

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：24506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657031

研究課題名（和文） 中性子結晶解析法によるヒドロゲナーゼの水素活性化反応機構の解明

研究課題名（英文） Study of Catalytic Mechanism of Hydrogen Activation by Hydrogenase using Neutron Crystal Structure Analysis

研究代表者

樋口 芳樹 (HIGUCHI YOSHIKI)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授

研究者番号：90183574

研究成果の概要（和文）：

平成22年度は、酵素・ヒドロゲナーゼ中のすべての水素原子を重水素原子に置き換えることを計画したが、結晶化に十分な量の精製酵素を得ることは困難であった。平成22, 23年度にかけて、通常の野生型ヒドロゲナーゼ試料について、重水中において、重水素化した沈殿剤（2-メチル-2,4-ペンタンジオール）を用いて良質で大きな単結晶を得るための条件を探索し、約4 mm³の単結晶の調製に成功した。また、結晶の凍結条件の探索を続け、モザイク性の低い回折データを得られる凍結条件を得た。

研究成果の概要（英文）：

The perfectly deuterated [NiFe] hydrogenase was tried to prepare by inoculating the sulfate-reducing bacterium in the deuterated media in 2010. However, it was not successful to obtain enough amount of the protein sample for crystallization trial. In 2011-2012, the ordinary (not deuterated) hydrogenase was tried to crystallize using deuterated precipitant in deuterated buffer solution. We have succeeded in preparation of a single crystal with a volume of 4 mm³. This crystal gave a neutron diffraction pattern at 5.0 Å resolution at 100 K using the neutron beam at Japan Atomic Energy Research Institute. In addition, some parameters for diffraction experiment for large single crystals of [NiFe] hydrogenase at cryo-temperature have been found.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	420,000	3,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：・タンパク質・中性子結晶解析・水素代謝・反応機構

1. 研究開始当初の背景

人類による化石燃料の大量消費はCO₂レベルの上昇に伴う温暖化現象など地球規模の環境問題を引き起こしてきた。水素は化石燃料

に変わる次世代の燃料として期待されている究極のクリーンエネルギーである。これまで申請者は水素の合成・分解酵素・ヒドロゲナーゼの構造化学的研究を進めてきた。その結果、

As-purified 酸化型 (空気中で精製した酵素) の活性部位は, Ni-Fe ヘテロ2 核金属錯体で, Ni には4 つのシステイン側鎖のS が配位し, そのうち2 つはFe にも配位しブリッジを形成していることを明らかにした. Fe には非アミノ酸配位子として3 本の2 原子分子が配位し, さらに3 番目の非アミノ酸ブリッジ配位子も発見した. ヒドロゲナーゼのNi-Fe 活性部位は, Ni とFe を中心とする2 つの8 面体型配位錯体の水平面の4 本の配位子のうち2 本を共有し, さらに錯体の軸を傾けて垂直方向の配位子を1 本ずつ共有したような珍しい配位子構造を示していた. 還元型の構造では非アミノ酸配位子のうち, ブリッジ配位子は消失して酵素は活性型になっていた. 競争阻害剤・CO を結合した, CO結合型およびCO光遊離型の精密構造解析 (Ni-CO) から, 活性部位で重要な役割を演じる原子 (Ni およびCys546 のS) を特定した.

その後, As-purified 型構造は, 二つの型「Unready (Ni-A) 型」と「Ready (Ni-B) 型」の混合物であることが判明した. これらの二つの型を作り分ける方法を開発し, Ni-A と Ni-B 型を超高分解能X 線結晶解析法により解明した. その結果, Ni-A は2 原子分子が, Ni-B は単原子がNiとFe をブリッジ配位していることを明らかにした. Ni-Fe 活性部位では, 基質の水素以外にNi の配位子であるシステイン側鎖の硫黄原子も触媒に重要であり, しかもそれが水素化されているというEPR およびDFT 理論計算による報告がある. 我々の超高分解能X 線解析構造では, 4 個のシステインの硫黄配位子のうち少なくとも1 個は水素化されている可能性を見出している. しかし, 水素原子を束縛条件無しに精密化することはX 線結晶解析では困難であり, そのためには水素原子を直接観察できる中性子線解析が必須であった.

