

## 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・廣本武史・柴田直樹・樋口芳樹  
Nishikawa, K., Hiromoto, T., 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、フラビント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 $\text{NAD}^+$ - $\text{NADH}$ 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 $\text{B}_{12}$ 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

柴田直樹・廣本武史・西川幸志・樋口芳樹  
Shibata, N., Hiromoto, T., Nishikawa, K., 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 $\beta$ -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。

## 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. T. Matsumoto, K. Yoshimoto, C. Zheng, Y. Shomura, Y. Higuchi, H. Nakai and S. Ogo  
Synthesis and Reactivity of a Water-soluble NiRu Monohydride Complex with a Tethered Pyridine Moiety  
*Chem. Lett.*, 45, 197-199 (2016)
- I-2. N. D. M. Noor, K. Nishikawa, H. Nishihara, K-S. Yoon, S. Ogo and Y. Higuchi  
Improved Purification, Crystallization and Crystallographic Study of Hyd-2 Type [NiFe]-hydrogenase from *Citrobacter* sp. S-77.  
*Acta Crystallogr.*, F72(1), 53-58 (2016)
- I-3. K. So, R. Hamamoto, R. Takeuchi, Y. Kitazumi, O. Shirai, R. Endo, H. Nishihara, Y. Higuchi and K. Kano  
Bioelectrochemical Analysis of Thermodynamics of the Catalytic Cycle and Kinetics of the Oxidative Inactivation of Oxygen-tolerant [NiFe]-hydrogenase.  
*J. Electroanal. Chem.*, 766, 152-161 (2016)
- I-4. M. Nakabayashi, N. Shibata, E. Ishido-Nakai, M. Kanagawa, Y. Iio, H. Komori, Y. Ueda, N. Nakagawa, S. Kuramitsu and Y. Higuchi  
Crystal Structure of a Hypothetical Protein, TTHA0829 from *Thermus thermophilus* HB8, Composed of Cystathionine- $\beta$ -synthase (CBS) and Aspartate-kinase Chorismate-mutase tyrA (ACT) Domains  
*Extremophiles*, 20(3), 275-282 (2016)
- I-5. K. So, Y. Kitazumi, O. Shirai, K. Nishikawa, Y. Higuchi and K. Kano  
Direct Electron Transfer-Type Dual Gas Diffusion H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> Biofuel Cells  
*J. Mat. Chem.*, 4, 8742-8749 (2016)
- I-6. H. Komori, K. Kataoka, S. Tanaka, N. Matsuda, Y. Higuchi and T. Sakurai  
Exogenous Acetate Ion Reaches the Type II Copper Centre in CueO Through the Water-Excretion Channel and Potentially Affects the Enzymatic Activity  
*Acta Crystallogr.*, F72, 558-563 (2016)
- I-7. H. Tai, L. Xu, S. Inoue, K. Nishikawa, Y. Higuchi and S. Hirota  
Photoactivation of the Ni-SIr State to the Ni-SIa State in [NiFe] Hydrogenase: FT-IR Study on the Light Reactivity of the Ready Ni-SIr State and As-isolated Enzyme Revisited  
*Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18 22025-22030 (2016)
- I-8. M. Akter, C. Inoue, H. Komori, N. Matsuda, T. Sakurai, K. Kataoka, Y. Higuchi and N. Shibata  
Biochemical, Spectroscopic and X-ray Structural Analysis of Deuterated Multicopper Oxidase CueO Prepared from a New Expression Construct for

Neutron Crystallography  
*Acta Crystallogr.*, F72, 788-794 (2016)

- I-9. H. Xia, K. So, Y. Kitazumi, O. Shirai, K. Nishikawa, Y. Higuchi and K. Kano  
Dual Gas-diffusion Membrane and Mediatorless Dihydrogen/Airbreathing Biofuel Cell Operating at Room Temperature  
*Journal of Power Sources*, 335, 105-112 (2016)
- I-10. H. Ogata, W. Lubitz and Y. Higuchi  
Structure and Function of [NiFe] Hydrogenases  
*J. Biochem. (Tokyo)*, 160(5), 251-258 (2016)
- I-11. S. Negoro, Y. Kawashima, N. Shibata, T. Kobayashi, T. Baba, Y-H. Lee, K. Kamiya, Y. Shigeta, K. Nagai, I. Takehara, D. Kato, M. Takeo and Y. Higuchi  
Mutations Affecting the Internal Equilibrium of the Reaction Catalyzed by 6-aminohexanoate-dimer Hydrolase  
*FEBS Lett.*, 590(18), 3133-3143 (2016)
- I-12. 廣田駿, 加納健司, 樋口芳樹  
ヒドロゲナーゼによる水素分解・合成機構および酵素燃料電池への応用  
*BIO INDUSTRY*, 33 No.1, 43-48 (2016) (シーエムシー出版)  
ISSN: 0910-6545, 2016年1月12日
- I-13. 小森博文, 片岡邦重, 樋口芳樹, 櫻井武  
マルチ銅酸化酵素の活性部位に見つかった酢酸イオンについて  
第16回日本蛋白質科学会年会 (福岡, 2016年6月7日) ポスター発表
- I-14. 太 虎林, 西川 幸志, 井上 誠也, 樋口 芳樹, 廣田 俊  
FT-IRとEPRを用いた[NiFe]ヒドロゲナーゼの新規中間体の特定と鉄硫黄クラスターによる反応制御機構の解明  
第16回日本蛋白質科学会年会 (福岡, 2016年6月7日) ポスター発表
- I-15. Y. Higuchi  
Structural and Biochemical Studies of Hyd-2 type [NiFe]-hydrogenase from *Citrobacter* sp. S-77 -Proposal of the General Mechanism of O<sub>2</sub>-tolerance of [NiFe]-hydrogenases  
Hydrogenase 2016 (Marseille, France, 2016年7月13日) 招待講演
- I-16. Y. Higuchi  
Structural Studies of [NiFe]-hydrogenases  
5-th International Symposium on Diffraction Structural Biology (Knoxville, USA, 2016年8月9日) 招待講演
- I-17. 樋口芳樹  
[NiFe]ヒドロゲナーゼの触媒反応機構の解明  
茨城県中性子利用促進研究会 (茨城, 2016年8月29日) 招待講演

- I-18. 許力揚, 太虎林, 井上誠也, 西川幸志, 樋口芳樹, 廣田俊  
[NiFe]ヒドロゲナーゼにおけるNi-SIr状態からNi-SIa状態への光活性化  
第10回バイオ関連化学シンポジウム2016 (石川, 2016年9月7日) ポスター発表
- I-19. 樋口芳樹  
水素エネルギー社会はいつ来るのか?  
第21期垂水文化講座 (兵庫, 2016年9月12日) 招待講演
- I-20. K. So, Y. Kitazumi, O. Shirai, K. Nishikawa, Y. Higuchi and K. Kano  
Dual Gas Diffusion H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> Biofuel Cell in Direct Electron Transfer-Type System  
PRiME2016/230th ECS Meeting (Honolulu, Hawaii, 2016年10月4日) ポスター発表
- I-21. Y. Higuchi  
Crystallographic Studies of [NiFe]-hydrogenases  
Swiss-Japanese Workshop 2016 -Hydrogen technology and energy storage (東京, 2016年10月6日) 招待講演
- I-22. ブイタンタン, 嶺重温, 窪田慎太郎, 樋口芳樹, 矢澤哲夫  
炭素コーティングによる電子伝導性多孔質ガラス電極の作製  
第57回ガラスおよびフォトニクス材料討論会 (京都, 2016年11月14日) ポスター発表
- I-23. 澤辺大嗣, 樋口芳樹, 庄村康人  
Fe(CN)<sub>2</sub>CO 錯体の生合成に関与するHypCD 複合体の二価金属結合型構造  
日本結晶学会平成28年度年会 (茨城, 2016年11月17-18日) ポスター発表
- I-24. 西川幸志, 樋口芳樹  
Ni desorption from the active site in the [NiFe] hydrogenase  
日本結晶学会平成28年度年会 (茨城, 2016年11月17-18日) ポスター発表
- I-25. 中島悠志, 竹田翠, 池田洋子, 庄村康人, 樋口芳樹  
NAD<sup>+</sup>還元型[NiFe]ヒドロゲナーゼ (水素活性型) の結晶学的研究  
日本結晶学会平成28年度年会 (茨城, 2016年11月17-18日) ポスター発表
- I-26. 柴田直樹, 末吉由依, 虎谷哲夫, 樋口芳樹  
ラジカル B12 酵素におけるアデノシルコバラミン活性化の構造基盤  
日本結晶学会平成28年度年会 (茨城, 2016年11月17-18日) ポスター発表
- I-27. H. Tai, L. Xu, S. Inoue, K. Nishikawa, Y. Higuchi and S. Hirota  
光照射を利用した硫酸還元菌由来[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性化機構のFT-IR研究  
第54回日本生物物理学会年会 (茨城, 2016年11月25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, M. Yamanaka, S. Nagao, H. Komori, Y. Higuchi and S. Hirota  
Domain Swapping Oligomerization of Thermostable *c*-type Cytochrome in *E. coli* Cells

*Scientific Report* Feb 3;6:19334. (2016)

- II-2. 宮本昂明, 栗林麻衣, 長尾聡, 庄村康人, 樋口芳樹, 廣田俊  
ドメインスワップしたシトクロムcb562 2量体が形成するZn-SO<sub>4</sub>クラスター内包タンパク質ナノケージの結晶構造  
第16回日本蛋白質科学会年会 (福岡, 2016年6月8日) ポスター発表
- II-3. S. Hirota, S. Nagao, Y. Hayashi, T. Miyamoto, C. Ren, M. Yamanaka, Y-W. Lia, H. Komori, Y. Shomura and Y. Higuchi  
Domain Swapping of *c*-Type Cytochromes and Myoglobin  
International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP)  
(Nanjing, China, 2016年7月3~9日) 招待講演
- II-4. 須田綾香, 小林紀, 長尾聡, 柴田直樹, 樋口芳樹, 廣田俊  
ミオグロビンのループ領域アミノ酸変異によるドメインスワップ二量体のデザイン  
第10回バイオ関連化学シンポジウム2016 (石川, 2016年9月7日) ポスター発表
- II-5. S. Terawaki, S. Fujita, T. Katsutani, K. Shiomi, K. Keino-Masu, M. Masu, K. Wakamatsu, N. Shibata and Y. Higuchi  
Structural Basis for Limitation of Ccd1 Activity by a Unique Homomeric Interaction in the Wnt Pathway  
The 42nd Naito Conference (北海道, 2016年10月5日) ポスター発表
- II-6. 樋澤芽依, 樋口芳樹, 庄村康人  
ジペプチド合成酵素RSp1486a のX線結晶構造解析  
日本結晶学会平成28年度年会 (茨城, 2016年11月17-18日) ポスター発表
- II-7. 寺脇慎一, 石渡拓也, 藤田翔平, 榎正幸, 樋口芳樹, 若松馨  
ゼブラフィッシュCcd1 DIXドメインの不活性型変異体のX線結晶構造解析  
日本結晶学会平成28年度年会 (茨城, 2016年11月17-18日) ポスター発表
- II-8. 山西勲平, 矢野晶子, 柴田直樹, 寺脇慎一, 樋口芳樹  
ホモ相互作用を強化した Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナル因子Dishevelled-DIXドメイン  
日本結晶学会平成28年度年会 (茨城, 2016年11月17-18日) ポスター発表
- II-9. 岡裏直也, 福本友貴恵, 柴田直樹, 大庭伸介, 山川晃, 鄭雄一, 樋口芳樹  
軟骨形成転写因子 Sox9 と DNA 複合体の結晶学的研究  
日本結晶学会平成28年度年会 (茨城, 2016年11月17-18日) ポスター発表
- II-10. 長尾聡, 須田綾香, 小林紀, 柴田直樹, 樋口芳樹, 廣田俊  
Formation of myoglobin dimers by domain swapping  
第54回日本生物物理学会年会 (茨城, 2016年11月27日) ポスター発表
- II-11. S. Hirota, S. Natao, M. Yamanaka and Y. Higuchi  
Cytochrome *c*: Domain Swapping, Self-Modification, and Molecular Recognition  
5th Symposium on Advanced Biological Inorganic Chemistry (Kolkata, India, 2017年1月7-11日) 招待講演

## 大学院理学研究科

博士後期課程

Mahfuza Akter : マルチ銅酵素の構造化学

博士前期課程

山西勲平 : DAX-DIX 複合体の構造生物学

岡裏直也 : 軟骨形成転写因子・Sox9 の構造生物学

中島悠志 : NAD<sup>+</sup>還元型[NiFe]ヒドロゲナーゼの X 線結晶解析

松浦滉明 : Spectroscopic and crystallographic studies on [NiFe]-hydrogenases

矢野晶子 : 高親和化 DIX ドメインの構造生物学

今西隆浩 : Structural and biochemical studies on Hyd-2 type [NiFe]-hydrogenase

## 科学研究費補助金等

1. 独立行政法人科学技術振興機構 (平成 24-29 年度) 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)
2. 日本学術振興会学術研究助成基金助成金 (平成 26-28 年度) 挑戦的萌芽研究 課題番号 26650051  
研究課題 : 二重特異性を有する分子認識機能性分子を利用した新規結晶化法の開発  
研究代表者 (柴田直樹)
3. 公益財団法人 ひょうご科学技術協会 学術研究助成 (平成 28 年度)  
研究課題 : 新規酸素安定性ヒドロゲナーゼの構造化学  
研究代表者 (西川幸志)