

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03215

研究課題名(和文)[FeFe]ヒドロゲナーゼの構造基盤と反応機構

研究課題名(英文)Structural basis and reaction mechanism of [FeFe] hydrogenases

研究代表者

緒方 英明(Ogata, Hideaki)

兵庫県立大学・理学研究科・教授

研究者番号：30795935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：電子伝達分岐型とセンサー型[FeFe]ヒドロゲナーゼを化学合成した2核鉄錯体を用いることで人工的に成熟化させた。センサー型[FeFe]ヒドロゲナーゼの活性中心近傍のプロトン輸送経路と予想されるアミノ酸に対して変異体を導入し水素酸化活性を測定し、ある変異体で水素酸化活性がほとんど消失していることを明らかにした。第2配位圏の違いにより活性中心の鉄硫黄クラスターの酸化還元電位が変化した。さらに、電子伝達分岐型[FeFe]ヒドロゲナーゼのクライオ電子顕微鏡法による構造解析を行った。その結果、3つのサブユニットで構成される[FeFe]ヒドロゲナーゼが4量体を構成していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

電子伝達分岐型[FeFe]ヒドロゲナーゼのクライオ電子顕微鏡法による構造解析から3つのサブユニットで構成される4量体を構成していることが明らかとなった。複雑な電子伝達経路を持っており、FMNが結合している領域で電子伝達分岐が分岐する可能性が示された。また、センサー型[FeFe]ヒドロゲナーゼでは、第2配位圏の違いにより活性中心の鉄硫黄クラスターの酸化還元電位の変化が顕著に見られた。これらの結果から、金属中心近傍の構造が機能に重要であることが示唆された。本研究で明らかとなった知見は水素発生系ヒドロゲナーゼを模した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) from thermophilic bacteria have successfully been matured with the chemically synthesized di-iron complexes. We mutated the amino acid residues in vicinity of the active site of the sensory [FeFe] hydrogenase. One of the variants showed significantly less activity compared to the wild type hydrogenase enzyme. It suggested that the electronic structure of the active site [4Fe-4S] sub-cluster could be changed. The cryo-electron microscopic structure of the electron-bifurcating [FeFe] hydrogenase showed the tetramer of the promoters which consists of three subunits.

研究分野：生物物理学

キーワード：金属酵素 ヒドロゲナーゼ 水素 クライオ電子顕微鏡 構造解析 赤外分光法

### 1. 研究開始当初の背景

[FeFe]ヒドロゲナーゼは多くの嫌気性微生物が持つ酵素で、水素分子の合成を可逆的に触媒する。その水素触媒能力は希少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。[FeFe]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。そのため、この酵素をモデルにした人工触媒や燃料電池の開発などの応用も含め、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)の最初の立体構造は1998年に報告され(Peters et al., Science 1998)、Hクラスターと呼ばれる二核鉄錯体と[4Fe-4S]クラスターから構成される特異な構造を持つ活性中心が明らかとなった。そのほかに、タンパク分子のほぼ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ことが構造から明らかとなった。本課題の対象とする電子伝達分岐型やセンサー型[FeFe]ヒドロゲナーゼは、これまでに立体構造や詳細な反応機構は分かっていなかった。

### 2. 研究の目的

本課題では、次の2つの[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。この[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)から電子を受け取りH<sub>2</sub>を発生させる。こ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、分光学的手法や立体構造解析により明らかにすることを目的とする。

(2)センサー型[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。さらに、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の結果と統合することによって、分子レベルでの反応機構の総合的理解を目指す。

### 3. 研究の方法

超好熱菌由来の[FeFe]ヒドロゲナーゼ遺伝子(電子伝達分岐型TmHydABCとセンサー型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。大腸菌で発現誘導した[FeFe]ヒドロゲナーゼのアポ型をStrepアフィニティークロマトグラフィーで精製し、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メチルピオロゲンを使い、時間変化UV-vis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、酸化型や還元型などの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クライオ電顕により立体構造を求める。

