

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770111

研究課題名（和文）

膜内在性[NiFe]ヒドロゲナーゼのX線結晶構造解析

研究課題名（英文）

X-ray structural study of the membrane-bound [NiFe]-hydrogenase

研究代表者

庄村 康人（SHOMURA YASUHITO）

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教

研究者番号：50423900

研究成果の概要（和文）：水素分子の分解と合成を触媒する金属タンパク質であるヒドロゲナーゼには構造や性質の異なる様々な種類のものが存在する。本研究では酸素存在下で活性を示す膜結合型[NiFe]ヒドロゲナーゼの高分解能 X 線結晶構造解析を行い、本酵素がこれまでに生体内では報告例が無い特徴的な鉄硫黄クラスターをもつことを見出した。さらに、この鉄硫黄クラスターが示す酸化還元電位依存的な構造変化と本酵素がもつ酸素耐性との関係を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Hydrogenases play key roles in hydrogen metabolism by catalyzing synthesis and decomposition of molecular hydrogen. While most of the hydrogenases exhibit no activity in the presence of O<sub>2</sub>, the membrane-bound [NiFe]-hydrogenase is known to be O<sub>2</sub>-tolerant, of which mechanism had been poorly understood. In this study, X-ray crystal structures of the membrane-bound [NiFe]-hydrogenase have been determined for three different redox states at resolutions of 1.2-1.4 Å. One of the Fe-S clusters showed an unprecedented structure and its redox dependent conformational changes, to which the O<sub>2</sub>-tolerant property of this hydrogenase should be ascribable.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：構造生物化学

キーワード：水素代謝；金属タンパク質；ヒドロゲナーゼ；X線結晶構造解析；膜タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

[NiFe]ヒドロゲナーゼは原核生物の水素代謝において中心的な役割を担っており、主に、エネルギー獲得のための水素分子の分解およびプロトン濃度差の制御を目的とした細胞質内での水素分子の合成に関与してい

る。この酵素は、最も小さな分子である水素の分解を可逆的に触媒する活性を持っており、その興味深い化学反応はこれまでに様々な手法による研究対象とされてきた。現在でも活性中心に注目した分光学的・構造学的手法による研究が精力的に続けられているが、

その反応機構の解明には至っていない。) 水素分子の合成と分解は、実際の生体内では異なる種類のヒドロゲナーゼが担っている。これらの反応性の違いは活性中心の構造の違いのみではなく、細胞内での局在場所や、会合する(している)電子伝達体の酸化還元電位によっても特徴付けられることが予想されるため、詳細な反応機構や生体内での作用機序を理解するためには、生物学的機能単位での構造情報が不可欠である。また、[NiFe]ヒドロゲナーゼに関しては、これまでは酸素に対して高い感受性を示す硫酸還元菌由来のものが「標準型」ヒドロゲナーゼであるとして研究が進められてきた。しかしながら、実際にはほとんどの原核生物が[NiFe]ヒドロゲナーゼを持っており、反応機構や立体構造に関して、必ずしも硫酸還元菌由来のものがスタンダードではないことが最近明らかになりつつある。これまでに結晶構造が報告されている[NiFe]ヒドロゲナーゼは、何れも硫酸還元菌由来のもので、しかも、4つのグループの中のグループIに属する水素分子分解型の可溶性部位(Ni-Feクラスター活性中心を含むLサブユニットと複数の鉄硫黄クラスターを含む電子伝達ユニットであるSサブユニットのヘテロ2量体)のみであった。従って、硫酸還元菌由来のものとは異なった生化学的・分光学的特徴を持つ[NiFe]ヒドロゲナーゼや、生物学的機能単位全体のX線結晶構造解析は、本酵素の詳細且つ生体内での機能を反映した反応機構の解明に向けての重要な基盤となることが期待されていた。

## 2. 研究の目的

ヒドロゲナーゼは一般的に酸素との相性が悪く、酸素分子との反応により可逆的に不活性な状態になるか金属クラスターが分解されて失活するものが多いが、活性部位にニッケル・鉄原子を含む[NiFe]ヒドロゲナーゼにおいては酸素存在下でも活性を示すものが複数種知られている。これらの酵素がもつ酸素耐性(ここでの「耐性」は酸素存在下でも機能することを意味し、単に不可逆的な阻害を免れるものとは一線を画す)の機構については、幾つかのモデルが提唱されているものの、どれも議論の余地が多く残されている。

