多くはその分子表面に α

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

ヘリックス構造を持つ。そこで、LARFHに設計した3L型結合面を好熱菌 *T. thermophiles* 由来 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH) と 2C-メチル-D-エリスリトール-2,4-シクロニリン酸キナーゼ (MECDPS) の2つのタンパク質の分子表面の α ヘリックス上に移植した。3L型結合面を導入した IPMDH 改変体 12 個中 2 つはスルエリスリン改変体と相互作用した(*10,11)。また、3L型結合面を導入した MECDPS 改変体 5 個中、3 つはスルエリスリン改変体と相互作用した。つまり、本プロジェクトで開発したタンパク質間結合面は他のタンパク質にも移植可能であることを示した。

以上、スルエリスリンと LARFH タンパク質の相互作用を人工的に創り、自己組織化タンパク質繊維を構築でき、目標を達成した。さらに、スルエリスリン改変体の非特異的な分子間相互作用を抑制すること、LARFH に導入した結合面を最適化すること、結合面は他のタンパク質へも移植可能であることを見いだした。以上、当初の目標を 150%達成した。

＜優れた成果が上がった点＞

A-1. 短期間でのアライメントが可能となった。また、アライメントに基づいて祖先タンパク質配列を推定、復元し、全生物の最後の共通祖先 (LUCA もしくは Commonote) の持っていたタンパク質を、機能(酵素活性)を持った状態で復元した(*35)。これは、完全長を復元された最長最古のタンパク質である。これは、本課題の成果として特筆すべきものである。

A2-1. rgDAAO^{MV} 発現トランスジェニック線虫は、人工的に活性酸素を発生させるトランスジェニック動物の初めての例である。古くから活性酸素と疾患および老化の関係性が指摘されているものの、未だにその因果関係は明らかとなっていない。今後、個体における活性酸素の生理的意義などを明らかにする上で、線虫 *in vivo* 解析は非常に有用性が高い。

A2-3. 新規な過酸化水素発生系を構築し、その影響を調べることができた。この過酸化水素発生系は細胞死などの細胞ダメージが低く、過酸化水素の量をコントロールできる。

A-2-4. DAAO を生体内で発現する方法に使用できるトランスジェニックショウジョウバエが作成できた。また、脳機能を測定できる行動実験を立ち上げることができた(*1, 3, 11, 16)。

A3. 安定発現困難な *A. brasiliensis* ラッカーゼを祖先型改変で安定化発現させ、重合ポリフェノールのマクロファージ活性化作用メカニズムの一端を初めて明らかにした。

C3. タンパク質と電極を用いたナノバイオプロセスの構築に向けた有用酵素探索の過程で、*Acidithiobacillus* の菌体自体がよく電極と相互作用し、窒素固定反応の触媒として優れた性質を示すことが見出された。電気活性微生物を利用して大気中の窒素ガスからアンモニアを電気合成することに世界で始めて成功した。将来的な産業利用も期待されることから特許出願^{*3}を行った。本菌株を利用すれば低コストかつ省エネルギーなアンモニア製造を実現できる可能性があるため、今後実用化を目指した研究開発を行っていく。

＜課題となった点＞：特にない。

＜自己評価の実施結果と対応状況＞：順調に推移し全体で 100%以上の到達といえる。

＜外部(第三者)評価の実施結果と対応状況＞初年度、シンポジウムの記載をしなかったために、その点を指摘されたので、2 年目以降報告書に記載した。指摘に対応して業績の総数を追記した。

＜研究期間終了後の展望＞

理論、検証、応用の連携研究が継続して実施されている。

＜研究成果の副次的効果＞

多くの学生が参加し、PD となるなど学部学生、大学院生の教育に大きな効果を生んだ。

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

12 キーワード(当該研究内容をよく表していると思われるものを8項目以内で記載してください。)

- (1) 酵素耐熱化 (2) 酵素高活性化 (3) タンパク質-タンパク質結合
 (4) タンパク質-金属結合 (5) 動力学シミュレーション (6) 活性酸素種
 (7) 重合ポリフェノール (8) バイオナノテクノロジー

13 研究発表の状況(研究論文等公表状況。印刷中も含む。)

上記、11(4)に記載した研究成果に対応するものには*を付すこと。

<雑誌論文・図書・学会発表>様式はこれら3つが別であったが、テーマごとにまとめた。

本拠点研究全体での研究発表の状況を総計すると以下の様である。

雑誌論文:46 報

図書(総説著書等):6 報

国際学会発表:26 件

国内学会発表:96 件

テーマごとの雑誌論文、図書、学会発表は以下の様である。

A. ビックデータを用いた酵素高安定化設計方法の開発

A-1. 理論:酵素安定化理論の高度化

雑誌論文

1. Akanuma, S., S. Yokobori, Y. Nakajima, M. Bessho, & A. Yamagishi, Robustness of predictions of extremely thermally stable proteins in ancient organisms. *Evol.* 69(11): 2954–2962(2015)
2. Semba, Y., Ishida, M., Yokobori, S., Yamagishi, A., Ancestral amino acids substitution improved thermal stability of recombinant lignin-peroxidase from white-rot fungi, *Phanerochaete chrysosporium* strain UAMH 3641. *Protein Engineer. Des. Select.* 28(7): 221–230(2015)
3. Fukuda, Y., A. Abe, T. Tamura, T. Kishimoto, A. Sogabe, S. Akanuma, S. Yokobori, A. Yamagishi, K. Imada, & K. Inagaki (2016) Epistasis effects of multiple ancestral-consensus amino acid substitutions on the thermal stability of glycerol kinase from *Cellulomonas* sp. NT3060. *J. Biosci. Bioeng.* 121(5): 497–502.
4. Yokobori, S., Y. Nakajima, S. Akanuma, & A. Yamagishi (2016) Birth of Archaeal Cells—Molecular phylogenetic analyses of G1P dehydrogenase, G3P dehydrogenases, and glycerol kinase suggest derived features of archaeal membranes having G1P-polar lipids. *Archaea* Article ID 1802675
5. *Furukawa, R., M. Nakagawa, T. Kuroyanagi, S. Yokobori, & A. Yamagishi (2017) Quest for ancestors of eukaryal cells based on phylogenetic analyses of aminoacyl tRNA synthetases. *J. Mol. Evol.* 84(1):51–66.
6. Garcia, A. K., J. W. Schopf, S. Yokobori, S. Akanuma, A. Yamagishi (2017) Reconstructed ancestral enzymes suggest long-term cooling of Earth's photic zone since the Archean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 114: 4619–4624.

