

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反応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。

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. Komori, R. Sugiyama, K. Kataoka, K. Miyazaki, Y. Higuchi and T. Sakurai
New Insights into the Catalytic Active Site Structure of Multicopper Oxidase
Acta crystallogr., **D70**, 772-779 (2014)
- I-2 T. Noji, M. Kondo, T. Jin, T. Yazawa, H. Osuka, Y. Higuchi, M. Nango, S. Itoh and T. Dewa
Light-Driven Hydrogen Production by Hydrogenases and a Ru-Complex inside a Nanoporous Glass Plate under Aerobic External Conditions
J. Phys. Chem. Lett., **5 (14)**, 2402-2407 (2014)
- I-3 K. So, Y. Kitazumi, O. Shirai, K. Kurita, H. Nishihara, Y. Higuchi, K. Kano
Gas-diffusion and Direct Electron Transfer-type Bioanode for Hydrogen Oxidation with Oxygen-tolerant [NiFe]-hydrogenase as an Electrocatalyst
Chemistry Lett., **43**, 1575-1577 (2014)
- I-4 T. Yagi, S. Ogo and Y. Higuchi
Catalytic Cycle of Cytochrome-*c*₃ Hydrogenase, a [NiFe]-enzyme, Deduced from the Structures of the Enzyme and the Enzyme Mimic.
Int. J. Hydrogen. Energy, **39 (32)**, 18543-18550 (2014)
- I-5 K. So, Y. Kitazumi, O. Shirai, K. Kurita, H. Nishihara, Y. Higuchi, and K. Kano
Kinetic Analysis of Inactivation and Enzyme Reaction of Oxygen-tolerant [NiFe]-hydrogenase at Direct Electron Transfer-type Bioanode
Bull. Chem. Soc. Jpn., **87**, 1177-1185 (2014)
- I-6 H. Tai, K. Nishikawa, M. Suzuki, Y. Higuchi, and S. Hirota
Control of Transition between Ni-C and Ni-SI_a States in Catalytic Cycle of [NiFe] Hydrogenase by Redox State of its Proximal Fe-S Cluster
Angew. Chem. Int. Ed., **53**, 13817-13820 (2014)
- I-7 Noor Dina Muhd Noor, Koji Nishikawa, Ki-Seok Yoon, Seiji Ogo, Yoshiki Higuchi
Structural chemistry of oxygen tolerant [NiFe]-hydrogenase from *Citrobacter*
EMTECH-University of Hyogo Joint Colloquium 2014 (Putra, Malaysia, 2014年5月26日)
口頭発表
- I-8 樋口芳樹
ヒドロゲナーゼの構造・機能・進化
第41回 生体分子科学討論会 (福岡, 2014年6月6日) 招待講演
- I-9 小森博文・片岡邦重・樋口芳樹・櫻井武
マルチ銅酸化酵素Cue0の構造解析
第55回日本生化学会中国四国支部例会 (松山, 2014年6月7日) 口頭発表
- I-10 太虎林・西川幸志・鈴木雅之・樋口芳樹・廣田俊
硫酸還元菌由来 [NiFe]ヒドロゲナーゼの光反応性の分光学的研究
第14回日本蛋白質科学会年会 (横浜, 2014年6月26日) ポスター発表
- I-11 Yoshiki Higuchi
X-Ray Structural Studies of [NiFe]-Hydrogenases
International Conference of Catalytic Systems for Chemical Energy Conversion (Germany, 2014年7月24日) 招待講演
- I-12. 太虎林・西川幸志・樋口芳樹・廣田俊
[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性化サイクルにおける新規中間体の特定
第8回分子科学討論会 (東広島, 2014年9月23日) 口頭発表
- I-13 角田早・蔡徳七・鈴木雅之・樋口芳樹・松本卓也
SAM 修飾電極を用いたシトクロム *c*₃ 単分子の電気伝導測定
第8回分子科学討論会 (東広島, 2014年9月24日) ポスター発表
- I-14 Noor Dina Muhd Noor, Koji Nishikawa, Ki-Seok Yoon, Seiji Ogo, Yoshiki Higuchi
Towards structural determination of oxygen-stable [NiFe]-hydrogenase from *Citrobacter*