2. 研究の目的

本申請研究では, 巨大タンパク質・ヒドロゲナーゼのNi-Fe 活性部位における水素活性化の反応中間体を, 中性子結晶解析法により直接観察することを主目的とする. そのために分子中の全ての水素原子を重水素に置換した酵素試料を調製することを目指す. 本酵素の基質は「水素および重水素」である. 従って, 構造中に (重) 水素を「直接に精度良く見る」ことが可能な中性子結晶解析法は最適の研究手法である. 中性子回折実験において, 試料中の水素原子は, 非干渉性散乱の割合が大きいためバックグラウンドを上げて回折データのS/N 比に多大な悪影響を与える. 本研究ではこれら試料中の水素原子を全て重水素原子に置き換えて精度の高い中性子線結晶解析を遂行する.

3. 研究の方法

(1) 完全重水素化・ヒドロゲナーゼの調製. 硫酸還元菌が乳酸以外の試薬を炭素源 (ギ酸 + CO₂) として生育する条件を探索する. また, 市販のクロレラ培地を用いるとさらに菌体収量がどの程度改良されるかを精査する.

(2) 重水素緩衝液中での結晶化条件の確立. 2-メチル-2,4-ペンタンジオール (MPD) による結晶化相図に基づき, 3 mm³ を超える大きさの巨大単結晶の調製を目指す. また, MPDのみを沈殿化剤とする結晶化で予定の巨大結晶の成長が困難となる可能性も考慮し, ポリエチレングリコール (PEG) 等の沈殿剤を用いた新規結晶化条件の探索も進める.

(3) 巨大単結晶の高圧下における凍結条件のスクリーニング.

一酸化炭素 (CO) をプローブとして基質の反応水素を活性部位に固定することを最大の目的とするため, 巨大結晶を使った中性子回折実験を80 K あるいはそれ以下の30 K 程度の低温条件下で行うために, 結晶にダメージを与えることなく一様に凍結する方法を考案する. そのために, 単結晶高圧凍結装置の利用を検討する. 本手法の有効利用は, 今後中性子線結晶解析法で水素原子やプロトンの挙動も含めた動的構造化学を進展させる上でも有用である.

4. 研究成果

平成 22 年度は, 酵素・ヒドロゲナーゼ中のすべての水素原子を重水素原子に置き換えることを計画し, 重水素化した培養試薬を用い, 重水中で硫酸還元菌の培養条件を探索した. しかし, 硫酸還元菌にとって, 主なる栄養素である乳酸がない培地での成長は著しく悪く, 結晶化実験に十分な量の精製酵素試料を得ることは困難であった. そこで, 平成 22, 23 年度にかけて, 通常の野生型 (縫う水素化されていない) ヒドロゲナーゼ試料について, 重水中において, 重水素化した沈殿剤 (2-メチル-2,4-ペンタンジオール) を用いて良質で大きな単結晶を得るための条件を探索した. その結果, 約 4 mm³ の巨大単結晶の調製に成功した. 得られた結晶を日本原子力研究開発機構の原子炉において, 回折実験を行ったところ, 約 7 Å分解能の回折パターンが得られることが判明した. そこで, 最近開発された中性子回折実験用の試料凍結装置を用いて, 100 K にて再度回折実験をしたところ, 最高分解能は 5 Å分解能まで到達した (図 1). 平成 23 年度は, 東日本大震災の影響で原子炉が稼働しなかったため, 中性子回折実験はできなかった. そこで, 結晶の凍結条件の探索を続け, 主に X線回折法によりその条件を評価した. その結果, 昨年度よりもモザイク性の低い回折データを得られる凍結条件を得た.

