

単核鉄ヒドロゲナーゼの構造と電子状態および水素活性化機構に関する理論的研究

(京大院・理¹, iCeMS²)○中谷 直輝¹、榊 茂好²

【緒】

ヒドロゲナーゼは生体内で可逆的な水素分子の活性化反応を触媒する酵素であり、水溶液中での水素化反応や燃料電池反応への応用が期待される非常に興味深いタンパク質である。ヒドロゲナーゼには活性中心の構造の違いによって 3 つのクラスが存在する。最も典型的な[NiFe]ヒドロゲナーゼでは、NiとFeの二核錯体が活性中心に存在し、水素分子の活性化において重要な役割を果たしている。また、[FeFe]ヒドロゲナーゼも知られており、Fe-Feの

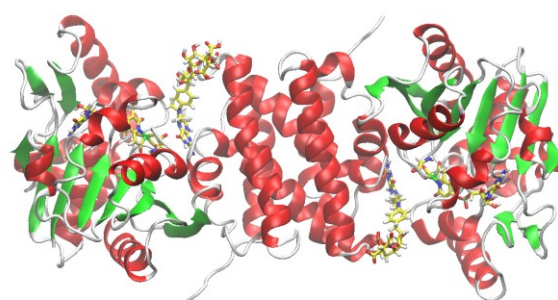
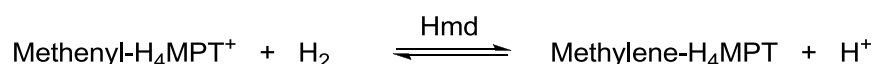


Figure 1. Crystal structure of mononuclear iron hydrogenase

二核錯体が活性中心に存在する。また、これら 2 つのヒドロゲナーゼでは、NADH や FADH₂などの還元物質からの電子移動を媒介する鉄-硫黄クラスターを有しており、酵素反応において重要な役割を担っている。ところが、近年、単核鉄錯体からなる活性中心を持ち、鉄-硫黄クラスターも持たないヒドロゲナーゼが発見され、盛んに研究が行われてきている。特に、他の 2 つのヒドロゲナーゼとは活性中心の構造が大きく異なることから、全く異なる水素活性化機能を有していると考えられ、触媒設計の観点からも、この単核鉄ヒドロゲナーゼ(Hmd)の水素活性化機構の解明は重要な課題である。しかしながら、2007年にHmdの結晶構造(Figure 1)が報告されたものの、活性中心の構造や電子状態は未解明な部分が多い。活性中心は五配位もしくは六配位の低スピン鉄錯体であると考えられているが、鉄中心の酸化数に関しては 2 価と 0 価が考えられており、どちらが正しいかは判っていない。また、活性中心の配位構造に関しては、IR や XAS の実験などから 2 つの CO とシステインの S、GP 補酵素が持つ N が鉄中心に配位していることが明らかになっているが、残りの配位座に関しては分かっていない。

Hmdの水素活性化反応では、基質である methenyl-tetrahydromethanopterin (CH-H₄MPT)が水素分子のヘテロリティックな解裂に伴って還元され、methylene-tetrahydromethanopterin (CH₂-H₄MPT)とプロトンが生成する。



興味深いことに、基質の非存在下では水素分子の活性化さえ進行せず、基質の結合によって引き起こされるタンパク質のグローバルな構造変化が反応のトリガーになっていると考えられている。

そこで本研究では、電子状態理論に基づいて単核鉄ヒドロゲナーゼの活性中心の構造と電子状態について検討し、過去の実験事実と比較・考察を行った。また分子動力学法に基づいて、活性種となる基質結合後のタンパク質の構造を予測し、水素活性化機構について検討を行った。

【計算】

まず、活性中心の配位構造の候補として、Scheme 1 に示すように、考えられる全てのモデル錯体について採用し、密度汎関数法(DFT)を用いて構造最適化を行った。汎関数には B3LYP を使い、基底関数は Fe に Stuttgart/Dresden (311111/22111/411/1) with ECP10MDF を、その他の原子には 6-311G**を用い、N、O、S には diffuse 関数も加えて計算を行った。

