

「新規酸素安定性ヒドロゲナーゼの構造化学」

兵庫県立大学大学院生命理学研究科

西川 幸志

1 研究の背景と目的

化石燃料の大量消費に伴う二酸化炭素の排出量の増加は、地球温暖化を引き起こした要因の一つと考えられており、近年世界的規模の問題となっている。水素ガスからエネルギーを取り出す際に、最終的に生成されるのは水のみであり二酸化炭素を排出しないことから、水素ガスは環境負荷の少ない次世代のクリーンエネルギーとして注目されている。

ヒドロゲナーゼは、可逆的な水素の分解および合成反応を触媒する金属酵素で、実に多様な生物中に見られる。ヒドロゲナーゼは、嫌気呼吸において重要な役割を担っており、水素の分解によって生じたプロトンや電子は、膜内外でのプロトン濃度勾配を駆動力とする ATP の合成や、硫酸塩や硝酸塩などの電子受容体を還元するのに使われる。

ヒドロゲナーゼは、白金等の希少金属を必要とせずに、しかも常温・常圧で高い触媒効率を示すことから、バイオ燃料電池の開発やクリーンエネルギーキャリアである水素の産生への応用といった観点から注目されている。しかし、ヒドロゲナーゼは、一般に酸素によって失活してしまうため、応用利用には酸素感受性を克服する必要がある。

ヒドロゲナーゼは、活性中心を構成する金属の構成によって、[NiFe]-、[FeFe]-、[Fe]-ヒドロゲナーゼの 3 種類に大別される。[NiFe]ヒドロゲナーゼ(図 1)の中には、酸素耐性を有するものが見つかっており、構造解析の結果、[4Fe-3S]-6Cys モチーフが酸素耐性の獲得に重要であることが報告されている(図 2)。近年発見された *Citrobacter* sp.S-77 由来膜結合ヒドロゲナーゼ(S-77 ヒドロゲナーゼ)は、酸素安定性および高触媒活性を有する事が報告されている。アミノ酸配列比較の結果、S-77 ヒドロゲナーゼは酸素感受性ヒドロゲナーゼと同様の配列を持ち、[4Fe-3S]-6Cys モチーフが保存されていなかったことから、本酵素は新たな酸素耐性機構を有することが示唆された。本研究では S-77 ヒドロゲナーゼの持つ酸素耐性機構を構造生物学的見地から解明することを目指す。