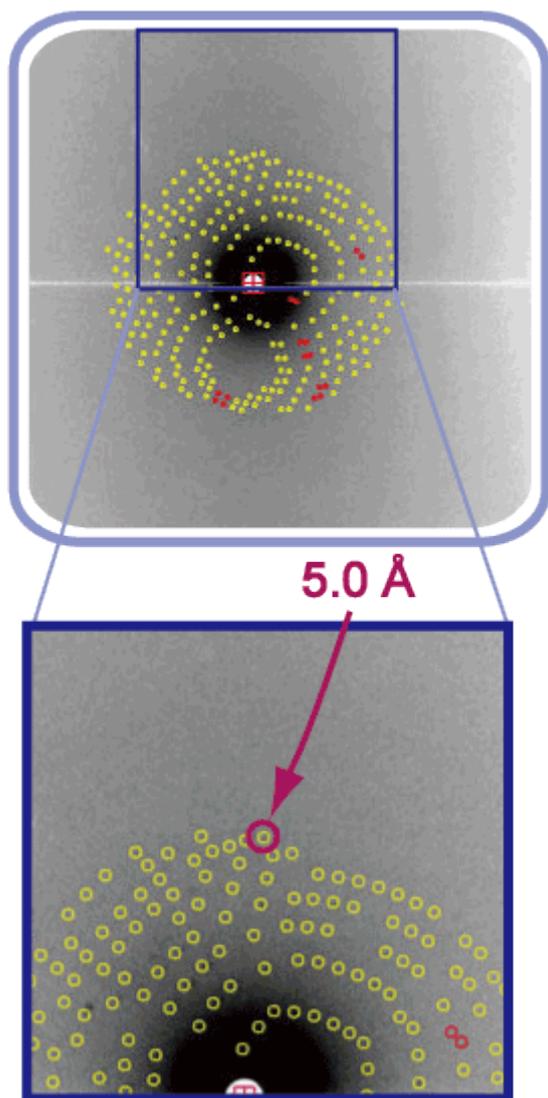


図1. 約4 mm³の[NiFe]ヒドロゲナーゼ巨大単結晶による5 Å分解能の中性子回折パターン (温度: 100K)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計26件)

- ①Y. Shomura, E. Hinokuchi, H. Ikeda, A. Senoo, Y. Takahashi, J. Saito, H. Komori, N. Shibata, Y. Yonetani and Y. Higuchi, Structural and Enzymatic Characterization of BacD, An L-amino Acid Dipeptide Ligase from *Bacillus subtilis*. 査読有, *Protein Science* 21, 707-716 (2012). DOI:10.1002/pro.2058
- ②H. Komori, R. Sugiyama, K. Kataoka, Y. Higuchi, and T. Sakurai, An O-Centered Structure of the Trinuclear Copper Center in the Cys500Ser/Glu506Gln Mutant of Cue0 and Structural Changes in Low to

High X-Ray Dose Conditions. 査読有, *Angewandte Chemie* 51 (8), 1861-1864 (2012). DOI: 10.1002/anie.201107739

- ③S. Negoro, N. Shibata., Y. Tanaka, K. Yasuhira, H. Shibata, H. Hashimoto, Y. -H. Lee, S. Oshima, R. Santa, S. Oshima, K. Mochiji, Y. Goto, T. Ikegami, K. Nagai, D. Kato, M. Takeo and Y. Higuchi, The Three-dimensional Structure of Nylon Hydrolase and The Mechanism of Nylon-6 Hydrolysis. 査読有, *J. Biol. Chem.* 287, 5079-5090 (2012). DOI: 10.1074/jbc.M111.321992
- ④Y. Shomura, K. Yoon, H. Nishihara, and Y. Higuchi, Structural Basis for a [4Fe-3S] Cluster in the Oxygen-tolerant Membrane-bound [NiFe]-hydrogenase. 査読有, *Nature* 479, 253-257 (2011). DOI: 10.1038/nature10504
- ⑤Y. Shomura, K. Hagiya, K. Yoon, H. Nishihara, and Y. Higuchi, Crystallization and Preliminary X-ray Diffraction Analysis of Membrane-bound Respiratory [NiFe] Hydrogenase from *Hydrogenovibrio marinus*. 査読有, *Acta Crystallogr.* F67, 827-829 (2011). DOI:10.1107/S1744309111019804
- ⑥T. Baba, K. Kamiya, T. Matsui, N. Shibata, Y. Higuchi, T. Kobayashi, S. Negoro and Y. Shigetani, Molecular Dynamics Studies on Mutational Structures of a Nylon-6 Byproduct-degrading Enzyme. 査読有, *Chem. Phys. Lett.* 507, 157-161 (2011). DOI:10.1016/j.cplett.2011.03.046
- ⑦N. Shibata, Y. Higuchi and T. Toraya, How Coenzyme B12-dependent Ethanolamine Ammonialyase Deals with Both Enantiomers of 2-Amino-1-propanol as Substrates: Structure-based Rationalization. 査読有, *Biochemistry* 50, 591-598 (2011). DOI: 10.1021/bi101696h
- ⑧K. Yasuhira, N. Shibata, Y. Tanaka, N. Kumagai, Y. Tanaka, K. Nagai, D. Kato, M. Takeo, S. Negoro and Y. Higuchi, Crystallization and X-ray Diffraction Analysis of Nylon Oligomer Hydrolase (NylC) from *Agromyces* sp. KY5R. 査読有, *Acta Crystallogr.*, F67, 892-895 (2011). DOI:10.1107/S1744309111022858
- ⑨S. Terawaki, K. Yano, T. Katsutani, K. Shiomi, K. Keino-Masu, M. Masu, Y. Shomura, H. Komori, N. Shibata and Y. Higuchi, Crystallographic Characterization of the DIX Domain of the Wnt Signalling Positive Regulator Ccd1. 査読有, *Acta Crystallogr.*, F67, 758-761 (2011). DOI :10.1107/S1744309111016526