電子状態計算は Gaussian03 Revision C02 を用いて行い、分子動力学計算は Amber10 を用いて行った。

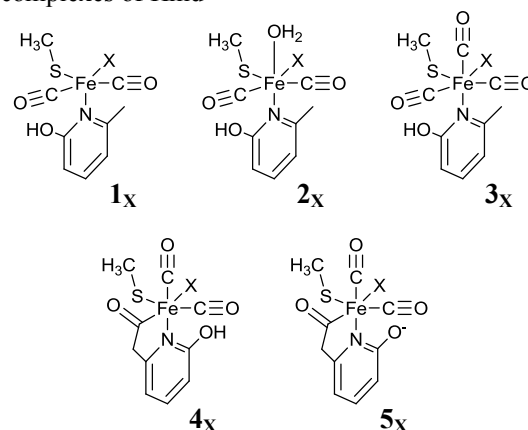
【結果と考察】

初めに、鉄中心の酸化数について検討を行った。構造最適化の結果、鉄 2 価錯体では、5 配位もしくは 6 配位構造が得られ、実験構造と矛盾しない結果となったが、鉄 0 価錯体では、 d^8 電子配置に特有の平面四配位構造が安定となり、実験構造との一致は良くなかった。したがって、Hmd の活性中心は低スピン鉄 2 価錯体であると結論づけた。

また、IR の実験では、鉄に配位した 2 つの CO の伸縮振動に由来するピークが観測されており、活性な錯体(A)および CN 阻害(I_{CN})、CO 阻害(I_{CO})された錯体で、それぞれピーク位置がシフトすることが報告されている。そこで DFT 法を用いて計算された CO の伸縮振動数を実験値に対してプロットし、候補となるモデル錯体の相関をみると、A、I_{CN}、I_{CO} の妥当な候補として 2_{OH}、2_{CN}、3_{CO} および 4_{OH}、4_{CN}、5_{CO} が考えられ、特に 4_{OH}、4_{CN}、5_{CO} は実験結果を最も良く再現することが分かった。したがって、GP 補酵素のピリジノール部はアシルピリジノール型を取って 2 座のキレート配位子として配位し、2 つの CO、システインの S、および水酸化物イオン(OH)が配位した八面体型の 6 配位構造を取っている可能性が高いと結論づけた。

さらに、タンパク質全体を考慮して分子動力学計算を行い、基質結合後のタンパク質の構造を予測し、ONIOM(QM/MM)法を用いて水素活性化機構について検討を行った。この結果については当日発表する予定である。

Scheme 1. Possible candidate of active site model complexes of Hmd



(X = OH⁻, H₂O, NH₃, CN⁻, and CO)

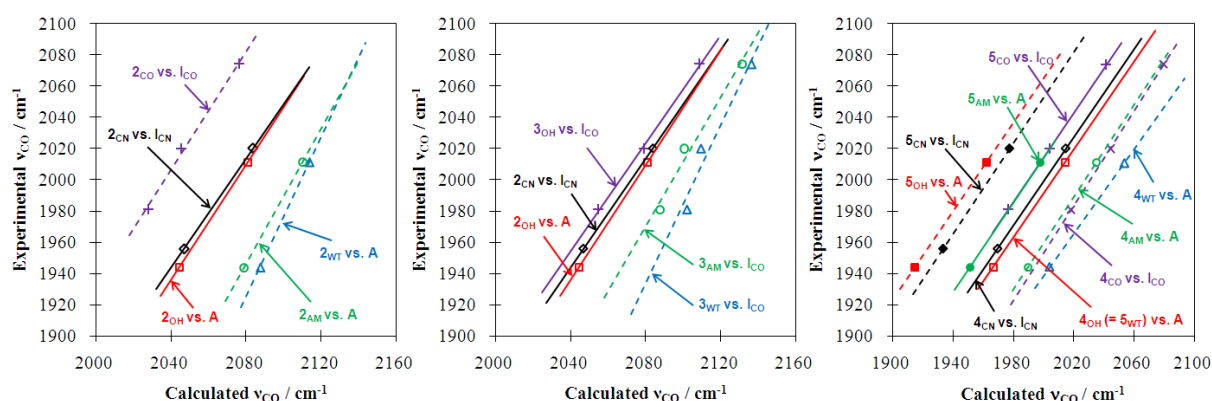


Figure 2. Relation between calculated CO-stretching frequencies and experimental values. Solid lines mean candidate with good correlation.