

令和元年6月26日現在

機関番号：84502

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04172

研究課題名(和文) 鉄酵素活性機構の解明を加速する高分解能・高感度核共鳴振動分光装置の開発

研究課題名(英文) Development of a novel nuclear resonance vibrational spectrometer to elucidate the mechanism in the active center of iron enzymes

研究代表者

依田 芳卓 (Yoda, Yoshitaka)

公益財団法人高輝度光科学研究センター・利用研究促進部門・主幹研究員

研究者番号：90240366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：核共鳴振動分光法は複雑な構造を有する酵素のなかで、活性中心にある鉄の振動のみを抽出できるという大きな特徴をもつ。一方で、分解能や強度の不足により、観測したい試料・振動モードが限定されることは利用の大きな障壁となっていた。本研究では、鉄酵素試料に最適化された高分解能・高感度の核共鳴振動分光装置の開発を行い、鉄-水素の振動モードを観測することにより水素を酸化還元するヒドロゲナーゼの活性機構の理解を深めることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性中心に金属をもつ金属酵素のなかで鉄酵素は水素を酸化還元するヒドロゲナーゼをはじめ、エネルギー問題・食糧問題・医療などと密接に関わっているものが多い。すでに結果も出始めているが、開発した核共鳴振動分光装置の利用による鉄酵素の活性機構の解明を通じて、タンパク質の動的機能の理解を深めることができる。一方、得られた知見は大きな投資が行われている水素と酸素を水に変換する燃料電池電極を始めとする人工触媒の開発において重要なヒントを与えると期待されている。

研究成果の概要(英文)：Nuclear resonance vibrational spectroscopy is a powerful tool to investigate the active center of the iron metalloenzymes because it selectively probe the vibrational motion of Fe-57. But the observable vibrational modes were limited due to the lower resolution or the lower counting rates of the signals. We have developed a novel nuclear resonance vibrational spectrometer and observed the iron-hydrogen bending mode in hydrogenase which reversibly catalyze the molecular hydrogen. It contributes to the deep understanding of the mechanism of the hydrogenase.

研究分野：放射光科学

キーワード：量子ビーム 酵素反応 核共鳴振動分光 核共鳴非弾性散乱 核共鳴散乱 生物化学 高分解能モノクロメータ ヒドロゲナーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 鉄は生物において酸素運搬・貯蔵の働き以外にも金属酵素の活性中心としてさまざまな、そして極めて重要な生理学的役割を担っていることが明らかになっている。例えば水素を酸化還元するヒドロゲナーゼ、窒素固定をおこなうニトロゲナーゼ、DNA合成に関わるリボヌクレオチドリダクターゼ、メタンをメタノールに転換するメタンモノオキシゲナーゼ、ミトコンドリアで電子伝達系に関わるシトクロムc、および、呼吸末端酵素のシトクロム酸化酵素などが鉄を活性中心にもつ酵素として挙げられる。タンパク質のX線結晶構造解析等によりその構造は明らかになってきているが、酵素反応機構解明の鍵となる反応中間体の分子構造をはじめとする、酵素反応に関わる活性機構・作用秩序の多くはいまだ謎のままである。これらの酵素の活性機構の解明は学術的興味のみならず、もしその具体像が明らかになれば自然を模写した高効率な触媒を開発・作製するにあたり、極めて大きなヒントを与えることは多くの研究者・技術者が認識するところである。

(2) 核共鳴振動分光法は原子核の共鳴準位によるX線の散乱（核共鳴散乱）を利用し、原子の振動状態を求めることができる比較的新しい分光法である。タンパク質中の原子の振動状態を調べる手法としては赤外分光法やラマン分光法などがあるが、核共鳴振動分光法の最大の特徴は”鉄原子の振動のみを抽出できる”ところにある。入射強度は放射光X線結晶構造解析に用いられるX線に比べて4桁程度弱く、光による状態変化がないため、酵素反応の反応中間体の測定が可能である。またその他の特徴として、1) 単結晶が不要、2) どんな酸化状態（磁気状態）でも測定可能、3) 水溶液中で測定可能、4) 定量解析が可能、などの利点がある。

2. 研究の目的

(1) 核共鳴振動分光法は複雑な構造を有する酵素のなかで、活性中心にある鉄の振動のみを抽出できるという大きな特徴をもつ。しかしながら、分解能や強度の不足により、観測したい試料・振動モードが限定されることは利用の裾野を広げる上で最大の障壁となっていた。本研究では、極めて重要でありながらこれまで測定困難であった鉄酵素の活性機構の解明に資するため、希薄な鉄酵素試料に最適化された高分解能・高感度の核共鳴振動分光装置を開発することを目的とした。

(2) また開発した装置の性能を活かして、研究協力者でもある University California, Davis の Cramer 教授と協力して、未だ酵素において観測されたことのない鉄と水素の伸縮振動モードの観測をめざした。この振動モードが観測可能になれば、水素社会実現のために全容の解明が待たれるヒドロゲナーゼにおける水素活性の機構解明に大きな進展が期待できるばかりでなく、どの鉄酵素の測定においても、ひとつの大きな指標となると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 核共鳴振動分光装置の高分解能化・高感度化を実現するために、放射光において高分解能モノクロメータへのX線発散角を屈折レンズにより平行化するとともに、平行X線に最適化された図1に示すようなGeおよびSiのブラッグ反射で構成された高分解能モノクロメータを設計・製作した。その際、希薄な酵素試料に最適化するために縦のビームサイズを広げた独自の配置をとることにより、感度の向上、分光能の向上が期待できた。

