

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291038

研究課題名(和文) [NiFe]ヒドロゲナーゼの酸素耐性機構の解明

研究課題名(英文) Structural chemistry of O₂-tolerant [NiFe]-hydrogenases

研究代表者

樋口 芳樹 (Higuchi, Yoshiki)

兵庫県立大学・生命理学研究科・教授

研究者番号：90183574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では，[NiFe]-ヒドロゲナーゼにみられる酸素耐性の構造基盤を解明すべく，新規の酸素耐性酵素のX線結晶解析と酸素耐性をもたない標準酵素の中性子結晶解析を進めた。

1. 好熱菌の新規酸素耐性酵素について空気酸化型，水素還元型およびK₃Fe(CN)₆による強制酸化型のX線解析を進めている。これまでの結果では，近位クラスターは，酸素耐性をもたない酵素と同じ[4Fe4S]型構造をもっていた。しかし，強制酸化型では，従来の酸素耐性酵素と同様にそのクラスターの構造は変化したが，変化の仕方は異なっていることを見出した。
2. 標準酵素において，2.0 Å分解能の中性子回折データの取得に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, x-ray structure analysis of newly found O₂-tolerant [NiFe]-hydrogenase and neutron structure analysis of standard enzyme have been carried out.

1. The x-ray structures of the newly found O₂-tolerant [NiFe]-hydrogenase from *Citrobacter* sp. S-77 in the air-oxidized, K₃Fe(CN)₆-oxidized and H₂-reduced forms have been successfully solved at the resolutions better than 2.0 Å. The one of the iron-sulfur clusters (the proximal to the Ni-Fe active site) is not a [4Fe3S]-type, which was found in the usual O₂-tolerant enzymes, but a [4Fe4S]-type typical as those in the standard enzymes. This [4Fe4S]-type cluster changed its structure when the enzyme is oxidized by K₃Fe(CN)₆, but the mechanism of the structural changed are different from those clusters in O₂-tolerant hydrogenase.
2. Neutron diffraction data up to 2.0 Å resolution have been successfully obtained from a large crystal (>1.5 mm³) grown in D₂O.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶解析 酸素耐性酵素 Ni酵素 ヒドロゲナーゼ 燃料電池 中性子結晶解析 反応機構 プロトンチャンネル

1. 研究開始当初の背景

微生物における「水素代謝システム」の中心酵素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、その触媒する反応は「 $H_2 \rightleftharpoons 2H^+ + 2e^-$ 」である。ヒドロゲナーゼは、その活性部位の金属原子の構成により、[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種類に分類されていた。申請者は、30年間にわたり、[NiFe]ヒドロゲナーゼの構造化学を展開してきた。現在までに2種類の酸化不活性型(Ni-A型、Ni-B型)、水素還元活性型(Ni-C型)、一酸化炭素結合(休止)型(Ni-CO型)、光活性型(Ni-L型)など、異なる5種類の状態「型」について、1.0-1.4Åの高分解能で立体構造を報告してきた。これらの構造解析により、その活性部位の特異な配位子構造やその配位子構造変化を明らかにし、さらにこれらの構造化学的結果を元に新規のモデル化合物(Ni-Ru錯体)を設計し、世界で初めてヒドロゲナーゼ酵素と同様の触媒反応を示す人工化合物の合成に成功した(*Science*,2007)。また、*Hydrogenovibrio marinus* 由来の酸素耐性をもつヒドロゲナーゼ(Hyd1)のX線解析に成功し、その酸素耐性にはNi-Fe活性部位の近傍の[4Fe3S]クラスターの構造変化が重要であることをつきとめた(*Nature*,2011)。

2. 研究の目的

ヒドロゲナーゼは水素の合成・分解を触媒する酵素で、その反応機構の解明は新規の燃料電池や水素合成触媒の開発につながる。本酵素は触媒活性部位にNiやFeなどの金属原子を有する金属酵素であるため、一般的に酸素は強い阻害剤としてはたらく。本酵素の応用利用のためにはこの酸素感受性を克服しなければならない。最近新規の酸素耐性ヒドロゲナーゼが見出され、その耐性機構も様々であることが明らかになりつつある。本研究では、酸素耐性をもつ複数の[NiFe]ヒドロゲナーゼについてその酸素耐性の構造基盤を解明することを初期目的とし、これらの結果を元に酸素に阻害される金属酵素に酸素耐性機能を付与する「普遍的なしくみ」を見出し、酵素やモデル化合物の改変・設計に対して有用な情報を提供する。また、酵素による触媒反応機構の全容を解明するために中性子結晶解析を進展させることも目的とする。

