

令和 6 年 5 月 6 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19H00984

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Structural basis of reaction mechanism and proton pathway of [NiFe]-hydrogenase

研究代表者

樋口 芳樹 (Higuchi, Yoshiki)

兵庫県立大学・理学研究科・特任教授

研究者番号：90183574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,900,000円

研究成果の概要(和文)：標準的[NiFe]ヒドロゲナーゼ(酸化型)の中性子結晶解析に成功し、活性部位には平面四角形Ni(II)構造が混在し、近接の[4Fe-4S]の配位S原子に低障壁水素結合を同定した。弱酸素耐性ヒドロゲナーゼのCO結合型の結晶構造から酸素耐性とCO耐性に正の相関を提案した。酸化型NAD<sup>+</sup>還元[NiFe]ヒドロゲナーゼの結晶FT-IRの解析に成功し、活性部位のNi(IV)構造が酸素耐性に寄与していると結論した。植物葉上共生細菌由来のギ酸脱水素酵素のX線解析に成功し、他のエネルギー代謝酵素との進化的関係を明らかにした。ラマン分光法による活性測定法を開発し、本酵素の気液界面触媒反応性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究における学術的意義は、『高分解能中性子結晶解析』による巨大タンパク質内で重要な役割を担う水素原子の可視化であった。元素の中で最も小さな水素原子は、『プロトン、ヒドリド、水素分子』と変幻自在に形を変えて化学反応に関与する。[NiFe]ヒドロゲナーゼの水素分解・合成反応では『ヒドリド』と『プロトン』の挙動が反応機構解明に重要である。特に水分子を含んだ水素結合ネットワークに支えられた高効率プロトン伝達機構の正確な知見を中性子結晶解析法で得ることで、触媒反応を効率化する『タンパク質場』を真に理解できる。この理解が進めば、今後、燃料電池等にも応用して卓越した新規の製品開発に貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：Neutron crystallographic analysis of a standard [NiFe]-hydrogenase in the oxidized form was successfully performed. The active site was found to contain a planar square Ni(II). A low-barrier hydrogen bond at the ligand (S) of the proximal Fe-S was found, suggesting that the Fe-S functions as an electron donor when O<sub>2</sub> invades. Based on the crystal structure of the CO-bound form of the weakly oxygen-tolerant hydrogenase, a positive correlation between oxygen and CO tolerance was proposed.

FT-IR analysis of the oxidized NAD<sup>+</sup>-reducing [NiFe]-hydrogenase was successfully performed, and it was concluded that the Ni(IV) structure of the active site contributes to oxygen tolerance. X-ray analysis of the formate dehydrogenase from one of the plant symbiotic bacteria revealed its evolutionary relationship with other energy-metabolizing enzymes.

We also developed a Raman method to assay hydrogenases, and found that the enzyme is catalytically active mainly at the gas-liquid interface.

研究分野：構造生物学

キーワード：ヒドロゲナーゼ 中性子結晶解析 X線結晶解析 プロトン経路 ラマン分光法 酵素活性定量法 酸素耐性酵素

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究における学術的な背景は、X線結晶解析法による蛋白質の精密構造に基づいた研究だけでは明らかにできない『課題の克服』であった。すなわち『高分解能中性子結晶解析』による巨大蛋白質内の水素原子完全可視化への挑戦である。X線結晶解析法では水素原子の同定には疑念が付きまとう。元素の中で最も小さな水素原子は、『プロトン、ヒドリド、水素分子』と変幻自在に形を変えて化学反応に関与する。酵素の触媒反応の本質を理解するには、これらの水素原子種の位置と動きを正確に知る必要がある。特に[NiFe]ヒドロゲナーゼの水素分解・合成反応では、NiとFeの間のヘテロな空間を架橋すると考えられている『ヒドリド』の配向と挙動が反応機構解明に重要である。一方、酸化還元反応には、電子伝達とともにプロトン移動も重要である。しかし、X線結晶解析、分光解析および変異体解析においてもプロトン経路の証明は難しい。また、現段階で可能なプロトン経路は複数力所もあるため、中性子結晶解析で実験的に経路を特定できなければ理論化学計算のみを駆使しても正確な議論は不可能である。水分子を含んだ巧妙な水素結合ネットワークに支えられた高効率プロトン伝達機構の正確な知見なくしては、蛋白質の卓越した機能、すなわち、触媒反応を効率化する『蛋白質場』を真に理解することはできない。

