

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03173

研究課題名(和文)地球温暖化緩和をめざした全原子構造情報に基づくヒドロゲナーゼ反応機構の全容解明

研究課題名(英文)Elucidation of the catalytic mechanism of hydrogenase based on all-atom structure information for the mitigation of global warming

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・量子生命科学研究所・グループリーダー

研究者番号：50391248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,500,000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中性子構造解析では、先行研究で見出した新たなコンフォメーションも考慮した構造精密化を完了し、活性中心に存在する酸素原子種の同定やプロトン輸送・電子伝達経路の理解に繋がる水素/重水素の直接観察に成功した。還元型の構造解析では、メチルビオロゲン処理による還元条件の最適化を実施し、水素および重水素還元したヒドロゲナーゼの中性子回折データを収集した。

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完了し、還元型についても中性子回折データを収集出来た。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 and iron-sulfur clusters. We determined the oxidized form of hydrogenase from Desulfovibrio vulgaris Miyazaki based on Ni-B state and new conformation by combined use of neutron and X-ray crystallography. Neutron structure identifies the oxygen species at the active site and confirms specific hydrogen/deuterium atoms to clarify the proton and electron transfer pathways. In addition, we collected neutron diffraction data of the H₂ and D₂-reduced form prepared using a redox indicator, methyl viologen.

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

1. 研究開始当初の背景

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おり、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。一方で、Ni と Fe 間にブリッジされた原子種の直接的な同定には至っていないため、水素原子の直接観察に長けた中性子を用いた構造研究に着手した。

先行研究として実施した基盤研究 C (2016~2019 年度) において、*Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F (DvMF) 由来ヒドロゲナーゼの中性子および X 線結晶構造解析から以下の知見を得た。

【酸化型】

- 八面体型配位錯体構造から欠落した Ni 原子の存在を異常分散効果を考慮した X 線結晶構造解析から明らかにし、新たな酸化型のコンフォメーション (欠落した Ni を中心とした平面四角形構造) を提唱した。
- 2.0 分解能で収集した中性子回折データと同一結晶から取得した X 線回折データを相補的に用いた構造精密化により、Ni と Fe 間にブリッジされた原子種が硫黄ではなく酸素であることを明らかにした。

【還元型】

- 嫌気環境下で大型結晶を均一に凍結する条件を確立した。
- 好気条件下で作製した結晶を水素ガスで活性化する条件としてメチルビオロゲン (MV) を用いた還元が有効であることを確認した。

2. 研究の目的

- 酸化型の中性子結晶構造解析を完了し、Ni-B 構造中の Ni-Fe 間に架橋された酸素原子の状態の解明、および新たなコンフォメーションの詳細構造の決定
- 水素還元型 (3 つの活性状態: Ni-R, Ni-S1a, Ni-C) の中性子結晶構造解析を実施し、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^+) 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 1.0 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

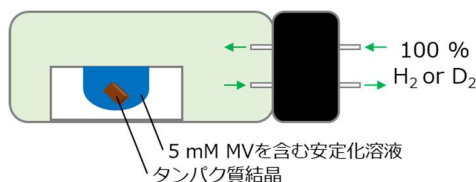
(1) 酸化型の中性子結晶構造解析

先行研究から Ni-B と Ni が欠落した新たなコンフォメーションの存在比を 7:3 と見積もった。この情報に基づいて、2.0 分解能の中性子回折データと同一結晶から取得した 1.04 分解能の X 線回折データを相補的に用いた構造精密化をプログラム PHENIX を用いて実施した。

(2) 還元型の中性子および X 線結晶構造解析

メチルビオロゲンをを用いた水素還元の効果を異なる反応時間 (3 時間および 21 時間) で検討し、X 線結晶構造解析により評価した。メチルビオロゲンの濃度は 5mM で統一し、100% 水素ガスを反応容器 (図 1) に流入した。反応容器を嫌気下に戻したのちに、先行研究で確立した凍結条件により低温下に大型結晶を移行した。中性子回折実験用には H (負の散乱長) / D (正の散乱長) のコントラストを活かした解析のため、水素ガスおよび重水素ガスで還元した結晶をそれぞれ用意した。X 線回折データ収集は SPring-8 の BL26B1 で、中性子回折データ収集は酸化型と同様に J-PARC/MLF の BL03 (iBIX) で実施し、プログラム STARGazer で処理した。

図 1. 水素 (重水素) ガスによる還元の様式図



4. 研究成果

(1) 酸化型の中性子結晶構造解析

精密化は結晶学的 R 値 20.6%で完了した。水和水や補因子を含む総原子数（17350）の半数を超える 9469 個の水素もしくは重水素原子をアサインすることができた（図 2A）。

