

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., 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、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・外敵に应答してそれに対応、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・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应答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シグナルや関連する伝達経路のうち、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ドメインや、新規の癌細胞増殖シグナル軸であるDKK-CKAP4経路に関して、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. Nishikawa, H. Ogata and Y. Higuchi: Structural Basis of the Function of [NiFe]-hydrogenases, *Chemistry Letters*, **49(2)** 164-173 (2020)
- I-2 T. Hiromoto, K. Nishikawa, S. Inoue, H. Matsuura, Y. Hirano, K. Kurihara, K. Kusaka, M. Cuneo, L. Coates, T. Tamada and Y. Higuchi: Towards cryogenic neutron crystallography on the reduced form of [NiFe]-hydrogenase, *Acta Crystallogr. D*, **76** 946-953 (2020)
- I-3 T. Hiromoto, K. Nishikawa, T. Tamada, Y. Higuchi: The Challenge of Visualizing the Bridging Hydride at the Active Site and Proton Network of [NiFe]-Hydrogenase by Neutron Crystallography, *Topics in Catalysis*, (2021)
- I-4 S. Negoro, D. Kato, T. Ohki, K. Yasuhira, Y. Kawashima, K. Nagai, M. Takeo, N. Shibata, K. Kamiya, Y. Shigeta: Structural and functional characterization of nylon hydrolases, *Methods in Enzymology*, **648** 357-389 (2021)
- I-5 緒方英明, 樋口芳樹: 水素酸化還元酵素ヒドロゲナーゼ, 生命金属ダイナミクス (2021)
- I-6 柴田直樹, 末吉由依, 樋口芳樹, 虎谷哲夫: X 線結晶構造に基づく B₁₂ 補酵素がラジカル酵素反応を制御する仕組みの解明, 放射光, **33(1)** 33-42 (2020)
- I-7 樋口芳樹: 生物のエネルギー代謝酵素の分子進化, 実験医学増刊 イメージング時代の構造生命科学, **38(5)** 56-59 (2020)
- I-8 ○T. Tamada, T. Hiromoto, K. Nishikawa, Y. Hirano, K. Kusaka, L. Coates, Y. Higuchi: Neutron diffraction studies of [NiFe]-hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F, 第 20 回日本蛋白質科学会年会, 2020/6/18 オンライン開催 (札幌市, 北海道) 【口頭発表】
- I-9 ○今西隆浩, 熊坂崇, 奥村英夫, 仲村勇樹, 松浦滉明, 樋口芳樹: プレートスキャン法を用いた [NiFe] ヒドロゲナーゼの常温構造解析, 日本結晶学会 2020 年度年会, 2020/11/28 オンライン開催 (つくば市, 茨城県) 【口頭発表】
- I-10 ○樋口芳樹: 生物酵素による水素の合成と分解～水素触媒の新たな展開になるか～, 若狭湾エネルギー研究所・先端技術セミナー, 2020/12/18 オンライン開催 (敦賀市, 福井県) 【招待講演】
- II-1 R.N. Cahyono, M. Yamanaka, S. Nagao, N. Shibata, Y. Higuchi, S. Hirota: 3D domain swapping of azurin from *Alcaligenes xylosoxidans*, *Metallomics*, **12(3)** 337-345 (2020)
- II-2 S. Nagao, A. Suda, H. Kobayashi, N. Shibata, Y. Higuchi, S. Hirota: Thermodynamic Control of Domain Swapping by Modulating Helical Propensity in the Hinge Region of Myoglobin, *Chemistry-An Asian Journal*, **15** 1743-1749 (2020)
- II-3 S. Nagao, A. Idomoto, S. Shibata, Y. Higuchi, S. Hirota: Rational Design of Metal-binding Sites in Domain-swapped Myoglobin Dimers, *J. Inorg. Biochem.*, **217** (2021)

大学院生命理学研究科

ピコバイオロジー専攻

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

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～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 (令和元年度～令和 5 年度) 基盤研究(A) (一般) 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
3. 科学研究費補助金 (令和 2 年度～令和 4 年度) 基盤研究(C) (一般) 課題番号: 20K06511
研究課題: [NiFe]ヒドロゲナーゼの酸化に伴う鉄硫黄クラスターの構造変化に関する研究
研究代表者 西川幸志