図書

7. Akanuma, S., and Yamagishi, A.; Ancestral Reconstruction of Enzymes, in "Understanding enzymes: Function, Design, Engineering and Analysis", Ed. Allan Svendsen, Pan Stanford Publishing. (2016) pp. 581–596

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

8. Akanuma, S., and Yamagishi, A. Chapter 20 “A Strategy for Designing Thermostable Enzymes by Reconstructing Ancestral Sequences Possessed by Ancient Life”, in Grand Challenges in Biology and Biotechnology “*Biotechnology of Extremophiles: Advances and Challenges*” Ed. Pabulo H. Rampelotto, Springer (2016) pp. 581–596

国際学会発表

9. Yamagishi, A., Evolution of Life revealed from genetic information, *Astrobiology A Japanese–German Colloquium*, 2015/12, Kiel, Germany
10. Yokobori, S., Experimental evidence for the thermophilicity of ancestral life. *Germany & Japan Workshop on Evolutionary Genomics*. 2016/03, Mishima, Japan
11. Yokobori, S., Y. Nakajima, S. Akanuma, & A. Yamagishi. Derived Features of Archaeal Membranes Having G1P–Polar Lipids Suggested by Molecular Phylogenetic Analyses of G1P Dehydrogenase, G3P Dehydrogenases, and Glycerol Kinase. *Extremophiles 2016*. 2016/09, Kyoto, Japan
12. Akanuma, S., S. Yokobori, & A. Yamagishi. Ancestral Sequence Reconstruction to Learn about the Environment of Early Life. *Extremophiles 2016*. 2016/09, Kyoto, Japan
13. Sasamoto, T., S. Akanuma, M. Bessho, S. Yokobori, & A. Yamagishi. Inferring the pH Environment of Ancient Organisms by Characterizing Resurrected Proteins. *Extremophiles 2016*. 2016/09, Kyoto, Japan
14. Furukawa, R., M. Nakagawa, T. Kuroyanagi, S. Yokobori, & A. Yamagishi. Searching for Ancestors of Eukaryotic Cells Based on Phylogenetic Analyses of Aminoacyl–tRNA Synthetase. *Extremophiles 2016*. 2016/09, Kyoto, Japan
15. Harada, M., R. Furukawa, S. Yokobori, E. Tajika, & A. Yamagishi. Evolution of cyanobacterial promoter sequences and its relationships to the rise of atmospheric oxygen 2.2–2.45 billion years ago. *Extremophiles 2016*. 2016/09, Kyoto, Japan

国内学会発表

16. 別所瑞萌、赤沼哲史、横堀伸一、山岸明彦、祖先生物超好熱菌説の確実さの検証、日本地球惑星科学連合 2015 年大会、2015/5、千葉
17. 横堀伸一、別所瑞萌、笹本峻弘、中島慶樹、赤沼哲史、山岸明彦、古代タンパク質の復元に基づく全生物の最後の共通祖先の生育環境の復元、日本地球惑星科学連合 2015 年大会、2015/5、千葉
18. 古川龍太郎、横堀伸一、山岸明彦、アミノアシル tRNA 合成酵素の分子系統樹から見た真核生物の起源、日本地球惑星科学連合 2015 年大会、2015/5、千葉
19. 笹本峻弘、赤沼哲史、別所瑞萌、横堀伸一、山岸明彦、復元した祖先型タンパク質の耐熱性と触媒活性の pH 特性、日本地球惑星科学連合 2015 年大会、2015/5、千葉
20. 山岸明彦、40 億年前の祖先タンパクの再生実験、日本進化学会第 17 回大会、2015/8、東京
21. Akanuma, S., M. Bessho, T. Sasamoto, S. Yokobori, A. Yamagishi. Reverification of the thermophilicity of ancient life. , 8th Astrobiology Workshop, 2015/11, Tokyo
22. 山岸明彦、系統的データを用いた祖先型手法による効率的酵素耐熱化設計、BMB2015、2015/12、神戸
23. 別所瑞穂、赤沼哲史、横堀伸一、山岸明彦、実験により復元したタンパク質の変性温度から古代生物の生育環境温度を推定する、BMB2015、2015/12、神戸
24. 別所瑞萌、赤沼哲史、横堀伸一、山岸明彦、Non–Homogeneous モデルを用いて復元した祖先型 NDK の耐熱性、生命の起原および進化学会の第 41 回学術講演会、2016/3、鳴門

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

25. 赤沼哲史、横堀伸一、笹本峻弘、別所瑞萌、山岸明彦、現存生物の相同遺伝子の比較から古代タンパク質、生物、環境を探る、生命の起原および進化学会の第41回学術講演会、2016/3、鳴門
26. 原田真理子、古川龍太郎、横堀伸一、田近英一、山岸明彦。大酸化イベントに伴うシアノバクテリア SOD (Superoxide dismutase) 発現量の地球史的変動: 祖先型プロモーター配列からの推定。日本進化学会第 18 回大会。2016/08、東京(大岡山)。
27. 横堀伸一、中島慶樹、赤沼哲史、山岸明彦。古細菌細胞膜の起源: G1PDH、G3PDH、グリセロールキナーゼの分子系統解析に基づいて。アストロバイオロジーネットワークワークショップ 2016 年年会。2016/09、仙台。
28. 古川龍太郎、中川穂、黒柳拓也、横堀伸一、山岸明彦。アミノアシル tRNA 合成酵素の分子系統解析に基づく真核生物の起源。第 89 回日本生化学会大会。2016/09、仙台。
29. 横堀伸一、中島慶樹、赤沼哲史、山岸明彦。G1PDH と G3PDH の分子系統解析に基づく古細菌細胞膜の起源。第 39 回分子生物学会年会。2016/11、横浜。
30. 横堀伸一。アミノアシル tRNA 合成酵素の分子系統解析に基づく遺伝暗号進化経路の推定。新学術領域研究「冥王代生命学の創成」平成 29 年度 キックオフワークショップ。2017/05、東京。
31. *古川龍太郎、横堀伸一、山岸明彦。アミノアシル tRNA 合成酵素の分子系統解析に基づく初期翻訳系の進化。日本進化学会第 19 回大会。2017/08、京都。
32. *古川龍太郎、横堀伸一、山岸明彦。アミノアシル tRNA 合成酵素の分子系統解析に基づく生命の初期進化の解析。日本 Archaea 研究会第 30 回講演会。2017/09、仙台。
33. 横堀伸一。アミノアシル tRNA 合成酵素の分子系統解析に基づく遺伝暗号進化経路の推定。新学術領域研究「冥王代生命学の創成」第2回ワークショップ。2017/10、白馬、長野。
34. 古川龍太郎、横堀伸一、山岸明彦。ASGARD 古細菌を含めたアミノアシル tRNA 合成酵素の分子系統解析に基づく真核細胞の成立過程の推定。極限環境微生物学会第 18 回大会。2017/11、つくば。
35. *横堀伸一、古川龍太郎、横川隆志、笹本峻弘、佐藤陸、宮下奈津実、遠藤有紀、松田直樹、丸山真歩、木賀大介、赤沼哲史、山岸明彦。アミノアシル化 tRNA 合成酵素の分子系統解析と祖先酵素復元に基づく標準遺伝暗号表の成立過程の推定。Conbio 2017。2017/12、神戸。
36. 張博文、赤沼哲史、笹本峻弘、横堀伸一、山岸明彦。再構成した祖先タンパク質の解析による全生物の共通祖先の生育環境 pH の推定。Conbio 2017。2017/12、神戸。

