

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06511

研究課題名(和文) [NiFe]ヒドロゲナーゼの酸化に伴う鉄硫黄クラスターの構造変化に関する研究

研究課題名(英文) Structural study on the conformation change of iron-sulfur cluster accompanied by oxidation in [NiFe] hydrogenase

研究代表者

西川 幸志 (Nishikawa, Koji)

兵庫県立大学・学術総合情報センター・准教授

研究者番号：80723593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼについて、酸化に伴う鉄硫黄クラスターの構造変化を精査し、従来の酸素耐性[NiFe]ヒドロゲナーゼの鉄硫黄クラスターの構造変化の様式と比較することで、[NiFe]ヒドロゲナーゼがいかんして酸素耐性を獲得しているのか、酸素耐性機構の普遍則を明らかにすることを旨とした。硫酸還元菌由来の標準型酵素について、空気酸化型および $K_3Fe(CN)_6$ による化合物酸化型のX線解析を進めている。これまで、標準型酵素の近位クラスターは構造変化しないと考えられていたが、嫌氣的に調製した結晶を酸化させると構造変化することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題は、本酵素を利用した酵素電極バイオ燃料電池の開発やクリーンエネルギー源である水素の産生、活性中心を模倣した人工触媒の開発といった応用利用が期待できるものである。一例として光合成反応中心と組み合わせた光駆動型の水素生産系が考えられる。光合成反応中心が太陽光を吸収し還元力が生じ、電子がヒドロゲナーゼへと移動することで水素産生が可能になる。しかし、酸素発生の伴う光合成と組み合わせようすると、ヒドロゲナーゼの酸素分子に対する感受性が問題となるため、応用が著しく制限されてしまう。酸素耐性機構の普遍則を解明することは、ヒドロゲナーゼの工業利用へ大きく寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the structural change of the iron-sulfur cluster of standard-type [NiFe] hydrogenase upon oxidation and compared it with the manner of structural change of the iron-sulfur cluster of conventional oxygen-tolerant [NiFe] hydrogenases to reveal how [NiFe] hydrogenase acquires oxygen tolerance. We aimed to elucidate the universal rule of the oxygen-tolerant mechanism. X-ray analysis of the standard-type enzyme from sulfate-reducing bacteria is underway for the air-oxidized form and the compound-oxidized form with $K_3Fe(CN)_6$. It has been previously thought that the proximal cluster of the standard-type enzyme does not undergo structural change. However, we have found that the crystal prepared anaerobically undergoes structural change when it is oxidized.

研究分野：構造生物学

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

1. 研究開始当初の背景

微生物に広く見られる「水素代謝システム」で中心的な役割を担うのはヒドロゲナーゼと呼ばれる金属タンパク質である。ヒドロゲナーゼは水素分子を基質として、「 $H_2 \rightleftharpoons 2H^+ + 2e^-$ 」の反応を触媒する。ヒドロゲナーゼは、その活性部位を構成する金属原子の構成によって、[NiFe]ヒドロゲナーゼ、[FeFe]ヒドロゲナーゼ、[Fe]ヒドロゲナーゼの3種類に分類される。申請者は、これまで[NiFe]ヒドロゲナーゼの構造化学を研究してきており、種々の酸化還元状態(図1)における「型」について、1.0-1.3 Å の高分解能で立体構造を報告してきた。特に、触媒サイクルを構成する「型」の中で最も還元された状態である Ni-R 型の X 線結晶構造解析では、0.89 Å のサブアトム分解能で構造決定することに成功し、活性部位の Ni 原子と Fe 原子をヒドリド(H^-)が架橋し、Ni 原子に配位するシステイン残基側鎖がプロトン化されている様子を捉えた。また、酸化型では、活性部位の Ni 原子の占有率が減少することを明らかにした。

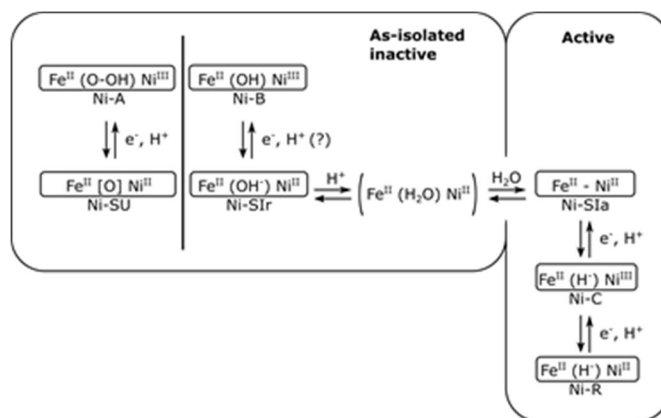


図1 . [NiFe]ヒドロゲナーゼの活性部位の種々の酸化還元状態における構造。Ni-Fe 活性部位と(予想される)架橋配位子を表す。Ni, Fe の右肩の数字は、それぞれの酸化還元状態での価数。

2. 研究の目的

一般に、ヒドロゲナーゼは酸素存在下では不活性化されるが、一部の[NiFe]ヒドロゲナーゼは酸素耐性を持ち、酸素耐性獲得のためには特異な鉄硫黄クラスターを持っていることが必要だと考えられている。また、酸素耐性を示す酵素では、酸化に伴い鉄硫黄クラスターが構造変化することが分かっているが、酸素耐性の無い標準型の[NiFe]ヒドロゲナーゼでも、酸化に伴い鉄硫黄クラスターの構造変化が起こっているようなデータが集まりつつある。これらのことから、酸化に伴う鉄硫黄クラスターの構造変化が酸素耐性獲得の主たる要因では無い可能性があり、まだ知らぬ新たな酸素耐性機構が存在することが示唆された。本課題では、硫酸還元菌由来の標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼの酸化還元に伴う鉄硫黄クラスターの構造に注目し、[NiFe]ヒドロゲナーゼがいかにかして酸素耐性を獲得しているのか、酸素耐性機構の普遍則を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本課題では、硫酸還元菌由来の標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼについて、酸化還元に伴う鉄硫黄クラスターの構造変化について着目した。これまで、本酵素は好氣的に精製、結晶化された標品について詳しく結晶構造解析されてきたが、その過程では鉄硫黄クラスターの構造変化は見られておらず、嫌氣的に精製した標品を酸化させたときにのみ構造変化が起こっているような結果を得つつあった。そこで、嫌氣的に調製した結晶(嫌気結晶と呼ぶ)を種々の酸化条件でそれぞれ調製し、鉄硫黄クラスターの構造を X 線結晶構造解析により詳細に解析することで、構造変化の様子の違いを比較した。

4. 研究成果

嫌氣的フェリシアン酸化処理では主に Ni-B が形成され(95%)、好氣的フェリシアン酸化処理では Ni-B に加えて Ni-A も形成された(20%)。また嫌氣的フェリシアン酸化の後に好氣的にフェリシアンによる酸化処理を行っても活性部位の Ni-A の割合は増えず、近位 FeS クラスターの構造変化は起きなかった。(図2, 3) 好氣的フェリシアン酸化では活性部位の Ni, Fe 間の架橋酸素

に加えて, Cys546 の周辺に強い電子密度のピークが見られ, Ni には負の $F_o - F_c$ 電子密度が見られた(図 2 -e, f)。

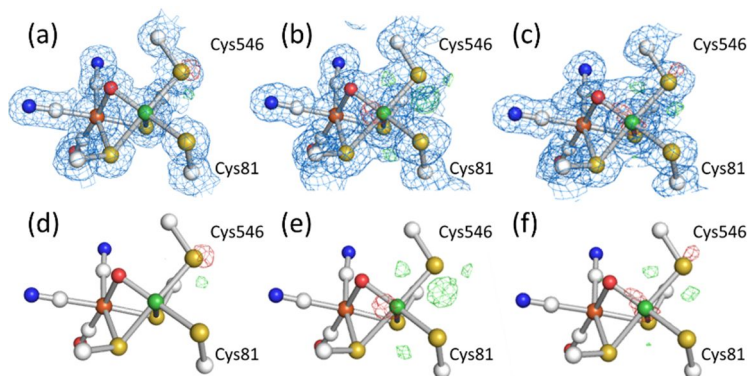


図 2 . 活性中心の構造と電子密度 (a)(d)嫌気的フェリシアン酸化, (b)(e)好氣的フェリシアン酸化, (c)(f)嫌気的フェリシアン酸化 好氣的フェリシアン酸化
 $2F_o - F_c$: 1.0σ (青) $F_o - F_c$: $\pm 5.0\sigma$ (+; 緑, -; 赤)

これまでに好気精製後に結晶化した酸化型の構造の高分解能データは先行研究により得られており、それらによる酸化型の構造と本課題における好氣的フェリシアン酸化の Ni-Fe 活性部位の構造を比較したところ、よく似た電子密度が観察され、同様の構造変化を起こしていることが確認された。好気精製・結晶化では Ni-A および Ni-B の混合物が形成されるが、近位 FeS クラスターの構造変化は起きない点が異なっていた。

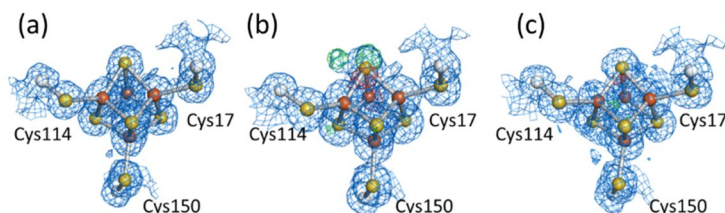


図 3 . 近位 FeS クラスターの構造と電子密度 (a)嫌気的フェリシアン酸化, (b)好氣的フェリシアン酸化, (c)嫌気的フェリシアン酸化 好氣的フェリシアン酸化
 $2F_o - F_c$: 1.0σ (青) $F_o - F_c$: $\pm 5.0\sigma$ (+; 緑, -; 赤)

以上から、近位 FeS クラスターの構造変化には活性部位の Ni-A の形成が関係しており、それには酵素を酸素に曝露させる必要があると考えられた。また一度酸化され Ni-B が形成されると、そこから Ni-A は形成されず、近位クラスターの構造変化が起きないこともわかった。

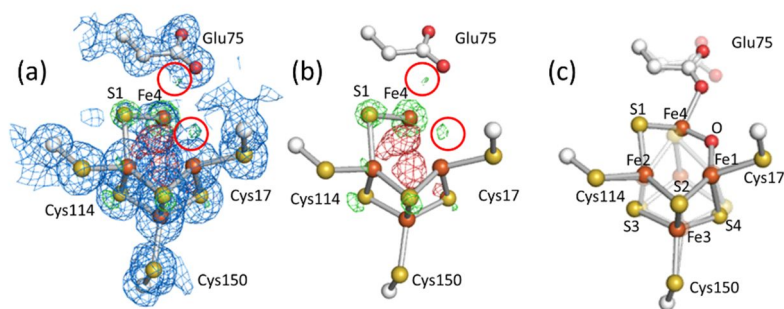


図 4 . 構造変化した近位クラスターのモデリング (a)(b)Fe と S の移動と周囲の電子密度 (c)Glu75 の移動と O の配位を含めた構造変化後の近位 FeS クラスターのモデル

構造変化した近位 FeS クラスターでは、キューバン型のクラスターのうち S1 と Fe4 原子がクラスターの外側に移動していた。移動した Fe4 と Fe1 原子の間には酸素原子が架橋しており、クラスターは開いた構造を取っていることがわかった。また、移動後の Fe4 原子に接近するように Glu75 残基の側鎖がフリップしてきて Fe4 原子と配位結合していることも、構造変化した後のクラスターを安定化することに寄与していると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Imanishi Takahiro, Nishikawa Koji, Taketa Midori, Higuchi Katsuhiko, 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 -

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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nishikawa K, Nakagawa Y, Inoue S, Chuji T, Ogata H, Nakashima S, Shigeta Y, Fukutani K, Higuchi Y
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 玉田太郎, 廣本武史, 西川幸志, 樋口芳樹
2. 発表標題 Desulfovibrio vulgaris Miyazaki F株由来[NiFe]-ヒドロゲナーゼ酸化型の中性子/X線結晶構造解析
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nishikawa K, Nakagawa Y, Inoue S, Chuji T, Nakashima S, Shigeta Y, Fukutani K, Higuchi Y
2. 発表標題 New assay method for the enzymatic reaction with gaseous substrates by Raman spectroscopy
3. 学会等名 Materials Research Meeting (国際学会)
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, COATES Leighton, 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
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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