

## 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25年 6月 3日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22370061

研究課題名（和文） 新規Ni酵素による水素活性化機構の解明とその利用

研究課題名（英文） Structural Study of the Mechanism of Hydrogen Activation on Ni-enzymes

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）：

本研究では、新規のNAD<sup>+</sup>還元4量体ヒドロゲナーゼをもつ水素酸化菌の培養法とそのヒドロゲナーゼ酵素の精製法および活性測定方法を開発し、また、酸素耐性をもつ膜結合性ヒドロゲナーゼ（MBH）については、その空気酸化型、水素還元型および酸化剤を用いた超酸化型のX線結晶解析に成功した。MBHの全体構造やNi-Fe活性部位の配位子構造は、いわゆる酸素耐性をもたない標準型の[NiFe]ヒドロゲナーゼとほとんど差異が無かった。しかし、Ni-Fe活性部位のもっとも近くに位置する鉄-硫黄クラスターが、従来まで知られていた[4Fe-4S]-4Cys型ではなく、新規の[4Fe-3S]-6Cys型の構造をもつことを見出した。また、MBHは、O<sub>2</sub>にさらされたとき、この[4Fe-3S]-6Cys型の鉄-硫黄クラスターが特徴的な構造変化を起こすことを見出し、この構造変化こそが本酵素の酸素耐性の本質であることを提案し、それを2011年の*Nature*誌に発表した。

研究成果の概要（英文）：

We have studied newly found NAD<sup>+</sup>-reducing four subunits [NiFe] hydrogenase and O<sub>2</sub>-tolerant membrane-bound [NiFe] hydrogenase (MBH) in this project. In 2010-2012, we have developed the new protocols for inoculation of the bacterium and purification for NAD<sup>+</sup>-reducing four subunits [NiFe] hydrogenase. For MBH, the x-ray crystal structures of as-isolated, H<sub>2</sub>-reduced and chemically super-oxidized MBH at high resolution has been successfully determined. Overall structure of the molecule and the coordination geometry of the Dinuclear Ni-Fe active site of the MBH are almost identical to those of the standard O<sub>2</sub>-sensitive [NiFe] hydrogenase. The proximal iron-sulfur (Fe-S) cluster, however, has a [4Fe-3S]-6Cys structure. When the enzyme is chemically oxidized, the cluster supplies additional electrons to the Ni-Fe active site, and a deprotonated amide nitrogen of the polypeptide backbone coordinates the Fe atom stabilizing the super-oxidized state of the cluster.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2012年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：ヒドロゲナーゼ・X線結晶解析・反応機構・Ni酵素・燃料電池

### 1. 研究開始当初の背景

水素は燃料として利用しても水を生じるだけで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。これまで申請者らによる研究の結果、標準タイプとよばれる[NiFe]ヒドロゲナーゼのAs-purified 酸化型（不活性）酵素の活性部位は、Ni-Fe ヘテロ2 核金属錯体で、Ni には4 個のシステイン側鎖のS が配位し、そのうち2 個はFe にも配位し架橋していることを示した。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 番目の非アミノ酸架橋配位子も発見した。活性化された酵素のNi-Fe活性部位では、上記の3番目の架橋配位子は消失していた。その後、As-purified 型構造は、二つの型「Unready (Ni-A)」と「Ready (Ni-B)」の混合物であることが判明した。これらをそれぞれX線結晶解析を行った結果、Ni-A は3番目の架橋配位子が(O<sub>2</sub>またはO<sub>2</sub>H)、Ni-B では(OまたはOH)であった。N-Cでは、この配位座にH<sub>2</sub>が配位すると考えられている。

### 2. 研究の目的

上記のように種々の方法で研究されてきた、いわゆる標準タイプの[NiFe]ヒドロゲナーゼは、酸素に暴露されると不活性化することが知られていた。近年、大気中の酸素濃度でも不活性化されず、触媒反応を続ける酵素が見つかった(酸素耐性酵素)。この酵素は、たとえ酸素に暴露されて不活性化してもNi-Bにはなるが、Ni-Aにはならない。種々の研究で、Ni-Aにならないことが酸素耐性に必須であることがわかった。そこで本研究では、最近見出された酸素耐性をもつ[NiFe]ヒドロゲナーゼ、NAD<sup>+</sup>還元型[NiFe]ヒドロゲナーゼと膜結合型[NiFe]ヒドロゲナーゼ(MBH)の精製法の開発、結晶化およびX線結晶解析を研究目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) MBHのX線構造化学的研究

