

樋口 芳樹

公立大学法人 兵庫県立大学 大学院生命理学研究科
教授

生物酵素による水素エネルギー利用システムの構造基盤解明

§ 1. 研究実施体制

(1) 「樋口」グループ (兵庫県立大学)

- ① 研究代表者: 樋口 芳樹 (兵庫県立大学大学院生命理学研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・ 水素-化学エネルギー変換ヒドロゲナーゼの X 線結晶解析
 - ・ 酸素耐性[NiFe]ヒドロゲナーゼの超高分解能 X 線結晶解析
 - ・ 標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼの中性子解析用大型単結晶の調製

(2) 「加納」グループ (京都大学)

- ① 主たる共同研究者: 加納健司 (京都大学大学院農学研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・ 酸素耐性[NiFe]ヒドロゲナーゼの電気化学的特性評価とバイオ電池の構築

(3) 「廣田」グループ (奈良先端科学技術大学院大学)

- ① 主たる共同研究者: 廣田 俊 (奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・ [NiFe]ヒドロゲナーゼの分光学的解析

§ 2. 研究実施の概要

課題 1 : 水素酸化細菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1 (HtTH-1) 由来の水素-化学エネルギー変換・[NiFe]ヒドロゲナーゼ (NAD⁺還元ヒドロゲナーゼ) については、「大量試料調製法の開発」に挑戦しているが、大腸菌など異なる宿主を用いた高効率な発現系開発については未だ進展させることはできていない。しかし、HtTH-1 の培養条件を改良し、酢酸ナトリウムを炭素源にした培地を用いることにより、1 回の培養 (140 L) あたりの菌体回収量を約 3 倍 (170→500 g) に改善することができた。また、これまでの精製ステップにもう 1 段階の高性能陰イオンクロマトグラフィーを追加することで、さらに純度の高い酵素試料を恒常的に得られるようになった。得られた試料を用いて嫌気チャンバー内で水素還元型酵素の結晶化を行い、10 μm の単結晶を得ている。また、ギ酸脱水素酵素を本酵素の代替とした電気化学的特性の取得し、天然の第二基質 (NAD⁺/NADH) には自由エネルギーの直線性があることを明らかにした。この性質を利用して、NAD⁺/NADH より優れた人口基質に代替することに成功し、ギ酸/CO₂ の可逆相互変換を実現する酵素機能電極の作成に成功した。双方向触媒に関する電流-電圧曲線の理論解析にも成功し、論文発表している。

課題 2 : 直接電子移動型電極触媒反応による水素酸化波のシグナルを解析するのに妥当なモデルを構築し、熱力学的、および速度論的特性を得ることに成功した。また、酸化的不活性化を回避するためのガス拡散電極を提案し、その有効性を実証し、これに関する論文を電気化学の専門誌に発表した (論文2)。これらの知見をもとに、水素-酸素バイオ電池を試作した。*Citrobacter* sp.S-77由来の新規酸素耐性ヒドロゲナーゼの精製条件の改良に成功し、結晶化に成功した (図1)。また、本酵素の高い酸素安定性を示す酵素化学的データの取得に成功し専門誌に発表した (論文6)

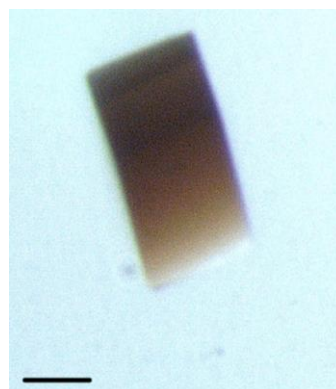


図 1. 新規酸素耐性[NiFe]ヒドロゲナーゼの単結晶 (棒は 5μmを示す)

課題 3 : 標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼにおいて、水素活性化で得られるNi-Cへのレーザー照射により、Ni-Lの異なる2状態を同時にFT-IRにより観測することに成功した。弱塩基性条件下では、Ni-Cへの照射により1911 cm⁻¹にCO伸縮振動、2047と2061 cm⁻¹にCN伸縮振動を示すNi-L2が観測されたが、塩基性条件下での照射では、1890 cm⁻¹にCO伸縮振動、2034と2047 cm⁻¹にCN伸縮振動を示す新たな状態が検出された。この新しい状態を、Ni-L2において活性部位Niに末端配位しているシステイン残基 (Cys546) の側鎖硫黄が脱プロトン化された状態と考えられるNi-L3に帰属した。Ni-L2のプロトン解離に伴うエンタルピー変化とエントロピー変化はそれぞれ6.4 ± 0.8 kJ mol⁻¹および25.5 ± 10.3 J mol⁻¹ K⁻¹と非常に小さい値であることが示唆され、[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性部位ではプロトン移動が効率よく行われることが示された。これらの研究結果を化学専門誌に報告した (論文3)。

標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼの中性子結晶解析を目指して重水中において巨大良質単結晶を再現性良く調製するための結晶化条件の探索を進めた。その結果、空気酸化型について、 1mm^3 を超える大きさの良質単結晶を得ることに成功した。

論文 2: K. So *et al.*, *J. Electroanal. Chem.*, **766**, pp. 152–161, 2016.

論文 3: H. Tai *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, **119**, No. 43, pp.13668–13674, 2015

論文 6: N. Dina *et al.*, *Acta Crystallogr. F* **72** (1), 53-58, 2016