

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つつある。また、これらのタンパク質についての中性子結晶解析のための予備実験を開始した。さらにバクテリアの翻訳システムの制御に関わる酵素の構造生物学を進めている。

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、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・外敵に应答してそれに対応、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開始した。

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を進めている。

発表論文 List of Publications

- I-1 Y. Tanaka, S. Saito, S. Mori, N. Aratani, H. Shinokubo, N. Shibata, Y. Higuchi, Z. S. Yoon, K. S. Kim, S. B. Noh, J. K. Park, D. Kim and A. Osuka
Metalation of Expanded Porphyrins: A Chemical Trigger Used To Produce Molecular Twisting and Möbius Aromaticity
Angew. Chem. Int. Ed., 47, 681-684 (2008).
- I-2 T. Chatake, Y. Higuchi, N. Mizuno, I. Tanaka, N. Niimura and Y. Morimoto
Hydrogen Bonds of DsrD Protein Revealed by Neutron Crystallography
J. Synchrotron Rad., 15, 277-280 (2008).
- I-3 Y. Ueda, N. Shibata, D. Takeuchi, M. Kitamura and Y. Higuchi
Crystallization and Preliminary X-ray Crystallographic Study of Flavoredoxin from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F
Acta crystallogr., F64, 851-853 (2008).
- I-4 B. Kure, T. Matsumoto, K. Ichikawa, S. Fukuzumi, Y. Higuchi, T. Yagi and S. Ogo
pH-Dependent Isotope Exchange and Hydrogenation Catalysed by Water-soluble NiRu Complexes as Functional Models for [NiFe] hydrogenases
Dalton Trans., 4747 - 4755 (2008).
- I-5 Y. Takayama, N. D. Werbeck, H. Komori, K. Morita, K. Ozawa, Y. Higuchi, and H. Akutsu
Strategic Roles of Axial Histidines in Structure Formation and Redox Regulation of Tetraheme Cytochrome c_3
Biochemistry, 47 (36), 9405-9415 (2008).
- I-6 M. Kitamura, N. Shibata, Y. Ueda, D. Takeuchi and Y. Higuchi
Structural Studies on Flavoredoxin from *Desulfovibrio vulgaris*(Miyazaki F).
16th Symposium on Flavins and Flavoproteins 2008 (Spain, 2008年6月4日) ポスター発表
- I-7 N. Shibata, M. S. Taketa, T. Ohki, K. Yasuhira, Y. Kawashima, S. Negoro, A. Nakagawa, K. Inaka, H. Tanaka, M. Sato, T. Kobayashi, T. Tanaka and Y. Higuchi
Challenge to ultra-high resolution structure analysis of nylon oligomer hydrolase using the crystals grown in space,
12th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules (ICCBM-12) (Cuncun, 2008年5月2日) 口頭発表
- I-8 K. Tomoyori, N. Niimura, T. Sakurai, K. Kataoka, S. Kurose, Y. Higuchi, H. Komori and T. Kajino,
Crystal growth of multicopper oxidase CueO $\Delta \alpha 5-7$ mutant,
XXI Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2008) (Osaka, 2008年8月24-25日) ポスター発表
- I-9 H. Komori and Y. Higuchi
Crystallographic analysis of response regulator protein from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough,
XXI Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2008) (Osaka, 2008年8月24-25日) ポスター発表
- I-10 Y. Shomura, A. Bracher, F-U. Hartl and Y. Higuchi,
Crystal structure of the full length Hsp110 molecular chaperone in the nucleotide-free state,
XXI Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2008) (Osaka, 2008年8月26-27日) ポスター発表
- I-11 N. Shibata, T. Schwarz-Romond, M. Fiedler, P. J. G. Butler, H. Komori, Y. Shomura, H. Yamamoto, A. Kikuchi, M. Bienz and Y. Higuchi,

