

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05566

研究課題名(和文)白金性能を超える新規[NiFe]ヒドロゲナーゼの電子伝達機構の解明

研究課題名(英文)Elucidating electron transfer mechanism of new [NiFe]hydrogenase surpassing platinum catalyst

研究代表者

尹 基石 (Ki-Seok, Yoon)

九州大学・カーボンニュートラル・エネルギー国際研究所・准教授

研究者番号：50701497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒドロゲナーゼは、水素分子をプロトンと電子への分解反応とその逆反応の水素生成を触媒する金属酵素である。ヒドロゲナーゼは水素酸化触媒性が非常に強いことから、燃料電池の水素極触媒等として工業的な応用が期待される。しかし、ヒドロゲナーゼは高い活性を示すが、酸素に不安定である。そこで本研究では、阿蘇くじゅう国立公園から単離した新規細菌、*Citrobacter* sp. S-77から酸素に安定な[NiFe]ヒドロゲナーゼの精製に成功し、その生化学的な特性解析を行った。

研究成果の概要(英文)：[NiFe]hydrogenases catalyze the reversible reaction of the cleavage and production of H₂, harboring a NiFe center for H₂ activation in a large subunit and iron-sulfur clusters for electron transfer in a small subunit. The H₂-catalyzing biocatalysts have received much attention due to their potential applications in H₂-based fuel cell technology. However, most hydrogenases are highly sensitive to O₂, leading to inactivation of catalytic activity after oxidative stress. We recently found the new O₂-tolerant [NiFe]hydrogenases from our isolated enterobacterium *Citrobacter* sp. S-77. The newly found [NiFe]hydrogenase displays an excellent performance for catalytic H₂-activation as an O₂-tolerant catalyst.

研究分野：生体触媒変換

キーワード：水素酸化反応 ヒドロゲナーゼ 酸素耐性酵素 燃料電池

1. 研究開始当初の背景

ヒドロゲナーゼは、水素分子をプロトンと電子への分解反応とその逆反応の水素生成を触媒する金属酵素である。その生体由来の非貴金属水素触媒は高い水素触媒活性を示すことから、その工業的な応用が期待されている。しかし、これまでに広く研究されてきたヒドロゲナーゼは高い酵素活性を示すが、酸素に不安定であり酸素暴露後には酵素活性が失活してしまう問題があった。近年申請者らはこれらの欠点を克服できる、酸素安定型新規[NiFe]ヒドロゲナーゼの探求とその触媒的な特性解析を行った。また、新規固体高分子型水素燃料電池への応用研究によってその新規酵素が白金触媒を超える優れた性能を示すことを明らかにした。しかし、本新規[NiFe]ヒドロゲナーゼの水素活性化機構と細胞膜近傍における電子伝達系は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らが見出した白金を超える優れた性能を示す本新規ヒドロゲナーゼについて、水素活性化機構とその電子伝達系の解明を行うことを研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新規ヒドロゲナーゼの探索と精製

申請者らは阿蘇くじゅう国立公園から単離した S77 株には高い水素酸化活性と酸素安定性を示すヒドロゲナーゼ活性が確認された。本研究ではジャーファーマンターなどを用いた大量培養に挑む。また、培養細胞からヒドロゲナーゼの精製などを行う。

(2) *Citrobacter* sp. S-77 のゲノム解析

本単離 S-77 株からゲノム DNA を抽出・断片化し、Roche 社 Genome Sequencer FLX を用いて配列の読み込みを行った。さらに得られた配列を用いて *de novo* アセンブルを行い、scaffold 配列を作成した。得られた S-77 株のゲノム配列から既知のヒドロゲナーゼ遺伝子群との相同性を評価した。相同性検索による本菌由来のヒドロゲナーゼ遺伝子群の同定を行った。

(3) [NiFe]S77 複合体の特性解析

ヒドロゲナーゼは、活性中心を有する large subunit と外部との電子の受け渡しをする small subunit によって構成されている。Large subunit の活性中心と small subunit の電子授受は、ヒドロゲナーゼの酵素活性と酸素耐性において重要な役割を果たしていると考えられる。本菌のゲノム解析を基に、[NiFe]S77 の活性中心構造と small subunit の鉄硫黄クラスターの構造の特性を行う。また、新規酵素[NiFe]S77 の構造遺伝子の解明

