

樋口 芳樹

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、水素還元型結晶の調製法を確立した。これまでは、溶液状態の濃縮試料を水素によって還元してからグローブボックス内で嫌氣的に結晶化をしていたが、X線回折実験の結果、十分に回折分解能を与える結晶は得られていなかった。今年度、空気中で結晶化した酸化型の結晶を水素によって還元することで十分なX線回折データを与える結晶を調製することに成功した。現在、水素還元型の結晶解析を進めている。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 より優れた人工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酸化型酵素の高分解能X線回折データの取得に成功した。

(図1) また、K₃Fe(CN)₆を用いて嫌氣的に結晶を酸化する条件を決定した。

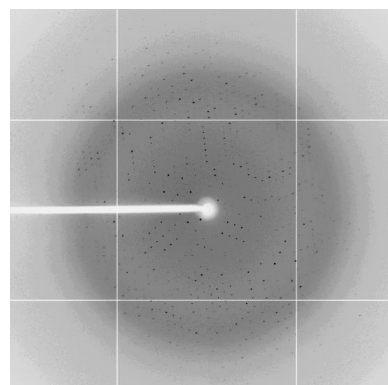


図 1. 新規酸素耐性[NiFe]ヒドロゲナーゼ (酸化型) のX線回折パターン

課題 3 : 標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼでは、活性準備状態Ni-SI_Rは酸塩基平衡により活性状態の一つであるNi-SI_Aに変換され、H₂の分解/合成が可能となるが、詳細な酸塩基平衡反応機構は不明であった。低温 (103–238 K) でレーザー光 (514.5 nm) 照射下のFT-IRスペクトルを測定することで、これまでNi-SI_Rが不活性状態であるNi-SLに光変換されると考えられていたことが間違いで、Ni-SI_RはNi-SI_Aに光活性化することを発見した。溶液のpHを8.0から9.6に上げるとNi-SI_Rの光活性化が著しく抑制されたことから、この光活性化反応ではNiとFe間の架橋配位子OH⁻がプロトン化され、H₂O分子として解離すると解釈した。さらに、Ni-SLは本酵素で報告されているすべての不活性状態よりも活性化されにくい新たな不活性状態 (Ni-SXと命名) への光照射により生成することを突き止めた。これらに関する研究成果を論文発表した (論文3)。

標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼの水素還元型構造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水素/重水素で還元するための条件検討を行った。また巨

大な単結晶の結晶性を劣化させず、また分解能を落とさないように液体窒素温度に冷却するための方法をほぼ開発した。

ラマン分光法を用いてヒドロゲナーゼの触媒活性を定量する方法の開発を進め、改良型（第4世代）の測定セルを開発した。

ヒドロゲナーゼの精密立体構造から触媒反応機構についての考察を論文発表した（論文1）。

論文1 : H. Ogata *et al.*, *J. Biochem. (Tokyo)* **160**(5), 251-258 (2016)

論文2 : K. So, *et al.*, *J. Mater. Chem. A*, **4**, 8742–8749 (2016)

論文3 : H. Tai *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **18**(32), 22025-22030 (2016)