### 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とセンサー型HydSの遺伝子を含むプラスミドをそれぞれ導入した大腸菌(*E. coli* BL21<sup>AiscR</sup>)をLBまたはTB培地で培養した。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結果、誘導発現したアポ[FeFe]ヒドロゲナーゼが安定に発現・存在することができた。集菌は嫌気グローブボックス内で行い凍結保存した。菌体は嫌気グローブボックス内で超音波破碎機を用いて破碎した。アポ酵素の精製はStrep-Tactinアフィニティークラムと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、高純度の精製標本(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。

#### (2) 電子伝達分岐型[FeFe]ヒドロゲナーゼの構造解析

アポ電子伝達分岐型[FeFe]ヒドロゲナーゼの立体構造をクライオ電子顕微鏡法を用いて決定した(図1)。全体構造は $\alpha$ サブユニット、 $\beta$ サブユニット、 $\gamma$ サブユニットで構成されるプロトマーが4つ存在する4量体であった。中心部分に $\alpha$ サブユニットが集まって複合体を構成していた。電子伝達系路を構成する鉄硫黄クラスターが各サブユニット上で同定できた。アポ酵素の構造では活性中心Hクラスターの二核鉄錯体サブクラスターが無いため、[4Fe-4S]サブクラスターのみが同定できた。 $\alpha$ サブユニットには[4Fe-4S]クラスターが4つ、[2Fe-2S]クラスターが2つ、 $\beta$ サブユニットには[4Fe-4S]クラスターが3つ、[2Fe-2S]クラスターが1つ、さらに $\gamma$ サブユニットには[2Fe-2S]クラスターが1つ存在していた。各鉄硫黄クラスター間の距離は約8-13Åで電子伝達を効果的に行うことができる距離であった。 $\beta$ サブユニットにはFMNが一つ結合していることが明らかとなった。

D2 対称を用いてさらに詳細に構造を検討したところ、フェレドキシン様ドメインがβサブユニットに存在し、[4Fe-4S]クラスターを見出した。また、このフェレドキシンドメインは2つのコンフォメーションを持つことが明らかとなり、さらにはこのクラスター付近にZnイオンが結合していた。このZnイオンはフェレドキシンドメインの動きに必要なヒンジの役割を持つと推定された。

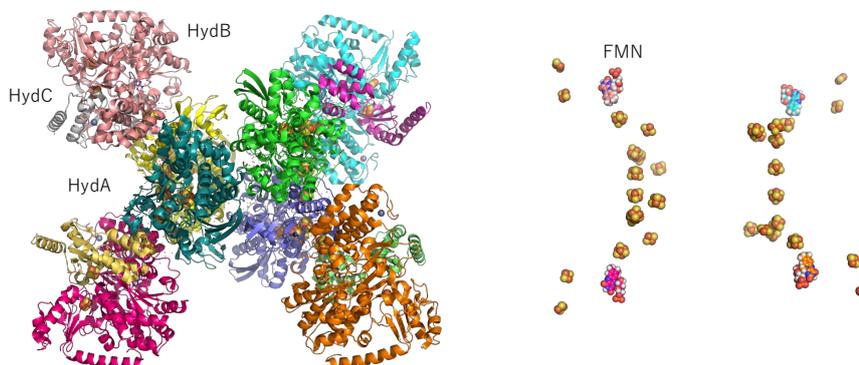


図1. クライオ電子顕微鏡法で明らかとなった電子伝達分岐型[FeFe]ヒドロゲナーゼの立体構造。プロトマーはHydA、HydB、HydCで構成され、4量体構造である。右図は、金属中心やFMNの配置を球で表したもの。鉄硫黄クラスターが左2つのプロトマー内または右2つのプロトマー内でそれぞれ電子伝達可能な位置に配置されている (PDB 7P5H)。