[NiFe]ヒドロゲナーゼの高分解能中性子結晶解析を完遂すれば、長年の研究目標であった活性部位での『水素分子の合成・分解の反応機構解明』に加えて、『蛋白質内プロトン経路の実験的証明(プロトン場の重要性の理解)』、プロトンネットワークにおける『水分子の動的再配置の重要性』、ヒドロゲナーゼの『酸素耐性に対する水分子の役割』を明かにできる。また、本研究により、ラマン分光法を応用した酵素活性定量法の開発に成功すれば、触媒反応における『水素同位体効果』などの学術的『問い』に対する解も得られると期待できる。

### 2. 研究の目的

本申請研究は、[NiFe]ヒドロゲナーゼが有する卓越した機能・『高い水素合成・分解触媒反応を理解するために、『反応中間体』と『水分子の精緻な配置と配向に基づく水素結合ネットワーク上の高効率なプロトン伝達経路』の構造基盤を解明することを第一目的とする。このために下記の課題1と課題3を掲げる。本目的を達成することで、Ni-Fe活性部位での反応モデル構築のための酵素反応パラメータを求めることが可能になり、その結果触媒反応機構の解明に繋がる。第二の目的は、ヒドロゲナーゼに見出された酸素耐性機構を水の構造(酸化還元依存した動的再配置)や周辺官能基の構造柔軟性から理解することである。このために下記の課題1と課題2を掲げる。本目的の達成で酵素電池等の応用への道が拓けるとともに蛋白質内部のプロトン移動制御の本質や水素の同位体効果を研究する新しい学問分野の構築が可能となる。

### 3. 研究の方法

課題1：ヒドロゲナーゼの高分解能中性子構造化学：

酵素を水素分子( $H_2$ )で活性化してプロトン経路を $H^+$ でラベルした結晶について高分解能(1.8 Å分解能程度)の中性子回折データを取得する。中性子回折用の結晶は重水中で調製するが、この時、分子中の可換プロトン・ $H^+$ はほとんど $D^+$ に置換されているため、 $H_2$ で活性化することでプロトン経路を同定できる。また、同じ結晶からSPring-8にて超高分解能(1.0 Å分解能程度)のX線回折データを収集し、中性子およびX線回折データの両方を用いて構造精密化を行う。酸化型酵素の構造結果と比較することで分子内のプロトン経路を特定する。活性サイクルの3種類の間接体、Ni-C、N-R、Ni-SIa型における基質水素の結合状態を核密度分布図上で観察す

る。得られた構造情報に基づいて理論化学計算によるシミュレーションと検証も加味してプロトン移動も含めた触媒反応の全容を解明する。これにより、ヒドロゲナーゼの分子内部の高効率『プロトン場』の構造基盤が提示できる。ここで、 $H_2$ で活性化した結晶を重水素分子・ $D_2$ で再度活性化させ、プロトン経路を全て  $D^+$  で上塗りして中性子結晶解析を行えば、プロトン経路は完全に同定できる。さらに、完全重水素化ヒドロゲナーゼのX線および中性子結晶構造解析にも挑む。また、課題3のラマン分光法を用いた活性測定結果とも合わせてヒドロゲナーゼ分子内の同位体効果について理論的に考察する。そのために蛋白質構成アミノ酸の全水素を重水素化した完全重水素化ヒドロゲナーゼを調製するための発現系構築を計画する。

課題2：ヒドロゲナーゼの酸素耐性機構・一般則の確立：

酸素耐性をもたない標準的酵素はCOを結合し、活性部位の最近位に位置するクラスターは[4Fe-4S]-4Cysである。CO結合型をつくらない典型的な膜結合性の酸素耐性酵素は、最近位のクラスターは[4Fe-3S]-6Cysで、 $O_2$ が侵入すると超酸化型構造に変化し活性部位に電子を供給する。標準的酵素と同様に、最近位に[4Fe-4S]-4Cysをもつ「弱」酸素耐性ヒドロゲナーゼについて、競争阻害剤である一酸化炭素(CO)を結合させた結晶試料の高分解能X線解析を進める。得られた結果から酸素耐性とCO耐性の構造化学的相関について考察する。また、酸素感受性の高い標準的酵素に酸素耐性を付与した変異体等を調製するための発現系の構築を検討する。2017年に構造解明した $NAD^+$ 還元ヒドロゲナーゼは、Ni-Fe活性部位自体が酸素による修飾を防御する機構や活性酸素種の生成を抑える分子機構を備えている。これらとの構造比較から共通の構造基盤を抽出するとともに、分光学的なデータからそれらの構造機能相関を検証する。さらに、酸化還元同期した活性部位周辺の水分子ネットワークの可逆的な再構築についても理論化学的に検証する。一方、標準的[NiFe]ヒドロゲナーゼが $O_2$ で不活性化される時の構造変化を詳細に調べて酸素耐性機構を検証する。

