

I 代謝系に関わるタンパク質・酵素群のX線構造化学

X-ray Structural Chemistry of Proteins in Metabolic Systems

寺脇慎一・庄村康人・小森博文・柴田直樹・樋口芳樹

Terawaki, S., Shomura, Y., Komori, H., Shibata, N., Higuchi, Y.

微生物の体内では、酵素や電子伝達タンパク質など多くの生体高分子が重要な化学反応の制御に関与している。膜内外のプロトン濃度の直接支配や還元力の維持などはある種の微生物にとっては必須の生体内システムである。硫酸還元菌では[NiFe]ヒドロゲナーゼ、ヒドロゲナーゼ成熟化因子、各種チトクロム類、硫酸塩・亜硫酸塩還元系酵素、フラビンタンパク質などの分子が水素代謝機構に関与している。我々はこれらの生体高分子のX線結晶構造解析を行い、その機能・分子間相互作用・電子伝達機構などの研究を行っている。特に[NiFe]ヒドロゲナーゼではその活性部位における様々な状態(酸化型・還元型・不活性型・光活性型)について精密な分子構造を明らかにし、酵素触媒反応機構を構造化学的に解明し、さらにモデル化合物の合成に成功している。また、これらのタンパク質について中性子結晶解析を進めている。また、最近、膜結合性のヒドロゲナーゼやNAD⁺還元型の新規ヒドロゲナーゼ酵素群の構造化学を開始した。さらに硫酸還元菌の翻訳システムの制御に関わる酵素の構造生物学も進めている。

ビタミンB₁₂補酵素 (Co原子含有) の関与するジオールデヒドラターゼの構造化学によりより補酵素の結合位置、K⁺イオンと基質との相対配置等を明らかにし、酵素の触媒するラジカル反応機構を提唱している。また、同類の酵素・エタノールアミンアンモニアリアーゼの解析も進展している。他にナイロンオリゴマー分解酵素やデカルボキシラーゼ、フェレドキシン - NADP還元酵素、マルチ銅酸化酵素などについても高精度な構造化学的研究を展開しつつある。

外部からの様々な刺激・ストレス・外敵に応答してそれに対応、あるいは制御するためのシステムは生物が生命を維持するためには重要である。酸化ストレスや金属イオンの細胞外への排出に関わる酵素や、気体分子に反応してDNAの転写制御に関わるタンパク質群のX線構造化学的研究を進めている。

II 脳・神経系で機能するタンパク質群のX線構造生物学

X-ray Structural Biology of Proteins Functioning in Brain and Neuron

寺脇慎一・庄村康人・小森博文・柴田直樹・樋口芳樹

Terawaki, S., Shomura, Y., Komori, H., Shibata, N., Higuchi, Y.

生物の細胞内、特に脳神経細胞内では様々な制御・調節のシステムが互いに高度な連携をとりながら機能している。これらのシステムに関与しているタンパク質群の構造生物学的研究は現在発展途上である。本研究室では脳・神経系で特異的に発現され、Wntシグナル伝達・血管成長・シナプス間接着などの重要な働きに関与するタンパク質群のX線結晶構造解析を進め、その分子構造に基づいて機能をより深く理解することをめざしている。また、これらのタンパク質の重要な機能は分子表面の疎水性残基による分子間相互作用に基づくものが多い。このため一般的にこれらの分子は精製時や濃縮時に凝集を起こし不溶性の沈殿となりやすく、通常の結晶化方法の利用が困難である。従って新規の結晶化方法の開発も進めている。

