

## 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 $\text{NAD}^+$ - $\text{NADH}$ 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 $\text{B}_{12}$ 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

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 $\beta$ -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-1 K. Koketsu, K. Moriwaki, Y. Shomura, M. Hayashi, S. Mitsuhashi, R. Hara, K. Kino and Y. Higuchi  
Refined Regio- and Stereoselective Hydroxylation of L-Pipecolic Acid by the Engineered L-Proline-cis-4-Hydroxylase  
Synthetic Biology, 4 (4), 383-392 (2015)
- I-2 H. Tai, K. Nishikawa, S. Inoue, Y. Higuchi and S. Hirota  
FT-IR Characterization of the Light-Induced Ni-L2 and Ni-L3 States of [NiFe] Hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F  
J. Phys. Chem. B 119 (43), 13668-13674 (2015)
- I-3 H. Komori, K. Inaka, N. Furubayashi, M. Honda and Y. Higuchi  
Crystallization and Preliminary X-ray Diffraction Analysis of FAD-dependent Glucose Dehydrogenase  
Acta Crystallogr. F71, 1017-1019 (2015)
- I-4 A. Nakamura, T. Ishida, K. Kusaka, T. Yamada, S. Fushinobu, I. Tanaka, S. Kaneko, K. Ohta, H. Tanaka, K. Inaka, Y. Higuchi, N. Niimura, M. Samejima and K. Igarashi  
"Newton's Cradle" Proton Relay with Amide-imidic Acid Tautomerization in Inverting Cellulase Visualized by Neutron Crystallography  
Science Advances, Aug; 1(7): e1500263 (2015)
- I-5 H. Yamaguchi, D.-C. Che, Y. Hirano, M. Suzuki, Y. Higuchi, and T. Matsumoto  
Nanoscale Charge Transport in Cytochrome  $c_3$ /DNA Network: Comparative Studies between Redox-active Molecules  
Jap. J. of App. Physics 54, 095201-(1-4) (2015)
- I-6 H. Komori and Y. Higuchi  
Structural Insights into the  $O_2$  Reduction Mechanism of Multicopper Oxidase  
J. Biochem. (Tokyo) 158(4), 293-298 (2015)
- I-7 N. Shibata and T. Toraya  
Molecular architectures and functions of radical enzymes and their (re)activating proteins  
J. Biochem. (Tokyo) 158(4), 271-292 (2015)
- I-8 太虎林・西川幸志・井上誠也・樋口芳樹・廣田 俊  
[NiFe]ヒドロゲナーゼの光照射で生じるNi-L状態の分光学的研究  
第42回生体分子科学討論会 (群馬, 2015年6月12日~13日) ポスター発表
- I-9 樋口芳樹  
水素を新しいエネルギー源とする新領域の構築  
第16回 フェロー研究報告会 (愛知, 2015年6月22日) 招待講演
- I-10 樋口芳樹  
ヒドロゲナーゼの水素活性化反応機構とプロトン移動  
平成27年度前期物性研究所短期研究会 機能物性融合科学シリーズ(3)「反応と輸送」  
(東京, 2015年6月25日) 招待講演
- I-11 Hulin Tai, Koji Nishikawa, Seiya Inoue, Masayuki Suzuki, Yoshiki Higuchi and Shun Hirota  
Control of the Transition between Ni-C and Ni-SIa States in the Catalytic Cycle of [NiFe] Hydrogenase by the Redox State of the Proximal Fe-S Cluster  
17th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (Beijing, China, 2015年7月20日~24日) ポスター発表
- I-12 Hisashi Nakashima, Midori Taketa, Hanae Nakagawa, Mao Habukawa, Naoki Shibata, Yasuhito Shomura, Yoshiki Higuchi  
Preparation of the crystals of NAD<sup>+</sup>-reducing [NiFe] hydrogenase in the reduced form  
Student exchange program between College of Natural Sciences in Dong-A University and School of Science in University of Hyogo  
(兵庫, 2015年8月22日) ポスター発表

