

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K17936

研究課題名(和文) 活性部位システイン配位子の酸化修飾による[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性阻害機構

研究課題名(英文) Activity inhibition mechanism of [NiFe] hydrogenase by oxidative modification of active site cysteine ligand

研究代表者

太 虎林 (Tai, Hulin)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・特任助教

研究者番号：40512554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：[NiFe]ヒドロゲナーゼの不活性状態Ni-SIrは酸塩基平衡により活性状態Ni-SIaに変換され、H<sub>2</sub>の分解/合成が可能となる。本研究では、これまでNi-SIrが不活性状態Ni-SLに光変換されると考えられていたことが間違いで、Ni-SIrはNi-SIaに光活性化することを発見した。光活性化されたNi-SIaからNi-SIrへの戻り反応では、大きな活性化エネルギーと速度論的同位体(H/D)効果が検出され、Ni-Fe部位へのH<sub>2</sub>Oの付加と脱プロトン化によりOH-架橋配位子が形成することが示された。また、Ni-SLは新たな不活性状態(Ni-SXと命名)への光照射により生成することを突き止めた。

研究成果の概要(英文)：[NiFe] hydrogenase catalyzes the interconversion of dihydrogen to two protons and two electrons. The acid-base equilibrium between the ready Ni-SIr and active Ni-SIa states is a common feature among [NiFe] hydrogenases, but its mechanism remains unrevealed. We have shown that the Ni-SIr state was photo-activated to its Ni-SIa state by Ar<sup>+</sup> laser irradiation at 514.5 nm, whereas the Ni-SL state was light induced from a newly identified state, which was less active than any other identified state and existed in the "as-isolated" enzyme. Large activation energy and kinetic isotope effect were obtained for the reconversion of the Ni-SIa state to Ni-SIr state after the Ni-SIr-to-Ni-SIa photoactivation, suggesting that the Ni-SIa state reacts with H<sub>2</sub>O and leaves a bridging hydroxo ligand for the Ni-SIr state. These results provide new insights into the acid-base equilibrium of [NiFe] hydrogenase.

研究分野：生体関連化学

キーワード：金属蛋白質 Ni酵素 ヒドロゲナーゼ 酸塩基平衡 光活性化 水素

### 1. 研究開始当初の背景

硫酸還元菌由来[NiFe]ヒドロゲナーゼは、 $H_2$ 分子の可逆的な分解/合成を触媒する酵素であり、大小2つのサブユニットからなるヘテロ二量体構造をもつ(Fig. 1 左)。Ni-Fe 活性部位は大サブユニット側、電子伝達を担う3個の鉄硫黄クラスターは小サブユニット側にそれぞれ配置されている。水素還元状態Ni-Rの超高分解能(0.89 Å)X線結晶構造解析により、 $H_2$ のヘテロティックな分解過程で生じるヒドリド(H<sup>-</sup>)はNiとFe間に架橋することが報告された(H. Ogata *et al.* *Nature* 2015)。一方、好氣的に精製した酵素では、H<sup>-</sup>の結合部位であるNiとFe間にOH<sup>-</sup>が架橋したNi-B(Ni<sup>3+</sup>)と呼ばれる不活性状態が主に得られ(Fig. 1 右)、Ni-Bを1電子還元すると活性準備状態Ni-SI<sub>r</sub>(Ni<sup>2+</sup>)が形成される。Ni-SI<sub>r</sub>には光反応性があり、不活性状態Ni-SLに光変換されると提唱されていた。Ni-SI<sub>r</sub>は酸塩基平衡により活性状態の一つであるNi-SI<sub>a</sub>(Ni<sup>2+</sup>)に変換され、 $H_2$ 分子の分解/合成が可能となるが、その酸塩基平衡の反応機構の詳細は不明であった。

