

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「ライフサイエンスの革新を目指した構造
生命科学と先端的基盤技術」
研究課題「生物酵素による水素エネルギー利用
システムの構造基盤解明」

研究終了報告書

研究期間 平成24年10月～平成30年3月

研究代表者：樋口 芳樹
(兵庫県立大学大学院生命理学研究
科、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1)実施概要

課題 1 : 水素酸化細菌 *H. thermoluteolus* TH-1 由来の水素-化学エネルギー変換・[NiFe]ヒドロゲナーゼ (NAD⁺還元ヒドロゲナーゼ) の空気酸化型および水素還元型について, それぞれ 2.5 Å および 2.7 Å 分解能で X 線結晶構造解析に成功した. その結果, 分子内の 5 個の FeS クラスタと FMN の配置は呼吸鎖電子伝達系・複合体Iの対応する補因子のそれらと酷似していた. しかし, ヒドロゲナーゼユニット (HoxFU) とジアフォラーゼユニット (HoxYH) の相互配置は, 複合体Iの対応するユニット (Nqo1・2・3 および Nqo6・4) の配置とは異なっており, 両者は同じ祖先タンパク質から別々に進化してそれらが合体した後, 電子伝達経路の立体配置については最も効率の良い現在の構造に進化したことを証明した. 酸化型酵素の Ni-Fe 活性部位の配位子構造は, 通常酵素とは異なっていた. しかし, 水素還元型では構造変化を起こし, 通常と同じ配位子構造を示していた. さらに, 酸化型では NAD⁺結合部位に酵素自身の C 末端が入り込んでいたが, 還元によりそれが外れて NAD⁺の結合が可能となると同時に FMN が遊離していた. これらの構造変化は, Ni-Fe 活性部位および FMN 結合部位近傍の Fe-S クラスタの酸化還元と同期していた. 今回得られた NAD⁺還元ヒドロゲナーゼの立体構造から, 生物のエネルギー代謝を担う重要酵素の進化的知見を得た. また, 本酵素では分子内金属クラスタの酸化還元がスイッチとなって機能発現のための構造変化を誘導していることが明らかになった (論文 1).

NAD⁺還元ヒドロゲナーゼに類似した酵素として, *Methyrobacterium extroquens* AM1 由来の NAD⁺還元ギ酸脱水素酵素(FDH)について, 精製方法および結晶化条件の検討を進めた結果, 板状の微結晶の調製に成功した.

課題 2 : 直接電子移動型電極触媒反応による水素酸化波のシグナルを解析するのに妥当なモデルを構築し, 電気化学理論に基づいた解析法を提示した. この手法をもとに, 電極に吸着した膜結合型ヒドロゲナーゼが触媒する電気化学的なH₂酸化反応の熱力学および速度論的特性を得た. また, 高電位雰囲気におけるNi-B形成による“酸化的不活性化”に対して電気化学的拮抗阻害モデルを構築し, 電気化学データを速度論的に解析することにより本モデルの妥当性を示した. さらに, このモデルから酸化的不活性化を回避するためにはガス拡散電極を用いることが不可欠であることが予測され, 実験的にその有効性を実証した (論文2).

一方, 標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼと天然電子受容体シトクロム_c₃の電子移動速度定数に及ぼすイオン強度の効果をポアソン-ボルツマン型の理論で説明し, 長距離型の静電相互作用といえども, 近距離相互作用が極めて重要であることを示した. さらにこの考えを利用して静電相互作用を利用した酵素の配向制御法を提案した.

これらの知見と技術を結集して, 水素-酸素バイオ電池としては世界最高出力 (60 °C, H₂/O₂雰囲気下, Passive modeで8.4 mW cm⁻²; 25 °C, H₂/air雰囲気下, Passive modeで6.1 mW cm⁻²) でかつ理論値 (1.23 V) に極めて近い開回路電圧 (1.1 V) を達成した.

NAD⁺還元ギ酸脱水素酵素について, 電気化学的特性の取得を進め, CO₂還元とギ酸酸化の双方向触媒に関する電流-電圧曲線の理論解析を行った. こうした知見を基に, 世界最高レベルの高電流密度でのCO₂のバイオ電解還元 (12 mW cm⁻²) を実現し, 超高出力のギ酸-酸素バイオを構築した (Passive modeで12 mW cm⁻²; 開回路電圧1.2 V [理論値1.25 V]).

Citrobacter sp.S-77由来の新規酸素耐性ヒドロゲナーゼについて空気酸化型, 水素還元型, 化合物酸化型の結晶構造を決定した. 他の酸素耐性および酸素感受性ヒドロゲナーゼとの構造比較から, ヒドロゲナーゼが酸素耐性を獲得するための構造要因を明らかにしつつある.

課題 3 : 本課題で作製した低温光照射用 FT-IR 装置を用いて, 標準型酵素のレーザー光 (514.5 nm) 照射により生じる Ni-L 状態が, 触媒反応サイクルの Ni-C 状態と Ni-SI_a 状態間の変換の中間体であることを突き止めた. Ni-L 状態から Ni-SI_a 状態への変換過程では, Ni-Fe 活性部位から 1 個の電子と 1 個のプロトンが放出され, 放出された電子は Fe-S クラスタ (近

位, 中位, 遠位) へ流れる. 極低温 EPR 測定を行い, Fe-S クラスターの酸化還元状態を評価したところ, 近位 Fe-S クラスターが酸化型の時は電子を受け取ることができ, Ni-C 状態への照射により生じた Ni-L 状態は Ni-SI_a 状態に変換されるが, 還元型の時は Ni-C 状態は Ni-L 状態にのみ変換されることが分かった. 以上より, 近位 Fe-S クラスターの酸化還元状態により触媒反応サイクルが制御されることが判明した (論文 3). Ni-L には複数の状態が存在すると考えられているが, Ni-L の異なる 2 状態を同時に FT-IR により観測することに成功した. 弱塩基性条件下では, Ni-C 状態への照射により 1911 cm⁻¹ に CO 伸縮振動 (ν_{CO}), 2047 と 2061 cm⁻¹ に CN⁻ 伸縮振動 (ν_{CN}) を示す Ni-L2 状態が観測されたが, 塩基性条件下での照射では, 1890 cm⁻¹ に ν_{CO}, 2034 と 2047 cm⁻¹ に ν_{CN} を示す新たな状態が検出された. この新しい状態を, Ni-L2 状態において活性部位 Ni に末端配位しているシステイン残基 (Cys546) の側鎖硫黄が脱プロトン化された状態と考えられる Ni-L3 に帰属した. Ni-L2 状態のプロトン解離に伴うエンタルピー変化とエントロピー変化はそれぞれ 6.4 ± 0.8 kJ mol⁻¹, 25.5 ± 10.3 J mol⁻¹ K⁻¹ と非常に小さい値であることが見出され, ヒドロゲナーゼの Ni-Fe 活性部位ではプロトン移動が効率よく行われることが示された (論文 4).

標準型酵素の活性準備状態 Ni-SI_r は酸塩基平衡により活性状態の 1 つである Ni-SI_a に変換され, 水素分子の分解/合成が可能となるが, 酸塩基平衡の詳細な反応機構は不明であった. 低温 (103–238 K) でレーザー光 (514.5 nm) 照射下の FT-IR スペクトルを測定することで, これまで Ni-SI_r 状態は不活性状態である Ni-SL に光変換されると考えられていたことが間違いで, Ni-SI_r 状態は Ni-SI_a 状態に光活性化することを発見した. 溶液の pH を 8.0 から 9.6 に上げると Ni-SI_r 状態の光活性化が著しく抑制されたことから, この光活性化反応では Ni と Fe 間の架橋配位子 OH⁻ がプロトン化され, H₂O 分子として解離すると解釈した. また, Ni-SL 状態は本酵素で報告されているすべての不活性状態よりも活性化されにくい新たな不活性状態 (Ni-SX と命名) への照射により生成することを突き止めた (論文 5). 光活性化された Ni-SI_a 状態から Ni-SI_r 状態への戻り反応では, 大きな活性化エネルギーと速度論的同位体効果 (k_H/k_D) が検出され, Ni-Fe 活性部位への H₂O 分子付加と脱プロトン化により OH⁻ 架橋配位子が形成することが示された (論文 6).

標準型酵素の中性子結晶解析を可能とする巨大良質単結晶を再現性良く重水中で成長させる条件を見出し, 酸化型結晶の高分解能中性子回折データを取得した.

ラマン分光法を用いてヒドロゲナーゼの触媒活性を定量する方法の開発に成功し, その手法を用いてヒドロゲナーゼの触媒活性を長時間にわたって分析した結果, これまで全く知られていなかった新しい性質を見出して, 現在その分子機構を検討中である.

論文 1 : Y. Shomura *et al.*, *Science*, in press (2017)

論文 2 : K. So, *et al.*, *J. Mater. Chem. A*, **4**, 8742-8749 (2016)

論文 3 : H. Tai *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53** (50), 13817-13820 (2014)

論文 4 : H. Tai *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, **119** (43), 13668-13674 (2015)

論文 5 : H. Tai *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **18** (32), 22025-22030 (2016)

論文 6 : H. Tai *et al.*, *Chem. Commun.*, **53** (75), 10444-10447 (2017)

(2) 顕著な成果

1. 課題1の NAD⁺還元ヒドロゲナーゼの X 線結晶解析 (論文 1)

概要:

X 線結晶解析の結果、本酵素と呼吸鎖電子伝達系・複合体Iは、同じ祖先タンパク質から別々に進化してそれらが合体した後、電子伝達経路の立体配置については最も効率の良い現在の構造に進化したことが証明された。Ni-Fe 活性部位の配位子構造と NAD⁺結合部位の構造から、本酵素では分子内金属クラスターの酸化還元がスイッチとなって機能発現のための構造変化を誘導していることが明らかになった。水素-NADH の酸化還元カップリングの分子機構の解明となる。

2. 課題 3. ヒドロゲナーゼの新規触媒反応中間体の特定と触媒反応サイクルの制御機構の解明 (論文 3)

概要:)

標準型酵素の触媒反応サイクル状態の 1 つである Ni-C への光照射で生じる Ni-L 状態が、触媒反応中間体であることを突き止めた。本酵素がもつ 3 個の Fe-S クラスターのうち近位 Fe-S クラスターが還元されている時は触媒反応は進まないが、酸化されている時は進むことを見出し、近位 Fe-S クラスターの酸化還元状態により触媒反応サイクルの Ni-L と Ni-SI_a 状態間の相互変換が制御されることを明らかにした。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. 課題 3. ヒドロゲナーゼの中性子結晶構造解析

概要:

標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼの巨大良質結晶の調製法に成功し、原子分解能の中性子回折データを取得している。ヒドロゲナーゼは、水素も重水素も分解する酵素活性を持つため、基質として水素を反応させた場合と重水素を反応させた場合でそれぞれについて中性子結晶解析を行えば、両者を核密度分布内で完全に区別することが可能となる。本実験に成功すれば、世界で初めてタンパク質中のプロトン経路を実験的に『見る』方法が確立されることになる。

