

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580094

研究課題名(和文) 高安定型ヒドロゲナーゼのシトクロム *b* 複合体の調製と解析研究課題名(英文) Purification and analysis of the highly stable hydrogenase as a cytochrome *b* complex form.

研究代表者

西原 宏史 (NISHIHARA HIROFUMI)

茨城大学・農学部・准教授

研究者番号：10260465

研究成果の概要(和文)：ヒドロゲナーゼは水素の酸化・発生反応を行う酵素で、水素生産や燃料電池用触媒への利用が期待される。本研究では優れた耐熱性・耐酸素性をもつ高安定型ヒドロゲナーゼを本来の細胞膜における存在形態であるシトクロム *b* 複合体として精製することに成功し、水素に依存したシトクロム *b* の還元を機能的に確認することができた。これにより、ヒドロゲナーゼの安定化や安定な人工酵素のデザインに有用な情報を得るために、結晶化および構造解析へと供することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：Hydrogenases have been anticipated for their potential use in hydrogen production and development of alternative hydrogen fuel cell catalyst to noble platinum. In this study, we succeeded in purification of the highly stable hydrogenase as a cytochrome *b* complex form. It will enable us to perform further crystallogenic and structural study of the enzyme to obtain useful information for hydrogenase stabilization and development of stable mimics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：ヒドロゲナーゼ, シトクロム *b*, 蛋白質精製, 膜蛋白質, 可溶化, 水素酸化細菌, *Hydrogenovibrio marinus*

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒドロゲナーゼは水素の酸化・発生反応を行う酵素で、例えば光化学系との組み合わせにより水からの水素生産も可能にする。また、希少資源である白金に替わる、再生可能な水素燃料電池用触媒としての利用が期待

される[1]。

(2) 我々は高酸素分圧下で生育できる新属新種の好気性水素酸化細菌 *Hydrogenovibrio marinus* を分離し[2]、その膜結合型ヒドロゲナーゼ (Membrane-bound hydrogenase; MBH)

は極めて高い酸素耐性と耐熱性をもつなど実用的な特徴を有することを見出した[3]。

(3) これまでに *H. marinus* 由来の MBH (HmMBH) の蛋白質一次配列、および *Desulfovibrio* 属細菌由来ヒドロゲナーゼの結晶構造[4, 5]に基づく解析から、HmMBH で多く見られるイソロイシン残基が安定性に寄与することが推測され、立体構造の解明は非常に興味深いものとなった。

(4) 本酵素は活性中心の構造から [NiFe] 型ヒドロゲナーゼに分類される。これまで [NiFe] 型ヒドロゲナーゼの構造解析は、*Desulfovibrio* 属細菌のペリプラズム局在型酵素で成功しているが、特に酸素による酸化失活に対して高い耐性をもつ好気性菌由来の MBH では例がない。

(5) 典型的な MBH はヒドロゲナーゼ分子部位と生体内電子受容体であるシトクロム *b* が複合体を構成している。膜からの可溶化の過程でシトクロム *b* が容易に外れてしまうため、元来の存在状態である複合体としての調製は成されていなかった。

[参考文献]

- [1] Mertens, R. and Liese, A. Biotechnological applications of hydrogenases. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 343-348 (2004)
- [2] Nishihara, H. Genus III *Hydrogenovibrio* Nishihara, Igarashi and Kodama 1991b, 132^{VP}. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2nd edn.), Vol. 2: The Proteobacteria (Part B), D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, G. M. Garrity (eds.), Springer-Verlag New York, pp.188-189 (2005)
- [3] Nishihara, H. *et al.* Characterization of an extremely thermophilic and oxygen-stable membrane-bound hydrogenase from a marine hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenovibrio marinus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232, 766-770 (1997)
- [4] Higuchi, Y. *et al.* Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis. *Structure* 5, 1671-1680 (1997)

[5] Volbeda, A. *et al.* Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* 373, 580-587 (1995)