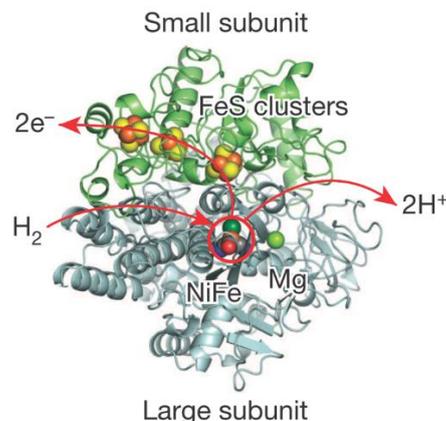


図 1. 標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼの全体構造

活性中心を有する大サブユニット、3つのFeS クラスタを保持する小サブユニットからなるヘテロダイマーである。

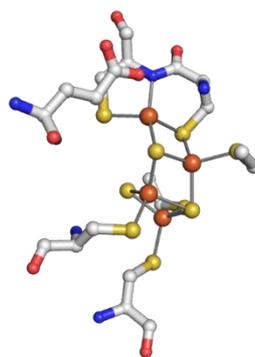


図 2. [4Fe-3S]-6Cys モチーフ

酸素耐性ヒドロゲナーゼでは、活性中心に一番近い[Fe-S] クラスタは[4Fe-3S]-6Cys 構造を取っている。図は超酸化型の構造である。

2 研究方法・研究内容

2-1. *Citobacter* sp. S-77 培養・S-77 ヒドロゲナーゼの精製

菌体の培養，細胞の破碎および膜成分からの[NiFe]ヒドロゲナーゼの可溶化は，(Eguchi et al., *J. Biosci. Bioeng.* **114**, 479-484(2012))に報告されているプロトコールに準じた。Bacto Marine Broth を改変した培地を用い，微好気条件下，30 °C で静置培養を行なった。得られた菌体を超音波破碎した後，超遠心分離によって膜成分を分離し，これに界面活性剤を添加しS-77 ヒドロゲナーゼを膜から可溶化した。再び超遠心分離を行い，目的タンパク質を上清画分として回収し，2回の陰イオンクロマトグラフィー，疎水性相互作用クロマトグラフィー，透析を経て最終精製標品を得た。溶出画分のヒドロゲナーゼ活性は，Native 電気泳動をした後，活性染色により確認を行なった。

2-2. S-77 ヒドロゲナーゼの結晶化

S-77 ヒドロゲナーゼの構造解析を行うことを目指し，市販の結晶化スクリーニングキットを利用して，2-1の精製標品の結晶化を行なった。使用した結晶化スクリーニングキットは以下の通りである。

Proplex, Precipitant Synergy, JBScreen Classic, JBScreen PEG/Salt, JBScreen JCSG++, JBScreen PACT++

回折実験に適した結晶を得るため，結晶化条件の最適化を行なった。

2-3. S-77 ヒドロゲナーゼ結晶の還元処理および化合物酸化処理

既に報告されている酸素耐性ヒドロゲナーゼの構造解析では，空気酸化型の結晶構造に加え，水素還元型およびフェリシアン化カリウム酸化型の結晶構造の比較がなされ，酵素が酸化された際の[Fe-S]クラスターの構造変化から酸素耐性機構が説明されている(Shomura et al., *Nature*, **479**, 253-257(2011))。

2-2. により好気条件下で得られた結晶は，空気酸化型である。結晶をセプタム付きスクリーキャップバイアル中に移し，気相を水素ガスで置換した。10 °C で12時間静置することで結晶を還元した(水素還元型結晶)。また，還元型結晶をグローブボックス内で，5 mM フェリシアン化カリウムを含むリザーバー溶液に移し，10 °C で12時間静置することでフェリシアン化カリウム酸化型結晶を調製した。水素還元型およびフェリシアン化カリウム酸化型の結晶は，それぞれグローブボックス内で液体窒素に浸漬することで凍結させ，回折実験まで液体窒素デューワー中で保管した。

2-4. 回折実験

2-2. および2-3. で得られた空気酸化型，水素還元型，フェリシアン化カリウム酸化型結晶は，SPring-8のBL44XUビームラインにおいて回折実験を行なった。測定は，波長0.9000 Å, 100 Kで行なった。

3 研究成果

3-1. *Citobacter* sp. S-77 培養・S-77 ヒドロゲナーゼの精製

図3に各精製段階での SDS 電気泳動の結果を示す。疎水性相互作用クロマトグラフィー (Phenyl HP)の溶出面分では、高純度に精製されており、S-77 ヒドロゲナーゼを構成している大サブユニットと小サブユニットのバンドのみ検出された(図3)。また、活性染色では DEAE FF, Q HP, Phenyl HP と精製が進むに従って、S-77 ヒドロゲナーゼ由来のバンド強度が大きくなり、精製が進み、濃縮されていく様子が確認できた。(図4)。

