

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19350080

研究課題名（和文）チオシアネート加水分解酵素コバルト反応中心の機能と形成の分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanism for biogenesis and function of the cobalt reaction center of thiocyanate hydrolase

研究代表者

尾高 雅文 (ODAKA MASAFUMI)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・准教授

研究者番号：20224248

研究成果の概要：

チオシアネート加水分解酵素(SCNase)は、構造遺伝子下流に存在するアクセサリタンパク質 P15K による触媒サブユニットへの金属イオンとシステイン酸化修飾の導入と他のサブユニットの会合が順に起こることで成熟することを明らかにした。また、SCNase と類似の立体構造を持つニトリルヒドラーゼ(NHase)の基質特異性は基質ポケットの構造に依存していて、触媒機構は保存されていること、NHase の触媒反応ではシステイン酸化修飾が重要な機能を有することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2008 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合科学・生体関連化学

キーワード：加水分解酵素・チオシアネート加水分解酵素・ニトリルヒドラーゼ・翻訳後修飾・アクセサリ蛋白質・金属酵素・結晶構造解析・無細胞タンパク質合成

## 1. 研究開始当初の背景

チオシアネート(SCN<sup>-</sup>)は工業廃水に多く含まれる汚染物質であり、その分解系の研究は環境保全のための重要な課題の一つである。チオシアネート加水分解酵素(SCNase)はチオシアネート(SCN<sup>-</sup>)を水和・加水分解してカルボニルスルフィド(SCO)とアンモニアにする酵素であり、チオシアネートを硫酸イオン(SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)にまで分解する微生物分解系の第一

段階を触媒する。我々は、SCNase がニトリルヒドラーゼ(NHase) と同一のタンパク質ファミリーを形成することを報告した。NHase は非コリン型コバルトまたは非ヘム鉄を反応中心とする金属酵素で、ニトリルの水和反応を触媒する。アクリルアミドやニコチンアミドの生産に利用される工業的に極めて重要な酵素であるが、触媒機構は明らかにされていない。NHase においては、金属は触媒サブユ

ニットである $\alpha$ サブユニット上の金属結合モチーフC1-X-L-C2-S-C3(X = SまたはT)に結合し、SerとCys3の2個の主鎖アミド窒素と3個のCysのイオウ原子が配位し、Cys2とCys3がシステインスルフィン酸(Cys-SO<sub>2</sub>H)、システインスルフェン酸(Cys-SOH)に翻訳後修飾された特異な反応中心を形成している。

最近、我々はNHaseファミリーに属する新規酵素であるSCNaseの構造と機能に関する研究を開始し、コバルトを含まない不活性なアポSCNaseと活性のあるホロSCNaseの組換え体発現系を作製し、天然型とアポ酵素の立体構造を決定した。その結果、SCNaseは立体構造レベルでもNHaseと類似しており、Cysの酸化修飾を含めたコバルト反応中心の構造も良く保存されていることを明らかにした。一方、我々は、SCNase 遺伝子下流にコードされるタンパク質 P15K はSCNase の組換え体発現に必須な活性化タンパク質であることを明らかにした。P15K を共発現させないとアポSCNase が発現することから、P15K はタンパク質への金属の挿入を制御し、システイン配位子の翻訳後修飾にも関与することが示唆された。同様な活性化タンパク質はすべてのコバルト型 NHase の遺伝子下流にもコードされていることから、SCNase とコバルト型 NHase の特異なコバルト反応中心は、特異的に作用する活性化タンパク質による共通のメカニズムによって形成されることが考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々が発見したSCNaseとNHaseに見られる特異なシステイン配位子の酸化修飾の生成機構を明らかにするとともに、それらの修飾の生理機能を明らかにすることを研究目的とする。このため、(1)P15K によるSCNaseの反応中心形成およびサブユニット集合のメカニズムの解明、(2)部位特異的変異体誘発によるSCNase基質特異性の研究、(3)鉄型NHaseの時間分割結晶構造解析による触媒反応機構の解析を行う。