### (3) センサー型[FeFe]ヒドロゲナーゼ変異体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 (CaF<sub>2</sub>) 間に金メッシュと電極を挿入し、精製標品に対して外部からポテンシャルを変化させることで、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活性中心Hクラスター内のFe-COとFe-CNの振動状態を調べた。IRピークの波数変化の電位依存性を調べることによって、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、変異体ではIRピークの位置はほとんど変化していないことが明らかとなった。しかし、S267M変異体では、ブリッジしているCOのピークがわずかに変化していた。

### (4) センサー型[FeFe]ヒドロゲナーゼ変異体の活性測定

電子伝達体メチルビオローゲンを用いたセンサー型[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以前の研究で明らかとなっていた。本研究では、変異体 (A131C, G177M, Y223F, S267M) を作成し、それぞれの水素酸化還元活性を測定した (図2)。

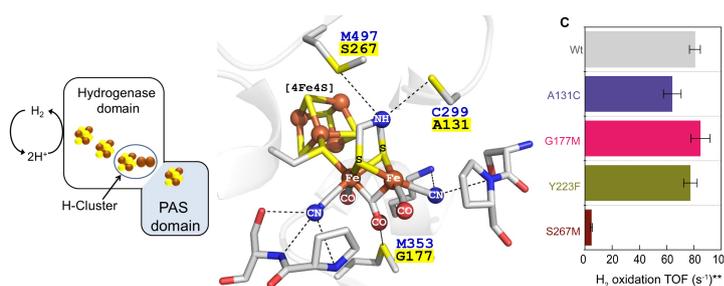


図2. (左) センサー型[FeFe]ヒドロゲナーゼの模式図。(中央) 活性中心Hクラスターと周辺のアミノ酸の構造。アミノ酸の上番号は標準型のものを示し、下番号はセンサー型のアミノ酸を表す。(右図) 変異体の活性測定結果。S267Mで顕著に活性が低くなることが示された。

### (5) センサー型[FeFe]ヒドロゲナーゼの電気化学的分光解析

センサー型[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とるが、本研究で変異体を用いた解析の結果、Hクラスターの2Feサブクラスターよりも[4Fe-4S]サブクラスターの電子状態が変化していることが示唆された。これらは周辺のアミノ酸の影響により変化したと考えられ、変異体では活性中心近傍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。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Chongdar Nipa, Rodriguez-Macia Patricia, Reijerse Edward J., Lubitz Wolfgang, Ogata Hideaki, Birrell James A.	4. 巻 14
2. 論文標題 Redox tuning of the H-cluster by second coordination sphere amino acids in the sensory [FeFe] hydrogenase from <i>Thermotoga maritima</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 3682 ~ 3692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2sc06432d	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 該当する
1. 著者名 Furlan Chris, Chongdar Nipa, Gupta Pooja, Lubitz Wolfgang, Ogata Hideaki, Blaza James N, Birrell James A	4. 巻 11
2. 論文標題 Structural insight on the mechanism of an electron-bifurcating [FeFe] hydrogenase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/elife.79361	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 該当する
1. 著者名 Stripp Sven T., Duffus Benjamin R., Fourmond Vincent, Leger Christophe, Leimkuhler Silke, Hirota Shun, Hu Yilin, Jasniewski Andrew, Ogata Hideaki, Ribbe Markus W.	4. 巻 122
2. 論文標題 Second and Outer Coordination Sphere Effects in Nitrogenase, Hydrogenase, Formate Dehydrogenase, and CO Dehydrogenase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Reviews	6. 最初と最後の頁 11900 ~ 11973
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrev.1c00914	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 Imanishi Takahiro, Nishikawa Koji, Taketa Midori, Higuchi Katsuhiro, Tai Hulin, Hirota Shun, Hojo Hironobu, Kawakami Toru, Hataguchi Kiriko, Matsumoto Kayoko, Ogata Hideaki, Higuchi Yoshiki	4. 巻 78
2. 論文標題 Structural and spectroscopic characterization of CO inhibition of [NiFe]-hydrogenase from <i>Citrobacter</i> sp. S-77	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications	6. 最初と最後の頁 66 ~ 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2053230X22000188	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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 C. Furian, N. Chongdar, P. Gupta, W. Lubitz, H. Ogata, J. N. Blaza, J. A. Birrell
2. 発表標題 Structure of an electron-bifurcating [FeFe] hydrogenase
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 C. Furian, N. Chongdar, P. Gupta, W. Lubitz, H. Ogata, J. N. Blaza, J. A. Birrell
2. 発表標題 Structural insight on the mechanism of an electron-bifurcating [FeFe] hydrogenase from <i>Thermotoga maritima</i>
3. 学会等名 EBEC2022, the 21st European Bioenergetics Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 K. Nishikawa, Y. Nakagawa, S. Inoue, T. Chuji, H. Ogata, S. Nakashima, Y. Shigeta, K. Fukutani, Y. Higuchi
2. 発表標題 New Assay System for the Enzymatic Reaction with Gaseous Substrates by Using Raman Spectroscopy
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西川幸志, 中川由佳, 井上翔太, 中地隆文, 中島聡, 緒方英明, 重田育照, 福谷克之, 樋口芳樹
2. 発表標題 Raman分光法を用いたガス状分子を基質とする酵素反応の新規活性測定法
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 緒方英明
2. 発表標題 水素酸化還元酵素の反応機構の解明
3. 学会等名 第42回STクラブ（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 緒方英明
2. 発表標題 タンパク質によって水素分子が分解される様子を構造解析で捉える
3. 学会等名 兵庫県立大学バイオダイナミクスセンターセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中宏幸, 緒方英明
2. 発表標題 水素センサータンパク質の異種発現と精製法
3. 学会等名 兵庫県立大学播磨理学キャンパス 技術・人材マッチング交流会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 緒方英明, C. Furlan, N. Chongdar, P. Gupta, W. Lubitz, J. Blaza, J. Birrell
2. 発表標題 [FeFe]ヒドロゲナーゼの電子伝達経路の構造学的研究
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 N. Chongdar, J. A. Birrell, E. Reijerse, W. Lubitz, H. Ogata
2. 発表標題 センサー型[FeFe]ヒドロゲナーゼの変異体による水素酸化還元反応
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 N. A. Binti Azmi, T. Mashima, H. Ogata, H. Komori, T. Ando, M. Yamanaka, S. Hirota
2. 発表標題 Construction and structural characterization of a unique dimer of ferredoxin from <i>Thermotoga maritima</i>
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大西遥喜, 藤原綱大, 真島剛史, 小林直也, 山中優, 緒方英明, 廣田俊
2. 発表標題 ヘリックスで連結した3ユニット環状ヘムタンパク質の設計と構築
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 緒方英明
2. 発表標題 金属酵素の結晶構造化学的研究
3. 学会等名 日本結晶学会令和 2 年(2020 年)度年会および会員総会 70 周年記念大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 N. Chongdar, K. Pawlak, O. Rudiger, E. J. Reijerse, P. Rodriguez-Marcia, W. Lubitz, J. A. Birrell, H. Ogata
2. 発表標題 Spectroelectrochemical FTIR studies of an electron-bifurcating [FeFe] hydrogenase
3. 学会等名 第 58 回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Hideaki Ogata, Wolfgang Lubitz	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 8
3. 書名 Encyclopedia of Biological Chemistry 3rd Edition	

1. 著者名 緒方英明、樋口芳樹（城宜嗣，津本浩平編）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 株式会社エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 7
3. 書名 生命金属ダイナミクス	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------

ドイツ	マックスプランク研究所			
英国	ヨーク大学	オックスフォード大学	エセックス大学	
インド	CSIR海洋学国立研究所			