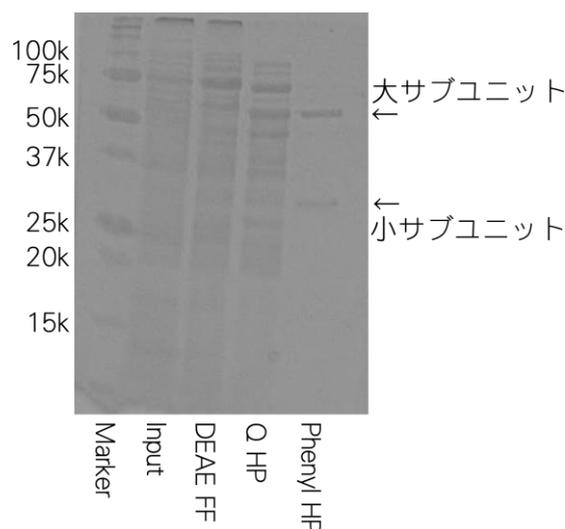


図3. S-77 ヒドロゲナーゼの精製結果
各精製段階の SDS 電気泳動結果を示す。

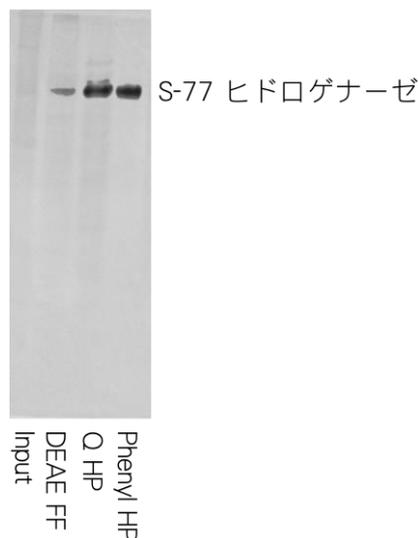


図4. 活性染色
ヒドロゲナーゼを含むバンドは TTC の還元により発色する。

3-2. S-77 ヒドロゲナーゼの結晶化

市販の結晶化スクリーニングキットを用いて、結晶化を行なったところ、いくつかの条件で微結晶の析出を確認した。条件の最適化を行なった結果、タンパク質濃度：15 mg/mL, 沈殿剤溶液：18% (w/v) PEG 10000, 20% (w/v) glycerol, 0.1 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, pH8.5, 温度：10°C において回折実験に適した結晶の調製に成功した(図5)。

3-3. S-77 ヒドロゲナーゼ結晶の還元処理および化合物酸化処理

(Shomura *et al.*, Nature, **479**, 253-257(2011))の方法を参考に、水素還元結晶およびフェリシアン化カリウム酸化結晶の調製を行ない、回折実験に供した。

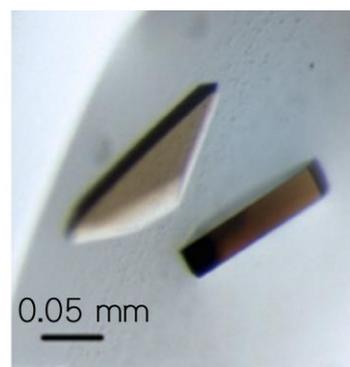


図5. 空気酸化型結晶

3-4. 回折実験

空気酸化型結晶、水素還元結晶およびフェリシアン化カリウム酸化型結晶の回折実験を SPring-8 BL44XU ビームラインに於いて行なった。空気酸化型では、回折分解能 1.6 Å までのデータセット取得に成功しており、現在構造解析を進めている。しかしながら、水素還元型およびフェリシアン化カリウム酸化型についてはデータ取得に至っていない。

4 生活や産業への貢献および波及効果

近年、化石燃料を燃焼させることで生じる二酸化炭素による地球温暖化は深刻な問題となっている。水素は燃焼しても、二酸化炭素のような環境を汚染する物質を生じず、水を生成するのみなので、環境に配慮したグリーンケミストリー、特にクリーンなエネルギー源である水素の利用に関心が集まっている。

ヒドロゲナーゼは、白金等の高価な金属を用いることなく、また常温常圧で水素の酸化還元反応を触媒できるため、水素生産プロセスにヒドロゲナーゼを利用することで、エネルギー生産のコストを大幅に減少させることが期待される。しかし、ヒドロゲナーゼは、一般に酸素によって失活するため、応用利用には酸素敏感性を克服する必要がある。本研究が目指すヒドロゲナーゼの酸素耐性機構の解明は、この応用利用に大きな貢献をもたらすものであり、酵素自体を電極として利用するバイオ燃料電池のようなアプリケーションや、水素の酸化還元反応を触媒するモデル化合物の設計・開発等にも応用が期待される。また、ヒドロゲナーゼの酸素安定性機構の不偏則を明らかにすることは、酸素敏感性金属酵素への酸素安定性付与に大いに貢献することが期待できる。