Ni-B 構造の Ni-Fe 間に架橋された酸素原子種については、X線結晶構造解析から得られた電子密度が明瞭に酸素原子の存在を示した一方で、中性子結晶構造解析から得られた原子核散乱長密度分布（核密度）は水素/重水素原子のみならず酸素原子の存在を示さなかった（図 2B）。この結果は「架橋した酸素原子は水酸化物イオン (OH^-) として存在し、固定された酸素原子を基に複数のコンフォメーションを形成している」状態を示していると考えられた。上述のように負の散乱長を持つ水素原子は正の散乱長を持つ酸素原子との間で、核密度が相殺される傾向がある。この傾向はコンフォメーションが複数あると亢進されるため、水酸化物イオン由来の核密度が消失したと思われる。水酸化物イオンの存在は量子化学計算による検証からも支持されており、 OD^- に置き換わらず OH^- のまま存在しているという結果はラベル化した水分子を用いた交換反応の実験結果とも合致した。Ni-B 構造における Ni イオンの配位子であるラージサブユニットのシステイン残基 (C546^L) と水素結合距離にあるグルタミン残基 (E34^L) 間、さらに E34^L は近接しているスモールサブユニットのスレオニン残基 (T18^S) 間においても水素（重水素）原子の存在は観察されなかった（図 2C）。T18^S はプロトンの輸送経路の分岐点となるグルタミン酸 (E16^S) と水素結合を形成していたが、活性中心から T18^S までの経路は水素結合が存在しないことが明らかになった。

E16^S からのプロトン輸送経路はこれまでに 3 つの経路が提唱されている（図 3A）。3 つの経路のうち、Path2 において特徴的な核密度が観察された。いずれも解離状態で存在する 2 つのグルタミン酸 (E16^S と E46^S) の側鎖間にヒドロニウムイオン (D_3O^+) が確認され（図 3B）、E46^S 側鎖と分子表面近傍に位置するチロシン残基 (Y44^S) 側鎖の間には短距離水素結合が形成されていた（図 3C）。

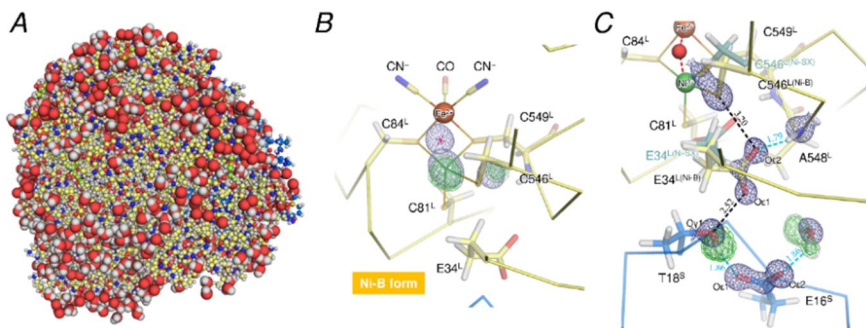


図 2. *DWMF* ヒドロゲナーゼの中性子構造。A: 全体構造。白丸が水素および重水素原子を示す。B: 活性中心 (Ni-B 構造) C: 活性中心近傍。青の網目は電子密度 (+2 で表示した $2F_0 - F_c$ マップ)、緑の網目は核密度 (+3.2 で表示した $F_0 - F_c$ H/D オミットマップ) を示す。図 3, 4 も同様。

