

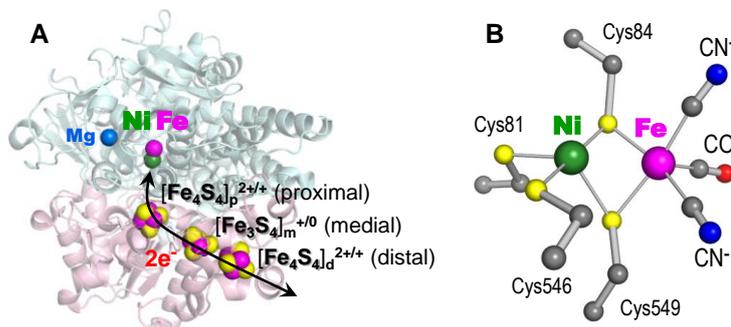
## [NiFe]ヒドロゲナーゼの活性化サイクルにおける新規中間体の特定

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

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

(Nara. Inst. Sci. Tech.,<sup>1</sup> Univ. of Hyogo,<sup>2</sup> CREST/JST<sup>3</sup>)○Hulin Tai,<sup>1,3</sup> Koji Nishikawa,<sup>2</sup> Yoshiki Higuchi,<sup>2,3</sup> and Shun Hirota<sup>1,3</sup>

**【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<sup>[1]</sup>。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<sub>a</sub>、Ni-C、及び Ni-R 型と呼ばれる構造が存在する<sup>[2]</sup>。Ni-C 型 (Ni<sup>3+</sup>) 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 (Ni<sup>1+</sup>) 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<sub>a</sub> 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<sub>a</sub> 型構造への変換が制御されることを明らかにした。



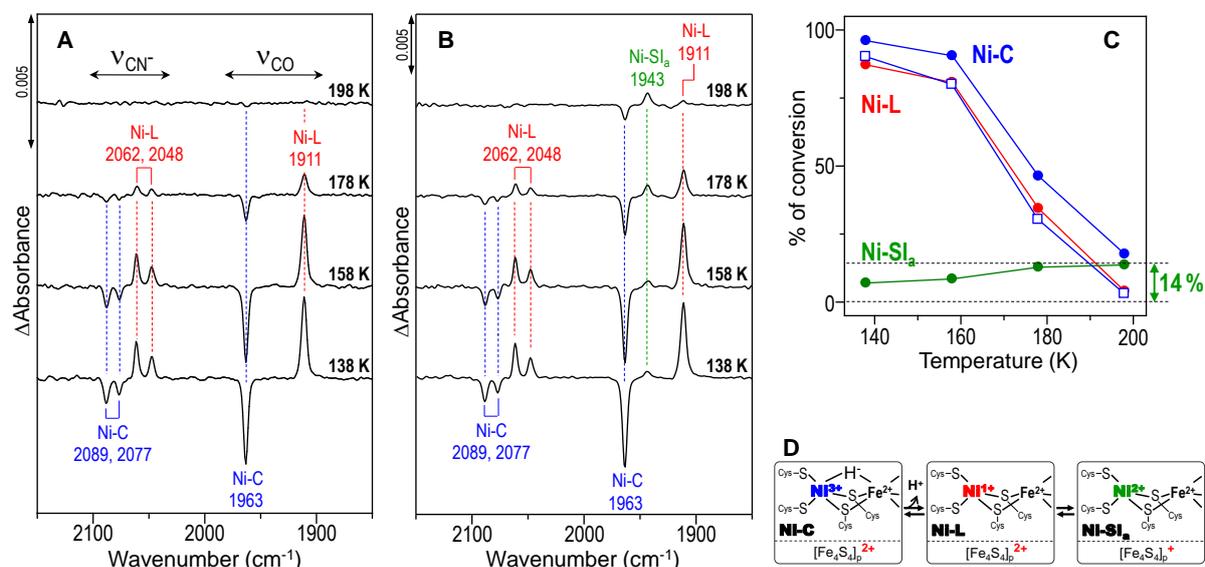
**Fig. 1** Structure of [NiFe] hydrogenase from DvMF (PDB: 1WUL). (A) Overall structure with metals (nickel, iron, and manganese) and  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]_p^{2+/+}$ ,  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]_m^{+/0}$ , and  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]_d^{2+/+}$  clusters highlighted. (B) NiFe active site structure. 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°C 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<sup>+</sup>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/cm<sup>2</sup>)、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  $1963\text{ cm}^{-1}$  の正のバンドは Ni-C 型構造の CO 伸縮振動 ( $\nu_{\text{CO}}$ )、 $1911\text{ cm}^{-1}$  の負のバンドは Ni-L 型構造の  $\nu_{\text{CO}}$  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)<sup>[2]</sup>。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  $1911\text{ cm}^{-1}$  のバンド以外にも、 $1943\text{ cm}^{-1}$  に Ni-SI<sub>a</sub> 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<sub>a</sub> 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<sub>a</sub> 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<sub>a</sub> 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<sub>a</sub> 型構造への変換が多くなった (約 14 % の Ni-C 型が Ni-SI<sub>a</sub> 型構造に変換)。以上より、Ni-L 型構造は Ni-C 型と Ni-SI<sub>a</sub> 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<sub>a</sub> 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<sub>a</sub> 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<sub>a</sub> 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<sub>a</sub> 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<sub>a</sub> 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 H<sub>2</sub>-activated [NiFe] hydrogenase from DvMF between the spectra with and without light irradiation under (A) H<sub>2</sub> and (B) N<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub> (open blue square) and N<sub>2</sub> (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<sub>a</sub> state (closed green circle) under N<sub>2</sub> atmosphere. (D) Proposed conversion mechanism between Ni-C and Ni-SI<sub>a</sub> 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.