A-2 活性酸素種(ROS)発生系と検出蛍光タンパク素子の開発

A-2-1 ROS 産生系の開発

雑誌論文

1. Yun YS, Tajima M, Takahashi S, Takahashi Y, Umemura M, Nakano H, Park HS, Inoue H. Two Alkaloids from Bulbs of *Lycoris sanguinea* MAXIM. Suppress PEPCK Expression by Inhibiting the Phosphorylation of CREB. (2016) *Phytother. Res.* 2016 30(10), 1689-1695.
2. Yun YS, Noda S, Takahashi S, Takahashi Y, Inoue H. Piperine-like alkaloids from *Piper nigrum* induce BDNF promoter and promote neurite outgrowth in Neuro-2a cells. (2018) *J. Nat. Med.* 72(1), 238-245.

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

3. Fujikawa, Y., Nampo, T., Mori, M., Kikkawa, M., and Inoue, H. Fluorescein diacetate (FDA) and its analogue as substrates for Pi-class glutathione S-transferase (GSTP1) and their biological application. (2018) *Talanta*, 179, 845–852.

国内学会発表

4. *H₂O₂の発生系のための *Rhodotorula gracillis* D-アミノ酸オキシダーゼの基質特異性評価. 田邨瑞希, 藤川雄太, 井上英史. 日本薬学会第136年会, 2016年3月(横浜)
5. *細胞内局所で H₂O₂を産生するシステムの構築. 青山芙由子, 藤川雄太, 井上英史. 日本薬学会第136年会, 2016年3月(横浜)
6. **Rhodotorula gracillis* D-アミノ酸オキシダーゼに対する人工基質の速度論的解析. 田邨瑞希, 藤川雄太, 井上英史. 第89回日本生化学会, 2016年9月(仙台)
7. *D-アミノ酸オキシダーゼを用いた細胞内局所での H₂O₂産生系の構築. 青山芙由子, 藤川雄太, 田邨瑞希, 山崎えりか, 井上英史. 日本薬学会第137年会, 2017年3月(仙台)
8. *D-アミノ酸オキシダーゼを用いた細胞内局所での H₂O₂発生系の構築とその応用. 熊倉夏希, 藤川雄太, 井上英史. 日本薬学会 第138年会 2018年3月(金沢)
9. 新規 GSTP1 選択的阻害剤の開発およびその作用メカニズムと構造活性相関研究. 南保泰希, 藤川雄太, 森崎芙美花, 佐々木将, 齋藤聡, 小島宏建, 岡部隆義, 長野哲雄, 井上英史. 日本薬学会 第138年会 2018年3月(金沢)

A-2-2 過酸化水素発生素子となる D-アミノ酸の合成

雑誌論文

1. Kobayashi, T., Shioi, R., Ushie, A., Abe, H. and Ito, H. Catalytic Asymmetric Total Synthesis of Artalbic Acid, *Chem. Commun.* **2016**, 52, 9391–9393.
2. Kobayashi, T., Yamanoue, K., Abe, H., and Ito, H., Diastereoselective Total Synthesis of (±)-Toxicodenane A, *Euro. J. Org. Chem.* **2017**, 6693–6699.
3. Kobayashi, T., Ishida, M., Imaida, K., Abe, H., and Ito, H., Total Synthesis of Pleurolactone, *Tetrahedron Lett.* **2017**, 58, 3294–3295.

国内学会発表

4. 山野上琴乃, 小林豊晴, 阿部秀樹, 伊藤久央, Toxicodenane A の立体選択的全合成 第46回複素環化学討論会 2016年9月(金沢)
5. 山野上琴乃, 小林豊晴, 阿部秀樹, 伊藤久央, Toxicodenane A の全合成 日本薬学会第136年会 2016年3月(横浜)
6. 塩井隆太, 牛江亜衣, 小林豊晴, 阿部秀樹, 伊藤久央, artalbic acid の全合成 日本薬学会第136年会 2016年3月(横浜)
7. 石田雅子, 今井田和紘, 小林豊晴, 阿部秀樹, 伊藤久央, 中国産食用キノコ由来テルペノイド類の合成研究 日本薬学会第136年会 2016年3月(横浜)

A-2-3 ROS 発生系の細胞応用

国内学会発表

1. *齋藤 遼太, 梅村 真理子, 田籠 博太郎, 中野 春男, 高橋 滋, 高橋 勇二, ATF5 は神経細胞の樹状突起形成に重要である, BMB2015(第38回日本分子生物学会年会・第88回生化学会大会 合同大会), 2015年12月, 神戸
2. *出口 侑希乃, 山田 基弘, 上坂 望, 勝俣 優利, 中野 春男, 梅村 真理子, 高橋 滋, 高橋 勇二, マウス腸管粘膜上皮の杯細胞の終末分化における ATF5 の関与, 第39回日本分子生物学会年会, 2016年11月, 横浜

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

3. *山田 基弘, 出口 侑希乃, 上坂 望, 勝俣 優利, 中野 春男, 梅村 真理子, 高橋 滋, 高橋 勇二, マウス腸管の粘液産生細胞の分化におけるストレス応答因子 ATF5 の役割, 第 94 回日本生理学会大会, 2017 年 3 月, 浜松

A-2-4 ROS 検出・発生系の生体応用

雑誌論文

1. *Suzuki, Y., Ikeda, H., Miyamoto, T., Miyakawa, H., Seki, Y., Aonishi, T., Morimoto, T. Noise-robust recognition of wide-field motion direction and the underlying neural mechanisms in *Drosophila melanogaster*. *Sci Rep.* 5:10253. doi: 10.1038/srep10253. (2015)
2. 中本竣, 鈴木力憲, 森本高子, 宮川博義, 青西亨, ショウジョウバエにおける視野闘争の理論研究 視覚系の安定構造解析, 電子情報通信学会技術研究報告, 信学技報, vol.115, No.111, pp.41-46 (2015)
3. *Koseki, N., Mori, S., Suzuki, S., Tonooka, Y., Kosugi, S., Miyakawa, H., Morimoto, T. Individual differences in sensory responses influence decision making by *Drosophila melanogaster* larvae on exposure to contradictory cues. *J. Neurogenet.* 30:288-296. (2016)