水素酸化細菌・*Hydrogenovibrio marinus* について、酵素の膜内シトクロム*b*を除いた水素活性化ユニット(α, β)複合体の精製と結晶化条件をスクリーニングする。得られた空気酸化型結晶の還元方法と超酸化方法を開発する。各結晶について、SPring-8において高分解能X線回折データを取得し、構造解析および精密化を行う。立体構造からその酸素耐性機構を解明する。

#### (2) NAD<sup>+</sup>還元型4量体[NiFe]ヒドロゲナーゼ

#### の結晶学的研究

*Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1 の培養条件を検討し、より大量の酵素を発現する条件を確立する。得られた菌体からNAD<sup>+</sup>還元型ヒドロゲナーゼを単離し、その精製法を開発する。その後、結晶化スクリーニング・X線回折実験を進める。

### 4. 研究成果

#### (1) MBHのX線構造化学的研究

MBHについては、結晶化および高分解能X線結晶解析に成功した。MBHの全体構造やNi-Fe活性部位の配位子構造は、いわゆる酸素耐性をもたない標準型の[NiFe]ヒドロゲナーゼとほとんど差異が無かった。しかし、分子が3個もつ鉄-硫黄クラスターのうち、触媒反応中心であるNi-Fe活性部位のもっとも近くに位置する鉄-硫黄クラスターが、従来まで知られていた[4Fe-4S]-4Cys型ではなく、新規の構造である[4Fe-3S]-6Cys型であることを見出した。また、本膜結合型ヒドロゲナーゼは、酸素にさらされたとき、この新規の[4Fe-3S]-6Cys型の鉄-硫黄クラスターが特徴的な構造変化を起こすことを見出した。この構造変化こそが本酵素の酸素耐性の本質であることを提案し、それを2011年の*Nature*誌に発表した。その後、結晶解析をさらに詳細に進めた結果、酸素にさらされたときには、[4Fe-3S]-6Cys型の鉄-硫黄クラスターのうちの1個の鉄原子が位置を変化させ、近くのアミノ窒素による配位結合を受けることも明らかにした(図1a, b)。

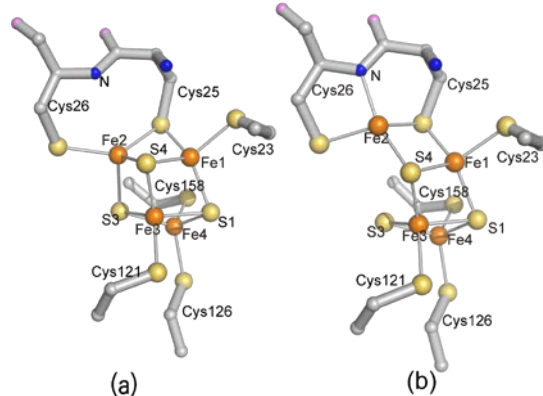


図 1. 酸素耐性[NiFe]ヒドロゲナーゼの新規の[4Fe-3S]-6Cysクラスターの構造。a: 水素還元型の構造, b: 酸化剤を使って強制的に酸化した時の構造。Fe2 が上方に動き、ポリペプチド主鎖の脱プロトンしたアミド窒素により配位される。

(2) NAD<sup>+</sup>還元型 4 量体[NiFe]ヒドロゲナーゼの結晶学的研究

*Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1 株について、栄養培地を使つての培養法および酵素試料のカラムクロマトグラフィー法による精製法を開発し、電気泳動的にほぼ不純物を含まない純度のタンパク質試料を調製することに成功した。現在、得られたタンパク質試料について、硫酸アンモニウムやポリエチレングリコール等を沈殿剤として結晶化条件を探索中である。