3. 研究の方法

本研究では以下の2項目について研究を行った。

(1) 新規酸素耐性[NiFe]ヒドロゲナーゼのX線構造生物学: *Citrobacter* sp. S-77由来の4量体型[NiFe]ヒドロゲナーゼは、強い酵素活性と酸素安定性をもつ。本申請では、この酵素の精製・結晶化・X線結晶解析および生化学的性質の精査を進める。

(2) 標準タイプ[NiFe]ヒドロゲナーゼの中

性子結晶構造解析: 硫酸還元菌・*Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki のもつ標準タイプ[NiFe]ヒドロゲナーゼについて中性子結晶構造解析のための巨大単結晶の調製法のための結晶化相図の作成を行う。

4. 研究成果

(1) 新規酸素耐性[NiFe]ヒドロゲナーゼのX線構造生物学

好熱菌(*Citrobacter* sp. S-77)の[NiFe]-ヒドロゲナーゼのヒドロゲナーゼユニット(Hyd2-s77)について、菌体の培養法および酵素の精製法の確立を進めた。九州大学の江口等により開発された精製法で、2.2Å分解能の単結晶を得たが、小サブユニットのC末端の分子構造がはっきりと同定できなかった。そこで、酵素の精製前にトリプシンを作用させて細胞膜から抽出することでC末端部分が切りそろえられた均一な分子量のHyd2-s77を得ることに成功した。この新しい精製法により、酵素の回収率は従来法の13%から49%にまで上がり、また、比活性は233 U/mgから580 U/mgまで改善された。さらに、本精製酵素を用いて、空気酸化型Hyd2-s77の結晶構造を1.6Å分解能にまで高めることができた。

2,3,5-トリフェニル-2H テトラゾリウムクロリド(TTC)をヒドロゲナーゼが水素を酸化した後の最終電子受容体として用いることで酵素の活性を定量する方法を開発した。この方法でHyd2-s77の酸素に対する安定性を精査したところ、図1に示すように水素を飽和した後、63 nmolの酸素を加えた系においても若干の遅延はあるが水素分解活性を復活させることがわかった。これにより、Hyd2-s77は、若干の酸素が存在しても水素を分解して還元力を得ることにより、酵素活性を復活させることができる、即ち、酸素耐性をもつヒドロゲナーゼであることを見出した。各酸素濃度での酵素の酸素耐性の指標を図1の曲線の傾きが最大となった時間の逆数を100倍した数値で定義すると、4.2, 8.4, 12.6, 31.5, 63.0 nmol O₂での指標値は、それぞれ46.9, 20.5, 17.1, 2.44 and 1.34であった。

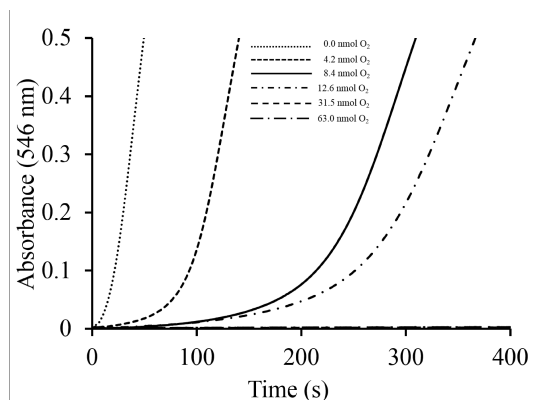


図1.測定系内を水素で飽和した後、0.0, 4.2, 8.4, 12.6, 31.5, 63.0 nmolの酸素加えた場合のヒドロゲナーゼ活性復活の時間経過(酵

素活性が復活すれば、TTCが還元されて546 nmの吸収が増大する)

菌体膜破碎抽出後にトリプシンで処理して小サブユニットのC末端部分を一樣にしてからクロマトグラフィー法で精製したHyd2-s77とトリプシン処理せずに精製した試料の両方について結晶化を行った。図2にトリプシン処理して得られた単結晶を示す。

