

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07283

研究課題名(和文) 中性子結晶構造解析によるヒドロゲナーゼの水素合成・分解機構の全容解明

研究課題名(英文) Elucidation of reaction mechanism of hydrogenase by neutron crystallography

研究代表者

玉田 太郎 (Tamada, Taro)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学領域・グループリーダー(定常)

研究者番号：50391248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒドロゲナーゼが触媒する水素の合成・分解反応の全原子レベルでの全容解明を目指して、ヒドロゲナーゼ酸化型および還元型の中性子およびX線結晶構造解析を実施した。Desulfovibrio vulgaris Miyazaki F由来ヒドロゲナーゼ酸化型のX線構造解析では、異常分散効果を考慮することによりNi-A型の新たなコンフォメーションを決定した。新しいコンフォメーションに基づいて、2.0 Å分解能の中性子回折データを用いた構造精密化をほぼ終了した。さらに、嫌気条件下での大型結晶凍結方法を確立し、ヒドロゲナーゼ還元型の中性子回折データ収集に道筋をつけることが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒドロゲナーゼは水素の合成・分解を両方向に常温・常圧で触媒する特長を有している。水素原子の直接観察に長けた中子を軸にした構造解析によるヒドロゲナーゼの反応メカニズムの全原子レベルでの全容解明を目指して研究を実施した。Desulfovibrio vulgaris Miyazaki F由来ヒドロゲナーゼ酸化型の中性子結晶構造解析をほぼ完了し、還元型についても実施の道筋をつけることが出来た。精緻な構造情報に基づいたヒドロゲナーゼ模倣化合物や高機能ヒドロゲナーゼの作成を通じて、クリーンエネルギー実現、さらには温室効果ガス削減による環境問題解決が期待される。

研究成果の概要(英文)：Hydrogenases catalyze the reversible oxidation of molecular hydrogen and play an essential role in energy metabolism in many microorganisms. Furthermore, hydrogenases are interesting not only for basic research but also for clean energy applications since hydrogen is a sustainable and environmentally friendly energy source. [NiFe] hydrogenase contains several metal centers, including the bimetallic Ni-Fe active site, iron-sulfur clusters, and a Mg<sup>2+</sup> ion. We determined new conformation of Ni-A type in the oxidized form of hydrogenase from Desulfovibrio vulgaris Miyazaki F by X-ray crystallography considering anomalous dispersion. Neutron structural analysis of the oxidized form was almost completed at 2.0 Å resolution. In addition, we established the freezing method of large crystals of hydrogenase under anaerobic conditions by confirming the uniformity of crystal mosaicism. Neutron structural analyses of the reduced form (active form) are in progress.

研究分野：構造生物学

キーワード：タンパク質 立体構造 X線・中性子 水素

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

地球温暖化は人類の産業活動に伴い排出された温室効果ガスが主因とされているが、そのうち二酸化炭素は温室効果ガス全体の70%程度を占めている。二酸化炭素排出の大半は化石燃料の消費が原因であるが、特に発電と輸送時に発生する二酸化炭素は全排出量の約半数を占める。これらの現状は、化石燃料に代わる次世代のエネルギー・燃料開発が温暖化緩和のもっとも有効な手段であることを示している。水素は燃焼しても水が生成するだけであることから、化石燃料に代わる次世代の燃料として期待されている「究極の」クリーンエネルギーである。ある種の微生物は水素合成能を有していることが知られているが、この機能は微生物中に存在する酵素「ヒドロゲナーゼ」が担っている。ヒドロゲナーゼの特徴的な点は「水素の合成・分解( $H_2 \rightleftharpoons 2H^+ + 2e^-$ )」の両方向に触媒できる点で、合成反応は燃料としての水素分子供給として、分解反応に伴い発生する電子は電気エネルギーとして燃料電池として利用可能である。

ヒドロゲナーゼはこの特徴的な反応を通常の金属触媒の1,000倍以上の高効率で触媒する優れた生物触媒であるが、NiFe型のヒドロゲナーゼではその高度な機能は活性部位に構築されたNiとFeを中心とした2つの八面体型配位錯体構造により発現している(他にFe型およびFeFe型ヒドロゲナーゼが存在する)。先行研究から、NiFe型のヒドロゲナーゼでは、2つの不活性状態(Ni-A, Ni-B:いずれも酸化型)を経て、異なる3つの活性状態(Ni-R, Ni-S1a, Ni-C:水素還元型)からなる触媒サイクルに至ることが明らかにされている。活性状態においてNiとFeの間にブリッジされている水素(ヒドリド)の存在に関しては、Ni-C型については分光学的手法によって、Ni-R型については0.89Å分解能のX線結晶解析によって、その存在が強く示唆されているが、いずれについても水素原子存在の直接的証拠は得られていなかった。また、酸化型においてNi-Fe間にブリッジされていると示唆される原子種およびその状態(O/S or OH<sup>-</sup>/SH<sup>-</sup>)も明らかになっていなかった。