2. 研究の目的

水素は燃焼による生成物は水であり、水素燃料電池によって電気に変換することもできるため、21世紀におけるクリーンなエネルギーとして期待される。ヒドロゲナーゼは水素の酸化・発生反応を行う酵素で、例えば光化学反応による水の光分解と組み合わせることによって、水を原料とした水素の生産も可能にする。また、常温で機能する水素燃料電池では高価な白金触媒が用いられているが、ヒドロゲナーゼはそれに替わる水素酸化触媒としての利用が期待されている。実際に際して課題となるのはその安定性であり、とりわけ活性中心が酸素によって容易に酸化され、活性を失うことは重要な問題点である。

好気性水素酸化細菌 *H. marinus* 由来の MBH は好氣的環境で高い水素酸化活性を機能し、生体エネルギーである ATP の生成に関与する。本研究では、酸素耐性および耐熱性に優れる本酵素の構造解析を本来の存在形態であるシトクロム *b* 複合体として可能にすることを目的とし、精製法の確立と酵素的な解析を試みた。

3. 研究の方法

(1) *H. marinus* の培養および膜画分の調製と可溶化

培養は 1,000 mL 容量の坂口フラスコ、または 10 L 容量のジャーファーメンターを用いて独立栄養的に行った。フラスコ培養では気相を水素/酸素/炭酸ガスの混合ガスで置換し、ジャーファーメンターでは連続的に通気して 30°C で行った[6, 7]。膜画分は超音波破碎後の無細胞抽出液を超速心分離することにより調製した[6]。可溶化は界面活性剤の種類、濃度、異なる界面活性剤のコンビネーション、バッファー種、処理時間と温度などの条件を適宜組み合わせで検討した。

(2) ヒドロゲナーゼ活性の測定 : Benzyl viologen (BV) 還元活性

ヒドロゲナーゼの水素酸化反応に伴う BV の還元速度によって活性を求めた[8]。還元によって無色から紫色に呈色する BV の 604nm における吸光度 (モル吸光係数; $8.4\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) の変化を 30°C にて測定し、1 min に $1\ \mu\text{mol}$ の BV を還元する酵素量を 1 U とした。50 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.0) を使用し、400 mM BV を終濃度 10 mM になるように添加して反応を開始した。

(3) HmMBH-シトクロム *b* 複合体の量的評価

①方法 I

MBHによる水素酸化反応に共役して、シトクロム *b* が還元型になることを確認することで行った。*H. marinus* の還元型シトクロム *b* では 561 nm に α -吸収帯ピークが見られるため、水素還元型と酸化状態のサンプルとの吸光度差 (水素還元型 $Ab_{S_{561}}$ - 酸化型 $Ab_{S_{561}}$) を測定し、存在量の目安とした。

②方法 II

Bernhard らの方法 [9] を参考にして、還元状態のサンプルの 561 nm と 575 nm の差 ($\Delta A_{561-575nm}$) を測定した。これは Cyt *b* の 575 nm での吸収が酸化還元に影響されないことを利用したものである。

(4) カラム精製

蛋白質精製装置 Biologic DuoFlow 10 Base システム (Bio-Rad) を使用し、嫌気条件にて室温で行った。

(5) *H. marinus* 由来ユビキノン-8 の抽出

Rauchova らの方法 [10] を参考にし、アセトンによる抽出、シリカゲルプレートによる分離精製を行った。

(6) 結晶化の検討

沈殿剤として、ハンプトンリサーチ社のクリスタルスクリーンキット数種類を使用し、ハンギングドロップ法による検討を行った。タンパク質溶液 1 μ l と沈殿剤溶液 1 μ l を混合した結晶化用ドロップを 0.1 ml の沈殿剤溶液に対して 10°C にて蒸気平衡させた。

[参考文献]

[6] Nishihara, H. *et al.* Isolation of an obligately chemolithoautotrophic, halophilic and aerobic hydrogen-oxidizing bacterium from a marine environment. Arch. Microbiol. 152, 39-43 (1989)

[7] Nishihara, H. *et al.* Growth characteristics and high cell-density cultivation of a marine obligately chemolithoautotrophic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenovibrio marinus* strain MH-110 under a continuous gas-flow system. J. Ferment. Bioeng. 72, 358-361 (1991)

[8] Yoon, K. S. *et al.* Isolation and characterization of a new facultatively autotrophic hydrogen-oxidizing Betaproteobacterium, *Hydrogenophaga* sp. AH-24. FEMS Microbiol. Lett. 278, 94-100 (2008)

[9] Bernhard, M. *et al.* Functional and structural role of the membrane-bound hydrogenase complex of *Alcaligenes eutrophus* H16. Eur. J. Biochem. 15, 179-86 (1997)

[10] Rauchova, H. *et al.* Steady-State Kinetics of Reduction of Coenzyme Q Analogs by Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase in brown adipose Tissue Mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 344, 235-241 (1997)

4. 研究成果

(1) HmMBH-シトクロム *b* 複合体の量的評価方法の検討

方法 I では Cyt *b* の α -吸収帯 (561 nm) における水素還元型と酸化型サンプルの吸光度差を指標とした。方法 II では Cyt *b* の 575 nm での吸収が酸化還元に影響されないことを利用し、還元型サンプルの 561 nm と 575 nm の吸光度差を測定したが、いずれの方法でもサンプルに共存する Cyt *c* の 552 nm 付近における吸収が加算され、信頼性に欠けることがわかった (図 1, 水素ガス添加前の吸収をベースラインとした)。

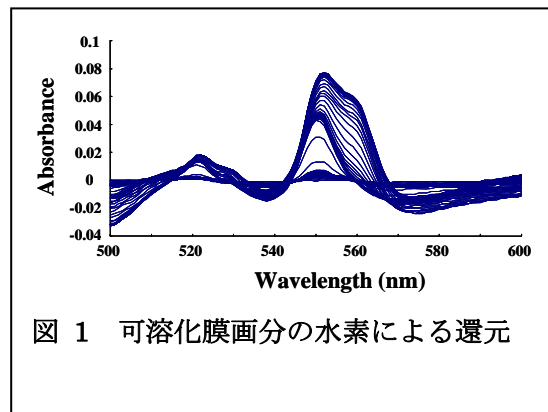


図 1 可溶化膜画分の水素による還元

一方、図 2 はあらかじめ 1 mM ascorbic acid で還元処理した可溶化膜画分を水素により還元した場合のスペクトル変化であり、Cyt *b* 由来の 561 nm 付近の吸収が特異的に観察された。そこでアスコルビン酸還元型サンプルの吸収を差し引き、さらに酸化・還元状態でほとんど影響を受けない 575 nm における吸収をベースラインとして差スペクトルを算出する方法により評価することとした (HmMBH-Cyt *b* 複合体 = 水素還元型 [$\Delta A(561-575 \text{ nm})$] - アスコルビン酸還元型 [$\Delta A(561-575 \text{ nm})$])。

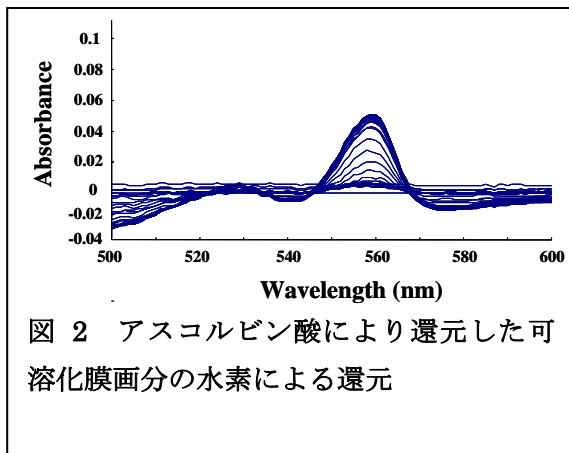


図 2 アスコルビン酸により還元した可溶化膜面分の水素による還元

(2) 菌体の洗浄によるシトクロム *c* の除去
細胞破碎前に菌体を 15-25 %の硫酸アンモニウムを含むバッファーで洗浄することにより、ペリプラズムや細胞膜表面に多量に存在する Cyt *c* のみを効果的に除去できることを見出した。この操作は細胞膜からの MBH の可溶化に際して、Cyt *b* 複合体の存在量をより正確に把握するために有効であった。