発表論文 List of Publications

- I-1 Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a putative two-domain-type laccase from a metagenome
H. Komori, K. Miyazaki and Y. Higuchi
Acta crystallogr., **F65**, 264-266 (2009).
- I-2 X-ray structure of a two-domain type laccase: A missing link in the evolution of multi-copper proteins
H. Komori, K. Miyazaki and Y. Higuchi
FEBS Lett., **583**, 1189-1195 (2009).
- I-3 Zwitterionic Corroles: Regioselective Nucleophilic Pyridination of a Doubly Linked Biscorrole
S. Hiroto, N. Aratani, N. Shibata, Y. Higuchi, T. Sasamori, N. Tokitoh, H. Shinokubo and A. Osuka
Angew. Chem. Int. Ed., **48**, 2388– 2390 (2009).
- I-4 Molecular design of nylon-6 byproduct degrading enzyme from carboxylesterase with a β -lactamase fold
Y. Kawashima, T. Ohki, N. Shibata, Y. Higuchi, Y. Wakitani, Y. Matsuura, Y. Nakata, M. Takeo, D. Kato and S. Negoro
FEBS J., **276**, 2547-2556 (2009).
- I-5 Two alternative modes for optimizing nylon-6 byproduct hydrolytic activity from a carboxylesterase with a β -lactamase fold: X-ray crystallographic analysis of directly evolved 6-aminohexanoate-dimer hydrolase
T. Ohki, N. Shibata, Y. Higuchi, Y. Kawashima, M. Takeo, D. Kato and S. Negoro
Protein Science, **18**, 1662-1673 (2009)
- I-6 Structure analysis of the flavoredoxin from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F reveals key residues that discriminate the functions and properties of the flavin reductase family
N. Shibata, Y. Ueda, D. Takeuchi, Y. Haruyama, S. Kojima, J. Sato, Y. Niimura, M. Kitamura and Y. Higuchi
FEBS J., **276**, 4840-4853 (2009).
- I-7 [NiFe] hydrogenases: structural and spectroscopic studies of the reaction mechanism
H. Ogata, W. Lubitz and Y. Higuchi
Dalton Transactions, **37**, 7577- 7587 (2009) Selected as Cover Image
- I-8 庄村康人・樋口芳樹
異化型亜硫酸還元酵素の構造化学的研究。
第9回日本蛋白質科学会年会（熊本、 2009年5月20日）ポスター発表
- I-9 小森博文・宮崎健太郎・樋口芳樹
メタゲノム由来ラッカーゼのX線結晶構造解析。
第36回生体分子科学討論会（札幌、 2009年6月19日）口頭発表
- I-10 H. Osuka, S. Hirota, S. Terawaki, Y. Shomura, H. Komori, N. Shibata, S. Hirota and Y. Higuchi,
Biding ligand at the active site of [NiFe] hydrogenase.
14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (Nagoya, 2009年7月25-30日) ポスター発表
- I-11 N. Shibata
Crystal Structure Analysis and Insight into the Reaction Mechanism of Ethanolamine Ammonia-Lyase.
The 2009 Gordon Research Conference on Vitamin B12 and Corphins (Magdalen College, Oxford, UK; 2009年8月2-7日) 口頭発表