- ⑩M. Michishita, A. Morimoto, T. Ishii, H. Komori, Y. Shiomi, Y. Higuchi and H. Nishitani, Positively Charged Domain Located Downstream of PIP Box, Together with TD Amino Acids within PIP Box, is Important for CRL4^{Cdt2}-mediated Proteolysis. 査読有, *Genes to Cells*, 16, 12-22 (2011). DOI:10.1111/j.1365-2443.2010.01464.x
- ⑪J. Kondo, H. Shibata, S. Miura, A. Yamakawa, K. Sato, Y. Higuchi, C. Shukunami, and Y. Hiraki, A Functional Role of the Glycosylated N-terminal Domain of Chondromodulin-I. 査読有, *J. Bone Miner. Metab.*, 29, 23-30 (2011). DOI:10.1007/s00774-010-0193-0
- ⑫Y. Takayama, M. Taketa-Sato, H. Komori, K. Morita, Su-Jin Kang, Y. Higuchi, and H. Akutsu, Role of π -Electron Systems in Stabilization of the Oxidized Tetraheme Architecture in Cytochrome *c*₃. 査読有, *Bull. Chem. Soc. Jpn. Vol. 84, No. 10*, 1096-1101 (2011). DOI: 10.1246/bcsj.20110039
- ⑬K. Ichikawa, K. Nonaka, T. Matsumoto, B. Kure, K-S. Yoon, Y. Higuchi, T. Yagi, S. Ogo, Concerto Catalysis. Harmonising [NiFe] Hydrogenase and NiRu Model Catalysts. 査読有, *Dalton Transactions* 39, 2993-2994 (2010). DOI: 10.1039/B926061G
- ⑭H. Komori, D. Seo, T. Sakurai and Y. Higuchi, Crystal Structure Analysis of *Bacillus subtilis* Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreductase and the Structural Basis for Its Substrate Selectivity. 査読有, *Protein Science* 19(12), 2279-2290 (2010). DOI: 10.1002/pro.508
- ⑮S. Hirota, Y. Hattori, S. Nagao, M. Taketa, H. Komori, H. Kamikubo, Z. Wang, I. Takahashi, S. Negi, Y. Sugiura, M. Kataoka, Y. Higuchi, Cytochrome *c* polymerization by successive domain swapping at the C-terminal helix. 査読有, *Pro. Natl. Acad. Sci.* 107(29), 12854-12859 (2010). DOI: 10.1073/pnas.1001839107
- ⑯N. Shibata, H. Tamagaki, N. Hieda, K. Akita, H. Komori, Y. Shomura, S. Terawaki, K. Mori, N. Yasuoka, Y. Higuchi, and T. Toraya, Crystal Structures of Ethanolamine Ammonia-lyase complexed with Coenzyme B₁₂ Analogs and Substrates. 査読有, *J. Biol. Chem.* 285 (34), 26484-26493 (2010). DOI : 10.1074/jbc.M110.125112.
- ⑰H. Komori and Y. Higuchi, Structure and Molecular Evolution of Multicopper Blue Proteins. 査読有, *BIOMOLECULAR CONCEPTS*, 1, 31-40 (2010). DOI: 10.1515/BMC.2010.004
- ⑱Y. Kawashima, K. Yasuhira, N. Shibata, Y. Matsuura, Y. Tanaka, M. Taniguchi, Y. Miyoshi, M. Takeo, D. Kato, Y. Higuchi and S. Negoro, Enzymatic Synthesis of Nylon-6 units in Organic Solvent Contained Low-water: Structural Requirement of 6-aminohexanoate-dimer Hydrolase for Efficient Amide Synthesis. 査読有, *J. Mol. Cat. B* 64, 81-88 (2010). DOI: 10.1016/j.molcatb.2010.02.006
- ⑲S. Terawaki, K. Kitano, T. Mori, Y. Zhai, Y. Higuchi, N. Itoh, T. Watanabe, K. Kaibuchi and T. Hakoshima, The PHCCEX Domain of Tiam1/2 is a Novel Protein- and Membrane-binding Module. 査読有, *EMBO J.* 29, 236-250 (2010). DOI:10.1038/emboj.2009.323
- ⑳K. Yasuhira, N. Shibata, G. Mongami, Y. Uedo, Y. Atsumi, Y. Kawashima, A. Hibino, Y. Tanaka, Y-H. Lee, D. Kato, M. Takeo, Y. Higuchi, and S. Negoro, X-ray Crystallographic Analysis of the 6-aminohexanoate Cyclic Dimer Hydrolase: Catalytic Mechanism and Evolution of an Enzyme Responsible for Nylon-6 Byproduct Degradation. 査読有, *J. Biol. Chem.* 285, 1239-1248 (2010). DOI: 10.1074/jbc.M109.041285
- ㉑H. Ogata, Y. Shomura, A. G. Agrawal, A. P. Kaur, W. Gärtner, Y. Higuchi and W. Lubitz, Purification, Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of the Dissimilatory Sulfite Reductase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. 査読有, *Acta Crystallogr.*, F66, 1470-1472 (2010). DOI: 10.1107/S1744309110033191
- ㉒M. Taketa, H. Komori, Y. Hattori, S. Nagao, S. Hirota and Y. Higuchi, Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of Dimeric and Trimeric Cytochromes *c* from Horse Heart. 査読有, *Acta Crystallogr.*, F66, 1477-1479 (2010). DOI: 10.1107/S1744309110034913
- ㉓N. Shibata, H. Tamagaki, S. Ohtsuki, N. Hieda, K. Akita, H. Komori, Y. Shomura, S. Terawaki, T. Toraya, N. Yasuoka and Y. Higuchi, Expression, Crystallization and Preliminary X-ray Crystallographic Study of Ethanolamine Ammonia-lyase from *Escherichia coli*. 査読有, *Acta Crystallogr.*, F66, 709-711 (2010). DOI: 10.1107/S1744309110014478
- ㉔K. Nishikawa, Y. Shomura, S. Kawasaki, Y.

