

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2011～2015

課題番号：23228002

研究課題名(和文)炭素-窒素結合切断および合成酵素群の統括的機能解明と応用開発

研究課題名(英文)Comprehensive elucidation and application of the function of enzymes involved in cleavage and synthesis of a carbon-nitrogen bond

研究代表者

小林 達彦(KOBAYASHI, Michihiko)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：70221976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 148,500,000円

研究成果の概要(和文)：ペプチド結合以外の炭素-窒素(C-N)結合を切断する酵素や合成する酵素は、基礎・応用面で重要であるにも関わらずプロテアーゼほど精力的に行われていない。既知のC-N結合切断酵素や合成酵素のみならず、反応機構が異なる種々のタイプの酵素群を対象としてタンパク質・遺伝子レベルから解析し、C-N結合切断および酵素群の機能解析を行った。さらに、その触媒機能を利用した有用物質生産系基盤技術を構築した。

研究成果の概要(英文)：Enzymes involved in the cleavage and synthesis of a carbon-nitrogen bond (except for the peptide bond) are very important in applied as well as academic fields. In this project, we tried to elucidate the function of enzymes involved in the cleavage and synthesis of a carbon-nitrogen bond. Moreover, we constructed fundamental techniques for the production of useful compounds using their catalytic activities.

研究分野：応用微生物学

キーワード：微生物 酵素

### 1. 研究開始当初の背景

プロテアーゼが作用するペプチド結合以外の炭素-窒素 (C-N) 結合を切断する酵素や合成する酵素について、反応機構を始めとする生化学的解析はプロテアーゼほど精力的に行われていないのが現状である中、我々はこれまで、特に C-N 三重結合 [C≡N] を切断する酵素や C-N 単結合 [C-N] を切断する酵素を対象としタンパク質・遺伝子レベルから解析してきた。その過程で、同じ反応を触媒しながら反応機構の異なる酵素の発見およびそれらの活性アミノ酸残基の相違など多くの興味深い発見を行った。これらの知見は(従来の反応機構とは異なる)未だ発見されていない種々のタイプの C-N 結合切断酵素群が自然界に存在する可能性を示唆するものである。

### 2. 研究の目的

本研究では、我々が取得することに成功しているオリジナルな C-N 結合切断酵素類、活性中心が従来とは異なる種々のタイプの新規 C-N 結合切断酵素、および、C-N 結合合成酵素を対象とし、構造機能(反応機構を含む)を生化学的に明らかにすることを目的とする。さらに、得られる情報を基に(その触媒機能を利用し)有用物質生産系の基盤を構築することを目的とする。

### 3. 研究の方法

既存の C-N 結合切断酵素・C-N 結合合成酵素 (Aldoxime dehydratase, Isonitrile hydratase, N-Substituted formamide deformylase 等) だけでなく、従来知られていないタイプの酵素も対象とし、酵素および遺伝子レベルで詳細に解析する。酵素の反応速度論的解析や分光学的解析により諸性質や機能を解明するだけでなく、立体構造や反応機構の観点からも比較解析を行う。

いずれの酵素においても、構造情報の利用や変異酵素の作製を通して、高機能や触媒機能(正反応)・逆反応・(本来の酵素反応とは異なる)酵素反応の多様性を利用した有用物質生産系開発を行う。

### 4. 研究成果

(1) C-N 二重結合 [C=N] をもつアルドキシムを基質とする Aldoxime dehydratase (OxdA) の基質特異性を検討していた過程で、ケトキシム化合物が OxdA の基質とならないことを認めた。C-N 二重結合をもつケトキシム化合物の代謝に関してはこれまで知られていないことから、このケトキシム化合物代謝能を示す微生物のスクリーニングを行った。グリセロールを炭素源として添加し、ケトキシム化合物類を単一窒素源とした培地を作成し、200ヶ所以上の土壌サンプルを加えて 28°C で集積培養を行った結果、2-ブタノンオキシムの最少培地で生育できる微生物の単離に成功した。単離した菌株について休止菌体反応を行い、残存する 2-ブタノンオキシ

ムを高速液体クロマトグラフィーで定量し活性測定を行ったところ、2-ブタノンオキシム分解活性が認められた。さらに、ガスクロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィー質量分析法により、2-ブタノンオキシムの分解産物として 2-ブタノンや、クロトン酸を始めとする低級有機酸を同定し、分解経路を推定した。本分解経路、およびその分解経路上初発の C-N 二重結合切断反応を触媒する酵素の報告例はこれまで無く、新規 C-N 二重結合切断酵素の存在が強く示唆された。

(2) 我々はイソニトリル (R-N≡C) を N-置換ホルムアミドに水和する反応を触媒する 2 種の C-N 結合切断酵素、即ち、*Pseudomonas putida* N19-2 株由来 Isonitrile hydratase および *Arthrobacter pascens* F164 株由来 Isonitrile hydratase の発見に成功している。両者は同じ反応を触媒するものの、互いにアミノ酸配列の相同性がないことから、触媒反応に関与する活性アミノ酸残基や反応機構が全く異なると考えられる。F164 株由来 Isonitrile hydratase について詳細な解析を行った結果、本酵素が Isonitrile hydratase / Nitrilase の両活性を触媒することを発見した。さらに、変異酵素を構築・精製し、酵素活性測定することで、Isonitrile hydratase の酵素反応触媒上重要な活性アミノ酸残基としてシステイン残基の同定に成功した。

(3) C-N 三重結合合成酵素である Aldoxime dehydratase (OxdA) は、C-N 二重結合をもつアルドキシムからニトリル (R-C≡N) を形成する脱水反応を触媒する。ヘムを有する OxdA のこのような希有な反応を触媒する機構の解析を試みた。硫酸アンモニウムやグリセロールの沈殿剤を使用したハンギングドロップ法により、赤色を呈した OxdA の結晶を得ることができ、本酵素の立体構造を 1.8Å の解像度で決定した。(ヘム鉄から 6Å 以内の distal 側に位置し) 反応機構に関与する可能性のあるアミノ酸残基として、E143, S174, R178, S219, Q221, Y234, N279 を選別し、これらのアミノ酸のみをアラニンに変異させた OxdA 変異酵素を各々作成・精製した。それらと野生型 [OxdA (WT)] 酵素に対し、CD スペクトル解析、ヘム含有量および酵素活性測定を行った結果、H320 とともに R178 と S219 が反応機構上、重要であることを明らかにした。OxdA による C-N 三重結合形成反応において重要な S219 の変異酵素 OxdA (S219A) のラマンスペクトル測定を行った結果、S219 の役割は一般塩基触媒と考えられた。しかし、一般的にセリン残基は単独で求核剤として機能できず、S219 に求核性を与えるアミノ酸残基の存在が不可欠である。Q221 のみが S219 に求核性を与える可能性のあるアミノ酸残基と推定されたが、Q221 の変異酵素 OxdA (Q221A) の酵素活性はほとんど減少しな

かったため、S219 は一般塩基触媒として働かないと結論付けた。S219 と H320 だけが基質に直接作用し得る位置に存在するので、H320 は酸触媒としてだけではなく、塩基触媒としても機能することが示唆された。OxdA (WT) の結晶構造情報および OxdA の各種変異酵素の酵素科学および物理学的性質の解析により、① H320 は酸-塩基触媒として働き、② R178 は H320 のイミダゾール環の求電子性を強め、③ S219 は基質を固定するとともに基質の水酸基の塩基性を増加していることを明らかにし、これらが関与して C-N 三重結合合成反応を触媒する Aldoxime dehydratase の反応機構の全貌を解明した。

(4) Aldoxime dehydratase (OxdA) はヘム酵素ではあるが、触媒する反応は(一般的なヘム酵素が触媒する)酸化還元反応ではなく、本来の基質アルドキシムからニトリルを生成する脱水反応を触媒する。Aldoxime dehydratase が本来の脱水反応とは異なる反応を触媒するかに興味を持ち、酸化還元反応に着目し、Catalase、Peroxidase、Peroxygenase 活性を指標として検討を行った。野生型 [OxdA (WT)] 酵素だけでなく、(本来の活性を失う) 変異酵素 [OxdA (H320A)] や酸化還元活性が高くなると予想される変異酵素 [OxdA (H320D)] についても、それぞれの酵素活性を検討した。

OxdA (WT) を Catalase 反応の基質である過酸化水素に作用させ、酸素電極を用いて、Catalase 反応産物である酸素を測定・定量した結果、Aldoxime dehydratase が Catalase 活性を触媒することを初めて発見した。Catalase 活性は、OxdA (H320D) と OxdA (H320A) の両変異酵素でも検出でき、それぞれの酵素活性のキネティックパラメーターを決定した。その結果、OxdA (H320D) の  $V_{max}$  は、OxdA (WT) や OxdA (H320A) の約 30 倍高かった。一方、OxdA (H320A) の  $K_m$  値は、OxdA (WT) と OxdA (H320D) の約 10 分の 1 であり、3 つの OxdA の中で最も低くなった。

次に、OxdA および 2 種の変異酵素を用いて、Peroxidase 活性の検討を行った。基質として過酸化水素以外に、Guaiacol もしくは ABTS [2, 2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid ammonium salt)] を用いて Peroxidase 活性を測定した結果、いずれの基質においても本活性の検出に成功し、Aldoxime dehydratase が Peroxidase 活性を触媒することを初めて発見した。それぞれの酵素活性のキネティックパラメーターを決定した結果、OxdA (H320D) の活性は OxdA (WT) に比べ、2.5~10 倍高い値を示した。

さらに、OxdA (WT) および 2 種の変異酵素の Peroxygenase 活性についても検討を行った。基質として過酸化水素と 1-Methoxynaphthalene を用い、産物の (4-Methoxy-1-naphthalenol の重合体であ

る) Russig's blue の増加量を定量して本活性を測定した結果、Aldoxime dehydratase が Peroxygenase 活性を触媒することを初めて発見した。興味深いことに、OxdA (H320D) を用いた反応では、Russig's blue は生成せず、その反応溶液は野生型とは全く異なる色に変化した。この結果より、OxdA (H320D) の 1-Methoxynaphthalene を基質とした Peroxygenase 反応において、新規の産物が生成したことが示唆された。そこで、OxdA (H320D) の未知の Peroxygenase 反応産物を、酢酸エチルで抽出後、HPLC で精製した標品を用いて、LC/MS により産物の分子量を決定した。NMR の解析結果をあわせ、最終的に本産物を 1-Methoxy-2-naphthalenol と同定した。本化合物はこれまで Peroxygenase の反応産物として報告のない構造をもつ化合物であり、従来 of Peroxygenase には無い新たな機能を有する Peroxygenase の作成に初めて成功するとともに、本酵素の Peroxygenase 反応を利用した 1-Methoxy-2-naphthalenol の酵素的合成法を確立した。続いて、本化合物のモル吸光係数を決定し、その値を用いた OxdA (H320D) の Peroxygenase 活性測定法を新たに構築し、キネティックパラメーターを調べた。その結果、OxdA (H320D) の Peroxygenase 活性は、OxdA (WT) の約 6 倍高かった。

最後に、酸化還元触媒能の強さの指標となる還元電位を、OxdA (WT) と OxdA (H320D)、OxdA (H320A) について測定した。その結果、OxdA (H320D) の onset ポテンシャルは 0.4 V と、OxdA (WT) の 0.28 V や OxdA (H320A) の 0.28 V より高く、OxdA (WT) の数倍~数十倍の酸化還元活性を示す OxdA (H320D) の高い活性は高い還元電位に起因するものであることが示唆された。

(5) グラム陽性菌の細胞壁のテイコ酸の D-アラニル化に関わる初発の反応、即ち、キャリアタンパク質である DltC のホスホパンテイン補欠分子族に D-アラニンと結合する DltA に着目した。本酵素はチオエステル結合形成反応を触媒するが、D-アラニンと (DltC の代わりに) L-システインを基質として反応させたところ、反応産物が D-アラニンと L-システインがペプチド結合したジペプチドであることが判明し、本酵素がペプチド結合形成能も示すことを発見した。(D-アラニンの代わりに) 各種アミノ酸と L-システインを基質として反応させたところ、いくつかの組合せにおいて反応が進行し、HPLC による反応産物の分離および LC-MS/MS 分析を行った結果、ジペプチドが合成されていることを明らかにした。さらに、D-アラニンと (L-システインの代わりに) アミノ酸あるいはペプチドを反応させた場合にも、いくつかの組合せにおいて反応が進行し、ジペプチド、オリゴペプチド等の反応産物が得られることも明らかにし、種々のジペプチド、トリペプチ

ド・オリゴペプチドの酵素的合成法を確立した。D-アラニンを様々なL-システイン類似化合物と反応させ、反応の進行が認められた場合には反応産物の分離および同定を行った。アミノ基もチオール基ももたないシステイン類似化合物、あるいはアミノ基はもつがチオール基をもたないシステイン類似化合物を基質として用いた場合は、いずれも反応は進行せず、一方、アミノ基をもたずにチオール基のみをもつ類似化合物の場合に得られる反応産物はチオエステル結合化合物と同定した。チオール基および一部保護されたアミノ基をもつシステイン類似化合物を反応に用いた場合は、チオエステル結合化合物、アミド化合物の順で産物が検出された。これらの結果を基に、本来の酵素反応によりS-アシルL-システインが中間体として合成され、続く化学的なS→Nアシルシフト反応によりN-アシルL-システインが合成されることによってペプチド(C-N)結合が形成されることを実証し、新規な酵素-化学カップリング連続反応機構として提唱した。

(6) 枯草菌の鉄キレート剤の1種であるBacillibactinの生合成に関わる酵素の1つであるDhbEは、2,3-Dihydrobenzoic acid (2,3-DHB)を、チオエステル結合を介して別のNRPS酵素DhbBに付加する反応を触媒する。DhbEはDltAと同じAdenylate-forming enzyme superfamilyに属する酵素であることから本酵素に着目した。dhbE遺伝子をプラスミドにクローン化し、大腸菌を宿主として大量発現系を構築した。大量発現させたDhbEを精製し、それを用いて2,3-DHBと(DhbBの代わりに)L-システインを基質として反応させたところ、反応の進行を示唆するAMPの増加が確認された。各種HPLCカラムを用いて産物の探索および分離を検討し、LC-MS/MSを用いて反応産物を同定したところ、DhbEもまたL-システインを基質にすることができ、反応産物としてアミド化合物を合成できることを明らかにした。さらに、本酵素反応の諸性質を解明した。本反応を利用して(2,3-DHBの代わりに)各種芳香族系カルボン酸とL-システインを基質として反応させたところ、いくつかの組合せにおいて反応が進行し、様々な芳香族系N-アシルL-システインの酵素的合成法を確立した。

(7) 我々がC-N単結合切断酵素として発見した新規酵素N-Substituted formamide deformylaseを利用して、アミンと、酢酸あるいはプロピオン酸を基質とした逆反応によるCarboxamideの酵素的合成法を開発した。特に、低級カルボン酸が1.0 M、ベンジルアミンが0.2 Mの濃度の逆反応制御下で、16 mMのN-置換ホルムアミド、22 mMのN-置換酢酸アミド、18 mMのN-置換プロピオン酸アミドを各々生産する系を確立した。

## 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4件)

(1) Yamada, M., Hashimoto, Y., Kumano, T., Tsujimura, S., & Kobayashi, M. "New function of aldoxime dehydratase: Redox catalysis and the formation of an unexpected product" *PLOS ONE*, **12**, e0175846 (2017), doi: 10.1371/journal.pone.0175846, doi: 10.1371/journal.pone.0178974, 査読有

(2) Abe, T., Hashimoto, Y., Sugimoto, S., Kobayashi, K., Kumano, T., & Kobayashi, M. "Amide compound synthesis by adenylation domain of bacillibactin synthetase" *J. Antibiot.*, **70**, 435-442 (2017), doi: 10.1038/ja.2016.117, 査読有

(3) Abe, T., Hashimoto, Y., Zhuang, Y., Ge, Y., Kumano, T., & Kobayashi, M. "Peptide bond synthesis by a mechanism involving an enzymatic reaction and a subsequent chemical reaction" *J. Biol. Chem.*, **291**, 1735-1750 (2016), doi: 10.1074/jbc.M115.700989, 査読有

(4) Nomura, J., Hashimoto, H., Ohta, T., Hashimoto, Y., Wada, K., Naruta, Y., Oinuma, K-I., & Kobayashi, M. "Crystal structure of aldoxime dehydratase and its catalytic mechanism involved in carbon-nitrogen triple-bond synthesis" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 2810-2815 (2013), doi: 10.1073/pnas.1200338110, 査読有

[学会発表] (計40件)

(1) ○石上佳奈, 橋本義輝, 熊野匠人, 小林達彦, "ニトリル前駆体アナログの微生物代謝", 2016年度日本農芸化学会大会、平成28年3月28日、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

(2) ○山田優駿, 橋本義輝, 熊野匠人, 小林達彦, "アルドキシム脱水酵素の多機能性", BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会)、平成27年12月1日、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

(3) ○Kobayashi, M., "New synthetic formation of a carbon-nitrogen bond by unique enzyme function", BIT's 6th Annual Symposium of Enzyme & Biocatalysis 2015, 平成27年4月26日、南京 (中国)

(4) ○山田優駿, 橋本義輝, 熊野匠人, 小林達彦, "ニトリル合成酵素の多機能性", 2015年度日本農芸化学会大会、平成27年3月29

日、岡山大学（岡山県・岡山市）

(5) ○小林達彦、“微生物代謝および酵素の分子機構と機能開発”、2015年度日本農芸化学会大会、平成27年3月26日、岡山大学（岡山県・岡山市）**日本農芸化学会賞受賞講演**

(6) ○Hashimoto, Y., Ohsuka, S., & Kobayashi, M., "Microbial degradation of an analog of nitrile precursor", 2015 International Symposium on New Frontiers in Microbiology and Biotechnology, 平成27年1月12日, 無錫（中国）

(7) 大須賀勝, 橋本義輝, ○熊野匠人, 小林達彦、“ニトリル前駆体アナログ分解菌の培養条件検討”、第87回日本生化学会大会、平成26年10月18日、国立京都国際会館（京都府・京都市）

(8) ○橋本義輝, 荘葉, 安部智子, 葛寅, 熊野匠人, 小林達彦、“枯草菌細胞壁合成に関与する酵素の基質特異性解析”、第87回日本生化学会大会、平成26年10月18日、国立京都国際会館（京都府・京都市）

(9) ○Hashimoto, Y., Abe, T., Zhuang, Y., Ge, Y., Kumano, T., & Kobayashi, M., "Substrate specificity in peptide synthetic reaction", FEBS EMBO 2014 Conference, 平成26年9月3日, Paris (France)

(10) ○荘葉, 橋本義輝, 安部智子, 葛寅, 熊野匠人, 小林達彦、“枯草菌細胞壁合成に関与する酵素を用いたペプチド合成の基質特異性”、2014年度日本農芸化学会大会、平成26年3月28日、明治大学（神奈川県・川崎市）

(11) ○Yamada, M., Hashimoto, Y., Kumano, T., and Kobayashi, M., "Unique reaction of carbon-nitrogen triple bond synthetic enzyme", 2014 International Symposium on New Frontiers in Microbiology and Biotechnology, 平成26年3月14日, 無錫（中国）

(12) Nomura, J., Hashimoto, H., Ohta, T., Hashimoto, Y., & ○Kobayashi, M., "Microbial nitrile-synthetic enzyme involved in C-N triple bond formation: Unique function and reaction", BioMicroWorld 2013, 平成25年10月3日, Madrid (Spain)

(13) Nomura, J., Hashimoto, H., Ohta, T., Hashimoto, Y., & ○Kobayashi, M., "Unique heme-containing enzyme involved in formation of carbon-nitrogen triple bond: Expression, structural and mechanistic

understanding and the potential for nitrile synthesis", Enzyme Engineering XXII, 平成25年9月26日, Toyama International Conference Center (Toyama)

(14) ○小林達彦、“炭素-窒素3重結合形成に関わる酵素の構造機能解析”、第86回日本生化学会大会、平成25年9月13日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

(15) 大須賀勝, 橋本義輝, ○熊野匠人, 小林達彦、“ニトリル前駆体アナログ分解菌のスクリーニング”、第86回日本生化学会大会、平成25年9月13日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

(16) 野村純平, 橋本博, 太田雄大, 橋本義輝, 和田浩一, 成田吉徳, 老沼研一, ○山田優駿, 小林達彦、“アルドキシムデヒドラターゼの立体構造と反応機構解析”、第86回日本生化学会大会、平成25年9月11日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

(17) ○Kobayashi, M., "Unique enzyme reaction involved in the synthesis of a carbon-nitrogen bond", 2013 Annual Meeting, Society for Industrial Microbiology & Biotechnology (SIMB), 平成25年8月12日, San Diego (USA) 招待講演

(18) ○Kobayashi, M., Nomura, J., & Hashimoto, Y., "Nitrile-synthetic enzyme involved in the formation of a carbon-nitrogen triple bond", Experimental Biology 2013, 平成25年4月23日, Boston (USA)

(19) ○荘葉, 橋本義輝, 安部智子, 葛寅, 熊野匠人, 小林達彦、“枯草菌細胞壁合成に関与する酵素を用いた新規ペプチド合成法”、2013年度日本農芸化学会、平成25年3月25日、東北大学（宮城県・仙台市）

(20) ○Hashimoto, Y., Nomura, J., Hashimoto, H., Ohta, T., Wada, K., Naruta, Y., Oinuma, K-I., & Kobayashi, M., "Aldoxime dehydratase: Crystal structure and catalytic mechanism involved in carbon-nitrogen triple bond synthesis", 2013 International Symposium on New Frontiers in Microbiology and Biotechnology, 平成25年3月6日, 無錫（中国）

(21) ○荘葉, 安部智子, 葛寅, 橋本義輝, 小林達彦、“枯草菌細胞壁合成に関与する酵素の新規アミド結合触媒反応”、第85回日本生化学会大会、平成24年12月16日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡（福岡県・福岡市）

(22) ○小林達彦、“微生物代謝の分子機構と

物質生産への機能開発”, BioJapan2012, 平成 24 年 10 月 10 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市) バイオインダストリー協会賞受賞講演

(23) ○橋本義輝, 佐藤太祐, 小林達彦, “*Arthrobacter* 属放線菌由来新規イソニトリルヒドラターゼの部位特異的変異解析”, 2012 年度日本放線菌学会大会、平成 24 年 9 月 6 日、府中の森芸術劇場 (東京都・府中市)

(24) ○Kobayashi, M., "Diverse metabolism of toxic isonitrile compounds and the degrading enzymes", 2012 Society for Industrial Microbiology & Biotechnology (SIMB) Annual Meeting & Exhibition, 平成 24 年 8 月 14 日, Washington, DC (USA) 招待講演

(25) Nomura, J., Oinuma, K-I., Hashimoto, Y., & ○ Kobayashi, M., "Microbial nitrile-synthetic metabolism and the enzyme", American Society for Microbiology 112th General Meeting, 平成 24 年 6 月 19 日, San Francisco (USA)

(26) Sato, H., Hashimoto, Y., & ○ Kobayashi, M., "Discovery of a novel enzyme involved in cleavage of a nitrogen-carbon triple bond", The 12th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering (12<sup>th</sup> 日中韓酵素工学シンポジウム), 平成 24 年 5 月 29 日, 金沢エクセルホテル東急 (石川県・金沢市)

(27) ○小林達彦, “微生物と酵素の潜在機能の開拓: 探索と戦略”, 2012 年度日本農芸化学会、平成 24 年 3 月 25 日、京都女子大学 (京都府・京都市)

(28) ○野村純平, 橋本義輝, 小林達彦, “ニトリル合成酵素の変異体構築および諸性質の解析”, 2012 年度日本農芸化学会、平成 24 年 3 月 24 日、京都女子大学 (京都府・京都市)

(29) ○佐藤太祐, 橋本義輝, 小林達彦, “新規イソニトリルヒドラターゼの諸性質と活性残基の同定”, 84 回生化学会大会、平成 23 年 9 月 23 日、国立京都国際会館 (京都府・京都市)

(30) ○Kobayashi, M., "Unique enzyme reactions involved in the formation of a carbon-nitrogen bond", Enzyme Engineering XXI, 平成 23 年 9 月 19 日, Colorado (USA) 招待講演

(31) ○Sato, H., Hashimoto, Y., & Kobayashi, M., "New isonitrile hydratase from

*Arthrobacter*: Characterization and identification of the active site", International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS 2011 Congress), 平成 23 年 9 月 8 日, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

(32) ○Kobayashi, M., "Microbial nitrile metabolism: Regulation and utilization", Society for Industrial Microbiology & Biotechnology (SIMB) 61st Annual Meeting, 平成 23 年 7 月 26 日, New Orleans (USA) 招待講演

[図書] (計 0 件)

[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.microbes.agbi.tsukuba.ac.jp/kobayashi/>

新聞掲載

- ・科学新聞、平成 25 年 2 月 22 日(金)掲載
- ・日刊工業新聞、平成 25 年 2 月 13 日(水)掲載

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 達彦 (KOBAYASHI, Michihiko)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号: 70221976

### (2) 研究分担者

東端 啓貴 (HIGASHIBATA, Hiroki)

東洋大学・生命科学部・准教授

研究者番号: 20344864

(平成 23 年度～平成 25 年度)

熊野 匠人 (KUMANO, Takuto)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号: 70585025

(平成 24 年度～)

橋本 義輝 (HASHIMOTO, Yoshiteru)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号: 00323254

(平成 26 年度～)