

機関番号：10101  
研究種目：国際共同研究加速基金（帰国発展研究）  
研究期間：2017～2019  
課題番号：16K21748  
研究課題名（和文） 水素生成[FeFe]ヒドロゲナーゼの反応機構  
研究課題名（英文） Reaction mechanism of [FeFe] hydrogenases  
研究代表者  
緒方 英明 (Ogata, Hideaki)  
北海道大学・低温科学研究所・特任准教授  
研究者番号：30795935  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）43,300,000円

## 研究成果の概要（和文）：

[FeFe]ヒドロゲナーゼ（電子伝達分岐型と調節型）と化学合成した2核鉄錯体を用いることで人工的に成熟化させることに成功した。電子伝達分岐型[FeFe]ヒドロゲナーゼの活性は、触媒型ヒドロゲナーゼの活性と同等であった。さらに、電子伝達体フェレドキシンとNADHを用いた電子伝達分岐反応から、HydAサブユニット中の鉄硫黄クラスターが分岐を制御していると提唱した。また、調節型[FeFe]ヒドロゲナーゼの活性は、触媒型ヒドロゲナーゼの活性と比べ非常に低いことがわかった。さらに、調節型[FeFe]ヒドロゲナーゼの電気化学的赤外分光法により3つの酸化還元状態を取ることを示した。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

電子伝達体フェレドキシンとNADHを用いた電子伝達分岐反応から、HydAサブユニット中の鉄硫黄クラスターが分岐を制御していると提唱した。調節型[FeFe]ヒドロゲナーゼの活性は、触媒型ヒドロゲナーゼの活性と比べ非常に低いことがわかった。このことから活性中心周辺のアミノ酸の重要性が明らかとなった。本研究で明らかとなった知見はヒドロゲナーゼを模した化学錯体の設計に重要な指針を与える。

## 研究成果の概要（英文）：

[FeFe] hydrogenases (an electron-bifurcating and a sensory types) have successfully been matured with the chemically synthesized di-iron complexes. The catalytic activity of the electron-bifurcating [FeFe] hydrogenase showed the high catalytic activity similar to that of the standard [FeFe] hydrogenases. The results of the electron-bifurcating assay with ferredoxin and NADH suggested that one of the iron-sulfur clusters might be the electron bifurcating site. The sensory [FeFe] hydrogenase showed less activity than that of the standard hydrogenase enzyme. The electrochemical FTIR spectroscopic data indicated that the three distinct oxidation states could be assigned.

研究分野：生物物理学

キーワード：酵素 ヒドロゲナーゼ 反応機構 フーリエ変換赤外分光 電気化学

1. 研究開始当初の背景

ヒドロゲナーゼは多くの微生物が持つ金属酵素で、水素分子の分解や合成を可逆的に触媒する。その水素触媒能力は高価なプラチナなどを用いた化学触媒と同等以上の効率とされる。ヒドロゲナーゼは地球上にふんだんに存在する鉄を活性中心に持つことから、この酵素を模範にした安価な人工触媒や燃料電池の開発への応用も含めてさまざまな基礎研究が進められている。水素発生型[FeFe]ヒドロゲナーゼ(標準型)の最初の結晶立体構造が報告され(Peters et al., Science 1998)、2核 Fe 錯体と[4Fe4S]クラスターから構成される特異な構造を持つ活性中心(Hクラスター)が明らかとなった。また、タンパク分子中央に位置する活性中心へ繋がるプロトンチャンネル・ガスチャンネルや電子伝達を担う[FeS]クラスター群が存在している。本研究の対象とするフラビンによる電子伝達分岐型や調節型[FeFe]ヒドロゲナーゼは、立体構造や反応機構は分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、次の[FeFe]ヒドロゲナーゼの反応機構の解明を目指した。(1) 電子伝達分岐型[FeFe]ヒドロゲナーゼは、2つの異なる酸化還元電位をもつ電子伝達体(フェレドキシンとNADH)から電子を受け取る。それらの電子がどのようにして活性中心へ伝達されるのか(活性中心やフラビン・[FeS]クラスターの酸化還元状態)を、分光学的手法や構造解析により明らかにする。