図書(総説・著書)

4. *鈴木力憲, 森本高子, ショウジョウバエにおけるノイズロバストな動き検知メカニズム: 実験と理論からのアプローチ, 生物物理, vol.56, No.2, pp.102-105 (2016)

国際学会発表

5. Yoshinori Suzuki, Toru Aonishi, Yoichi Seki, Hiroyoshi Miyakawa and Takako Morimoto, Robust encoding the outside world in a tiny insect brain: neural basis of robust motion perception in *Drosophila*, Neuroethology: Behavior, Evolution & Neurobiology (Gordon Research Conference), Italy (2015,6-7)

国内学会発表

6. 中本竣, 鈴木力憲, 森本高子, 宮川博義, 青西亨, ショウジョウバエにおける視野闘争の理論研究 視覚系の安定構造解析, 電子情報通信学会ニューロコンピューティング研究会, 沖縄科学技術大学院大学 (2015,6)
7. (2) 鈴木力憲, 池田英彬, 関洋一, 宮川博義, 青西亨, 森本高子, ショウジョウバエにおけるノイズ頑強な動き検知の神経基盤, 第25回日本神経回路学会, 電気通信大学 (2015,9)
8. (3) 中本竣, 鈴木力憲, 森本高子, 宮川博義, 青西亨, ショウジョウバエにおける視野闘争の理論研究, 第25回日本神経回路学会, 電気通信大学 (2015,9)
9. Okuri, K., Sugimoto, K., Innami, K., Aonishi, T., Miyakawa, H., Morimoto, T. Development of Arduino-based device measuring optomotor response to elucidate neural mechanisms underlying complex visual perception in *Drosophila*. 第 39 回日本神経化学大会, 2016/7, 横浜
10. Sugimoto, K., Suzuki, Y., Aonishi, T., Morimoto T. A study on Dopaminergic modulation in optomotor response of *Drosophila*. 第 39 回日本神経化学大会, 2016/7, 横浜
11. *森本高子, 松本悠太郎, 鈴木未来, 清水彰, 宮川博義 ショウジョウバエを用いた精神疾患モデル開発とその応用 第 59 回神経化学会, 2016/9, 福岡
12. 森本高子, ショウジョウバエ CenG1A の機能解析: 精神疾患モデルは可能か第9回分子高次脳機能研究会, 2016/8, 名古屋

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

13. Okuri, K., Sugimoto K., Yamazaki S., Yamauchi J., Morimoto T. Dose Drosophila Perceive Visual Illusions? -I. Subjective Contours -第 40 回 日本神経科学学会、2017/7, 幕張
14. Sugimoto K., Kuraishi A., Okuri K., Aonishi T., Yamauchi J., Morimoto T. Does *Drosophila* Perceive Visual Illusions? - II. Waterfall Illusion -第 40 回 日本神経科学学会、2017/7, 幕張
15. Shibuya T., Seki Y., Yamauchi J., Morimoto T. Elucidating the neural basis of behavior and emotion elicited by natural aromatic substances using *Drosophila* larvae.第 40 回 日本神経科学学会、2017/7, 幕張
16. *Morimoto T., Matsumoto Y., Takei K., Shimizu K., Yamauchi J. Prepulse inhibition in *Drosophila* reveals possible candidate genes that have functions in sensory gating and relate to the psychiatric disorder.第 60 回 日本神経化学会 2017/9, 仙台

A-3 免疫アジュバント開発

雑誌論文

1. * Y. Hamuro, K. Tajima, A. Matsumoto-Akanuma, S. Sakamoto, R. Furukawa, A. Yamagishi, N. Ohno, S. Akanuma, Characterization of a thermostable mutant of *Agaricus brasiliensis* laccase created by phylogeny-based design, *J Biosci Bioeng*, 26 (2017).
2. *K. Tajima, S. Akanuma, A. Matsumoto-Akanuma, D. Yamanaka, K.-i. Ishibashi, Y. Adachi, N. Ohno, Activation of macrophages by a laccase-polymerized polyphenol is dependent on phosphorylation of Rac1, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495 2209-2213 (2018).

国際学会発表

3. *Katsuya Tajima, Satoshi Akanuma, Akiko Matsumoto-Akanuma, Daisuke Yamanaka, Ken-ichi Ishibashi, Yoshiyuki Adachi, Naohito Ohno., Characteristics of a modified laccase on polyphenol polymerization and immunomodulating effect of the polymerized polyphenols, *The 16th International Symposium on Advanced Technology*, 2017/11/1 Tokyo

国内学会発表

4. *田島克哉, 山中大輔, 赤沼哲史, 松本明子, 元井益郎, 元井章智, 石橋健一, 安達禎之, 大野尚仁. Laccase 触媒重合 Polyphenol の解析. 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月, 横浜
5. *田島克哉, 赤沼哲史, 松本明子, 山中大輔, 石橋健一, 安達禎之, 大野尚仁. 真菌 Laccase によって合成した Polyphenol 重合体:免疫修飾作用の検討. 日本医真菌学会総会学術総会第 60 回, 2016 年 10 月, 台東区
6. *赤沼哲史, 松本明子, 田島克哉, 大野尚仁. 真菌 Laccase によって合成した Polyphenol 重合体:安定化改変した真菌ラッカーゼの異種発現. 日本医真菌学会総会学術総会第 60 回, 2016 年 10 月, 台東区
7. *松本明子, 赤沼哲史, 元井益郎, 大野尚仁. 真菌 Laccase によって合成した Polyphenol 重合体: *Agaricus brasiliensis* 由来 laccase 遺伝子群のクローニング. 日本医真菌学会総会学術総会第 60 回, 2016 年 10 月, 台東区
8. *田島克哉, 赤沼哲史, 松本明子, 山中大輔, 石橋健一, 安達禎之, 大野尚仁, Laccase polymerized polyphenols の特徴と生体防御系への影響. 第 28 回日本生体防御学会学術総会, 2017/6/29 相模原市
9. 松本明子, *Agaricus brasiliensis* 新規 laccase 類のクローニング, 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会, 2017/12/6 神戸市