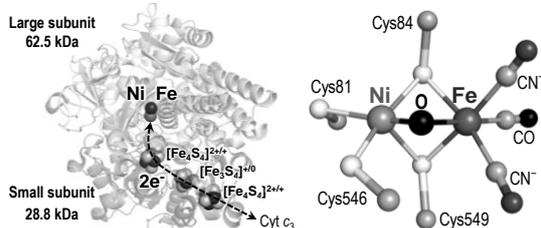


Fig. 1 硫酸還元菌由来[NiFe]ヒドロゲナーゼの全体構造(左)と不活性状態 Ni-B の活性部位構造(右)(PDB: 1WUJ)。

### 2. 研究の目的

本研究では、103–238 K でレーザー光(514.5 nm)照射下の FT-IR スペクトルを測定することで、Ni-SI<sub>r</sub>とNi-SI<sub>a</sub>間の酸塩基平衡の反応機構を明らかにした。

### 3. 研究の方法

好氣的に精製した酵素を37°Cで $H_2$ ガスと5.5 h反応させることで水素還元型酵素を調製した。水素還元型酵素を5当量のフェノサフラニン( $E_m = -252$  mV)を用いて部分的に酸化させ、主にNi-SI<sub>r</sub>とNi-SI<sub>a</sub>を含むフェノサフラニン酸化型酵素を調製した。

### 4. 研究成果

[NiFe]ヒドロゲナーゼの FT-IR スペクトル

では、活性部位 Fe に結合している CO と CN<sup>-</sup>の伸縮振動( $\nu_{CO}$  と  $\nu_{CN}$ )が 1850–2150  $cm^{-1}$ に観測され(Fig. 1 右と Fig. 2)、本酵素の様々な活性部位状態を区別することができる。フェノサフラニン酸化型酵素の(照射時)–(照射前)の FT-IR 差スペクトルでは、Ni-SI<sub>r</sub>の $\nu_{CO}$ (1924  $cm^{-1}$ )と $\nu_{CN}$ (2056と2071  $cm^{-1}$ )に由来する負のピーク、Ni-SI<sub>a</sub>の $\nu_{CO}$ (1943  $cm^{-1}$ )と $\nu_{CN}$ (2077と2089  $cm^{-1}$ )に由来する正のピークが観測され、Ni-SI<sub>r</sub>がNi-SI<sub>a</sub>に光活性化されることを明らかにした。溶液のpHを8.0から9.6に上げるとNi-SI<sub>r</sub>の光活性化が著しく抑制されたことから、この光活性化反応ではNiとFe間の架橋配位子OH<sup>-</sup>がプロトン化され、 $H_2O$ 分子として解離すると解釈した。また、従来の研究により、Ni-SI<sub>r</sub>は不活性状態Ni-SLに光変換されると提唱されていたが、好氣的に精製した不活性状態の酵素への照射により、Ni-SL(1968, 2076, 2090  $cm^{-1}$ )は本酵素で報告されているどの不活性状態よりも活性化されにくい新しい不活性状態(Ni-SXと命名(1922, 2061, 2070  $cm^{-1}$ ))から光変換されることが明らかとなった。Ni-SXは*in vitro*での酸素分子による本酵素の不活性化では形成されないが、細胞(硫酸還元菌)内環境下で形成されることが示された。硫黄の代謝に関与するほかの[NiFe]ヒドロゲナーゼで、システイン配位子の一つがペルスルフィド化された不活性状態がX線結晶構造解析より提唱されており、その不活性状態の分光学的性質がNi-SXと酷似していることから、Ni-SXで

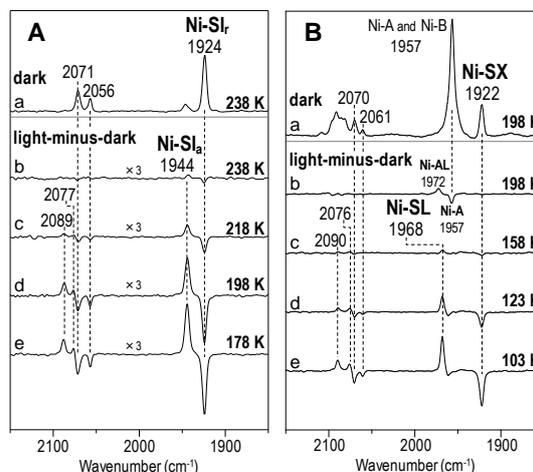


Fig. 2 (A)フェノサフラニン酸化型酵素と(B)好氣的に精製した酵素の FT-IR スペクトル。(a)照射前のスペクトル、(b-e)(照射時)–(照射前)の差スペクトル。

