

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、昨年度 2.5 Å 分解能の結晶構造の精密化を完了した。また、酵素活性部位の金属原子の分光学的データについては、昨年度得られた結果に対して再現性のある電子常磁性共鳴法 (EPR) によるデータを取得した。酸化型の本酵素の Ni-Fe 活性部位はこれまで知られていた標準型の酵素とは異なり、3本のシステイン残基側鎖によるブリッジと1本のグルタミン酸の側鎖 (2 配位) によるものであることが確定した。これは、EPR の結果と完全に矛盾しないものであることを結論した。また、分子全体の構造についてもほぼ完全に決定した。構造比較の結果、4量体の本ヒドロゲナーゼ分子内部の5個の鉄-硫黄クラスターと1個の FMN の空間配置は、呼吸鎖電子伝達体の重要酵素・複合体 I の可溶性部分のクラスターと驚くほど一致していた。従って両者は進化的には共通の祖先をもったタンパク質であることが証明された。還元型酵素の結晶調製のため条件検討を行った。酸化型の本酵素の結晶化については、結晶学専門誌 (2014) に発表した。変異型酵素については、E32D の発現系の構築に成功し、その分光学的な性質を得た。

**課題2:** *Hydrogenovibrio marinus* 由来の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流-電圧曲線の理論解析を行い、触媒反応と酸化的不活性化のメカニズムと速度論的特性を提唱した。触媒過程での律速段階は酵素内電子移動であることと、 $H_2$  酸化触媒は 2 段階 1 電子反応であることを完全に明らかにした。一方、昨年度酸化的不活性化は可逆的であり、不活性型の Ni-B 生成に由来することを示した。この不活性化は Ni(II) の酸化に続く化学反応 (近接 FeS の構造変化等) が律速反応であることがわかった。一方、還元的再活性化は Ni(III) の還元反応が律速であった。酸化的不活性化反応を拮抗阻害反応の一種と考え、水素供給速度を向上すればこの酸化的不活性化を防ぐことができると予想し、これをガス拡散型のアノードを構築して実証した。この成果を水素-酸素バイオ電池に適用すれば  $5 \text{ mW cm}^{-2}$  程度の世界最高出力が期待できることを明らかにした。これらの成果を化学専門誌 (2014) に掲載した。また、新規酸素耐性ヒドロゲナーゼの精製を進め結晶化条件を開始した。

**課題3:** Ni-Fe 活性部位における水素活性化触媒反応機構の解明するため、本課題で開発した低温光照射用 FT-IR 装置を用いて本酵素活性部位の光反応性を調べた。その結果、標準型酵素でレーザー光 (514.5 nm) 照射により生じる Ni-L 状態が、活性サイクル中の Ni-C 状態と Ni-SI<sub>a</sub> 状態間の変換の中間体であることを突き止めた。Ni-L 状態から Ni-SI<sub>a</sub> 状態への変換過程では、Ni-Fe 活性部位から一個の電子と一個のプロトンが放出され、放出された電子は Fe-S クラスター (近位, 中位, 遠位) へ流れる。EPR により Fe-S クラスターの酸化還元状態を評価したところ、近位  $[Fe_4S_4]_p^{2+/+}$  クラスターは酸化型の時は電子を受け取ることができ、光照射により Ni-C 状態は Ni-SI<sub>a</sub> 状態にも変換されるが、還元型の時は Ni-C 状態は Ni-L 状態にのみ変換されることが分かった。以上より、近位  $[Fe_4S_4]_p^{2+/+}$  クラスターの酸化還元状態により活性サイクルが制御されることが判明し、これらの研究成果を化学専門誌 (2014 年) に発表した。