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

A-4 でんぷん改質酵素安定化

雑誌論文

1. Okada K, Horii E, Nagashima Y, Mitsui M, Matsuura H, Fujiwara S and Tsuzuki M (2015) Genes for a series of proteins that are involved in glucose catabolism are upregulated by the Hik8-cascade in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Planta*, 241: 1453–1462.
2. Hayashi M, Kodama M, Nakamura Y and Fujita N (2015) Thermal and pasting properties, morphology of starch granules, and crystallinity of endosperm starch in the rice SSI and SSIIIa double-mutant. *J Appl Glycosci*, 62: 81–86.
3. Crofts N, Abe N, Oitome NF, Matsushima R, Hayashi M, Tetlow IJ, Emes MJ, Nakamura Y and Fujita N (2015) Amylopectin biosynthetic enzymes from developing rice seed form enzymatically active protein complexes. *J Exp Bot*, 66: 4469–4482.
4. Suzuki R, Koide K, Hayashi M, Suzuki T, Sawada T, Ohdan T, Takahashi H, Nakamura Y, Fujita N and Suzuki E (2015) Functional characterization of three (GH13) branching enzymes involved in cyanobacterial starch biosynthesis from *Cyanobacterium* sp. NBRC 102756. *Biochim Biophys Acta*, 1854: 476–484.
5. Higuchi K, Kanai M, Tsuchiya M, Ishii H, Shibuya N, Fujita N, Nakamura Y, Suzui N, Fujimaki S and Miwa E (2015) Common reed accumulates starch in its stem by metabolic adaptation under Cd stress conditions. *Front Plant Sci*, 6: 138.
6. Hieu HC, Li H, Miyauchi Y, Mizutani G, Fujita N and Nakamura Y (2015) Wetting effect on optical sum frequency generation (SFG) spectra of D-glucose, D-fructose, and sucrose. *Spectrochimica Acta*, 138: 834–839.
7. Sakurai T, Aoki M, Ju X, Ueda T, Nakamura Y, Fujiwara S, Umemura T, Tsuzuki M and Minoda A (2016) Profiling of lipid and glycogen accumulations under different growth conditions in the sulfotolerant red alga *Galdieria sulphuraria*. *Bioresour Technol*, 200: 861–866.
8. Yamamoto N, Kudo T, Fujiwara S, Takatsuka Y, Hirokawa Y, Tsuzuki M, Takano T, Kobayashi M, Suda K, Asamizu E, Yokoyama K, Shibata D, Tabata S and Yano K (2016) Pleurochrysome: a web database of *Pleurochrysis* transcripts and orthologs among heterogeneous algae. *Plant Cell Physiol*, 57: e6.
9. Miyashita S, Murota C, Kondo K, Fujiwara S and Tsuzuki M (2016) Arsenic metabolism in cyanobacteria. *Environ Chem*, 13: 577–589.
10. Kadouche D, Ducatez M, Cenci U, Tirtiaux C, Suzuki E, Nakamura Y, Putaux JL, Terrasson AD, Diaz-Troya S, Florencio FJ, Arias MC, Striebeck A, Palcic M, Ball SG and Colleoni C (2016) Characterization of function of the ClgA2 glycogen/starch synthase in *Cyanobacterium* sp. Clg1 supports an ancient role in the synthesis of long chain glycogen and starch. *Plant Physiol*, 171: 1879–1892.
11. Kobayashi T, Sasaki S, Utsumi Y, Fujita N, Umeda K, Sawada T, Kubo A, Abe J, Colleoni C and Ball S (2016) Comparison of chain-length preferences and glucan specificities of isoamylase-type α -glucan debranching enzymes from rice, cyanobacteria, and bacteria. *PLoS ONE*, 11: e0157020.
12. Toyosawa Y, Kawagoe Y, Matsushima R, Crofts N, Ogawa M, Fukuda M, Kumamaru T, Okazaki Y, Kusano M, Toyooka K, Sato M, Oitome N, Itoh R, Ai Y, Jane JL, Nakamura Y and Fujita N (2016) Deficiency of starch synthase IIIa and IVb alters starch granule morphology from polyhedral to spherical in rice endosperm. *Plant Physiol*, 170: 1255–1270.

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

13. Matsumoto H, Fujiwara S, Miyagi H, Nakamura N, Shiga Y, Ohta T and Tsuzuki M (2017) Carbonic anhydrase inhibitors induce developmental toxicity during zebrafish embryogenesis, especially in the inner ear. *Mar Biotechnol*, 19: 430–440.
 14. Nakamura Y, Ono M, Sawada T, Crofts N, Fujita N and Steup M (2017) Characterization of the functional interactions of plastidial starch phosphorylase and starch branching enzymes from rice endosperm during reserve starch biosynthesis. *Plant Sci*, 264: 83–95.
 15. Crofts N, Sugimoto K, Oitome, NF, Nakamura Y and Fujita N (2017) Differences in specificity and compensatory functions among three starch synthases determine the structure of amylopectin in rice endosperm. *Plant Mol Biol*, 94: 399–417.
 16. Nakagami T, Yoshihara H, Nakamura T, Utsumi Y, Sawada T, Fujita N, Satoh H and Nakamura Y (2017) Biochemical analysis of new-type mutants of japonica rice that accumulate water-soluble α -glucans in the endosperm but retain full starch debranching enzyme activities. *Starch*, 69: 1600159.
 17. Crofts N, Nakamura Y and Fujita N (2017) Critical and speculative review of the roles of multi-protein complexes in starch biosynthesis in cereals. *Plant Science*, 262: 1–8.
 18. Nakamura Y (2018) Rice starch biotechnology: Rice endosperm as a model of cereal endosperms. *Starch*, 70: 1600375.
 19. Sakurada S, Fujiwara S, Suzuki M, Kogure T, Uchida T, Umemura T and Tsuzuki M Involvement of acidic polysaccharide Ph-PS-2 and protein in initiation of coccolith mineralization, as demonstrated by in vitro calcification on the base plate. *Mar Biotechnol*, in press.
 20. Murakami S, Fujita N, Nakamura Y, Inouchi N, Oitome N, Koda T and Nishioka A Effects of shear and heat milling treatment on the molecular structure of rice starch. *Starch*, in press.
 21. Hirota T, Yoshida S, Sawada T, Nakamura Y Starch properties affecting maltose production ability in vegetable black soybean seeds (Edamame) with different maturation periods. *Horticulture Journal*, in press.
- 図書(総説・著書等)
22. Nakamura Y (2015) Biosynthesis of Reserve Starch. In: Nakamura Y. (ed.) *Starch: Metabolism and Structure*. Springer. pp. 161–209.
 23. Nakamura Y (2015) Initiation Process of Starch Biosynthesis. In: Nakamura Y. (ed.) *Starch: Metabolism and Structure*. Springer. pp. 315–332.
 24. 中村保典 (2017) 澱粉合成研究の材料としてのイネ. *生物工程*, 95: 220–224.
- 国際学会発表
25. Murota, C., Matsumoto, H., Sato, N., Fujiwara S., Tsuzuki, M. Relationship between gene expression of phosphate transporter and arsenate resistance in *Chlamydomonas*. *The 17th International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas*, June, 2016, Kyoto
 26. Nakamura Y, Thirty years of rice starch biosynthesis. *Starch Round Table 2017*, October, 2017, San Diego
 27. Asakawa K, Sakurada S, Fujiwara S, Endo H, Suzuki M, Kogure T, Kubo R, Amano K and Tsuzuki M, Analysis of the factors involved in coccolith formation in the coccolithophore *Pleurochrysis haptanemofera*. *BioMinXIV, 14th International Symposium on Biomineralization*, October, 2017, Tsukuba