## 3. 研究の方法

(1)P15K によるSCNaseの反応中心形成およびサブユニット集合のメカニズムの解明

SCNaseではコバルトイオンはタンパク質内部に存在している。そのため、コバルトイオンの挿入にP15Kが関与する場合、その関与はサブユニットの会合以前に起こる可能性が高い。そこで、P15KとSCNase各サブユ

ニットとの相互作用を解析する。得られた結果をもとに、P15KとSCNaseサブユニット複合体の生化学的特性を明らかにする。またこの複合体をもとにホロ型SCNaseを再構成し、サブユニットの会合過程を明らかにする。

(2)部位特異的変異体誘発によるSCNase基質特異性の研究

SCNaseの基質ポケットにはArg等の塩基性残基が集中し、高い正電荷を帯びているのに対し、NHaseのそれではArgが芳香属性アミノ酸に置換されており、電気的に中性になっている。これは前者の基質が陰イオンであるのに対し、後者の基質は疎水性の高いアルキル基または芳香環を有することに対応していると考えられる。そこで、SCNaseの $\beta$ Arg90と $\gamma$ Arg136をNHaseの相当するTrpとPheに置換した変異体を構築し、触媒活性に対する影響を解析する。

(3)鉄型NHaseの時間分割結晶構造解析による触媒反応機構の解析

触媒反応機構を明らかにするためには反応中間体の構造を知ることが不可欠である。鉄型NHaseは反応中心である鉄イオンへの一酸化窒素(NO)の結合と光解離で触媒活性を制御できる。このことから、不活性なNO結合型NHase結晶を基質存在下で光活性化することにより、触媒反応の時間分割結晶構造解析を行う。

## 4. 研究成果

(1)P15KによるSCNaseの反応中心形成およびサブユニット集合のメカニズムの解明

SCNase  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ サブユニットとP15Kとをそれぞれ大腸菌組換え体で共発現させ、Ni Chelating クロマトグラフィーにより複合体形成を解析したところ、 $\gamma$ サブユニットとP15Kのみが化学量論比が1対1の複合体を形成した。また、培地にCoCl<sub>2</sub>を添加した条件で $\gamma$ サブユニットとP15Kとを共発現させたところ、 $\gamma$ P15K複合体[ $\gamma$ P15K(+Co)]のほかに遊離の $\gamma$ サブユニット[ $\gamma$ (+Co)]が獲得された。 $\gamma$ P15K(+Co)と $\gamma$ (+Co)はいずれもCoイオンが結合しており、いずれも触媒中心におけるシステイン残基の翻訳後修飾を有していた。触媒中心の状態が天然型SCNaseと酷似していることから、 $\gamma$ P15K(+Co)と $\gamma$ (+Co)はSCNaseが成熟化される過程における中間体であり、また $\gamma$ (+Co)は $\gamma$ P15K(+Co)からP15Kが解離したものであると予想された。

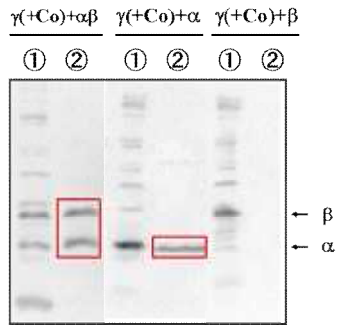


図1. 無細胞タンパク質合成による  $\gamma(\text{Co})$  と複合体を形成するサブユニットの確認。抗  $\alpha$ 、 $\beta$  抗体を用いたウェスタンブロッティング 合成反応液; Ni Chelating クロマトグラフィー精製後

