

# 博士論文審査報告書

氏名 中川 由佳  
学位の種類 博士（理学）  
学位記番号 博理第115号  
学位授与報告番号 甲第353号  
学位授与年月日 平成31年3月22日  
学位授与の要件 学位規則第4条1項該当  
論文題目 A Raman Assay Method for the Enzymes Reacting with Gaseous Substrates and its Application to Hydrogenase  
「ガス状分子を基質とする酵素のためのラマン分光法を用いた新規活性測定法の開発とヒドロゲナーゼへの応用」

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 吉久 徹  
(副査) 教授 酒井 誠

(岡山理科大学理学部化学科)

(副査) 教授 Syun-Ru Yeh

(Albert Einstein College of Medicine)

\* Yeh 委員の審査結果については別紙（英文）として添付する。

## 1. 論文内容の要旨

ヒドロゲナーゼは水素分子を分解してプロトンと電子を生成する反応を触媒し、嫌気性微生物における水素を利用したエネルギー代謝システムで重要な役割を担っている。本酵素の触媒能は燃料電池や酵素電極等への応用利用が期待されており、高効率な触媒反応機構の構造機能相関の解明は重要な課題である。本研究では、ヒドロゲナーゼの基質・水素分子が難溶性であることを利用し、反応系の気相から水素分子のラマン散乱を検出して酵素活性を定量するための測定装置の開発、および、その測定結果に基づいたヒドロゲナーゼ反応機構モデルの提案を目的とした。

本研究で開発した酵素活性測定法では反応系内の気相部分のみがラマン励起用レーザー光によって照射されるため、溶液内の酵素分子は照射光の影響を全く受けない。また、測定中に気体試料を抽出する必要が無いため、反応系内の物質総量に変化を与えることなく長時間にわたり触媒反応の進行を観察できるという特徴も併せ持つ。さらに、ヒドロゲナーゼは、H-D同位体交換やオルトH(D)<sub>2</sub>-パラH(D)<sub>2</sub>の核スピン変換反応を触媒することが知られている。これらの反応はヒドロゲナーゼの水素酸化還元反応の詳細を理解するためには重要である。本装置は、オルトH(D)<sub>2</sub>、パラH(D)<sub>2</sub>、HD等、水素に関わる同位体/異性体のスペクトルを同時に観測することも可能である。本装置を用いて硫酸還元菌由来の[NiFe]ヒドロゲナーゼが示すH-D交換反応をD<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>Oの系で測定した。その結果、本酵素が触媒する同位体交換反応では、H<sub>2</sub> (2原子交換体) とHD (1原子交換体) が同時に生成され、それらの初期生成速度がほぼ同じであることを見出した。反応系内の

酵素濃度の変化に対して、 $H_2$  およびHDの生成初期速度の比は変わらなかったことから、2原子交換 ( $H_2$ 生成) 反応は1原子交換反応後に酵素から遊離して近隣の酵素の活性部位で交換を受けるのではなく、同じ酵素の活性部位で起こることを提案した。本実験で得られた同位体交換反応結果は、Leroux 等によって提唱されたモデル反応式によく一致し、交換反応速度定数 ( $k$ ) と基質の酵素からの遊離速度定数 ( $k_{out}$ ) の比 ( $k/k_{out}$ ) は、 $1.9 \pm 0.2$  と見積もることに成功した。また、この同位体交換反応モデルにおいてプロトンの引き抜き部位と供与部位が異なる可能性を提案した。さらに、反応系の気液界面の面積が等しい場合、 $D_2$ の減衰速度は、反応系内の酵素溶液量 (体積) には依存せず、酵素濃度に依存することからヒドロゲナーゼの触媒反応は主に反応系内の気液界面近辺で行われていることを見出した。

## 2. 論文審査結果

これまで、気体状分子を基質とする酵素の活性を定量する場合、ガスクロマトグラフィー法や質量分析法が利用されていた。これらの分析法は、測定中に気体試料を抽出するため反応系内の圧力が変化し、また微量の酸素が混入する危険がある。その結果、補正が必要となり、また長時間に渡っての測定は困難であった。また、ラマン分光法を用いた酵素活性測定法はこれまでにいくつかの例が報告されているが、それらは全て溶液内に直接レーザー光を照射するため、酵素に損傷を与える可能性があった。申請者が本研究でヒドロゲナーゼの酵素活性測定用に開発したラマン分光装置は以下の特徴を持つ。1) 反応系から気体試料を抽出せずにラマン散乱を測定できるため系内の環境を乱さずに長時間に渡る観測が可能である。2) 酵素反応系の気相部分のみにラマン励起用レーザー光を照射するため光照射によって酵素に損傷を与えない。3) ヒドロゲナーゼが触媒する反応に関わる全ての基質/生成物 (オルト $H(D)_2$ 、パラ $H(D)_2$ 、HD) について同時観測が可能である。

申請者は、本装置を使ってオルト-パラ変換およびH-D交換反応を同時に測定可能であることを実証した。次にヒドロゲナーゼのH-D交換反応 ( $D_2/H_2O$ の系) を定量的に測定し、その酵素濃度依存性を調べた結果から2原子交換 ( $H_2$ 生成) 反応は同じ酵素の活性部位で起こることを提案した。また、Leroux 等によって提唱されたモデル反応式から、交換反応速度定数 ( $k$ ) と基質の酵素からの遊離速度定数 ( $k_{out}$ ) の比 ( $k/k_{out}$ ) を、見積もるとともに、交換反応においては、プロトンの引き抜き部位と供与部位が異なる機構を提案した。さらに、ヒドロゲナーゼの触媒反応が主に反応系内の気液界面近辺で行われていることを見出した。これらの新しい知見は、ヒドロゲナーゼの酵素反応機構の理解に大きく貢献するもので、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寄与するものと期待される。また、本装置は、基質を水素とするヒドロゲナーゼのみならず、 $N_2$ や $CH_4$ 等を基質とする他の重要酵素の活性定量にも利用できると考えられ、応用利用の広い点から極めて重要な成果である。

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31年1月29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。

Jan 30, 2019

**RE: Ms. Yuka Kawahara-Nakagawa's Thesis Review**

To Whom It May Concern:

Ms. Yuka Kawahara-Nakagawa's thesis is aimed to develop a novel spectroscopic method for probing enzymatic reactions involving gas molecules, in particular the hydrogenase reaction. It is a hard project. I applaud her for her success as demonstrated by the absolutely beautiful time-resolve Raman data that she presented in Fig 4-2. It is not easy to be a pioneer. As a biophysicist, I fully appreciate the degree of knowledge and resilience required to set up a novel spectroscopy system that allow the acquisition of weak Raman signals of gas molecules with a good signal to noise ratio, and to develop a sample handling and transport system that allow the preservation of the activity of an oxygen-sensitive enzyme for time-dependent studies. I am sure that the thesis will offer an excellent practical guide for those who are interested in applying the Raman method for the studies of the hydrogenase reactions or any other gas-utilization enzyme reactions.

Thus, I hereby state my full approval of the thesis completed by Ms. Nakagawa in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science in the Graduate School of Life Science, University of Hyogo. I also agree the decision by the dissertation committee who certified that the applicant passed the final oral examination held on January 29, 2019.

Sincerely yours,



Syun-Ru Yeh, Ph.D.

Professor

Department of Physiology and Biophysics