と生化学的な特性解析を行う。

4. 研究成果

(1) 新規ヒドロゲナーゼの精製

申請者らは阿蘇くじゅう国立公園から単離した *Citrobacter* sp. S77 株から高い水素酸化活性と酸素安定性を示す膜結合型[NiFe]ヒドロゲナーゼ ([NiFe]S77) の精製に成功した。その精製ヒドロゲナーゼは 58.5 kDa の large subunit と 38.5 kDa の small subunit によって構成されている (図 1)。精製[NiFe]S77 は酸素及び一酸化炭素暴露後にも 100%酵素活性が回復できる非常に高い安定性を示す酵素であった。

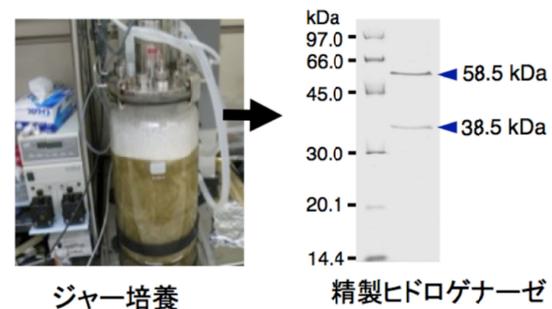


図 1 水素酸化活性を示す新規細菌の単離からヒドロゲナーゼの精製までのプロセス

(2) ゲノム解析の結果

申請者は *Citrobacter* sp. S-77 のゲノム解析を行い、総塩基数 5.22 Mbp の塩基配列の取得に成功した (GenBank ID: DF830265, 830266)。ゲノム解析結果より、本菌は少なくとも 3 種類の互いに独立した hydrogenase 遺伝子群を有していることがわかった (図 2)。これらは、いずれも同じ Enterobacteriaceae family の *E. coli* が擁する HyaABC、HybOABC、HycBCDEFG の 3 種類の hydrogenase 遺伝子と高い相同性を示した。この内、[NiFe]S77 は、N 末端アミノ酸配列解析に基づき Hyb-hydrogenase であることが示唆されている。

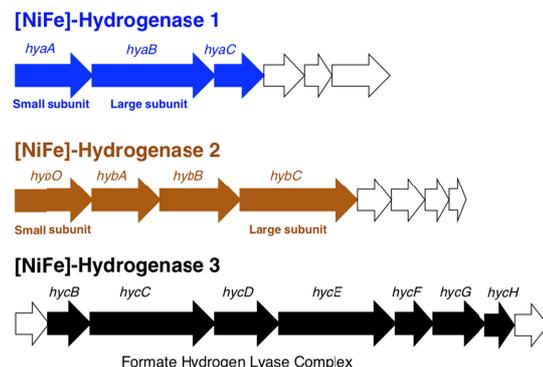


図 2 *Citrobacter* sp. S-77 株の 3 種類の hydrogenase 遺伝子群

(3) 新規[FeS]クラスターの特性解析

我々が新規に発見した[NiFe]S77は大腸菌由来ヒドロゲナーゼ-2 (HYD2) と呼ばれるものと類似した構造を示していることが明らかにした。しかし、HYD2は研究例が非常に少なく、これまでに酸素感受性型[NiFe]ヒドロゲナーゼとして知られていった。そのHYD2は機能未知のタンパク質によって複合体が構造されており、その電子伝達機構と機能がまったく不明である。本菌のゲノム解析の結果によって、[NiFe]S77のsmall subunit (Hyb0)は中間のクラスター周辺に付加的なシステイン残基が保存されており、既存のヒドロゲナーゼとは異なるクラスター構造する可能性が示唆された。これまでに発見された「NiFe」型ヒドロゲナーゼは中間の鉄硫黄クラスターが全て[3Fe4S]に対して、本新規[NiFe]S77は[4Fe4S]クラスターの構造を有する可能性がある(図3)。[4Fe4S]クラスターは、[3Fe4S]クラスターより低い酸化還元電位を持つため、これは、活性中心と電子伝達体とのエネルギー障壁に打ち勝つことができると予測できる。

