ヒドロゲナーゼの超高分解能X線結晶構造解析

マックスプランク化学エネルギー変換研究所 緒方英明

Hideaki OGATA: High Resolution Crystal Structure Analysis of [NiFe] Hydrogenase

Hydrogen is known as an ultimate clean energy source and is thus discussed as a future sustainable energy carrier. Hydrogenases catalyze the reversible oxidation of the molecular hydrogen. We report the crystal structure analysis of [NiFe] hydrogenase from sulfate reducer at subatomic resolution. The structure reveals that the hydride bridge between nickel and iron at the active site and the possible proton bound site at the cysteine residue, resulting from the initial heterolytic splitting of dihydrogen by the enzyme. This finally clarifies the initial step in the mechanism of hydrogen conversion.

1. はじめに

ヒドロゲナーゼは多くの微生物がもつ金属酵素で、水素分子の分解や合成を触媒する。^{1,2)} その水素触媒能力は高価なプラチナなどを用いた化学触媒と同等以上の効率とされる。この酵素を模範にした安価な人工触媒や燃料電池の開発への応用も含めてさまざまな基礎研究が進められている。

ヒドロゲナーゼは活性中心を構成する金属種により主に3つのタイプが知られている([NiFe], [FeFe]と[Fe]ヒドロゲナーゼ)。図1Aに示すように、[NiFe]ヒドロゲナーゼはその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([NiFe]活性中心)をもっている。^{3,4)} この[NiFe]活性中心は4つのシステイン残基によって支えられている構造をもっている。このうちFe原子には2つのシアン化物イオン(CN⁻)と1つの一酸化炭素(CO)が配位している(図1B)。[NiFe]ヒドロゲナーゼには、酸素耐性型と酸素感受性型(標準型)の2種類がある。どちらも[NiFe]活性中心はほぼ同じであるが、近位の鉄硫黄クラスターが大きく異なっている。⁵⁾ 酸素耐性型では特異な[4Fe3S]クラスターが6つのシステイン残基によって保持されているのに対し、標準型は通常の[4Fe4S]クラスターである。

標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼを空気中にとりだすと、[NiFe]活性中心は触媒活性を示さない「不活性型」になる。不活性型は、Ni原子とFe原子の間にヒドロキシ(OH⁻)イオンが結合しており、さらにNi原子周辺の部分も酸素原子の修飾を受けて複雑な構造(例えばシステイン残基がスルフィン化されている)をもっている。^{5,6)} この酸化状態を水素で還元すると、OH⁻配位子が外れ触媒活性を示す「活性型」と呼ばれる構造に変化し、酵素は水素の分解と合成反応を触媒する「水素触媒サイクル」

に移行する。実際に、この水素活性化後の還元状態ではOH⁻配位子が外れることが1.4 Å分解能で解析された結晶構造から明らかになっている。^{7,8)} しかし、この分解能ではブリッジ配位子に水素原子種が配位しているのかどうかまでは決定できなかった。

水素触媒サイクル(図1B)における[NiFe]活性中心の状態には少なくとも3つの状態があることがわかっていく(図1BのNi-S1a, Ni-CおよびNi-R)。また、Ni-C状態ではNi(II)とFe(II)の間にヒドリド(H⁻)がブリッジ配位していることが電子常磁性共鳴法(EPR)によって示唆されていた。⁹⁾ この状態からさらに1電子還元されるとNi-R型となる。この最も還元されたNi-R型はフーリエ変換赤外分光法(FTIR)によって3つのサブフォーム(Ni-R1, Ni-R2およびNi-R3)が存在することが知られている。¹⁾ このように[NiFe]活性中心は、さまざまな酸化還元状態をとるが価数が増えるのはNi原子だけであり、Fe原子はすべての状態で低スピンFe(II)である。

ヒドロゲナーゼの触媒メカニズムを理解するためには、これらさまざまな状態の詳細な構造情報が重要である。これまでNi-R型はH⁻がブリッジ配位すると類推されていたが、詳細な構造はほとんど不明であった。X線結晶解析では、電子を1個しかもたない水素原子を見るには1 Å分解能を超える超高分解能で、しかも超高精度で分子構造を決定する必要がある。

そこで今回の研究では、硫酸還元菌*Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F株の[NiFe]ヒドロゲナーゼについて、Ni-R型の三次元立体構造を明らかにすることを目指した。嫌気条件化で得られた結晶を用いることでNi-R1型の[NiFe]ヒドロゲナーゼのX線結晶構造を0.89 Å分解能で決定することができた。¹⁰⁾ また、鉄同位体(⁵⁷Fe)を用いた核共鳴振動分光法(NRVS: Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopy)法によって、Ni-R1型のFe原

図1 (A) [NiFe] ヒドロゲナーゼの全体構造. (B) ヒドロゲナーゼの反応機構. (Structure and reaction mechanism of [NiFe] hydrogenase.) [NiFe] 活性中心は酸化型 (不活性型) から水素によって活性化されると触媒サイクル (Ni-SI_a, Ni-C または Ni-R) に移行する. Ni-R 型が最も還元された状態である.

子の振動状態を観測した. NRVs は Nuclear inelastic scattering (NIS), Nuclear inelastic absorption (NIA), または Nuclear resonant inelastic X-ray scattering (NRIXS) と呼ばれる. さらに, モデル化合物の NRVs スペクトルや密度汎関数理論 (DFT: Density Functional Theory) 計算などの結果を比較することによって, [NiFe] 活性中心における Ni-H⁻-Fe の振動状態を見出すことができた.¹¹⁾

本稿では, 放射光を用いた高分解能X線結晶構造解析と核共鳴振動分光法によって明らかとなった [NiFe] 活性中心の詳細な構造について紹介する.

表1 結晶構造解析の統計値. (Data collection and refinement statistics.)

データ名	Ni-R _{UH}	Ni-R _H
PDB ID	4U9H	4U9I
Data collection		
Wavelength (Å)	0.91841	0.91841
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit-cell parameters	66.53, 97.95, 125.85	63.85, 99.69, 122.19
Resolution (Å)	52.9-0.89 (0.91-0.89)	49.2-1.06 (1.09-1.06)
No. of observed reflections	9519061	1759243
No. of unique reflections	1167454	648452
R _{merge}	0.069 (0.940)	0.040 (0.646)
Completeness (%)	95.8 (84.4)	94.8 (78.1)
<I/σ(I)>	16.5 (1.1)	12.0 (1.3)
Redundancy	8.2 (2.8)	2.7 (2.0)
CC _{1/2} (%)	99.9 (50.0)	99.9 (53.4)
Wilson B factor (Å ²)	7.6	8.6
Refinement		
Resolution	37.6-0.89	49.2-1.06
R/R _{free} (%)	9.6/10.6	11.0/13.2
No. of residues	798	798
No. of solvent molecules	922	786
r.m.s.d. bond lengths (Å)	0.014	0.014
r.m.s.d. bond angles (°)	1.658	1.511
Average B (Å ²)	12.3	13.5
Protein	10.1	11.3
Solvent	23.1	24.9
Ligands	5.1	6.7
Ramachandran plot statistics (%)		
Preferred regions	97.5	97.6
Outlier regions	0.0	0.0

2. 高分解能X線結晶構造解析

2.1 精製・結晶化

標準型 [NiFe] ヒドロゲナーゼは酸素雰囲気下で容易に不活性化される. 空气中で精製した場合, 精製サンプルは不活性型であるいくつかの酸化状態の混合物である. またこの場合, [NiFe] 活性中心が酸素原子種で修飾されている結晶構造がいくつか報告されているが詳細は不明である. 酸素に触れないように培養・精製すれば, これらの酸素原子種による修飾を防ぐことができると考え, 本研究では菌体培養から精製標品の結晶化までの操作をすべて嫌気条件下で行った.

