

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・柴田直樹・樋口芳樹

Nishikawa, K., Shomura, 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 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、フェレドキシニン-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・柴田直樹・樋口芳樹

Nishikawa, K., Shomura, 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. H. Osuka, Y. Shomura, H. Komori, N. Shibata, S. Nagao, Y. Higuchi, S. Hirota
Photosensitivity of the Ni-A State of [NiFe] Hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris*
Miyazaki F with Visible Light
Biochem. Biophys. Res. Commun., **430**, 284-288, (2013)
- I-2. T. Yagi and Y. Higuchi
Studies on Hydrogenase
Proc. Jpn. Acad., Ser. B **89**, 16-33 (2013)
- I-3. H. Komori, T. Kajikawa, K. Kataoka, Y. Higuchi and T. Sakurai
Crystal Structure of the CueO Mutants at Glu506, the Key Amino Acid Located in the Proton
Transfer Pathway for Dioxygen Reduction
Biochem. Biophys. Res. Commun., **438**, 686-690 (2013)
- I-4. K. Nagai, K. Yasuhira, Y. Tanaka, D. Kato, M. Takeo, Y. Higuchi, S. Negoro and N. Shibata
Crystallization and X-ray Diffraction Analysis of Nylon Hydrolase (NylC) from
Arthrobacter sp. KI72.
Acta Cryst. F, **69**, 1151-1154 (2013).
- I-5. Y. Shomura, Y. Higuchi
Structural Aspects of [NiFe]-hydrogenases.
Reviews in Inorganic Chemistry **33**, 173-192 (2013).
- I-6. P. P. Parui, M. S. Deshpande, S. Nagao, H. Kamikubo., H. Komori, Y. Higuchi, M. Kataoka
and S. Hirota
Formation of Oligomeric Cytochrome *c* during Folding by Intermolecular Hydrophobic
Interaction between N- and C-Terminal α -Helices
Biochemistry, **52(48)**, 8732-8744 (2013).
- I-7. C. He, K. Nishikawa, Ö. F. Erdem, E. Reijerse, H. Ogata, W. Lubitz, M. Knipp
Complexes of Ferriheme Nitrophorin 4 with Low-molecular Weight Thiol(ate)s Occurring
in Blood Plasma
J. Inorg. Biochem. **122**, 38-48 (2013)
- I-8. A. Nakamura, T. Ishida, S. Fushinobu, K. Kusaka, I. Tanaka, K. Inaka, Y. Higuchi, M.
Masaki, K. Ohta, S. Kaneko, N. Niimura, K. Igarashi and M. Samajima
Phase-diagram-guided method for growth of a large crystal of glycoside hydrolase family
45 inverting cellulase suitable for neutron structural analysis
J. Synchrotron Rad., **20**, 859-863 (2013).
- I-9. 根来誠司・永井圭介・大島祥平・飯田一希・加藤太一郎・武尾正弘・持地広造・柴田直樹・
樋口芳樹
立体構造を基盤としたナイロン加水分解酵素の開発と耐熱化機構
酵素工学ニュース, **69**, 12-18
- 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
(2013)

- I-11. 樋口芳樹
ヒドロゲナーゼ
光合成のエネルギー利用と環境応用, 33-42 (2014) 三宅淳, 佐々健監修 (CMC出版)
- I-12. 庄村康人・樋口芳樹
ヒドロゲナーゼの酸素による不活性化およびその耐性機構
CSJカレントレビュー15, 次世代のバイオ水素エネルギー開発, 80-85 (2014), 日本化学会編
(化学同人)
- I-13. Y. Higuchi and Y. Shomura
Reaction Mechanism of *S*-Carbamoylation of HypE by HypF in the Maturation of
[NiFe]-hydrogenase
10th International Hydrogenase Conference (ハンガリー・Szeged, 2013年7月9日) 基調講演
- I-14. 角田早・山口晴正・蔡徳七・平野義明・鈴木雅之・樋口芳樹・松本卓也
AFM によるシトクロムc3分子の電気伝導測定
第 74 回応用物理学会 (京都, 2013年9月16日) ポスター発表
- I-15. 山口晴正・角田早・蔡徳七・平野義明・鈴木雅之・樋口芳樹・松本卓也
シトクロムc3ネットワークの電気特性
第 74 回応用物理学会 (京都, 2013年9月16日) ポスター発表
- I-16. 山口晴正・角田早・蔡徳七・平野義明・鈴木雅之・樋口芳樹・松本卓也
シトクロムc3ネットワークの電気特性
第7回分子科学討論会 (京都, 2013年9月24日~27日) 口頭発表
- I-17. 角田早・山口晴正・蔡徳七・平野義明・鈴木雅之・樋口芳樹・松本卓也
AFMによるシトクロムc3分子の電気伝導測定
第7回分子科学討論会 (京都, 2013年9月24日~27日) 口頭発表
- I-18. 中川英恵・竹田翠・庄村康人・樋口芳樹
水素-化学エネルギー変換・ヒドロゲナーゼの構造化学
兵庫県立大学シンポジウム (神戸, 2013年9月24日) ポスター発表
- I-19. 大川雄嗣・樋口芳樹・庄村康人
水素分解酵素の成熟化機構の解明
兵庫県立大学シンポジウム (神戸, 2013年9月24日) ポスター発表
- I-20. 中村彰彦・石田卓也・伊中浩治・樋口芳樹・伏信進矢・五十嵐圭日子・鮫島正浩
糖質加水分解酵素ファミリー45に属する担子菌由来エンドグルカナーゼの構造・機能解析
日本応用糖質科学会平成 25 年度大会 (第 62 回) (鹿児島, 2013 年 9 月 25~27 日) 口頭発表
- I-21. 中川英恵・竹田翠・土生川真央・木平清人・柴田直樹・西原宏史・尹基石,
小江誠司・石井正治・五十嵐泰夫・庄村康人・樋口芳樹
NAD⁺還元型ヒドロゲナーゼの結晶学的研究
平成25年度日本結晶学会年会 (熊本, 2013年10月12~13日) ポスター発表
- I-22. 大川雄嗣, 樋口芳樹, 庄村康人
[NiFe]-ヒドロゲナーゼ成熟化タンパク質HypAの結晶化
平成25年度日本結晶学会 (熊本, 2013年10月12~13日) ポスター発表

- I-23. M. Akter, H. Komori, N. Shibata, Y. Shomura, T. Sakurai, K. Kataoka, Y. Higuchi
Preparation of Single Crystals of Multi-copper Oxidases Suitable for Neutron
Diffraction
平成25年度日本結晶学会（熊本，2013年10月12～13日）ポスター発表
- I-24. Y. Higuchi, K.-S. Yoon, H. Nishihara and Y. Shomura
X-ray Structural Study of O₂-tolerant [NiFe] hydrogenase
International Conference on Bio/Mimetic Solar Energy Conversion (iSEC) 2013,
（大阪，2013年11月23日）招待講演
- I-25. H. Ogata, K. Nishikawa, W. Lubitz
Observation of the Hydride Bridge in the Ni-Fe Active Site of [NiFe]-hydrogenase by
High Resolution Crystallographic Analysis
Fifth Joint BER II and BESSY II User Meeting (Berlin, Germany, 2013年12月4～6日)ポ
スター発表
- I-26. M. Akter, H. Komori, N. Shibata, T. Sakurai, K. Kataoka, Y. Higuchi
Crystallization of Single Crystals of Multi-Copper Oxidases for Neutron Diffraction
Experiment
第1回ピコバイロジ研究所国際シンポジウム（兵庫，2014年1月7日～8日）
ポスター発表
- I-27. Y. Okawa, Y. Higuchi, and Y. Shomura
Crystallization of [NiFe]-hydrogenase Maturation Protein Complex HypA-HypB
第1回ピコバイロジ研究所国際シンポジウム（兵庫，2014年1月7日～8日）
ポスター発表
- I-28. H. Nakagawa, M. Taketa, M. Habukawa, K. Kihira, N. Shibata, H. Nishihara,
K.-S. Yoon, S. Ogo, Ma. Ishii, Y. Igarashi, Y. Shomura and Y. Higuchi
Purification and Crystallization of NAD⁺-reducing [NiFe]-hydrogenase
第1回ピコバイロジ研究所国際シンポジウム（兵庫，2014年1月7日～8日）
ポスター発表
- I-29. 庄村康人
[NiFe]ヒドロゲナーゼのX線結晶構造解析
第27回日本放射光学会年会放射光科学合同シンポジウム（広島，2014年1月11～13日）招待講
演
- I-30. 庄村康人・西川幸志・井上誠也・玉田太郎・樋口 芳樹
結晶構造解析による水素分解酵素の反応機構解明に向けた試み
蛋白質研究所セミナー「結晶構造を併用したハイブリッド構造研究の最前線」（大阪，2014
年2月7-8日）口頭発表
- I-31. 樋口芳樹
水素社会の展望と課題
兵庫県立大学 次世代水素触媒共同研究センター キックオフシンポジウム（姫路，2013年3
月25日）パネルディスカッションパネリスト
- I-32. 太虎林・竹田翠・庄村康人・西川幸志・鈴木雅之・樋口芳樹・廣田俊
H. thermoluteolus TH-1由来NAD⁺還元ヒドロゲナーゼの分光学研究
日本化学会第94春季年会（名古屋，2013年3月29日）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. Y. Nitta, H. Kikuzaki, T. Azuma, Y. Ye, M. Sakaue, Y. Higuchi, H. Komori, H. Ueno
Inhibitory Activity of *Filipendula ulmaria* Constituents on Recombinant Human Histidine Decarboxylase
Food. Chem., **138**, 1551-1556, (2013)
- II-2. Y. Hayashi, S. Nagao, H. Osuka, H. Komori, Y. Higuchi, and S. Hirota
Domain Swapping of the Heme and N-Terminal α -Helix in *Hydrogenobacter thermophilus* Cytochrome- c_{552} Dimer
The 27th Annual Symposium of The Protein Society (米国・Boston, 2013年7月20~22日) ポスター発表
- II-3. N. Shibata, T. Katsutani, S. Terawaki, H. Yamamoto, A. Kikuchi and Y. Higuchi
Structure of the Native Axin-DIX domain Crystallized without Mercury Compound.
7th International Conference on Structural Genomics 2013 (札幌, 2013年7月29日~8月1日) ポスター発表
- II-4. 小森博文・新田陽子・植野洋志・樋口芳樹
 α フルオロメチルヒスチジンによるヒスタミン合成酵素の阻害機構の解明
第86回日本生化学大会 (横浜, 2013年9月11日~13日) 口頭発表
- II-5. 山中優・長尾聡・羽田正雄・小森博文・樋口芳樹・廣田俊
超好熱菌由来シトクロム c の多量化と二量体構造
第7回バイオ関連シンポジウム (日本化学会) (豊田, 2013年9月27日) 口頭発表
- II-6. 勝谷拓也・柴田直樹・寺脇慎一・山本英樹・菊池章・樋口芳樹
水銀化合物非存在下での野生型 Axin DIX-ドメイン
平成25年度日本結晶学会 (熊本, 2013年10月12~13日) ポスター発表
- II-7. 吉田早希・平林敬浩・八木健・庄村康人・樋口芳樹
細胞接着分子プロトカドヘリン細胞外領域の結晶化
平成25年度日本結晶学会 (熊本, 2013年10月12~13日) ポスター発表
- II-8. 小森博文・新田陽子・植野洋志・樋口芳樹
ヒスタミン合成酵素の構造解析
平成25年度日本結晶学会 (熊本, 2013年10月12) 口頭発表
- II-9. M. S. Deshpande, P. P. Parui, M. Yamanaka, S. Nagao, H. Kamikubo, M. Kataoka, H. Komori, Y. Higuchi and S. Hirota
Formation of Domain-Swapped Oligomeric Cytochrome c from Its Molten Globule State
第51回日本生物物理学会年会 (京都, 2013年10月28日~30日)
- II-10. S. Hirota, S. Nagao, Y. Hayashi, Z. Wang, A. D. Nugraheni and Y. Higuchi
Polymerization and Oligomerization of Cytochrome c and Myoglobin by Domain Swapping
12th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (中国・広州, 2013年12月3~6日) 招待講演
- II-11. S. Yoshida, T. Hirabayashi, T. Yagi, Y. Shomura and Y. Higuchi
Crystallization of Extracellular Domains of Protocadherin, a Neural Cell Adhesion Protein
第1回ピコバイロジ研究所国際シンポジウム (兵庫, 2014年1月7日~8日)

ポスター発表

- II-12. 寺脇慎一・大塚寛貴・樋口芳樹・若松馨
逆行性輸送因子による積荷認識の構造的基盤
第29回PFシンポジウム（つくば，2014年3月15～16日）口頭発表
- II-13. 山中優・長尾聡・小森博文・樋口芳樹・廣田俊
超好熱菌由来シトクロム*c*のドメインスワッピング
日本化学会第94春季年会（名古屋，2013年3月30日）口頭発表
- II-14. 林有吾・長尾聡・山中優・小森博文・樋口芳樹・廣田俊
大腸菌膜との相互作用によるシトクロム*c*の多量化
日本化学会第94春季年会（名古屋，2013年3月30日）口頭発表

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
Noor Dina Binti Muhd Noor [NiFe]ヒドロゲナーゼの構造化学的研究

博士前期課程

- 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 25-27 年度）基盤研究（B） 課題番号 26291038
研究課題 [Ni]ヒドロゲナーゼの酸素耐性機構の解明
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 24-25 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 25 年度）新学術研究領域 課題番号 25121731
研究課題 DIX ドメインをコアとする Wnt シグナル伝達系複合体群の構造生物学
研究代表者 柴田直樹
4. 日本学術振興会学術研究助成基金助成金（平成 25-27 年度）基盤研究（C） 課題番号 25440034
研究課題 真核生物細胞質における鉄硫黄クラスター合成マシーナリーの構造生物学
研究代表者 庄村康人
5. 日本学術振興会科学研究費補助金（平成 25-26 年度）新学術領域研究 課題番号 25107522
研究課題 水素合成触媒としての応用を視野に入れたヒドロゲナーゼの構造・技術基盤の確立
研究代表者 庄村康人
6. 日揮・実吉奨学会研究助成金（平成 25 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
7. 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
8. 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25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