課題3：ラマン分光法によるヒドロゲナーゼ触媒活性定量法の開発：

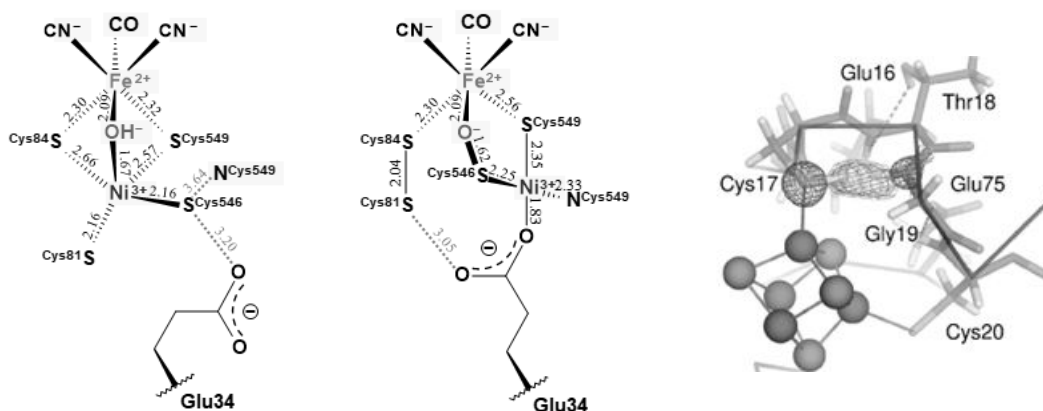
再現性の高いデータを得るために測定システム全体を改良して測定方法を確立し、酵素触媒反応に関わるパラメータを見積もり、それを基に反応モデルの構築を目指す。これまでに得られているヒドロゲナーゼの触媒反応における次の特徴1~3を検証する。特徴1： $D_2/H_2O$ 系での水素-重水素交換反応は、反応部位で同時に2原子交換が起こり、 $H_2/D_2O$ が生成する、特徴2：酵素反応は溶液内での均一反応ではなく、主として気液界面で不均一反応として進む、特徴3：酵素は、 $D^+$ よりも $H^+$ を選択的に分子内に取り込んで利用している(同位体効果)。

#### 4. 研究成果

課題1：ヒドロゲナーゼの高分解能中性子構造化学：

硫酸還元菌・*Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F由来の標準的[NiFe]-ヒドロゲナーゼ(DvMF酵素)の酸化型について、高分解能中性子結晶構造解析(2.20 Å)に成功した。酸化型酵素のNi-Fe活性部位は、従来型の(活性化が容易な)両面四角錐・Ni(図1aのNi-B)構造と、活性化に構造変化を要する平面四角形・Ni( ) (図1bの歪んだ新規構造)構造の2種類の混合物であることを見出した。この時、平面四角形構造のNi原子は従来型構造(Ni-Bや活性型のNi-C)の位置から1.0 Å以上移動し、さらにNi-B構造でNiに配位していたCys81, Cys84, Cys546, Cys549の4個のS原子のうち、Cys84とCys81は遊離して両者はジスルフィド結合を形成していた。結果として、Niには、Cys546とCys549のS原子, Glu34のカルボキシO原子とCys549のアミドN原子が配位結合していた。Glu34は酸化されることで側鎖を回転して構造変化していた。また、Cys546のS原子は酸素化され、そのO原子はFeに配位していた。この配位構造は、Ni-Aとしてこれまで提案されてい

たものとも異なっていた。これらの構造モデルは、異常分散効果を考慮した1.04 Åの超高分解能X線結晶解析や酸化型酵素溶液の赤外吸収スペクトルの結果とも矛盾しなかった。また、理論化学計算の結果、平面四角形錯体構造のNiの価数は、Ni( )ではなく、Ni( )が最適であった。



a. 両面四角錐型 (Ni<sup>2+</sup>-B)      b. 平面四角形型 (Ni<sup>2+</sup>)