(2) 調節型[FeFe]ヒドロゲナーゼの活性中心の酸化還元状態を分光学的手法により明らかにする。また、構造解析により立体構造を明らかにする。さまざまな酸化還元状態での構造変化等を調べ、上記の分光学的手法で調べた結果と統合することにより、分子レベルでの反応メカニズムの総合的理解を目指す。

3. 研究の方法

[FeFe]ヒドロゲナーゼ遺伝子(電子伝達分岐型 TmHydABC と調節型 TmHydS)を、それぞれベクターに導入し大腸菌による発現系を構築する。[FeFe]ヒドロゲナーゼのアポ型を Strep アフィニティー精製し、嫌気条件下でモデル化合物を挿入することによって、人工的に成熟化する。これらの[FeFe]ヒドロゲナーゼのさまざまな酸化還元状態を電気化学的 FTIR 分光法で解析する。酵素活性は、水素分解反応では電子伝達体を使い水素還元し、時間変化 UV スペクトルを観測する。水素発生反応は、ガスクロマトグラフィーで定量する。また、サイクリックボルタンメトリーを測定し、各状態間の酸化還元電位を求める。電子スピン法により、CW-ESR シグナルを測定し、酸化型や還元型、また、阻害剤である一酸化炭素を結合させた状態など Fe 原子の電子状態を調べる。さらに、高純度に精製したサンプルを用いて結晶化し X 線結晶構造解析を行う。

4. 研究成果

(1) [FeFe]ヒドロゲナーゼの大量培養・精製

電子伝達分岐型 HydABC と調節型 HydS それぞれに対し、大腸菌 (*E. coli* BL21<sup>ΔiscR</sup>) を培養し誘導をかけた直後に気相を窒素ガスで置換することで嫌気的に培養した。これによって発現したアポ[FeFe]ヒドロゲナーゼが安定に発現・存在することができた。集菌は嫌気チャンバー内で行い、集めた菌体は超音波破碎機で破碎した。精製は Strep-Tactin アフィニティーカラムと FPLC 精製装置を用いたゲルろ過カラムクロマトグラフィー等を嫌気チャンバー内で行い、高純度の精製サンプル(培養 1L 当たり約 10mg)を得ることができた。精製の純度は SDS-PAGE や Native-PAGE 等の電気泳動で確認した。このアポ酵素に 2 核 Fe 錯体を挿入することによって、人工的に成熟化に成功した(図 1)。

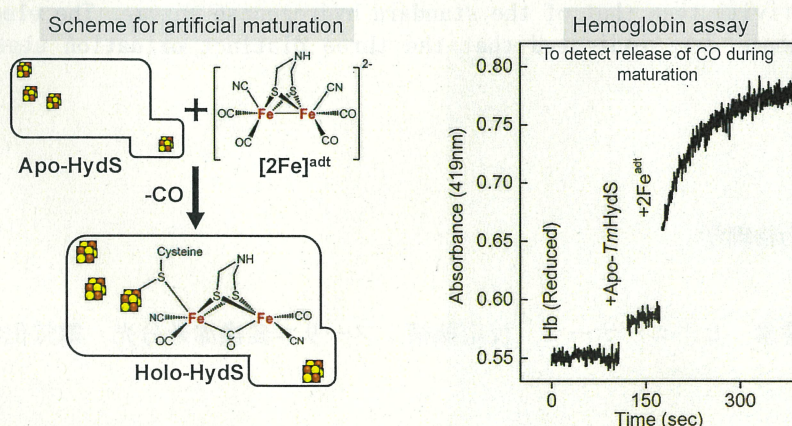


図 1 (左図) [FeFe]ヒドロゲナーゼの人工的成熟化の模式図。(右図) アポ酵素に 2 核 Fe 錯体を加え成熟化する際に放出される CO を検出した UV-vis スペクトル。

(2) 電子伝達分岐型[FeFe]ヒドロゲナーゼの活性測定

電子伝達体メチルピオローゲンをを用いた電子伝達分岐型[FeFe]ヒドロゲナーゼの水素酸化還元活性は、触媒型ヒドロゲナーゼの活性と同等であった。また、ヒドロゲナーゼドメインのみを持つサブユニット HydA の大量発現系を構築し、人工的に成熟化させることにも成功した。水素酸化活性では HydA が HydABC より高い活性を示した。さらに、[FeFe]ヒドロゲナーゼ HydABC の電子伝達分岐解析を行った。電子伝達体フェレドキシンと NADH を用いた電子伝達分岐反応から、HydA サブユニット中の鉄硫黄クラスターが分岐を制御していると提唱した。

(3) 電子伝達分岐型[FeFe]ヒドロゲナーゼの電気化学的分光解析

電気化学的赤外分光法では、IR ウィンドウに電極と金メッシュを挿入し、サンプルに外部からポテンシャルを変化させることにより、連続的に変化する FTIR スペクトルを収集した。これによって、各酸化還元状態に特徴的な Fe-CO と Fe-CN の振動状態を調べた。IR ピークの変化の電位依存性を調べることで、各状態間の酸化還元電位を求めた。この電気化学的赤外分光法により HydABC は 2 つの酸化還元状態を取ることが分かった。もっとも酸化された状態では、活性中心は Fe(I)Fe(II) と 2 価の鉄硫黄クラスターである。1 電子還元される (-420mV) と 2 核鉄錯体が還元され、鉄硫黄クラスターは 2 価のままであることが明らかとなった (図 2)。

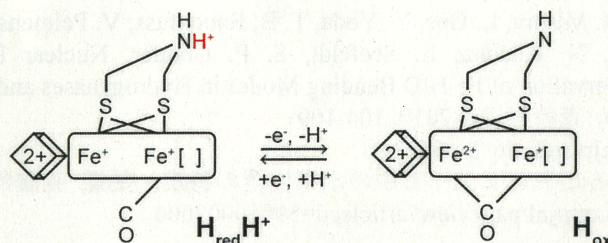


図 2 電気化学的赤外分光法によって得られた電子伝達分岐型[FeFe]ヒドロゲナーゼの H クラスターの酸化還元状態。

(4) 調節型[FeFe]ヒドロゲナーゼの活性測定

電子伝達体メチルピオローゲンをを用いた調節型[FeFe]ヒドロゲナーゼの水素酸化還元活性は、電子伝達分岐型や触媒型ヒドロゲナーゼの活性より低いことが明らかとなった。

(5) 調節型[FeFe]ヒドロゲナーゼの電気化学的分光解析

電気化学的赤外分光法では、電子伝達分岐型と同様に IR ウィンドウに電極と金メッシュを挿入し、サンプルに外部からポテンシャルを変化させることにより、連続的に変化する FTIR スペクトルを収集した。これによって、各酸化還元状態に特徴的な Fe-CO と Fe-CN の振動状態を調べた。IR ピークの変化の電位依存性を調べることで、各状態間の酸化還元電位を求めた。この電気化学的赤外分光法により、調節型[FeFe]ヒドロゲナーゼの活性中心 H クラスターは 3 つの酸化還元状態を取ることが明らかとなった。もっとも酸化された状態では、活性中心は Fe(I)Fe(II) と 2 価の鉄硫黄クラスターである。1 電子還元される (-300 mV) と先に 2 核鉄錯体が還元され、さらに 1 電子還元される (-570 mV) と鉄硫黄クラスターが還元されることが分かった (図 3)。これらは触媒型ヒドロゲナーゼの反応機構と異なっており、活性中心近傍のアミノ酸の立体構造環境が異なるため反応機構が異なること示唆された。このことから活性中心周辺のアミノ酸の重要性が明らかとなった。