- Structural basis of dynamic polymerization of DIX domains: A revised model of Wnt signaling,
XXI Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2008) (Osaka, 2008年8月26-27日) ポスター発表
- I-12 K. Nishikawa, Y. Shomura, S. Kawasaki, Y. Sakai, Y. Niimura, S. Terawaki, H. Komori, N. Shibata and Y. Higuchi
Structural study of H₂O₂ reductase, rubperoxin,
XXI Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2008) (Osaka, 2008年8月26-27日) ポスター発表
- I-13 K. Kihira, S. Numata, M. Kitamura, S. Terawaki, Y. Shomura, H. Komori, N. Shibata and Y. Higuchi,
The crystal structure analysis of release factor 3 from sulfate-reducing bacterium,
XXI Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2008) (Osaka, 2008年8月26-27日) ポスター発表
- I-14 Y. Higuchi, M. S. Taketa, T. Ohki, K. Yasuhira, Y. Kawashima, M. Takeo, D. Kato, S. Negoro, A. Nakagawa, K. Inaka, H. Tanaka, M. Sato, T. Kobayashi, T. Tanaka and N. Shibata
Evolution of nylon-oligomer degrading enzyme based on high resolution crystal structure analysis,
XXI Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2008) (Osaka, 2008年8月28-29日) ポスター発表
- I-15 鈴木義規・南川卓也・大貫敏彦・竹田 翠・樋口芳樹・辻村清也・白井 理・加納健司
荷電ポリマー修飾電極上におけるcytochrome c₃の酸化還元挙動とU(VI)の還元
第54回ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会(熊本、2008年11月22日) ポスター発表
- I-16 田仲広明・伊中浩治・佐藤 勝・朴 三用・樋口芳樹・中川敦史・小林智之・田中哲夫
高品質結晶によるタンパク質の超精密構造解析を目指した ISS 応用利用研究拠点の取組
日本マイクログラビティ応用学会第23回学術講演会(京都、2008年11月25日) 口頭発表
- I-17 H. Osuka, S. Terawaki, Y. Shomura, H. Komori, N. Shibata, S. Hirota and Y. Higuchi
FT-IR study of the active site of [NiFe] hydrogenase.
日本生物物理学会第46回年会(福岡、2008年12月4日) ポスター発表
- I-18 N. Shibata, Y. Tamagaki, H. Komori, Y. Shomura, N. Hieda, K. Akita, K. Mori, T. Toraya, N. Yasuoka and Y. Higuchi
Crystal structure analysis of ethanolamine ammonia-lyase.
日本生物物理学会第46回年会(福岡、2008年12月4日) ポスター発表
- I-19 N. Shibata, N. Hieda, K. Akita, K. Mori, T. Toraya and Y. Higuchi
Crystal structure of coenzyme B₁₂-dependent ethanolamine ammonia-lyase
International Symposium on Chemistry of Reductases (名古屋, 2009年1月15-16日) ポスター発表
- I-20 H. Komori, K. Kataoka, Y. Ueki, Y. Konno, Y. Kamitaka, S. Kurose, S. Tsujimura, K. Kano, D. Seo, T. Sakurai and Y. Higuchi
X-ray crystallographic analysis of Multicopper Oxidase CueO mutants
International Symposium on Chemistry of Reductases (名古屋、2009年1月15-16日) ポスター発表
- I-21 Y. Shomura and Y. Higuchi
Structural Studies on Dissimilatory Sulfite Reductase
International Symposium on Chemistry of Reductases (名古屋、2009年1月15-16日) ポスター発表
- I-22 M. Taketa, B. Kure, S. Ogo and Y. Higuchi