### 2. 研究の目的

大型結晶取得実績のある*Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F (DvMF)由来ヒドロゲナーゼについて、

- 酸化型(2つの不活性状態: Ni-B, Ni-A)の中性子構造解析を実施し、Ni-Fe間に架橋された原子種及びその状態の解明
- 水素還元型(3つの活性状態: Ni-R, Ni-S1a, Ni-C)の中性子構造解析を実施し、Ni-Fe間の水素(ヒドリド)の存在を直接観察

を目指した。また、水素の分解反応において発生するプロトン(H<sup>+</sup>)の輸送経路である分子中に形成された水素結合ネットワークについても、その詳細解明を目指した。最終的には、併せて取得する1.0Å分解能を超える高分解能X線構造情報に基づく(水素原子以外の)原子の精緻な位置情報も統合して、高精度の全原子構造情報に基づくヒドロゲナーゼの水素の合成・分解反応の全容解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) 酸化型の中性子およびX線結晶構造解析

先行研究において国内のパルス中性子施設 J-PARC/MLF の BL03 (iBIX) で収集済みの酸化型の中性子回折データの処理はプログラム STARGazer を用いて実施した。相補的な構造精密化のために放射光施設において同一結晶から収集したX線回折データから部分的にNiが欠落していることを確認したため、NiのK吸収端近傍(波長1.48および1.49Å)で収集したX線回折データ(放射光施設 KEK/PF の BL5A で実施)を用いた異常分散効果を考慮した解析により、Ni-A型とNi-B型の初期構造および存在比を決定した。プログラム PHENIX により、得られた初期構造を中性子、X線の両データを用いて構造精密化した。同一結晶から収集したX線回折データは1Å近い分解能であったため、別途プログラム SHELXL により結合距離・結合角の束縛を緩めたX線構造精密化も実施した。

#### 2) 還元型の中性子およびX線結晶構造解析

還元型の結晶は大きく分けて2種類の方法で作製した。1つは好気下で作製した酸化型結晶を嫌気下で水素もしくは重水素ガスにより還元する方法、もう1つは試料調製から結晶化までのすべてを嫌気下で行う方法である(上述の0.89Å分解能のNi-R型X線結晶解析は後者で作製した結晶が用いられた)。前者については還元剤(メチルピオロゲン)の有無及び反応時間を複数検討した。還元の状態は放射光施設におけるX線結晶解析によりNi-Fe間の距離や残余電子密度で評価した。中性子回折データ収集は還元状態を保持するために100K下で、前者についてはJ-PARC/MLFのiBIX、後者については米国パルス中性子施設SNSのMaNDiにおいて実施した。嫌気環境下における結晶凍結については、液体窒素に直接浸ける方法と100Kの窒素ガス気流下で凍結する方法を検討した。検討結果は中性子回折像で確認した他に、SPRING-8のBL28B1で収集したX線回折データのモザイク性からも評価した。iBIXで収集した回折データはプログラム STARGazer で、MaNDiで収集した回折データはプログラム Mantid を用いて処理した。同一結晶から収集したX線回折データを相補的に用いた構造精密化はプログラム PHENIX により実施した。

