

機関番号：24506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657077

研究課題名(和文)中性子結晶解析法によるヒドロゲナーゼの反応機構およびプロトン経路の解明

研究課題名(英文)Reaction Mechanism of [NiFe]-hydrogenase by Neutron Structural Chemistry

研究代表者

樋口 芳樹 (Higuchi, Yoshiki)

兵庫県立大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：90183574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、[NiFe]-ヒドロゲナーゼのNi-Fe活性部位における水素活性化の反応機構を中性子結晶解析法により解明するために、良質の巨大単結晶の調製を目指した。

重水溶液中での[NiFe]-ヒドロゲナーゼの結晶化においては、沈殿剤として2-methyl-2,4-pentanediol(MPD)を用いるが、これが酸化されると4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone(HMPO)が生成されヒドロゲナーゼの結晶性を著しく劣化させることをつきとめた。また、巨大単結晶にダメージを与えることなく、凍結させる条件を見出した。その結果、11mm³の大きさの良質の単結晶の調製に成功した。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study is to elucidate the reaction mechanism of at the active site of [NiFe]-hydrogenase by neutron diffraction study. For this purpose, we have tried to prepare large crystals of hydrogenase in high quality in D₂O.

We have improved the crystallization condition by using 2-methyl-2,4-pentanediol(MPD) as a precipitant in D₂O. We found that MPD is oxidized to be 4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone(HMPO) which causes a serious damage to the quality of the crystals. We have successfully determined the more suitable crystallization condition under anaerobic condition. As a result, we have succeeded in preparation of a crystal with a volume of 11 mm³. In addition, we have found the condition to freeze the large crystals without damage. Unfortunately, the reactor (neutron source) of JAEA in Tokai is still in preparatory period due to a serious disaster in the area of East Japan in 2011, we will try to do neutron diffraction study in the near future.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：ヒドロゲナーゼ X線結晶解析 反応機構 Ni酵素 燃料電池

1. 研究開始当初の背景

人類による化石燃料の大量消費は CO₂ レベルの上昇に伴う温暖化現象など地球規模の環境問題を引き起こしてきたとも言われている。水素は化石燃料に変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。水素の分解と合成を触媒する金属酵素で、常温常圧においては、白金等の金属触媒と比較してはるかに高効率の触媒能を有する。従って、本酵素の水素活性化触媒機構を解明は、新規のバイオ触媒の開発に道を拓くと期待できる。これまで申請者は水素分解の構造化学的研究を進めてきた。その結果、活性部位は Ni-Fe ヘテロ 2 核金属錯体で、Ni には 4 つのシステイン側鎖の S が配位し、そのうち 2 つは Fe にも配位しブリッジを形成していることを明らかにした。Fe には非アミノ酸配位子として 3 本の 2 原子分子が配位し、さらに 3 番目の非アミノ酸ブリッジ配位子も見出した。水素分解は上記の特異な配位子構造をもった Ni-Fe 活性部位上で、配位子構造を変化させながら水素の酸化還元反応を触媒する。このように水素分解の構造化学を展開してきたが、基質の水素分子の挙動を X 線結晶解析法で直接観測することはできない。従ってその反応機構の全容解明は、中性子結晶解析法でのみ可能である。2011 年度までの研究で、世界で初めて 5Å 分解能の中性子線回折像の取得に成功していた。

2. 研究の目的

本申請研究では、巨大タンパク質・水素分解酵素の Ni-Fe 活性部位における水素活性化の反応中間体を、中性子結晶解析法により直接観察することを主目的とした。また、水素を分解した後の産物・プロトンのタンパク質中の移動経路の解明も目指した。2011 年までの研究で、分子量 10 万に近い水素分解酵素分子の巨大単結晶を重水中で調製することに成功した。本研究では、これをさらに進展させ、原子分解能での中性子結晶構造解析を遂行する。

3. 研究の方法

重水素化した 2-メチル-2,4-ペンタジオール (MPD) による結晶化相図を完成させ、結晶化条件をさらに詳細にスクリーニングした。また、ポリエチレングリコール (PEG) 等の沈殿剤を用いた新規結晶化条件の探索も進めた。実験試料 (酵素・水素分解酵素) については、これまでに最もよく研究してきた標準タイプの [NiFe] 水素分解酵素に加えて、酸素耐性 [NiFe] 水素分解酵素についても重水溶液中での結晶化スクリーニングを進めた。さらに、結晶中の酵素反応を止めて中間体を得るための「高圧凍結装置」を用いた実験条件を探索した。

