

## 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、フラビント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、モデル化合物の合成にも成功している。また、これらのタンパク質についての中性子結晶解析を進めている。最近、酸素耐性ヒドロゲナーゼの解析にも成功し、その酸素耐性が鉄-硫黄クラスターの構造変化によるものであることを明らかにするとともに、NAD<sup>+</sup>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B<sub>12</sub>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、補酵素の結合位置、K<sup>+</sup>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 K. Yasuhira, N. Shibata, G. Mongami, Y. Uedo, Y. Atsumi, Y. Kawashima, A. Hibino, Y. Tanaka, Y-H. Lee, D. Kato, M. Takeo, Y. Higuchi, and S. Negoro  
X-ray Crystallographic Analysis of the 6-aminohexanoate Cyclic Dimer Hydrolase: Catalytic Mechanism and Evolution of an Enzyme Responsible for Nylon-6 Byproduct Degradation  
*J. Biol. Chem.*, **285**, 1239-1248 (2010).
- I -2 K. Nishikawa, Y. Shomura, S. Kawasaki, Y. Niimura and Y. Higuchi  
Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of NADH:rubredoxin Oxidoreductase from *Clostridium acetobutylicum*  
*Acta Crystallogr.* **F66**, 23-25 (2010).
- I -3 K. Nishikawa, Y. Shomura, S. Kawasaki, Y. Niimura, and Y. Higuchi  
Crystal Structure of NADH:rubredoxin Oxidoreductase from *Clostridium acetobutylicum*: A Key Component of the Dioxygen Scavenging System in Obligatory Anaerobes  
*Proteins*, **78(4)**, 1066-1070 (2010).
- I -4 H. Komori, D. Seo, T. Sakurai and Y. Higuchi  
Crystallization and Preliminary X-ray Studies of Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> Oxidoreductase Encoded by *Bacillus subtilis* yumC  
*Acta Crystallogr.* **F66**, 301-303 (2010).
- I -5 K. Ichikawa, K. Nonaka, T. Matsumoto, B. Kure, K-S. Yoon, Y. Higuchi, T. Yagi, S. Ogo  
Concerto Catalysis. Harmonising [NiFe] Hydrogenase and NiRu Model Catalysts.  
*Dalton Transactions*, **39**, 2993-2994 (2010).
- I -6 Y. Kawashima, K. Yasuhira, N. Shibata, Y. Matsuura, Y. Tanaka, M. Taniguchi, Y. Miyoshi, M. Takeo, D. Kato, Y. Higuchi and S. Negoro  
Enzymatic Synthesis of Nylon-6 units in Organic Solvent Contained Low-water: Structural Requirement of 6-aminohexanoate-dimer Hydrolase for Efficient Amide Synthesis  
*J. Mol. Cat. B*, **64**, 81-88 (2010).
- I -7 H. Komori and Y. Higuchi  
Structure and Molecular Evolution of Multicopper Blue Proteins  
*BIOMOLECULAR CONCEPTS*, **1**, 31-40 (2010).
- I -8. N. Shibata, H. Tamagaki, S. Ohtsuki, N. Hieda, K. Akita, H. Komori, Y. Shomura, S. Terawaki, T. Toraya, N. Yasuoka and Y. Higuchi  
Expression, Crystallization and Preliminary X-ray Crystallographic Study of Ethanolamine Ammonia-lyase from *Escherichia coli*  
*Acta Crystallogr.*, **F66**, 709-711 (2010).
- I -9 N. Shibata, H. Tamagaki, N. Hieda, K. Akita, H. Komori, Y. Shomura, S. Terawaki, K. Mori, N. Yasuoka, Y. Higuchi, and T. Toraya  
Crystal Structures of Ethanolamine Ammonia-lyase complexed with Coenzyme B<sub>12</sub> Analogs and Substrates.  
*J. Biol. Chem.*, **285(34)**, 26484-26493 (2010).
- I -10 S. Hirota, Y. Hattori, S. Nagao, M. Taketa, H. Komori, H. Kamikubo, Z. Wang, I. Takahashi, S. Negi, Y. Sugiura, M. Kataoka, Y. Higuchi  
Cytochrome *c* Polymerization by Successive Domain Swapping at the C-terminal Helix  
*Pro. Natl. Acad. Sci.*, **107(29)**, 12854-12859 (2010).

- I -11 H. Ogata, Y. Shomura, A.G. Agrawal, A.P. Kaur, W. Gärtner, Y. Higuchi and W. Lubitz, Purification, Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of the Dissimilatory Sulfite Reductase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F  
*Acta Crystallogr.*, **F66**, 1470-1472 (2010).
- I -12 M. Taketa, H. Komori, Y. Hattori, S. Nagao, S. Hirota and Y. Higuchi  
Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of Dimeric and Trimeric Cytochromes c from Horse Heart.  
*Acta Crystallogr.*, **F66**, 1477-1479 (2010).
- I -13 H. Komori, D. Seo, T. Sakurai and Y. Higuchi  
Crystal Structure Analysis of *Bacillus subtilis* Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> Oxidoreductase and the Structural Basis for Its Substrate Selectivity  
*Protein Science*, **19(12)**, 2279-2290 (2010).
- I -14 樋口芳樹  
ナイロンオリゴマー分解酵素の精密構造解析 ～新規酵素機能の創成を目指して～  
第10回日本蛋白質科学会年会（札幌、2010年6月18日）ランチョンセミナー
- I -15 庄村康人  
ニッケル・鉄ヒドロゲナーゼの構造生物学  
生物無機化学夏季セミナー（山梨、2010年8月29日）招待講演
- I -16 小森博文  
マルチ銅酸化酵素の構造解析  
生物高分子学会2010年度大会（姫路、2010年9月10日）招待講演
- I -17 S. Hirota, Y. Hattori, S. Nagao, M. Taketa, H. Komori, H. Kamikubo, Z. Wang, I. Takahashi, S. Negi, Y. Sugiura, M. Kataoka and Y. Higuchi  
Cytochrome c Polymerization by Successive Domain Swapping at the C-terminal Helix  
日本生物物理学会第48回年会（仙台、2010年9月22日）口頭発表、ポスター発表
- I -18 S. Negoro, Y. Kawashima, T. Ohki, M. Takeo, D. Kato, N. Shibata, Y. Higuchi, K. Kamiya, Y. Shigeta  
Enzymatic Degradation and Synthesis of Nylon-6 Related Compounds.  
International Symposium on BioPolymers 2010（Stuttgart, 2010年10月4日）招待講演
- I -19 N. Shibata, T. Toraya and Y. Higuchi  
Basis for the Lack of Stereospecificity in Coenzyme B<sub>12</sub>-dependent Ethanolamine ammonia-lyase.  
The 10th Conference of the Asian Crystallographic Association (Pusan, 2010年11月1-3日)  
ポスター発表
- I -20 H. Akutsu, Y. Takayama, M. Taketa, H. Komori, K. Morita, S. Kang and Y. Higuchi  
The Role of the  $\pi$ -electron System in Regulation of Reduction Potentials of Tetraheme Cytochrome c.  
The 10th Conference of the Asian Crystallographic Association (Pusan, 2010年11月1-3日)  
ポスター発表
- I -21 H. Tanaka, M. Sato, K. Inaka, N. Furubayashi, S. Takahashi, B. Yan, A. Higashiura, M. Suzuki, S.-Y. Park, Y. Higuchi, Y. Yoshimura and A. Nakagawa  
Improved Technologies for High-resolution X-ray Crystallography.  
The 10th Conference of the Asian Crystallographic Association (Pusan, 2010年11月1-3日)  
ポスター発表

- I -22 小森博文・瀬尾悌介・櫻井 武・樋口芳樹  
枯草菌由来フェレドキシン-NADPH 還元酵素のX線結晶構造解析.  
2010年度日本結晶学会年会 (吹田、2010年12月3-5日) ポスター発表
- I -23 庄村康人・萩谷啓輔・尹 基石・西原宏史・樋口芳樹  
膜結合型[NiFe]ヒドロゲナーゼのX線結晶構造解析.  
2010年度日本結晶学会年会 (吹田、2010年12月3-5日) ポスター発表
- I -24 柴田直樹・樋口芳樹・虎谷哲夫  
B12-補酵素関与エタノールアミアンモニアリアーゼの立体構造に基づく立体化学経路の解明  
第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会 合同大会 (神戸、2010年12月7日)  
口頭発表
- I -25 Y. Shomura  
Structural Basis for the Reaction Mechanism of Dissimilatory Sulfite Reductase.  
International Symposium on Chemistry of Reductases IV (名古屋、2011年1月20-21日)  
口頭発表
- I -26 N. Shibata, T. Toraya and Y. Higuchi  
Structural Basis for the Apparent lack of Stereospecificity in Coenzyme B<sub>12</sub>-dependent  
Radical Enzyme Ethanolamine Ammonia-lyase.  
International Symposium on Chemistry of Reductases IV (名古屋、2011年1月20-21日)  
ポスター発表
- I -27 H. Komori and Y. Higuchi  
Structure and molecular evolution of multicopper blue proteins.  
International Symposium on Chemistry of Reductases IV (名古屋、2011年1月20-21日)  
ポスター発表
- I -28 M. Taketa, Y. Shomura and Y. Higuchi  
Crystallization and X-ray Analysis of ATP-sulfurylase from Sulfate-reducing Bacteria.  
International Symposium on Chemistry of Reductases IV (名古屋、2011年1月20-21日)  
ポスター発表
- I -29 Y. Higuchi  
Can we elucidate the reaction mechanism of [NiFe] hydrogenase by neutron diffraction  
study?  
Neutron Structural Biology -Hydration Structure in Proteins- (Ibaragi、2011年3月4日)  
招待講演
- II -1 S. Terawaki, K. Kitano, T. Mori, Y. Zhai, Y. Higuchi, N. Itoh, T. Watanabe, K. Kaibuchi  
and T. Hakoshima  
The PHCCE<sub>x</sub> Domain of Tiam1/2 is a Novel Protein- and Membrane-binding Module  
*EMBO J.*, **29**, 236-250 (2010)
- II -2 柴田直樹・寺脇 慎一・小森博文・庄村康人・Marc Fiedler・Mariann Bienz・樋口芳樹  
Wnt シグナル制御因子Dishevelled-DIX ドメインのX線構造解析.  
第10回日本蛋白質科学会年会 (札幌、2010年6月16日) ポスター発表
- II -3 寺脇慎一・塩見健輔・榊 正幸・柴田直樹・樋口芳樹  
Wnt シグナル伝達機構ではたらくCCD1 の構造化学的研究.  
第10回日本蛋白質科学会年会 (札幌、2010年6月16日) ポスター発表

