

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 Microorganisms

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、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反応して代謝や増殖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。またこれに関連する転写因子として、軟骨形成に関わるSox9のDNA認識機構についても研究を行っている。

発表論文 List of Publications

- I-1 H. Tai, Y. Higuchi and S. Hirota: Comprehensive Reaction Mechanisms at and Nearby the Ni-Fe Active Sites of [NiFe] Hydrogenases, *Dalton Transactions*, 47, 4408-4423 (2018)
- I-2 S. Shiraiwa, K. So, Y. Sugimoto, Y. Kitazumi, O. Shirai, K. Nishikawa, Y. Higuchi, K. Kano: Reactivation of Standard [NiFe]-hydrogenase and Bioelectrochemical Catalysis of Proton Reduction and Hydrogen Oxidation in a Mediated-electron-transfer System, *Bioelectrochem*, 123, 156-161 (2018)
- I-3 N. Shibata, Y. Sueyoshi, Y. Higuchi and T. Toraya: Direct Participation of a Peripheral Side Chain of a Corrin Ring in Coenzyme B₁₂ Catalysis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 57, 7830-7835 (2018)
- I-4 H. Arai, Y. Shomura, Y. Higuchi and M. Ishii: Complete Genome Sequence of a Moderately Thermophilic, Facultative Chemolithoautotrophic Hydrogen-Oxidizing Bacterium, *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1, *Microbiology Resource Announcements*, 7, e00857-18 (2018)
- I-5 M. Akter, T. Tokiwa, M. Shoji, K. Nishikawa, Y. Shigeta, T. Sakurai, Y. Higuchi, K. Kataoka and N. Shibata: Redox Potential-dependent Formation of an Unusual His-Trp Bond in Bilirubin Oxidase, *Chem. Eur. J.*, 24, 1-8 (2018)
- I-6 N. D. M. Noor, H. Matsuura, K. Nishikawa, H. Tai, S. Hirota, J. Kim, J. Kang, M. Tateno, K-S. Yoon, S. Ogo, S. Kubota, Y. Shomura and Y. Higuchi: Redox-dependent Conformational Changes of a Proximal [4Fe-4S] Cluster in Hyb-type [NiFe]-hydrogenase to Protect the Active Site from O₂, *Chem. Commun.*, 54, 12385-12388 (2018)
- I-7 T. Tokiwa, M. Shoji, V. Sladek, N. Shibata, Y. Higuchi, K. Kataoka, Y. Shigeta and F. Misaizu: Structural Changes in the Trinuclear Copper Center upon the Reduction of Bilirubin Oxidase (BOD), *Molecules*, 24, 76, (2018)
- I-8 樋口芳樹: [NiFe]ヒドロゲナーゼの構造化学, 第18回日本蛋白質科学会年会, 2018/6/28, 朱鷺メッセ (新潟市, 新潟県) 【招待講演】
- I-9 Yoshiki Higuchi: Aiming towards comprehensive structural chemistry on [NiFe]-hydrogenases -Molecular mechanism of O₂-tolerance, FGSB2018 (3rd International Symposium and Workshop on Functional genomics and Structural Biology) 【基調講演】, 2018/7/23, University of Putra Malaysia (クアラルンプール, マレーシア)
- I-10 Yoshiki Higuchi: Structural chemistry on O₂-tolerant [NiFe]-hydrogenases, ICC2018 (43rd International Conference on Coordination Chemistry), 2018/8/2, 仙台国際センター (仙台市, 宮城県) 【招待講演】
- I-11 ○西川幸志, 中川由佳, 樋口芳樹, 小倉尚志: Development of Raman spectroscopic measurement system for analyzing the enzymatic reaction with gaseous substrate, 日本生物物理学会第56回年会, 2018/9/16, 岡山大学 (岡山市, 岡山県) 【招待講演】
- I-12 ○松浦滉明, 西川幸志, 金在炫, 姜志始, 館野賢, 庄村康人, 樋口芳樹: [NiFe]ヒドロゲナーゼにおける新規の酸素防御機構—水素エネルギー社会の実現に向けて, 兵庫県立大学知の交流シンポジウム 2018, 2018/9/20, 姫路商工会議所 (姫路市, 兵庫県) 【ポスター発表】
- I-13 ○Hulin Tai, Shun Hirota, Koji Nishikawa, Yoshiki Higuchi, Liang-nian Ji, Zong-wan Mao: Activation/inactivation mechanism between the Ni-SIr and Ni-SIa states of [NiFe] hydrogenase studied by utilizing Ni-SIr-to-Ni-SIa Photoactivation, 中国化学会第14回全国生物無機化学会, 2018/10/18, 南京大学 (南京, 中国) 【ポスター発表】
- I-14 Mahfuza Akter, 常盤恭樹, 庄司光男, 西川幸志, 重田育照, 櫻井 武, 片岡邦重, 樋口芳樹, ○柴田直樹: ビリルビンオキシダーゼで見つかった Trp-His 共有結合と Type I Cu の酸化還元電位との相関, 日本結晶学会平成 30 年度年会, 2018/11/10-11, 東京工業大学・大岡山キャンパス (目黒区, 東京都) 【ポスター発表】
- I-15 ○廣本武史・西川幸志・緒方英明・樋口芳樹: 水素分解を伴う不活性酸化型[NiFe]ヒドロゲナーゼの再活性化, 日本結晶学会平成 30 年度年会, 2018/11/10-11, 東京工業大学・大岡山キャンパス (目黒区, 東京都) 【ポスター発表】
- I-16 樋口芳樹: タンパク質分子内部の水ネットワークの構造と機能—ヒドロゲナーゼを例に, iBIX 将来構想検討会 (茨城県中性子利用研究会中性子産業利用推進協議会), 2018/11/20, エッサム神田ホール (千代田区, 東京都) 【招待講演】