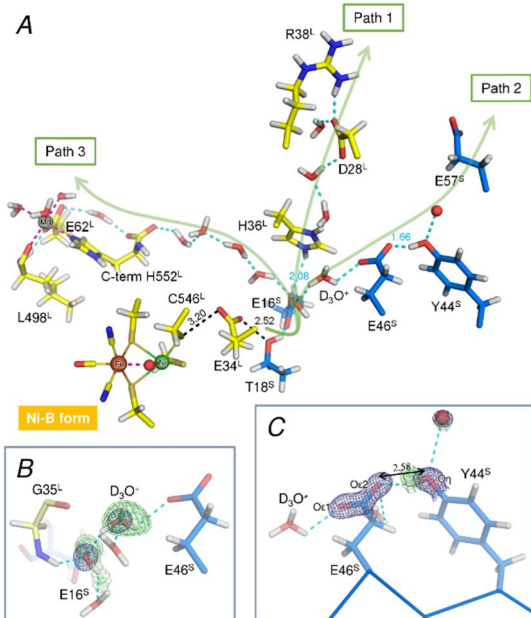


図 3. プロトン輸送経路。A: 提唱されている 3 つの経路。B, C: Path2 経路において確認された特徴的な核密度。

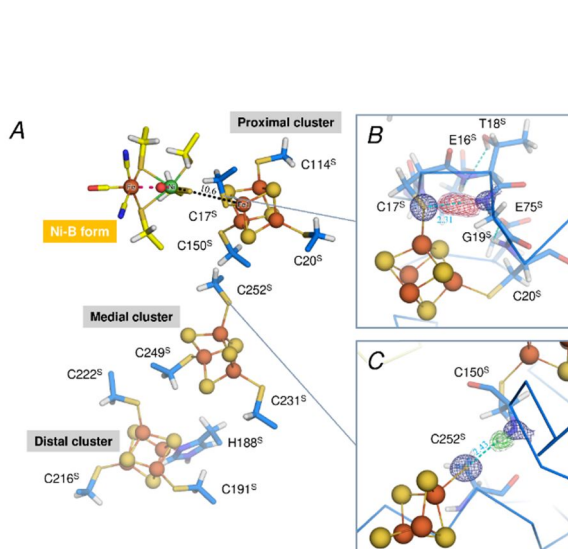


図 4. 電子伝達経路。A: 3 つの鉄硫黄クラスター。B: proximal クラスター、C: medial クラスターの配位に関わるシステイン残基の水素結合。赤の網目は核密度 (-3.2 で表示した $F_0 - F_c$ H/D オミットマップ) を示す。

NiFe ヒドロゲナーゼは電子伝達経路として3つの鉄硫黄クラスターを有している(図4A)。このうち活性中心に最も近い proximal クラスターの配位子であるシステイン残基(C17^S)と近傍のグリシン残基(G19^S)のアミド基間の水素結合は他のクラスターにおける同様の水素結合とは有意に異なっており、ドナーとアクセプター間に非局在的に水素原子(重水素置換されていない)を含んでいた(図4B,C)。配位しているシステイン残基が酸化還元電位に影響を与えることは鉄硫黄クラスターで広く知られていることから、この特徴的な水素結合が電子伝達の制御に影響している可能性が示唆された。

(2) 還元型の中性子およびX線結晶構造解析

メチルピオロゲンをを用いた水素還元の効果をもX線結晶構造解析により評価した結果を図5に示す。Ni-B 構造をモデルとした酸化型のオミットマップ(左)が先行研究で見出した新たなコンフォメーション由来の電子密度に相当する。嫌気環境下(98% N₂, 2% H₂)で結晶を還元した還元型において同様にオミットマップ(左から2番目)を確認したところ、余剰電子密度が残っていた。この結果は、酸化型の新たなコンフォメーションの不活性度はNi-B よりも高く、触媒サイクルに至るまでの障壁が高いことを意味する。今回、3-(2)に記載した方法で水素還元を進めた結果、3時間後(右から2番目)、21時間後(右)のいずれにおいても、余剰密度は有意に減少しており、両者に大きな違いは見られなかったため、メチルピオロゲン処理は比較的短時間で問題ないと思われた。

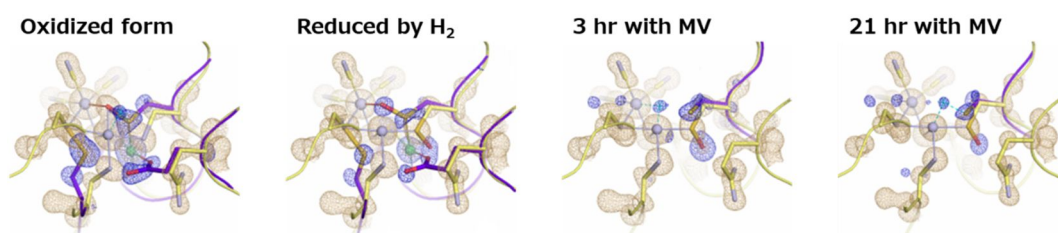


図5.水素還元の評価。活性中心の構造と電子密度。左から、酸化状態・嫌気環境下での還元・メチルピオロゲンをを用いた水素ガス還元(3時間および21時間)状態、の順。橙色が+2 で表示した $2F_o-F_c$ マップ、青がNi-B 構造でオミットした F_o-F_c マップ。

メチルピオロゲン処理により水素還元した大型結晶を用いて中性子回折データを収集した。3-(2)に記載した通り、H/D のコントラストによるプロトン輸送経路の同定を目指して、還元には水素ガスと重水素ガスの双方を用いた。統計値を表1に示す。いずれも2.0 Å分解能で統計処理を行ったが、水素還元の水素還元データについてはデータの完全性、重水素還元の水素還元データについては統計精度(R_{merge})に問題が残った。回折点そのものは良好であったため、処理法に問題があると考えている。プログラム STARGazer を利用する際の細かい条件設定等で最適化する必要があると思われる。