偏性嫌気性細菌 (*Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F) の培養は 50 L の培養装置を用い, 常に窒素ガスを充填することで嫌気条件 (酸素濃度 0%) を満たした. 菌体破碎から精製・結晶化までの段階は嫌気チャンバー内で行った. 結晶化サンプルの酸化還元状態は FTIR スペクトルを測定し, 結晶化前後の酸化状態を確認した. 結晶化に用いた沈殿剤 2-メチルペンタン-2,4-ジオール (MPD) は, 終濃度 33% で抗凍結剤として十分に機能した. 嫌気チャンバー内で結晶を液体窒素で凍結し, 回折実験ま

で保存した。

2.2 回折データ測定

回折データ測定は放射光施設 BESSY II (ベルリン) のビームライン BL14.2 を用いた。X 線ビームサイズは約 0.1×0.1 mm で X 線の輝度は約 10^{12} photon s⁻¹ である。検出器は Rayonix225 を用いた。X 線の波長は最大輝度となる 0.91841 Å を選択した。結晶 (約 $0.2 \times 0.2 \times 2.0$ mm) をクライオループ (0.4 mm) に載せ 100 K で測定した。凍結した結晶化母液やクライオループからのバックグラウンドノイズを低減するため、クライオループからはみ出した部分の結晶に X 線を照射してデータ測定を行った。

まず最初に 1 つの結晶から低分解能側の 4 データセット (1.8 Å 程度まで) を収集した。これらはそれぞれ振動角 100 ~ 125 度ごとに X 線の照射位置をずらした。これは、水素原子による回折の情報は低角側の回折点におもに反映されるため、データの冗長度を上げることによってこれらの回折点の強度を精確に決定するためである。例えば、0.89 Å 分解能データの低角側 52.9 ~ 3.98 Å までの観測した反射数は 221201、そのユニーク反射数は 13605 であり冗長度は 16.3 である。1.06 Å 分解能データでは 49.2 ~ 4.74 Å までの観測反射数は 48517、ユニーク反射数は 7606 であり冗長度は 6.4 である。冗長度が高いほど水素原子の電子密度が見えやすいようである。X 線による結晶の損傷を最小限に抑えるために、低分解能側の測定時のみ減衰器を用いた。その後、高分解能側データを収集した。その際、約 30 度の振動角ごとに結晶を平行移動しデータを測定した。

これらの回折データを XDS で指数付け・積分したのち、XSCALE ですべてのデータセットをスケールした。最終的に分解能 0.89 Å のデータを収集できた。Karplus ら¹³⁾ によると CC_{1/2} が最高分解能側で約 0.1 まで有為なデータとして精密化するべきと提案されているが、現在まで分解能を決める一義的な基準はない。本研究では、CC_{1/2} の高角側の値が 0.5 を超えたところでデータの完全性が非常に低くなったので分解能を 0.89 Å までとした。金属原子 (Ni や Fe) の異常分散効果は今回用いた X 線波長域では非常に小さいが、Friedel 対の反射は独立した反射として扱った。また、異なる分解能による電子密度 (特に水素原子の電子密度) の見え方を検討するため、別の結晶を用いて分解能 1.06 Å のデータを収集した。

2.3 構造精密化

初期位相決定は PHESER を用いモデル分子として [NiFe] ヒドロゲナーゼの構造 (PDB 1WUI)⁶⁾ を選択し分子置換を行った。構造精密化にはプログラム PHENIX を用いた。¹²⁾ アミノ酸の水素原子はライディングモデルとして扱った。1.5 Å 分解能までは等方性温度因子の精密化を行い、1.3 Å 分解能以上の精密化では異方性温度

表2 活性中心の原子間結合距離と温度因子 (B)。 (Bond distances of the [NiFe] active site.)

	Bondlength (Å)	Esd (Å)	B (Å ²)	B (Å ²)
Ni-Fe	2.5734	0.0022	Ni: 4.55	Fe: 4.16
Fe-CO	1.7529	0.0072		C: 4.49
Fe-CN1	1.8776	0.0071		C: 4.40
Fe-CN2	1.9100	0.0074		C: 4.89
Ni-SC81	2.2379	0.0026		S: 4.43
Ni-SC84	2.2124	0.0026		S: 4.26
Ni-SC546	2.1797	0.0028		S: 7.03
Ni-SC549	2.5391	0.0026		S: 4.72
Fe-SC84	2.2595	0.0029		
Fe-SC549	2.3142	0.0028		

因子を導入し精密化を進めた。この段階で金属原子と硫黄原子の異常分散効果も含めて精密化した。金属原子は Fe (II), Ni (II), Mg (II) の散乱因子を使って計算した。1 Å を超える分解能の精密化の場合、散乱因子は PHENIX のライブラリ中にある Wt1995 モデルを用いた。精密化最終段階では、マルチコンフォーマーや水素原子の配向などをチェックした。水分子は Fo-Fc オミットマップ ($\sigma = 2.0$) 上で水素原子が見えている場合、その水素をモデルに組み込んで精密化した。最終的に、結晶学的信頼度因子 R 値, R_{Free} 値はそれぞれ 9.6/10.6 (0.89 Å のデータ) と 11.0/13.2 (1.06 Å のデータ) に収束した。

PHENIX には超高分解能データの精密化用に IAS 法 (Interatomic Scatters) という電子密度図の改良方法がオプションとしてあるが、本研究のデータでは分解能が不足しているのか、この方法では結合電子に対する擬似散乱モデルが精密化できなかった。

精密化を終えた座標データを使って、プログラム SHELXL で Least-Square 計算を行い原子間結合距離の誤差を見積もった。[NiFe] 活性中心は球状分子の中心部分に位置しているので、温度因子は周辺の原子と比べて有意に低い値が得られ、Esd (Estimated standard deviation) の値も小さくなった (表2)。

3. 高精度の構造解析

[NiFe] 活性中心の Fe 原子に配位している CO と CN⁻ 配位子は電子数が等しいため電子密度図上からは区別が難しい。実際、Fo-Fc オミットマップを計算し、炭素、酸素、窒素原子の平均電子密度と温度因子の相関を見ると、アミノ酸の炭素、酸素、窒素原子は温度因子が低い場合 (約 10 Å²)、それぞれ区別できた (各原子の温度因子を横軸に、平均電子密度を縦軸にとり分布を調べることでわかる)。しかし CO と CN⁻ 配位子の酸素と窒素原子は区別できなかった。そこで、これらの配位子の Fe 原子との結合距離を比べたところ、鉄-炭素間の結合距離は Fe-CO は 1.75 Å, Fe-CN⁻ は 1.88 Å または 1.91 Å で有為な違いがあり、これら 2 原子配位子を明確に区別する

図2 水分子の電子密度図。(Electron density of the water molecules.) 大サブユニットのC末端のMgイオン周辺には水分子が配位してる。水素原子の電子密度図から水分子の配向を決定した。

図3 水素原子の電子密度図。(Electron density of the hydrogen atoms.) 例としてGly555の電子密度を示した。H_xはX線回折のライディングモデル、H_Nは中性子回折のライディングモデルである。HはFo-Fcオミットマップから得られた電子密度のピーク位置を表す。数値の単位はÅ。

ことができた(表2)。また、Ni-Fe間の距離は2.57 Åであり、これは弱い金属-金属結合を形成していると示唆された。

水分子の水素原子の電子密度も見える範囲で同定した。水素原子が同定できた水分子のほとんどはアミノ酸との水素結合を作っているものであった。一例として、大サブユニットのC末端に位置しているMgイオン周辺に配位している水分子の水素原子の電子密度を図2に示す。これらの水分子は周辺のアミノ酸と水素結合により安定化されていることがわかった。

中性子回折では原子核の位置を決定でき、X線回折では電子密度分布を決定できる。水素に比べて重い原子(例えば炭素など)に結合した水素の電子密度のピークが重い原子側に現れることが知られている。¹⁴⁾ 図3に示すように、水素原子の電子密度のピークは中性子回折で

決定される核-核距離よりも約0.2 Åほど結合原子側に近い場所に見出された。この電子密度のピークはX線回折での水素原子のライディングモデルからもわずかにずれた位置(約0.1 Å)に見出される場合が多かった。

4. [NiFe]活性中心におけるヒドリドの検出

一般に、X線結晶構造解析では金属原子近傍の原子を検出することは難しい。これは、電子密度図上に現れるフーリエ変換の副極大の影響(Fourier truncation ripple: 以下リップルノイズと呼ぶ)を受けるためであり、その影響の程度は回折データの分解能と原子の温度因子に依存することが知られている。^{15,16)} 例えば、ニトロゲナーゼのFeMocoクラスターの解析において、1.16 Å分解能では、鉄原子に囲まれている中心部分は空であると報告されたが、その後のより高分解能(1.0 Å)の結晶構造では炭素原子が配位していることが示された。¹⁶⁾ これは、1.16 Å分解能データでは中心部分の電子密度が、本来あるべき炭素原子の電子密度と、その配位子である6つのFe原子によって引き起こされたリップルノイズによってちょうど打ち消しあってしまったからである。このように重原子近傍の電子密度にはリップルノイズの影響が大きいのでは注意しなければならない。Fo-Fcマップは2Fo-Fcマップよりリップルノイズの影響を受けにくいとされている。そこで、本研究では異なる結晶からのデータ、かつ、異なった分解能のデータ由来のFo-Fcマップ上の電子密度を注意深く比較した。

0.89 Å分解能のデータから、[NiFe]活性中心のNi原子近傍の50アミノ酸残基の水素原子(378個)のうち、約350個を電子密度図上で確認することができた。さらに、Ni原子とFe原子をブリッジしている第3ブリッジ配位子に相当する位置と、システイン残基(Cys546)のS原子付近にそれぞれ小さな電子密度があり、水素原子の相対的電子密度を比較することによって、これらがヒドリド(H⁻)とプロトン(H⁺)であることを見出した(図4)。Ni原子とH⁻との距離は1.58 Å、また、Fe原子とH⁻の距離は1.78 Åであり、H⁻ブリッジ配位子は非対称に配位していた。また、水素原子の相対的電子密度と温度因子の相関を調べたところ、[NiFe]活性中心近傍のアミノ酸の水素原子については相対電子密度の平均値が3.2であったのに対し、ブリッジ配位子の相対電子密度は6.7と約2倍の値となり、システイン残基に配位している水素原子の相対電子密度は4.5であった。また1.06 Å分解能のデータにおいても、ほぼ同様の電子密度が得られたので、リップルノイズによる影響はないと示唆された。この分解能で水素原子の電子密度を見るには、低分解能側データの長い冗長度と、各アミノ酸ごとにFo-Fcオミットマップを逐次計算することが効果的であった。

Ni(II)原子のスピン状態は、低スピンまたは高スピ

図4 [NiFe]活性中心の構造。(Structure of the [NiFe] active site.) 数値は結合距離(Å)を表す。電子密度図はFo-Feオミットマップ(6 σ カットオフ)で、水素原子のみを示した。

図5 Ni原子の配位構造。(Geometry of the Ni site.) (A) Ni-R型の結晶構造から得られた結合距離(Å)と角度(°)を示す。(B) DFT計算から得られたNi-C型の構造。¹⁷⁾

ンのどちらの状態をとっているのかこれまでの分光学的実験や理論計算ではどちらの可能性も示唆されており、はっきりとわかっていなかった。そこでNi原子に配位しているS原子との結合距離をみると、4つのS原子のうちCys549のみ結合距離(2.54 Å)が長くなっていることが示された(ほかの硫黄原子は2.3 Å以下であった)。図5に示すように、Niに配位している3つのシステイン残基とH⁻と、ブリッジ配位しているシステイン残基(Cys549)によって、Ni原子の配位構造は四角錐形を構成していた。これによってNi原子が低スピン状態であることが示唆された(次章参照)。

水素分子が分解され生じたプロトンは、[NiFe]活性中心から分子表面へと移動すると考えられる。EPR分光法によって、Ni原子に配位している4つのシステイン残基のうちの1つがこのプロトンの最初のアクセプターであると予想されていた。図4に示すようにFo-FeオミットマップからCys546のS原子の近傍に電子密度が観測された。このピークとS原子までの距離は約1.1 Åであり、S-H結合の理論値1.2 Åと非常に近い値であった。このことからCys546がプロトンの最初のアクセプターであることがわかった。

5. 核共鳴振動分光法NRVSによるFe-ヒドリドの振動状態

5.1 ⁵⁷Fe核共鳴振動分光法

結晶構造解析とは少し話題が離れるが、放射光を用いた核共鳴振動分光法によりFe-H⁻の振動状態の観測に成功したので紹介する。

最も還元された状態であるNi-R型ではNi原子はNi(II)であるためEPR分光法では観測できず、その電子状態はほとんど明らかになっていなかった。また、FTIR分光法で直接Fe-H⁻の振動状態を検出するのは非常に難しい。そこで近年生体分子での研究が進んできた核共鳴振動分光法NRVSを用い、Ni-R型の活性中心の振動状態を明らかにすることを目指した。

NRVS法は原子核の共鳴単位のエネルギーに近いX線を照射し、フォノンの生成消滅を伴う原子核励起を起こすことにより特定の原子の振動状態を調べる分光法である。¹⁸⁾これはシンクロトロン放射光の利用により初めて測定可能になった方法である。NRVSの利点は、共鳴ラマン分光法や赤外分光法と比較して遷移禁則がないためすべての状態を測定することが可能である点である。これまでにヘム鉄、ハロゲナーゼSyrB2、ニトロゲナーゼや[Fe]ヒドロゲナーゼなどで活性部位におけるFe-リガンドの振動状態の先行研究が報告されている。¹⁸⁻²¹⁾

NRVS法ではメスバウアー法と同様にFe同位体(⁵⁷Fe)の試料が必要となるが、本研究では硫酸鉄(⁵⁷FeSO₄)と最小培地を用いてガラス培養装置(10 L)で菌体培養し精製した[NiFe]ヒドロゲナーゼを用い、NRVS実験を行った。精製は空気中で行ったためNi-R型の試料としてH₂で還元したものとD₂で還元したものを準備した。NRVSデータは主にSPRING-8のビームラインBL09XUとBL19LXUで収集した。

5.2 Fe-H⁻の振動状態¹¹⁾

[NiFe]ヒドロゲナーゼのNRVS測定に先立って、[NiFe]活性中心を模したモデル化合物のNRVS測定とそのDFT計算を行ったところ、Ni-H⁻-FeのWagモード(対称面外変角縦揺れ)が存在することが予想された。

モデル化合物と異なり、[NiFe]ヒドロゲナーゼの場合、分子内のFe原子が多くNRVS測定においてFe-リガンドのNRVSシグナルが重複してしまう可能性があった。しかしながらFeSクラスターのFe原子のNRVSシグナルと、[NiFe]活性中心のFe-CO、CN⁻のNRVSシグナルはうまく分離していたので大きな問題にはならなかった。FeSクラスターのFe原子の振動モードは<420 cm⁻¹に見出された。図6に示すように[NiFe]活性中心の振動モードは>420 cm⁻¹の高エネルギー側に現れ、Fe-CN⁻やFe-COの伸縮モード、Fe-C-Oの変角モードを観測できた(420 ~ 640 cm⁻¹)。さらに高エネルギー側

図6 (A) Ni-R型 [NiFe] ヒドロゲナーゼのNRVSスペクトル。(NRVS spectra and DFT calculated normal mode.) 実線はH₂で還元した試料, 点線はD₂で還元した試料のスペクトルである。(B) DFT計算による675 cm⁻¹に対応する振動モード解析. 矢印は振動方向を表す.

(> 640 cm⁻¹) に微小なNRVSシグナルを観測することに成功した. このシグナルはH₂またはD₂で還元した試料のデータを比較することにより明確に確認できた. これらのスペクトルとDFTによるスペクトル計算を比較することによって, 次に述べるようにFe配位子の詳細な振動状態を得ることができた.

DFT計算では, さまざまな[NiFe] 活性中心モデルを作製し, それらを構造最適化したもの(Ni原子の高スピン状態と低スピン状態をそれぞれ作製した)を用いてNRVSスペクトルを計算した. これらのモデルのうち, Ni原子が低スピン状態でH⁻ブリッジ配位子とシステイン残基のS原子にプロトンが配位しているモデルが最もよくNRVSスペクトルを再現できた. このモデルはX線構造解析で得られた結果とほぼ一致した. 図6に示すように, NRVSシグナル(675 cm⁻¹)に対応する振動モード解析の結果, このシグナルはNi-H⁻-FeのWagモードに由来することがわかった.

6. おわりに

超高分解能X線結晶構造解析と核共鳴振動分光法により, [NiFe] ヒドロゲナーゼのNi-R型の活性中心の詳細な立体構造と振動状態を明らかにすることができた. 今回構造解析された[NiFe] ヒドロゲナーゼのNi-R型の[NiFe] 活性部位では, ヒドリドイオンが第3配位子としてFe原子とNi原子をブリッジし, Niに配位しているCys546のS原子がプロトン化されていたが, この結果はこれまでに報告されていた理論(DFT) 計算の結果とよく合致した. またNRVS法により[NiFe] 活性中心におけるFe原子の振動モード(特にNi-H⁻-FeのWagモード)が初めて明らかとなった.

謝 辞

本研究は西川幸志博士研究員(現兵庫県立大学大学院生命理学研究科 助教), Wolfgang Lubitz教授(MPI CEC), また, NRVS実験はStephen Cramer教授(UC Davis) らとの共同研究により達成できた. また樋口芳樹教授(兵庫県日本結晶学会誌 第57巻 第6号 (2015)

立大学大学院生命理学研究科) にはヒドロゲナーゼ研究において長年にわたり助言をいただいた. この場を借りて関係者の皆様に感謝の意を表します.

文 献

- 1) W. Lubitz, H. Ogata, O. Rüdiger and E. Reijerse: *Chem. Rev.* **114**, 4081 (2014).
- 2) H. Ogata, W. Lubitz and Y. Higuchi: *Dalton Trans.* 7577 (2009).
- 3) Y. Higuchi, T. Yagi and N. Yasuoka: *Structure* **5**, 1671 (1997).
- 4) A. Volbeda, *et al*: *Nature* **373**, 580 (1995).
- 5) Y. Shomura, K. S. Yoon, H. Nishihara and Y. Higuchi: *Nature* **479**, 253 (2011).
- 6) H. Ogata, *et al*: *Structure* **13**, 1635 (2005).
- 7) Y. Higuchi, H. Ogata, K. Miki, N. Yasuoka and T. Yagi: *Structure* **7**, 549 (1999).
- 8) 樋口芳樹: 日本結晶学会誌 **43**, 227 (2001).
- 9) M. Brecht, *et al*: *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 13075 (2003).
- 10) H. Ogata, K. Nishikawa and W. Lubitz: *Nature* **520**, 571 (2015).
- 11) H. Ogata, *et al*: *Nat. Commun.* **6** (7890) doi: 10.1038/ncomms8890 (2015).
- 12) P. D. Adams, *et al*: *Acta Cryst.* **D66**, 213 (2010).
- 13) P. A. Karplus and K. Diederichs: *Science* **336**, 1030 (2012).
- 14) J. Gruene, *et al*: *J. Appl. Cryst.* **47**, 462 (2014).
- 15) P. V. Afonine, *et al*: *Acta Cryst.* **D60**, 260 (2004).
- 16) E. M. Burger, S. LA Andrade and O. Einsle: *Curr. Opin. Struct. Biol.* **35**, 32 (2015).
- 17) T. Krämer, *et al*: *ChemBioChem* **14**, 1898 (2013).
- 18) 太田雄大, 瀬戸 誠: 日本結晶学会誌 **56**, 329 (2014).
- 19) S. D. Wong, *et al*: *Nature* **499**, 320 (2013).
- 20) A. D. Scott, *et al*: *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 15942 (2014).
- 21) Y. Guo, *et al*: *Inorg. Chem.* **47**, 3969 (2008).

プロフィール

緒方英明 Hideaki OGATA
マックスプランク化学エネルギー変換研究所
Max Planck Institute for Chemical Energy Conversion
Stiftstrasse 34-36, D45470 Mülheim an der Ruhr,
Germany
e-mail: hideaki.ogata@cec.mpg.de
最終学歴: 京都大学大学院理学研究科, 博士課程
専門分野: タンパク質の結晶構造解析
現在の研究テーマ: 金属タンパク質の構造解析