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

28. Harada K, Miyauchi H, Aota Y, Sato R, Okada K, Fujiwara S and Tsuzuki M, SSCC-type photobioreactor and possible application of wastewater to the algal culture and phosphorus retrieval. *The 16 th International Symposium on Advanced Technology (ISAT16 th)*, 2017, Tokyo

国内学会発表

29. 櫻田舜人, 鈴木道生, 小暮敏博, 板山翔, 都筑幹夫, 藤原祥子, *Pleurochrysis* の円石形成 (in vitro 石灰化), 日本植物学会第 79 回大会, 2015 年 9 月, 新潟
30. 櫻田舜人, 浅川航輝, 遠藤博寿, 鈴木道生, 小暮敏博, 藤原祥子, 都筑幹夫, 円石藻 *Pleurochrysis* の円石形成 —ベースプレートの性質と関連遺伝子の探索—, 第 10 回バイオミネラルリゼーションワークショップ, 2015 年 12 月, 東京
31. 松本寛子, 藤原祥子, 都筑幹夫, ゼブラフィッシュ初期胚の耳石形成における炭酸脱水酵素の関与, 第 10 回バイオミネラルリゼーションワークショップ, 2015 年 12 月, 東京
32. 室田知里, 辻下真紀, 畑山遥, 山下貴矢, 松本寛子, 西弘貴, 佐藤典裕, 藤原祥子, 都筑幹夫, *Synechocystis* sp. PCC 6803 のリン酸輸送体変異株を用いたヒ素耐性機構の解明, 日本藻類学会第 40 回大会, 2016 年 3 月, 東京
33. クロフツ尚子, 杉本恭平, 追留那緒子, 中村保典, 藤田直子, Starch synthase (SS) IIa は SSIIIa の長鎖伸長機能を相補できない. 日本応用糖質科学会平成 28 年度大会, 2016 年 9 月, 福山
34. 藤田直子, 豊澤佳子, 川越靖, 松島良, クロフツ尚子, 小川雅弘, 福田真子, 中村保典, スターチシンターゼ SSIIIa と SSIVb が同時に欠損するとなぜ澱粉粒が球形に変化するのか? 日本応用糖質科学会平成 28 年度大会, 2016 年 9 月, 福山
35. 松本寛子, 藤原祥子, 都筑幹夫, 炭酸脱水酵素阻害剤エトキシゾルアミドによるゼブラフィッシュ胚への影響. 第 22 回日本環境毒性学会研究発表会, 2016 年 9 月, 松山
36. 櫻田舜人, 鈴木道生, 小暮敏博, 藤原祥子, 都筑幹夫, 円石藻 *Pleurochrysis* の円石形成. 第 11 回バイオミネラルリゼーションワークショップ, 2016 年 11 月, 柏
37. 浅川航輝, 藤原祥子, 遠藤博寿, 都筑幹夫, RNAi による円石藻 *Pleurochrysis* の円石形成関連遺伝子の探索. 第 11 回バイオミネラルリゼーションワークショップ, 2016 年 11 月, 柏
38. 内海好規, 内海稚佳子, 田中真帆, 藤田直子, 中村保典, 関原明, キャッサバ (*Manihoto esculenta*) の澱粉枝作り酵素 (Starch Branching Enzyme, SBE) の機能解析. 日本応用糖質科学会平成 28 年度大会, 2016 年 9 月, 福山
39. 中村保典, 穀類澱粉の生合成を俯瞰する. 日本応用糖質科学会平成 29 年度大会, 2017 年 9 月, 日本大学湘南キャンパス
40. 宮内啓喜, 原田康平, 青田侑生, 岡田克彦, 藤原祥子, 都筑幹夫, 固相表面上のクロレラにおける光合成能力と排水中リン回収能力, 日本植物学会第 81 回大会, 2017 年 9 月, 野田
41. 大滝理恵, 林泰平, 平井一帆, 藤原祥子, 都筑幹夫, 佐藤典裕, クロレラにおけるトリアシルグリセロール蓄積気孔, 日本植物学会第 81 回大会, 2017 年 9 月, 野田

B. ビックデータを用いた好熱菌安定酵素の高活性化技術の確立

B-1 理論・実証: 好熱菌酵素の汎用的な低温高活性化改変技術の確立

雑誌論文

1. *赤沼哲史, 耐熱性酵素の創成と好熱菌酵素の低温高活性化、*ファインケミカル* 2 月号 (2017) シーエムシー出版

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

国際会議発表

- *Bessho M, Akanuma S, Kimura H, Yamagishi A, Improving the low-temperature activity of a thermophilic enzyme without loss of its thermostability by mutanome analysis, *Extremophiles2016*, Sep. 2016, Kyoto, Japan

国内学会発表

- *別所瑞萌、赤沼哲史、木村彦乃、山岸明彦、ミュータノーム解析による好熱菌由来 3-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の低温高活性化、第16回蛋白質科学会年会、2016年6月、福岡
- *別所瑞萌、赤沼哲史、木村彦乃、山岸明彦、好熱菌イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素を用いた常温活性と耐熱性のトレードオフ仮説の検証:トレードオフ仮説は必ずしも成立しない、第39回日本分子生物学会年会、2016年11月、横浜
- *別所瑞萌、赤沼哲史、木村彦乃、山岸明彦、相同アミノ酸配列に基づく好熱菌酵素の低温活性化、第67回生物工学会大会、2015/10、鹿児島

B-2 過酸化水素検出素子開発

国際学会発表

- *Koike, H., Tokishita, S., and Ohta, T., Isolation and Analysis of the OxyR-Controlled Genes in Response to Oxidative Stress in *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles 2016 11th international congress extremophiles*, 2016/11, Kyoto, Japan