#### 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 35 件)

- ① T. Yagi, Y. Higuchi, Studies on hydrogenase. 査読有り, Proc. Jpn. Acad., Ser. B 89, 16-33 (2013). DOI: 10.2183/pjab.89.16
- ② H. Osuka, Y. Shomura, H. Komori, N. Shibata, S. Nagao, Y. Higuchi, S. Hirota, Photosensitivity of the Ni-A State of [NiFe] Hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F with Visible Light. 査読有り, Biochem. Biophys. Res. Commun. 430, 284-288 (2013). DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.10.136
- ③ Y. Nitta, H. Kikuzaki, T. Azuma, Y. Ye, M. Sakaue, Y. Higuchi, H. Komori, H. Ueno, Inhibitory Activity of *Filipendula ulmaria* Constituents on Recombinant Human Histidine Decarboxylase. 査読有り, Food. Chem. 138, 1551-1556 (2013). DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.10.074
- ④ K. Kihira, Y. Shimizu, Y. Shomura, N. Shibata, M. Kitamura, A. Nakagawa, T. Ueda, K. Ochi, Y. Higuchi, Crystal Structure Analysis of the Translation Factor RF3 (release factor 3). 査読有り, FEBS Letters 586, 3705-3709 (2012). DOI: 10.1016/j.febslet.2012.08.029
- ⑤ Y. Hayashi, S. Nagao, H. Osuka, H. Komori, Y. Higuchi, S. Hirota, Domain Swapping of the Heme and N-Terminal  $\alpha$ -Helix in *Hydrogenobacter thermophilus* Cytochrome c552 Dimer. 査読有り, Biochemistry 51, 8608-8616 (2012). DOI: 10.1021/bi3011303
- ⑥ H. Komori, Y. Nitta, H. Ueno, Y. Higuchi, Structural Study Reveals Ser345 Determines Substrate Specificity on Human Histidine Decarboxylase. 査読有り, J. Biol. Chem. 287, 29175-29183 (2012). DOI: 10.1074/jbc.M112.381897
- ⑦ S. Nagao, H. Osuka, T. Yamada, T. Uni, Y. Shomura, K. Imai, Y. Higuchi, S. Hirota, Structural and Oxygen Binding Properties of Dimeric Horse Myoglobin. 査読有り, Dalton Transactions 41, 11378-11385 (2012). DOI: 10.1039/C2DT30893B
- ⑧ Y. Shomura, Y. Higuchi, Purification, Structural Basis for the Reaction Mechanism of S-carbamoylation of HypE by HypF in the Maturation of [NiFe]-hydrogenases. 査読有り, J. Biol. Chem. 287, 28409-28419 (2012). DOI: 10.1074/jbc.M112.387134
- ⑨ H. Komori, Y. Nitta, H. Ueno, Y. Higuchi, Purification, Crystallization, and Preliminary X-ray Analysis of Human Histidine Decarboxylase. 査読有り, Acta Crystallogr F68, 675-677 (2012). DOI:10.1107/S1744309112015692
- ⑩ Y. 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
- ⑪ H. 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
- ⑫ S. 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
- ⑬ Y. 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
- ⑭ Y. 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
- ⑮ T. Baba, K. Kamiya, T. Matsui, N. Shibata, Y. Higuchi, T. Kobayashi, S. Negoro and Y. Shigeta, 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
- ⑯ N. 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
- ⑰ K. 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
- ⑱ S. 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
- ⑲ M. 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<sup>Gdt2</sup>-mediated Proteolysis. 査読有, Genes to Cells, 16, 12-22 (2011). DOI:10.1111/j.1365-2443.2010.01464.
- ⑳ J. 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
- ㉑ Y. Takayama, M. Taketa-Sato, H. Komori, K. Morita, Su-Jin Kang, Y. Higuchi, and H. Akutsu, Role of  $\pi$ -Electron Systems in Stabilization of the Oxidized Tetraheme Architecture in Cytochrome *c*<sub>3</sub>. 査読有, Bull. Chem. Soc. Jpn. Vol. 84, No. 10, 1096-1101 (2011). DOI: 10.1246/bcsj.20110039
- ㉒ K. 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
- ㉓ H. Komori, D. Seo, T. Sakurai and Y. Higuchi, Crystal Structure Analysis of *Bacillus subtilis* Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> Oxidoreductase and the Structural Basis for Its Substrate Selectivity. 査読有, Protein Science 19(12), 2279-2290 (2010). DOI: 10.1002/pro.508
- ㉔ S. 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
- ㉕ N. 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 B<sub>12</sub> Analogs and Substrates. 査読有, J. Biol. Chem. 285 (34), 26484-26493 (2010). DOI : 10.1074/jbc.M110.125112.
- ㉖ H. 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
- ㉗ Y. 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
- ㉘ S. 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
- ㉙ K. 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
- ③⑩H. 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
- ③⑪M. 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
- ③⑫N. 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
- ③⑬K. 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). DOI: 10.1107/S1744309109047162
- ③⑭K. 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
- ③⑮H. Komori, D. Seo, T. Sakurai, and Y. Higuchi, Crystallization and Preliminary X-ray Studies of Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> Oxidoreductase Encoded by *Bacillus subtilis* yumC. 査読有, *Acta Crystallogr.* F66, 301-303 (2010). DOI: 10.1107/S1744309110000151
- [学会発表] (計 16 件)
- ①八木達彦, 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, 福岡国際会議場(福岡)
- ②Y. Higuchi, Structural Study of O<sub>2</sub>-Tolerant [NiFe] Hydrogenase. The 2nd International Conference on MEXT Project of Integrated Research on Chemical Synthesis, 2012年12月11日, 名古屋大学(愛知)
- ③樋口芳樹, [NiFe]ヒドロゲナーゼの酸素耐性機構の解明－放射光X線利用による精密構造化学－. 日本農芸化学会関西支部第477回講演会, 2012年12月1日, 神戸大学(兵庫)
- ④庄村康人, 樋口芳樹, [NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化因子HypE, HypFのX線結晶構造解析. 第49回日本生物物理学会年会, 2012年9月24日, 名古屋大学(愛知)
- ⑤庄村康人, 尹基石, 西原宏史, 樋口芳樹, 酸素耐性 [NiFe] ヒドロゲナーゼの結晶構造解析. 第12回日本蛋白質科学会年会, 2012年6月22日
- ⑥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)
- ⑦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)
- ⑧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)
- ⑨Y. Shomura, Y. Higuchi et al., Structural study of the O<sub>2</sub>-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)
- ⑩K. 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)
- ⑪Y. 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)
- ⑫Y. 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).

