

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・柴田直樹・樋口芳樹
Nishikawa, K., 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。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。また、 NAD^+ - NADH 変換機能をもつ酵素や膜内電子伝達タンパク質との複合体ヒドロゲナーゼ、さらに、それらの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。一方、ヒドロゲナーゼの基質（水素）をラマン分光法で直接分析することにより酵素活性を測定する新規の活性定量方法を開発している。これは、気体分子を基質とする酵素全般に応用可能である。

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ラ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。

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・西川幸志・樋口芳樹
Shibata, N., 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。

味覚は味覚受容体タンパク質に味物質が結合すると構造変化が起こり、そのシグナルが伝達される。極めて低濃度で甘味受容体を活性化し、ショ糖の代替物としての利用が期待されている甘味タンパク質について構造生物学研究を行っている。

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 K. Yamanishi, W. Kumano, S. Terawaki, Y. Higuchi, N. Shibata: Head-to-Tail Complex of Dishevelled and Axin-DIX Domains: Expression, Purification, Crystallographic Studies and Packing Analysis, *Protein Pept. Lett.*, **26(10)**, 792-797 (2019)
- I-2 H. Tai, K. Nishikawa, Y. Higuchi, Z. W. Mao, S. Hirota: Cysteine SH and Glutamate COOH Contributions to [NiFe] Hydrogenase Proton Transfer Revealed by Highly Sensitive FTIR Spectroscopy, *Angew Chem Int Ed Engl*, **58(38)**, 13285-13290 (2019)
- I-3 K. Nishikawa, H. Ogata, Y. Higuchi: Structural Basis of the Function of [NiFe]-hydrogenases, *Chemistry Letters*, **49(2)**, 164-173 (2019)
- I-4 Y. K. Nakagawa, K. Nishikawa, S. Nakashima, S. Inoue, T. Ohta, T. Ogura, Y. Shigeta, K. Fukutani, T. Yagi, Y. Higuchi: New Assay Method Based on Raman Spectroscopy for Enzymes Reacting with Gaseous Substrates, *Protein Science*, **28**, 663-670 (2019)
- I-5 Y. Shomura and Y. Higuchi: NAD⁺-reducing [NiFe]-hydrogenase, *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, 1-11 (2019)
- I-6 根来誠司, 武尾正弘, 柴田直樹, 樋口芳樹, 加藤太郎, 重田育照: ナイロン分解酵素 NylB の構造進化, 触媒機構とアミド合成への応用, *月刊バイオインダストリー*, **6** (2019)
- I-7 Y. Higuchi: Role of water network for O₂-stability of [NiFe]-hydrogenases, 12th International Conference on Hydrogenases, 2019/4/1, Universidade Nova de Lisboa (Lisbon, Portugal) 【招待講演】
- I-8 ○T. Tamada, T. Hiromoto, K. Nishikawa, S. Inoue, Y. Hirano, Y. Higuchi: Neutron diffraction studies of [NiFe]-hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F, 12th International Conference on Hydrogenases, 2019/4/1, Universidade Nova de Lisboa (Lisbon, Portugal) 【ポスター発表】
- I-9 西川幸志: ラマン散乱を利用したヒドロゲナーゼ活性測定法の開発, 新学術領域「ハイドロジェノミクス」第3回若手育成スクール, 2019/5/17, 東京工業大学大岡山キャンパス (東京都, 東京都) 【招待講演】
- I-10 ○玉田太郎, 廣本武史, 西川幸志, 井上誠也, 平野優, 樋口芳樹: *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F 株由来[NiFe]-ヒドロゲナーゼの中性子回折実験, 第19回日本蛋白質科学会年会第71回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 2019/6/24, 神戸国際会議場 (神戸市, 兵庫県) 【ポスター発表】
- I-11 樋口芳樹: 生物酵素・ヒドロゲナーゼにおける水素合成・活性化触媒反応機構の構造化学, cat-DVD 研究会, 2019/7/19, BIZ SPACE 姫路 (姫路市, 兵庫県) 【招待講演】
- I-12 ○T. Imanishi, H. Matsuura, H. Hasuike, T. Hiromoto, Y. Higuchi: Expression, purification and crystallization of HybA in Hyb-type [NiFe]-hydrogenase, The 6th International Symposium on Diffraction Structural Biology 2019, 2019/10/18, 大阪大学 (吹田市, 大阪府) 【ポスター発表】
- I-13 ○T. Hiromoto, K. Nishikawa, H. Matsuura, Y. Hirano, K. Kusaka, M. Cuneo, T. Tamada, Y. Higuchi: Neutron diffraction experiments on [NiFe]-hydrogenase reduced under H₂ atmosphere, The 6th International Symposium on Diffraction Structural Biology 2019, 2019/10/19, 大阪大学 (吹田市, 大阪府) 【ポスター発表】
- I-14 ○西川幸志, 井上翔太, 樋口芳樹: 酸化に伴う[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性部位と FeS クラスターの構造変化の関連について, 日本結晶学会 2019 年度年会, 2019/11/19, 金沢市文化ホール (金沢市, 石川県) 【ポスター発表】
- I-15 ○井上翔太, 西川幸志, 樋口芳樹: [NiFe]ヒドロゲナーゼにおける近位[FeS]クラスターの構造変化について, 日本結晶学会 2019 年度年会, 2019/11/19, 金沢市文化ホール (金沢市, 石川県) 【ポスター発表】
- I-16 ○玉田太郎, 廣本武史, 西川幸志, 井上誠也, 平野優, 樋口芳樹: *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F 株由来[NiFe]ヒドロゲナーゼの中性子回折実験, 日本結晶学会 2019 年度年会, 2019/11/20, 金沢市文化ホール (金沢市, 石川県) 【ポスター発表】
- I-17 Y. Higuchi: Structural Studies on [NiFe]-hydrogenases, 3rd International Solar Fuels Conference/International Conference on Artificial Photosynthesis-2019, 2019/11/21, 広島コンベンションホール (広島市, 広島県) 【招待講演】
- I-18 K. Nishikawa, Y. Kawahara, S. Inoue, T. Chuji, S. Nakashima, Y. Shigeta, K. Fukutani, ○Y. Higuchi: New Assay Method for the Enzymes Reacting with Gaseous Substrates by Raman