研究代表者のグループは、このうち、膜結合型と呼ばれる酸素耐性の最も高いとされる酵素の酸素耐性機構の解明を目指した。

一方、これまでに単離・精製の報告例がほとんど無い、膜内在性水素産生型[NiFe]ヒドロゲナーゼについては、その試料調製方法の確立を目的とした。

## 3. 研究の方法

最初に、水素酸化細菌に由来する膜結合型酵素の可溶性部位の試料調製法の検討が共同研究者らによって行われた。菌体は目的酵素の収量を上げるため、水素80%、酸素15%、二酸化炭素5%雰囲気下で独立栄養的に培養され、不純物を含んだ状態での酸素による不可逆的な失活を防ぐため、酵素は嫌気条件下で単離・精製された。研究代表者はその後の膜結合型酵素結晶の調製、X線回折データ測定、および結晶構造解析を行なった。結晶の調整について条件検討を試みた結果、放射光施設におけるX線回折実験で分解能1.1Åの回折点が得られ、酸化状態やpHなどの異なる約30の条件で回折データを取得し、構造決定およびモデルの精密化を行なった。

また、水素合成型膜内在性ヒドロゲナーゼについては、比較的安定で、まとまった量の試料調製が期待できる偏性嫌気性高度好熱菌由来の酵素を対象とした。大量培養は学内施設にある大量培養装置で嫌气的に行なった。目的タンパク質の検出は、水素ガスとメチルビオローゲンを用いたヒドロゲナーゼ活性測定と、抗ペプチドポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングによって行なった。好気条件下における目的タンパク質の取扱いは不可逆的な不活性化に繋がる可能性があるため、必要に応じて精製・結晶化はグローブボックス内で行なった。最初の可溶化条件、用いるバッファーやクロマトグラフィーの種類の検討を進め、SDS-PAGEで90%以上の純度となるような試料の調製を目指した。

## 4. 研究成果

結晶中で膜結合型酵素は、基本単位が2つ会合した状態で存在していた。分子間の接触面積やクラスターの配向などを考慮すると、

この構造は本酵素の生体内での状態を反映していると考えられる。基本単位の全体構造や、反応を触媒する Ni-Fe 活性部位の構造、電子伝達を担う3つの Fe-S クラスターの配置などは、これまでによく研究されてきた酸素耐性をもたない標準型とほとんど同じであることが分かった。しかし、電子伝達を担う3つの Fe-S クラスターのうち、最も Ni-Fe 活性部位に近いものが、これまでに知られていた [4Fe-4S]-4Cys タイプではなく、[4Fe-3S]-6Cys タイプであり、本酵素が新規のクラスターを有することが見出された。このクラスターでは、通常の[4Fe-4S]部分の1つの S が失われ、その代わりに2つのシステインが加わって、合計6つのシステイン残基により[4Fe-3S]クラスターがタンパク質中に支えられていた。

さらに、膜結合型酵素の結晶をフェリシアン化カリウムで酸化することによって、この[4Fe-3S]-6Cys クラスターの構造が変化することが分かった。この時、クラスターの1つの Fe 原子が動き、Fe-S 結合が1つ切れ、その代わりに、Fe 原子はタンパク質中のペプチド主鎖の脱プロトンした窒素原子と新たな結合を形成していた。脱プロトン化にともなう電荷の変化は、鉄の酸化状態に大きな影響を与えると考えられる。これまでに、同クラスターには3つの酸化還元状態があることが分光学的研究により示唆されていたが、Fe-S クラスターとしては異常なこの性質は、本研究で明らかになった構造変化により説明づけることができた。

今回同定された[4Fe-3S]-6Cys クラスターは、本酵素が水素の分解を触媒している間は、標準型の[4Fe-4S]-4Cys クラスターと同様に2つの酸化還元状態を行き来して電子の流れを制御していると考えられる。しかし、酸素分子が Ni-Fe 活性部位に結合した場合、[4Fe-3S]-6Cys タイプのクラスターは上述の構造変化によって、Ni-Fe 活性部位に2つの電子を渡すことが可能となり、これらは活性部位に残された電子および別の鉄硫黄クラスターからの電子とともに、Ni-Fe 活性部位に結合した酸素分子をヒドロキソ配位子にまで分解するのに用いられると考えられる。また、ペプチド主鎖から解離したプロトンは、

