

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

- ・標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼの分光学的解析

## § 2. 研究実施内容

### 課題 1：水素－化学エネルギー変換・ヒドロゲナーゼの構造化学的研究

水素酸化細菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1 由来の水素－化学エネルギー変換・ヒドロゲナーゼについては、申請段階で 3.2 Å 分解能の結晶を得ており、金属クラスター等のおよその位置は決定できていた。しかし、酵素試料の収率は極めて低く、また、酵素発現系の構築は困難であり、結晶解析の進展に支障を来していた。そこで、平成 24 年度は、菌体の培養条件・精製法の改良に着手した。特に活性定量法の改善により、活性値に基づいた高純度試料を得ることが可能となり、結晶化の成功確率が上がった。また、シーディング法による結晶化および結晶凍結方法の改良により、空気酸化型酵素の結晶について分解能を 2.5 Å まで向上させることに成功した。その結果、Ni-Fe 活性部位と電子伝達ユニットについて、さらに信頼性の高い座標を取得できた。従って、平成 24-25 年度の目標「大量試料調製法の検討と酸化型結晶の X 線構造解析」のうち、「酸化型結晶の X 線構造解析」については、目標をほぼ達成できた。

### 課題 2：酸素・熱耐性を有する膜結合型ヒドロゲナーゼの構造基盤確立とその電気化学的特性の評価

*Hydrogenovibrio marinus* 由来の膜結合型ヒドロゲナーゼ (MBH) について構造化学的研究を推進させた。昨年までの結果では、酵素が強く酸化された時、近位の [4Fe-3S] クラスターが構造変化し、活性部位に余分の電子を与えることで、酸素耐性を獲得する機構を提唱していた。今年度、試料調製法の改良を行い、得られた試料について、酸化型構造の高分解能結晶解析をさらに進展させたところ、酸素耐性機構について新しい知見を得た。すなわち、近位の [4Fe-3S] クラスターの近傍のグルタミン酸残基も酸素耐性に関与している可能性が見出された。来年度は、そのメカニズムについてさらに詳しく調査して行く。また、還元型の超高分解能 X 線解析のための結晶化条件の見直しを行った。

MBH は酸素耐性特性を有することから、水素－酸素バイオ燃料電池への展開が期待できる。そこで、平成 24 年度は、MBH の電気化学特性の予備評価を行った。本酵素の直接電子移動型電極触媒反応 (DET; 電極に吸着した酵素が電極を直接的に電子受容体とする触媒反応) によるシグナルは、グラッシーカーボン電極では観測できなかった。しかし、2-aminoethanethiol 等の親水性のチオールによる自己集積膜 (SAM) 修飾電極では明瞭な DET 型の水素酸化波が観測できた。その波形は、通常の触媒波と大きく異なり、両掃引ともに -0.2 V (vs. Ag/AgCl 以下同様) 付近にピークのある特徴的なものであった。この現象は、電極上の MBH が酸化的に不活性化し、また還元的に再活性化したものと考え、そのことをダブルポテンシャルステップ法で検証した。その結果、本過程は 1 電子移動過程であることがわかり、電気化学的不活性化の酸化還元電位 ( $E_{\text{active}}$ ) も評価した。

一方、メディエータ型触媒反応 (MET; キノン類等の低分子酸化還元物質を酵素と電極間の電子移動の媒介とする反応) も観測できた。この場合、吸着型 MBH を電気化学的に不活性化する

と MET 型触媒反応も観測できなくなるのに対し、溶存型 MBH は MET 反応である典型的なシグモイド型電流-電圧曲線を与えた。このことは、溶液電位が  $E_{\text{active}}$  より十分正側であるにもかかわらず不活性化しないことを意味する。これらの現象から、電気化学的酸化による不活性化は、従来から言われている Ni-B 型生成(だけ)では説明できない可能性が示唆された。

### 課題 3 : Ni-Fe 活性部位における水素活性化触媒反応機構の解明

本課題では、硫酸還元菌・*Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F 由来の標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼの中性子結晶解析と分光学的手法による反応機構の解明を目指している。