表1. 還元型の回折データ統計値

| | H ₂ -reduced | D ₂ -reduced |
|--------------------|--------------------------|-------------------------|
| | iBIX at MLF/J-PARC | iBIX at MLF/J-PARC |
| Beam source | 3.0-5.8 | 3.2-4.89 |
| Wavelength (Å) | 20.77-2.0 (2.11-2.00) | 16.7-2.0 (2.11-2.00) |
| Resolution (Å) | 43,518 | 56,080 |
| Unique reflections | 22.1 (49.9) | 28.3 (73.6) |
| R_{merge} (%) | 7.0 (2.0) | 7.1 (2.0) |
| $I/\sigma(I)$ | 76.6 (47.8) | 98.3 (98.1) |
| Completeness (%) | 4.4 (2.7) | 4.8 (3.0) |
| Redundancy | | |

(3) まとめ

酸化型については、Ni-B 構造と新たなコンフォメーションに基づいて、中性子の構造精密化を完了した。その結果、Ni-Fe 間に架橋した酸素原子種を同定するとともに、プロトン輸送および電子伝達経路における特徴的な水素(重水素)の振る舞いを直接観察できた。この結果は原著論文として投稿準備中である。還元型については、メチルピオロゲン処理条件を評価し、その結果に基づいて作製した大型結晶を用いて水素および重水素還元状態の中性子回折データを収集した。

プロトン輸送および電子伝達経路については、今回の酸化型の中性子結晶構造解析のみで断定的な結論を導くことは難しく、H/D コントラスト解析も含めた還元型の中性子結晶構造解析の結果との比較・検証が必要であろう。そのためにも、統計処理に問題が残っている還元型の中性子回折データ処理の最適化を進め、酸化・還元双方に全原子構造情報に基づいたヒドロゲナーゼの水素の分解・合成反応の全容解明に迫りたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Hiromoto Takeshi, Nishikawa Koji, Inoue Seiya, Matsuura Hiroaki, Hirano Yu, Kurihara Kazuo, Kusaka Katsuhiko, Cuneo Matthew, Coates Leighton, Tamada Taro, Higuchi Yoshiki | 4. 巻 76 |
| 2. 論文標題 Towards cryogenic neutron crystallography on the reduced form of [NiFe]-hydrogenase | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section D Structural Biology | 6. 最初と最後の頁 946 ~ 953 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2059798320011365 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Hiromoto Takeshi, Nishikawa Koji, Tamada Taro, Higuchi Yoshiki | 4. 巻 64 |
| 2. 論文標題 The Challenge of Visualizing the Bridging Hydride at the Active Site and Proton Network of [NiFe]-Hydrogenase by Neutron Crystallography | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Topics in Catalysis | 6. 最初と最後の頁 622 ~ 630 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11244-021-01417-0 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 廣本武史、西川幸志、樋口芳樹、玉田太郎 |
| 2. 発表標題 中性子回折によるヒドロゲナーゼを構成する全原子の可視化 |
| 3. 学会等名 量子生命科学会第3回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 玉田太郎、廣本武史、西川幸志、平野優、日下勝弘、Leighton Coates、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結晶構造解析 |
| 3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 玉田太郎 |
| 2. 発表標題 中性子結晶解析でかなうウェットとドライの融合 |
| 3. 学会等名 C B I 研究機構 量子構造生命科学研究所 中性子産業利用推進協議会 生物・生体材料研究会 合同シンポジウム (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 T. Tamada, T. Hiromoto, K. Nishikawa, Y. Hirano, K. Kusaka, L. Coates, Y. Higuchi |
| 2. 発表標題 Neutron diffraction studies of [NiFe]-hydrogenase from <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Miyazaki F |
| 3. 学会等名 The 20th Annual Meeting of the Protein Science Society of Japan |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 廣本武史、西川幸志、樋口芳樹、玉田太郎 |
| 2. 発表標題 中性子回折によるヒドロゲナーゼの立体構造解析 |
| 3. 学会等名 量子生命科学会第2回大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 玉田太郎 |
| 2. 発表標題 量子構造生物学への展望と1MWへの期待 |
| 3. 学会等名 高エネルギー加速器研究機構1MWワークショップ (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 玉田太郎 |
| 2. 発表標題 中性子回折を用いた構造解析の展望 |
| 3. 学会等名 2020年度中性子構造生物学研究会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021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 H ₂ 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 | 廣本 武史 (Hiromoto Takeshi) (80609884) | 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学研究所・主幹研究員 (82502) | |
| 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・量子生命科学研究所・上席研究員 (82502) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 | | |
|---------|-------------|--|--|
| 米国 | オークリッジ国立研究所 | | |