図1. 中性子結晶解析で明らかになった酸化型DvMF酵素・Ni-Fe活性部位の2種類の配位構造。

図2. DvMF酵素の近位[4Fe-4S]のクラスターに見出された低障壁水素結合。

さらに、3個の鉄-硫黄クラスターのうち、活性部位に最近位にある[4Fe-4S]クラスターの配位子・Cys17のS原子と近傍の主鎖アミド (Gly17) のN原子との間に「低障壁水素結合」と思われる構造を同定した (図2, アミドN原子のプロトンがS原子側に引き寄せられている)。この特異な構造は、酵素がO<sub>2</sub>に晒された時、O<sub>2</sub>を還元無毒化するための防御機構として活性部位がクラスターから電子を奪い取ろうとする力が働いた結果であると考えられる。これは課題2の酸素耐性一般則とも関係する。上記成果は、英国王立化学会の*Chemical Science*誌に発表した。

水素還元結晶の中性子結晶解析結果からプロトン経路を可視化する課題については、本研究期間内に達成できなかった。蛋白質の中性子結晶解析には、1 mm<sup>3</sup> 以上の容積を持つ巨大結晶を必要とする。この巨大結晶を水素で還元することを試みたが、結晶内部分子の活性部位を完全に還元できなかった。今後は水素の圧力を上げて還元する装置や電気化学的に結晶を強制的に還元する手法の開発が必要と考えている。酵素の発現系の構築についても期間内に達成できなかった。

## 課題2：ヒドロゲナーゼの酸素耐性機構・一般則の確立：

*Citrobacter S-77*の弱酸素耐性[NiFe]ヒドロゲナーゼ (S-77酵素) のCO結合型のX線結晶解析に成功した。酸素耐性酵素の活性部位にはCOは結合しないが、酸素感受性の標準的酵素はCOが結合する(占有率・Q>0.5)比較的小さい酸素耐性をもつ本S-77酵素において、占有率は低い(Q=0.26)が、COは結合するという結果が得られた。これまでに報告されているデータに基づく、ヒドロゲナーゼのCOによる活性阻害は、標準的酵素 > S-77酵素 > 酸素耐性酵素の順に大きく、CO結合の占有率も同様であることから、酸素耐性とCO耐性には正の相関があると考えられた。本結果は、2022年に国際結晶学連合の *Acta Crystallographica F*誌に発表した。

好熱生水素酸化細菌・*Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1由来のNAD<sup>+</sup>還元[NiFe]ヒドロゲナーゼ (TH-1酵素) の酸化型の結晶FT-IR・EPRの測定と解析に成功した。本酵素は酸素雰囲気下で酸化されると、活性部位の配位構造が変化し、酸素の侵入を物理的に防ぐ機構を持っている。我々は、2017年に酸化型酵素の活性部位は、近傍のGlu32側鎖が回転してNiに配位しているとX線結晶解析の結果を発表した。本研究では、Glu32変異体や活性部位のCO配位子を「<sup>13</sup>C<sup>18</sup>O」で標識した試料を調製した。それらの性質の変化と構造の関係についての分光学的データおよび理論

化学計算から, Niの価数を( )と導いた. その結果, Ni( )の電子状態とGlu32側鎖(COO<sup>-</sup>)のNiへの直接配位が活性部位を侵入してきた酸素から防御していると結論した. (この時, 還元(活性)型でGlu34側鎖を固定していた水分子の動きがGlu34の構造柔軟性にとって極めて重要であった. 本結果は, 2022年度末にアメリカ化学会の *J. Am. Chem. Soc.* 誌に発表した. また, 還元型酵素結晶についての分光学的解析の結果, 活性型酵素の触媒サイクルの中間状態うち, Ni-SR状態とNi-C状態間の平衡が温度によって変化することを見出した. この反応中間状態間の平衡の温度依存性は, Ni-Fe活性部位と最近接の[4Fe-4S]クラスター間で行われる「電子およびH<sup>+</sup>の授受」で制御されると結論した. これは課題1の酸化型標準的酵素の中性子解析結果と矛盾しない.