2. 課題 2. ヒドロゲナーゼ等を触媒とする高機能バイオ電極

概要:NAD⁺還元ヒドロゲナーゼは、中性付近における H⁺/H₂系だけでなく、NAD⁺/NADH系も含めた可逆変換電極触媒となる。類似機能を有する NAD⁺還元ギ酸脱水素酵素は中性付近における CO₂/ギ酸系と NAD⁺/NADH 系の可逆変換電極触媒として機能する。本酵素を電極触媒としたバイオ電極では、中性付近でも極めて高い電流密度 (数十 mA cm⁻²程度) での H₂酸化, H⁺還元, ギ酸酸化, CO₂還元, NADH 酸化および NAD⁺還元を実現でき、数十 mW cm⁻²程度の世界トップクラスの H₂ - O₂ およびギ酸 - O₂ バイオ電池を構築できる。特に高電流密度の CO₂ バイオ電解還元法は企業からも高い関心を持たれている。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

①「樋口」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
樋口 芳樹	兵庫県立大学 大学院生命理学研究科	教授	H24.10~H30.3
庄村 康人	茨城大学 大学院理工学研究科	准教授	H24.10~H30.3

竹田 翠	兵庫県立大学 大学院生命理学研究科	技術員	H24.10～H30.3
西川 幸志	同上	助教	H26.4～H30.3
端口 希理子	同上	技術員	H26.4～H30.3
松本 香代子	同上	技術員	H26.4～H30.3
山西 勲平	同上	M1(H1)～D2(H4)	H26.4～H30.3
松浦 滉明	同上	M1(H1)～D1(H3)	H27.4～H30.3
池田 洋子	同上	技術員	H28.4～H30.3
今西 隆浩	同上	M1(H1)～M2(H2)	H28.4～H30.3
窪田 慎太郎	同上	特任助教	H28.6～H30.3
廣本 武史	同上	特任講師	H28.6～H30.3
柴田 大輝	同上	M1	H29.4～H30.3
樋口 雄大	同上	M1	H29.4～H30.3
鈴木 雅之	同上	技術員	H25.4～H25.9
大須賀 久織	同上	D3	H24.10～H25.3
前 悠里	同上	M2	H24.10～H25.3
勝谷 拓也	同上	M2	H24.10～H25.3
Mahfuza Akter	同上	M2～D4	H24.10～H29.3
中川 英恵	同上	M1～M2	H24.10～H26.3
吉田 早希	同上	M1～M2	H24.10～H26.3
大川 雄嗣	同上	M1～M2	H25.4～H26.3
Noor Dina Binti Noor	同上	D1(H3)～D3(H5)	H25.4～H28.3
井上 誠也	同上	M1～M2	H26.4～H28.3
高木 涼	同上	M1～M2	H26.4～H28.3
松本 卓樹	同上	M1～M2	H26.4～H28.3
中島 悠志	同上	M1～M2	H27.4～H29.3
矢野 晶子	同上	M1～M2	H27.4～H29.3
岡浦 直也	同上	M1～M2	H27.4～H29.3

研究項目

- ・NAD⁺還元ヒドロゲナーゼの X 線結晶解析
- ・酸素耐性ヒドロゲナーゼの X 線結晶解析
- ・標準タイプ酸素感受性ヒドロゲナーゼの超高分解能 X 線結晶解析
- ・標準タイプ酸素感受性ヒドロゲナーゼの中性子結晶解析
- ・ラマン分光法による酵素活性法の開発

②「加納」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
加納 健司	京都大学大学院農学研究科	教授	H24.10～H30.3
白井 理	同上	准教授	H24.10～H30.3
夏 洪斉	同上	D3	H29.4～H29.9
阪井 研人	同上	M1～D1	H25.4～H28.3
日比野 佑哉	同上	D2	H28.4
白岩 咲衣子	同上	M1～M2	H28.4～H30.3
高橋 優依	同上	M1	H29.4～H30.3

河井 翔太	同上	M2～D1	H24.10～H27.3
濱本 塁	同上	M1～M2	H24.10～H26.3
宋 慶盛	同上	M2～D1	H25.4～H28.3
杉本 悠	同上	D1～D3	H26.4～H29.3

研究項目

- ・ NAD⁺還元ヒドロゲナーゼの電気化学的特性評価
- ・ H⁺/H₂の可逆変換系と高電流密度 H₂酸化バイオアノードの構築
- ・ 酸素耐性ヒドロゲナーゼの電気化学特性の評価
- ・ ヒドロゲナーゼを用いた H₂-O₂ バイオ電池の開発
- ・ NAD⁺還元ギ酸脱水素酵素を用いたギ酸-O₂ バイオ電池の開発

②「廣田」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
廣田 俊	奈良先端科学技術大学院 大学物質創成科学研究科	教授	H24.10～H30.3
長尾 聡	同上	助教	H24.10～H30.3
山中 優	同上	助教	H24.10～H30.3
Tai Hulin	同上	特任助教	H25.4～H30.3
林 有吾	同上	D1～D2	H24.10～H26.3
Xu Liyang	同上	M1～M2	H27.6～H29.3

研究項目

- ・ NAD⁺還元ヒドロゲナーゼの分光学的解析
- ・ 酸素耐性ヒドロゲナーゼの分光学的解析
- ・ 標準型ヒドロゲナーゼの触媒反応機構の解明

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

(研究チーム外での連携や協働についてご記入ください。ライフ分野では臨床医等を含みます。)

ドイツ・マックスプランク研究所・化学エネルギー変換研究所（ヒドロゲナーゼの分光・電気化学解析）

ドイツ・ベルリン工科大学（ヒドロゲナーゼの発現系構築）

東京大学大学院農学研究科・茨城大学農学部（ヒドロゲナーゼ遺伝子等の提供）

九州大学大学院工学府（酸素耐性ヒドロゲナーゼを有する菌体の提供）

§ 3 研究実施内容及び成果

3.1 課題1～3の構造化学的研究（兵庫県立大学 樋口グループ）

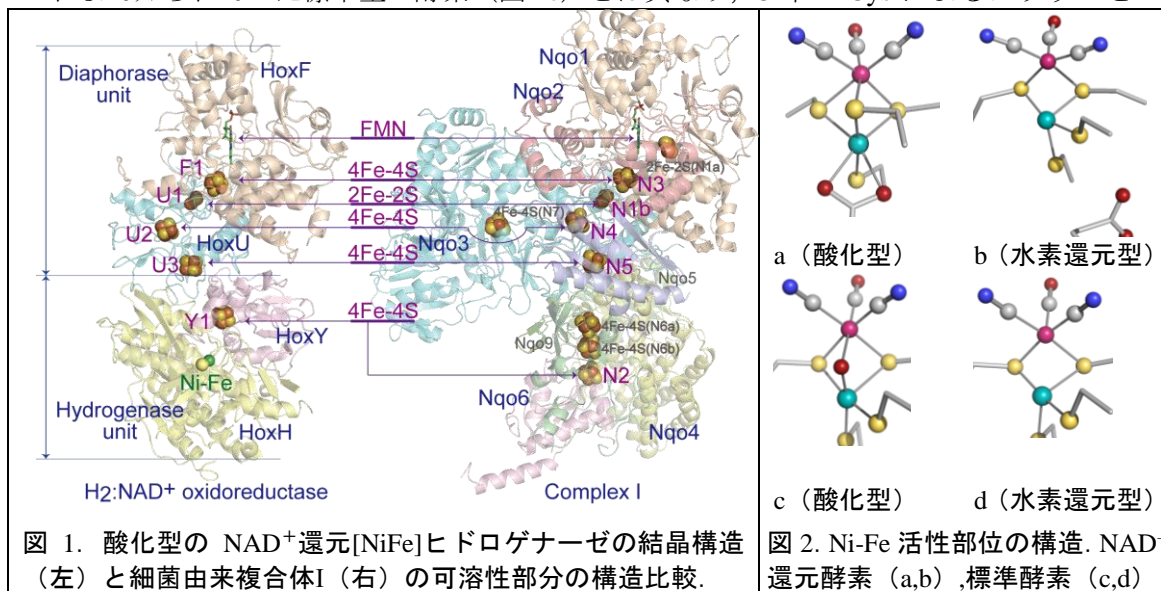
(1) 研究実施内容及び成果

課題1：水素－化学エネルギー変換・(NAD⁺還元) ヒドロゲナーゼの構造化学的研究

研究実施方法：X線解析により本酵素の結晶構造を高分解能で解明した。

研究実施内容と成果：酸化型および水素還元型酵素について、それぞれ 2.5 Å, 2.7 Å 分解能

の結晶解析に成功した。分子全体の構造比較の結果、4量体の酵素分子内部の5個の鉄-硫黄クラスターと1個のFMNの空間配置は、呼吸鎖電子伝達系の重要酵素・複合体Iの可溶性部分のクラスターと驚くほど一致していた(図1)。しかし、ヒドロゲナーゼユニット(HoxF・U)とジアフォラーゼユニット(HoxY・H)の相互配置は、複合体Iの対応するユニット(Nqo1・2・3, Nqo6・4)の配置とは異なっており、両者は同じ祖先タンパク質から別々に進化してそれらが合体した後、電子伝達経路の立体配置については最も効率の良い両者の現在の構造に進化したことを証明した。酸化型酵素のNi-Fe活性部位の配位子構造はこれまで知られていた標準型の酵素(図2c)とは異なり、3本のCysによるブリッジと



Glu32の側鎖(2配位)によるものであった(図2a)。しかし、水素還元型では構造変化を起こし、Glu32が遊離し、通常と同じ配位子構造を示していた(図2b, d)。酸化型では、Glu32が活性部位に配位することにより、酸化された時に酸素分子が金属に配位することを防いでいると思われる。さらに、酸化型ではNAD⁺結合部位に酵素自身のHox FサブユニットのC末端が入り込んでいた。しかし、水素還元によりそれが外れてHoxFとHoxYの境界領域まで数10 Å動き、NAD⁺の結合部位が完全に空位となっていた。この構造変化でNAD⁺の挿入が可能となると同時に酸化型においてNAD⁺結合部位近傍に結合していたFMNが遊離していた。さらにこれらの構造変化は、Ni-Fe活性部位およびFMN結合部位近傍のFe-Sクラスターの酸化還元と同期していると考えられた。複合体Iにおいても人工電子伝達を用いた場合や分子内クラスターが完全に還元された時には、FMNの結合が弱くなることが報告されている。今回得られたNAD⁺還元ヒドロゲナーゼの水素還元型構造は、水素と十分な量の人工電子伝達体(BV)存在下で得られたことから、ヒドロゲナーゼ分子内の金属クラスターは、完全に還元状態に有り、そのためにFMNは遊離したと考えられる。複合体Iにおける活性酸素種(ROS)の発生は、主にFMNに起因すると報告されていることから、本ヒドロゲナーゼにおけるFMNの遊離もROSの発生を抑えることに貢献したのかもしれない。今回得られたNAD⁺還元ヒドロゲナーゼの立体構造から、生物のエネルギー代謝を担う重要酵素の進化的知見を得た。また、本酵素では分子内金属クラスターの酸化還元がスイッチとなって機能発現のための構造変化を誘導していることが明らかになった(論文1)。

課題2:標準的ヒドロゲナーゼの中性子結晶解析およびラマン分光法による酵素活性定量法の開発

研究実施方法:中性子結晶解析法により本酵素の結晶構造を解明する。ラマン分光法による酵素活性を定量するための測定セルおよび測定システムを開発する。

研究実施内容と成果:

標準的[NiFe]ヒドロゲナーゼの空気酸化型および水素還元型構造の中性子結晶解析を目指して重水中において巨大良質単結晶を再現性良く水素/重水素で還元するための条件を見出した。また、巨大単結晶の結晶性を劣化させず、また分解能を落とさないように液体窒素温度に冷却するための方法を確立した。

ヒドロゲナーゼは、水素も重水素も分解する酵素活性を持つため、基質として水素を反応させた場合と重水素を反応させた場合でそれぞれについて中性子結晶解析を行う予定である。水素還元型、重水素還元型の解析に成功すれば、「H⁺」と「D⁺」を核密度分布内で完全に区別することが可能となる。本実験に成功すれば、世界で初めてタンパク質中のプロトン経路を実験的に『見る』方法が確立されることになる。

ラマン分光法を用いてヒドロゲナーゼの触媒活性を定量する方法の開発を進め、改良型(第4世代)の測定セルを開発した。既に水素-重水素交換反応およびオルト-パラ水素の核スピンの変換反応を定量的に再現性良く測定することが可能になっている。本手法は、気体分子を基質とする酵素・タンパク質の活性を長期間、測定系を乱さずに、さらに酵素自身に外的な刺激を与えることなしに正確に定量する方法として応用できる。

3.2 課題1, 2についての電気化学的研究 (京都大学 加納グループ)

(1)研究実施内容及び成果

課題1: 水素-化学エネルギー変換・(NAD⁺還元) ヒドロゲナーゼの電気化学的研究

研究実施方法: 本酵素を触媒とした電極反応を厳密な電気化学理論により解析し、その応用について検討した。

研究実施内容と成果: NAD⁺還元ヒドロゲナーゼの直接電子移動(DET)型電極触媒系とメデイエータ電子移動(MET)型電極触媒系の電極反応を解析した。本酵素は、中性条件で H⁺/H₂系と NAD⁺/NADH 系の双方を可逆変換できることを見出した。中性付近で H⁺/H₂系を可逆変換できる電極触媒はヒドロゲナーゼ以外にはない。また、NAD⁺/NADH 系を可逆変換できる電極触媒としては本酵素のような FeS 含有のジアフォラーゼユニットをもつ酵素だけである。これらの特性は基礎と応用の両面から極めて貴重かつ重要であり、構造化学的情報をあわせて、分子内電子移動について考察しているところである。FeS 含有のジアフォラーゼユニットをもつ NAD⁺還元ギ酸脱水素酵素についても生物電気化学的特性を精査した。このギ酸脱水素酵素は、CO₂/ギ酸系と NAD⁺/NADH 系を可逆変換できることを明らかにした。CO₂の電解還元は通常大きな過電圧を要し、生成物は主に CO となるのに対し、本酵素を触媒とすることにより、過電圧はほとんどなく、より有用なギ酸に変換できることが極めて重要な点であり、今後工業的展開も期待できる。これらの酵素を電極触媒とすることにより、数十 mA cm⁻²レベルの H₂酸化、H⁺還元、ギ酸酸化、CO₂還元のバイオ電解を実現できることを示した。NADH 酸化や NAD⁺還元も可能である。また、世界最高の十 mW cm⁻²レベルのギ酸-O₂ バイオ電池を構築した。チラコイド膜とギ酸脱水素酵素を組み合わせた人口光合成(CO₂の光還元によるギ酸生成)もできることを示した。ギ酸脱水素酵素の代わりにヒドロゲナーゼを用いると H⁺の光還元 H₂生成も実現できる。これらの生物電気化学的手法を組み合わせ、新規なエネルギー変換・資源利用としての水素/C1 社会を提案した。

課題2: 膜結合型酸ヒドロゲナーゼの電気化学的研究

研究実施方法: 本酵素を触媒とした電極反応を厳密な電気化学理論により解析し、その応用について検討した。

研究実施内容と成果: 膜結合型ヒドロゲナーゼは(DET)型電極触媒として極めて優れていることを明らかにした。また、DET 型電極触媒反応のシグナルの電気化学理論に基づいた解析法を示した。この手法をもとに、電極に吸着した膜結合型ヒドロゲナーゼが触媒する電気化学的 H₂酸化反応の熱力学的および速度論的特性を明らかにした。また、高電位雰囲気における Ni-B 形成による“酸化的不活性化”に対して電気化学的拮抗阻害モデルを提案し、電気化学データを本モデルに基づいて速度論的に解析した。その結果、本モデルが妥当であることを実証できた。このモデルから酸化的不活性化を回避するためには H₂の供給速度

を大幅に向上することが不可欠であることが予測され、ガス拡散電極の開発へと展開した。その結果、酸化的不活性化をほぼ完全に回避できることを示した。一方、標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼと天然電子受容体シトクロム c_3 の電子移動速度定数に及ぼすイオン強度の効果をポアッソボルツマン型の理論で説明し、近距離相互作用が極めて重要であることを示した。さらのこの考えを利用して酵素の構造情報をもとに、電極表面を修飾することにより、静電相互作用を利用した配向制御ができることを示した。これらの知見と技術を結集して、 $H_2 - O_2$ バイオ電池としては世界最高出力 ($60^\circ C, H_2/O_2$ 雰囲気下, Passive mode で 8.4 mW cm^{-2} ; $25^\circ C, H_2/\text{air}$ 雰囲気下, Passive mode で 6.1 mW cm^{-2}) でかつ理論値 (1.23 V) に極めて近い開回路電圧 (1.1 V) を達成した。

3.3 課題1~3の分光学的研究 (奈良先端科学技術大学院大学 廣田グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

課題1 : NAD^+ 還元ヒドロゲナーゼの分光学的解析

研究実施方法: EPR 分光法により NAD^+ 還元ヒドロゲナーゼの Ni-Fe 活性部位構造に関する情報を取得し、結晶構造解析グループと連携して本酵素の触媒反応機構を解明する。

研究実施内容と成果: NAD^+ 還元ヒドロゲナーゼの酸化型で EPR シグナルが観測され、Ni は III 価の状態を取ることが明らかになった。EPR シグナルの g_x は 2.25 と 2.26, g_y は 2.13, g_z は 2.04 であり、酸化型には Ni の配位構造が類似した 2 つの状態が存在した。これらの g 値は標準型酵素における Ni-A と Ni-B 状態の g 値と大きく異なることから、 NAD^+ 還元ヒドロゲナーゼの酸化型の Ni-Fe 活性部位構造は標準型酵素と異なることが示唆された。 NAD^+ 還元ヒドロゲナーゼの水素還元型では、強度は小さいものの、標準型酵素の Ni-C 状態の g 値と類似したシグナルが $g_x = 2.21$ と $g_y = 2.14$ に観測された (g_z は他のシグナルと重なった)。本酵素の Ni-C 状態を確認するため、光照射を行ったところ、Ni-C 状態に由来すると考えられる EPR シグナルは消失し、標準型酵素の Ni-L 状態の g 値と類似したシグナル ($g_x = 2.28$ と 2.31 , $g_y = 2.11$, $g_z = 2.05$) が新たに観測された。以上より、 NAD^+ 還元ヒドロゲナーゼの水素還元型は Ni-C 状態を形成し、標準型酵素の水素還元型と類似した Ni-Fe 活性部位構造を取ることが示唆された。 NAD^+ 還元ヒドロゲナーゼの Ni-Fe 活性部位に関するこれらの分光学的データは、X 線結晶構造解析の結果と一致した。

課題2: 標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼの触媒反応機構の解明

研究実施方法: 標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼの種々の状態の光反応性を FT-IR と EPR 分光法を用いて調べることにより、本酵素の反応機構を解明する。

研究実施内容と成果:

1、標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼの不活性酸化状態の光反応性

標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼの不活性酸化型の 1 つである Ni-A 状態の光反応性を FT-IR と EPR 分光法を用いて調べた。Ni-A 状態にレーザー光 ($457.9 - 514.5 \text{ nm}$) を室温で照射すると FT-IR スペクトルが変化し、光反応性があることが判明した。光照射を停止すると FT-IR スペクトルの変化は観測されなくなったが、光照射を再開すると同様のスペクトル変化が観測され、この反応が可逆的であることが判明した。Ni-A 状態の EPR スペクトルも可視光照射により変化し、光照射を停止するとスペクトル変化は観測されなくなった。一方、本酵素のもう 1 つの不活性酸化型である Ni-B 状態に光を照射しても、FT-IR や EPR スペクトルは変化しなかった。光照射によって生じた反応生成種の ν_{CO} と ν_{CN} の値をバンドフィッティングにより同定したところ、 ν_{CO} は 1971 cm^{-1} , ν_{CN} は 2086 と 2098 cm^{-1} と求まった。EPR スペクトルの g 値はバンドフィッティングにより 2.29, 2.24, 2.02 と求まった。これらの値は本酵素でこれまでに報告されている値とは異なっており、光照射により新たな種が生成したと考えられ、Ni-AL 状態と名付けた。Ni-AL 状態の g 値は Ni-A 状態の g 値 (2.30, 2.23, 2.01) に非常に近いことから、 Ni^{3+} の電子状態は Ni-A 状態と類似していると推測された。Ni-AL

状態の ν_{CN} 振動数は Ni-A 状態の 2084 と 2094 cm^{-1} から僅かしか変化しなかったが、 ν_{CO} 振動数は Ni-A 状態の 1956 cm^{-1} から 15 cm^{-1} 高波数シフトしたことより、Ni-AL 状態は Ni-A 状態に比べて Fe^{2+} に対して CO 配位子の反対側に位置する 2 原子分子配位子 ($\text{XO}_1\text{-XO}_2$) から Fe^{2+} への電子供与が弱くなったことが示唆された。以上の結果より、Ni-AL 状態では $\text{Fe}^{2+}\text{-XO}_1$ 結合が弱くなっていると結論付けた。本研究成果は、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 誌 (2013) に論文発表した。

2、新規触媒反応中間体の特定と触媒反応サイクルの制御機構の解明

標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼは、大小二つのサブユニットからなるヘテロダイマー構造を取っている。大サブユニットには Ni-Fe 活性中心が配位されているのに対し、小サブユニットには 3 つの Fe-S クラスタ (近位 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]_{\text{p}}^{2+/+}$, 中位 $[\text{Fe}_3\text{S}_4]_{\text{m}}^{+/0}$, 遠位 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]_{\text{d}}^{2+/+}$) が配置され、水素分子の分解過程で生じる電子をシトクロム c_3 へ伝達する。本酵素の触媒反応サイクルでは、Ni-SI_a, Ni-C, Ni-R と呼ばれる状態が存在する。Ni-C 状態に光を照射すると、Ni-L と呼ばれる状態が形成されることが報告されているが、触媒反応機構における Ni-L 状態の位置づけは不明であった。そこで、低温光照射用 FT-IR 装置を用いて、水素または窒素雰囲気下でレーザー光 (514.5 nm) 照射時と照射前との間で標準型酵素の Ni-Fe 活性部位の構造変化を 138–198 K で調べた。水素雰囲気下では光照射により Ni-C 状態は Ni-L 状態にのみ変換されたのに対し、窒素雰囲気下では Ni-C 状態は Ni-L 状態に加えて Ni-SI_a 状態にも変換された。温度を上げると、光照射により生じる Ni-L 状態が減少し、Ni-C 状態から Ni-SI_a 状態への変換率が上昇した。以上より、Ni-L 状態が Ni-C 状態と Ni-SI_a 状態間の変換の中間体であることが判明した。極低温 EPR 測定により、Ni-C 状態での近位 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]_{\text{p}}^{2+/+}$ の酸化還元状態を調べたところ、水素雰囲気下では、ほとんどすべての近位 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]_{\text{p}}^{2+/+}$ が還元型であるのに対して、窒素雰囲気下では約 15%が酸化型であることがわかった。Ni-C 状態における酸化型近位 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]_{\text{p}}^{2+}$ の割合は、198 K における Ni-C 状態から Ni-SI_a 状態への変換率 (約 14%) とよく一致しており、Ni-C 状態から Ni-SI_a 状態への変換は、近位 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]_{\text{p}}^{2+/+}$ が酸化型のと看み起こることが明らかになった。つまり、Ni-L 状態から Ni-SI_a 状態への変換の際、1 個の電子が Ni-Fe 活性部位から放出され、近位 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]_{\text{p}}^{2+/+}$ へ流れると考えられる。窒素雰囲気下では、一部の近位 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]_{\text{p}}^{2+/+}$ は酸化されており、電子を受取ることができる。しかし、水素雰囲気下では、ほとんど全ての近位 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]_{\text{p}}^{2+/+}$ は還元されており、電子数が最大に達しているため電子を受け取れず、Ni-L 状態は Ni-SI_a 状態へ変換されない。以上より、近位 Fe-S クラスタの酸化還元状態により触媒反応サイクルが制御されることが判明した。本研究成果は、*Angew. Chem. Int. Ed.* 誌 (2014 年) に論文発表した。

Ni-L 状態には Ni の配位環境が僅かに異なる 3 つの状態 (Ni-L1, Ni-L2, Ni-L3) が存在することが EPR 分光法を用いた研究により報告されているが、それらの違いは不明であった。本研究では、塩基性条件下で Ni-L3 状態を FT-IR により検出することに成功し、Ni-L2 状態から Ni-L3 状態への遷移過程では Ni に末端配位しているシステイン (Cys546) 側鎖の硫黄の脱プロトン化が関与していることを提唱した。163 K での光照射時と照射前の EPR 差スペクトルから、弱塩基性条件下 (274 K で pH 8.0) で、Ni-C 状態 ($g_x = 2.198, g_y = 2.144, g_z = 2.010$) から Ni-L2 状態 ($g_x = 2.300, g_y = 2.120, g_z = 2.049$) への光反応性が観測された。一方、塩基性条件下 (274 K で pH 9.6) では、Ni-L2 状態以外にも $g_x = 2.321$ に新しいシグナルが観測された (g_y と g_z のシグナルは Ni-L2 のシグナルと重なっていた)。新しいシグナルは、30 K で報告されている不安定な Ni-L1 状態の g 値 ($g_x = 2.26, g_y = 2.11, g_z = 2.05$) と異なる g 値を示し、Ni-L2 状態より大きい g_x 値を示したことから、Ni-L3 状態に帰属した。Ni-L2 と Ni-L3 状態の違いを明らかにするため、弱塩基性と塩基性条件下で、光照射時と照射前の FT-IR 差スペクトルを求めた。弱塩基性条件下の差スペクトルでは、1963 cm^{-1} に Ni-C 状態の ν_{CO} に由来する負のバンド、1911 と 1943 cm^{-1} に Ni-L2 と Ni-SI_a 状態の ν_{CO} に由来する正のバンドがそれぞれ観測され、Ni-C 状態から Ni-L2 および Ni-SI_a 状態への光反応性が観測された。塩基性条件下では、Ni-L2 状態に由来するバンドは誤差範囲内ながら若干低波数シフトして 1910 cm^{-1} に観測され、この 1910 cm^{-1} の正のバンド以外に新たに 1890 cm^{-1} に正のバンドが観測された。EPR スペクトルで観測された Ni-L3 状態のシグナルと同様、1890 cm^{-1}

のバンドは塩基性条件下で観測されたことから、Ni-L3 状態の ν_{CO} に帰属した。Ni-C 状態への照射で生じる Ni-L2 状態では、Ni-Fe 間に架橋していた H が H^+ として放出され、Cys546 配位子の硫黄に結合することが報告されており、Ni-L3 状態は Cys546 の脱プロトン化状態であることが示唆された。Ni-L3 状態の ν_{CO} バンドは Ni-L2 状態に比べて 20 cm^{-1} 低波数シフトしており、標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼの各種状態の ν_{CO} バンドの中で最も低波数に観測された。チオレートはチオールより強い σ ドナーであるため、Ni に末端配位している硫黄が脱プロトン化すると Ni の電子密度が上昇すると推測される。Ni の電子密度の上昇により、Ni-Fe の金属-金属結合を通じて Fe の電子密度が上昇し、Ni-L3 状態では Ni-L2 状態に比べて ν_{CO} バンドが 20 cm^{-1} 低波数シフトしたと解釈した。Ni-L2 と Ni-L3 状態の ν_{CO} バンドの強度比を温度の逆数に対してプロットし、ファントホッフの式より Ni-L2 状態のプロトン解離に伴うエンタルピー変化とエントロピー変化を求めたところ、それぞれ $6.4 \pm 0.8 \text{ kJ mol}^{-1}$, $25.5 \pm 10.3 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ と非常に小さい値が得られ、[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性部位ではプロトン移動が効率よく行われることが示された。本研究成果は、*J. Phys. Chem. B* 誌 (2015 年) に論文発表した。

3、酸塩基平衡を介した標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性化・不活性化機構の解明

標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼでは、活性準備状態 Ni-SI_r は酸塩基平衡により活性状態の 1 つである Ni-SI_a に変換され、水素分子の分解/合成が可能となるが、この酸塩基平衡反応機構の詳細は不明であった。本研究では、好氣的に精製した酵素を 37°C で水素ガスと 5.5 h 反応させることで水素還元型酵素を調製した。水素還元型酵素を 5 当量のフェノサフラニン ($E_m = -252 \text{ mV}$) を用いて部分的に酸化させ、主に Ni-SI_r と Ni-SI_a 状態を含むフェノサフラニン酸化型酵素を調製した。フェノサフラニン酸化型酵素の (照射時) - (照射前) の FT-IR 差スペクトルには、Ni-SI_r 状態の ν_{CO} (1924 cm^{-1}) と ν_{CN} (2056 と 2071 cm^{-1}) に由来する負のピーク、Ni-SI_a 状態の ν_{CO} (1943 cm^{-1}) と ν_{CN} (2077 と 2089 cm^{-1}) に由来する正のピークが観測され、Ni-SI_r 状態が Ni-SI_a 状態に光活性化されることを明らかにした。溶液の pH を 8.0 から 9.6 に上げると Ni-SI_r 状態の光活性化が著しく抑制されたことから、この光活性化反応では Ni と Fe 間の架橋配位子 OH がプロトン化され、 H_2O 分子として解離すると解釈した。また、従来の研究により、Ni-SI_r 状態は不活性化状態 Ni-SL 状態に光変換されると提唱されていたが、好氣的に精製した不活性化状態の酵素への照射により、Ni-SL 状態 ($1968, 2076, 2090 \text{ cm}^{-1}$) は本酵素で報告されているどの不活性化状態よりも活性化されにくい新しい不活性化状態 (Ni-SX と命名 ($1922, 2061, 2070 \text{ cm}^{-1}$)) から光変換されることが明らかとなった。Ni-SX 状態は *in vitro* での酸素分子による本酵素の不活性化では形成されないが、細胞 (硫酸還元菌) 内環境下で形成されることが示された。これらの研究成果は、*Phys. Chem. Chem. Phys.* 誌 (2016 年) に論文発表した。

光活性化された Ni-SI_a 状態から Ni-SI_r 状態への戻り反応を FT-IR スペクトルにより追跡したところ、この反応の速度定数 (k) は pH 8.5 で pH 8.0 に比べて約 10 倍大きくなった。得られた k をもとに $\ln(k/T)$ を温度の逆数に対してプロットし、アイリングの式より Ni-SI_a 状態から Ni-SI_r 状態への不活性化反応の活性化エンタルピー ΔH^\ddagger と活性化エントロピー ΔS^\ddagger を求めたところ、 ΔH^\ddagger は pH 8.5 ($61.6 \pm 1.6 \text{ kJ mol}^{-1}$) と pH 8.0 ($59.4 \pm 1.8 \text{ kJ mol}^{-1}$) で有意に変化しなかったのに対し、 ΔS^\ddagger は pH 8.5 ($\sim 45 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) で pH 8.0 ($\sim 15 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) に比べて約 $30 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ 大きくなった。以上より、pH の増大に伴う k の増大は、 ΔH^\ddagger よりも ΔS^\ddagger の変化に起因することが明らかになった。さらに、 H_2O と D_2O 溶媒中で k を比較したところ、 $k_{\text{H}}/k_{\text{D}} = 150$ (203 K) と非常に大きい速度論的同位体効果が検出された。これらの結果は、Ni-SI_a 状態から Ni-SI_r 状態への不活性化反応において、Ni-Fe 活性部位への H_2O 分子の付加と脱プロトン化により OH 架橋配位子が形成されることを示す。これらの研究成果は、[NiFe]ヒドロゲナーゼの酸塩基平衡を介した活性化・不活性化機構の理解に寄与するものであり、*Chem. Commun.* 誌 (2017 年) に論文発表した。

以上の分光研究成果をはじめとする [NiFe]ヒドロゲナーゼの最新研究状況を *Dalton Trans.* 誌 (2018 年) に Perspective として発表した。

§ 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際 (欧文) 誌 27 件)

1. 著者、論文タイトル、掲載誌 巻、号、発行年

1. Hisao Osuka, Yasuhito Shomura, Hirofumi Komori, Naoki Shibata, Satoshi Nagao, Yoshiki Higuchi, and Shun Hirota, “Photosensitivity of the Ni-A State of [NiFe] Hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F with Visible Light”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **430** (1), 284-288, 2013 (DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.10.136)
2. Keisei So, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, Kouhei Kurita, Hirofumi Nishihara, Yoshiki Higuchi, and Kenji Kano, “Gas-diffusion and Direct Electron Transfer-type Bioanode for Hydrogen Oxidation with Oxygen-tolerant [NiFe]-hydrogenase as an Electrocatalyst”, *Chem. Lett.*, **43** (10), 1575–1577, 2014 (DOI:10.1246/cl.140622)
3. Keisei So, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, Kouhei Kurita, Hirofumi Nishihara, Yoshiki Higuchi, and Kenji Kano, “Kinetic Analysis of Inactivation and Enzyme Reaction of Oxygen-Tolerant [NiFe]-Hydrogenase at Direct Electron Transfer-Type Bioanode”, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **87** (11), 1177–1185, 2014 (DOI:10.1246/bcsj.20140223)
4. Hulin Tai, Koji Nishikawa, Masayuki Suzuki, Yoshiki Higuchi, and Shun Hirota, “Control of the Transition between Ni-C and Ni-SI_a States by the Redox State of the Proximal Fe-S Cluster in the Catalytic Cycle of [NiFe] Hydrogenase”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53** (50), 13817-13820, 2014 (DOI: 10.1002/anie.201408552)
5. Tatsuhiko Yagi, Seiji Ogo, and Yoshiki Higuchi, “Catalytic Cycle of Cytochrome-c₃ Hydrogenase, a [NiFe]-enzyme, Deduced from the Structures of the Enzyme and the Enzyme Mimic”, *Int. J. Hydrogen Energy*, **39** (32), 18543-18550, 2014 (DOI: 10.1016/j.ijhydene.2013.12.174)
6. Tomoyasu Noji, Masaharu Kondo, Tetsuro Jin, Tetsuo Yazawa, Hisao Osuka, Yoshiki Higuchi, Mamoru Nango, Shigeru Itoh, and Takahisa Dewa, “Light-Driven Hydrogen Production by Hydrogenases and a Ru-Complex inside a Nanoporous Glass Plate under Aerobic External Conditions”, *J. Phys. Chem. Lett.*, **5** (14), 2402-2407, 2014 (DOI: 10.1021/jz5008164)
7. Midori Taketa, Hanae Nakagawa, Mao Habukawa, Hisao Osuka, Kiyohito Kihira, Hirofumi Komori, Naoki Shibata, Masaharu Ishii, Yasuo Igarashi, Hirofumi Nishihara, K-Seok. Yoon, Seiji Ogo, Yasuhito Shomura, and Yoshiki Higuchi, “Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of the NAD⁺-reducing [NiFe] hydrogenase from *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1”, *Acta Cryst. F*, **71**, 96–99, 2015 (DOI: 10.1107/S2053230X14026521)
8. Hideaki Ogata, Koji Nishikawa and Wolfgang Lubitz, “Hydrogens Detected by Subatomic Resolution Protein Crystallography in a [NiFe] Hydrogenase”, *Nature* **520**, 571–574, 2015, (DOI: 10.1038/nature14110)
9. Hulin Tai, Koji Nishikawa, Seiya Inoue, Yoshiki Higuchi, and Shun Hirota, “FT-IR Characterization of the Light-Induced Ni-L2 and Ni-L3 States of [NiFe] Hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F”, *J. Phys. Chem. B*, **119** (43), 13668-13674, 2015 (DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b03075)
10. Kento Sakai, Bo-Chuan Hsieh, Akihiro Maruyama, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai and Kenji Kano, “Interconversion between Formate and Hydrogen Carbonate by Tungsten-containing Formate Dehydrogenase-catalyzed Mediated Bioelectrocatalysis”, *Sens. BioSens. Res.*, **5**, 90–96, 2015 (DOI: 10.1016/j.sbsr.2015.07.008)
11. Takahiro Matsumoto, Koji Yoshimoto, Chunbai Zheng, Yasuhito Shomura, Yoshiki Higuchi, Hidetaka Nakai and Seiji Ogo, “Synthesis and Reactivity of a Water-soluble NiRu Monohydride Complex with a Tethered Pyridine Moiety”, *Chem. Lett.*, **45**, 197–199, 2016 (DOI:10.1246/cl.1510)
12. Noor Dina Muhd Noor, Koji Nishikawa, Hirofumi Nishihara, Ki-Seok Yoon, Seiji Ogo and Yoshiki Higuchi, “Improved Purification, Crystallization and Crystallographic Study of Hyd-2 Type [NiFe]-hydrogenase from *Citrobacter* sp. S-77”, *Acta Cryst.*, **F72(1)**, 53-58, 2016 (DOI: 10.1107/S2053230X15024152)
13. Keisei So, Rui Hamamoto, Ryosuke Takeuchi, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, Ryohei Endo, Hirofumi Nishihara, Yoshiki Higuchi and Kenji Kano, “Bioelectrochemical Analysis of 14.

- Thermodynamics of the Catalytic Cycle and Kinetics of the Oxidative Inactivation of Oxygen-tolerant [NiFe]-hydrogenase”, *J. Electroanal. Chem.*, **766**, 152-161, 2016 (DOI:10.1016/j.jelechem.2016.02.009)
14. Keisei So, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, Koji Nishikawa, Yoshiki Higuchi and Kenji Kano, “Direct Electron Transfer-Type Dual Gas Diffusion H₂/O₂ Biofuel Cells”, *J. Mat. Chem. A*, **4**, 8742-8749, 2016 (DOI: 10.1039/c6ta02654k)
 15. Hulin Tai, Liyang Xu, Seiya Inoue, Koji Nishikawa, Yoshiki Higuchi, and Shun Hirota, “Photoactivation of the Ni-SI_r State to the Ni-SI_a State in [NiFe] Hydrogenase: FT-IR Study on the Light Reactivity of the Ready Ni-SI_r State and As-isolated Enzyme Revisited”, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **18** (32), 22025-22030, 2016 (DOI: 10.1039/c6cp04628b)
 16. Hong-qi Xia, Keisei So, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, Koji Nishikawa, Yoshiki Higuchi and Kenji Kano, “Dual Gas-diffusion Membrane- and Mediatorless Dihydrogen/Air Breathing Biofuel Cell Operating at Room Temperature”, *J. Power Sources*, **335**, 105-112, 2016 (DOI: 10.1016/j.jpowsour.2016.10.030)
 17. Hideaki Ogata, Wolfgang Lubitz and Yoshiki Higuchi, “Structure and Function of [NiFe] Hydrogenases”, *J. Biochem. (Tokyo)*, **160** (5), 251-258, 2016 (DOI: 10.1093/jb/mvw048)
 18. Kento Sakai, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, and Kenji Kano, “Bioelectrocatalytic Formate Oxidation and Carbon Dioxide Reduction at High Current Density and Low Overpotential with Tungsten-containing Formate Dehydrogenase and Mediators”, *Electrochem. Commun.*, **65**, 31–34, 2016 (DOI: 10.1016/j.elecom.2016.02.006)
 19. Kento Sakai, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, Kazuyoshi Takagi, and Kenji Kano, “Efficient Bioelectrocatalytic CO₂ Reduction on Gas-Diffusion-Type Biocathode with Tungsten-Containing Formate Dehydrogenase”, *Electrochem. Commun.*, **73**, 85–88, 2016 (DOI: 10.1016/j.elecom.2016.11.008)
 20. Kento Sakai, Yu Sugimoto, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, Kazuyoshi Takagi, and Kenji Kano, “Direct Electron Transfer-Type Bioelectrocatalytic Interconversion of Carbon Dioxide/Formate and NAD⁺/NADH Redox Couples with Tungsten-Containing Formate Dehydrogenase”, *Electrochim. Acta*, **228**, 537-544, 2017 (DOI: 10.1016/j.electacta.2017.01.112)
 21. Yu Sugimoto, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, Koji Nishikawa, Yoshiki Higuchi, Masahiro Yamamoto, and Kenji Kano, “Electrostatic Roles in Electron Transfer from [NiFe] Hydrogenase to Cytochrome *c*₃ from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F”, *Biochim. Biophys. Acta, Proteins and Proteomics*, **1865**, 481-487, 2017 (DOI: 10.1016/j.bbapap.2017.02.009)
 22. Kento Sakai, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, Kazuyoshi Takagi, and Kenji Kano, “High Power Formate/Dioxygen Biofuel Cell Based on Mediated Electron Transfer Type Bioelectrocatalysis”, *ACS Catalysis*, **7**, 5668–5673, 2017 (DOI: 10.1021/acscatal.7b01918)
 23. Koji Nishikawa, Satoko Mochida, Takeshi Hiromoto, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi “Ni-elimination from the active site of the standard [NiFe]-hydrogenase upon oxidation by O₂”, *J. Inorg. Biochem.*, **177**, 435-437, 2017 (DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2017.09.011)
 24. Yasuhito Shomura, Midori Taketa, Hirofumi Nakashima, Hulin Tai, Hanae Nakagawa, Yoko Ikeda, Masaharu Ishii, Yasuo Igarashi, Hirofumi Nishihara, Ki-Seok. Yoon, Seiji Ogo, Shun Hirota, Yoshiki Higuchi, “Structural basis of the redox switches in the NAD⁺-reducing soluble [NiFe]-hydrogenase”, *Science*, **357**, 928-932, 2017 (DOI: 10.1126/science.aan4497)
 25. Hulin Tai, Liang Xu, Koji Nishikawa, Yoshiki Higuchi, and Shun Hirota, “Equilibrium between Inactive Ready Ni-SI_r and Active Ni-SI_a States of [NiFe] Hydrogenase Studied by Utilizing Ni-SI_r-to-Ni-SI_a Photoactivation”, *Chem. Commun.*, **53**, 10444-10447, 2017, (DOI: 10.1039/c7cc06061k)
 26. Kento Sakai, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, Kazuyoshi Takagi, and Kenji Kano, “Direct Electron Transfer-Type Four-Way Bioelectrocatalysis of CO₂/Formate and NAD⁺/NADH Redox Couples by Tungsten-Containing Formate Dehydrogenase Adsorbed on Gold Nanoparticle-Embedded Mesoporous Carbon Electrodes Modified with 4-Mercaptopyridine”, *Electrochem. Commun.*, **84**, 75–79, 2018 (2DOI: dx.doi.org/10.1016/j.elecom.2017.10.005).
 27. Saeko Shiraiwa, Keisi So, Yu Sugimoto, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, Koji Nishikawa, Yoshiki Higuchi, Kenji Kano, “Reactivation of standard [NiFe]-hydrogenase and bioelectrochemical catalysis of proton reduction and hydrogen oxidation in a mediated-electron-transfer system”, *Bioelectrochem.*, **123**, 156-161 (2018),

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. Tatsuhiko Yagi and Yoshiki Higuchi, "Studies on Hydrogenase", *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **89**, 16-33, 2013 (DOI: 10.2183/pjab.89.16)
2. Yasuhito Shomura and Yoshiki Higuchi, "Structural Aspects of [NiFe]-hydrogenases", *Rev. Inorg. Chem.*, **33** (4), 173-192, 2013 (DOI: 10.1515/revic-2013-0005)
3. 庄村康人, 樋口芳樹, "膜結合型ヒドロゲナーゼの酸素耐性機構の解明", *生物物理*, **53-2**, 82-85, 2013
4. 樋口芳樹, "ヒドロゲナーゼ", *光合成のエネルギー利用と環境応用 (CMC)*, 33-42, 2014, 監修: 三宅 淳, 佐々 健
5. 庄村康人, 樋口芳樹, "ヒドロゲナーゼの酸素による不活性化およびその耐性機構", *CSJ カレントレビュー15, 次世代のバイオ水素エネルギー開発 (化学同人)*, 80-85, 2014, 日本化学会編
6. 樋口芳樹, "生物による水素エネルギー代謝システム", *実験医学増刊 構造生命科学 (羊土社)*, ISBN: 978-4-7581-0339-8, 2014
7. 廣田 俊, 加納健司, 樋口芳樹, "ヒドロゲナーゼによる水素分解・合成機構および酵素燃料電池への応用", *BIO INDUSTRY*, **33**, No.1, 43-48, 2016 (シーエムシー出版), ISSN: 0910-6545, 2016年1月12日
8. 西川幸志, 樋口芳樹, "[NiFe]ヒドロゲナーゼの中性子結晶解析に向けての良質大型単結晶の調製", *Int. J. Microgravity Sci. Appl.*, **34** (1), 2017 (DOI: 10.15011/jasma.34.340100)
9. Yu Sugimoto, Keisei So, Hong-qi Xia, and Kenji Kano, "Orientation-Oriented Adsorption and Immobilization of Redox Enzymes for Electrochemical Communication with Electrodes", *"Encyclopedia of Interfacial Chemistry: Surface Science and Electrochemistry"*, pp. 403-423, Elsevier (2018), Book ISBN:9780128097397
10. Keisei So, Kento Sakai, and Kenji Kano, "Gas Diffusion Bioelectrodes", *Current Opinion in Electrochemistry*, **5**, 173-182, 2017 (DOI: dx.doi.org/ 10.1016/j.coelec.2017.09.001)
11. 庄村康人, 樋口芳樹, "NAD⁺還元[NiFe]ヒドロゲナーゼのレドックススイッチ機構の構造基盤の解明", *ライフサイエンス新着レビュー*, 2017 (DOI: 10.7875/first.author.2017.100)
12. Hulin Tai, Yoshiki Higuchi, and Shun Hirota, "Comprehensive Reaction Mechanisms at and nearby the Ni-Fe Active Sites of [NiFe] Hydrogenases", *Dalton Transactions*, **47**, 4408-4423 (2018), March, DOI: 10.1039/c7dt04910b
13. Yasuhito Shomura and Yoshiki Higuchi, "Crystal structures of the NAD⁺-reducing soluble [NiFe]-hydrogenase", *SPring-8 Research Frontier 2017*, in press (2018)

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

- ① 招待講演 (国内会議 21 件、国際会議 15 件)
 1. 発表者(所属)、タイトル、学会名、場所、月日
- ② 口頭発表 (国内会議 21 件、国際会議 4 件)
 1. 発表者(所属)、タイトル、学会名、場所、月日
- ③ ポスター発表 (国内会議 24 件、国際会議 8 件)
 1. 発表者(所属)、タイトル、学会名、場所、月日

①招待講演

国際会議

- *1. Yoshiki Higuchi and Yasuhito Shomura, "Reaction Mechanism of S-Carbamoylation of HypE by HypF in the Maturation of [NiFe]-hydrogenase", 10th International Hydrogenase Conference, Szeged, Hungary, 2013/7/9
- *2. Yoshiki Higuchi, "X-ray Structural Study of O₂-tolerant [NiFe] hydrogenase", International Conference on Bio/Mimetic Solar Energy Conversion (iSEC) 2013, Osaka, 2013/11/23
- *3. Yoshiki Higuchi, "X-Ray Structural Studies of [NiFe]-Hydrogenases", International Conference

of Catalytic Systems for Chemical Energy Conversion, Max Planck Institute for Chemical Energy Conversion (Germany), 2014/7/24

- *4. Yoshiki Higuchi, "Structure, Function and Evolution of [NiFe]-Hydrogenases", The International Conference on Artificial Photosynthesis (iCARP), 2014, Awaji Yumebutai (Hyogo), 2014/11/27
- *5. Yasuhito Shomura, "Development of the Heterologous Expression System of the Group IV [NiFe]-hydrogenase", The International Conference on Artificial Photosynthesis (iCARP), 2014, Awaji Yumebutai (Hyogo), 2014/11/27
- 6. Yasuhito Shomura, "X-ray Structure Analysis of the [NiFe]-hydrogenase from *Citrobacter* sp. S-77", I2CNER International Workshop, 2015, Kyushu University (Fukuoka), 2015/2/4
- *7. Kenji Kano, Kinetic and Thermodynamic Analysis of Hydrogen Oxidation with [NiFe]-hydrogenase as a Direct Electron Transfer-type Electrocatalysis and its Application to a Biofuel Cell, 48th Heyrovský Discussion 2015, Třešt', Czech Republic, 2015/06/14-19
- *8. Yoshiki Higuchi, "Structural and biochemical studies of Hyd-2 type [NiFe]-hydrogenase from *Citrobacter* sp. S-77 - proposal of the general mechanism of O₂-tolerance of [NiFe]-hydrogenases", 11th International Hydrogenase Conference, Aix-Marseille Université, Marseille, France, 2016/7/13
- *9. Kenji Kano, "Bioelectrochemistry of [NiFe]-Hydrogenases", 11th International Hydrogenase Conference, Aix-Marseille Université, Marseille, France, 2016/7/14
- *10. Yoshiki Higuchi, "Structural Studies of [NiFe]-hydrogenases", 5-th International Symposium on Diffraction Structural Biology, Knoxville, USA, 2016/8/9
- *11. Yoshiki Higuchi, "Structural Biology of [NiFe]-hydrogenases - Reaction mechanism of uptake and production of H₂ by the enzyme", Swiss-Japanese Workshop 2016 -Hydrogen technology and energy storage, Chiyoda, Tokyo, 2016/10/6
- *12. Yoshiki Higuchi, "Crystallographic Studies of [NiFe]-hydrogenases", 8th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC8), Auckland, New Zealand, 2016/12/6
- *13. Kenji Kano, "Bioelectrochemical Strategy to Hydrogen and C1 Society", 16th International Symposium on Electroanalytical Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Changchun, Jilin, China. 2017/08/18
- *14. Kenji Kano, "Construction of Direct Electron Transfer-Type Bioelectrodes with High Performance", The 68th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Providence, RI, USA, 2017/08/28
- *15. Kenji Kano, "Structural Biology and Bioelectrochemistry of [NiFe]-Hydrogenase", EPSRC-ISIS-JSPS Joint Symposium, Abingdon, Oxon, UK, 2018/02/22

国内会議

- 1. 庄村康人, "[NiFe]ヒドロゲナーゼの X 線結晶構造解析", 第 27 回日本放射光学会・放射光科学合同シンポジウム, 広島市, 広島県, 2014/1/11-13
- 2. 庄村康人, 西川幸志, 井上誠也, 玉田太郎, 樋口 芳樹, "結晶構造解析による水素分解酵素の反応機構解明に向けた試み", 蛋白質研究所セミナー「結晶構造を併用したハイブリッド構造研究の最前線」, 吹田市, 大阪府, 2014/2/7-8
- 3. 樋口芳樹, "ヒドロゲナーゼの構造・機能・進化", 第 41 回 生体分子科学討論会, 九州大学西新プラザ, 福岡市, 福岡県, 2014/ 6/6
- 4. 加納健司, "ヒドロゲナーゼー電極接合から見えるもの", 豊田理研平成 26 年度特定課題研究講演会「水素を新しいエネルギー源とする新領域の構築」, 東京大学, 東京都, 2014/10/27
- 5. 庄村康人, "Ni-Fe 型水素分解酵素の構造化学的研究", 異分野融合若手研究者 Science & Technology クラブ, 姫路市じばさんビル, 姫路市, 兵庫県, 2015/1/26
- 6. 西川幸志, "[NiFe] ヒドロゲナーゼ活性部位におけるヒドリドの同定", 大阪大学蛋白質研究所セミナー (嫌気蛋白質を対象とした構造・機能相関の現状), 大阪大学蛋白質研究所, 吹田市, 大阪府, 2015/3/5
- 7. 樋口芳樹, "ヒドロゲナーゼの水素原子を見る", 宇宙科学研究拠点形成プログラムキッ

- クオフ会議，東京大学弥生講堂，東京都，2015/3/5
8. 樋口芳樹，”ヒドロゲナーゼの反応水素が見えるか？”，日本物理学会第70回年次大会，早稲田大学早稲田キャンパス，東京都，2015/3/21
 9. 樋口芳樹，”ヒドロゲナーゼの水素活性化反応機構とプロトン移動”，平成27年度前期物性研究所短期研究会 機能物性融合科学シリーズ(3)「反応と輸送」，東京大学物性研究所，柏市，千葉県，2015/6/25
 10. 樋口芳樹，”水素を新しいエネルギー源とする新領域の構築に向けて”，第16回豊田理研フェロー研究報告会，豊田理化学研究所，長久手市，愛知県，2015/6/22
 11. 樋口芳樹，”Structural chemistry of hydrogenase by diffraction method”，錯体化学会第65討論会，奈良女子大学，奈良市，奈良県，2015/9/21
 12. 樋口芳樹，”Aiming towards Comprehensive Structural Chemistry of [NiFe]-hydrogenase”，東京大学放射光連携研究機構10周年記念講演会，東京大学本郷キャンパス，東京都，2015/11/13
 13. 樋口芳樹，”ヒドロゲナーゼの総合化学”，Cat-on-Cat symposium in Himeji 2015，姫路市，兵庫県，2015/12/10
 14. 加納健司，”酵素機能電極反応の理論に基づいたバイオ電池の新展開”，日本農芸化学会2017年度大会，京都女子大学，京都府，2016/2/19
 15. 樋口芳樹，”中性子結晶解析法を用いて酵素における水素分解の反応機構解明にせまる”，茨城大学大学院理工学研究科・ミニシンポジウム，茨城大学水戸キャンパス・ライブラリーホール，水戸市，茨城県，2016/2/22
 16. 樋口芳樹，”[NiFe]ヒドロゲナーゼの触媒反応機構の解明”，茨城県中性子利用促進研究会，いばらき量子ビーム研究センター，東海村，茨城県，2016/8/29
 17. 加納健司，”バイオ電池・バイオ電解－酵素を触媒とした エネルギー・物質変換”，第26回京都大学地球環境フォーラム，京都大学，京都市，京都府，2016/10/29
 18. 加納健司，”酵素機能電極の電流－電圧曲線から見えるもの”，第62回ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会，宮古島市中央公民館大ホール，宮古島市，沖縄県，2016/11/19-20
 19. 廣田俊，”金属タンパク質の構造変化：活性部位の構造変化とタンパク質の超分子構造体形成”，新世代研究所 水和ナノ構造研究会，新世代研究所，千代田区，東京都，2017/3/27
 20. 加納健司，”CO₂の生物電気化学的有効利用”，異分野融合シンポジウム「微生物を基軸とした環境と電気と金属」，東京工業大学，横浜，2017/7/10
 21. 加納健司，”生物電気化学的にみた水素/C1社会”，東京，第69回日本生物工学会大会，2017/09/12

②口頭発表

国際会議

1. Keisei So, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, and Kenji Kano, “Gas-diffusion and Direct Electron Transfer-type Bioanode for Hydrogen Oxidation with Oxygen-Tolerant [NiFe]-Hydrogenase as an Electrocatalyst”, 226th ECS Meeting, Cancun, Mexico, 2015/10/06-11
2. Kenji Kano, Kento Sakai, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, “High Performance Bioelectrocatalytic Interconversion between Formate and Carbon Dioxide”, 231st Electrochemical Society Meeting, Hilton New Orleans Riverside, New Orleans, LA, U.S.A., 2017/06/01
3. Shun Hirota, Hulin Tai, Koji Nishikawa, Seiya Inoue, and Yoshiki Higuchi, “Characterization of the light-induced Ni-L states of [NiFe] Hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F”, 11th 3. International Hydrogenase Conference, Aix-Marseille Université, Marseille, France, 2016/7/14

国内会議

1. 太 虎林, 竹田翠, 庄村康人, 西川幸志, 鈴木雅之, 樋口芳樹, 廣田 俊, *H. thermoluteolus*

- TH-1 由来 NAD⁺還元ヒドロゲナーゼの分光学研究, 日本化学会第 95 春季年会, 名古屋大学, 名古屋市, 愛知県, 2014/3/27-30
2. 宋 慶盛、河井翔太、北隅優希、白井 理、西原宏史、加納健司, ”非白金水素エネルギー変換系に繋げるヒドロゲナーゼの電気化学的アプローチ”, 日本農芸化学会東京 2014 年度大会, 東京大学, 東京都, 2014/3/27-30
 3. 阪井研人、河井翔太、高木一好、北隅優希、白井 理、加納健司, “ギ酸/二酸化炭素対の可逆反応系に対する生物電気化学的アプローチ”, 日本農芸化学会東京 2014 年度大会, 東京大学, 東京都, 2014/3/27-30
 4. 濱本 墨、河井翔太、北隅優希、白井 理、西原宏史、加納健司, ”酵素-電極間電子移動から見た膜結合型ヒドロゲナーゼの触媒反応と不活性化反応”, 電気化学会第 81 回大会, 関西大学千里山キャンパス, 吹田市, 大阪府, 2014/3/29-31
 5. 太 虎林, 西川幸志, 樋口芳樹、廣田 俊, ”[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性化サイクルにおける新規中間体の特定”, 第 8 回分子科学討論会, 広島大学, 広島市, 広島県, 2014/9/21-24
 6. 宋 慶盛, 北隅優希, 白井 理, 加納健司, “ヒドロゲナーゼの酸化的不活性化—速度論的解析と対策—”, 2014 年電気化学秋季大会, 北海道大学, 札幌市, 北海道, 2014/9/27/-28
 7. 宋 慶盛, 西原宏史, 樋口芳樹, 北隅優希, 白井 理, 加納健司, “ヒドロゲナーゼの酸化的不活性化—速度論的解析に基づく回避戦略—”, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 岡山大学, 岡山市, 岡山県, 2015/3/26-29
 8. 太 虎林, 西川幸志, 井上誠也, 樋口芳樹, 廣田俊, “[NiFe]ヒドロゲナーゼの光照射で生じる Ni-L 状態の分光学的研究”, 第 42 回生体分子科学討論会, 高崎シティギャラリー, 高崎市, 群馬県, 2015/6/21-24
 9. 阪井研人, 高木一好, 北隅優希, 白井 理, 加納健司, “ギ酸/二酸化炭素対の生物電気化学的相互変換系の構築”, 2015 電気化学秋季大会, 埼玉大学, さいたま市, 埼玉県, 2015/9/11-12
 10. 庄村康人, Noor Dina Binti Muhd Noor, 西川幸志, 樋口芳樹, “ヒドロゲナーゼがもつ鉄硫黄クラスターの構造的多様性”, 第87回日本生化学会大会, 神戸市, 兵庫県, 2015/12/1
 11. 太 虎林, 西川幸志, 井上誠也, 樋口芳樹, 廣田 俊, ”鉄硫黄クラスターの酸化還元状態による[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性サイクル制御”, 日本化学会第 96 春季年会, 日本大学理工学部船橋キャンパス, 船橋市, 千葉県, 2016/3/24-27
 12. 阪井研人, 北隅優希, 白井 理, 高木一好, 加納健司, “酵素触媒電極反応における直接電子移動型/メデイエータ型の判断基準の問題点 —ギ酸脱水素酵素を例として—”, 第 62 回ポラログラフィーおよび電気分析化学討論会, 宮古島中央公民館, 宮古島市, 沖縄県, 2016/11/20
 13. Xia, H.-Q., Kitazumi, Y., Shirai, O., and Kano, K., “Direct Electron Transfer-Type H₂/Air Biofuel Cell Operating at Room Temperature”, 第62回ポラログラフィーおよび電気分析化学討論会, 宮古島中央公民館, 宮古島市, 沖縄県, 2016/11/20
 14. 宋 慶盛, 北隅優希, 白井 理, 加納健司, “直接電子移動型酵素の配向制御解析に及ぼす物質拡散効果の危険性”, 第62回ポラログラフィーおよび電気分析化学討論会, 宮古島中央公民館, 宮古島市, 沖縄県, 2016/11/20
 15. Xia, H.Q. , So, K., Kitazumi, Y., Shirai, O., and Kano, K., “H₂/Air(O₂) Biofuel Cell Based on Gas Diffusion System”, 日本農芸化学会2017年度大会, 京都女子大学, 京都市, 京都府, 2017/2/19
 16. 阪井研人, 北隅優希, 白井 理, 高木一好, 加納健司, 気相の二酸化炭素を直接還元する新奇バイオカソードの構築, 日本農芸化学会2017年度大会, 京都女子大学, 京都市, 京都府, 2017/2/19
 17. 白岩咲衣子, 北隅優希, 白井 理, 加納健司, 標準型NiFeヒドロゲナーゼと酸化還元ポリマーによる両方向触媒反応系の構築, 日本農芸化学会2017年度大会, 京都女子大学,

京都市, 京都府, 2017/2/19

18. 太虎林, 許力揚, 西川幸志, 樋口芳樹, 廣田 俊, “光照射を利用した[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性化機構のFT-IR研究”, 日本化学会第97春季年会 (2017), 慶應義塾大学日吉キャンパス, 横浜市, 神奈川県, 2017/3/16
19. 阪井研人, 北隅優希, 白井 理, 加納健司, “メデイエータ型酵素電極反応を利用した高性能ギ酸/酸素バイオ燃料電池の構築”, 電気化学会第84会度大会, 首都大学東京, 東京, 2017/03/26
20. 太 虎林, 許 力揚, 西川幸志, 樋口芳樹, 廣田 俊, “硫酸還元菌由来[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性準備状態Ni-SI_rと活性状態Ni-SI_a間の酸塩基平衡機構のFT-IR研究”, 第44回生体分子科学討論会, カレッジプラザ, 秋田市, 秋田県, 2017/6/23
21. 太 虎林, 許 力揚, 西川幸志, 樋口芳樹, 廣田俊, “[NiFe]ヒドロゲナーゼの不活性化状態Ni-SI_rと活性状態Ni-SI_a間の活性化・不活性化機構の解明”, 日本化学会第98春季年会, 日本大学船橋キャンパス, 船橋市, 千葉県, 2018/3/20

③ポスター発表

国際会議

1. Noor Dina Muhd Noor, Koji Nishikawa, Ki-Seok Yoon, Seiji Ogo, Yoshiki Higuchi, “Towards Structural Determination of Oxygen-stable [NiFe]-hydrogenase from *Citrobacter S-77*”, 2n International Picobiology Institute Symposium (CAST), Hyogo, 2014/10/9
2. Hulin Tai, Koji Nishikawa, Seiya Inoue, Masayuki Suzuki, Yosjiki Higuchi, and Shun Hirota, “Control of the Transition between Ni-C and Ni-SI_a States in the Catalytic Cycle of [NiFe] Hydrogenase by the Redox State of the Proximal Fe-S Cluster”, 17th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, Beijing, China, 2015/7/21
3. Yoshiki Higuchi, Midori Taketa, Hanae Nakagawa and Yasuhito Shomura, “X-ray Structure Analysis of NAD⁺-reducing [NiFe]-hydrogenase”, JST CREST-PRESTO Joint International Symposium, ITO Hall, ITO International Research Center, The University of Tokyo, 2015/11/5-6
4. Keisei So, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, Koji Nishikawa, Yoshiki Higuchi and Kenji Kano, “Dual Gas-Diffusion-Type H₂O₂ Biofuel Cell”, 11th International Hydrogenase Conference, Aix-Marseille Université, Marseille, France, 2016/7/14
5. Keisei So, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, Koji Nishikawa, Yoshiki Higuchi and Kenji Kano, “Dual Gas Diffusion H₂O₂ Biofuel Cell in Direct Electron Transfer-Type System”, PRiME2016, Honolulu, USA, 2016/10/5
6. Kento Sakai, A. Suzuki, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai and Kenji Kano, “Bioelectrocatalytic Interconversion between Formate and Carbon Dioxide by Tungsten-Containing Formate Dehydrogenase”, PRiME2016, Honolulu, USA, 2016/10/5
7. Kento Sakai, Yuki Kitazumi., Osamu Shirai, Kazuyoshi Takagi, and Kenji Kano, “Efficient Bioelectrocatalytic Interconversion System between Formate and Carbon Dioxide”, 8th International Conference on Green and Sustainable Chemistry, Melbourne, Australia, 2017/07/25
8. Hulin Tai, Liyang Xu, Koji Nishikawa, Yoshiki Higuchi, and Shun Hirota, “Elucidation of the activation/inactivation mechanism between the Ni-SI_r and Ni-SI_a states of [NiFe] hydrogenase utilizing Ni-SI_r-to-Ni-SI_a photoactivation”, 2nd International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2017), Uji Campus of Kyoto University, Uji, Kyoto, 2017/12/14-15

国内会議

1. 大川雄嗣, 樋口芳樹, 庄村康人, “[NiFe]-ヒドロゲナーゼ成熟化タンパク質 HypA の結晶化”, 日本結晶学会 2013 年度年会, 熊本市, 熊本県, 2013/10/12-13
2. 中川英恵, 竹田翠, 土生川真央, 木平清人, 柴田直樹, 西原宏史, 尹 基石, 小江誠司, 石井正治, 五十嵐泰夫, 庄村康人, 樋口芳樹, “NAD⁺還元型ヒドロゲナーゼの結晶学的研究”, 日本結晶学会 2013 年度年会, 熊本市, 熊本県, 2013/10/12-13
3. 宋 慶盛, 河井翔太, 北隅優希, 白井理, 加納健司, “ヒドロゲナーゼの酸化的不活性化に対する防御戦略の提案”, 第 59 回ポラログラフイーおよび電気分析化学討論会,