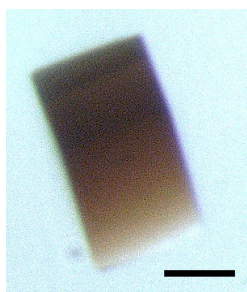


図2. Hyd2-s77単結晶
図下部の線は50 μm

SPring-8のビームライン(BL44XU)においてX線回折実験を行った。その結果、どちらの精製酵素も空間群 $P2_1$ に属していた。表1に示すように、トリプシン処理した試料から得られた結晶からは、1.6 Åの回折データを得ることができた。現在、構造精密化を進めているが、本酵素は、示したように酸素耐性を示すにも拘わらず、近位の鉄-硫黄クラスターは、標準タイプのヒドロゲナーゼと同じ、 $[4Fe4S]$ 型と思われる。

表1 X線回折測定データと処理の統計値

データセット	トリプシン処理	トリプシン非処理
光源(SPring-8)	BL44XU	BL44XU
波長 (Å)	0.9000	0.9000
測定温度 (K)	100	100
検出器	MX300HE	MX300HE
カメラ長 (mm)	160	190
回転角 (°)	0.5	1.0
縦回転角 (°)	180	180
露光時間 (s)	0.5	1.0
空間群	$P2_1$	$P2_1$
a, b, c (Å)	63.90, 118.89, 96.70	65.38, 121.45, 98.63
α, β, γ (°)	90.00, 100.61, 90.00	90.00, 102.29, 90.00
モザイク性 (°)	0.59	0.53
分解能 (Å)	28.75 - 1.60	33.68 - 2.00
測定反射数	93446	51136
独立反射数	26992	14294
完全性 (%)	99.9 (99.4)	98.7 (97.0)
剰余性	3.7 (3.5)	3.7 (3.6)
$\langle I / \sigma(I) \rangle$	8.5 (3.3)	10.8 (3.0)
R_{int}	0.093 (0.478)	0.121 (0.414)
温度因子 (Å ²)	7.4	21.1

空気酸化型に加えて、水素還元型および $K_3Fe(CN)_6$ による化合物強制酸化型の単結晶の調製に成功し、それらについて高分解能のX線回折実験を行った。現在、構造解析と構造精密化を進めている。 $K_3Fe(CN)_6$ による強制酸化型では、これまで知られていた酸素耐性酵素(Hyd1)に見られるようにそのクラスターの構造は変化していたが、その変化の仕方は異なっていた。本構造化学的研究の結果、酸素耐性と近位 $[4Fe4S]$ クラスターの構造変化

の関連について新しい知見が得られると期待される。

(2) 標準タイプ[NiFe]ヒドロゲナーゼの中性子結晶構造解析

高分解能の中性子回折データを得るには、重水中において、良質で巨大な単結晶を調製しなければならない。本研究では、標準タイプの[NiFe]ヒドロゲナーゼについてこれまでに得られていた結晶化条件をさらに精査するために結晶化相図の見直しを行うことにした。蒸気拡散法で結晶化を行うときの初期タンパク質濃度は、これまで0.33 mMが最適とされていた。しかし、結晶化開始時の最適のタンパク質濃度について、新たに作成した結晶化相図の過飽和領域内でのスクリーニングを詳細に行ったところ、0.20 mMのヒドロゲナーゼ溶液にマイクロシーディングを行って結晶化を開始した方が微結晶の析出が抑えられ、母液内に1~2個の単結晶が得られることがわかった。図3に得られた結晶化相図の概略を示す。この条件で得られた結晶について中性子回折実験を行ったところ、2.0 Å分解能の中性子回折データの取得に成功した。現在、構造解析および精密化を進めている。

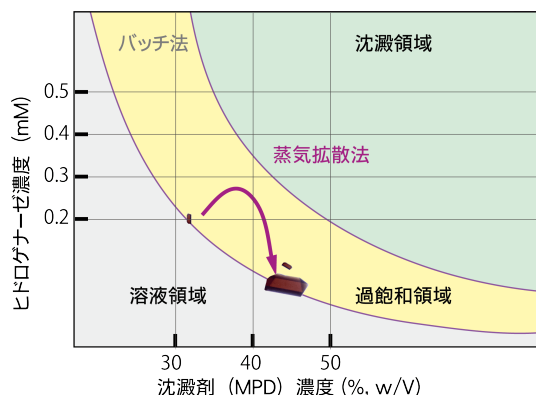


図3. 新たに作成した標準タイプ[NiFe]ヒドロゲナーゼの結晶化相図。

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31件)