- I-17 ○常盤恭樹, 庄司光男, 柴田直樹, 樋口芳樹, 片岡邦重, 重田育照, 美齊津文典: QM/MM 法によるビリルビンオキシダーゼの三核銅中心における構造変化に関する理論的研究, 第 32 回分子シミュレーション討論会, 2018/11/28, 産業技術総合研究所 (つくば市, 茨城県) 【ポスター発表】
- I-18 ○松浦滉明, 窪田慎太郎, 廣本武史, 竹田翠, 西川幸志, 柴田直樹, 樋口芳樹: 生物の力で水素をつくるー水素エネルギー利用システムへの応用に向けたヒドロゲナーゼの構造化学, 技術・人材マッチング交流会, 2019/2/12, 兵庫県立先端科学技術支援センター (上郡町, 兵庫県) 【ポスター発表】
- I-19 ○松浦滉明, 窪田慎太郎, 西川幸志, 樋口芳樹: [NiFe]ヒドロゲナーゼの不活性化ー再活性化機構の電気化学的解析, 2019 年電気化学会第 86 回大会, 2019/3/28, 京都大学吉田キャンパス (京都市, 京都府) 【ポスター発表】
- I-20 ○T. Tamada, T. Hiromoto., K. Nishikawa, S. Inoue, Y. Hirano, and Y. Higuchi: Neutron diffraction studies of [NiFe]-hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. 12th International Conference on Hydrogenases, 2019/3/31, Universidade NOVA de Lisboa (リスボン, ポルトガル) 【ポスター発表】
- I-21 ○廣本武史, 西川幸志, 井上誠也, 平野優, 樋口芳樹, 玉田太郎: 数の量子ビームを用いたヒドロゲナーゼの立体構造解析, 量子生命科学会第 1 回大会, 2019/5/23, 東京大学・弥生講堂一条ホール (文京区, 東京都) 【ポスター発表】
- II-1 A. Oda, S. Nagao, M. Yamanaka, I. Ueda, N. Shibata, Y. Higuchi and S. Hirota: Construction of a Triangle-Shaped Trimer and a Tetrahedral Structure Using an α -Helix-Inserted Circular Permutant of Cytochrome c555, *Chem. Asian J.*, 13, 964-967 (2018)
- II-2 S. Negoro, N. Shibata, Y.-H. Lee, I. Takehara, R. Kinugasa, K. Nagai, Y. Tanaka, D. Kato, M. Takeo, Y. Goto and Y. Higuchi: Structural Basis of Correct Subunit Assembly, Aggregation, and Intracellular Degradation of Nylon Hydrolase, *Scientific Reports*, 8, 9725 (2018)
- II-3 K. Yamanishi, Y. Sin, S. Terawaki, Y. Higuchi and N. Shibata: High-resolution Structure of Dishevelled2-DIX Domain Y27W Mutant, *Acta Crystallogr.*, F75, 116-122 (2018)
- II-4 ○Shun Hirota, Satoshi Nagao, Masaru Yamanaka, Yoshiki Higuchi: Domain Swapping-Based Assemblies of c-Type Cytochromes, ICPP-10 (International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines), 2018/7/6, The Westin Grand Munich (ミュンヘン, ドイツ) 【口頭発表】
- II-5 ○廣田俊, 太虎林, 樋口芳樹, 柳澤幸子, 小倉尚志: Picobiology of metalloproteins: Vibrational spectroscopic studies of cytochrome c and hydrogenase, 日本生物物理学会第 56 回年会, 2018/9/16, 岡山大学 (岡山市, 岡山県) 【招待講演】
- II-6 ○Kumpei Yamanishi, Naoki Shibata, Marc Fiedler, Mariann Bienz, Yoshiki Higuchi: Heterotypic interaction of Dishevelled-DIX and Axin-DIX triggers their colocalization and activates Wnt/ β -catenin signaling, 第 91 回日本生化学会大会, 2018/9/25, 国立京都国際会館 (京都市, 京都府) 【ポスター発表】
- II-7 ○Satoshi Nagao, Ayaka Suda, Hisashi Kobayashi, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota: Design of stable domain-swapped myoglobin oligomers, 日本化学会第 99 回春季年会 2019, 2019/3/17, 甲南大学・岡本キャンパス (神戸市, 兵庫県) 【口頭発表】
- II-8 ○Cheng Xie, Masaru Yamanaka, Satoshi Nagao, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota: Construction of a Two-Dimensional Protein Array Utilizing a Cytochrome c555-Based Protein, 日本化学会第 99 回春季年会 2019, 2019/3/17, 甲南大学・岡本キャンパス (神戸市, 兵庫県) 【口頭発表】
- II-9 ○Satoshi Nagao, Ayaka Suda, Hisashi Kobayashi, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota: Design and properties of domain-swapped myoglobin dimers with metal-binding abilities, 日本化学会第 99 回春季年会 2019, 2019/3/17, 甲南大学・岡本キャンパス (神戸市, 兵庫県) 【口頭発表】
- II-10 ○井戸本彩花, 長尾聡, 柴田直樹, 樋口芳樹, 廣田俊: 金属結合を有するドメインスワッピングしたミオグロビン 2 量体のデザインと性質, 日本化学会第 99 回春季年会 2019, 2019/3/17, 甲南大学・岡本キャンパス (神戸市, 兵庫県) 【口頭発表】

大学院生命理学研究科 ピコバイオロジー専攻

- 山西勲平： DAX-DIX 複合体の構造生物学
松浦滉明： Spectroscopic and crystallographic studies on [NiFe]-hydrogenase
今西隆浩： Structural and biochemical studies on Hyb-type [NiFe]-hydrogenase

生命科学専攻

博士前期課程

- 柴田大樹： 軟骨形成に関わる転写因子 Sox9 の構造解析
樋口雄大： S-77 ヒドロゲナーゼの高分解能結晶解析
井上翔太： ヒドロゲナーゼの酸化的不活性化の構造化学
清水 要： [NiFe]ヒドロゲナーゼの中性子結晶構造化学
谷垣暁章： 転写因子 Sox9-HMG ドメインの構造解析

科学研究費補助金等

1. 科学研究費補助金（平成 30～令和 4 年度） 新学術領域研究 課題番号：18H05516
研究課題：水素－電子カップリング機能の創出と機構解明
研究分担者 樋口芳樹
2. 科学研究費補助金（平成 30～令和 1 年度）国際共同研究加速基金 課題番号：16K21748
研究課題：水素生成[FeFe]ヒドロゲナーゼの反応機構
研究分担者 樋口芳樹
3. ひょうご科学技術協会 学術研究助成（平成 30-31 年度）
研究課題：中性子により [NiFe]ヒドロゲナーゼのプロトン輸送経路を可視化する
研究代表者 廣本武史