重水中における中性子結晶解析用の単結晶については、図 1 に示すような  $1.6 \times 0.6 \times 0.6$  mm の単結晶の調製に成功した。現在、得られた結晶を用いて凍結処理などの予備実験を行い、来年度の中性子回折実験に備えている。

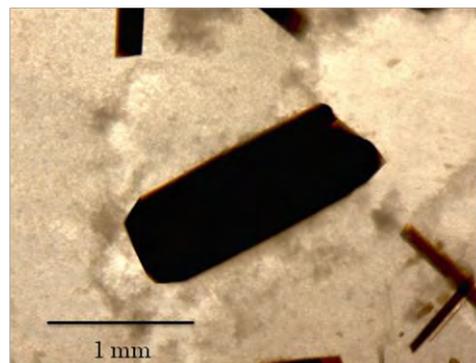


図 1. 重水中で得られた単結晶

Ni-Fe 活性部位における水素活性化触媒反応機構の解明に関しては、[NiFe]ヒドロゲナーゼの不活性酸化型の一つである Ni-A 型の光反応性をフーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) と電子常磁性共鳴法 (EPR) を用いて調べた。Ni-A 型にレーザー光 ( $457.9-514.5$  nm) を室温で照射すると FT-IR スペクトルが変化し、光反応性があることが判明した。光照射を停止すると FT-IR スペクトルの変化は観測されなくなったが、再度、光照射を開始すると同様のスペクトル変化が観測され、光反応は可逆的であることが判明した。Ni-A 型の ESR スペクトルも可視光照射により変化し、光照射を停止するとスペクトル変化は観測されなくなった。一方、本酵素のもう一つの不活性酸化型 (Ni-B 型) に光を照射しても、FT-IR や ESR のスペクトルは変化しなかった。光照射によって生じた反応生成種の CO 伸縮振動 ( $\nu(\text{CO})$ ) と CN<sup>-</sup>伸縮振動 ( $\nu(\text{CN}^-)$ ) の値をバンドフィッティングにより同定したところ、 $\nu(\text{CO})$  は  $1971 \text{ cm}^{-1}$ 、 $\nu(\text{CN}^-)$  は  $2086$  と  $2098 \text{ cm}^{-1}$  と求まった。ESR スペクトルの  $g$  値はバンドフィッティングにより  $2.29$ 、 $2.24$ 、 $2.02$  と求まった。これらの値は本酵素でこれまでに報告されている値とは異なっており、光照射により新たな種が生成したと考えられ、Ni-AL 型と名付けた。Ni-AL 型の  $g$  値は Ni-A 型の  $g$  値 ( $2.30$ 、 $2.23$ 、 $2.01$ ) に非常に近いことから、Ni 原子の電子状態は Ni-A 型と類似していると推測された。一方、Ni-AL 型の  $\nu(\text{CN}^-)$  振動数は Ni-A 型の  $2084$  と  $2094 \text{ cm}^{-1}$  からあまり変化しなかったが、 $\nu(\text{CO})$  振動数は Ni-A 型の  $1956 \text{ cm}^{-1}$  から  $15 \text{ cm}^{-1}$  高波数シフトしたことより、Ni-AL 型は Ni-A 型に比べて Fe 原子に対して CO の反対側に位置する 2 原子分子配位子 ( $\text{XO}_1\text{-XO}_2$ ) から Fe 原子への電子供与が弱くなったことが示唆された。以上の結果より、Ni-AL 型では Fe-XO<sub>1</sub> 結合が弱くなっていると推測された。本酵素のいくつかの還元型や CO 結合型などの状態でも光応答性が報告されており、本酵素の光応答性は機能と関係がある可能性がある。本分光学的結果については学術雑誌に報告した<sup>1)</sup>。また、これまでの本研究および世界の研究者による結果をレビューした上に、反応機構についての新しい見解をまとめて学術雑誌に報告した。

### §3.成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

1. Hisao Osuka, Yasuhito Shomura, Hirofumi Komori, Naoki Shibata, Satoshi Nagao, Yoshiki Higuchi and Shun Hirota, “Photosensitivity of the Ni-A State of [NiFe] Hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F with Visible Light”, Biochem. Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 430, No. 1, pp 284-288, 2013 (DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.10.136)