そこで、 $\gamma(+\text{Co})$  存在下において SCNase  $\alpha$ 、 $\beta$  サブユニットを無細胞タンパク質合成で発現させ、SCNase を再構成することを試みた。タンパク質の合成後、Ni Chelating クロマトグラフィーにより  $\gamma(+\text{Co})$  と複合体を形成したタンパク質を解析したところ、 $\alpha\beta\gamma$  複合体と  $\alpha\gamma$  複合体が確認された(図1)。また、 $\alpha\gamma$  複合体は触媒活性を持たなかったが、 $\alpha\beta\gamma$  複合体は活性を有していた。このことから  $\alpha$ 、 $\beta$  の順で  $\gamma(+\text{Co})$  への結合が起こることにより、Holo型 SCNase の再構成が行われたことが示された。以上の結果から、SCNase の成熟化過程において、P15K は  $\gamma$  サブユニットと複合体を形成することで、触媒中心への Co イオンの結合およびシステイン残基の翻訳後修飾を促進する機能を持つことが示唆された。その後  $\gamma$  サブユニットから P15K が解離し  $\alpha$ 、 $\beta$  サブユニットの結合が順に起こることで成熟化された SCNase が発現すると考えられる(図2)。

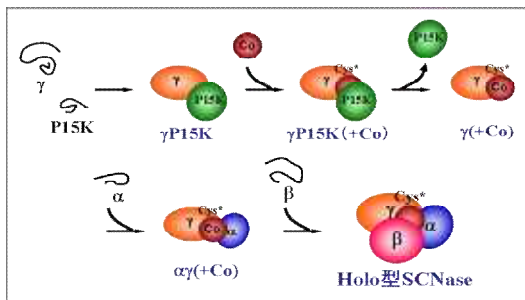


図2 予想される SCNase の成熟化機構

## (2) 部位特異的変異体誘発による SCNase 基質特異性の研究

3 種の SCNase 変異体 ( $\beta\text{R90W}$ 、 $\gamma\text{R136F}$ 、 $\beta\text{R90W}$ 、 $\gamma\text{R136F}$ ) を作成し、各変異体の大腸菌による発現系構築後、発現・精製を行った。全ての変異体は野生型酵素と同じ、 $(\alpha\beta\gamma)_4$  のヘテロ 12 量体を形成した。生産物の一つであるアンモニアを定量することで SCNase 活性を測定したところ、いずれの変異体も全く触媒活性を示さなかった。そこで、種々のニ

トリルを基質としてインキュベートした後、逆相 HPLC を用いて生成物を定量することで NHase 活性を測定した。その結果、いずれの酵素も、弱いながらもアミド化合物生成活性を示すことがわかった。以上の結果から、両酵素の基質選択性は基質ポケットの環境の違いにあり、触媒反応機構自体は同様に進行すると考えられた。

## (3) 鉄型 NHase の時間分割結晶構造解析による触媒反応機構の解析

### 新規基質の発見

結晶構造解析で 1 データセットを取るのに要する時間は約 15 分である。従って、 $k_{\text{cat}}$  が約  $1000 \text{ t}^{-1}$  であるニトリル基質の触媒反応を結晶構造解析で追跡することは不可能である。我々は鉄型 NHase がイソブチロイソニトリル ( $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{NC}$ ; iBuNC) 基質とする極めて遅い触媒活性を持つことを見いだした。iBuNC の反応生成物を質量分析法と ATR-FTIR によって解析したところ、イソブチルアミン ( $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{NH}_2$ ; iBuNH<sub>2</sub>) と一酸化炭素 (CO) であることがわかった。すなわち、NHase は (A) に示すように、イソニトリルをアミンに加水分解する新規な酵素活性をもつことが判った。



イソニトリルは極めて高い競争阻害活性を示すことから、ニトリルと同様の触媒反応過程を経る可能性が高い。そこで、イソニトリルを基質として、不活性型の NO 結合型 NHase に添加することで、触媒反応の時間分割結晶構造解析を行える可能性が示唆された。

### イソニトリル加水分解反応の時間分割結晶構造解析

基質としては、安定な *tert*-ブチルイソニトリル (tBuNC) を用いた。NO 結合型 NHase 結晶に暗所で tBuNC を蒸気拡散によって浸漬させ、冷光照明を照射した後、0 (光照射前)、18、120、340、440 分後に冷却して酵素反応を停止させ、NO 結合型の構造結晶構造 (PDB\_ID: 2AHJ) をもとに分子置換法により結晶構造を決定した。全体構造及び Cys-SO<sub>2</sub>H と Cys-SOH の翻訳後修飾を含めた配位構造は得られたすべての構造で保存されていた(図3)。NO 結合型酵素では tBuNC 由来の電子密度が基質ポケットに存在し、-NC 基はポケット中の鉄イオンから離れた位置に存在していた(図3A)。光照射 120 分後、NO の電子密度は消失し、tBuNC が鉄イオンに配位した構造が見出された(図3B)。tBuNC は鉄に直接配位して反応すると考えられた。光照射 440 分の基質・酵素複合体では、鉄の第 6 配位座に

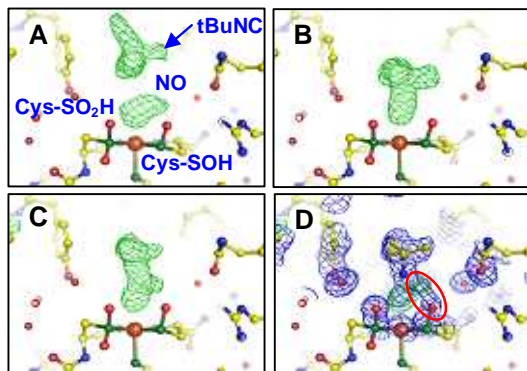


図. 3 鉄型 NHase による tBuNC 加水分解反応の時間分割 X 線結晶構造解析。A: 照射前、B: 120 分照射後、C: 440 分照射後、D: tBuNH<sub>2</sub> を加えて計算したときの 440 分照射後の構造。青のメッシュは 2Fo-Fc、緑のメッシュは Fo-Fc の電子密度を示す。

あった tBuNC のイソシアニド基の電子密度に変化が生じ、Cys-SOH の O $\delta$  原子の極近傍に溶媒の水分子由来である新たな電子密度が観測された(図 3C)。すなわち、この時間に触媒反応が進行していることが予測された。そこで、tBuNH<sub>2</sub> の存在を仮定して 440 分の電子密度図を再計算させたところ、得られた構造は電子密度図によく一致した(Fig. 3D)。以上の結果から、tBuNC は金属に直接配位した後、Cys-SOH 配位子の O $\delta$  原子によって活性化された水分子の求核攻撃を受け、tBuNH<sub>2</sub> と CO を生じる。両基質の構造の類似点を考慮すると、ニトリルの水和反応も同様に進行すると予想される。すなわち、ニトリル基が金属イオンに配位して活性化された後、Cys-SOH 配位子の O $\delta$  原子によって活性化された水分子の求核攻撃を受けると予想された。

(2)得られた成果の国内外における位置づけとインパクト。今後の展望。

本研究では、特異なシステイン酸化修飾をもつ SCNase と NHase の成熟機構と触媒反応機構について解析した。

成熟機構については、SCNase 構造遺伝子下流にコードされているアクセサリタンパク質 P15K が触媒サブユニットである と複合体を形成して金属の挿入と翻訳後修飾を行い、その後、解離した後、他のサブユニットの会合が起こることを見いだした。近年、多くの金属タンパク質において金属の挿入などに関わる金属シャペロンの研究が進められている。多くの金属シャペロンは金属を結合して受け渡す機能をもつものに対し、P15K は金属結合部位をもたず、単独では特定の立体構造ももたない全く新規な金属シャペロンである。最近、コバルト型 NHase において、P15K のホモログによる成熟機構の興味深いモデルが報告され、注目されている。本研究の成果と合わせ、今後、新しい金属シャペロ