S-77

2nd International Picobiology Institute Symposium (上郡, 2014年10月9日) ポスター発表

- I-15 Noor Dina Muhd Noor, Koji Nishikawa, Ki-Seok Yoon, Seiji Ogo,
Structural chemistry of oxygen tolerant [NiFe]-hydrogenase from *Citrobacter* S-77
日本結晶学会2014年度年会 (東京, 2014年11月1日~3日) ポスター発表
- I-16 井上誠也・西川幸志・玉田太郎・黒木良太・樋口芳樹
中性子結晶構造解析に向けた巨大単結晶の調製~相図を用いたアプローチ~
日本結晶学会2014年度年会 (東京, 2014年11月1日~3日) ポスター発表
- I-17 西川幸志・緒方英明・樋口芳樹・Wolfgang Lubitz
Observation of a hydride bridge in [NiFe] hydrogenase
日本結晶学会2014年度年会 (東京, 2014年11月1日~3日) ポスター発表
- I-18 小森博文・片岡邦重・樋口芳樹・櫻井武
マルチ銅酸化酵素Cue0の酸素還元におけるE506の役割
日本結晶学会2014年度年会 (東京, 2014年11月1日~3日) ポスター発表
- I-19 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近傍の酸性アミノ酸の役割
2014年日本化学会中国四国支部大会 (山口, 2014年11月9日) ポスター発表
- I-20 窪田慎太郎・東間清和・山崎徹・矢澤哲夫・安川智之・水谷文雄・樋口芳樹
ヒドロゲナーゼの性質の電気化学的解析と修飾用電極の探索
ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会 (京都, 2014年11月16日) ポスター発表
- I-21 Yoshiki Higuchi
Structure, function and evolution of [NiFe]-Hydrogenases
iCARP2014 (The International Conference on Artificial Photosynthesis) (淡路, 2014年11月27日) 招待講演
- I-22 Yasuhito Shomura
Development of the heterologous expression system of the group IV [NiFe]-hydrogenase
iCARP2015 (The International Conference on Artificial Photosynthesis) (淡路, 2014年11月27日) ポスター発表
- I-23 庄村康人
Ni-Fe型水素分解酵素の構造化学的研究
異分野融合若手研究者Science & Technologyクラブ (姫路, 2015年1月26日) 招待講演
- I-24 Yasuhito Shomura
X-ray structure analysis of the [NiFe]-hydrogenase from *Citrobacter* sp. S-77
I2CNER International Workshop 2015, (福岡, 2015年2月4日) 招待講演
- I-25 樋口芳樹
ヒドロゲナーゼの水素原子を見る
宇宙科学研究拠点形成プログラムキックオフ会議 (東京, 2015年3月5日) 招待講演
- I-26 西川幸志
[NiFe] ヒドロゲナーゼ活性部位におけるヒドリドの同定
大阪大学蛋白研究所セミナー (大阪, 2015年3月5日) 招待講演
- I-27 樋口芳樹
ヒドロゲナーゼの反応水素が見えるか?
日本物理学会 第70回年次大会 (東京, 2015年3月21日) 招待講演
- I-28 都築誠二・樋口芳樹・佐藤直樹
Ab initio分子軌道法による結晶中のTetrakis(methyltelluro)tetra-thiafulvalene (TTeC1-TTF) の分子間相互作用の解析
日本化学会第95春季年会 (船橋, 2015年3月26日) 口頭発表
- I-29 太虎林・西川幸志・井上誠也・樋口芳樹・廣田俊
鉄硫黄クラスターの酸化還元状態による[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性サイクル制御
日本化学会第95春季年会 (船橋, 2015年3月27日) 口頭発表