- I-13 ブイタンタン・橋野廉・嶺重温・窪田慎太郎・樋口芳樹・山崎徹・矢澤哲夫  
電子伝導性多孔質ガラス電極の作製  
公益社団法人日本セラミック協会第28回秋季シンポジウム（富山，2015年9月16～18日）  
ポスター発表
- I-14 樋口芳樹  
Structural chemistry of hydrogenase by diffraction method  
錯体化学討論会（奈良，2015年9月21日）招待講演
- I-15 小森博文・伊中浩治・古林直樹・本田通済・樋口芳樹  
DFAD/FAD依存型グルコース脱水素酵の結晶化 依存型グルコース脱水素酵の結晶化  
日本結晶学会2015年度年会（大阪，2015年10月17～18日）ポスター発表
- I-16 Hiroaki Matsuura, Hulin Tai, Koji Nishikawa, Ki-Seok Yoon, Seiji Ogo, Shun Hirota, Yoshiki Higuchi  
EPR spectroscopic studies of highly O<sub>2</sub>-stable [NiFe]-hydrogenase from *Citrobacter* sp. S-77  
University of Hyogo (UH) - EMTECH, Universiti Putra Malaysia (UPM) 2nd Joint Symposium  
（兵庫，2015年10月22日～23日）ポスター発表
- I-17 西川幸志  
[NiFe]ヒドロゲナーゼ活性部位における水素の同定  
兵庫県立大学大学院 生命理学研究科 リーディングプログラム主催 第1回 研究発表会  
（兵庫，2015年11月5日）招待講演
- I-18 樋口芳樹  
水素酸化還元酵素・[NiFe]-ヒドロゲナーゼの総合的構造化学を目指して  
東京大学放射光連携研究機構 10周年記念講演会（東京，2015年11月13日）招待講演
- I-19 窪田慎太郎・Buithanh Tan・山崎徹・矢澤哲夫，樋口芳樹  
ヒドロゲナーゼの修飾用電極の評価と反応活性の解析  
第61回ポラログラフイーおよび電気化学分析化学討論会（兵庫，2015年11月24日）  
ポスター発表
- I-20 庄村康人・Noor Dina Binti Muhd Noor・西川幸志・樋口芳樹  
ヒドロゲナーゼがもつ鉄硫黄クラスターの構造的多様性  
第87回日本生化学会大会（兵庫，2015年12月1日）口頭発表
- I-21 松本卓樹・樋口芳樹・庄村康人  
Crystal structure analysis of the Fe-S protein maturation factor Cia1  
第87回日本生化学会大会（兵庫，2015年12月1日）ポスター発表
- I-22 小森博文・新田陽子・植野洋志・樋口芳樹  
Crystallographic analysis of FAD-dependent glucose dehydrogenase from *Aspergillus terreus*  
第87回日本生化学会大会（兵庫，2015年12月1日）ポスター発表
- I-23 樋口芳樹  
ヒドロゲナーゼの総合化学  
Cat-on-Cat symposium in Himeji 2015（兵庫，2015年12月10日）招待講演
- I-24 樋口芳樹  
中性子結晶解析法を用いて酵素における水素分解の反応機構解明にせまる  
茨城大学大学院理工学研究科 ミニシンポジウム（茨城，2016年2月22日）招待講演
- I-25 西川幸志  
[NiFe]ヒドロゲナーゼ活性中心における水素種の同定  
甲南大学統合ニューロバイオロジー研究所セミナー（兵庫，2016年3月29日）招待講演
- II-1 S. Nagao, M. Ueda, H. Osuka, H. Komori, H. Kamikubo, M. Kataoka, Y. Higuchi and S. Hirota  
Domain-swapped Dimer of *Pseudomonas aeruginosa* Cytochrome *c*-551: Structural Insights into Domain Swapping of Cytochrome *c* Family Proteins  
PLoS One, 10(4): e0123653 (2015)
- II-2 S. Terawaki, A. Yoshikan, Y. Higuchi, K. Wakamatsu