- 沖縄市, 沖縄県, 2013/11/28 -12/1
4. 阪井研人、河井翔太、高木一好、北隅優希、白井 理、加納健司, ”ギ酸/二酸化炭素対の生物電気化学的可逆反応系に関する一考察”, 第 59 回ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会, 沖縄市, 沖縄県, 2013/11/28-12/1
 5. 太 虎林, 西川幸志, 鈴木雅之, 樋口芳樹, 廣田 俊, ”硫酸還元菌由来 [NiFe]ヒドロゲナーゼの光反応性の分光学的研究”, 第 14 回日本蛋白質科学会, ワークピア横浜/横浜産産貿易ホールマリネリア, 横浜市, 神奈川県, 2014/6/25-27
 6. Noor Dina Muhd Noor, Koji Nishikawa, Ki-Seok Yoon, Seiji Ogo, Yoshiki Higuchi, “Structural Chemistry of Oxygen Tolerant [NiFe]-hydrogenase from *Citrobacter S-77*”, 日本結晶学会 2014 年度年会, 東京大学弥生講堂, 東京都, 2014/11/1-3
 7. 井上誠也, 西川幸志, 玉田太郎, 黒木良太, 樋口芳樹, “中性子結晶構造解析に向けた巨大単結晶の調製～相図を用いたアプローチ～” 日本結晶学会 2014 年度年会, 東京大学弥生講堂, 東京都, 2014/11/1-3
 8. 西川幸志, 緒方英明, 樋口芳樹, Wolfgang Lubitz, “Observation of a Hydride Bridge in [NiFe] Hydrogenase”, 日本結晶学会 2014 年度年会, 東京大学弥生講堂, 東京都, 2014/11/1-3
 9. 窪田慎太郎, 東間清和, 山崎 徹, 矢澤哲夫, 安川智之, 水谷文雄, 樋口芳樹, “ヒドロゲナーゼの性質の電気化学的解析と修飾用電極の探索”, ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会, 京都工芸繊維大学 60 周年記念館, 京都市, 京都府, 2014/11/16
 10. ブイタンタン, 橋野廉, 嶺重 温, 窪田慎太郎, 樋口芳樹, 山崎 徹, 矢澤哲夫, “電子伝導性多孔質ガラス電極の作製”, 公益社団法人日本セラミック協会第28回秋季シンポジウム, 富山大学 (五福キャンパス), 富山県, 2015/9/16-18
 11. 窪田慎太郎, Buithanh Tan, 山崎 徹, 矢澤哲夫, 樋口芳樹, “ヒドロゲナーゼの修飾用電極の評価と反応活性の解析”, 第61回ポーラログラフイーおよび電気化学分析化学討論会, イーグレ姫路, 姫路市, 兵庫県, 2015/11/24
 12. 松本 卓樹, 樋口芳樹, 庄村康人, “Crystal structure analysis of the Fe-S protein maturation factor Cia1”, 第87回日本生化学会大会, 神戸, 兵庫県, 2015/12/1
 13. 宋 慶盛, 北隅優希, 白井 理, 加納健司, “バイオの力で発電する燃料電池”, 第 5 回 JACI/GSC シンポジウム, 神戸, 兵庫県, 2016/6/3
 14. 阪井研人, 鈴木新人, 北隅優希, 白井 理, 加納健司, “ギ酸/二酸化炭素対の生物電気化学的相互変換系の構築と今後の展望”, 第 5 回 JACI/GSC シンポジウム, 神戸, 兵庫県, 2016/6/3
 15. 太 虎林, 西川幸志, 井上誠也, 樋口芳樹, 廣田 俊, “FT-IR と EPR を用いた [NiFe] ヒドロゲナーゼの新規中間体の特定と鉄硫黄クラスターによる反応制御機構の解明”, 第16回日本蛋白質科学会年会, 福岡国際会議場, 福岡市, 福岡県, 2016/6/7
 16. 許力揚, 太虎林, 井上誠也, 西川幸志, 樋口芳樹, 廣田俊, “[NiFe]ヒドロゲナーゼにおけるNi-SI₂状態からNi-SI₄状態への光活性化”, 第10回バイオ関連化学シンポジウム, 石川県立音楽堂, 金沢市, 石川県, 2016/9/7
 17. ブイタンタン, 嶺重 温, 窪田慎太郎, 樋口芳樹, 矢澤哲夫, “炭素コーティングによる電子伝導性多孔質ガラス電極の作製”, 第57回ガラスおよびフォトニクス材料討論会, 京都大学 国際科学イノベーション棟, 京都市, 京都府, 2016/11/14
 18. 澤辺大嗣, 樋口芳樹, 庄村康人, “Fe(CN)₂CO 錯体の生合成に関与するHypCD 複合体の二価金属結合型構造”, 日本結晶学会平成28年度年会, 茨城県民文化センター, 水戸市, 茨城県, 2016/11/17-18
 19. 西川幸志, 樋口芳, “Ni desorption from the active site in the [NiFe] hydrogenase”, 日本結晶学会平成28年度年会, 茨城県民文化センター, 水戸市, 茨城県, 2016/11/17-18
 20. 中島悠志, 竹田 翠, 池田洋子, 庄村康人, 樋口芳樹, “NAD⁺還元型[NiFe]ヒドロゲナーゼ (水素活性型) の結晶学的研究”, 日本結晶学会平成28年度年会, 茨城県民文化センター, 水戸市, 茨城県, 2016/11/17-18
 21. 太 虎林, 許 力揚, 井上誠也, 西川幸志, 樋口芳樹, 廣田 俊, “光照射を利用した硫酸

- 還元菌由来[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性化機構のFT-IR研究”, 第54回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場, つくば市, 茨城県, 2016/11/25
22. 太虎林, 許力揚, 西川幸志, 樋口芳樹, 廣田 俊, “[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性準備状態 Ni-SI_r と活性状態 Ni-SI_a 間の酸塩基平衡機構の光照射を利用した研究”, 第17回日本蛋白質科学会年会, 仙台国際センター, 仙台市, 宮城県, 2017/6/21
 23. Hulin Tai, Liyang Xu, Koji Nishikawa, Yoshiki Higuchi, and Shun Hirota, “Elucidation of the Acid-Base Equilibrium Mechanism between the Ready Ni-SI_r and Active Ni-SI_a States of [NiFe] Hydrogenase Utilizing Light Irradiation”, 第55回日本生物物理学会年会, 熊本大学, 熊本市, 熊本県, 2017/9/20
 24. 松浦滉明, 西川幸志, 太虎林, Noor Dina Muhd Noor, 金在炫, 姜志姪, 尹基石, 小江誠司, 館野賢, 廣田俊, 樋口芳樹, “S-77 ヒドロゲナーゼ酸素耐性機構の構造化学”, 日本結晶学会平成29年度年会, JMS アステールプラザ, 広島市, 広島県, 2017/11/24

(4)知財出願

①国内出願

②海外出願

1. <発明の名称、発明者、出願人、出願日、出願番号、出願国>

③その他の知的財産権

(5)受賞・報道等

①受賞

1. 樋口芳樹, 第38回 井植文化賞 (科学技術部門), 公益財団・井植記念会, 神戸市, 2014/10/4
2. Keisei So, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, Kouhei Kurita, Hirofumi Nishihara, Yoshiki Higuchi, and Kenji Kano, 日本化学会 BCSJ 賞, 日本化学会, 東京, 2014/11/15
3. 宋 慶盛, GSC ポスター賞, 新化学技術推進協会, 神戸市, 2016/6/3
4. 宋 慶盛, 学生優秀口頭発表賞, 日本ポーラログラフ学会, 宮古島市, 2016/11/21
5. 阪井研人, 第10回 GSC Student Travel Grant Award, 新化学技術推進協会 東京都, 2017/7/3
6. 阪井研人, トピックス賞, 日本農芸化学会, 京都市, 2017/2/19
7. 樋口芳樹, 平成29年度 兵庫県科学賞 (平成29年11月7日)

②マスコミ(新聞・TV等)報道

- ・NHK 奈良「ならなび」, 水素の分解合成酵素の反応を制御するスイッチング機能を解明 ~ 燃料電池のエネルギー源や水素を添加する化合物の生産への利用に期待~, 2014年10月22日
 - ・日刊工業新聞, 水素分解の制御酵素 スイッチ機構の解明, 2014年10月27日
 - ・日本経済新聞, 微生物と水素で効率よく発電, 2014年10月28日
 - ・半導体産業新聞, 触媒酵素の制御解明 燃料電池の開発に寄与, 2014年12月3日
- プレス発表題目: 水素の分解合成酵素の反応を制御するスイッチング機能を解明、~燃料電池のエネルギー源や水素を添加する化合物の生産への利用に期待~
 場所: 奈良先端科学技術大学院大学附属図書館3階マルチメディアホール
 日時: 2014年10月22日
 概要: 奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科の廣田研究グループ、兵庫県立大学生命理科学研究科の樋口研究グループ、及び科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業チーム型研究(CREST)の共同研究グループは、水素分子の分解反応や水素分子を

つくりだす合成反応を可逆的に触媒する酵素(ニッケル-鉄ヒドロゲナーゼ)について、この酵素に含まれる「鉄硫黄クラスター」といわれる部分がスイッチ役になってこの酵素の触媒反応を制御するメカニズムを初めて明らかにした。この酵素による水素分子の分解・合成反応は、現在燃料電池等に利用されている白金等の希少金属触媒と比べて高効率で行われており、今回の成果は、新規の燃料電池や水素合成触媒の開発につながる研究と期待されている。

ニッケル-鉄ヒドロゲナーゼは微生物が有する水素分解・合成酵素である。酵素中の触媒反応を司る中心部分は、ニッケルと鉄原子からなる金属錯体で、ニッケル-鉄活性部位と呼ばれる。触媒反応が起こる時、水素分子の分解・合成によりこのニッケル-鉄活性部位の配位構造は3つの状態をとることが知られていた。また、触媒反応に関わる電子は3つの鉄硫黄クラスターを通過して外部のタンパク質分子とやりとりされる。この酵素に光を照射すると、ニッケル-鉄活性部位は3つの状態とは異なる新たな状態になることが知られていたが、その状態が触媒反応において意味を持つのかは謎であった。

廣田らは、フーリエ変換赤外吸収分光法という分子構造を調べる方法を用い、光照射で生じる状態が触媒反応の中間体であることを突き止めた。さらに、3つの鉄硫黄クラスターのうちニッケル-鉄活性部位に最も近い鉄硫黄クラスターの電子状態を調べた結果、そのクラスターが還元されている時は触媒反応が進まず、酸化されている時だけ進むことを見出した。つまり、ニッケル-鉄活性部位に最も近い鉄硫黄クラスターがスイッチ役になってヒドロゲナーゼの反応を制御していることを明らかにした。

③その他

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

②社会還元的な展開活動

§ 5 研究期間中の活動

5. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2013年 5月31日	チーム内ミーティング (非公開)	兵庫県立大学	22	研究推進打合せ、研究発表会
2013年 12月14日	チーム内ミーティング (非公開)	京都大学	20	研究推進打合せ、研究発表会
2014年 8月2日	チーム内ミーティング (非公開)	奈良先端科学技術大学院大学	22	研究推進打合せ、研究発表会
2015年 6月18日	高大連携授業	兵庫県立大学附属高校	1クラス	酵素を利用した水素エネルギーシステムについて
2015年 6月22日	豊田理化学研究所フェロー研究報告会	豊田理化学研究所	20	水素を新しいエネルギー源とする新領域の構築
2015年 10月29日	チーム内ミーティング (非公開)	兵庫県立大学	14	分光研究会、研究発表会
2016年 6月27日	チーム内ミーティング (非公開)	京都大学	23	研究推進打合せ、研究発表会

2016年 9月12日	垂水文化講座	井植記念館(神戸市垂水区)	70	水素エネルギー社会はいつ来るのか?
2017年 1月11日	神戸水素クラスター研究会	神戸市産業振興センター	30	水素社会を支える基礎科学～生物システムの研究
2017年 6月29日	チーム内ミーティング (非公開)	京都大学	22	研究推進打合せ, 研究発表会
2017年 7月14日	出張講義	兵庫県立三木高校	2クラス	酵素を利用した水素エネルギーシステムについて

§6 最後に