

博士論文審査報告書

氏名	松浦 滉明
学位の種類	博士（理学）
学位記番号	博理第124号
学位授与報告番号	甲第373号
学位授与年月日	令和2年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当
論文題目	Structural studies on a novel O ₂ -protecting mechanism found in [NiFe]-hydrogenase from <i>Citrobacter</i> sp. S-77 「 <i>Citrobacter</i> sp. S-77 由来[NiFe]ヒドロゲナーゼに見出された新規酸素防御機構の構造化学的研究」
論文審査委員	(主査) 教授 水島恒裕 (副査) 教授 樋口芳樹 (副査) 教授 吉田秀郎 (副査) 特任准教授 緒方英明 (北海道大学低温科学研究所、特任准教授) (副査) 研究グループリーダー 嶋 盛吾 (ドイツ・マックスプランク研究所)

1. 論文内容の要旨

水素エネルギーは次世代のクリーンなエネルギー源として注目されている。[NiFe]ヒドロゲナーゼは高効率な水素の分解・合成触媒として応用が期待されており、その触媒反応や酸素耐性機構解明の研究が進められている。これまで[NiFe]ヒドロゲナーゼの酸素耐性にとっては、酸素耐性酵素の持つ特殊な構造の近位・鉄硫黄クラスター（[4Fe-3S]）が必須であると考えられてきた。最近、*Citrobacter* sp. S-77に見出された[NiFe]ヒドロゲナーゼ（S77HYB）は、近位の鉄硫黄クラスターが酸素感受性の高い標準的酵素と同様の[4Fe-4S]型であるにも関わらず、酸素に安定な性質を持つことが示された。本研究では、S77HYBの酸素耐性を遺伝子工学的手法と電気化学的手法によって評価した。また、X線結晶解析法および分光学的手法を用いて[NiFe]ヒドロゲナーゼが持つ酸素防御の分子機構の解明を目指した。

本研究では、まず、水素利用性の独立栄養条件では生育できない *Ralstonia eutropha* 株に S77HYB を導入し、それが空気条件下においても S77HYB の水素酸化活性に依存した独立栄養培養で生育することを確認した。また、電気化学的手法（クロノアンペロメトリー測定）により S77HYB が酸素条件下で触媒活性を維持できることを確認した。さらに、S77HYB の良質単結晶を調製し、その空気酸化型、水素還元型および化合物酸化型について高分解能 X 線結晶解析を行った。その結果、近位[4Fe-4S]クラスターとその近傍のアスパラギン酸側鎖および水分子が、酵素の酸化還元同期した可逆的な構造変化と再配置を示すこと

を見出し、これらが分子動力学シミュレーションの結果とも整合することを示した。また、極低温 EPR 分光法による解析の結果、酸化型 S77HYB の Ni-Fe 活性部位が標準的 [NiFe] ヒドロゲナーゼに見られないスピン分布を示すことから、近位 [4Fe-4S] クラスタが超酸化状態になっている可能性を見出した。これらの結果を総合して、S77HYB の近位 [4Fe-4S] クラスタが、酸素耐性酵素の [4Fe-3S] クラスタと同様に活性部位に余分の電子を供給して酸素を還元できる能力を持つことを提案した。

2. 論文審査結果

本研究は、新規に見出された *Citrobacter sp.* S-77 由来の膜結合性 4 量体 [NiFe] ヒドロゲナーゼのヒドロゲナーゼヘテロ 2 量体ユニット (S77HYB) の酸素防御機構の構造基盤を構築することを目的としている。本研究では、最初に遺伝子工学的手法および電気化学的手法を用いて S77HYB の酸素耐性能の精査を行った。その結果、S77HYB 酵素の導入により菌体に酸素耐性を付与できること、および、実際に酸素条件下でも S77HYB が酵素活性を維持できることを確認した。次に、S77HYB 結晶の空気酸化型、水素還元型および化合物による強制酸化型について高分解能の X 線構造解析に成功した。その結果、近位 [4Fe-4S] クラスタとその近傍のアスパラギン酸側鎖が、酵素の酸化還元同期した可逆的な構造変化を示すことを見出した。また、この構造変化の可逆性は、分子内の水分子の再配置が重要であることを見出し、それが分子動力学シミュレーションの結果と整合することを示した。これらの結果を総合して、[NiFe] ヒドロゲナーゼの新しい酸素防御の分子機構を提案した。

本研究は、特殊な構造の [4Fe-3S] クラスタではなく、一般的な [4Fe-4S] クラスタでも酵素の構造条件を整えば酸素耐性に寄与するというを構造的に初めて示し、[NiFe] ヒドロゲナーゼが酸素によって機能を失わないための新しい防御機構を見出したものと評価できる。本研究の進展は、今後当該分野の基礎研究の発展に加えて、新規の人工デバイスの開発等に大いに寄与するものと期待される。また、本研究結果は、酸素によって不活性化されやすい他の酵素分子の活性を制御する研究にも重要な知見を与え得る。

よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として価値のあるものと認める。

また、令和 2 年 1 月 20 日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

博士論文審査報告書

論文題目 : Structural studies on a novel O₂-protecting mechanism found in [NiFe]-hydrogenase from *Citrobacter* sp. S-77

「*Citrobacter* sp. S-77 由来[NiFe]ヒドロゲナーゼに見出された新規酸素防御機構の構造化学的研究」

申請者 : 松浦 滉明

1. 論文内容の要旨

水素エネルギーは次世代のクリーンなエネルギー源として注目されている。[NiFe]ヒドロゲナーゼは高効率な水素の分解・合成触媒として応用が期待されており、その触媒反応や酸素耐性機構解明の研究が進められている。これまで[NiFe]ヒドロゲナーゼの酸素耐性にとっては、酸素耐性酵素の持つ特殊な構造の近位・鉄硫黄クラスター ([4Fe-3S]) が必須であると考えられてきた。最近、*Citrobacter* sp. S-77 に見出された[NiFe]ヒドロゲナーゼ (S77HYB) は、近位の鉄硫黄クラスターが酸素感受性の高い標準的酵素と同様の [4Fe-4S]型であるにも関わらず、酸素に安定な性質を持つことが示された。本研究では、S77HYB の酸素耐性を遺伝子工学的的手法と電気化学的手法によって評価した。また、X線結晶解析法および分光学的手法を用いて[NiFe]ヒドロゲナーゼが持つ酸素防御の分子機構の解明を目指した。

本研究では、まず、水素利用性の独立栄養条件では生育できない *Ralstonia eutropha* 株に S77HYB を導入し、それが空気条件下においても S77HYB の水素酸化活性に依存した独立栄養培養で生育することを確認した。また、電気化学的手法 (クロノアンペロメトリー測定) により S77HYB が酸素条件下で触媒活性を維持できることを確認した。さらに、S77HYB の良質単結晶を調製し、その空気酸化型、水素還元型および化合物酸化型について高分解能 X線結晶解析を行った。その結果、近位 [4Fe-4S] クラスターとその近傍のアスパラギン酸側鎖および水分子が、酵素の酸化還元に同期した可逆的な構造変化と再配置を示すことを見出し、これらが分子動力学シミュレーションの結果とも整合することを示した。また、極低温 EPR 分光法による解析の結果、酸化型 S77HYB の Ni-Fe 活性部位が標準的 [NiFe] ヒドロゲナーゼに見られないスピン分布を示すことから、近位 [4Fe-4S] クラスターが超酸化状態になっている可能性を見出した。これらの結果を総合して、S77HYB の近位 [4Fe-4S] クラスターが、酸素耐性酵素の [4Fe-3S] クラスターと同様に活性部位に余分の電子を供給して酸素を還元できる能力を持つことを提案した。

2. 論文審査結果

本研究は、新規に見出された *Citrobacter sp.* S-77 由来の膜結合性 4 量体[NiFe]-ヒドロゲナーゼのヒドロゲナーゼヘテロ 2 量体ユニット (S77HYB) の酸素防御機構の構造基盤を構築することを目的としている。本研究では、最初に遺伝子工学的手法および電気化学的手法を用いて S77HYB の酸素耐性能の精査を行った。その結果、S77HYB 酵素の導入により菌体に酸素耐性を付与できること、および、実際に酸素条件下でも S77HYB が酵素活性を維持できることを確認した。次に、S77HYB 結晶の空気酸化型、水素還元型および化合物による強制酸化型について高分解能の X 線構造解析に成功した。その結果、近位[4Fe-4S]クラスターとその近傍のアスパラギン酸側鎖が、酵素の酸化還元同期した可逆的な構造変化を示すことを見出した。また、この構造変化の可逆性は、分子内の水分子の再配置が重要であることを見出し、それが分子動力学シミュレーションの結果と整合することを示した。これらの結果を総合して、[NiFe]ヒドロゲナーゼの新しい酸素防御の分子機構を提案した。

本研究は、特殊な構造の[4Fe-3S]クラスターではなく、一般的な[4Fe-4S]クラスターでも酵素の構造条件を整えば酸素耐性に寄与するという構造化学的に初めて示し、[NiFe]ヒドロゲナーゼが酸素によって機能を失わないための新しい防御機構を見出したものと評価できる。本研究の進展は、今後当該分野の基礎研究の発展に加えて、新規の人工デバイスの開発等に大いに寄与するものと期待される。また、本研究結果は、酸素によって不活性化されやすい他の酵素分子の活性を制御する研究にも重要な知見を与え得る。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、令和 2 年 1 月 20 日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

主査：水島恒裕



副査：樋口芳樹



：吉田秀郎



：緒方英明



(北海道大学低温科学研究所、特任准教授)

：嶋 盛吾



(ドイツ・マックスプランク研究所 研究グループリーダー)