

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 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、得られた 2.5 Å 分解能の X 線回折データに基づいて結晶構造の精密化を進めた。その結果、Ni-Fe 活性部位と電子伝達に関わる金属クラスターについてより精度の高い 3 次元座標パラメータを取得した。また、分子全体の構造についても一部のループ領域以外はほぼ完全に決定し、細菌由来の呼吸鎖・複合体 I の可溶性部分との立体構造比較を進めている。活性部位の構造は、これまでに知られていた標準型および酸素耐性酵素とは異なっていた。活性型においては構造変化を起こすものと予想される。これは、下記に示すように電子常磁性共鳴法(EPR)による結果と矛盾しない。本酵素の酸化型では、EPR シグナルが観測され、III 価の Ni の存在が確認された。EPR スペクトルの g 値は、標準型酵素における二種類の酸化型(Ni-A, Ni-B)の g 値と異なることから、酸化型の活性部位構造は標準型と異なると考えられる。一方、還元型の EPR スペクトルでは、強度は小さいが標準型の Ni-C 型と類似したシグナルが観測され、還元型の活性部位構造が標準型と類似しているが示唆された。本ヒドロゲナーゼに類似した酵素として、*Methyrobacterium extroquens* AM1 由来のギ酸脱水素酵素(FoDH)について、メディエータ型酵素触媒電極反応に注目し、CO<sub>2</sub>/HCOOH 系の相互変換反応に対して、基質とメディエータの反応について直線自由エネルギー的な反応特性を認めた。

**課題2:**酸素耐性膜結合型ヒドロゲナーゼについて、直接電子移動型の MBH 酵素触媒機能電極反応の電気化学的挙動の pH 依存性を基軸に、触媒反応と電気化学的酸化不活性化のメカニズムを提唱した。直接電子移動型電極触媒反応によるシグナル解析から、H<sub>2</sub> 酸化触媒は 2 段階 1 電子反応であると結論した。一方、嫌気条件下での酸化的不活性化は可逆的であり、不活性化型の Ni-B 生成に由来すると考えられる。溶液中でも、[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup>で容易に Ni-B が生成されるが、メチレンブルーでも起こることを見出した。Ni-B はベンジルピオローゲンの還元体で容易に還元的に再活性化できるが、より強い還元剤である Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> では再活性化できなかつた。これは熱力学的観点だけでは説明不能な現象であり、還元的再活性は物質認識過程が存在することを意味している。また、バイオ電池への応用を志向して、水素酸化反応のガス拡散型のアノードを構築した。さらに、*Citrobacter* sp.S-77 由来の新規酸素耐性ヒドロゲナーゼの精製を開始検討して初期的な精製プロトコルを作成した。

**課題3:**Ni-Fe 活性部位における水素活性化触媒反応機構を解明するため、標準型酵素の Ni-C の光反応過程における Fe 部位の性質の変化を FT-IR 法により明らかにした。Ni-C に光を照射すると Ni-L が生成することが報告されている。本研究では、レーザー光(514.5 nm, -80 °C)照射時の FT-IR スペクトルを測定することに成功し、光照射により Ni-L とは異なる別の種(Ni-L'型)が生成することが明らかとなった。中性子結晶解析のための結晶化実験を進め、重水中において 5 mm<sup>3</sup> 以上の容積の単結晶を再現性よく得る条件をほぼ確立した。標準型酵素の触媒活性メカニズムについて、これまでの実験データをさらに精査し、改良反応機構を提唱し発表した<sup>2</sup>。また、ヒドロゲナーゼ全般についての総説を発表した。

### § 3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### 論文詳細情報(国内)

該当なし

##### 論文詳細情報(国際)

1. Y. Shomura and Y. Higuchi

Structural Aspects of [NiFe]-hydrogenases

Rev. Inorg. Chem., **33(4)**, pp.173-192, 2013 (DOI: 10.1515/revic-2013-0005)

2. T. Yagi, S. Ogo and Y. Higuchi

Catalytic Cycle of Cytochrome- $c_3$  Hydrogenase, a [NiFe]-enzyme, Deduced from the Structures of the Enzyme and the Enzyme Mimic.

Int. J. Hydrogen. Energy, 2014 (in press).