水素結合ネットワークを介して Ni-Fe 活性部位へ運ばれ、電子と同様にこの酸素分子との反応に用いられる可能性が高い。Ni-Fe 活性部位の構造や、ガスチャネル（本来は水素分子のために存在するが、一部の例外を除いて酸素分子も透過する）の位置やサイズは標準型と膜結合型に大きな違いは見られなかったことから、膜結合型の酸素耐性は、この新規クラスターに由来すると結論づけた。

酸素耐性をもつヒドロゲナーゼは酸素分子を物理的に排除しているというこれまでのモデルに対して、膜結合型では活性部位に結合した酸素分子をヒドロキソ配位子にまで分解することによって安定な不活性状態への変換を防ぐというモデルが提唱され、候補者らが行なった X 線結晶構造解析によりその妥当性が評価された。他の金属タンパク質においても Fe-S クラスターが酸化還元依存的に構造変化を起こす例は知られているが、機能上どのような意味をもつかについてはほとんど明らかにされていない。その中で、本来電子伝達のみを行なっていると考えられていた Fe-S クラスターが、活性部位の状態を感知して電子やプロトンを供給することにより、不活性な状態への変換を防ぐというモデルを立体構造の決定により証明した本研究結果は、これまでに例のない画期的なものである。

また、膜内在性水素合成ヒドロゲナーゼについては、目的酵素を産生させるために偏性嫌気性高度好熱菌の培養条件の検討を行った。本酵素の生体内での役割を考慮して、水素分子合成がより促進されるような生育条件の検討を進めた結果、効率的な目的タンパク質の発現を確認できた。得られた菌体を用いて精製条件の検討を行ったところ、比較的高純度の精製標品が得られるようになった。精製タンパク質の量と純度は結晶構造解析を進める上で重要な要素であるが、結晶化に供する試料の調製方法の確立に向けて大きな前進が見られた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕（計 3 件）

1. Shomura, Y., Hinokuchi, E., Ikeda, H., Senoo, A., Takahashi, Y., Saito, J., Komori, H., Shibata, N., Yonetani, Y., Higuchi, Y. Structural and enzymatic characterization of BacD, an l-amino acid dipeptide ligase from *Bacillus subtilis*. *Protein Sci.*, **21** (5), 707-716., 2012

2. Shomura, Y., Yoon, K-S., Nishihara, H. and Higuchi, Y. Structural basis for [4Fe-3S] cluster in the O<sub>2</sub>-tolerant membrane-bound [NiFe] hydrogenase. *Nature*, **479** (7372), 253-256, Oct., 2011.

3. Shomura, Y., Hagiya, K., Yoon, K.S., Nishihara, H., Higuchi, Y. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of membrane-bound respiratory [NiFe] hydrogenase from *Hydrogenovibrio marinus*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **67** (Pt 7), 827-829, Jul., 2011.

〔学会発表〕（計 4 件）

1. Yasuhito Shomura and Yoshiki Higuchi Structural Basis for the Reaction Mechanism of Dissimilatory Sulfite Reductase  
学術創成シンポジウム International symposium on chemistry of reductases（口頭）名古屋大学（2011/1/20）

2. Yasuhito Shomura, Ki-Seok Yoon, Hirofumi Nishihara, Yoshiki Higuchi 酸素耐性 [NiFe] ヒドロゲナーゼの構造化学的研究 (Structural study of the O<sub>2</sub>-tolerant [NiFe] hydrogenase)  
日本生物物理学会年会（口頭）兵庫県立大学（2011/9/17）

3. 庄村康人・尹基石・西原宏史・樋口芳樹 X線結晶構造解析による膜結合 [NiFe] ヒドロゲナーゼの酸素耐性機構の解明  
平成 23 年度生物構造学研究会 「蛋白質中の水素・水分子の役割 ～中性子構造生物学

の展望～」（口頭）東海村（2011/12/20）

4. 庄村康人  
酸素耐性 [NiFe] ヒドロゲナーゼの X 線結晶構造解析  
大阪大学蛋白質研究所セミナー「結晶学でみるタンパク質の化学と物理」（口頭）大阪大学（2012/3/7）

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

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

〔その他〕  
なし

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
庄村 康人 (SHOMURA YASUHITO)  
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教  
研究者番号：50423900

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし