

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 NAD^+ - 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

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や増殖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。またこれに関連する転写因子として、軟骨形成に関わるSox9のDNA認識機構についても研究を行っている。

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. Y. Sugimoto, Y. Kitazumi, O. Shirai, K. Nishikawa, Y. Higuchi, M. Yamamoto, K. Kano
Electrostatic Roles in Electron Transfer from [NiFe] hydrogenase to Cytochrome c_3 from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F
Biochim. Biophys. Acta, **1865** (5), 481-487 (2017)
- I-2. H. Tai, L. Xu, K. Nishikawa, Y. Higuchi, S. Hirota
Equilibrium between Inactive Ready Ni-SIr and Active Ni-SIa States of [NiFe] Hydrogenase Studied by Utilizing Ni-SIr-to-Ni-SIa Photoactivation
Chem. Commun., **53**, 10444-10447 (2017)
- I-3. Y. Shomura, M. Taketa, H. Nakashima, H. Tai, H. Nakagawa, Y. Ikeda, M. Ishii, Y. Igarashi, H. Nishihara, K-S. Yoon, S. Ogo, S. Hirota, Y. Higuchi
Structural Basis of the Redox Switches in the NAD⁺-reducing Soluble [NiFe]-hydrogenase
Science, **357** (6354), 928-932 (2017)
- I-4. K. Nishikawa, S. Mochida, T. Hiromoto, N. Shibata, Y. Higuchi
Ni-elimination from the Active Site of the Standard [NiFe]-hydrogenase upon Oxidation by O₂
J. Inorg. Biochem., **177**, 435-437 (2017)
- I-5. T. Hiromoto, F. Meilleur, R. Shimizu, C. Shibasaki, M. Adachi, T. Tamada, R. Kuroki
Neutron structure of the T26H mutant of T4 phage lysozyme provides insight into the catalytic activity of the mutant enzyme and how it differs from that of wild type
Protein Sci., **26**, 1953-1963 (2017)
- I-6. 樋口芳樹
[NiFe]ヒドロゲナーゼの水素分子の触媒反応機構の解明
分子研研究会 (分子科学研究所, 愛知県, 岡崎市, 2017/6/14) 招待講演
- I-7. 太虎林, 許力揚, 西川幸志, 樋口芳樹, 廣田俊
[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性準備状態Ni-SIrと活性状態Ni-SIa間の酸塩基平衡機構の光照射を利用した研究
第17日本蛋白質科学会年会 (仙台国際センター, 宮城県, 仙台市, 2017/6/22)
ポスター発表
- I-8. 西川幸志, 持田理子, 植木美月, 樋口芳樹
硫酸還元菌由来[NiFe]ヒドロゲナーゼの酸化による活性中心の構造変化に関する研究
第44回生体分子科学討論会 (カレッジプラザ, 秋田県, 秋田市, 2017/6/23-24)

口頭発表

- I-9. 中川由佳, 西川幸志, 垣本敦子, 樋口芳樹, 小倉尚志
ラマン分光によるヒドロゲナーゼ活性測定法の開発
第44回生体分子科学討論会 (カレッジプラザ, 秋田県, 秋田市, 2017/6/23-24)
口頭発表
- I-10. 常盤恭樹, 庄司光男, 柴田直樹, 樋口芳樹, 片岡邦重, 重田育照, 美齊津文典
ビリルビンオキシダーゼの構造と酸化還元電位に関する理論的研究
第11回分子科学討論会 (東北大学, 宮城県, 仙台市, 2017/9/16) 口頭発表
- I-11. 窪田慎太郎, 山崎徹, 矢澤哲夫, 樋口芳樹
水素利用のためのヒドロゲナーゼの電極への応用
兵庫県立大学・知の交流シンポジウム, (神戸商工会議所, 兵庫県, 神戸市
2017/9/19) ポスター発表
- I-12. Hulin Tai, Liyang Xu, Koji Nishikawa, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota
Elucidation of the acid-base equilibrium mechanism between the ready Ni-SIr and active Ni-SIa states of [NiFe] hydrogenase
第55回日本生物物理学会年会 (熊本大学, 熊本県, 熊本市, 2017/9/20)
ポスター発表
- I-13. Takai Tokiwa, Mitsuo Shoji, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Kunishige Kataoka, Yasuteru Shigeta, Fuminori Misaizu
QM/MM Study on the T1 Cu site structures and the Redox Potentials in Bilirubin Oxidase (BOD)
CPMD2017 Workshop (EPOCHAL, Tsukuba, Ibaraki, 2017/10/18-20) ポスター発表
- I-14. 松浦滉明
Picobiology of hydrogenase
博士課程教育リーディングプログラムフォーラム2017 (名古屋マリオットアソシアホテル, 愛知県, 名古屋市, 2017/10/20-21) ポスター発表
- I-15. 今西隆浩
Structural study on hydrogenase for realization of hydrogen society
博士課程教育リーディングプログラムフォーラム2017 (名古屋マリオットアソシアホテル, 愛知県, 名古屋市, 2017/10/20-21) ポスター発表
- I-16. 松浦滉明, 西川幸志, 太虎林, Noor Dina Muhd Noor, 金在炫, 姜志梗, 舘野賢, 尹基石, 小江誠司, 廣田俊, 庄村康人, 樋口芳樹
Citrobacter sp. S-77株由来[NiFe]-ヒドロゲナーゼの構造化学的研究
日本結晶学会平成29年度年会 (JMSアステールプラザ, 広島県, 広島市, 2017/11/23-24) ポスター発表
- I-17. Hiroaki Matsuura, Lars Lauterbach, Koji Nishikawa, Takeshi Hiromoto, Ki-Seok Yoon, Seiji Ogo, Oliver Lenz, Yoshiki Higuchi
Heterologous Overexpression of S-77 Hydrogenase in *Ralstonia eutropha*
リーディング国際シンポジウム (兵庫県立先端科学技術支援センター, 兵庫県,

