

学術賞

金属酵素の結晶構造化学的研究

○緒方 英明

(北海道大学低温科学研究所)

生体内に存在する金属は微量であるが生命活動において重要な役割を担っている。活性中心に金属原子を含む金属酵素は数多く知られているが、それらの反応機構を原子レベルで理解することは重要である。

ヒドロゲナーゼは次の式に示すように水素分子の分解や合成を可逆的に触媒する： $H_2 \rightleftharpoons H^+ + H^- \rightleftharpoons 2H^+ + 2e^-$

[NiFe]ヒドロゲナーゼは、タンパク質分子中で触媒反応を担う中心部分に Ni と Fe 原子から構成される Ni-Fe 活性中心を持っている (図 1)。^{1,3} この酵素が触媒するのは水素分子の分解という単純な反応であるが、その反応機構は複雑である。Ni-Fe 活性中心は様々な酸化還元状態を取るが、それらの状態を単離しその結晶構造や電子状態を明らかにすることによって反応機構を解明してきた (図 2)。

嫌気性微生物由来の[NiFe]ヒドロゲナーゼは酸素雰囲気下では、触媒活性を示さない「不活性 (酸化) 型」になる。この酸化型[NiFe]ヒドロゲナーゼの精密 X 線結晶構造解析 (1.04-1.4 Å 分解能) を行い、Ni(III)と Fe(II) の間に酸素原子種が架橋していることを示した。^{4,5}

さらに、単結晶 EPR (Electron Paramagnetic Resonance) 分光解析では磁場に対して垂直方向に結晶を回転させながら測定することで角度依存性 EPR スペクトルを収集した。これらのデータから結晶中の単位格子に存在する分子の g

値の主軸方向が決まる。[NiFe]ヒドロゲナーゼの場合、空間群 $P2_12_12_1$ で単位格子当たり 4 分子が存在し、これらの分子中の常磁性 Ni(III)の g 値の主軸方向を求めた。さらに単結晶 ENDOR (Electron Nuclear Double Resonance) 法を用いることで、不対電子とプロトンの相互作用を決定した。当初、X-band (9.7 GHz) 測定では大きな単結晶 (1.0×0.5×0.5 mm) と長時間の積算が必要であったが、後に Q-band (34 GHz) で測定することで比較的小さな結晶でも良好なスペクトルを短時間で得ることができた。この単結晶 ¹H-ENDOR 法では Ni 原子と近傍のプロトン (ブリッジ配位子やシステイン残基の C_β プロトン) の超微細結合定数を求めた。結晶母液を D₂O に交換し D₂ ガスで還元後、再酸化するとブリッジ配位子 (図 1 の X) 中のプロトン (¹H) に対応するシグナルが消失していた。

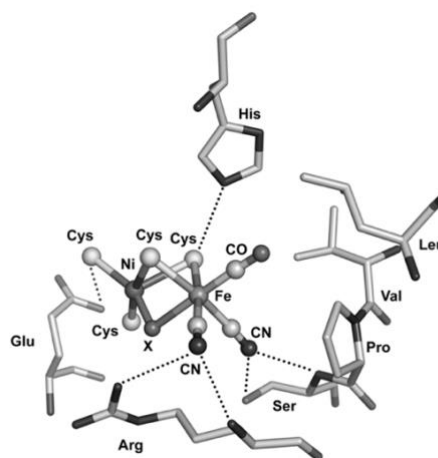


図 1 [NiFe]ヒドロゲナーゼの活性中心の模式図

これらの結果と理論計算から、酸化型 (Ni-A、Ni-B) のブリッジ配位子は OH⁻ 配位子であることが明らかとなった。⁶

不活性な状態のヒドロゲナーゼ酵素を水素還元すると、酵素は水素の分解反応を触媒する「水素触媒反応サイクル」に移行する。⁷この時に OH⁻ブリッジ配位子が Ni-Fe 活性中心から外れることにより「触媒活性型」に移行することを 1.4 Å 分解能での X 線結晶構造解析で示した。⁸

水素触媒反応サイクルにおける Ni-Fe 活性中心の状態には少なくとも 3 つの状態(Ni-SI_a、Ni-C および Ni-R)がある (図 2)。最も還元された Ni-R 状態で水素分子は H と H⁺に分解される。0.89 Å 分解能での超高分解能・超精密 X 線結晶構造解析に加えて、⁵⁷Fe 同位体の核共鳴振動分光法を駆使し、Ni-R 状態では活性中心の Ni(II)と Fe(II)の間にヒドリド (H⁻)が架橋していることを見出した。^{9,10}精密構造解析と核共鳴振動分光法の結果と DFT 理論計算を比較することで Ni 原子は低スピン Ni(II)であることを示した。これらの結果は、タンパク質中の水素原子の位置を正確に捉えた極めて稀な研究成果の一つである。また、Ni-C 状態の単結晶 EPR 分光解析を行い Ni-Fe 活性中心の電子状態を詳細に決定した。

また、水素分子に対する競争阻害剤である一酸化炭素分子 CO が Ni 原子に配位することを結晶構造解析 (1.2 Å 分解能)と共鳴ラマン分光法・EPR 分光法で明らかにした。^{11,12}

以上のようにヒドロゲナーゼの行う反応は複雑であるが、高分解能・精密 X 線結晶構造解析や単結晶分光法を駆使することによって水素触媒反応機構を解明した。

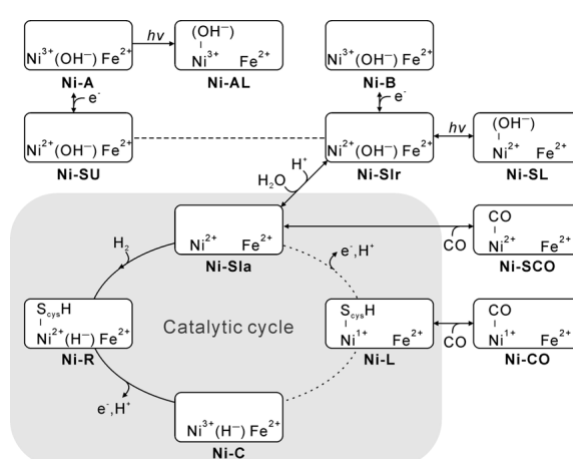


図 2 [NiFe]ヒドロゲナーゼの反応機構

参考文献

- (1) Lubitz, W., Ogata, H., Rüdiger O., Reijerse, E., *Chem. Rev.*, 114, 4081-4148 (2014)
- (2) Pandelia, M.E., Ogata, H., Lubitz, W., *ChemPhysChem.*, 11, 1127-1140 (2010)
- (3) Ogata, H., Lubitz, W., Higuchi, Y., *J. Biochem.*, 160, 251-258 (2016)
- (4) Ogata, H. et al., *Structure*, 13, 1635-1642 (2005)
- (5) Ogata, H., Kellers, P., Lubitz, W., *J. Mol. Biol.*, 402, 428-444 (2010)
- (6) Barilone, J.L., Ogata, H., Lubitz, W., van Gastel, M., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17, 16204-16212 (2015)
- (7) Pandelia, M.E., Ogata, H. et al., *J. Biol. Inorg. Chem.*, 14, 1227-1241 (2009)
- (8) Higuchi, Y., Ogata, H. et al., *Structure*, 7, 549-556 (1999)
- (9) Ogata, H., Nishikawa, K., Lubitz, W., *Nature*, 520, 571-574 (2015)
- (10) Ogata, H. et al., *Nat. Commun.*, 6:7890 (2015)
- (11) Ogata, H. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 11628-11635 (2002)
- (12) Pandelia, M.E., Ogata, H. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1797, 304-313 (2010)