

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

庄村康人・小森博文・柴田直樹・樋口芳樹

S., 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 $\text{NAD}^+ - \text{NADH}$ 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、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

庄村康人・小森博文・柴田直樹・樋口芳樹

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应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-1 N. Shibata, Y. Higuchi and T. Toraya How Coenzyme B12-dependent Ethanolamine Ammonialyase Deals with Both Enantiomers of 2-Amino-1-propanol as Substrates: Structure-based Rationalization.
Biochemistry, **50**, 591-598 (2011)
- I-2 T. Baba, K. Kamiya, T. Matsui, N. Shibata, Y. Higuchi, T. Kobayashi, S. Negoro and Y. Shigeta
Molecular Dynamics Studies on Mutational Structures of a Nylon-6 Byproduct-degrading Enzyme.
Chem. Phys. Lett., **507**, 157-161 (2011)
- I-3 S. Terawaki, K. Yano, T. Katsutani, K. Shiomi, K. Keino-Masu, M. Masu, Y. Shomura, H. Komori, N. Shibata and Y. Higuchi
Crystallographic Characterization of the DIX Domain of the Wnt Signalling Positive Regulator Ccd1.
Acta Crystallogr., **F67**, 758-761 (2011)
- I-4 Y. Shomura, K. Hagiya, K. Yoon, H. Nishihara, and Y. Higuchi
Crystallization and Preliminary X-ray Diffraction Analysis of Membrane-bound Respiratory [NiFe] Hydrogenase from *Hydrogenovibrio marinus*.
Acta Crystallogr., **F67**, 827-829 (2011)
- I-5 K. Yasuhira, N. Shibata, Y. Tanaka, N. Kumagai, Y. Tanaka, K. Nagai, D. Kato, M. Takeo, S. Negoro and Y. Higuchi
Crystallization and X-ray diffraction analysis of nylon oligomer hydrolase (NylC) from *Agromyces* sp. KY5R.
Acta Crystallogr., **F67**, 892-895 (2011)
- I-6 Y. Takayama, M. Taketa-Sato, H. Komori, K. Morita, Su-Jin Kang, Y. Higuchi, and H. Akutsu
Role of π - Electron Systems in Stabilization of the Oxidized Tetraheme Architecture in Cytochrome c_3
Bull. Chem. Soc. Jpn. **Vol. 84, No. 10**, 1096-1101 (2011)
- I-7 Y. Shomura, K. Yoon, H. Nishihara, and Y. Higuchi
Structural Basis for a [4Fe-3S] Cluster in the Oxygen-tolerant Membrane-bound [NiFe]-hydrogenase.
Nature, **479**, 253-257 (2011)
- I-8 廣田 俊・上田真理子・長尾 聡・大須賀久織・小森博文・上久保裕生・片岡幹雄・樋口芳樹：ウマシトクロム *c* および緑膿菌シトクロム *cs51* の多量体形成、第38回生体分子科学討論会（つくば、2011年6月23日）口頭発表
- I-9 N. Shibata, T. Inoue, Y. Higuchi, Y. Kai
Primer design for cDNA synthesis based on the crystal structure
XXII Congress and General Assembly of International Union of Crystallography
(Spain, 2011年8月27日) ポスター発表

- I-10 K. Kihira, Y. Shimizu, Y. Shomura, M. Kitamura, T. Tsukihara, T. Ueda, K. Ochi, Y. Higuchi
Crystal structure analysis of release factor 3
XXII Congress and General Assembly of International Union of Crystallography
(Spain, 2011年8月28日) 口頭発表
- I-11 林 有吾・上田真理子・大須賀久織・長尾 聡・小森博文・樋口芳樹・廣田 俊：シトクロム c552 の多量体生成と二量体構造、第5 回バイオ関連化学シンポジウム（つくば、2011年9月14日）口頭発表
- I-12 Y. Shomura, K-S. Yoon, H. Nishihara, Y. Higuchi
Structural study of the O₂-tolerant [NiFe] hydrogenase
第49回日本生物物理学会年会（姫路、2011年9月17日）口頭発表
- I-13 H. Komori, K. Kataoka, Y. Higuchi, T. Sakurai
High-Resolution X-Ray Crystal Structure Analysis of a Multicopper Oxidase, CueO and Structure Change in the Trinuclear Copper Center by Hydrated Electron
錯体化学会 第61 回討論会（岡山、2011年9月18日）ポスター発表
- I-14 小森博文・片岡邦重・櫻井 武・宮崎健太郎・樋口芳樹：マルチ銅酸化酵素の構造解析、第84回 日本生化学会大会（京都、2011年9月23日）ポスター発表
- I-15 樋口芳樹：ゼータサイザーでタンパク質のオリゴマー化を解析する、日本結晶学会年会（北海道、2011年11月24日）ランチョンセミナー
- I-16 木平清人・清水義宏・庄村康人・柴田直樹・北村昌也・中川敦史・月原富武・上田卓也・越智幸三・樋口芳樹：翻訳終結因子 RF3 の X 線結晶解析、日本結晶学会年会（北海道、2011年11月24日）ポスター発表
- I-17 柴田直樹・井上 豪・武隈秀子・武隈真一・吉田善一・樋口芳樹・甲斐 泰：結晶構造に基づくトキイロヒラタケ由来色素タンパク質の遺伝子クローニング、日本結晶学会年会（北海道、2011年11月24日）ポスター発表
- I-18 樋口芳樹：酸素耐性膜結合型[NiFe]ヒドロゲナーゼのX線結晶構造解析 –水素エネルギー利用に向けた基礎科学的研究–、関西サイエンスフォーラム（大阪、2011年11月29日）招待講演
- I-19 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91春期年会（東京、2011年3月25日）口頭発表
- I-20 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 c552 二量体の構造と安定性、日本化学会第91春期年会（東京、2011年3月25日）口頭発表
- II-1 J. Kondo, H. Shibata, S. Miura, A. Yamakawa, K. Sato, Y. Higuchi, C. Shukunami, and Y. Hiraki
A Functional Role of the Glycosylated N-terminal Domain of Chondromodulin-I
J. Bone Miner. Metab., **29**, 23-30(2011).
- II-2 M. Michishita, A. Morimoto, T. Ishii, H. Komori, Y. Shiomi, Y. Higuchi and

H. Nishitani

Positively Charged Domain Located Downstream of PIP Box, Together with TD Amino Acids within PIP Box, is Important for CRL4^{Cdt2}-mediated Proteolysis. *Genes to Cells*, **16**, 12-22 (2011).

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

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：[NiFe] ヒドロゲナーゼ・シトクロム c3 複合体の構造化学

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 23 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
- 2 日本学術振興会科学研究費補助金（平成 23 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
- 3 日本学術振興会科学研究費補助金（平成 23 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
- 4 日本学術振興会科学研究費補助金（平成 23 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
- 5 日本学術振興会科学研究費補助金（平成 23 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
- 6 日本学術振興会科学研究費補助金（平成 23 年度）若手研究（B） 課題番号 22770110
研究課題 転写因子 TFIIH 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 23 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 23 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 独立行政法人科学技術振興機構（平成 23 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
- 10 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23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