- II-4 K. Kihira, Y. Shimizu, Y. Shomura, M. Kitamura, A. Nakagawa, T. Ueda, K. Ochi and Y. Higuchi  
Structural Analysis of Release Factor 3  
日本生物物理学会第48回年会（仙台、2010年9月22日）ポスター発表
- II-5 寺脇慎一・塩見健輔・榊 正幸・柴田直樹・樋口芳樹  
Wnt シグナル伝達で機能するCCD1 のオリゴマー形成機構に関する構造学的研究.  
2010年度日本結晶学会年会（吹田、2010年12月3日）口頭発表
- II-6 寺脇慎一・塩見健輔・榊 正幸・柴田直樹・樋口芳樹  
Wntシグナル伝達で機能するCCD1 DIXドメインのX線結晶構造解析  
第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会 合同大会（神戸、2010年12月7日）ポスター発表
- II-7 S. Terawaki and Y. Higuchi  
Expression and Purification of the Rab GTPase-effector Complex.  
International Symposium on Chemistry of Reductases IV（名古屋2011年1月20-21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

博士前期課程

土生川真央：NAD<sup>+</sup>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 22 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 22 年度）新学術研究領域 課題番号:22121519  
研究課題 Wnt シグナル伝達系因子の離合集散を制御する DIX ドメインの構造生物学  
研究代表者 樋口芳樹
- 3 日本学術振興会科学研究費補助金（平成 22 年度）基盤研究(B) 課題番号:22370061  
研究課題 新規 Ni 酵素による水素活性化機構の解明とその利用  
研究代表者 樋口芳樹
- 4 日本学術振興会科学研究費補助金（平成 22 年度）挑戦的萌芽研究 課題番号:22657031  
研究課題 中性子結晶解析法によるヒドロゲナーゼの水素活性化反応機構の解明  
研究代表者 樋口芳樹
- 5 日本学術振興会科学研究費補助金（平成 22 年度）基盤研究 (C) 課題番号:22570123  
研究課題 光応答性酸素発生活性を有するトキイロヒラタケ由来の色素タンパク質の構造研究  
研究代表者 柴田直樹

- 6 日本学術振興会科学研究費補助金（平成 22 年度）若手研究(B) 課題番号:22770110  
研究課題 転写因子 TFIID サブ複合体の構造解析  
研究代表者 小森博文
- 7 日本学術振興会研究費補助金（平成 22 年度）若手研究(B) 課題番号:22770111  
研究課題 膜内在性[NiFe]ヒドロゲナーゼの X 線結晶構造解析  
研究代表者 庄村康人
- 8 兵庫県立大学特別教育研究助成金（平成 22 年度）奨励研究  
研究課題 膜結合型[NiFe]ヒドロゲナーゼの酸素耐性機構の解明  
研究代表者 庄村康人
- 9 日本学術振興会科学研究費補助金（平成 22 年度）若手研究 (B) 課題番号:22770112  
研究課題 動的オリゴマー形成因子による新規シグナル伝達制御の構造基盤  
研究代表者 寺脇慎一
- 10 財団法人ひょうご科学技術協会（平成 22 年度）奨励研究助成  
研究課題 Wnt シグナル伝達で機能する動的オリゴマー形成因子の構造学研究  
研究代表者 寺脇慎一
- 11 独立行政法人科学技術振興機構（平成 22 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
- 12 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22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