- Niimura and Y. Higuchi, Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of NADH:rubredoxin Oxidoreductase from *Clostridium acetobutylicum*. 査読有, Acta Crystallogr. F66, 23-25 (2010).
- ②K. Nishikawa, Y. Shomura, S. Kawasaki, Y. Niimura, and Y. Higuchi, Crystal Structure of NADH:rubredoxin Oxidoreductase from *Clostridium acetobutylicum*: A Key Component of the Dioxygen Scavenging System in Obligatory Anaerobes. 査読有, Proteins, 78(4), 1066-1070 (2010). DOI: 10.1107/S1744309109047162
- ②H. Komori, D. Seo, T. Sakurai, and Y. Higuchi, Crystallization and Preliminary X-ray Studies of Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreductase Encoded by *Bacillus subtilis* yumC. 査読有, Acta Crystallogr. F66, 301-303 (2010). DOI: 10.1107/S1744309110000151
- [学会発表] (計 34 件)
- ①樋口芳樹, 酸素耐性膜結合型[NiFe]ヒドロゲナーゼの X 線結晶構造解析—水素エネルギー利用に向けた基礎科学的研究—. 関西サイエンスフォーラム, 2011 年 11 月 29 日, リーガロイヤル NCB (大阪).
- ②柴田直樹, 樋口芳樹等, 結晶構造に基づくトキイロヒラタケ由来色素タンパク質の遺伝子クローニング. 日本結晶学会年会, 2011 年 11 月 24 日, 北海道大学 (北海道)
- ③木平清人, 樋口芳樹等, 翻訳終結因子 RF3 の X 線結晶解析. 日本結晶学会年会, 2011 年 11 月 24 日, 北海道大学 (北海道)
- ④樋口芳樹, ゼータサイザーでタンパク質のオリゴマー化を解析する. 日本結晶学会年会, 2011 年 11 月 24 日, 北海道大学 (北海道)
- ⑤小森博文, 樋口芳樹等, マルチ銅酸化酵素の構造解析. 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 23 日, 京都国際会館 (京都)
- ⑥H. Komori, Y. Higuchi, et al., High-Resolution X-Ray Crystal Structure Analysis of a Multicopper Oxidase, CueO and Structure Change in the Trinuclear Copper Center by Hydrated Electron. 錯体化学会第 61 回討論会, 2011 年 9 月 18 日, 岡山大学 (岡山)
- ⑦Y. Shomura, Y. Higuchi et al., Structural study of the O₂-tolerant [NiFe] hydrogenase. 第 49 回日本生物物理学会年会, 2011 年 9 月 17 日, 兵庫県立大学 (兵庫県).
- ⑧林有吾, 樋口芳樹等, シトクロム c-552 の多量体生成と二量体構造. 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム, 2011 年 9 月 14 日 (つくば国際会館 (茨城県)).
- ⑨K. Kihira, Y. Higuchi et al., Crystal structure analysis of release factor 3. XXII Congress and General Assembly of International Union of Crystallography, 2011 年 8 月 28 日, Madrid (Spain).
- ⑩N. Shibata, Y. Higuchi et al., Primer design for cDNA synthesis based on the crystal structure. XXII Congress and General Assembly of International Union of Crystallography, 2011 年 8 月 27 日, Madrid (Spain).
- ⑪廣田俊, 樋口芳樹等, ウマシトクロム c および緑膿菌シトクロム c₅₅₁ の多量体形成. 第 38 回生体分子科学討論会, 2011 年 6 月 23 日 (つくば国際会館, 茨城県).
- ⑫長尾聡, 樋口芳樹等, ウマミオグロビン二量体の立体構造および酸素結合特性. 日本化学会第 91 春期年会, 2011 年 3 月 25 日, 神奈川大学 (神奈川県).
- ⑬林有吾, 樋口芳樹等, 好熱菌由来シトクロム c₅₅₂ 二量体の構造と安定性. 日本化学会第 91 春期年会, 2011 年 3 月 25 日, 神奈川大学 (神奈川県).
- ⑭Y. Higuchi, Can we elucidate the reaction mechanism of [NiFe] hydrogenase by neutron diffraction study? Neutron Structural Biology -Hydration Structure in Proteins-, 2011 年 3 月 4 日, 日本原子力開発研究機構 (茨城県).
- ⑮Y. Shomura Y. Higuchi et al., Structural Basis for the Reaction Mechanism of Dissimilatory Sulfite Reductase. International Symposium on Chemistry of Reductases IV, 2011 年 1 月 20-21 日, 名古屋大学 (愛知県).
- ⑯N. Shibata, Y. Higuchi et al., Structural Basis for the Apparent lack of Stereospecificity in Coenzyme B₁₂-dependent Radical Enzyme Ethanolamine Ammonia-lyase. International Symposium on Chemistry of Reductases IV, 2011 年 1 月 20-21 日, 名古屋大学 (愛知県).
- ⑰H. Komori and Y. Higuchi, Structure and molecular evolution of multicopper blue proteins. International Symposium on Chemistry of Reductases IV, 2011 年 1 月 20-21 日, 名古屋大学 (愛知県).
- ⑱M. Taketa, Y. Shomura and Y. Higuchi, Crystallization and X-ray Analysis of ATP-sulfurylase from Sulfate-reducing Bacteria. International Symposium on Chemistry of Reductases IV, 2011 年 1 月 20-21 日, 名古屋大学 (愛知県).
- ⑲S. Terawaki and Y. Higuchi, Expression and Purification of the Rab GTPase-effector Complex. International