(2) ヒドロゲナーゼの核共鳴振動分光スペクトルの取得には図2に示すようなクライオスタットでヒドロゲナーゼ酵素を冷却し、原子核準位を経て散乱されたX線をAPD検出器で測定する。そして未だ酵素において観測されたことのない鉄と水素の伸縮振動モードの観測をめざした。

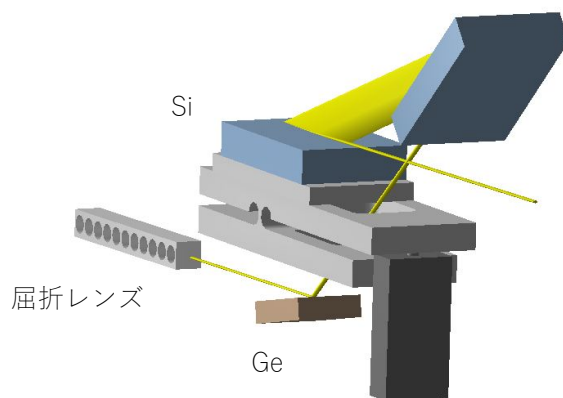


図1 高分解能モノクロメータ

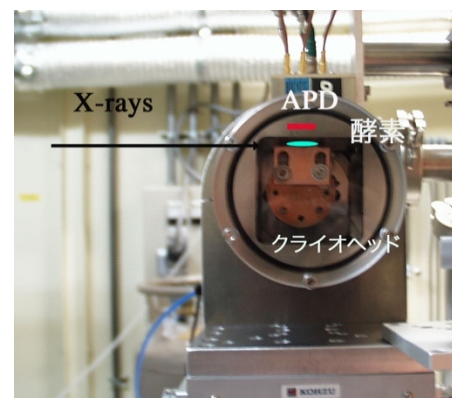


図2 クライオスタットで冷却された試料と APD 検出器

4. 研究成果

(1) 核共鳴振動分光装置内の高分解能モノクロメータに入射するX線の発散角を狭くする図3に示す次元屈折レンズの製作、評価を行った。SPring-8核共鳴散乱ビームラインBL09XUにおいて、14.4keVのX線に対しフルビームを使って発散角0.4秒のビームを得ることに成功し、想定シミュレーション値0.5秒を上回ることができた。また、この屈折レンズにおける透過率は98.5%と非常に高く減衰は軽微であった。しかしながら、予想された屈折レンズ3枚の条件ではなく、屈折レンズ1枚の条件で達成されたため調べてみると、レンズなしでもある程度平行化されていることが判明した。これは熱負荷を受けたビームラインモノクロメータの変形によるものと推測された。

(2) 高分解能モノクロメータを含めた核共鳴振動分光装置を設計・製作した。屈折レンズ(平行化レンズ)を挿入することにより、図4に示すように、3.5meVモノクロメータでは15%の、0.8meVモノクロメータでは10%の核共鳴散乱シグナルの増大を得ることができた。

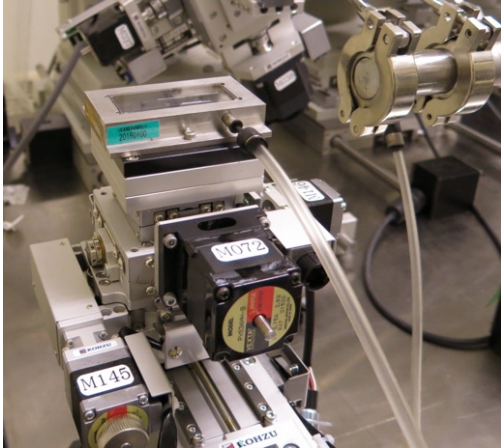


図3 屈折レンズと調整機構

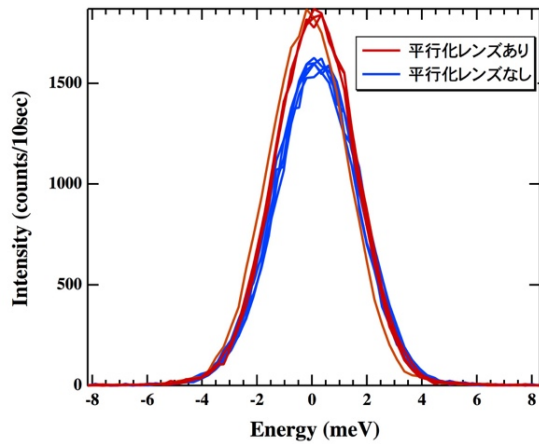


図4 屈折レンズ挿入による核共鳴散乱シグナルの増大

(3) [FeFe]ヒドロゲナーゼの核共鳴振動スペクトルを測定した。[FeFe]ヒドロゲナーゼの活性中心は図5に示すように電子伝達に寄与する鉄-硫黄クラスターと水素の酸化還元に関与する鉄-鉄サイトよりなる。図6に示す測定スペクトルは上から順にネイティブより架橋しているアミノ基を酸素に置換したもの、水素の伝搬に関与するシステインをセリンに置換したもの、ネイティブのヒドロゲナーゼである。赤色のスペクトルは水色のスペクトルが得られたヒドロゲナーゼにおいて水素を重水素に置換して得られたものである。重水素置換によりピークが無くなっていることはこのピークが鉄-水素の結合によることを明確に示している。図7に示すDFT計算では、このピークは当初目標としていた伸縮モードではなく、ベンディングモードとアサインされた。また、置換によってピークの振動数がシフトしていることは活性中心の原子から5オングストローム以上離れたアミノ酸が活性中心の反応に影響を与えることを示唆しており、非常に興味深い結果が得られた。

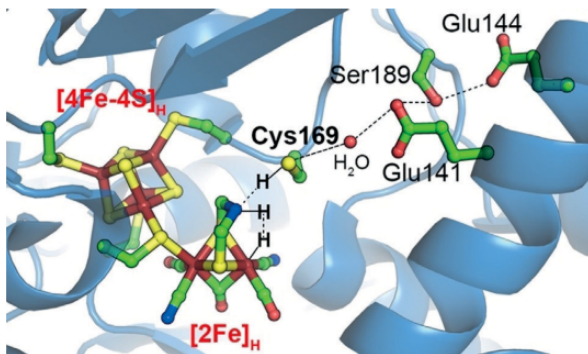


図5 ヒドロゲナーゼの活性中心とその周辺

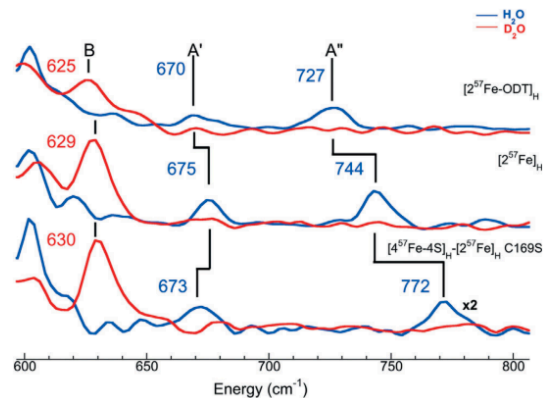


図6 ヒドロゲナーゼの核共鳴振動分光スペクトル

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 18 件)

- ① “X-ray beam properties available at the nuclear resonant scattering beamline at SPring-8”, Y. Yoda, *Hyperfine Interactions*, accepted, 査読有
- ② “Terminal hydride species in [FeFe]-Hydrogenases are vibrationally coupled to the active site environment”, C. C. Pham, …, Y. Yoda (12 番目/13 人) and S. P. Cramer, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 57 (2018) 10605-10609., 査読有, DOI: 10.1002/anie.20180514
- ③ “Reaction coordinate leading to H₂ production in [FeFe]-hydrogenase identified by nuclear resonance vibrational spectroscopy and density functional theory”, V. Pelmeshnikov, …, Y. Yoda (10 番目/13 人), …, and S. P. Cramer, *J. Am. Chem. Soc.*, 139 (2017) 16894-16902., 査読有, DOI: 10.1021/jacs.7b09751
- ④ “Direct Observation of an Iron-Bound Terminal Hydride in [FeFe]-Hydrogenase by Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopy”, E. J. Reijerse, …, Y. Yoda (8 番目/12 人), …, and S. P. Cramer, *J. Am. Chem. Soc.*, 139 (2017) 4306-4309., 査読有, DOI: 10.1021/jacs.7b00686
- ⑤ “High-resolution monochromator for iron nuclear resonance vibrational spectroscopy of biological samples”, Y. Yoda, K. Okada, H. Wang, S. P. Cramer and M. Seto, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 55 (2016) 122401. 査読有, DOI: 10.7567/JJAP.55.122401
- ⑥ 「核共鳴振動分光の生物学分野への応用 -酵素活性中心のプローブとして-」, 依田芳卓, *放射光*, 29 (2016) 150-157, 査読無, <http://www.jssrr.jp/journal/pdf/29/p150.pdf>

[学会発表] (計 3 件)

- ① Yoshitaka Yoda, “Latest research using nuclear resonant scattering at SPring-8”, International conference on Hyperfine Interactions and their applications, 2019 年 2 月 15 日, ゴア (インド)
- ② 依田芳卓, 「核共鳴振動分光装置の開発による鉄含有酵素の原子レベルでの考察」, 第 42 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会, 2018 年 9 月 1 日
- ③ Yoshitaka Yoda, “Nuclear resonant scattering beamline at SPring-8”, 1st nuclear resonant scattering workshop in China, 2017 年 1 月 20 日, 北京 (中国)

[その他]

ホームページ

<http://rud.spring8.or.jp/member/0001245.html>

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名 : Stephen P. Cramer

※科費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。