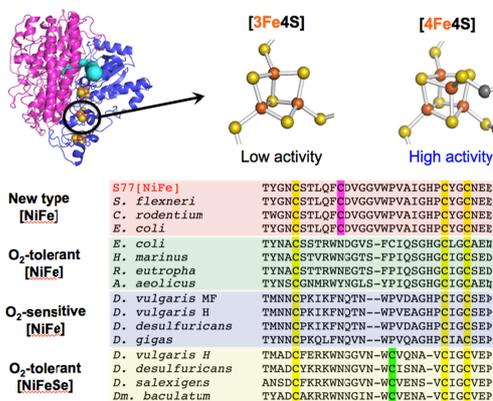


図3 予測される鉄硫黄クラスターのモデル構造とクラスター周辺のアミノ酸配列

(4) [NiFe]S77の電子伝達系の特性解析

本酵素を構成するタンパク質複合体サブユニットは膜近傍の局在性や異なるタンパク質の特性などから完全な状態での単離・精製が非常に困難であった。そのため、本菌のゲノム解析の結果から、[NiFe]S77はヒドロゲナーゼ4量体(HybC、Hyb0、HybB、HydA)の複合体構造をしていることが明らかにした。本研究によって、HybBとHydAは電子伝達体として機能し、[NiFe]S77の活性中心から発生した電子を細胞膜に伝達する機能を示すことが分かった(図4)。

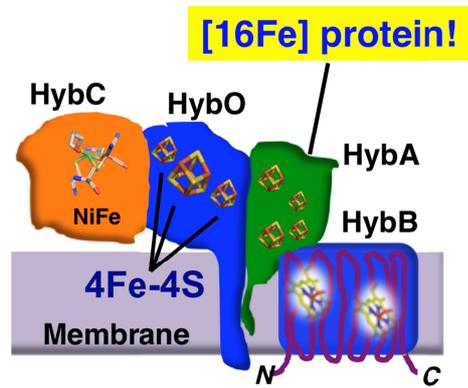


図4 *Citrobacter* sp. S-77由来のHyb-hydrogenaseの生体内局在の模式図

Hyb hydrogenaseは、Enterobacteriaceae familyの微生物である*E. coli*や*S. enterica*等に固有の[NiFe]hydrogenaseで、一般的に構造遺伝子群がHybOCで表される。通常、[NiFe]hydrogenaseの構造遺伝子群はLarge subunitおよびSmall subunitの遺伝子領域が近接しないし連続して存在し、膜結合型のhydrogenaseでは、accessory proteinとしてCyt-bの遺伝子領域が付随する。しかし、Hyb hydrogenaseでは、Large subunitの遺伝子領域であるHybCとsmall subunitの遺伝子領域Hyb0は約2150塩基ほど隔てて存在しており、両領域に挟まれる形で2種類のaccessory protein、HybAおよびHybBの遺伝子領域が存在している。HybBは、分子量43 kDaほどのタンパク質で、2つのヘムbを持って電子伝達機能をしていると思われる。HydAは、分子量約32 kDaのタンパク質であり、N-末端領域にTwin-arginineモチーフを含んでいる。これは、酸素耐性ヒドロゲナーゼのsmall subunitと同様に、HybBをアンカーとしてペリプラズム側に結合していると予測される。そのHydAは4つの鉄硫黄クラスターを構成するシステイン残基が保存されていることから、[4Fe4S]クラスターを4つほど含んでいる鉄硫黄タンパク質と思われる。

今後は、本新規酵素の水素活性化機構を明らかにするために、タンパク質結晶構造解析にも挑戦していきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計7件)

1. K.-S. Yoon, N.T. Nguyen, K.T. Tran, K. Tsuji, S. Ogo, Nitrogen Fixation Genes and Nitrogenase Activity of the Non-Heterocystous Cyanobacterium *Thermoleptolyngbya* sp. 0-77. *Microbes Environ.* 32(4),

- 324-329 (2017). (doi: 10.1264/j sme2.ME17015) 査読有
2. Y. Shomura, M. Taketa, H. Nakashima, H. Tai, H. Nakagawa, Y. Ikeda, Y. M. Ishii, Y. Igarashi, H. Nishihara, K.-S. Yoon, S. Ogo, and Y. Higuchi, Structural basis of the redox switches in the NAD⁺-reducing soluble [NiFe]-hydrogenase, *Science* 537, 928-932 (2017). [Press Release] [Nikkei Shimbun] (doi: 10.1126/science.aan4497) 査読有
 3. M. Takenaka, K.-S. Yoon, T. Matsumoto, and S. Ogo, Acetyl-CoA Production by Encapsulated Pyruvate Ferredoxin Oxidoreductase in Alginate Hydrogels, *Bioresour. Technol.* 227, 279-285 (2017). (doi: 10.1016/j.biortech.2016.12.051) 査読有
 4. S. Ogo, Y. Mori, T. Ando, T. Matsumoto, T. Yatabe, K.-S. Yoon, H. Hayashi, and M. Asano, One Model, Two Enzymes: Activation of Hydrogen and Carbon Monoxide, *Angew. Chem. Int. Ed.* 56, 9723-9726 (2017). [Hot Paper] [Cover Picture] [EurekaAlert! AAAS] [Press Release] (doi: 10.1002/anie.201704864) 査読有
 5. N.D. Muhd Noor, K. Nishikawa, H. Nishihara, K.-S. Yoon, S. Ogo S, and Y. Higuchi, Improved purification, crystallization and crystallographic study of Hyd-2 type [NiFe] hydrogenase from *Citrobacter* sp. S-77, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* F72, 52-58 (2016). (doi: 10.1107/S2053230X15024152) 査読有
 6. K. Tsuji, K.-S. Yoon, and S. Ogo, Biochemical Characterization of a Bifunctional Acetaldehyde-Alcohol Dehydrogenase Purified from a Facultative Anaerobic Bacterium *Citrobacter* sp. S-77, *J. Biosci. Bioeng.* 121, 253-258 (2016). (doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.06.019) 査読有
 7. K.G. Sigfridsson, N. Leidel, O. Sanganas, P. Chernev, O. Lenz, K.-S. Yoon, H. Nishihara H, A. Parkin, F. A. Armstrong, S. Dementin, M. Rousset, A.L. De Lacey, and M. Haumann, Structural Differences of Oxidized Iron-Sulfur and Nickel-Iron Cofactors in O₂-Tolerant and O₂-Sensitive Hydrogenases Studied by X-ray Absorption Spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, 1847, 162-170 (2015). (doi: 10.1016/j.bbabi.2014.06.011) 査読有
- 〔学会発表〕(計8件)
1. Ki-Seok Yoon, New insights of naturally occurring O₂-tolerant [NiFe]hydrogenase, ICPAC2018, Siem Reap, Cambodia, March 7-10, 2018
 2. Kohsei Tsuji, Ki-Seok Yoon, Seiji Ogo, S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by coenzyme A, ConBio2017, Kobe, December 6-9, 2017.
 3. Makoto Takenaka, Ki-Seok Yoon, Takahiro Matsumoto, Seiji Ogo, Acetyl-CoA production by immobilized pyruvate-ferredoxin oxidoreductase, 69th The Society for Biotechnology, Annual Meeting 2017, Tokyo, Sept 11-14, 2017.
 4. Kohsei Tsuji, Ki-Seok Yoon, Seiji Ogo, Biochemical characterization of Acetaldehyde-alcohol dehydrogenase from *Citrobacter* sp. S-77, 6th CSJ Chemistry Festa, Tokyo, November 14-16, 2016 (Poster).
 5. Ki-Seok Yoon, Biochemical and phylogenetic studies of Hyd-2 type O₂-tolerant [NiFe]hydrogenase, Gordon Research Conference: Metallocofactors, Stonehill College in Easton, MA, United States, June 12-17, 2016.
 6. Ki-Seok Yoon, Properties of new hydrogenase and its fuel cell, New Progress of Microbiology; Microbial Kyushu Symposium, Miyazaki, December 5, 2015.
 7. Kohsei Tsuji, Ki-Seok Yoon, Seiji Ogo, Purification and biochemical characterization of Coenzyme A-acetylating acetaldehyde-alcohol dehydrogenase, New Progress of Microbiology; Microbial Kyushu Symposium, Miyazaki, December 5, 2015.
 8. Ki-Seok Yoon, Insight into phylogenetic diversity of O₂-tolerant [NiFe]hydrogenase, Gordon Research Conference: Enzyme, Coenzyme &

Metabolic Pathways, Waterville Valley,
NH, United States, July 12-17, 2015.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.cstm.kyushu-u.ac.jp/ogo/modules/member/index.php/member/yoon.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

尹 基石 (Ki-Seok Yoon)

九州大学・カーボンニュートラルエネルギー

国際研究所 (WPI-ICNER)・准教授

研究者番号：50701497

(2)研究分担者：なし

(3)連携研究者：なし