も類似した活性部位構造が形成され、酵素の活性化が阻害されたと解釈した。これらの研究成果は、*Phys. Chem. Chem. Phys.*誌(2016年)に論文発表した。

光活性化された Ni-SI<sub>a</sub> から Ni-SI<sub>r</sub> への戻り反応を FT-IR スペクトルにより追跡したところ、この反応の速度定数( $k$ )は pH8.5 で pH8.0 に比べて約 10 倍大きくなった。得られた  $k$  をもとに  $\ln(k/T)$  を温度の逆数に対してプロットし、アイリングの式より Ni-SI<sub>a</sub> から Ni-SI<sub>r</sub> への不活性化反応の活性化エンタルピー  $\Delta H^\ddagger$  と活性化エントロピー  $\Delta S^\ddagger$  を求めたところ、 $\Delta H^\ddagger$  は pH 8.5 ( $61.6 \pm 1.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) と pH 8.0 ( $59.4 \pm 1.8 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) で有意に変化しなかったのに対し、 $\Delta S^\ddagger$  は pH 8.5 ( $\sim 45 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) で pH 8.0 ( $\sim 15 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) に比べて約 3 倍大きくなった。以上より、pH の増大に伴う  $k$  の増大は、 $\Delta H^\ddagger$  よりも  $\Delta S^\ddagger$  の変化に起因することが明らかになった。さらに、H<sub>2</sub>O と D<sub>2</sub>O 溶媒中で  $k$  を比較したところ、 $k_H/k_D = 150$  (203 K) と非常に大きい速度論的同位体効果が検出された。これらの結果は、Ni-SI<sub>a</sub> から Ni-SI<sub>r</sub> への不活性化反応において、Ni-Fe 活性部位への H<sub>2</sub>O 分子の付加と脱プロトン化により OH 架橋配位子が形成されることを示す。これらの研究成果は、[NiFe]ヒドロゲナーゼの酸塩基平衡を介した活性化・不活性化機構の理解に寄与するものであり、*Chem. Commun.*誌(2017年)に論文発表した。

NAD<sup>+</sup>還元ヒドロゲナーゼの酸化型で EPR シグナルが観測され、Ni は III 価の状態を取ることが明らかになった。EPR シグナルの  $g_x$  は 2.25 と 2.26、 $g_y$  は 2.13、 $g_z$  は 2.04 であり、酸化型には Ni の配位構造が類似した 2 つの状態が存在した。これらの  $g$  値は標準型酵素における Ni-A と Ni-B 状態の  $g$  値と大きく異なることから、NAD<sup>+</sup>還元ヒドロゲナーゼの酸化型の Ni-Fe 活性部位構造は標準型酵素と異なることが示唆された。NAD<sup>+</sup>還元ヒドロゲナーゼの水素還元型では、強度は小さいものの、標準型酵素の活性サイクル状態 Ni-C の  $g$  値と類似したシグナルが  $g_x = 2.21$  と  $g_y = 2.14$  に観測された( $g_z$  は他のシグナルと重なった)。本酵素の Ni-C を確認するため、光照射を行ったところ、Ni-C に由来すると考えられる EPR シグナルは消失し、標準型酵素の光誘起状

態 Ni-L の  $g$  値と類似したシグナル( $g_x = 2.28$  と  $2.31$ ,  $g_y = 2.11$ ,  $g_z = 2.05$ )が新たに観測された。以上より、NAD<sup>+</sup>還元ヒドロゲナーゼの水素還元型は Ni-C を形成し、標準型酵素の水素還元型と類似した Ni-Fe 活性部位構造を取ることが示唆された。NAD<sup>+</sup>還元ヒドロゲナーゼの Ni-Fe 活性部位に関するこれらの分光学的データを、X 線結晶構造解析の結果と組み合わせて、*Science* 誌(2017年)に論文発表した。

以上の研究成果をはじめとする [NiFe]ヒドロゲナーゼの最新研究状況を *Dalton Trans.*誌(2018年)に Perspective として発表した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. H. Tai, Y. Higuchi, and S. Hirota, Comprehensive reaction mechanisms at and nearby the Ni-Fe active sites of [NiFe] hydrogenases, *Dalton Transactions*, 査読有, Vol. 47, 2018, pp. 4408–4423  
DOI: 10.1039/C7DT04910B.
2. H. Tai, L. Xu, K. Nishikawa, Y. Higuchi, and S. Hirota, Equilibrium between inactive ready Ni-SI<sub>r</sub> and active Ni-SI<sub>a</sub> states of [NiFe] hydrogenase studied by utilizing Ni-SI<sub>r</sub>-to-Ni-SI<sub>a</sub> photoactivation, *Chemical Communications*, 査読有, Vol. 53, 2017, pp. 10444–10447  
DOI: 10.1039/c7cc06061k.
3. Y. Shomura, M. Taketa, H. Nakashima, H. Tai, H. Nakagawa, Y. Ikeda, M. Ishii, Y. Igarashi, H. Nishihara, K.-S. Yoon, S. Ogo, S. Hirota, and Y. Higuchi, Structural basis of the redox switches in the NAD<sup>+</sup>-reducing soluble [NiFe]-hydrogenase, *Science*, 査読有, Vol. 357, 2017, pp. 928–932  
DOI: 10.1126/science.aan4497.
4. H. Tai, L. Xu, S. Inoue, K. Nishikawa, Y. Higuchi, and S. Hirota, Photoactivation of the Ni-SI<sub>r</sub> state to Ni-SI<sub>a</sub> state in [NiFe] hydrogenase: FT-IR study on the light reactivity of the ready Ni-SI<sub>r</sub> state and as-isolated enzyme revisited, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 査読有, Vol. 18, 2016, pp. 22025–22030  
DOI: 10.1039/c6cp04628b.

[学会発表] (計 14 件)

1. 太虎林, 許力揚, 西川幸志, 樋口芳樹, 廣田俊, “[NiFe]ヒドロゲナーゼの不活性化状態 Ni-SI<sub>r</sub> と活性化状態 Ni-SI<sub>a</sub> 間の活性化・不活性化機構の解明”, 日本化学会第 98 春季年会, 日本大学船橋キャンパス, 船橋市, 千葉県, 2018/3/20

2. H. Tai, L. Xu, K. Nishikawa, Y. Higuchi, and S. Hirota, “Elucidation of the activation/inactivation mechanism between the Ni-SI<sub>r</sub> and Ni-SI<sub>a</sub> states of [NiFe] hydrogenase utilizing Ni-SI<sub>r</sub>-to-Ni-SI<sub>a</sub> photoactivation”, 2nd International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2017), Uji Campus of Kyoto University, Uji, Kyoto, 2017/12/14-15
  3. 松浦滉明, 西川幸志, 太 虎林, Noor Dina Muhd Noor, 金 在炫, 姜 志始, 尹 基石, 小江誠司, 館野賢, 廣田俊, 樋口芳樹, “S-77 ヒドロゲナーゼ酸素耐性機構の構造化学”, 日本結晶学会平成 29 年度年会, JMS アステールプラザ, 広島市, 広島県, 2017/11/24
  4. H. Tai, L. Xu, K. Nishikawa, Y. Higuchi, and S. Hirota, “Elucidation of the Acid-Base Equilibrium Mechanism between the Ready Ni-SI<sub>r</sub> and Active Ni-SI<sub>a</sub> States of [NiFe] Hydrogenase Utilizing Light Irradiation”, 第 55 回日本生物物理学学会年会, 熊本大学, 熊本市, 熊本県, 2017/9/20
  5. 的場康幸, 木原章吾, 村木美水, 坂東尚彦, 黒田照夫, 太 虎林, 廣田俊, 坂口美幸, 小倉尚志, 杉山政則, “放線菌由来チロシナーゼの成熟化機構”, 第 11 回バイオ関連化学シンポジウム, 東京大学弥生キャンパス, 東京都文京区, 2017/9/8
  6. 太 虎林, 許 力揚, 西川幸志, 樋口芳樹, 廣田 俊, “硫酸還元菌由来[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性準備状態 Ni-SI<sub>r</sub> と活性状態 Ni-SI<sub>a</sub> 間の酸塩基平衡機構の FT-IR 研究”, 第 44 回生体分子科学討論会, カレッジプラザ, 秋田市, 秋田県, 2017/6/23
  7. 太 虎林, 許 力揚, 西川幸志, 樋口芳樹, 廣田 俊, “[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性準備状態 Ni-SI<sub>r</sub> と活性状態 Ni-SI<sub>a</sub> 間の酸塩基平衡機構の光照射を利用した研究”, 第 17 回日本蛋白質科学学会年会, 仙台国際センター, 仙台市, 宮城県, 2017/6/21
  8. 村木美水, 木原章吾, 坂東尚彦, 吉津裕成, 黒田照夫, 坂口美幸, 萱間紅絵, 太 虎林, 廣田俊, 小倉尚志, 杉山政則, 的場康幸, “放線菌由来チロシナーゼの活性化機構”, 第 27 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 東京理科大学神楽坂キャンパス, 東京都新宿区, 2017/6/16
  9. 太 虎林, 許 力揚, 西川幸志, 樋口芳樹, 廣田 俊, “光照射を利用した[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性化機構の FT-IR 研究”, 日本化学会第 97 春季年会, 慶應義塾大学日吉キャンパス, 横浜市, 神奈川県, 2017/3/16
  10. 太 虎林, 許力揚, 井上誠也, 西川幸志, 樋口芳樹, 廣田俊, “光照射を利用した硫酸還元菌由来[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性化機構の FT-IR 研究”, 第 54 回日本生物物理学学会年会, つくば国際会議場, 茨城県つくば市, 2016/11/25
  11. 許力揚, 太 虎林, 井上誠也, 西川幸志, 樋口芳樹, 廣田俊, “[NiFe]ヒドロゲナーゼにおける Ni-SI<sub>r</sub> 状態から Ni-SI<sub>a</sub> 状態への光活性化”, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 石川県立音楽堂, 金沢市, 石川県, 2016/9/7
  12. Y. Higuchi, N. D. M. Noor, H. Matsuura, K. Nishikawa, H. Nishihara, K.-S. Yoon, S. Ogo, H. Tai, S. Hirota, and Y. Shomura, “Structural and Biochemical Studies of Hyd-2 Type [NiFe]-hydrogenase from *Citrobacter sp.* S-77 – Proposal of the General Mechanism of O<sub>2</sub>-tolerance of Hydrogenases”, 11th International Hydrogenase Conference, Aix-Marseille Université, Marseille, France, 2016/7/14
  13. S. Hirota, H Tai, K. Nishikawa, S. Inoue, and Y. Higuchi, “Characterization of the light-induced Ni-L states of [NiFe] Hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F”, 11th International Hydrogenase Conference”, Aix-Marseille Université, Marseille, France, 2016/7/13
  14. 太 虎林, 西川幸志, 井上誠也, 樋口芳樹, 廣田 俊, “FT-IR と EPR を用いた [NiFe] ヒドロゲナーゼの新規中間体の特定と鉄硫黄クラスターによる反応制御機構の解明”, 第 16 回日本蛋白質科学学会年会, 福岡国際会議場, 福岡市, 福岡県, 2016/6/7
- 〔その他〕
- <http://mswebs.naist.jp/LABs/hirota/index.html>
6. 研究組織
    - (1) 研究代表者
      - 太 虎林 (TAI Hulin)
      - 研究者番号 : 40512554
      - 奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・特任助教
    - (2) 研究分担者
      - なし
    - (3) 連携研究者
      - なし
    - (4) 研究協力者
      - 廣田 俊 (HIROTA Shun)
      - 研究者番号 : 90283457
      - 奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・教授
  
      - 樋口 芳樹 (HIGUCHI Yoshiki)
      - 研究者番号 : 90183574
      - 兵庫県立大学・生命理学研究科・教授
  
      - 許 力揚 (XU Liyang)