- I-30 宋慶盛・西原宏史・樋口芳樹・北隅優希・白井理・加納健司
ヒドロゲナーゼの酸化的不活性化—速度論的解析に基づく回避戦略—
日本農芸化学会2015年度大会（岡山，2015年3月28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 S. Terawaki, H. Ootsuka, Y. Higuchi and K. Wakamatsu
Crystallographic Characterization of C-terminal Coiled-coil Region of Mouse Bicaudal-D1 (BICD1)
Acta Crystallogr. **F70**, 1103-116 (2014)
- II-2 M. S. Deshpande, P. P. Parui, H. Kamikubo, M. Yamanaka, S. Nagao, H. Komori, M. Kataoka, Y. Higuchi, and S. Hirota
Formation of Domain-Swapped Oligomer of Cytochrome c from Its Molten Globule State Oligomer
Biochemistry, **53 (28)**, 4696-703 (2014)
- II-3 Y.-W. Lin, S. Nagao, M. Zhang, Y. Shomura, Y. Higuchi, and S. Hirota
Rational Design of Heterodimeric Protein Using Domain Swapping for Myoglobin
Angew. Chem. Int. Ed., **54** 511-515 (2014)
- II-4 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14回日本蛋白質科学会年会（横浜，2014年6月25日）ポスター発表
- II-5 Hirofumi Komori, Yoko Nitta, Hiroshi Ueno and Yoshiki Higuchi
Structural basis for the histamine synthesis by human histidine decarboxylase
23rd Congress and General Assembly of The International Union of Crystallography (IUCr2014) (Montreal, Canada, 2014年8月7日) ポスター発表
- II-6 宮本昂明・栗林麻衣・長尾聡・庄村康人・樋口芳樹・廣田俊
シトクロムcb562の多量化と二量体構造
第8回バイオ関連化学シンポジウム（岡山，2014年9月12日）ポスター発表
- II-7 林有吾・中山璃子・長尾聡・山中優・小森博文・樋口芳樹・廣田俊
生理的条件下でのシトクロムc 多量体形成
第8回バイオ関連化学シンポジウム（岡山，2014年9月12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X線結晶構造解析
日本生物高分子学会2014年度大会（長野，2014年9月13日）口頭発表
- II-9 小森博文・新田陽子・植野洋志・樋口芳樹
ヒスチジン脱炭酸反応における触媒ループの役割
第87回日本生化学会大会（京都，2014年10月16日）ポスター発表
- II-10 柴田直樹・矢野晶子・山西勲平・西川幸志・庄村康人・樋口芳樹
Trigger Factor を利用したLRP6 細胞内ドメインの結晶化
日本結晶学会2014年度年会（東京，2014年11月1～3日）ポスター発表
- II-11 寺脇慎一・大塚寛貴・樋口芳樹・若松馨
逆行性輸送因子 BICD1 のC末端コイルドコイル領域のX線結晶構造解析
日本結晶学会2014年度年会（東京，2014年11月1～3日）ポスター発表
- II-12 Hirofumi Komori, Yoko Nitta, Hiroshi Ueno, Yoshiki Higuchi
Structural analysis of human histidine decarboxylase
日本-イタリアシンポジウム(持続可能社会構築のための酵素と微生物の科学と工学に関する新潮流) (奈良，2014年11月5～7日) ポスター発表
- II-13 藤田祥平・寺脇慎一・塩見健輔・榊和子・榊正幸・若松馨・柴田直樹・樋口芳樹
ゼブラフィッシュ CCD1 DIXドメインのX線結晶解析
第3回物構研サイエンスフェスタ（つくば，2015年3月17～18日）ポスター発表
- II-14 Yugo Hayashi, Satoshi Nagao, Masaru Yamanaka, Hirofumi Komori, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota
Formation of domain-swapped oligomer of *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome cb552

- in an expression system
日本化学会第95春季年会（船橋，2015年3月26日）口頭発表
- II-15 Satoshi Nagao, Ying-wu Lin, Haruto Ishikawa, Takuya Yamada, Mohan Zhang, Yasuhito Shomura, Yasuhisa Izutani, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota
Design and Properties of Domain-swapped Dimeric Myoglobin
日本化学会第95春季年会（船橋，2015年3月26日）口頭発表
- II-16 Takaaki Miyamoto, Mai Kuribayashi, Satoshi Nagao, Yasuhito Shomura, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota
Crystal structure and function of a domain-swapped cytochrome cb562 dimer
日本化学会第95春季年会（船橋，2015年3月28日）口頭発表

大学院理学研究科

博士前期課程

- 山西勲平：DAX-DIX 複合体の構造生物学
井上誠也：[NiFe]-ヒドロゲナーゼの中性子構造化学
高木 涼：SUMO 化 Axin-DIX の構造生物学
松本卓樹：Fe-S タンパク質成熟化因子の構造化学

博士後期課程

- Mahfuza Akter：マルチ銅酵素の構造化学
Noor Dina Binti Muhd Noor：酸素安定性[NiFe]-ヒドロゲナーゼの構造化学

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 [NiFe]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
- 3 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
- 4 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
- 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 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
- 6 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
- 7 公益財団法人ひょうご科学技術協会学術研究助成金（平成 26 年度）
研究課題 Wnt シグナル伝達系因子の SUMO 修飾に関する構造生物学
研究代表者 柴田直樹