ンの機能に関する研究が飛躍的に展開されることが期待される。

NHase と SCNase の触媒反応機構に関しては、部位特異的突然変異体または特異的阻害剤を用いたタンパク質化学的な研究の他、金属反応中心の構造を模したモデル錯体や理論計算など様々な手法によって研究が行われ、Cys-SOH 酸化修飾が触媒機能に重要な役割を果たすことが示唆されている。本研究の成果は、Cys-SOH 配位子の O $\delta$  が溶媒の水分子を活性化して基質に求核攻撃を起こすことを構造的に明らかにした初めての報告例である。これにより、NHase 及び SCNase の触媒反応機構の研究がいっそう促進されることが期待される。

SCNase も NHase も我が国の研究者によって発見・命名され、我が国で立体構造が明らかにされた酵素である。また、いずれも酵素も環境に優しい工業を進める上で重要な意味を持っている。本研究の成果は基礎科学的なものであるが、今後、同酵素の機能の向上、利用を促進する上で重要な意味を持つことが期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 5 件)

(査読無し)尾高雅文, 養王田正文, 橋本浩一:「アクリルアミド生産に使われる酵素反応の謎 —ニトリルヒドラーターゼの反応機構の解明—」現代化学, No. 458, 51-58 (2009).

(査読有) Hashimoto, K., Suzuki, H., Taniguchi, K., Noguchi, T., Yohda, M., and Odaka, M.: Catalytic mechanism of nitrile hydratase proposed by time-resolved X-ray crystallography using a novel substrate, *tert*-butylisonitrile, *J. Biol. Chem.*, **283**, No. 52, 36617-36623 (2008).

(査読有) Taniguchi, K., Murata, K., Murakami, Y., Takahashi, S., Nakamura, T., Hashimoto, K., Koshino, K., Dohmae, N., Yohda, M., Hirose, T., Maeda, M., and Odaka, M.: Novel catalytic activity of nitrile hydratase from *Rhodococcus* sp. N771, *J. Bioeng. Biosci.*, **106**, 174-179 (2008).

(査読有) Ohtaki A, Kida H, Miyata Y, Ide N, Yonezawa A, Arakawa T, Iizuka R, Noguchi K, Kita A, Odaka M, Miki K, Yohda M: Structure and molecular dynamics simulation of archaeal prefoldin: the molecular mechanism for binding and recognition of nonnative substrate proteins., *J. Mol. Biol.* **376**, 1130-1141 (2008).

(査読有) Ohtaki A, Nakano Y, Iizuka R,



Arakawa T, Yamada K, Odaka M, Yohda M.: Structure of aspartate racemase complexed with a dual substrate analogue, citric acid, and implications for the reaction mechanism., *Proteins*, **70**, 1167-1174 (2008).

[学会発表](計 28 件)

山中保明、橋本浩一、養王田正文、尾高雅文: 変異体結晶構造解析による鉄型 Nitrile Hydratase 触媒反応機構の研究、BMB2008(第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同年会) 神戸、12 月 13 日(2008)。

波間聡志、堀 祥太、荒川孝俊、養王田正文、尾高雅文: 基質ポケット近傍アミノ酸残基のチオシアネート加水分解酵素基質特異性に対する影響、BMB2008(第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同年会) 神戸、12 月 11 日(2008)。

清水敏史、Cameron Rory A., 中山 洋、笹木章雅、倉本 幸、Cowan Don A., 堂前 直、尾高雅文、養王田正文: コバルト型 nitrile hydratase 成熟化における活性化タンパク質 P14K の機能解析、BMB2008(第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同年会) 神戸、12 月 10 日(2008)。

Masafumi Odaka, Shota Hori, Takatoshi Arakawa, Hiroshi Nakayaka, Naoshi Dohmae, Hiroyuki Mino, Yoko Katayama, and Masafumi Yohda: Maturation mechanism of a new nitrile hydratase family protein, thiocyanate hydrolase, The 4th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, ASBIC IV, Jeju, Korea, Nov. (2008)。

尾高雅文・堀祥太・荒川孝俊・中山洋・堂前直・三野広幸・片山葉子・養王田正文: 活性化蛋白質 15K によるチオシアネート加水分解酵素の成熟機構、第 58 回錯体化学討論会、第 58 回錯体化学討論会、金沢、9 月(2008)。

浪間聡志、堀祥太、荒川孝俊、養王田正文、尾高雅文: チオシアネート加水分解酵素基質特異性に対する基質ポケット近傍アミノ酸残基の影響、第 3 回バイオ化学関連合同シンポジウム、横浜、9 月(2008)。

山中保明、橋本浩一、養王田正文、尾高雅文: 変異体結晶構造解析による鉄型 Nitrile Hydratase 触媒反応機構の研究、第 3 回バイオ化学関連合同シンポジウム、横浜、9 月(2008)。

清水敏史、Cameron Rory A., 中山 洋、笹木章雅、倉本 幸、Cowan Don A., 堂

前 直、養王田正文、尾高雅文: コバルト型 nitrile hydratase 成熟過程における活性化タンパク質 P14K の機能解析、第 3 回バイオ化学関連合同シンポジウム、横浜、9 月(2008)。

Masafumi Odaka, Shota Hori, Takatoshi Arakawa, Hiroshi Nakayaka, Naoshi Dohmae, Hiroyuki Mino, Yoko Katayama, Masafumi Yohda: Maturation mechanism of a new nitrile hydratase family protein, thiocyanate hydrolase, The 9th European Biological Chemistry Conference, EUROBIC 9, Wroctaw, Poland, Sept. (2008)。

Koichi Hashimoto, Hiroyuki Suzuki, Kayoko Taniguchi, Takumi Noguchi, Masafumi Yohda, Masafumi Odaka: Structural evidence for the catalytic mechanism of nitrile hydratase proposed by time-resolved X-ray crystallography using a novel substrate, tert-butylisonitrile, The 9th European Biological Chemistry Conference, EUROBIC 9, Wroctaw, Poland, Sept. (2008)。

Koichi Hashimoto, Hiroyuki Suzuki, Kayoko Taniguchi, Takumi Noguchi, Masafumi Yohda, Masafumi Odaka: Delay-Time Resolved X-ray Crystallographic Analysis of Reaction Mechanism of Nitrile Hydratase, XXI Congress and General Assembly of The International Union of Crystallography (IUCr), Osaka, August (2008)。

橋本浩一、鈴木博行、谷口佳代子、野口巧、養王田正文、尾高雅文: 全反射吸収赤外分光法と時間分割 X 線結晶構造解析: ニトリルヒドラーゼの水和反応機構解析、第 35 回生体分子科学討論会、兵庫、6 月(2008)。

尾高雅文、堀祥太、荒川孝俊、片山葉子、中山洋、堂前直、三野広幸、養王田正文: チオシアネート加水分解酵素の成熟機構、第 35 回生体分子科学討論会、兵庫、6 月(2008)。

尾高雅文、堀 祥太、荒川孝俊、中山 洋、堂前 直、三野広幸、片山葉子、養王田正文: チオシアネート加水分解酵素の成熟機構、第 8 回日本蛋白質科学会年会、東京、5 月(2008)。

浪間聡志、養王田正文、尾高雅文: 基質ポケット近傍アミノ酸残基のチオシアネート加水分解酵素基質特異性に対する影響、第 8 回日本蛋白質科学会年会、東京、5 月(2008)。