国内学会発表

- 橋詰信, 時下進一, 太田敏博. 好気性高度好熱菌 *Thermus thermophilus* におけるカタラーゼ遺伝子制御因子の探索. 極限環境生物学会 2015年度(第16回)年会, 2015年11月, 東京
- *小池榛菜, 比留間友宏, 時下進一, 太田敏博. 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 における OxyR 標的遺伝子の探索と機能解析. 極限環境生物学会 2015年度(第16回)年会, 2015年11月, 東京
- Koike, H., Hashizume, M., Tokishita, S., and Ohta, T. Screening and analysis of OxyR regulated genes in *Thermus thermophilus* HB27. 第38回日本分子生物学会年会, 2015年12月, 神戸
- 大塚梨恵子, 土屋彰伸, 時下進一, 太田敏博. セルビオースによる *ccpA* 遺伝子の発現制御. 極限環境生物学会 2016年度(第17回)年会, 2016年11月, 神奈川
- 小林幸平, 小池榛菜, 時下進一, 太田敏博. 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 におけるフェリチン様タンパク質遺伝子の発現制御. 極限環境生物学会 2016年度(第17回)年会, 2016年11月, 神奈川
- 小林幸平, 小池榛菜, 時下進一, 太田敏博. 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 の ferritin-like protein 遺伝子の発現解析. 環境微生物系学会合同大会 2017, 2017年8月, 仙台

C. 金属(金、白金等)と特異的に結合するタンパク質設計技術の開発

C-1 金属(金、白金等)と特異的に結合するタンパク質設計技術の開発(理論)

雑誌論文

- *M. Watabe, H. Yamada, T. Miyakawa, R. Morikawa, M. Takasu, T. Uchida, A. Yamagishi, Structural Analysis of Metal-Binding Peptides Using Molecular Dynamics, accepted for publication in *8th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics Proceedings* (2018).

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

国際学会発表

- *M. Watabe, H. Yamada, T. Miyakawa, R. Morikawa, M. Takasu, T. Uchida, A. Yamagishi, Structural Analysis of Metal-Binding Peptides Using Molecular Dynamics, *8th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 2018/1 明治大学, 口頭発表

国内学会発表

- *渡部真央, 山田寛尚, 宮川毅, 森河良太, 高須昌子, 内田達也, 山岸明彦「水溶液中および金表面上における金属結合ペプチド構造の分子動力学法を用いた研究」日本物理学会第年会, 2017年3月, 大阪
- *渡部真央, 山田寛尚, 宮川毅, 森河良太, 高須昌子, 内田達也, 山岸明彦「水溶液中および金表面上における金属結合ペプチド構造の分子動力学法を用いた研究」日本物理学会第年会, 2017年9月, 岩手
- *渡部真央, 山田寛尚, 宮川毅, 森河良太, 高須昌子, 内田達也, 山岸明彦「水溶液中および金表面上における金属結合型タンパク質の分子動力学法を用いた研究」日本物理学会第年会, 2018年3月, 東京

C-2実証(梅村知、宮川):白金と結合する多種の配列の取得と解析

雑誌論文

- *Yagi S., Akanuma S., Kaji A., Niiro H., Akiyama H., Uchida T., Yamagishi A., Selection of a platinum-binding sequence in a loop of a four-helix bundle protein, *J. Biosci. Bioeng.* 125(2): pp 192-198 (2018)

国際学会発表

- *Kaji, A., Niiro, H., Akanuma, S., Uchida, T., Yamagishi, A., Designing of a novel platinum-binding amino acid sequence on a protein surface, *The 29th Annual Symposium of Protein Society*, 2015/7/22-/25, Barcelona

国内学会・シンポジウム発表

- *梶亜純、新納寛也、赤沼哲史、内田達也、山岸明彦、タンパク質上の白金結合ヘリックス間ループ配列の選択と解析、第67回生物工学会大会、2015/10、鹿児島
- *梶亜純、新納寛也、赤沼哲史、内田達也、山岸明彦、フロー型水晶振動子マイクロバランスを用いた白金結合アミノ酸配列の解析、BMB2015、2015/12、神戸八木創太、梶亜純、赤沼哲史、内田達也、山岸明彦、バイオナノテクノロジー：タンパク質-タンパク質結合とタンパク質-金属結合の創成、第5回医薬工3大学包括連携推進シンポジウム、2016/6、東京
- *八木創太、梶亜純、赤沼哲史、内田達也、山岸明彦、バイオナノテクノロジー：タンパク質-タンパク質結合とタンパク質-金属結合の創成、第5回医薬工3大学包括連携推進シンポジウム、2016/6、東京
- *八木創太、梶亜純、新納寛也、内田達也、赤沼哲史、山岸明彦、白金結合アミノ酸配列の創出と解析、第89回生化学会大会、宮城、2016/9
- *八木創太、梶亜純、新納寛也、内田達也、赤沼哲史、山岸明彦、4ヘリックスバンドルタンパク質上への金属およびタンパク質間結合面の設計、第39回分子生物学会年会、横浜、2016/12

C-3 応用:導電性タンパク質を利用した新規バイオプロセスの開発

国内学会発表

- *山田祥平、高妻篤史、渡邊一哉、「ニトロゲナーゼを高発現する鉄酸化細菌を用いた微

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

生物電気化学的アンモニア生産」、日本農芸化学会(名古屋)、2018年3月

2. *山田祥平、高妻篤史、渡邊一哉、「*Acidithiobacillus ferrooxidans* における窒素固定制御転写因子 NifA の機能解析」、日本農芸化学会(京都)、2017年3月

その他

3. *微生物を利用したアンモニアの製造法(特願 2017-33404)、渡邊一哉、高妻篤史、滝沢宏次、山田祥平

D. タンパク質-タンパク質接合面設計法の開発

D-1 理論:タンパク質-タンパク質接合面設計法の開発

雑誌論文

1. T. Ishioka, H. Yamada, T. Miyakawa, R. Morikawa, S. Akanuma, A. Yamagishi, M. Takasu, Mutual Positional Preference of IPMDH Proteins for Binding Studied by Coarse-grained Molecular Dynamics Simulation, *AIP Conf. Proc.* 1790 (2016) 020023.
2. *T. Ozawa, H. Yamada, T. Miyakawa, R. Morikawa, S. Yagi, S. Akanuma, A. Yamagishi, M. Takasu, Coarse-grained molecular dynamics simulation of sulerythrin and LARFH for production of protein nanofibers, accepted for publication in *8th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics Proceedings* (2018).

国際シンポジウム発表

3. T. Ishioka, H. Yamada, T. Miyakawa, R. Morikawa, S. Akanuma, A. Yamagishi, and M. Takasu, Mutual Positional Preference of IPMDH Proteins for Binding Studied by Coarse-grained Molecular Dynamics Simulation (招待講演), Computational Chemistry Symposium in *12th International Conference of Computational Methods in Sciences and Engineering 2016*, 2016/3, Athens, Greece.
4. *T. Ozawa, H. Yamada, T. Miyakawa, R. Morikawa, S. Yagi, S. Akanuma, A. Yamagishi, M. Takasu, Coarse-grained molecular dynamics simulation of sulerythrin and LARFH for production of protein nanofibers, *8th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 2018/1, 明治大学, 口頭発表

国内学会発表

5. *小澤尚史, 山田寛尚, 宮川毅, 森河良太, 八木創太, 赤沼哲史, 山岸明彦, 高須昌子, 粗視化モデルを用いた線維タンパク質の結合過程の分子動力学シミュレーション, 日本物理学会第72回年次大会, 2017年3月, 大阪大学, ポスター発表
6. *小澤尚史, 山田寛尚, 宮川毅, 森河良太, 八木創太, 赤沼哲史, 山岸明彦, 高須昌子, 粗視化モデルを用いたスレリスリンと LARFH の線維化シミュレーション, 日本物理学会 2017年秋季大会, 2017年9月, 岩手大学, ポスター発表

D-2 実証:タンパク質-タンパク質結合法の開発

雑誌論文

1. Yagi S., Akanuma S., Yamagishi M., Uchida T., Yamagishi A., Creation of artificial protein-protein interactions using α -helices as interfaces. *Biophys. Rev.* (2017) in press. (doi: 10.1007/s12551-017-0352-9)
2. *Yagi S., Akanuma S., Yamagishi M., Uchida T., Yamagishi A., De novo design of protein-protein interactions through modification of inter-molecular helix-helix interface residues, *Biochim. Biophys. Acta* 1864(3): pp 479-487 (2016)

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

3. *Yagi S., Akanuma S., Yamagishi A., Addition of negatively charged residues can reverse the decrease in the solubility of an acidic protein caused by an artificially introduced non-polar surface patch, *Biochim. Biophys. Acta* 1844(3): pp 553-560 (2014)

国際学会発表

4. *Sota Yagi, Satoshi Akanuma, Tatsuya Uchida, Akihiko Yamagishi, Creation of an artificial protein fiber by an easy-to-use designing of a protein-protein interaction, *The 30th Annual Symposium of Protein Society*, 2016/7, Batimore
5. *Sota Yagi, Satoshi Akanuma, Tatsuya Uchida, Akihiko Yamagishi, Construction of a Co-assembled Protein Fiber Composed of the Protein Derived from *Sulfolobus tokodaii* and the Artificial Thermostable Protein, *Extremophiles2016*, 2016/9, Kyoto
6. *Yagi,S., Akanuma, S., Yamagishi,A., De novo design of protein-protein interaction using hydrophobic and electrostatic interactions, *The 29th Annual Symposium of Protein Society*, 2015/7, Barcelona

国内学会・シンポジウム発表

7. *原田啓生、八木創太、山岸明彦、新規人工タンパク質複合体結合面における疎水性残基の組み合わせの検証、生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017)、2017/12、神戸
8. *大場創太、八木創太、吉原大貴、山岸明彦、人工タンパク質タンパク質相互作用に影響を与える結合面アミノ酸残基の最適化、生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017)、2017/12、神戸
9. *内山智尋、八木創太、山岸明彦、RFHと sulerythrin の共重合により形成される人工タンパク質線維の分岐の抑制、生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017)、2017/12、神戸
10. *八木創太、赤沼哲史、山岸明彦、Testing the universality of an artificial protein-protein interface designed on an α -helix, 生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017), 2017/12、神戸
11. *八木創太、赤沼哲史、内田達也、山岸明彦、人工設計タンパク質間結合面の移植による新規タンパク質間相互作用の創出、第55回日本生物物理学会年会、2017/9、熊本
12. *八木創太、大場創太、吉原大貴、内山智尋、原田啓生、赤沼哲史、内田達也、梅村知也、山岸明彦、スマートナノバイオテクノロジー、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業平成28年度 年度末研究報告会、2017/3、東京
13. *八木創太、梶亜純、新納寛也、内田達也、赤沼哲史、山岸明彦、4ヘリックスバンドルタンパク質上への金属およびタンパク質間結合面の設計、第39回分子生物学会年会、横浜、2016/12
14. *Yagi S., Creation of an artificial protein fiber by an easy-to-use design method of protein-protein interaction, *International Mini-symposium Smart Protein Engineering*, 2016/11, Tokyo
15. *八木創太、赤沼哲史、山岸明彦、新規タンパク質分子間結合面の創成と人工タンパク質繊維の作成、第54回日本生物物理学会年会、2016年11月、つくば
16. *八木創太、梶亜純、赤沼哲史、内田達也、山岸明彦、バイオナノテクノロジー：タンパク質-タンパク質結合とタンパク質-金属結合の創成、第5回医薬工3大学包括連携推進シンポジウム、2016/6、東京

法人番号	131066
プロジェクト番号	S1512002

17. *八木創太、赤沼哲史、山岸明彦、簡便なタンパク質間相互作用設計法を利用した非アミロイド型タンパク質線維の構築、第16回日本蛋白質科学会年会、福岡、2016/6
18. *八木創太、山岸愛美、赤沼哲史、内田達也、山岸明彦、疎水性相互作用とイオンペアのみを考慮した新規タンパク質間相互作用の設計、第 67 回生物工学会大会、2015/10、鹿児島
19. *八木創太、山岸愛美、赤沼哲史、内田達也、山岸明彦、新規タンパク質間相互作用の設計とその繊維状構造体構築への応用、BMB2015、2015/12、神戸
20. *八木創太、新規運動性タンパク質線維の創出、第10回「わかしゃち奨励賞」優秀提案発表会、2016/1、名古屋

<研究成果の公開状況> (上記以外)

シンポジウム・学会等の実施状況、インターネットでの公開状況等

<既に実施しているもの>

国際シンポジウム

1) Crossover Session on Geo Science and Life Science

---Toward the Protein Engineering using Big Data--- July 30, 2015

2) International Mini-symposium--Smart Protein Engineering--Nov. 29, 2016

学内報告会

1) 平成 27 年度年度末成果発表会 2016 年3月 24 日(木)

2) 平成 28 年度年度末報告会 2017 年3月 14 日(火)

3) 最終報告会 2018 年 3 月 19 日(月)

インターネットでの公開

<https://www.ls.toyaku.ac.jp/content/%E5%A0%B1%E5%91%8A%E4%BC%9A>

<これから実施する予定のもの> : 本最終報告書公開予定

14 その他の研究成果等

15 「選定時」及び「中間評価時」に付された留意事項及び対応

<「選定時」に付された留意事項>

特に無し。

<「選定時」に付された留意事項への対応>

該当せず。

<「中間評価時」に付された留意事項>

期間が 3 年間であり該当せず。

<「中間評価時」に付された留意事項への対応>

該当せず。