- Symposium on Chemistry of Reductases IV, 2011年1月20-21日,名古屋大学(愛知県).
- ⑳柴田直樹, 樋口芳樹等, B12-補酵素関与エタノールアミアンモニアリアーゼの立体構造に基づく立体化学経路の解明. 第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生化学会大会 合同大会, 2010年12月7日, ポートピアホテル(兵庫県).
- ㉑寺脇慎一, 樋口芳樹等, Wntシグナル伝達で機能するCCD1 DIXドメインのX線結晶構造解析. 第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生化学会大会 合同大会, 2010年12月7日, ポートピアホテル(兵庫県).
- ㉒小森博文, 樋口芳樹等, 枯草菌由来フェレドキシン-NADPH 還元酵素のX線結晶構造解析. 2010年度日本結晶学会年会, 2010年12月3-5日, 大阪大学(大阪府).
- ㉓庄村康人, 樋口芳樹等, 膜結合型[NiFe]ヒドロゲナーゼのX線結晶構造解析. 2010年度日本結晶学会年会, 2010年12月3-5日, 大阪大学(大阪府).
- ㉔寺脇慎一, 樋口芳樹等, Wntシグナル伝達で機能するCCD1のオリゴマー形成機構に関する構造学的研究. 2010年度日本結晶学会年会, 2010年12月3-5日, 大阪大学(大阪府).
- ㉕N. Shibata, Y. Higuchi et al., Basis for the Lack of Stereospecificity in Coenzyme B₁₂-dependent Ethanolamine ammonia-lyase. The 10th Conference of the Asian Crystallographic Association, 2010年11月1-3日, Pusan(Korea).
- ㉖H. Akutsu, Y. Higuchi et al., The Role of the π -electron System in Regulation of Reduction Potentials of Tetraheme Cytochrome c₃. The 10th Conference of the Asian Crystallographic Association, 2010年11月1-3日, Pusan(Korea).
- ㉗H. Tanaka, Y. Higuchi et al., Improved Technologies for High-resolution X-ray Crystallography. The 10th Conference of the Asian Crystallographic Association, 2010年11月1-3日, Pusan(Korea).
- ㉘S. Negoro, Y. Higuchi et al., Enzymatic Degradation and Synthesis of Nylon-6 Related Compounds. International Symposium on BioPolymers 2010, 2010年10月4日, Stuttgart(Germany).
- ㉙S. Hirota, Y. Higuchi et al., Cytochrome c Polymerization by Successive Domain Swapping at the C-terminal Helix. 日本生物物理学会第48回年会, 2010年9月22日, 東北大学(宮城県).
- ㉚K. Kihira, Y. Higuchi et al., Structural Analysis of Release Factor 3. 日本生物物理学会第48回年会, 2010年9月22日, 東北大学(宮城県).

- ㉛小森博文, 樋口芳樹等, マルチ銅酸化酵素の構造解析. 生物高分子学会2010年度大会, 2010年9月10日, 兵庫県立大学(兵庫県).
- ㉜樋口芳樹, ナイロンオリゴマー分解酵素の精密構造解析 ~新規酵素機能の創成を目指して~. 第10回日本蛋白質科学会年会, 2010年6月18日, 北海道大学(北海道).
- ㉝柴田直樹, 樋口芳樹等, Wntシグナル制御因子Dishevelled-DIXドメインのX線構造解析. 第10回日本蛋白質科学会年会, 2010年6月16日, 北海道大学(北海道).
- ㉞寺脇慎一, 樋口芳樹等, Wntシグナル伝達機構ではたらくCCD1の構造化学的研究. 第10回日本蛋白質科学会年会, 2010年6月16日, 北海道大学(北海道).

[図書] (計4件)

- ① 樋口芳樹, 中川敦史, 構造生物学, 共立出版, 253ページ(2010).
- ②S. Hirota and Y. Higuchi, Structures of Dimeric and Trimeric Cytochrome c and Its Polymerization Mechanism, SPring-8 Research Frontiers2010, pp32-22 (2011).
- ③W. Lubitz, H. Ogata, E. Reijerse and Y. Higuchi, Structural and Functional Features of Hydrogenase Enzymes, Molecular Solar Biofuels, pp288-325. edited by T. Wydrzynski and W. Hillier, published by Royal Society Chemistry, Cambridge (2011).
- ④庄村康人, 樋口芳樹, 新規の鉄-硫黄クラスターが生み出すヒドロゲナーゼの酸素耐性機構, ライフサイエンス新着レビュー(2011), <http://first.lifesciencedb.jp/archives/3775>.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 芳樹 (HIGUCHI YOSHIKI)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授
研究者番号: 90183574

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: