

氏 名	お 緒 方 ひで あき 明
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2631 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	Structural Chemistry of [NiFe] hydrogenase ([NiFe] ヒドロゲナーゼの構造化学的研究)

(主 査)
論文調査委員 教 授 三 木 邦 夫 教 授 伊 藤 維 昭 教 授 井 上 丹

論 文 内 容 の 要 旨

ヒドロゲナーゼは水素を分解して電子やプロトンを経細胞に供給し、余剰の電子やプロトンから水素を合成することで細胞膜内外のプロトン濃度勾配を調節する機能を有するタンパク質である。その触媒反応は $(\text{H}_2 \rightleftharpoons 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-)$ で示される。本触媒機能を使った工学的な応用として、人工的に水素を大量合成する生産システムや新規燃料電池の開発が考えられる。水素は燃焼してエネルギーを取り出しても水が生成されるだけであり、究極のクリーンなエネルギー源として注目を集めている、その開発が実現すれば地球規模の環境問題に大きく貢献するエネルギー供給システムを構築できると考えられている。本論文では、このようなヒドロゲナーゼの立体構造に関する研究を行った。

Desulfovibrio vulgaris Miyazaki F の [NiFe] ヒドロゲナーゼは、これまでに酸化型（不活性型）酵素の立体構造のみが得られていた。酸化型結晶の水素還元および低温回折の実験条件を決定し、分解能 1.4Å、結晶学的 R 値=21.8% という高精度で、水素還元型（活性型）酵素の結晶構造を明らかにした。酸化型および水素還元型の立体構造で異なっていた点は、酸化型酵素において活性部位の Ni と Fe をブリッジしているイオウ配位子の電子密度が、還元型では遊離消失していることであった。これまでに電子伝達体とともに水素還元した酵素から硫化水素が発生することを確認していたが、この実験事実と本構造解析の結果から、還元により発生する硫化水素は、Ni-Fe 活性中心のブリッジ配位子が酵素から遊離されたものであり、この配位子の原子種がイオウ原子であったことが裏付けられた。以上の結果から、ヒドロゲナーゼの反応機構においては活性化サイクルと触媒サイクルが存在し、このイオウブリッジ配位子は活性部位の酸化型と還元型を制御する機能を持つという仮説を提唱した。

ヒドロゲナーゼの触媒反応において、水素との初期反応部位が Ni-Fe 活性部位の Fe であるのか、それとも Ni であるのかは明らかではなかった。そこで、酵素反応の初期反応部位を決定するため、水素の競争阻害剤である一酸化炭素を結合させた「一酸化炭素 (CO) 結合型ヒドロゲナーゼ」の X 線結晶構造解析ならびに共鳴ラマン分光を行った。また、CO を光照射により遊離させた「光解離型ヒドロゲナーゼ」の X 線結晶構造解析も行った。3 つの結晶を用いて、CO 結合型および遊離型の合計 9 つの [NiFe] ヒドロゲナーゼの結晶構造を超高分解能 (1.2~1.4Å) で決定することに成功した。外部から加えられた CO は、暗状態で、Fe ではなく Ni 原子に、ある角度 (135~160°) を持って配位していた。また、結合した CO は 100K の温度では強い白色光を当てることによって効率良く遊離することが明らかになった。電子密度を精密に検討した結果、Ni に配位した CO と Cys546 のイオウ原子の間にわずかな電子密度が残っており、これは CO による阻害過程の途中で基質の水素が補足されている可能性が考えられた。また、CO 結合型と遊離型の (Fo-Fo) を係数とする電子密度図を詳細に検討した結果、Ni 原子と Cys546 のイオウ原子の電子密度のみが CO の結合・遊離の反応で変化することが明らかになった。このイオウ原子は [NiFeSe] ヒドロゲナーゼでは、Se に置き換わっている原子であった。これらの結果より、Ni 原子と Cys546 のイオウ原子が、水素の初期結合反応に最も重要な役割を担うと結論した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、微生物が持つ水素酸化還元酵素、[NiFe] ヒドロゲナーゼの触媒機能を、X 線結晶解析により得られた精密な立体構造から理解することを目的としている。

まず、水素により活性化された還元型 [NiFe] ヒドロゲナーゼの X 線結晶構造解析を行っている。これまでヒドロゲナーゼについては、酸化型（不活性型）の立体構造しか得られていなかったが、ここでは酸化型ヒドロゲナーゼ結晶が、ある水素圧下において効率良く還元されることを酵素化学的に明らかにしている。これらの実験条件を決定することにより、高輝度放射光 X 線を利用して、水素還元型酵素の精密な立体構造解析（1.4 Å 分解能）に成功している。この結果、酸化型と還元型の酵素の全体構造にはほとんど差異は無いものの、還元型酵素は酸化型酵素で同定されていた Ni-Fe 活性中心の単原子イオウブリッジを失っていることを見出している。また、この酸化型のイオウブリッジ原子は水素と化合し、硫化水素として分子外に放出されることを酵素化学的に証明している。これらの結果から、本 [NiFe] ヒドロゲナーゼは、水素の分解および合成の触媒反応を遂行する前に、酵素自身を活性化させる「活性化サイクル」を有することを示している。これはこの酵素の初期反応機構を理解するために重要であり、本酵素の分光学的な研究の発展に大きく貢献するものである。

酸化型および還元型（活性型）酵素の立体構造が解明されたが、活性部位にある 2 個の金属原子、Ni および Fe のどちらが触媒機能に対して、より重要な役割を果たすかは不明であった。そこで、ヒドロゲナーゼの基質である水素の競争阻害剤である一酸化炭素（CO）の結合および遊離の準ダイナミクスを、超高分解能の X 線結晶構造解析で決定した立体構造に基づいて CO の結合位置を決定することによって調べるという課題に取り組んでいる。CO 結合型の結晶解析を成功させるため、まず共鳴ラマン分光法により CO の結合遊離の条件を検討している。その結果、3 つの結晶を用いて CO 結合型、CO 遊離型およびその中間型の結晶構造を得ることに成功している。その結果、(1) CO は Ni 原子にのみ結合すること、(2) その結合は「直線的」ではなく「曲がった配位」であること、(3) CO は 100K 程度の低温度では「可視光」によってのみ効率的に遊離されることなどを見出している。タンパク質中の Ni 原子の外部 CO との配位構造およびその光による挙動を結晶学的に示したのは初めての例と思われる。さらに CO の結合と可視光による遊離の反応を同一の結晶において観察することにも成功している。その結果、Ni 原子とそのひとつのアミノ酸配位子（システインのイオウ原子）が、CO の結合、遊離によって電子密度を変化させることを明らかにしている。これらの知見は今後モデル化合物などの設計、合成研究にとって重要なものであり、未来のエネルギーとしての水素の利用を目指した研究にも寄与するものと評価できる。

以上のようにこれらの研究成果は、当該分野の進展に確かな寄与があるものであり、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認められる。論文内容とそれに関連する分野について試問した結果、合格と認めた。