植物葉上共生細菌・*Methylobacterium extorquens* AM1由来のギ酸脱水素酵素(FODH)のX線結晶構造解析に成功した. 他のMo-FODH, および, W-FODHと同様に, 活性部位は「W」原子を, bis-MGD (metal-binding pterin guanine dinucleotide cofactor) の4個のS原子, Cys436のS原子, および, 水分子のO原子の6個の配位子が三角プリズムの頂点を形成する幾何学的配置で配位することで形成されていた. 全体構造は および の2つのサブユニットから成り, は「W」活性部位と3個の[4Fe-4S]クラスターを有し, はNAD<sup>+</sup>結合部位, FMNと2個の[4Fe-4s]と1個の[2Fe-2S]クラスターを含む構造であった. 分子全体のサブユニット構造は, *Thermotoga maritima*由来の[FeFe]ヒドロゲナーゼ(FeFe酵素)に似ているが, *Thermus thermophilus* 由来のComplex Iの部分構造(Nqo1-3)とも酷似していた(図3). 一方, サブユニットのみに注目すると, 本申請研究のTH-1酵素のHoxFUサブユニットと高い相同性を示した(図3). これらの酵素はそれぞれ同じ祖先を持つサブユニットが再構築することにより構成されており, 進化的に強く関係づけられていることを証明した. 本FODHもNAD<sup>+</sup>還元[NiFe]ヒドロゲナーゼと同様に酸素耐性をもつことから, その構造基盤を明らかにすることで酸素耐性の普遍的メカニズムの解明が期待される. 今後, 還元型の結晶解析を目指す.