- I-12 木平清人・西川幸志・竹田 翠・庄村康人・小森博文・柴田直樹・大木 卓・安平健悟・川島康之・根来誠司・中川敦史・伊中浩治・田仲広明・佐藤 勝・小林智之・田中哲夫・樋口芳樹
生物酵素の構造－機能相関の解明と産業利用への挑戦 ー宇宙空間で調製した高品質結晶による超高分解能結晶解析ー、
兵庫県立大学シンポジウム (Kobe, 2009年9月11日) ポスター発表
- I-13 柴田 浩・熊谷尚也・松浦悠介・田中優佑・橋本 悠・加藤太一郎・柴田直樹・武尾正弘・樋口芳樹・根来誠司
ナイロンオリゴマー分解酵素(NylC)の熱安定性と触媒機能に及ぼすアミノ酸置換効果、
第61回日本生物工学会大会 (Kobe, 2009年9月24日) 口頭発表
- I-14 柴田 浩・田中優佑・橋本 悠・松浦悠介・柴田直樹・李 映昊・櫻井一正・加藤太一郎・武尾正弘・樋口芳樹・後藤祐児・根来誠司
N-terminal nucleophile(Ntn)-hydrolases family(NylC) の耐熱化機構、
第61回日本生物工学会大会 (Kobe, 2009年9月24日) 口頭発表
- I-15 河島康之・松浦悠介・柴田直樹・田中優介・小林達也・加藤太一郎・武尾正弘・樋口芳樹・根来誠司
加水分解酵素の逆反応によるアミド合成：高効率触媒の形成要件、
第61回日本生物工学会大会 (Kobe, 2009年9月24日) 口頭発表
- I-16 安平健吾・柴田直樹・門上 剛・厚海 悠・日比野 敦・吉野拓真・河島康之・加藤太一郎・武尾正弘・樋口芳樹・根来誠司
6- アミノヘキサ酸環状2 量体加水分解酵素(NylA)の触媒機構、
第61回日本生物工学会大会 (Kobe, 2009年9月24日) 口頭発表
- I-17 H. Komori, D. Seo, Y. Abe, T. Sakurai and Y. Higuchi
Crystal Structure of a new type of ferredoxin-NADH reductase from *Bacillus subtilis*,
第82回日本生化学大会 (Kobe, 2009年10月22日) ポスター発表
- I-18 D. Seo, H. Komori, Y Higuchi, T. Sakurai
NAD(P)H binding mechanism of ferredoxin-NADPH oxidoreductase from *Bacillus subtilis*,
第82回日本生化学大会 (Kobe, 2009年10月23日) ポスター発表
- I-19 H. Osuka, S. Terawaki, Y. Shomura, S. Kawasaki, Y. Sakai, Y. Niimura, S. Terawaki, H. Komori, N. Shibata, S. Hirota and Y. Higuchi,
X-ray crystallography and FT-IR studies on [NiFe] hydrogenase (Tokushima, 2009年10月30日) 口頭発表
- I-20 庄村康人・緒方英明・土生川真央・山田佳樹・浜田尚孝・樋口芳樹
生物系ビームラインでの利用を目的としたキャピラリーマウントシステムの開発
日本結晶学会2009年度年会 (西宮、 2009年12月5日) ポスター発表
- I-21 佐藤 勝・田中広明・伊中浩治・巖 斌・朴 三用・樋口芳樹・中川敦史・小林智之・田中哲夫
タンパク質結晶の高圧凍結装置の開発。
日本結晶学会2009年度年会 (西宮、 2009年12月5日) ポスター発表
- I-22 小森博文・宮崎健太郎・樋口芳樹
メタゲノム由来ラッカーゼのX線結晶構造解析。
日本結晶学会2009年度年会 (西宮、 2009年12月5日) ポスター発表
- I-23 N. Shibata, N. Hieda, K. Akita, K. Mori, T. Toraya and Y. Higuchi
Cobalt-carbon bond activation mechanism of ethanolamine ammonia-lyase
The 3rd International Conference on Joint Project of Chemical Synthesis
Core Research Institutions (名古屋、2010年1月7－8日) ポスター発表
- I-24 H. Komori, K. Miyazaki and Y. Higuchi
X-ray crystallographic analysis of two-domain type laccases
The 3rd International Conference on Joint Project of Chemical Synthesis