- ⑬M. 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).
- ⑭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).
- ⑮H. 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).
- ⑯K. 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).

[図書] (計10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>
- ⑤庄村康人, 樋口芳樹, ヒドロゲナーゼの新規酸素耐性機構-膜結合型[NiFe]ヒドロゲナーゼ, 化学, 67, 70-71 (2012)
- ⑥庄村康人, 樋口芳樹, 酸素耐性ヒドロゲナーゼの構造化学的研究-酵素分子に見出された活性保護機構-, 燃料電池, 11, 67-72 (2012)
- ⑦庄村康人, 樋口芳樹, [4Fe-3S] クラスターによる [NiFe] ヒドロゲナーゼの酸素耐性機構の構造基盤, SPring-8 利用者情報誌, 17, 105-110 (2012)
- ⑧Y. Shomura and Y. Higuchi, Crystal structure of O<sub>2</sub>-tolerant [NiFe] hydrogenase reveals the mechanism of

O<sub>2</sub>-tolerance attributable to a redox-dependent conformational change of [4Fe-3S] cluster, SPring-8 Research Frontier 2011, 5-6 (20-12)

- ⑨廣田俊, 樋口芳樹, シトクロムc ポリマー: 水溶性球状タンパク質に見出された多量化機構, 日本結晶学会誌, 54, 270-275 (2012)
- ⑩庄村康人, 樋口芳樹, 膜結合型ヒドロゲナーゼの酸素耐性機構の解明, 生物物理, 53, 82-85 (2013)

## 6. 研究組織

(1) 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  
( )

(3) 連携研究者  
庄村 康人 (SHOMURA YASUHIITO)  
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教  
研究者番号: 50423900