1) Improved Purification, Crystallization and Crystallographic Study of Hyd-2 Type [NiFe]-hydrogenase from *Citrobacter* sp. S-77, N. D. M. Noor, K Nishikawa, H. Nishihara, K-S. Yoon, S. Ogo and Y. Higuchi, *Acta Crystallogr. F72(1)*, 53-58 (2016), DOI: 10.1107/S2053230X15024152, 査読有

2) Synthesis and Reactivity of a Water-soluble NiRu Monohydride Complex with a Tethered Pyridine Moiety, T. Matsumoto, K. Yoshimoto, C. Zheng, Y. Shomura, Y. Higuchi, H. Nakai and S. Ogo, *Chem. Lett.* **45**, 197-199 (2016), DOI:10.1246/cl.1510, 査読有

3) 廣田駿, 加納健司, 樋口芳樹, ヒドロゲナーゼによる水素分解・合成機構および酵素燃料電池への応用, *BIO INDUSTRY*, 33 No.1, 43-48 (2016)(シーエムシー出版) URL : https://www.cmcbooks.co.jp/products/detail.php?product_id=5044, 査読無

4) Nanoscale Charge Transport in Cytochrome c3/DNA Network: Comparative Studies between Redox-active Molecules, H. Yamaguchi, D.-C. Che, Y. Hirano, M. Suzuki, Y. Higuchi, and T. Matsumoto, *Jap. J. of App. Physics* **54**, 095201-(1-4) (2015), DOI: 10.7567/JJAP.54.095201, 査読有

5) FT-IR Characterization of the Light-Induced Ni-L2 and Ni-L3 States of [NiFe] Hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F, H. Tai, K. Nishikawa, S. Inoue, Y. Higuchi and S. Hirota, *J. Phys. Chem. B* **119** (43), 13668–13674 (2015), DOI: 10.1021/acs.jpccb.5b03075, 査読有

6) Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of the NAD⁺-reducing [NiFe] hydrogenase from *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1, M. Taketa, H. Nakagawa, M. Habukawa, H. Osuka, K. Kihira, H. Komori, N. Shibata, M. Ishii, Y. Igarashi, H. Nishihara, K-S. Yoon, S. Ogo, Y. Shomura and Y. Higuchi, *Acta Crystallogr.* **F71**, 96–99 (2015), DOI: 10.1107/S2053230X14026521, 査読有

7) Control of Transition between Ni-C and Ni-SI_a States in Catalytic Cycle of [NiFe] Hydrogenase by Redox State of its Proximal Fe-S Cluster, H. Tai, K. Nishikawa, M. Suzuki, Y. Higuchi, and S. Hirota, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 13817-13820 (2014), DOI: 10.1002/anie.201408552, 査読有

8) Kinetic Analysis of Inactivation and Enzyme Reaction of Oxygen-tolerant [NiFe]-hydrogenase at Direct Electron Transfer-type Bioanode, K. So, Y. Kitazumi, O. Shirai, K. Kurita, H. Nishihara, Y. Higuchi, and K. Kano, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **87**, 1177–1185 (2014), DOI: 10.1246/bcsj.20140223, 査読有

9) Catalytic Cycle of Cytochrome-c₃ Hydrogenase, a [NiFe]-enzyme, Deduced from the Structures of the Enzyme and the Enzyme Mimic, T. Yagi, S. Ogo and Y. Higuchi, *Int. J. Hydrogen. Energy*, **39** (32), 18543-18550 (2014), DOI:10.1016/j.ijhydene.2013.12.174, 査読有

10) Gas-diffusion and Direct Electron Transfer-type Bioanode for Hydrogen Oxidation with Oxygen-tolerant [NiFe]-hydrogenase as an Electrocatalyst, K. So, Y. Kitazumi, O. Shirai, K. Kurita, H. Nishihara, Y. Higuchi, K. Kano, *Chemistry Lett.*, **43**, 1575-1577 (2014), DOI:

10.1246/cl.140, 査読有

11) Light-Driven Hydrogen Production by Hydrogenases and a Ru-Complex inside a Nanoporous Glass Plate under Aerobic External Conditions, T. Noji, M. Kondo, T. Jin, T. Yazawa, H. Osuka, Y. Higuchi, M. Nango, S. Itoh and T. Dewa, *J. Phys. Chem. Lett.*, **5** (14), 2402-2407 (2014), DOI: 10.1021/jz5008164, 査読有

12) Structural Aspects of [NiFe]-hydrogenases, Y. Shomura and Y. Higuchi, *Rev. Inorg. Chem.*, **33**(4), 173-192 (2013), DOI: 10.1515/revic-2013-0005, 査読有