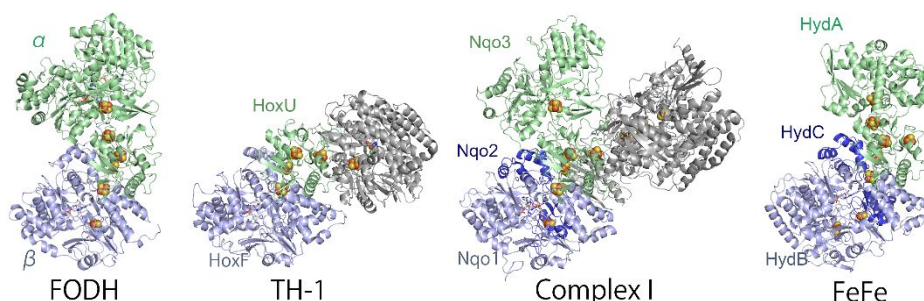


図3 FODH, TH-1, Complex I, および, FeFe酵素のサブユニット構造の比較

### 課題3: ラマン分光法によるヒドロゲナーゼ触媒活性定量法の開発:

硫酸還元菌由来の標準的[NiFe]ヒドロゲナーゼを試料として, ラマン分光法による新規の酵素活性定量法を開発した. 本手法でヒドロゲナーゼの触媒活性を定量したところ, 酵素活性は主に気液界面で進行していることを見出した. 気液界面の面積を最大にすることを目指して, 酵素溶液をエアロゾルにして基質(水素)中に浮遊させて活性測定する方法のプロトタイプを試作した. その結果, 酵素溶液をエアロゾル化することで見かけの初期反応速度が大幅に上昇することを確認した. 今後は, 酵素反応の気液界面反応性をさらに詳細に検証し, 論文発表を進める. また, メタン等他の難溶性の気体を基質とする酵素の活性を正確に測定する実験手法の開発への応用を目指す.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 17件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 T. Hiromoto, K. Nishikawa, S. Inoue, H. Ogata, Y. Hori, K. Kusaka, Y. Hirano, K. Kurihara, Y. Shigeta, T. Tamada and Y. Higuchi	4. 巻 35
2. 論文標題 New insights into the oxidation process from neutron and X-ray crystal structures of an O <sub>2</sub> -sensitive [NiFe]-hydrogenase	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 9306-9315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D3SC02156D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 A. Kobayashi, M. Taketa, K. Sowa, K. Kano, Y. Higuchi and H. Ogata	4. 巻 10
2. 論文標題 Structure and function relationship of formate dehydrogenases: an overview of recent progress	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 IUCrJ.	6. 最初と最後の頁 544-554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2052252523006437	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 S. Negoro, N. Shibata, D. Kato, Y. Tanaka, K. Yasuhira, K. Nagai, S. Oshima, Y. Furuno, R. Yokoyama, K. Miyazaki, M. Takeo, K. Hengphasatporn, Y. Shigeta, Y. Lee and Y. Higuchi	4. 巻 290
2. 論文標題 X-ray crystallographic and mutational analysis of the NylC precursor: Catalytic mechanism of autocleavage and substrate hydrolysis of nylon hydrolase	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS J.	6. 最初と最後の頁 3400-3421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16755	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 C. J. Kulka-Peschke, A-C. Schulz, C. Lorent, Y. Rippers, S. Wahlefeld, J. Preissler, C. Schulz, C. Wiemann, C. C. M. Bernitzky, C. Karafoulidi-Retsou, S. L. D. Wrathall, B. Procacci, H. Matsuura, G. M. Greetham, C. Teutloff, L. Lauterbach, Y. Higuchi, M. Ishii, N.T. Hunt, O. Lenz, I. Zebger, M. Horch	4. 巻 144
2. 論文標題 Reversible Glutamate Coordination to High-valent Nickel Protects the Active Site of a [NiFe] hydrogenase from Oxygen	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Am. Chem. Soc.	6. 最初と最後の頁 17022-17032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.2c06400	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 T. Imanishi, K. Nishikawa, M. Taketa, K. Higuchi, H. Tai, S. Hirota, H. Hojo, T. Kawakami, K. Hataguchi, K. Matsumoto, H. Ogata and Y. Higuchi	4. 巻 F78
2. 論文標題 Structural and Spectroscopic Characterization of CO Inhibition of [NiFe]-hydrogenase from <i>Citrobacter</i> sp. S-77	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Crystallogr.	6. 最初と最後の頁 66-74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2053230X22000188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 N. Shibata, Y. Higuchi, B. Krautler and T. Toraya	4. 巻 28
2. 論文標題 Structural Insights into the Very Low Activity of the Homocoenzyme B12 Adenosylmethylcobalamin in Coenzyme B12-dependent Diol Dehydratase and Ethanolamine Ammonia-lyase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemistry-A Europ. J.	6. 最初と最後の頁 e202202196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202202196	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 S. Nagao, A. Idomoto, N. Shibata, Y. Higuchi and S. Hirota	4. 巻 217
2. 論文標題 Rational design of metal-binding sites in domain-swapped myoglobin dimers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Inorg. Biochem.	6. 最初と最後の頁 111374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jinorgbio.2021.111374	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Hiromoto, K. Nishikawa, T. Tamada, and Y. Higuchi	4. 巻 64
2. 論文標題 The Challenge of Visualizing the Bridging Hydride at the Active Site and Proton Network of [NiFe]-hydrogenase by Neutron Crystallography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Topics in Catalysis	6. 最初と最後の頁 622-630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11244-021-01417-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 C. Xie, H. Shimoyama, M. Yamanaka, S. Nagao, H. Komori, N. Shibata, Y. Higuchi, Y. Shigeta, and S. Hirota	4. 巻 11
2. 論文標題 Experimental and Theoretical Study on Converting a Monomeric Protein into Domain-swapped Dimer by Utilizing a Tight Hydrogen Bond Network at the Hinge Region for Myoglobin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RCS Advances	6. 最初と最後の頁 37604-37611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1ra06888a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 R. N. Cahyono, M. Yamanaka, S. Nagao, N. Shibata, Y. Higuchi and S. Hirota	4. 巻 12(3)
2. 論文標題 3D Domain Swapping of Azurin from Alcaligenes xylosoxidans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Metallomics	6. 最初と最後の頁 337-345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9mt00255c	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 S. Nagao, A. Suda, H. Kobayashi, N. Shibata, Y. Higuchi, and S. Hirota	4. 巻 15
2. 論文標題 Thermodynamic Control of Domain Swapping by Modulating Helical Propensity in the Hinge Region of Myoglobin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry-An Asian Journal	6. 最初と最後の頁 1743-1749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/asia.202000307	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Hiromoto, K. Nishikawa, S. Inoue, H. Matsuura, Y. Hirano, K. Kurihara, K. Kusaka, M. Cuneo, L. Coates, T. Tamada and Y. Higuchi	4. 巻 D76
2. 論文標題 Towards cryogenic neutron crystallography on the reduced form of [NiFe]-hydrogenase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Crystallogr	6. 最初と最後の頁 946-953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2059798320011365	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する



1. 著者名 H. Tai, K. Nishikawa, Y. Higuchi, Z-w. Mao and S. Hirota	4. 巻 58
2. 論文標題 Cysteine SH and glutamate COOH contributions to [NiFe] hydrogenase proton transfer revealed by highly sensitive FT-IR spectroscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angew. Chem. Int. Ed.,	6. 最初と最後の頁 13285-13290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201904472	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 K. Nishikawa, H. Ogata and Y. Higuchi	4. 巻 49
2. 論文標題 Structural Basis of the Function of [NiFe]-hydrogenases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 164-173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.190814	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Y. Shomura and Y. Higuchi	4. 巻 1
2. 論文標題 NAD+-reducing [NiFe]-hydrogenase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/9781119951438.eibc2697	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 柴田直樹, 末吉由依, 樋口芳樹, 虎谷哲夫	4. 巻 33
2. 論文標題 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	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 放射光	6. 最初と最後の頁 33-42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 樋口芳樹	4. 巻 38
2. 論文標題 生物のエネルギー代謝酵素の分子進化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験医学増刊 イメージング時代の構造生命科学	6. 最初と最後の頁 56-59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計30件 (うち招待講演 12件 / うち国際学会 12件)

1. 発表者名 Y. Higuchi, T. Hiromoto, K. Nishikawa, H. Ogata, Y. Hori, Y. Shigeta, T. Tamada
2. 発表標題 Structural and functional studies on [NiFe]-hydrogenases
3. 学会等名 26th Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2023) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 ○廣本 武史、西川 幸志、樋口 芳樹、玉田 太郎
2. 発表標題 中性子結晶構造解析を用いたヒドロゲナーゼ酸化型における 特徴的な水素結合の観察
3. 学会等名 日本結晶学会2023年度年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 ○廣本 武史、西川 幸志、樋口 芳樹、玉田 太郎
2. 発表標題 中性子およびX線を相補的に用いたヒドロゲナーゼ酸化型の立体構造解析
3. 学会等名 量子生命科学会第5回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 ○Cheng Xie, Hiromitsu Shimoyama, Masaru Yamanaka, Satoshi Nagao, Hirofumi Komori, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Yasuteru Shigeta and Shun Hirota
2. 発表標題 Conversion of a Monomeric Protein into a Domain-swapped Dimer by Utilizing a Tight Hydrogen Bond Network at the Hinge Region for Myoglobin
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Chemistry (AsBIC10) (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ○Takeshi Hiromoto, Koji Nishikawa, Taro Tamada, Yoshiki Higuchi
2. 発表標題 NEUTRON AND X-RAY DIFFRACTION STUDIES ON THE OXIDIZED STATE OF [NIFE]-HYDROGENASE FROM D. VULGARIS MIYAZAKI F
3. 学会等名 2nd International Symposium "Hydrogenomics" (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ○玉田 太郎、廣本 武史、西川 幸志、樋口 芳樹
2. 発表標題 Desulfovibrio vulgaris Miyazaki F株由来[NiFe]-ヒドロゲナーゼ酸化型の中性子 / X線結晶構造解析
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺脇慎一、藤田祥平、中込蒼一郎、石渡拓也、清水結加、笠野一郎、井上裕介、塩見健輔、榎正幸、柴田直樹、樋口芳樹、若松馨
2. 発表標題 Axinオリゴマーの構造変化を介したWntシグナル伝達制御の構造基盤
3. 学会等名 第95回日本生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ○廣本 武史、西川 幸志、樋口 芳樹、玉田 太郎
2. 発表標題 X線回折データを相補的に用いたヒドロゲナーゼ酸化型の中性子結晶構造解析
3. 学会等名 日本結晶学会2022年度年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 樋口芳樹
2. 発表標題 [NiFe]ヒドロゲナーゼの分子機能の構造基盤
3. 学会等名 CBI学会2021年大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiromitsu Shimoyama, Masaru Yamanaka, Satoshi Nagao, Hirofumi Komori, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Yasuteru Shigeta, and Shun Hirota
2. 発表標題 Experimental and theoretical study on converting myoglobin into a stable domain-swapped dimer by utilizing a tight hydrogen bond network at the hinge region
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 樋口芳樹
2. 発表標題 水素発生分解酵素・ヒドロゲナーゼの構造生物学
3. 学会等名 バイオインダストリー協会 発酵と代謝研究会 第2回勉強会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樋口芳樹
2. 発表標題 ヒドロゲナーゼによる水素合成・分解についての構造化学
3. 学会等名 ポリマーフロンティア21 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樋口芳樹
2. 発表標題 ヒドロゲナーゼによる水素合成・分解についての構造化学
3. 学会等名 兵庫県立大学・水素エネルギー共同研究センター研究発表 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田 直樹, 樋口 芳樹, 虎谷 哲夫
2. 発表標題 ラジカルB12酵素ジオールデヒドラターゼ アデノシルメチルコバラミン複合体の立体構造
3. 学会等名 第463回ビタミンB研究協議会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koji Nishikawa, Yuka Nakagawa, Shota Inoue, Takfumi Chuji, Satoshi Nakashima, Yasuteru Shigeta, Katsuyuki Fukutani and Yoshiki Higuchi
2. 発表標題 New assay method for the enzymatic reaction with gaseous substrates by RAMAN spectroscopy
3. 学会等名 Material Research Meeting 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 T. Tamada, T. Hiromoto, K. Nishikawa, Y. Hirano, K. Kusaka, L. Coates, Y. Higuchi
2. 発表標題 Neutron diffraction studies of [NiFe]-hydrogenase from <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Miyazaki F
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今西隆浩, 熊坂崇, 奥村英夫, 仲村勇樹, 松浦滉明, 樋口芳樹
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本結晶学会2020年度年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 樋口芳樹
2. 発表標題 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～
3. 学会等名 若狭湾エネルギー研究所・先端技術セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 T. Tamada, T. Hiromoto, K. Nishikawa, K. Kurihara, Y. Hirano, Y. Higuchi
2. 発表標題 Neutron diffraction studies of [NiFe] hydrogenase from <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Miyazaki
3. 学会等名 12th International Conference on Hydrogenases (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Higuchi
2. 発表標題 Role of water network for O <sub>2</sub> -stability of [NiFe]-hydrogenases
3. 学会等名 12th International Conference on Hydrogenases (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Higuchi
2. 発表標題 Structural Studies on [NiFe]-hydrogenases-Role of water/proton-network for O <sub>2</sub> -stability
3. 学会等名 I2CNER International Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 樋口芳樹
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第16回Cat-CVD研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Hiromoto, K. Nishikawa, H. Matsuura, Y. Hirano, K. Kusaka, M. Cuneo, T. Tamada, Y. Higuchi
2. 発表標題 Neutron diffraction experiments on [NiFe]-hydrogenase reduced under H <sub>2</sub> atmosphere
3. 学会等名 The 6th International Symposium on Diffraction Structural Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Imanishi, H. Matsuura, H. Hasuike, T. Hiromoto, Y. Higuchi
2. 発表標題 Expression, purification and crystallization of HybA in Hyb-type [NiFe]-hydrogenase
3. 学会等名 The 6th International Symposium on Diffraction Structural Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Higuchi
2. 発表標題 STRUCTURAL STUDIES ON [NiFe]-HYDROGENASES
3. 学会等名 3rd International Solar Fuels Conference/International Conference on Artificial Photosynthesis-2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上翔太、西川幸志 樋口芳樹
2. 発表標題 [NiFe]ヒドロゲナーゼ近位[FeS]クラスターの酸化による構造変化
3. 学会等名 日本結晶学会2019年度年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 玉田 太郎、廣本 武史、西川 幸志、井上 誠也、平野 優、樋口 芳樹
2. 発表標題 Desulfovibrio vulgaris Miyazaki F株由来[NiFe]ヒドロゲナーゼの中性子回折実験
3. 学会等名 日本結晶学会2019年度年会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 玉田太郎、廣本武史、西川幸志、井上誠也、平野優、樋口芳樹
2. 発表標題 Desulfovibrio vulgaris Miyazaki F株由来[NiFe]-ヒドロゲナーゼの中性子回折実験
3. 学会等名 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
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Nishikawa, Y. Kawahara, S. Inoue, T. Chuji, S. Nakashima, Y. Shigeta, K. Fukutani and Y. Higuchi
2. 発表標題 NEW ASSAY METHOD FOR THE ENZYMES REACTING WITH GASEOUS SUBSTRATES BY RAMAN SPECTROSCOPY
3. 学会等名 1st INTERNATIONAL SYMPOSIUM "HYDROGENOMICS" combined with 14th INTERNATIONAL SYMPOSIUM HYDROGEN & ENERGY (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 K. Ishikawa, M. Shoji, Y. Hori, T. Hiromoto, Y. Higuchi, and Y. Shigeta
2. 発表標題 THEORETICAL ANALYSIS ON STRUCTURES OF RESTING OXIDIZED STATES OF [NIFE]HYDROGENASE
3. 学会等名 1st INTERNATIONAL SYMPOSIUM "HYDROGENOMICS" combined with 14th INTERNATIONAL SYMPOSIUM HYDROGEN & ENERGY (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Yuta Hori, Koji Nishikawa, Yasuteru Shigeta and Yoshiki Higuchi	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Kyoritsu Shuppan Co., Ltd	5. 総ページ数 304
3. 書名 Hydrogenomics: The Science of Fully Utilizing Hydrogen (Section3-7: pp152-168)	

1. 著者名 樋口芳樹 (城宜嗣・津本浩平 監修)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 564
3. 書名 生命金属ダイナミクス (水素酸化還元酵素ヒドロゲナーゼ)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	Technische Universität Berlin			
オーストリア	University of Innsbruck			