

日本-ドイツ・フランス・ベルギー国際共同研究 「手ごろでクリーンなエネルギー源としての持続可能な水素技術」 2023 年度 年次報告書	
研究課題名（和文）	藻類による水素生産を目指した蛋白質構造に立脚した代謝工学（H2M）
研究課題名（英文）	Structure-based metabolic engineering of algal H ₂ production (H2M)
日本側研究代表者氏名	栗栖 源嗣
所属・役職	大阪大学 蛋白質研究所・教授
研究期間	2022 年 4 月 1 日 ～ 2025 年 3 月 31 日

1. 日本側の研究実施体制

氏名	所属機関・部局・役職	役割
栗栖 源嗣	大阪大学・蛋白質研究所・教授	研究総括、活性測定、NMR 相互作用解析
三角 裕子	大阪大学・蛋白質研究所・特任研究員	酵素・タンパク質の精製、X 線結晶解析、クライオ電子顕微鏡構造解析

2. 日本側研究チームの研究目標及び計画概要

本年度は昨年度成功した酸素耐性を持つ[FeFe]ヒドロゲナーゼの構造解析をベースに、当初の計画であった緑藻由来ピルビン酸フェレドキシン還元酵素（PFR1）とヒドロゲナーゼ（HYDA1）のクライオ電子顕微鏡構造解析を目標とする。フェレドキシン（FD）との相互作用解析は、フランスグループからの情報を基にミトコンドリア型 FD に対象を変更して NMR 分光法により進める。

3. 日本側研究チームの実施概要

2023 年度は、緑藻由来ピルビン酸フェレドキシン還元酵素（PFR1）発現系の最適化と緑藻型[FeFe]ヒドロゲナーゼ（HYDA1）の構造解析に注力した。しかし色々な発現条

件の検討を行ったが、緑藻由来 PFR1 を高純度で大量に調製することは難航を極めた。そこで、欧州側の共同研究者とも相談し、硫酸還元菌 *Desulfovibrio africanus* がもつ PFR (DaPFR) に切り替えて実験を進めることにした。また、酸素耐性を持つ [FeFe] ヒドロゲナーゼである CbA5H は当初対象としていた緑藻型 [FeFe] ヒドロゲナーゼ (HYDA1) に比べて構造が安定であり魅力的ではあるものの、HYDA1 に比べると分子サイズが大きくミトコンドリアでの発現に懸念が残る。そこで、緑藻由来 HYDA1 と相同性の高い他の藻類（クロレラ等）がもつ小型の相同酵素にも対象を広げて構造解析を進めた。フェレドキシン (FD) と PFR との相互作用解析においては、フランスグループからの提案を基にミトコンドリア型 FD に対象を変更して実験を進めた。その結果、相互作用解析の基盤となる X 線結晶解析に成功して 1.9Å 分解能の構造情報を得た。この構造情報をもとに、NMR 分光法による相互作用解析をすすめてミトコンドリア内での本来の役割を損なうことなく PFR と反応が進むような変異の導入を進める。