- Structural Basis for Cargo Binding and Autoinhibition of Bicaudal-D1 by a Parallel Coiled-coil with Homotypic Registry  
 Biochem. Biophys. Res. Commun. 460(2), 451-456 (2015)
- II-3 C. Ren, S. Nagao, M. Yamanaka, H. Komori, Y. Shomura, Y. Higuchi and S. Hirota  
 Oligomerization Enhancement and Two Domain Swapping Mode Detection for Thermostable Cytochrome *c*-552 via the Elongation of the Major Hinge Loop  
 Mol. Biosyst. 11(12), 218-221 (2015)
- II-4 T. Miyamoto, M. Kuribayashi, S. Nagao, Y. Shomura, Y. Higuchi, and S. Hirota  
 Domain-swapped Cytochrome *cb*<sub>562</sub> Dimer and Its Nanocage Encapsulating a Zn-SO<sub>4</sub> Cluster in the Internal Cavity  
 Chem. Sci. 6, 7336-7342 (2015)
- II-5 Satoshi Nagao, Masaru Yamanaka, Ying-Wu LI, Megha Subhash Deshpande, Hirofumi Komori, Yasuhito Shomura, Yoshiki Higuchi, and Shun Hirota  
 Construction of Oligomers of Cytochrome *c* and Myoglobin Using Domain Swapping  
 第25回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2015) (長崎, 2015年5月30~31日) 口頭発表
- II-6 Takaaki Miyamoto, Mai Kuribayashi, Satoshi Nagao, Yasuhito Shomura, Yoshiki Higuchi and Shun Hirota  
 Structure and Property of Domain-swapped Cytochrome *cb*<sub>562</sub>  
 第25回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2015) (長崎, 2015年5月30~31日) ポスター発表
- II-7 林有吾・山中優・長尾聡・小森博文・樋口芳樹・廣田俊  
 大腸菌内での*c*型シトクロムのドメインスワッピング  
 第42回生体分子科学討論会 (群馬, 2015年6月12日~13日) 口頭発表
- II-8 Shun Hirota, Satoshi Nagao, Masaru Yamanaka, Hirofumi Komori, Yasuhito Shomura and Yoshiki Higuchi  
 Domain Swapping of *c*-type Cytochromes and Myoglobin  
 Metals in Biology in Wako (埼玉, 2015年6月15日~16日) ポスター発表
- II-9 Akiko Yano, Naoki Shibata, Kumpei Yamanishi, and Yoshiki Higuchi  
 Protein expression, purification, and X-ray crystallography of intracellular part of Wnt coreceptor LRP6  
 Student exchange program between College of Natural Sciences in Dong-A University and School of Science in University of Hyogo (兵庫, 2015年8月22日) ポスター発表
- II-10 Kumpei Yamanishi, Takuya Katsutani, Naoki Shibata, Koji Nishikawa, Yasuhito Shomura, Shin-ichi Terawaki, Hideki Yamamoto, Akira Kikuchi, and Yoshiki Higuchi  
 Structure of the native Axin-DIX domain crystallized without mercury compound  
 Student exchange program between College of Natural Sciences in Dong-A University and School of Science in University of Hyogo (兵庫, 2015年8月22日) ポスター発表
- II-11 Naoya Okaura, Yukie Fukumoto, Naoki Shibata, Shinsuke Ohba, Akira Yamakawa, Ung-il Chung/Yuichi Tei and Yoshiki Higuchi  
 Protein expression and purification of a key transcription factor Sox9 involved in skeletogenesis  
 Student exchange program between College of Natural Sciences in Dong-A University and School of Science in University of Hyogo (兵庫, 2015年8月22日) ポスター発表
- II-12 柴田直樹  
 Wnt シグナル伝達経路で働く DIX ドメイン複合体の構造生物学  
 生体超分子構造解析ビームライン利用報告会 (大阪, 2015年8月27日) 招待講演
- II-13 長尾聡・Lin Ying-W・Zhang Mohan・庄村康人・樋口芳樹・廣田俊  
 ドメインスワップ構造に基づくミオグロビン二量体のデザイン  
 第9回バイオ関連化学シンポジウム (熊本, 2015年9月10日) 口頭発表
- II-14 林有吾・山中優・長尾聡・小森博文・樋口芳樹・廣田俊  
 好熱菌シトクロム*c*-552のドメインスワップ多量体形成

- 日本生物高分子学会2015年度大会（香川，2015年9月19～20日）口頭発表
- II-15 山西勲平・柴田直樹・寺脇慎一・樋口芳樹  
Wnt/b-カテニンシグナル経路で働くDIXドメイン複合体の構造解析  
日本結晶学会2015年度年会（大阪，2015年10月17～18日）ポスター発表
- II-16 Satoshi Nagao, Ying-wu Lin, Haruto Ishikawa, Takuya Yamada, Mohan Zhang, Yasuhito Shomura, Yasuhisa Izutani, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota  
Wntシグナル伝達因子CCD1のDIXドメインを介する新規な自己活性制御の構造基盤の解明  
第87回日本生化学会大会（兵庫，2015年12月1日）ポスター発表
- II-17 Shin-ichi Terawaki, Shohei Fujita, Kensuke Shiomi, Kazuko Keino-Masu, Masayuki Masu, Kaori Wakamatsu, Naoki Shibata and Yoshiki Higuchi  
Structural basis of Wnt signaling regulation by dynamic polymerized proteins  
The 13th Conference of the Asian Crystallographic Association (AsCA2015) (India, 2015年12月2日) 招待講演
- II-18 林有吾・山中優・長尾聡・小森博文・樋口芳樹  
発現系における *c*型シトクロムの多量形成  
日本化学会第96春季年会（京都，2016年3月24～27日）口頭発表
- II-19. Miyamoto Takaaki, Kuribayashi Mai, Nagao Satoshi, Shomura Yasuhito, Higuchi Yoshiki, Hirota Shun  
Domain-swapped cytochrome *cb*<sub>562</sub> dimer and its nanocage encapsulating a Zn-SO<sub>4</sub> cluster in the internal cavity  
日本化学会第96春季年会（京都，2016年3月24～27日）口頭発表

## 大学院生命理学研究科

### 博士後期課程

Mahfuza Akter：マルチ銅酵素の構造化学

Noor Dina Binti Muhd Noor：酸素安定性[NiFe]-ヒドロゲナーゼの構造化学

### 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

岡裏 直也：軟骨形成転写因子・Sox9 の構造生物学

中島 悠志：NAD<sup>+</sup>還元型[NiFe]ヒドロゲナーゼの X 線結晶解析

矢野 晶子：Wnt 受容体 LRP6 細胞内ドメインの構造生物学

松浦 滉明：[NiFe]-ヒドロゲナーゼの中性子構造化学

## 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 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
- 3 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
- 4 公立大学法人兵庫県立大学 特別研究助成金（平成 27 年度）  
研究課題 [NiFe]ヒドロゲナーゼによる水素分解・合成反応メカニズムの解明  
研究代表者 西川幸志