山中保明、橋本浩一、養王田正文、尾高

- 雅文, 変異体結晶構造解析による Fe-type Nitrile Hydratase 触媒反応機構の研究, 第8回日本蛋白質科学会年会, 東京, 5月(2008)
- Keiichi Noguchi, Akashi Ohtaki, Yusuke Miyata, Hiroshi Kida, Akihiro Yonezawa, Masafumi Odaka, Kunio Miki, Masafumi Yohda: Molecular Mechanism for Substrate Recognition of Pyrococcus Prefoldin Revealed by X-Ray Crystal Structure Analysis and Molecular Dynamics Simulation, The 5th Open Workshop "Chemistry of Biological Processes Created by Water and Biomolecules", Nara, Jan. (2008).
- 鈴木博行、橋本浩一、養王田正文、尾高雅文、野口 巧: ニトリルヒドラーゼによる新規基質 tert-butyl isocyanide の加水分解反応: ATR-FTIR 法による生成物の同定, 生物物理学会第45回年会, 横浜, 12月(2007)
- 橋本浩一、鈴木博行、養王田 正文、野口 巧、尾高 雅文: ニトリルヒドラーゼ触媒反応の時間分割結晶構造解析, BMB2007 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会, 横浜, 12月(2007)
- 堀 祥太、荒川 孝俊、中山 洋、片山 葉子、堂前 直、養王田 正文、尾高 雅文: チオシアネート加水分解酵素の成熟化における活性化タンパク質 P15K の機能解析, BMB2007 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会, 横浜, 12月(2007)
- 21 尾高雅文、荒川孝俊、片岡慎吾、堀祥太、河野能顕、中山洋、片山葉子、堂前直、養王田正文、神谷信夫: チオシアネート加水分解酵素の立体構造とコバルト反応中心の構造, 第22回生体機能関連化学シンポジウム, 仙台, 9月(2007)
- 22 橋本浩一、鈴木博行、養王田正文、野口巧、尾高雅文: ニトリルヒドラーゼの触媒反応機構, 第54回錯体化学討論会, 名古屋, 9月(2007)
- 23 尾高雅文、荒川孝俊、片岡慎吾、堀 祥太、養王田正文、片山葉子、河野能顕、中山 洋、堂前 直、神谷信夫: チオシアネート加水分解酵素の立体構造とコバルト反応中心の構造, 第54回錯体化学討論会, 名古屋, 9月(2007)
- 24 Masafumi Odaka, Takatoshi Arakawa, Shota Hori, Hiroyuki Mino, Yoko Katayama, Hiroshi Nakayama, Naoshi Dohmae, Masafumi Yohda: Maturation of thiocyanate hydrolase is promoted by its activator protein, P15K, 13th International conference on Biological Inorganic Chemistry, Wein, July (2007).
- 25 Koichi Hashimoto, Masafumi Yohda, Masafumi Odaka: Delay time-resolved X-ray crystallographic study of Fe-type nitrile hydratase, 13th International conference on Biological Inorganic Chemistry, Wein, July (2007).
- 26 橋本浩一、養王田正文、尾高雅文: ニトリルヒドラーゼの時間分割 X 線結晶構造解析, 第34回生体分子科学討論会, 仙台, 6月(2007).
- 27 荒川孝俊、河野能顕、片岡慎吾、片山葉子、神谷信夫、養王田正文、尾高雅文: ニトリルヒドラーゼファミリーのニューフェイス: チオシアネート加水分解酵素, 第34回生体分子科学討論会, 仙台, 6月(2007).
- 28 尾高雅文、荒川孝俊、堀 祥太、三野広幸、片山葉子、中山洋、堂前 直、養王田正文: チオシアネート加水分解酵素の成熟機構における活性化タンパク質 P15K の機能, 第7回日本蛋白質科学会年会, 仙台, 5月(2007).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

尾高 雅文 (ODAKA MASAFUMI)  
東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・准教授  
研究者番号: 20224248

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

養王田 正文 (YOHDA MASAFUMI)  
東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・教授  
研究者番号: 50250105

山田 和弘 (YAMADA KAZUHIRO)  
東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・特任准教授  
研究者番号: 90431973