- Purification and characterization of ATP-sulfurylase from sulfate-reducing bacteria
International Symposium on Chemistry of Reductases (名古屋、2009年1月15-16日)
ポスター発表
- I-23 T. Nagao, K. Nishikawa, M. Taketa, H. Komori, H. Kobayashi and Y. Higuchi
Ultra-High Resolution X-ray Crystallography of Tetraheme Cytochrome c_3
International Symposium on Chemistry of Reductases (名古屋、2009年1月15-16日)
ポスター発表
- I-24 H. Osuka, S. Hirota and Y. Higuchi
FT-IR study on [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki
International Symposium on Chemistry of Reductases (名古屋、2009年1月15-16日)
ポスター発表
- I-25 庄村康人
[NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化因子の構造生物学的研究
第4回プロテオミクス講演会(岡崎、2009年1月31日) 招待講演
- I-26 樋口芳樹
酵素の進化：構造と活性
第34回生命の起源および進化学会学術講演会シンポジウム(立体構造からみたタンパク質の進化)(京都大学原子炉実験所、2009年3月18日) 招待講演
- II-1 K. Kihira, S. Numata, M. Kitamura, J. Kondo, S. Terawaki, Y. Shomura, H. Komori, N. Shibata and Y. Higuchi
Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of a Class II Release Factor RF3 from a Sulfate-reducing Bacterium
Acta crystallogr., **F64**, 622-624 (2008).
- II-2 S. Terawaki, K. Kitano and T. Hakoshima
Crystallographic characterization of the membrane-targeting domains of the Rac-specific guanine nucleotide-exchange factors Tiam1 and Tiam2
Acta crystallogr., **F64**, 1039-1042 (2008).
- II-3 S. Terawaki, K. Kitano, M. Aoyama and T. Hakoshima
Crystallographic characterization of the radixin FERM domain bound to the cytoplasmic tail of membrane-type1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)
Acta crystallogr., **F64**, 911-913 (2008).
- II-4 樋口芳樹
Wnt/ β -catenin シグナル伝達系で働く DIX ドメインの構造と機能
第62回日本癌学会学術総会シンポジウム(タンパク質構造から理論創薬を目指して)(名古屋、2008年10月30日) 招待講演
- II-5 樋口芳樹・柴田直樹・菊池 章・フィドラー=マーク・ビエンツ=マリアン
DIXドメインの構造と機能
第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会シンポジウム(シグナル伝達におけるタンパク質間相互作用の機能構造研究の新展開)(神戸、2008年12月11日)
招待講演
- II-6 寺脇慎一・北野 健・箱嶋敏雄
グアニンスクレオチド交換因子 Tiam2 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31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会シンポジウム(神戸、2008年12月11日) 一般口頭発表およびポスター発表

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
木平清人 : 硫酸還元菌の翻訳終結因子 (RF3) の構造生物学的研究
西川幸志 : Rubperoxin の構造化学的研究

博士前期課程

- 加藤 仁 : 16 ヘムタンパク質の構造化学的研究
藤本真緒 : CO 感受性転写活性化因子の構造化学
矢野孝明 : DIX ドメインの構造化学的研究
吉本健人 : [NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化因子の X 線解析

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 20 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 20 年度) 若手研究 B 課題番号 19770091
研究課題 Axin のリコマー化を決定する因子の構造基盤と β -カテニン分解活性との相関
研究代表者 柴田直樹
- 3 文部科学省科学研究費補助金 (平成 20 年度) 若手研究 B 課題番号 18770093
研究課題 一酸化炭素センサーとして働く転写制御ヘムタンパク質の構造解析
研究代表者 小森博文
- 4 文部科学省科学研究費補助金 (平成 20 年度) 若手研究 B 課題番号 18770094
研究課題 タンパク質の高次構造形成に重要な分子システムの研究—Hsp110の分子機構の
解明
研究代表者 庄村康人
- 5 文部科学省科学研究費補助金 (平成 20 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
- 6 財団法人ひょうご科学技術協会 (平成 20 年度) 奨励研究助成
研究課題 新規ユビキチン結合ドメインを持つ Doa1 タンパク質の X 線結晶構造解析
研究代表者 小森博文
- 7 兵庫県立大学特別教育研究助成金 (平成 20 年度) 奨励研究
研究課題 Wnt シグナルの活性化を制御する Dvl-Axin 複合体の構造生物学研究
研究代表者 寺脇慎一
- 8 独立行政法人科学技術振興機構 (平成 20 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
- 9 宇宙航空研究開発機構・国際宇宙ステーション応用利用研究拠点推進制度 (平成 20 年度)
研究課題 サブオンゲストロームレベルの構造解析・機能解析技術の確立
研究代表者 樋口芳樹