(3) 膜からの可溶化条件および精製の検討
界面活性剤は HmMBH に対して高い可溶化率を示した Triton X-100, Dodecyl- β -D-maltoside を使用し、コール酸ナトリウムの併用効果なども検討した。また、膜蛋白質の可溶化を促進する効果が期待される塩類や sucrose, glycerol の添加を試みたが、活性の可溶化率、 Δ Abs (561-575 nm) 共に添加剤の種類による有意な差は見られなかったため、カラム精製への影響が少なく、蛋白質安定化効果のある glycerol の利用が適当と考えられた。Cyt *b* 複合体としての回収率を考慮した場合、界面活性剤は Triton X-100 が効果的であり、濃度は 0.1 - 1%、添加剤としての glycerol 濃度は 10 - 30%、可溶化温度は 0 - 40°C が適当であった。バッファー種はリン酸カリウム, Bis-Tris, HEPES バッファーを検討した。その結果、10 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7), 0.1 M 硫酸アンモニウム, 1 mM DTT, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM PMSF, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 0.5% 6-amino-n-caproic acid を使用し、Ar ガス雰囲気下 30°C で 1 h の可溶化の後、氷冷下でさらに 1 h 可溶化することにより、細胞膜から約 50%の回収率で HmMBH-Cyt *b* 複合体としての可溶化を行うことができた。各種カラムクロマトグラフィーを検討し、ハイドロキシアパタイト, Q-Sepharose High Performance, Superdex 200 を使用して分子量 65 kDa, 37 kDa, 24 kDa のサブユニットから成る 3 量体ヒドロゲナーゼを得ることが

できた (図 3)。比活性 42.0 U/mg で活性の回収率、Cyt *b* 複合体の量的評価に基づく回収率ともに膜面分の 23%程度と求められた。Superdex 200 カラムによる分子量は 286 kDa と求められ、 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ の状態で存在していることが示唆された。得られた精製酵素の結晶化を試みたが、結晶の生成が観察される条件は見出されていない。

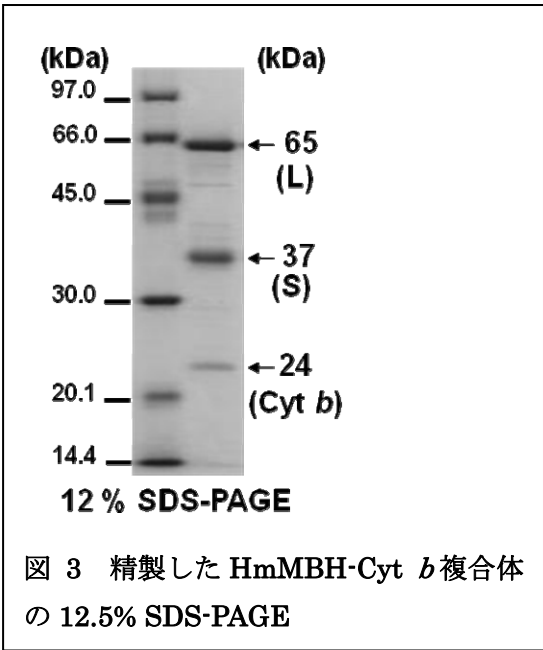


図 3 精製した HmMBH-Cyt *b* 複合体の 12.5% SDS-PAGE

(4) 吸収スペクトル測定
図 4 に精製された HmMBH-Cyt *b* 複合体の吸収スペクトルを示す。また、水素飽和水を添加することによって水素に依存した Cyt *b* の還元が継時的に進行する様子が確認された。*H. marinus* から抽出したユビキノン-8 との反応性を調べたが、有意と思われる還元反応は観察されなかった。