#### 4. 研究成果

##### 1) 酸化型の中性子およびX線結晶構造解析

###### ・酸化型のX線結晶構造解析（異常分散効果を考慮した解析）

中性子回折データを収集したものと同一結晶から SPring-8 の BL26B1 で 1.08 Å 分解能の X 線回折データを収集した。既知の酸化型構造を初期構造とした構造精密化の結果、活性中心の Ni 原子の一部が欠落していることが電子密度から明らかになった。その一方で活性中心近傍に余剰電子密度も確認された。そこで、Ni 原子の欠落の程度と余剰電子密度の原子種の同定を目的として、Ni 原子の K 吸収端 (1.48807 Å) の前後の波長 (1.48 および 1.49 Å) でデータを収集した。その結果、1.48 Å では Ni 原子、1.49 Å では Fe 原子由来の電子密度が明瞭に確認でき、1.48 Å のデータでは本来の場所の横に Ni 由来の有意なシグナルが存在していた (図 1)。この場所は 1.08 Å 分解能データで確認していた余剰電子密度と一致していた。また、他の余剰電子密度は活性中心近傍のアミノ酸残基の異なるコンフォメーション由来と推察された。これらの情報をもとに、Ni-B 型および Ni-A 型の 2 つの構造モデルを構築し (図 2a, b)、それぞれの占有率を考慮した精密化を行った結果、Ni-B 型と Ni-A 型の占有率が 7:3 であることを同定した。また、今回決定した Ni-A 型の構造は従来提唱されていた構造 (図 2c) とは異なっており、NiFe 型ヒドロゲナーゼの不活性型構造 (Ni-A 型) として、新たなコンフォメーションを提唱することが出来た。なお、今回の新しいコンフォメーションは共同研究者による量子化学計算からもその妥当性が実証された。

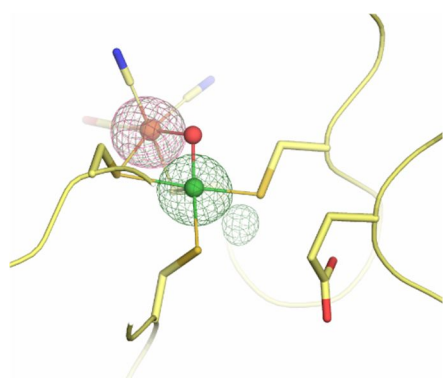


図 1. Ni および Fe 原子由来の電子密度。薄赤の網目が波長 1.49 Å、緑が 1.48 Å データで計算した異常分散差フーリエ図 (それぞれ 6 σ で表示)

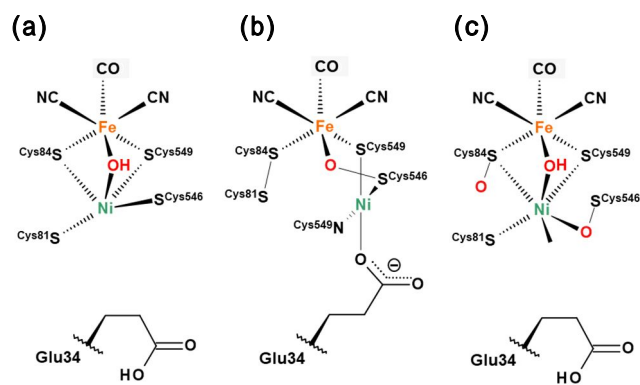


図 2. 酸化型の活性中心構造。(a) Ni-B、(b) 今回決定した Ni-A、(c) 従来提唱された Ni-A。

###### ・酸化型のX線結晶構造解析（高分解能データの構造精密化）

中性子回折データを収集したものと同一結晶から KEK/PF の BL5A において 1.04 Å 分解能で X 線回折データを収集した (処理後の統計値は表 1 に記す)。前項で述べた Ni-A 型および Ni-B 型のコンフォメーションと存在比を初期構造として、プログラム SHELXL を用いて結晶学的 R 値が 14.6% (free R 値が 17.1%) まで構造精密化を実施した。炭素原子に結合した水素原子の一部については電子密度を確認できているが、構造には加えていない。結合距離・結合角の束縛を緩めた構造精密化により、解離性アミノ酸の結合長および結合角度を正確に知ることが出来た。DvMF ヒドロゲナーゼはほぼ中性条件 (pH7.4) で結晶化されているが、アスパラギン酸については 41 残基中 4 残基、グルタミン酸については 44 残基中 4 残基がプロトン化状態で存在していることが結合長の差から明らかになった。模式図 (図 2a) では、Ni-A 型において活性中心に存在する Glu34 がプロトン化状態で示されているが、実際にプロトン化していることを確認できた。また、ヒスチジンについても 28 残基中 5 残基についてプロトン化状態を結合長と結合角度の双方から確認することが出来た。

###### ・酸化型の中性子結晶構造解析

中性子回折データは 2.0 Å 分解能で処理した (処理後の統計値は表 1 に記す)。プログラム PHENIX を用いた構造精密化はまだ完了していないが、活性中心にブリッジしている原子種は硫黄ではなく酸素であることは判明した。酸素の状態については水素 (重水素) 原子の観測には至っていないが、実際に存在しないのか、存在するが同定できていないのかは、構造精密化が完了してから判断したい。なお、共同研究者による量子化学計算からは Ni-B 型の活性中心にブリッジしている酸素は OH の状態であることが提唱されている。

表 1. 酸化型の回折データ統計値

	Neutron	X-ray
Beam source	iBIX at MLF/J-PARC	BL5A at PF/KEK
Wavelength (Å)	1.8-5.8	0.8000
Space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Cell dimensions		
a, b, c (Å)	66.6, 98.5, 126.8	66.7, 98.5, 126.9
Resolution (Å)	20-2.0 (2.07-2.0)	50-1.04 (1.07-1.04)
Unique reflections	55,004	397,623
R <sub>merge</sub> (%)	23.7 (44.9)	5.9 (46.1)
I/σ(I)	4.0 (1.6)	19.7 (4.1)
Completeness (%)	96.2 (94.0)	99.9 (99.6)
Redundancy	3.8 (2.3)	8.5 (7.2)

## 2) 還元型の中性子およびX線結晶構造解析

### ・還元型の中性子結晶構造解析

還元型の結晶は、好気下で作製した酸化型結晶を嫌気下で水素もしくは重水素ガスにより還元する方法、および試料調製から結晶化までのすべてを嫌気下で行う方法により作製した。いずれも体積  $1\text{mm}^3$  程度の結晶を用いて、前者は J-PARC/MLF の iBIX、後者は SNS の MaNDi において中性子回折データを収集し、それぞれ  $1.92$  および  $2.4\text{\AA}$  分解能で処理した（処理後の統計値は表 2 に記す）。同一結晶から X 線回折データを KEK/PF の BL5A においてそれぞれ  $1.02$  および  $1.25\text{\AA}$  分解能で収集した。中性子と X 線を相補的に用いた構造精密化はまだ途中であるが、先だって実施した X 線回折データの構造精密化（結合距離・結合角度の束縛をかけた状態）の結果、前者については、Ni-Fe の距離から還元状態ではあるが、酸化型（Ni-A 型）が若干混在していることが判明した。若干小さめ（体積  $0.1\text{mm}^3$  以下）の結晶を用いた予備的な X 線回折実験からは、還元剤（メチルピオロゲン）の反応時間を増やすことで Ni-A 型が減少し、約 1 日程度でほぼ還元状態に至ることを確認できた。

表 2. 還元型の回折データ統計値

	aerobically purified sample		anaerobically purified sample	
	Neutron	X-ray	Neutron	X-ray
Beam source	iBIX at MLF/J-PARC	BL5A at PF/KEK	MaNDi at SNS/ORNL	BL5A at PF/KEK
Wavelength (Å)	1.8-5.8	1.0000	2.0-4.0	1.0000
Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Cell dimensions				
a, b, c (Å)	66.7, 98.4, 126.7	66.7, 98.4, 126.7	66.7, 98.3, 126.8	66.6, 98.1, 126.0
Resolution (Å)	20-1.92 (1.95-1.92)	50-1.02 (1.05-1.02)	15-2.4 (2.49-2.4)	77-1.25 (1.27-1.25)
Unique reflections	59,110	390,846	28,772	227,512
$R_{\text{merge}}$ (%)	22.2 (42.0)	5.5 (44.4)	19.0 (23.8)	5.8 (24.0)
$I/\sigma(I)$	4.4 (1.5)	23.7 (3.9)	7.0 (3.1)	70.2 (11.4)
Completeness (%)	99.2 (79.8)	92.9 (88.1)	86.8 (80.3)	99.9 (99.6)
Redundancy	3.7 (2.2)	11.8 (7.5)	3.1 (2.1)	14.1 (11.7)

### ・還元状態下での大型結晶凍結

上記の回折データ収集は、いずれも吹付冷却装置のノズルを嫌気ボックスに挿入し、気流下において凍結した大型結晶を用いて実施した（図 3）。嫌気状態での結晶凍結は液体窒素に直接浸ける方法も併せて実施したが、中性子回折像の乱れが顕著であった（図 4a 右）。一方、気流下で凍結させた結晶は良好な回折点を確認できた（図 4b 右）。この違いを定量的に評価するために、それぞれの結晶に複数箇所照射し、そのモザイク性を比較した（2つの結晶の回転方向の方位は合わせている）。その結果、液体窒素に直接浸けた結晶では照射箇所および方位によってばらつきがあるのに対し（図 5a）、気流下で凍結した結晶ではほとんど見られなかった（図 5b）。これより、大型結晶を均一に凍結するためには気流下での瞬間冷却が重要であることをモザイク性から評価できた。



図 3. 嫌気ボックスに導入した吹付型冷却装置。右上は結晶近傍の拡大写真

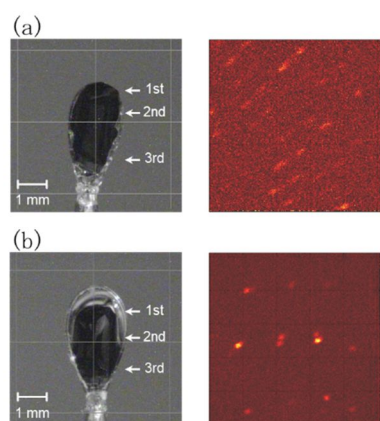


図 4. 還元型結晶（左）および中性子回折像（右）。(a)は液体窒素に直接浸けた結晶。(b)は気流下で凍結した結晶。結晶中の矢印はモザイク性評価のために X 線を照射した箇所

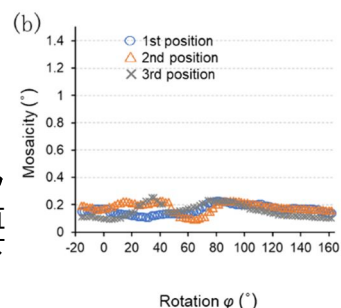
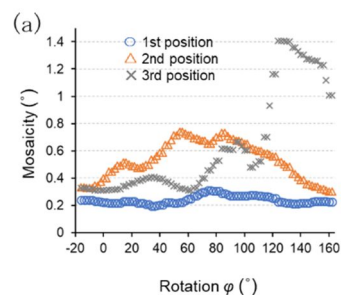


図 5. X線回折によるモザイク性評価。(a)は液体窒素に直接浸けた結晶。(b)は気流下で凍結した結晶

## 3) まとめ

酸化型については、異常分散効果を考慮することで新たな Ni-A 型のコンフォメーションを決定し、それに基づいた中性子および X 線構造精密化をほぼ完了した。還元型については、嫌気条件下での凍結方法および還元型大型結晶の作製方法を確立した。それぞれの結果は原著論文として報告予定であり、前者については準備中、後者については査読中である。今後は、還元型の中性子結晶構造解析を進め、活性中心およびプロトン輸送経路の詳細を水素原子の直接観察により明らかにしたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Tamada T.
2. 発表標題 Neutron Protein Crystallography at J-PARC/MLF
3. 学会等名 ミニシンポジウムタンパク質ダイナミクス研究の最前線（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tamada, T.
2. 発表標題 Neutron Protein Crystallography in Japan
3. 学会等名 Neutron Biology for Next Generation（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 玉田太郎
2. 発表標題 中性子とX線を相補的に用いたタンパク質の構造解析
3. 学会等名 2017年度第2回水とナノ構造研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tamada T, Hiromoto T, Nishikawa K, Inoue S, Hirano Y, Higuchi Y.
2. 発表標題 Neutron diffraction studies of [NiFe]-hydrogenase from <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Miyazaki F
3. 学会等名 12th International Hydrogenase Conference（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 玉田 太郎、廣本 武史、西川 幸志、井上 誠也、平野 優、樋口 芳樹
2. 発表標題 Desulfovibrio vulgaris Miyazaki F株由来[NiFe]-ヒドロゲナーゼの中性子回折実験
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiromoto T, Nishikawa K, Matsuura H, Hirano Y, Kusaka K, Cuneo M, Tamada T, Higuchi Y
2. 発表標題 Neutron diffraction experiments on [NiFe]-hydrogenase crystallized under H2 atmosphere
3. 学会等名 International Symposium on Diffraction Structure Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 玉田 太郎、廣本 武史、西川 幸志、井上 誠也、平野 優、樋口 芳樹
2. 発表標題 Desulfovibrio vulgaris Miyazaki F株由来[NiFe]-ヒドロゲナーゼの中性子回折実験
3. 学会等名 日本結晶学会令和元年(2019)度年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tamada T and Hirano Y
2. 発表標題 Structural biology relating to electron transfer
3. 学会等名 3rd QST International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	栗原 和男  (Kurihara Kazuo)  (50354890)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学 領域・上席研究員(定常)  (82502)	
連携 研究者	樋口 芳樹  (Higuchi Yoshiki)  (90183574)	兵庫県立大学・生命理学研究科・教授  (24506)	