上郡町, 2017/12/4-5) ポスター発表

- I-18. Takahiro Imanishi, Koji Nishikawa, Yoshiki Higuchi
Crystallographic studies on tetrameric complex of Hyd-2 type [NiFe]-hydrogenase from *Citrobacter* sp. S-77
リーディング国際シンポジウム (兵庫県立先端科学技術支援センター, 兵庫県, 上郡町, 2017/12/4-5) ポスター発表
- I-19. Takeshi Hiromoto, Flora Meilleur, Rumi Shimizu, Chie Shibazaki, Motoyasu Adachi, Taro Tamada, Ryota Kuroki
Neutron structure analysis of the T26H mutant of T4 phage lysozyme
リーディング国際シンポジウム (兵庫県立先端科学技術支援センター, 兵庫県, 上郡町, 2017/12/4-5) ポスター発表
- I-20. Hulin Tai, Liyang Xu, Koji Nishikawa, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota
Elucidation of the activation/inactivation mechanism between the Ni-SIr and Ni-SIa states of [NiFe] hydrogenase utilizing Ni-SIr-to-Ni-SIa photoactivation
The Second International Symposium on Biofunctional Chemistry (Kihada Hall, Kyoto University, 京都府, 京都市, 2017/12/14-18) ポスター発表
- I-21. Takai Tokiwa, Mitsuo Shoji, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Kunishige Kataoka, Yasuteru Shigeta, Fuminori Misaizu
A Theoretical Study on T1Cu Site in Bilirubin Oxidase (BOD):Relation between Structural Changes and Redox Potentials
Sanibel Symposium 2018 (Gainesville, FL, USA, 2018/2/20) ポスター発表
- I-22. 常盤恭樹、庄司光男、柴田直樹、樋口芳樹、片岡邦重、重田育照、美齊津文典
QM/MM法によるビリルビンオキシダーゼにおける構造変化と酸化還元電位に関する理論的研究
第7回日本生物物理学会関東支部会 (東京大学駒場キャンパス, 東京都, 2018/3/13-14) 口頭発表
- I-23. Hiroaki Matsuura, Lars Lauterbach, Koji Nishikawa, Takeshi Hiromoto, Ki-Seok Yoon, Seiji Ogo, Oliver Lenz, Yoshiki Higuchi
Construction of the expression system of S77Hyd2 in *Ralstonia eutropha*
The Final Evaluation Conference of the Leading Program, University of Hyogo (県立先端科学技術支援センター, 兵庫県, 上郡町, 2018/3/12-13) ポスター発表
- I-24. Takahiro Imanishi, Koji Nishikawa, Yoshiki Higuchi
Crystallographic studies on tetrameric complex of Hyd-2 type [NiFe]-hydrogenase from *Citrobacter* sp. S-77
The Final Evaluation Conference of the Leading Program, University of Hyogo (県立先端科学技術支援センター, 兵庫県, 上郡町, 2018/3/12-13) ポスター発表
- I-25. Katsuhiro Higuchi, Koji Nishikawa, Yoshiki Higuchi

Crystallization of [NiFe]-hydrogenase from *Citrobacter* sp. S-77 for a High Resolution Crystal Structure Analysis

The Final Evaluation Conference of the Leading Program, University of Hyogo (県立先端科学技術支援センター, 兵庫県, 上郡町, 2018/3/12-13)
ポスター発表

- I-26. Yuka Nakagawa, Koji Nishikawa, Satoru Nakashima, Yoshiki Higuchi, Takashi Ogura

Development of Raman spectroscopic measurement system for analyzing the reaction mechanism catalyzed by Hydrogenase

The Final Evaluation Conference of the Leading Program, University of Hyogo (県立先端科学技術支援センター, 兵庫県, 上郡町, 2018/3/12-13)
ポスター発表

- I-27. Takeshi Hiromoto, Flora Meilleur, Rumi Shimizu, Chie Shibasaki, Motoyasu Adachi, Taro Tamada, Ryota Kuroki

Neutron structure analysis of the T26H mutant of T4 phage lysozyme

The Final Evaluation Conference of the Leading Program, University of Hyogo (県立先端科学技術支援センター, 兵庫県, 上郡町, 2018/3/12-13)
ポスター発表

- I-28. Hulin Tai, Liyang Xu, Koji Nishikawa, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, Elucidation of the Activation/Inactivation Mechanism between the Inactive Ni-SIr and Active Ni-SIa States of [NiFe] Hydrogenase

日本化学会第98回春季年会 (日本大学理工学, 千葉県, 船橋市, 2018/3/20)
口頭発表

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. M. Yamanaka, M. Hoshizumi, S. Nagao, R. Nakayama, N. Shibata, Y. Higuchi, S. Hirota

Formation and Carbon Monoxide-dependent Dissociation of *Allochromatium vinosum* Cytochrome *c'* Oligomers Using Domain-swapped Dimers
Protein Science, **26**(3), 464-474 (2017)

- II-2. M. Zhang, T. Nakanishi, M. Yamanaka, S. Nagao, S. Yanagisawa, Y. Shomura, N. Shibata, T. Ogura, Y. Higuchi, S. Hirota

Rational Design of Domain-Swapping-Based c-Type Cytochrome Heterodimers by Using Chimeric Proteins
ChemBioChem, **18**, 1-5 (2017)

- II-3. S. Terawaki, S. Fujita, T. Katsutani, K. Shiomi, K. Keino-Masu, M. Masu, K. Wakamatsu, N. Shibata, Y. Higuchi

Structural Basis for Ccd1 Autoinhibition in the Wnt Pathway through Homomerization of the DIX Domain
Scientific Reports, **7**(1), 7739 (2017)

- II-4. Masaru Yamanaka, Ryoko Nakayama, Satoshi Nagao, Makoto Hoshizumi, Naoki

- Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota
 CO-Dependent Control of Oligomer Association/Dissociation Using Domain-Swapped Dimers of Cytochrome c
 第17回日本蛋白質科学会年会 (仙台国際センター, 宮城県, 仙台市, 2017/6/23)
 ポスター発表
- II-5. 小田祥也, 上田一凱, 山中優, 長尾聡, 柴田直樹, 樋口芳樹, 廣田俊
 シトクロム c555 をベースに設計した人工タンパク質を用いたナノ構造体構築
 第11回バイオ関連化学シンポジウム (東京大学農学部, 東京都, 2017/9/8)
 ポスター発表
- II-6. 山中優, 中山諒子, 長尾聡, 柴田直樹, 樋口芳樹, 廣田俊
 シトクロム c' ドメインスワップ2量体を用いたCO依存的な多量体形成・解離
 日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017年度合同大阪大会 (大阪府立大学, 大阪府, 堺市, 2017/9/21) 口頭発表
- II-7. 中込蒼一郎, 藤田祥平, ザムザリナ ビンティ タリブディン, 梶正幸, 樋口芳樹, 若松馨, 寺脇慎一
 Wnt シグナル伝達を制御する動的ヘテロオリゴマーのX線結晶構造解析
 日本結晶学会平成29年度年会 (JMS アステールプラ, 広島県, 広島市, 2017/11/23-24) ポスター発表
- II-8. Kumpei Yamanishi, Naoki Shibata, Marc Fiedler, Mariann Bienz, Yoshiki Higuchi
 Direct interaction via DIX domain is necessary and sufficient for recruiting Axin by Dishevelled upon Wnt/ β -catenin signaling
 Wnt 研究会 (神戸大学医学部 神緑会館多目的ホール, 兵庫県, 神戸市, 2017/12/10) 口頭発表
- II-9. Shun Hirota, Satoshi Nagao, Masaru Yamanaka, Yoshiki Higuchi
 Construction of heme protein oligomers by 3D domain swapping
 The second International Symposium on Biofunctional Chemistry (Kihada Hall, Kyoto University, 京都府, 京都市, 2017/12/14-18) 招待講演
- II-10. Masaru Yamanaka, Ikki Ueda, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota
 Construction of a Supramolecule with an Artificial Protein Based on Cytochrome c555
 日本化学会第98回春季年会 (日本大学理工学部, 千葉県, 船橋市, 2018/3/20)
 口頭発表
- II-11. Satoshi Nagao, Ayaka Suda, Hisashi Kobayashi, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota
 Design and Properties of Domain-swapped Myoglobin Dimer
 日本化学会第98回春季年会 (日本大学理工学部, 千葉県, 船橋市, 2018/3/20)
 口頭発表

大学院生命理学研究科

ピコバイオロジー専攻

山西勲平： DAX-DIX 複合体の構造生物学

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

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

生命科学専攻

博士前期課程

柴田大樹： 軟骨形成に関わる転写因子 Sox9 の構造解析

樋口雄大： S-77 ヒドロゲナーゼの高分解能結晶解析

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. 一般財団法人 蛋白質研究奨励会 金子・成田研究奨励金（平成 29 年度）
研究課題：[NiFe]ヒドロゲナーゼの触媒機能解明を目指した中性子結晶構造解析
研究代表者（西川幸志）
3. 公立大学法人兵庫県立大学 平成 29 年度特別研究助成金
研究課題：膜結合型[NiFe]ヒドロゲナーゼの組換え体調製とその構造解析
研究代表者（廣本武史）