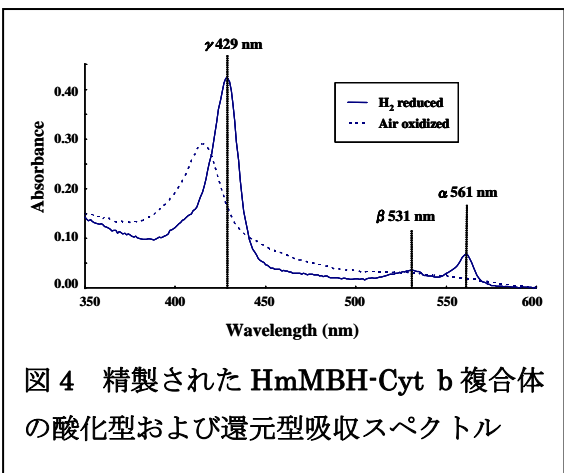
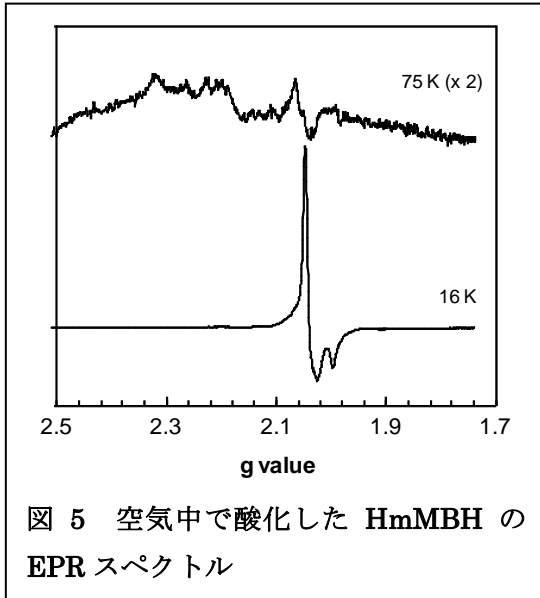


図 4 精製された HmMBH-Cyt *b* 複合体の酸化型および還元型吸収スペクトル

(5) 量体精製酵素の EPR 解析

HmMBH の耐酸素性解析のため、好氣的に 72 h 放置した酵素の EPR 解析を行い、活性中心および電子伝達サブユニットの FeS-クラスターの酸化状態を調べた(図 5, 実験条件: 10 mW, 10G modulation amplitude, 100 kHz modulation frequency, 1.0×10^5 receiver gain, 9.411 GHz microwave frequency)。



酸化された $[3\text{Fe-4S}]^+$ クラスターの典型的な強いシグナルが温度依存的に 16K で観察されたが、このような条件で通常の $[\text{NiFe}]$ 型ヒドロゲナーゼでは高温側 (75K) で観察されるようになる酸化型 Ni の強いシグナル (Ni-A, unready 型) は見られず、非常に弱い Ni-B (ready 型) シグナルのみが観察された。このような好氣的条件でも多くの活性中心が EPR サイレントである Ni (II) の状態を保っていること、あるいは Ni-A まで酸化されにくい特徴をもつことが示された。

(6) 得られた成果の位置づけと今後の展望

ヒドロゲナーゼは水素の生産や燃料電池用触媒としての利用が期待される重要な酵素である。本研究では好氣的性水素酸化細菌 *H. marinus* 由来の耐熱性・耐酸素性 MBH を本来の細胞膜での存在形態である Cyt *b* 複合体として精製することに成功し、水素に依存した Cyt *b* の還元を機能的に確認することができた。精製法の検討に加え、高い耐酸素性に関して EPR を利用した解析を実施し、活性中心の Ni が酸化されにくい特徴をもつことが示された。今後、ヒドロゲナーゼの安定化や安定な人工酵素のデザインに有用な情報を得ることを目指し、結晶化および構造解析の研究を進めることが可能になった。ATP の生成に関与する MBH の結晶構造は世界的にも解

析されておらず、特に Cyt *b* 複合体での解析は分子レベルでの機能解明のために重要である。また、MBH-Cyt *b* の下流で機能する電子伝達体を明らかにすることは、未だ全容が明確にされていない微生物水素酸化系の理解に貢献することができる。

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には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① K. S. Yoon, K. Fukuda, K. Fujisawa, H. Nishihara, Purification and characterization of a highly thermostable, oxygen-resistant, respiratory $[\text{NiFe}]$ -hydrogenase from a marine, aerobic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenovibrio marinus*. International Journal of Hydrogen Energy, 査読有, 36: 7081-7088 (2011)

[学会発表] (計 1 件)

① 西原宏史、*Hydrogenovibrio marinus*由来膜結合型ヒドロゲナーゼ-シトクロム *b* 複合体の精製と解析、第 62 回日本生物工学会大会、2010 年 10 月 29 日、宮崎

[その他]

ホームページ <http://www.ibaraki.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西原 宏史 (NISHIHARA HIROFUMI)

茨城大学・農学部・准教授

研究者番号：10260465