

# 博士論文審査報告書

氏名	Noor Dina Binti Muhd Noor (ノール デイナ ビンチ ムートー ノール)
学位の種類	博士 (理学)
学位記番号	博理第 9 5 号
学位授与報告番号	甲第 2 6 5 号
学位授与年月日	平成 2 8 年 3 月 2 2 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
論文題目	Biochemical and crystallographic study of O <sub>2</sub> -tolerant [NiFe]-hydrogenase from <i>Citrobacter sp.</i> S-77 「酸素耐性[NiFe]-ヒドロゲナーゼの生化学的および結晶学的研究」
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) 教授 栗栖 源嗣 (大阪大学蛋白質研究所) (副査) 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)

## 1. 論文内容の要旨

[NiFe]ヒドロゲナーゼは、主に微生物が有する酵素で、水素分子の分解・合成反応を触媒する。本酵素の触媒能は燃料電池等への応用利用が期待されている。しかし、広く研究されてきた「標準的酵素」においてはその酸素感受性の克服が大きな課題であった。近年、大気中でも触媒機能を失わない「酸素耐性酵素」が見出され、その酸素耐性の本質は、3個の電子伝達クラスターのうち Ni-Fe 活性部位に対して近位の[4Fe-3S]-6Cys クラスターの可逆的構造変化にあることが示された。最近発見された *Citrobacter sp.* S-77 (CS-77) が有する[NiFe]-ヒドロゲナーゼは、そのアミノ酸配列の相同性から大腸菌の膜結合性 4 量体酵素 (Hyd2-タイプ) に属する。CS-77 のヘテロ 2 量体ヒドロゲナーゼユニット (Hyd2-s77) は酸化後に再活性化されても 90%以上の活性値を示し、しかも高触媒活性をもつことが示された。本研究では、Hyd2-s77 の酸素耐性を精査するとともに、その構造-機能相関を解明することを目的とした。

これまでに確立されていた方法で精製された酵素試料は若干の狭雑タンパク質を含み、得られた結晶の X 線回折分解能は、2.2~2.5 Å 程度であった。そこで、精製初期段階においてトリプシンを作用させることで、試料の純度、比活性および収率ともに大幅に改善することに成功した。この試料から得られた結晶からは 1.6 Å の高分解能の X 線回折データを得ることができた。次に Hyd2-s77 が酸素条件下でも水素分解活性を示すことを TTC 活性測定法により示した。これより Hyd2-s77 は標準的酵素等とは異なり、酸素耐性を示すことを証明した。最後に Hyd2-s77 の空気酸化型、水素還元型および K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>による強制酸化

型結晶について X 線結晶解析を行った。Hyd2-s77 の近位の鉄硫黄クラスターは、[4Fe-4S]-4Cys タイプであり、還元型酵素の分子構造は標準的酵素とほとんど同一であった。しかし、[4Fe-4S]-4Cys クラスターは、強制酸化型では還元型と比較して Fe 原子 1 個と S 原子 1 個の座標が移動する構造変化を起こしていた。一方、空気酸化型の結晶構造は、水素還元型と強制酸化型の混合物であった。強制酸化型では、Hyd2 タイプ酵素のみに保存されているアスパラギン酸側鎖のカルボキシ酸素が、移動した Fe 原子を配位していた。これは、脱プロトンしたカルボキシ酸素の負電荷が強制酸化されて構造変化を起こした [4Fe-4S]-4Cys クラスターを安定化していることを示唆する結果であり、従来の酸素耐性機構とは同一の原理ではあるが、異なる様式のものであると結論した。

## 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 (Hyd2-s77) の酸素安定性とその構造基盤を確立することを最終目的としている。本研究では、最初に酸素耐性能の精査および X 線構造化学的研究を推進させるために、高純度の酵素試料を大量に得ることを目指して精製法の改良を行った。精製過程でプロテアーゼによってランダムに切断され、分子量的に不均一になる領域をトリプシン処理により均一にする条件を見出した。その結果、従来法に比して高比活性・高純度の試料を得ることが可能となり、高分解能回折データを与える結晶を得ることに成功した。Hyd2-s77 は、酸素に対する高安定性が報告されていた。そこで、本酵素は、酸素条件下で Ni-Fe 活性部位が酸素化された場合でも水素が存在すれば、水素を分解して得た還元力で活性部位を還元・再活性化し、その触媒能を最大値まで復活させ得る「酸素耐性酵素」であることを、TTC 活性測定法を応用して明らかにした。最後に Hyd2-s77 の空気酸化型、水素還元型および  $K_3Fe(CN)_6$  による強制酸化型について高分解能の X 線結晶構造解析を遂行し、Hyd2-s77 の水素還元 (活性) 型については、分子全体のフォールディング、Ni-Fe 活性部位および 3 個の鉄硫黄クラスターの構造は、酸素耐性を持たない「標準的酵素」と酷似することを示した。しかし、標準的酵素とは異なり、近位の [4Fe-4S]-4Cys クラスターが酵素の酸化還元で構造を可逆的に変化させ、それが本酵素の酸素耐性機構に深く関わる可能性を見出した。また、それには、Hyd2-タイプのヒドロゲナーゼに保存されているアスパラギン酸が重要であることを提案した。

本研究は、新規の酸素耐性 [NiFe]-ヒドロゲナーゼの構造研究によって酸素耐性の新しい様式を見出したものと評価でき、本酵素の応用利用の観点から極めて重要である。また、本結果は、酸化によって不活性化される他の酵素分子の活性を制御する取組に重要な知見を与え得る。本研究の進展は、今後当該研究分野の基礎研究の発展に加えて、新規の水素合成触媒や燃料電池への応用等に大いに寄与するものと期待される。

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、平成 28 年 1 月 13 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。