- I-25 Core Research Institutions (名古屋、2010年1月7-8日) ポスター発表
Y. Shomura and Y. Higuchi
Structural Studies on Dissimilatory Sulfite Reductase II
The 3rd International Conference on Joint Project of Chemical Synthesis
Core Research Institutions (名古屋、2010年1月7-8日) ポスター発表
- I-26 M. Habukawa, K. Kihira, H. Osuka, K. Nishikawa, S. Terawaki, H. Komori, N. Shibata, K. Yoon, H. Nishihara, Y. Shomura and Y. Higuchi
Isolation and purification of NAD⁺-reducing [NiFe] hydrogenase
The 3rd International Conference on Joint Project of Chemical Synthesis
Core Research Institutions (名古屋、2010年1月7-8日) ポスター発表
- I-27 Y. Yamada, H. Osuka, H. Ogata, S. Terawaki, H. Komori, N. Shibata, Y. Shomura and Y. Higuchi
An Attempt to Neutron Crystal Structure Analysis of [NiFe] hydrogenase
The 3rd International Conference on Joint Project of Chemical Synthesis
Core Research Institutions (名古屋、2010年1月7-8日) ポスター発表
- I-28 庄村康人・樋口芳樹
異化型亜硫酸還元酵素のX線結晶構造解析
日本化学会第90春季年会 (大阪、2010年3月26日) 口頭発表
- II-1 寺脇慎一・北野 健・森 智行・樋口芳樹・箱嶋敏雄
Taim2のPHドメインを含む新規細胞膜結合ドメインのX線結晶構造解析.
第9回日本蛋白質科学会年会 (熊本、2009年5月21日) ポスター発表
- II-2 木平清人・沼田修子・北村昌也・近藤 淳・寺脇慎一・庄村康人・小森博文・柴田直樹・樋口芳樹
翻訳終結因子RF3の構造生物学.
第9回日本蛋白質科学会年会 (熊本、2009年5月21日) ポスター発表
- II-3 寺脇慎一・矢野孝明・塩見健輔・榊 正幸・庄村康人・小森博文・柴田直樹・樋口芳樹
Wntシグナル伝達の活性化を制御する新規因子Coiled-Coil DIX1 (CCD1)の持つDIXドメインのX線結晶構造解析
日本結晶学会2009年度年会 (西宮、2009年12月5日) ポスター発表
- II-4 S. Terawaki, K. Kitano, t. Mori, Y. Higuchi, N. Ito, T. Watanabe, K. Kaibuchi, T. Hakoshima and M. Mishima
The PHCCEx domain of Tiam1/2 is a novel protein- and membrane-binding module,
The 32rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (Yokohama, 2009年12月11日) ポスター発表
- II-5 A. Sato, T. Kanaba, S. Terawaki, Y. Ito, M. Amano, K. Kaibuchi, T. Hakoshima and M. Mishima
Structural studies of split PH domain of Rho-kinase using solution NMR spectroscopy.
The 32rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (Yokohama, 2009年12月11日) ポスター発表

大学院生命理学研究科

博士後期課程

- 大須賀久織 : 時間分解 FT-IR 法による金属タンパク質の構造化学的研究
西川幸志 : 編成嫌気性菌における酸素解毒システムの構造化学的研究

博士前期課程

- 土生川真央 : NAD⁺還元型[NiFe]ヒドロゲナーゼの X 線解析
山田佳樹 : [NiFe]ヒドロゲナーゼの中性子結晶解析

科学研究費補助金等

- 1 文部科学省科学研究費補助金（平成 21 年度）学術創成研究 課題番号:18GS0207
研究課題 還元系金属酵素の有機金属・クラスター化学
研究分担者 樋口芳樹
- 2 文部科学省科学研究費補助金（平成 21 年度）特定領域研究(2) 課題番号:18054029
研究課題 鉄ニッケル型ヒドロゲナーゼの金属クラスター形成における構造生物学的研究
研究代表者 庄村康人
- 3 兵庫県立大学特別教育研究助成金（平成 21 年度）奨励研究
研究課題 微小管依存的な物質輸送を制御する BICD による Dynein 認識の構造基盤
研究代表者 寺脇慎一
- 4 独立行政法人科学技術振興機構（平成 21 年度）CREST
研究課題 水中ナノ界面を介した水素 - 光変換システム
研究分担者 樋口芳樹
- 5 宇宙航空研究開発機構・JEM利用高品質タンパク質結晶生成実験（平成21年度）
研究課題 医療検査・産業応用に重要なタンパク質についての基質複合体の高品質結晶調製技術の開発
研究代表者 樋口芳樹