

I 微生物の細胞機能を維持するタンパク質群のX線構造化学

X-ray Structural Chemistry of Proteins in Various Metabolic Systems of Microorganism

西川幸志, 庄村康人, 小森博文, 柴田直樹, 樋口芳樹
Nishikawa, K., Shomura, Y., Komori, H., Shibata, N., Higuchi, Y.

微生物の細胞内では、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調節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、シトクロム類、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、その生化学的機能・分子間相互作用・電子伝達機構などの解明を目指している。特にヒドロゲナーゼについては、その水素活性化の分子機構の解明に近づいており、中性子結晶解析法による研究も進めている。また、一般的にヒドロゲナーゼは、酸素によりその機能を失う。我々は、酸素耐性をもつヒドロゲナーゼの構造を解明し、酸素耐性の構造基盤を明らかにしてきた。さらに、水素の還元力を利用して $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$ 変換機能をもつ酵素や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_{12} 補酵素 (Co原子含有) の関与するジオールデヒドラターゼやエタノールアミンアンモニアリアーゼの構造解析を行い、酵素の触媒するラジカル反応機構を提唱している。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、抗生物質の生産など医薬品合成に応用できるアミノ酸2量体合成酵素などについても高精度な構造化学的研究を展開している。

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、金属イオンの細胞外排出に関わるマルチ銅酵素や、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 高等生物細胞のタンパク質間相互作用のX線構造生物学

X-ray Structural Biology of Protein-protein Interactions in the Cells of Higher Organisms

西川幸志, 庄村康人, 小森博文, 柴田直樹, 樋口芳樹
Nishikawa, K., 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、神経発生の多様性等に関与していると考えられているプロトカドヘリンのX線構造生物学を展開し、それら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。

細胞は外界の変化に応答して代謝を調節するためのシグナル伝達機構をもっている。本研究室ではWntシグナル伝達経路のうち、特に β -カテニン経路に関わるAxin, Dishevelled, Coiled-coil DIXタンパク質がもつDIXドメインの結晶解析を通して、その分子間相互作用における構造基盤の解明を目指している。

神経伝達やアレルギーに関わるヒスタミンの合成に関わるヒト・ヒスタミン合成酵素の結晶解析を展開し、その構造と機能の関係を明らかにしつつある。

発表論文 List of Publications

I. 微生物の細胞機能を維持するタンパク質群のX線構造化学

- I-1. K. Kihira, Y. Shimizu, Y. Shomura, N. Shibata, M. Kitamura, A. Nakagawa, T. Ueda, K. Ochi, Y. Higuchi, Crystal Structure Analysis of the Translation Factor RF3 (release factor 3). *FEBS Letters* **586**, 3705-3709 (2012).
- I-2. Y. Shomura, Y. Higuchi, Purification, Structural Basis for the Reaction Mechanism of S-carbamoylation of HypE by HypF in the Maturation of [NiFe]-hydrogenases. *J. Biol. Chem.* **287**, 28409-28419 (2012).
- I-3. Y. Shomura, E. Hinokuchi, H. Ikeda, A. Senoo, Y. Takahashi, J. Saito, H. Komori, N. Shibata, Y. Yonetani and Y. Higuchi, Structural and Enzymatic Characterization of BacD, An L-amino Acid Dipeptide Ligase from Bacillus subtilis. *Protein Science* **21**, 707-716 (2012).
- I-4. H. Komori, R. Sugiyama, K. Kataoka, Y. Higuchi, and T. Sakurai, An O-Centered Structure of the Trinuclear Copper Center in the Cys500Ser/Glu506Gln Mutant of CueO and Structural Changes in Low to High X-Ray Dose Conditions. *Angewandte Chemie* **51(8)**, 1861-1864 (2012).
- I-5. S. Negoro, N. Shibata., Y. Tanaka ,K. Yasuhira, H. Shibata, H. Hashimoto, Y.-H. Lee, S. Oshima, R. Santa, S. Oshima, K. Mochiji, Y. Goto, T. Ikegami, K. Nagai, D. Kato, M. Takeo and Y. Higuchi, The Three-dimensional Structure of Nylon Hydrolase and The Mechanism of Nylon-6 Hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **287**, 5079-5090 (2012).
- I-6. 庄村康人・樋口芳樹
ヒドロゲナーゼの新規酸素耐性機構 —膜結合型 [NiFe] ヒドロゲナーゼ
化学 **67-4**、70-71 (2012)
- I-7. 庄村康人・樋口芳樹
酸素耐性ヒドロゲナーゼの構造化学的研究—酵素分子に見出された活性保護機構—
燃料電池 **11**、67-72 (2012)
- I-8. 庄村康人・樋口芳樹
[4Fe-3S] クラスターによる [NiFe] ヒドロゲナーゼの酸素耐性機構の構造基盤
SPRING-8 利用者情報誌 **17**、105-110 (2012)
- I-9. Y. Shomura and Y. Higuchi, Crystal structure of O₂-tolerant [NiFe] hydrogenase reveals the mechanism of O₂-tolerance. *SPRING-8 Research Frontier* **2011**, 5-6(2012)
- I-10. 庄村康人・樋口芳樹
膜結合型ヒドロゲナーゼの酸素耐性機構の解明
生物物理 **53**、82-85 (2012).
- I-11. Y. Shigeta, K. Kamiya, T. Baba, T. Matsui, M. Boero, N. Shibata, Y. Higuchi and S. Negoro
Computer-simulations Based Design of Nylonoligomer Hydrolase.
3rd Symposium on Enzymes & Biocatalysis (Xian China, 2012年4月26日) 招待講演
- I-12. 樋口芳樹・柴田直樹・根来誠司
微小重力環境下でのナイロン分解酵素の高品質結晶生成の実例と今後の取り組みについて

第12回日本蛋白質科学会年会（愛知、2012年6月22日）招待講演

- I-13. 庄村康人・尹 基石・西原宏史・樋口芳樹
酸素耐性 [NiFe] ヒドロゲナーゼの結晶構造解析
第12回日本蛋白質科学会年会（愛知、2012年6月22日）招待講演
- I-14. 庄村康人・尹 基石・西原宏史・樋口芳樹
[NiFe] ヒドロゲナーゼ成熟化因子 HypE、HypF のX線結晶構造解析
第49回日本生物物理学会年会（愛知、2012年9月24日）口頭発表
- I-15. Y. Higuchi, N. Shibata, K. Nagai, Y. Kawashima and S. Negoro
An attempt to solve the ultra-high resolution crystal structures of nylon-oligomer hydrolases using the crystals grown in space
14th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules
(Huntsville, USA, 2012年9月26日) ポスター発表
- I-16. 小森博文・片岡邦重・櫻井武・宮崎健太郎・樋口芳樹
X線照射によるマルチ銅活性中心の構造変化
平成24年度日本結晶学会年会（宮城、2012年10月26日）口頭発表
- I-17. 樋口芳樹
[NiFe] ヒドロゲナーゼの酸素耐性機構の解明—放射光 X線利用による精密構造化学
日本農芸化学会関西支部 第477回講演会（兵庫、2012年12月1日）招待講演
- I-18. Y. Shomura, Y. Higuchi
Crystal structures of the S-carbamoyl transferase HypF alone and in complex with its carbamoyl acceptor HypE
Asian Crystallographic Association (Adelaide, Australia, 2012年12月2-6日)ポスター発表
- I-19. Y. Higuchi
Structural Study of O₂-Tolerant [NiFe] Hydrogenase
The 2nd International Conference on MEXT Project of Integrated Research on Chemical Synthesis（愛知、2012年12月11日）招待講演
- I-20. 八木達彦・樋口芳樹
Catalytic cycle of cytochrome-c3 hydrogenase, a [NiFe]-hydrogenase
第85回日本生化学会大会（福岡、2012年12月14-15日）ポスター発表

II. 高等生物細胞のタンパク質間相互作用のX線構造生物学

- II-1. Y. Hayashi, S. Nagao, H. Osuka, H. Komori, Y. Higuchi, S. Hirota, Domain Swapping of the Heme and N-Terminal α -Helix in Hydrogenobacter thermophilus Cytochrome c552 Dimer. *Biochemistry* **51**, 8608-8616 (2012).
- II-2. S. Nagao, H. Osuka, T. Yamada, T. Uni, Y. Shomura, K. Imai, Y. Higuchi, S. Hirota, Structural and Oxygen Binding Properties of Dimeric Horse Myoglobin. *Dalton Transactions* **41**, 11378-11385 (2012).
- II-3. H. Komori, Y. Nitta, H. Ueno, Y. Higuchi, Structural Study Reveals Ser345 Determines Substrate Specificity on Human Histidine Decarboxylase. *J. Biol. Chem.* **287**, 29175-29183 (2012).
- II-4. H. Komori, Y. Nitta, H. Ueno, Y. Higuchi, Purification, Crystallization, and Preliminary X-ray Analysis of Human Histidine Decarboxylase. *Acta Crystallogr* **F68**, 675-677 (2012).

- II-5. 廣田俊・樋口芳樹
シトクロム c ポリマー：水溶性球状タンパク質に見出された多量化機構
日本結晶学会誌 **54**、270-275 (2012).
- II-6. 長尾聡・宇仁武史・山田卓矢・大須賀久織・庄村康人・今井清博・樋口芳樹・廣田俊ウマミオ
グロビン二量体の立体構造 および酸素結合特性
日本化学会第92春季年会（神奈川、2012年4月26日）招待講演
- II-7. S. Hirota, Y. Hattori, Z. Wang, S. Nagao, M. Taketa, H. Komori, H. Kamikubo, T. Matsuo, I. Takahashi, S. Negi, Y. Sugiura, M. Kataoka, Y. Higuchi
Polymerization and Peroxidase Activity Enhancement of Cytochrome c by Successive Domain Swapping at the C-Terminal Helix.
IEEE International Conference on Computational Photography (Seattle, USA, 2012年4月27日-29日) 口頭発表
- II-8. 林有吾・長尾聡・大須賀久織・小森博文・樋口芳樹・廣田俊
好熱菌由来シトクロム c-552 2量体の構造と熱安定性
第39回生体分子科学討論会（宮城、2012年6月8日）口頭発表
- II-9. 長尾聡・宇仁武史・山田卓矢・大須賀久織・庄村康人・今井清博・樋口芳樹・廣田俊
ドメインスワッピングによるミオグロビン二量体の形成
第39回生体分子科学討論会（宮城、2012年6月9日）口頭発表
- II-10. S. Hirota, Y. Hattori, Z. Wang, S. Nagao, M. Taketa, H. Komori, H. Kamikubo, T. Matsuo, I. Takahashi, S. Negi, Y. Sugiura, M. Kataoka, Y. Higuchi
International Conference on Porphyrins and Phthalocyanins (Pusan, Korea, 2012年7月2日) 招待講演
- II-11. 新田陽子・小森博文・樋口芳樹・植野洋志
ヒト由来ヒスチジンデカルボキシラーゼの基質特異性と触媒機構の研究
日本生物高分子学会2012年度年会（秋田、2012年9月21日）口頭発表
- II-12. 勝谷拓也・寺脇慎一・柴田直樹・山本英樹・Marc Fiedler・Mariann Bienz, 菊池 章・樋口芳樹
Wnt シグナル伝達経路で機能するDIX ドメインを介した相互作用の構造生物学
平成24年度日本結晶学会年会（宮城、2012年10月26日）ポスター発表
- II-13. H. Komori, Y. Nitta, H. Ueno, and Y. Higuchi
Structural basis for the histamine synthesis by human histidine decarboxylase
Asian Crystallographic Association (Adelaide, Australia, 2012年12月2-6日) ポスター発表

大学院理学研究科

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

勝谷拓也：Wnt シグナル伝達で機能する DIX ドメインの構造生物学

前 悠里：膜結合型[NiFe] ヒドロゲナーゼの結晶化

Mahfuza Akter：細胞の運動制御に関わるタンパク質の結晶学的研究

大川雄嗣：ヒドロゲナーゼ成熟化因子の結晶化

中川英恵 : NAD⁺還元型ヒドロゲナーゼの結晶解析
吉田早希 : プロトカドヘリンの精製と結晶化

科学研究費補助金等

1. 日本学術振興会科学研究費補助金（平成 24 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
2. 日本学術振興会科学研究費補助金（平成 24 年度）挑戦的萌芽研究 課題番号 24657077
研究課題 中性子結晶解析法によるヒドロゲナーゼの反応機構およびプロトン経路の解明
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 24 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
4. 日本学術振興会科学研究費補助金（平成 24 年度）新学術研究領域 課題番号 23121526
研究課題 Wnt 受容体共役タンパク質-細胞内 Wnt シグナル伝達因子複合体群の構造生物学
研究代表者 柴田直樹
5. 日本学術振興会科学研究費補助金（平成 24 年度）若手研究（B） 課題番号 22770110
研究課題 転写因子 TFIIF サブ複合体の構造解析
研究代表者 小森博文
6. 日本学術振興会研究費補助金（平成 24 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
7. 兵庫県立大学特別教育研究助成金（平成 24 年度）奨励研究
研究課題 水素分解酵素の酸素耐性に関する新規鉄硫黄クラスターの構築原理の解明
研究代表者 庄村康人
8. 日揮・実吉奨学会研究助成金（平成 24 年度）
研究課題 水素分解酵素の反応機構解明に向けた各中間状態の超精密立体構造解析
研究代表者 庄村康人
9. 独立行政法人科学技術振興機構（平成 24 年度 10 月 1 日から）CREST
研究課題 生物酵素による水素エネルギー利用システムの構造基盤解明
研究代表者 樋口芳樹
10. 独立行政法人科学技術振興機構（平成 24 年度 9 月末まで）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
11. 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24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