

[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性化サイクルにおける新規中間体の特定

(奈良先端大物質創成¹, 兵庫県大院生命理学², CREST/JST³)○太 虎林^{1,3}, 西川 幸志², 樋口 芳樹^{2,3}, 廣田 俊^{1,3}

Specification of a new intermediate in the catalytic cycle of [NiFe] hydrogenase

(Nara. Inst. Sci. Tech.,¹ Univ. of Hyogo,² CREST/JST³)○Hulin Tai,^{1,3} Koji Nishikawa,² Yoshiki Higuchi,^{2,3} and Shun Hirota^{1,3}

【序論】 *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F (DvMF) 由来[NiFe]ヒドロゲナーゼは、水素の可逆的な合成/分解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。Fig. 1 に示すように、本酵素は 62.5 kDa の大サブユニットと 28.8 kDa の小サブユニットからなるヘテロダイマー構造をとっている^[1]。大サブユニットの活性部位 Ni 原子には 4 つのシステイン残基の硫黄原子が配位し、それらのうち 2 つは Fe 原子にも配位し、架橋構造を形成している。Fe 原子には 1 個の CO と 2 個の CN の 3 つの二原子分子も配位している。また、小サブユニットには、3 つの Fe-S クラスター（近位 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]_p^{2+/+}$ 、中位 $[\text{Fe}_3\text{S}_4]_m^{+/0}$ 、遠位 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]_d^{2+/+}$ ）が配置され、水素の分解過程で生じる電子をシトクロム c_3 へ伝達する。[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性化サイクルでは、Ni-SI_a、Ni-C、及び Ni-R 型と呼ばれる構造が存在する^[2]。Ni-C 型 (Ni³⁺) 構造に光を照射すると、活性部位の Ni と Fe 間に架橋している H が解離し、Ni-L 型構造 (Ni¹⁺) が形成されることが報告されているが、触媒反応機構における Ni-L 型構造の位置づけは不明である。本研究では、レーザー光 (514.5 nm) 照射時の FT-IR スペクトルを 138~198 K で測定することにより、Ni-L 型構造が Ni-SI_a 型と Ni-C 型間の構造転移の中間体であることが示唆され、近位 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]_p^{2+/+}$ クラスターの酸化状態により Ni-C 型から Ni-SI_a 型構造への変換が制御されることを明らかにした。

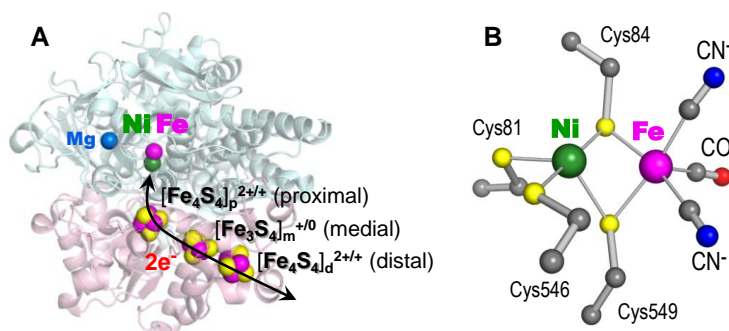


Fig. 1 Structure of [NiFe] hydrogenase from DvMF (PDB: 1WUL). (A) Overall structure with metals (nickel, iron, and manganese) and $[\text{Fe}_4\text{S}_4]_p^{2+/+}$, $[\text{Fe}_3\text{S}_4]_m^{+/0}$, and $[\text{Fe}_4\text{S}_4]_d^{2+/+}$ clusters highlighted. (B) NiFe active site structure. Carbon, nitrogen, oxygen, sulphur, nickel, iron, and manganese atoms are shown in black, blue, red, yellow, green, pink, and cyan spheres, respectively.

【実験】 好氣的環境下で精製した酸化型ヒドロゲナーゼの水溶液を真空ラインにより脱気し、水素で満たした後、37℃で6時間水素と反応させて、還元型サンプル(水素雰囲気下)を調整した。さらに、真空ラインにより水素を窒素に置換することで、窒素雰囲気下の還元型サンプルを調整した。

温度制御可能なセルホルダー (CoolSpeK IR USP-203IR-A, Unisoku) を FT-IR 装置 (FT-IR 6100V, JASCO) の試料室に設置し、Ar⁺レーザー光をサンプルに照射しながら (サンプル点での光強度: 500 mW/cm²)、FT-IR スペクトルを 138~198 K で測定した。EPR スペクトルも 4~50 K で測定した。

【結果と考察】 138~198 K での光照射時と光照射前の FT-IR スペクトルの差スペクトルを Fig. 2 に示す。差スペクトルにおける負と正のバンドは、それぞれ光反応物と光生成物に由来する。水素雰囲気下での差

スペクトルで観測された 1963 cm^{-1} の正のバンドは Ni-C 型構造の CO 伸縮振動 (ν_{CO})、 1911 cm^{-1} の負のバンドは Ni-L 型構造の ν_{CO} に帰属でき、Ni-C 型から Ni-L 型構造への光反応性が確認された (Fig. 2A)^[2]。窒素雰囲気下で同様の実験を行ったところ、Ni-L 型構造に由来する 1911 cm^{-1} のバンド以外にも、 1943 cm^{-1} に Ni-SI_a 型構造に由来する正のバンドが観測され (Fig. 2B)、Ni-C 型から Ni-SI_a 型構造への変換が観測された。窒素雰囲気下では Ni-C 型から Ni-SI_a 型構造への変換が観測されたため、Ni-C 型構造の光反応効率が水素雰囲気下に比べて増大した (Fig. 2C)。さらに、138 K では約 87% の Ni-C 型構造が Ni-L 型構造に変換されたが、測定温度の上昇に伴い、Ni-C 型から Ni-SI_a 型構造への変換が増加し、198 K では Ni-L 型構造よりも Ni-SI_a 型構造への変換が多くなった (約 14 % の Ni-C 型が Ni-SI_a 型構造に変換)。以上より、Ni-L 型構造は Ni-C 型と Ni-SI_a 型間の構造転移の中間体であることが示唆された (Fig. 2D)。Ni-C 型構造における近位 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]_{\text{p}}^{2+/+}$ クラスタは、水素雰囲気下ではほとんど全て還元されているのに対し、窒素雰囲気下では約 15% が酸化されていることが EPR 測定により明らかになった。Ni-C 型構造における酸化型 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]_{\text{p}}^{2+}$ クラスタの割合は、198 K における Ni-C 型から Ni-SI_a 型構造への変換率 (約 14 %) とよく一致し (Fig. 2C)、Ni-C 型から Ni-SI_a 型構造への変換は、近位 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]_{\text{p}}^{2+/+}$ クラスタが酸化型であるときに起こることが推測された。Ni-L 型から Ni-SI_a 型構造への変換過程では、一個の電子が放出され、近位 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]_{\text{p}}^{2+/+}$ クラスタへ流れると考えられる。窒素雰囲気下では、一部の $[\text{Fe}_4\text{S}_4]_{\text{p}}^{2+/+}$ クラスタは酸化型であり、電子を受取ることができるが、水素雰囲気下では、 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]_{\text{p}}^{2+/+}$ クラスタはほとんど全て還元型であり、電子を受け取れず、Ni-L 型は Ni-SI_a 型構造へ変換されないと推測される。以上より、 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]_{\text{p}}^{2+/+}$ クラスタの酸化状態が Ni-C 型から Ni-SI_a 型構造への変換を制御することが明らかになった。

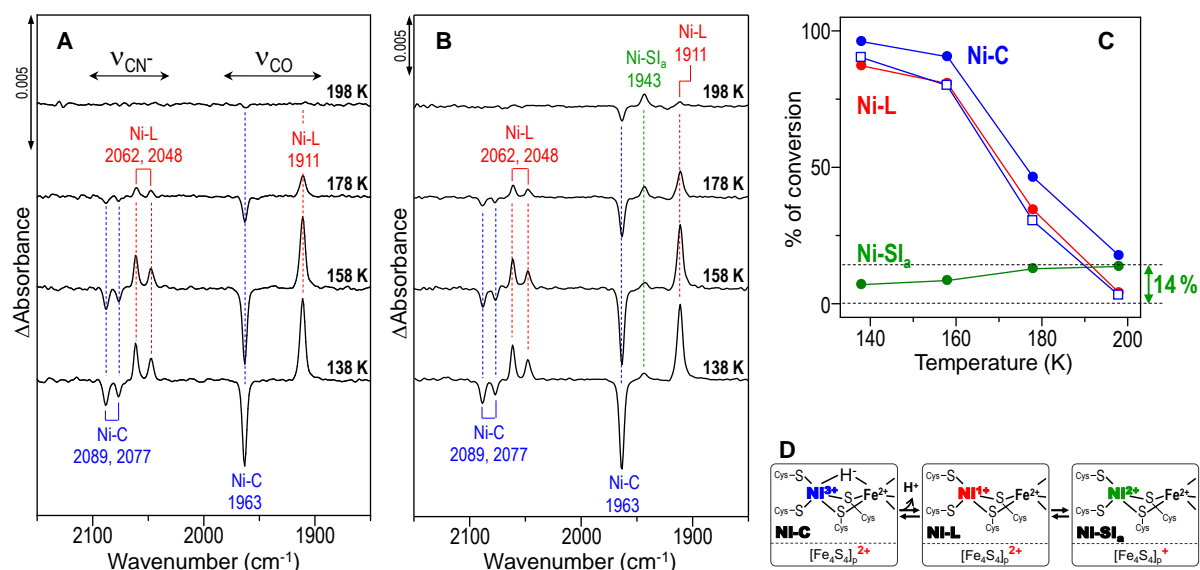


Fig. 2 Difference FT-IR spectra of H₂-activated [NiFe] hydrogenase from DvMF between the spectra with and without light irradiation under (A) H₂ and (B) N₂ atmosphere at 138, 158, 178, and 198 K. (C) Temperature dependence of the percentage of the Ni-C state converted to other states by light irradiation under H₂ (open blue square) and N₂ (closed blue circle) atmospheres and the percentages of the transition of the Ni-C state to the Ni-L state (closed red circle) and Ni-SI_a state (closed green circle) under N₂ atmosphere. (D) Proposed conversion mechanism between Ni-C and Ni-SI_a states.

[参考文献]

- [1] H. Ogata, Y. Mizoguchi, N. Mizuno, K. Miki, S. Adachi, N. Yasuoka, T. Yagi, O. Yamauchi, S. Hirota, Y. Higuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11628-11635.
- [2] W. Lubitz, H. Ogata, O. Rudiger, E. Reijerse, *Chem. Rev.* **2014**, 114, 4081-4148.