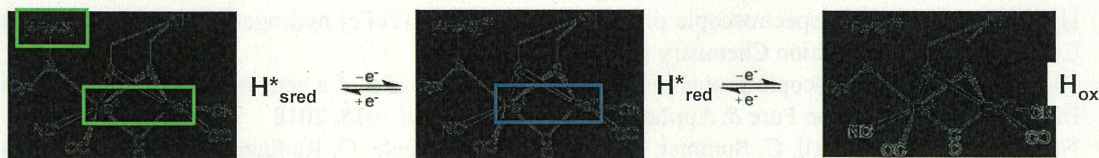


図 3 電気化学的赤外分光法によって得られた調節型[FeFe]ヒドロゲナーゼの H クラスターの酸化還元状態。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① N. Chongdar, K. Pawlak, O. Rüdiger, E. J. Reijerse, P. Rodríguez-Maciá, W. Lubitz, J. A. Birrell, H. Ogata, Spectroscopic and biochemical insight into an electron bifurcating [FeFe] hydrogenase, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 査読有, 25, 2020, 135-149

DOI: 10.1007/s00775-019-01747-1

- ② K. Nishikawa, H. Ogata, Y. Higuchi, Structural basis of the function of [NiFe]-hydrogenases, *Chemistry Letters*, 査読有, 49, 2020, 164-173  
DOI:10.1246/cl.190814
- ③ M. S. Sim, H. Ogata, W. Lubitz, J. F. Adkins, A. L. Sessions, V. J. Orphan, S. E. McGlynn, Role of APS reductase in biogeochemical sulfur isotope fractionation, *Nature Communications*, 査読有, 10, 2019  
DOI: 10.1038/s41467-018-07878-4
- ④ S. Abbruzzetti, A. Allegri, A. Bidon-Chanal, H. Ogata, G. Soavi, G. Cerullo, S. Bruno, C. Montali, F. J. Luque, C. Viappiani, Electrostatic Tuning of the Ligand Binding Mechanism by Glu27 in Nitrophorin 7, *Scientific Reports*, 査読有, 8, 2018  
DOI: 10.1038/s41598-018-29182-3
- ⑤ Nipa Chongdar, James A. Birrell, Krzysztof Pawlak, Constanze Sommer, Edward J. Reijerse, Olaf Rüdiger, Wolfgang Lubitz, Hideaki Ogata, Unique Spectroscopic Properties of the H-Cluster in a Putative Sensory [FeFe] Hydrogenase, *Journal of the American Chemical Society*, 査読有, 140, 2018, 1057-1068  
DOI:10.1021/jacs.7b11287
- ⑥ C. Pham, H. Wang, N. Mishra, L. Gee, Y. Yoda, T. B. Rauchfuss, V. Pelmeshnikov, H. Ogata, E. J. Reijerse, W. Lubitz, N. Khadka, L. Seefeldt, S. P. Cramer, Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopy for Observation of Fe-H/D Bending Modes in Hydrogenases and Nitrogenases, *SPRING-8/SACLA Information*, 査読無, 22, 2017, 104-109  
<https://user.spring8.or.jp/sp8info/?p=34731>
- ⑦ 緒方英明, X線によるヒドロゲナーゼ中の水素位置の特定, *触媒*, 査読無 59, 2017, 274-278  
<https://www.shokubai.org/jnl/pageview?articlecd=59050007000>

[学会発表] (計 18 件)