- Spectroscopy, 1st International Symposium “Hydrogenomics” combines with 14th International Symposium Hydrogen & Energy, 2020/1/6, ホテルモントレーエーデルホフ札幌 (札幌市, 北海道) 【ポスター発表】
- I-19 ○K. Ishikawa, M. Shoji, Y. Hori, T. Hiromoto, Y. Higuchi, Y. Shigeta: Theoretical Analysis on Substrates of Resting Oxidized States of [NiFe]hydrogenase, 1st International Symposium “Hydrogenomics” combines with 14th International Symposium Hydrogen & Energy, 2020/1/6, ホテルモントレーエーデルホフ札幌 (札幌市, 北海道) 【ポスター発表】
- I-20 Y. Higuchi: Structural Studies on [NiFe]-hydrogenases, I²CNER International Workshop, 2020/1/31, 九州大学 (福岡市, 福岡県) 【基調講演】
- II-1 K. Yamanishi, M. Fiedler, S. Terawaki, Y. Higuchi, M. Bienz, N. Shibata: A direct heterotypic interaction between the DIX domains of Dishevelled and Axin mediates signaling to beta-catenin, *Sci. Signal.*, **12(611)**, eaaw5505 (2019)
- II-2 H. Yang, M. Yamanaka, S. Nagao, K. Yasuhara, N. Shibata, Y. Higuchi, S. Hirota: Protein surface charge effect on 3D domain swapping in cells for c-type cytochromes, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1867(11)**, 140265-140273 (2019)
- II-3 ○井戸本彩花, 長尾聡, 柴田直樹, 樋口芳樹, 廣田俊: Design and Properties of Domain-swapped Myoglobin Dimers with Metal-binding Sites, 第 19 回日本蛋白質科学会年会第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 2019/6/24, 神戸国際会議場 (神戸市, 兵庫県) 【ポスター発表】
- II-4 ○M. Yamanaka, S. Nagao, C. Ren, M. Zhang, A. Oda, Y. Higuchi, S. Hirota: Construction of Protein Supramolecules Based on Domain Swapping, 第 19 回日本蛋白質科学会年会第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 2019/6/25, 神戸国際会議場 (神戸市, 兵庫県) 【ポスター発表】
- II-5 ○柴田直樹, 山西勲平, Marc Fiedler, 寺脇慎一, Mariann Bienz, 樋口芳樹: Direct Interaction via the DIX Domains of Dishevelled and Axin Indices Their Colocalization and Down-regulates Wnt/beta-catenin Signaling, 第 19 回日本蛋白質科学会年会第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会 合同シンポジウム, 2019/6/26, 神戸国際会議場 (神戸市, 兵庫県) 【招待講演】
- II-6 ○S. Terawaki, K. Wakamatsu, M. Masu, N. Shibata, Y. Higuchi: Structural basis of the molecular interaction of Axin with Coiled-coil DIX1 by heterotypic oligomerization of DIX domain, 第 19 回日本蛋白質科学会年会第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 2019/6/26, 神戸国際会議場 (神戸市, 兵庫県) 【招待講演】
- II-7 ○M. Yamanaka, S. Nagao, C. Ren, M. Zhang, A. Oda, Y. Higuchi, S. Hirota: Construction of Protein Supramolecules Based on Domain-Swapping Mechanism, The Protein Society 2019, 2019/6/30, The Sheraton Grand Seattle (Washington, USA) 【ポスター発表】
- II-8 ○井戸本彩花, 長尾聡, 柴田直樹, 樋口芳樹, 廣田俊: ドメインスワッピングを利用したミオグロビンへの金属結合部位への導入, 第 13 回バイオ関連化学シンポジウム, 2019/9/4, 東北大学 (仙台市, 宮城県) 【ポスター発表】
- II-9 ○R. Cahyono, 山中優, 長尾聡, 柴田直樹, 廣田俊: Domain Swapping of Azurin from *Alcaligenes xylosoxidans* and Characterization of Its Dimer, 第 13 回バイオ関連化学シンポジウム, 2019/9/6, 東北大学 (仙台市, 宮城県) 【ポスター発表】
- II-10 ○井戸本彩花, 長尾聡, 柴田直樹, 樋口芳樹, 廣田俊: 金属結合部位を導入したドメインスワップミオグロビン 2 量体の構造と性質, 第 9 回 CSJ 化学フェスタ 2019, 2019/10/6, タワーホール船堀 (東京都, 東京都) 【ポスター発表】
- II-11 K. Yamanishi, W. Kumano, S. Terawaki, Y. Higuchi. ○N. Shibata: Structure of the head-to-tail complex of Dishevelled and Axin-DIX domains, The 6th International Symposium on Diffraction Structural Biology 2019, 2019/10/18, 大阪大学 (吹田市, 大阪府) 【ポスター発表】
- II-12 ○S. Idomoto, S. Nagao, N. Shibata, Y. Higuchi, S. Hirota: Structure and properties of domain-swapped myoglobin dimers with metal binding sites, 43rd Annual Macro Symposium, 2019/10/24, University of Michigan (Michigan, USA) 【ポスター発表】
- II-13 ○長尾聡, 井戸本彩花, 須田綾香, 小林紀, 柴田直樹, 樋口芳樹, 廣田俊: タンパク質超分子構築のためのドメインスワッピングにおけるヒンジ領域のアミノ酸配列設計, 日本化学会第 100 春季年会, 2020/3/23, 東京理科大学野田キャンパス (野田市, 千葉県) 【口頭発表】

大学院生命理学研究科

ピコバイオロジー専攻

- 松浦滉明： Spectroscopic and crystallographic studies on [NiFe]-hydrogenase
今垣隆浩： Structural and biochemical studies on Hyb-type [NiFe]-hydrogenase

生命科学専攻

博士前期課程

- 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
池田智紀： 中性子結晶解析を目指した還元型ヒドロゲナーゼの大型結晶の調製
大濱 凜： 4量体[NiFe]ヒドロゲナーゼ構成サブユニットの大腸菌発現系の構築
中地隆文： ラマン分光法を用いたヒドロゲナーゼの触媒反応の解析
吉村日向： 細胞の増殖を亢進する DKK-CKAP4 シグナルの構造生物学的研究

科学研究費補助金等

1. 科学研究費補助金（平成 30 年度～令和 4 年度） 新学術領域研究 課題番号：18H05516
研究課題：水素一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 年度～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. 科学研究費補助金（令和元年度～令和 5 年度）基盤研究(A) 課題番号：19H00984
研究課題：ヒドロゲナーゼの触媒反応機構と高効率プロトン伝達機構の構造基盤解明
研究代表者 樋口芳樹
4. 公益財団法人 ひょうご科学技術協会（平成 31 年度（令和元年度））学術研究助成
研究課題：がん細胞増殖シグナルを活性化するタンパク質複合体の構造生物学
研究代表者 柴田直樹
5. 木下基礎科学研究基金助成金（令和元年度）
研究課題：ヒドロゲナーゼの反応機構解明
研究代表者 西川幸志