4. 研究成果

本研究では、下記の3点について研究を遂行し、成果を得た。

(1) 重水溶液中での [NiFe] 水素分解酵素の結晶化条件の改良。

沈殿剤として利用していた

2-methyl-2,4-pentanediol (MPD) が酸化されると 4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone (HMPO) が生成され、それが水素分解酵素を変性させることなどを見出した。また、HMPO を利用した場合には、結晶化母液の pH が設定値よりも変動することが酵素の結晶化に大きく影響することを確認できた。結晶化を嫌氣的雰囲気で行うことにより、沈殿剤の変性による結晶の劣化を防げることを見出した。これにより、長期の結晶保存方法を確立できた。

(2) 酸素耐性膜結合型 [NiFe] 水素分解酵素の重水緩衝溶液中での結晶化。

水素酸化細菌のもつ酸素耐性水素分解酵素について、重水溶液中での初期スクリーニングを行ったが、現時点では、良質の結晶は得られていない。

(3) 巨大単結晶の凍結条件のスクリーニングおよび結晶還元条件の確立。

これまでの研究では、酵素に CO を結合させることで、活性部位に基質・水素をトラップできることが判明している。この方法で基質の反応水素を活性部位に固定することを目的に、回折実験を 80 K の低温で行う条件検討を引き続き行った。その結果、MPD を結晶化沈殿剤として利用する場合に限って、大きなダメージを与えることなく巨大結晶を凍結できることがわかった。実験室 X 線装置を用いて 1.3 Å 分解能の X 線回折像を得た。今後、中性回折実験を行うための実験条件がほぼ確立できた。

なお、本研究遂行期間には日本原子力研究開発機構の原子炉が稼働されなかったため、中性回折実験を行うことはできなかった。

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 22 件)

T. Yagi and Y. Higuchi, Studies on Hydrogenase, Proc. Jpn. Acad., Ser. B **89**, 査読有, 16-33 (2013) DOI: 10.2183/pjab.89.16

Y. Shomura, Y. Higuchi, Structural aspects of [NiFe]-hydrogenases. Reviews in Inorganic Chemistry, 査読有, **33**, 173-192 (2013). DOI: 10.1515/revic-2013-0005

Y. Shomura, Y. Higuchi, Structural Basis for the Reaction Mechanism of S-carbamoylation of HypE by HypF in the Maturation of [NiFe]-hydrogenases, J. Biol. Chem., 査読有, **287**, (2012). DOI:10.1074/jbc.M112.387134

K. Kihira, Y. Shimizu, Y. Shomura, N. Shibata, M. Kitamura, A. Nakagawa, T. Ueda, K. Ochi, Y. Higuchi, Crystal Structure

Analysis of the Translation Factor RF3 (release factor 3), FEBS Letters, 査読有, **586**, 3705- 3709 (2012). DOI: 10.1016/j.febslet.2012.08.029

H. Osuka, Y. Shomura, H. Komori, N. Shibata, S. Nagao, Y. Higuchi, S. Hirota, Photosensitivity of the Ni-A State of [NiFe] Hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F with Visible Light, Biochem. Biophys. Res. Commun., 査読有, **430**, 284-288 (2012). DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.10.136.

庄村康人, 樋口芳樹, 膜結合型ヒドロゲナーゼの酸素耐性機構の解明, 生物物理, **53-2**, 82-85 (2013), ISSN 0582-4052

Y. Shomura and Y. Higuchi, Crystal structure of O₂-tolerant [NiFe] hydrogenase reveals the mechanism of O₂-tolerance attributable to a redox-dependent conformational change of [4Fe-3S] cluster, SPring-8 Research Frontier 2011, 5-6 (2012), http://www.spring8.or.jp/ja/news_publications/publications/research_frontiers/html/rf11

樋口芳樹, 庄村康人, [4Fe-3S] クラスタによる [NiFe] ヒドロゲナーゼの酸素耐性機構の構造基盤, SPring-8利用者情報誌 Vol.17 No.2, 105-110 (2012), <http://user.spring8.or.jp/sp8info/>.

庄村康人, 樋口芳樹, 酸素耐性ヒドロゲナーゼの構造化学的研究 - 酵素分子に見出された活性保護機構 -, 燃料電池, VOL.11 No.4, 67-72 (2012)

庄村康人, 樋口芳樹, ヒドロゲナーゼの新規酸素耐性機構 -膜結合型[NiFe]ヒドロゲナーゼ, 化学 Vol. **67**, 70-71 (2012), ISSN 0451-1964

〔学会発表〕(計 48 件)

H. Nakagawa, M. Taketa, M. Habukawa, K. Kihira, N. Shibata, H. Nishihara, K.-S. Yoon, S. Ogo, Ma. Ishii, Y. Igarashi, Y. Shomura and Y. Higuchi, Purification and Crystallization of NAD⁺-reducing [NiFe]-hydrogenase, 第1回ピコバイロジ-研究所国際シンポジウム, 2014年1月7日~8日, 兵庫

Y. Okawa, Y. Higuchi, and Y. Shomura, Crystallization of [NiFe]-hydrogenase maturation protein complex HypA-HypB, 第1回ピコバイロジ-研究所国際シンポジウム, 2014年1月7日~8日, 兵庫

Y. Higuchi, K.-S. Yoon, H. Nishihara and Y. Shomura, X-ray Structural Study of O₂-tolerant [NiFe] hydrogenase, International Conference on Bio/Mimetic Solar Energy Conversion (iSEC) 2013, 2013年11月23日, 大阪

中川英恵, 竹田翠, 土生川真央, 木平清人,

柴田直樹, 樋口芳樹, NAD⁺還元型ヒドロゲナーゼの結晶学的研究, 平成25年度日本結晶学会年会, 2013年10月12~13日, 熊本

大川雄嗣, 樋口芳樹, 庄村康人, [NiFe]-ヒドロゲナーゼ成熟化タンパク質HypAの結晶化, 平成25年度日本結晶学会, 2013年10月12~13日, 熊本

大川雄嗣, 樋口芳樹, 庄村康人, 水素分解酵素の成熟化機構の解明, 兵庫県立大学シンポジウム, 2013年9月24日, 神戸

中川英恵, 竹田翠, 庄村康人, 樋口芳樹, 水素-化学エネルギー変換・ヒドロゲナーゼの構造化学, 兵庫県立大学シンポジウム, 2013年9月24日, 神戸

Y. Higuchi and Y. Shomura, Reaction Mechanism of S-Carboxylation of HypE by HypF in the Maturation of [NiFe]-hydrogenase, 10th International Hydrogenase Conference・Szeged, 2013年7月9日, ハンガリー

太虎林, 竹田翠, 庄村康人, 西川幸志, 鈴木雅之, 樋口芳樹, 廣田俊, *H. thermoluteolus* TH-1由来NAD⁺還元ヒドロゲナーゼの分光学研究, 日本化学会第94春季年会, 2013年3月29日, 名古屋

八木達彦, 樋口芳樹, Catalytic cycle of cytochrome-c3 hydrogenase, a [NiFe]-hydrogenase, 第85回日本生化学会大会, 2012年12月14日, 福岡

Y. Higuchi, Structural Study of O₂-Tolerant [NiFe] Hydrogenase, The 2nd International Conference on MEXT Project of Integrated Research on Chemical Synthesis, 2012年12月11日, 愛知

樋口芳樹, [NiFe]ヒドロゲナーゼの酸素耐性機構の解明 - 放射光 X線利用による精密構造化学 -, 日本農芸化学会関西支部 第477回講演会, 2012年12月01日, 兵庫

庄村康人, 尹基石, 西原宏史, 樋口芳樹, [NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化因子 HypE, HypF の X線結晶構造解析, 第49回日本生物物理学会年会, 2012年09月24日, 愛知

庄村康人, 尹基石, 西原宏史, 樋口芳樹, 酸素耐性 [NiFe]ヒドロゲナーゼの結晶構造解析, 第12回日本蛋白質科学会年会, 2012年06月22日, 愛知

〔図書〕(計 2 件)

庄村康人, 樋口芳樹, CSJカレントレビュー-15, 次世代のバイオ水素エネルギー開発, 174(80-85)(2014) (化学同人)

樋口芳樹, ヒドロゲナーゼ, 光合成のエネルギー利用と環境応用, 33-42 (2014) 三宅淳, 佐々健監修 (CMC出版)

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口芳樹（HIGUCHI Yoshiki）
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授
研究者番号：90183574