- ① H. Ogata, N. Chongdar, K. Pawlak, O. Rüdiger, E. Reijerse, P. Rodríguez-Marcía, W. Lubitz, J. A. Birrell, Artificial Maturation of the Electron-Bifurcating [FeFe] Hydrogenase from *Thermotoga maritima*, 3<sup>rd</sup> International Solar Fuels Conference International Conference on Artificial Photosynthesis-2019, 2019
- ② N. Chongdar, K. Pawlak, O. Rüdiger, E. Reijerse, W. Lubitz, J. A. Birrell, H. Ogata, Characterization of the electron-bifurcating [FeFe] hydrogenase from *Thermotoga maritima*, 12<sup>th</sup> International Conference on Hydrogenases, 2019
- ③ N. Chongdar, J. A. Birrell, E. Reijerse, W. Lubitz, H. Ogata, Exploring the roles of secondary coordination sphere amino acids in the H-cluster of *Thermotoga maritima* HydS<sup>2</sup>, 12<sup>th</sup> International Conference on Hydrogenases, 2019
- ④ N. Chongdar, O. Rüdiger, E. J. Reijerse, W. Lubitz, J. A. Birrell, H. Ogata, Spectroscopic characterization of an electron-bifurcating [FeFe] hydrogenase, 第 19 回日本蛋白質科学会年会・第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会, 2019
- ⑤ N. Chongdar, O. Rüdiger, E. J. Reijerse, W. Lubitz, J. A. Birrell, 緒方英明, 電子伝達分岐型[FeFe]ヒドロゲナーゼの赤外分光学, 第 56 回日本生化学会北海道支部例会 日本生化学会北海道支部・東北支部/日本生物物理学会北海道支部合同シンポジウム, 2019
- ⑥ 緒方英明, ヒドロゲナーゼの構造解析と水素触媒反応機構, 日本学術振興会回折構造生物第 169 委員会中性子・放射光連携小委員会合同研究会, 2019
- ⑦ Hideaki Ogata, Characterization of a putative sensory [FeFe] hydrogenase from *Thermotoga maritima*, Seminar at MPI für terrestrische Mikrobiologie, 2018
- ⑧ Hideaki Ogata, Unique spectroscopic properties of a sensory [FeFe] hydrogenase, 43<sup>rd</sup> International Conference on Coordination Chemistry ICC2018, 2018
- ⑨ Hideaki Ogata, Spectroscopic properties of the di-iron active site of a sensory [FeFe] hydrogenase, International Congress on Pure & Applied Chemistry Langkawi 2018, 2018
- ⑩ N. Chongdar, J. A. Birrell, C. Sommer, K. Pawlak, E. J. Reijerse, O. Rüdiger, W. Lubitz, H. Ogata, FTIR studies of a putative sensory [FeFe] hydrogenase, 第 18 回日本蛋白質科学会年会, 2018
- ⑪ K. Pawlak, N. Chongdar, O. Rüdiger, E. J. Reijerse, W. Lubitz, J. A. Birrell, H. Ogata, Spectroscopic analysis of an electron-bifurcating [FeFe] hydrogenase, 第 56 回日本生物物理学会年会, 2018
- ⑫ 廣本武史, 西川幸志, 緒方英明, 樋口芳樹, 水素分解を伴う不活性酸化型[NiFe]ヒドロゲナーゼの再活性化, 日本結晶学会 2018 年度年会および総会, 2018
- ⑬ 緒方英明, 水素酸化還元酵素ヒドロゲナーゼの構造と反応機構, 低温科学研究所共同研究利用研究集会 環境微生物最前線 2017, 2018
- ⑭ Hideaki Ogata, Hydrogen activation by hydrogenases, I<sup>2</sup>CNER International Workshop 2018, 2018
- ⑮ 緒方英明, 人工的成熟化による[FeFe]ヒドロゲナーゼの分光学的解析, 兵庫県立大学セミナー, 2017

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

- ⑯ Nipa Chongdar, Krzysztof Pawlak, James A. Birrell, Wolfgang Lubitz, Hideaki Ogata, Spectroscopic analysis of hydrogen sensor type [FeFe] hydrogenase from *Thermotoga maritima*, 錯体化学会第 67 回討論会, 2017
- ⑰ Nipa Chongdar, Krzysztof Pawlak, James A. Birrell, Wolfgang Lubitz, Hideaki Ogata, Spectroscopic studies of hydrogen sensing [FeFe] hydrogenase from *Thermotoga maritima*, 第 55 回日本生物物理学会年会, 2017
- ⑱ Nipa Chongdar, James A. Birrell, Constanze Sommer, Krzysztof Pawlak, Edward J. Reijerse, Wolfgang Lubitz, Hideaki Ogata, Artificial maturation of sensor type [FeFe] hydrogenase, 第 90 回日本生化学会大会, 2017

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：樋口 芳樹

ローマ字氏名：Higuchi, Yoshiki

所属研究機関名：兵庫県立大学

部局名：生命理学研究科

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：90183574

※科研費による研究は、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。