13) 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**, 82-85 (2013) URL : http://www.biophys.jp/journal/journal_dl.php, 査読無

〔学会発表〕(計50件)

1) 樋口芳樹, 中性子結晶解析法を用いて酵素における水素分解の反応機構解明にせまる, 茨城大学大学院理工学研究科ミニシンポジウム, 茨城大学水戸キャンパス ライブラリーホール(水戸市・茨城県), 2016年2月22日

2) 樋口芳樹, ヒドロゲナーゼの総合化学, Cat-on-Cat symposium in Himeji 2015, 姫路・西はりま地場産業センター(姫路市・兵庫県) 2015年12月10日

3) 樋口芳樹, 水素酸化還元酵素・[NiFe]-ヒドロゲナーゼの総合的構造化学を目指して, 東京大学放射光連携研究機構 10周年記念講演会, 東京大学小柴ホール(文京区・東京都), 2015年11月13日

4) 樋口芳樹, Structural chemistry of hydrogenase by diffraction method, 錯体化学討論会, 奈良女子大学(奈良市・奈良県), 2015年9月21日

5) 樋口芳樹, ヒドロゲナーゼの水素活性化反応機構とプロトン移動, 平成27年度前期物性研究所短期研究会 機能物性融合科学シリーズ(3)「反応と輸送」, 東京大学物性研究所(柏市・千葉県), 2015年6月25日

6) 樋口芳樹, 水素を新しいエネルギー源とする新領域の構築, 第16回 豊田理研フェロー研究報告会, 豊田理化学研究所オープンコミュニティ(豊田市, 愛知県) 2015年6月22日

7) 樋口芳樹, ヒドロゲナーゼの反応水素が見えるか?, 日本物理学会 第70回年次大会, 早稲田大学 早稲田キャンパス(新宿区・東

京都), 2015年3月21日

8) Y. Higuchi, Structure, function and evolution of [NiFe]-Hydrogenases, iCARP2014 (The International Conference on Artificial Photosynthesis), 淡路夢舞台国際会議場(淡路市・兵庫県)2014年11月27日

9) Y. Higuchi, X-Ray Structural Studies of [NiFe]-Hydrogenases, International Conference of Catalytic Systems for Chemical Energy Conversion, Max Planck Institute for Chemical Energy Conversion, Muelheim (Germany), 2014年7月14日

10) 樋口芳樹, ヒドロゲナーゼの構造・機能・進化, 第41回生体分子科学討論会, 九州大学西新プラザ(福岡市・福岡県)2014年6月6日

11) Noor Dina Muhd Noor, Koji Nishikawa, Ki-Seok Yoon, Seiji Ogo, Yoshiki Higuchi, Structural chemistry of oxygen tolerant [NiFe]-hydrogenase from Citrobacter S-77, EMTECH-University of Hyogo Joint Colloquium 2014, Kuala Lumpur (Malaysia), 2014年5月26日

12) 庄村康人, 西川幸志, 井上誠也, 玉田太郎, 樋口芳樹, 結晶構造解析による水素分解酵素の反応機構解明に向けた試み, 蛋白質研究所セミナー「結晶構造を併用したハイブリッド構造研究の最前線」, 大阪大学蛋白質研究所(吹田市・大阪府), 2014年2月7-8日

13) 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, 大阪市大(大阪市・大阪府), 2013年11月23日

14) Y. Higuchi and Y. Shomura, Reaction Mechanism of S-Carbamoylation of HypE by HypF in the Maturation of [NiFe]-hydrogenase, 10th International Hydrogenase Conference, Szeged (Hungary), 2013年7月9日

〔図書〕(計5件)

1) 木平清人, 樋口芳樹, タンパク質立体構造散歩「翻訳終結因子」, 生物物理, 55 No.2 (318), 117 (2015) (日本生物物理学会)

2) 樋口芳樹, 電子密度分布は構造の全てを語る, 進化を続ける構造生物学, 157-168 (2014), 松島正明, 伊中浩治編(化学同人)

3) 樋口芳樹, 生物による水素エネルギー代

謝システム, 実験医学増刊32-10, (構造生命科学で何がわかるのか, 何ができるのか), 135-141 (2014) (羊土社)

4) 庄村康人, 樋口芳樹, ヒドロゲナーゼの酸素による不活性化およびその耐性機構 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, 80-85 (2014), 日本化学会編(化学同人)

5) 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

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号: