最近の研究から

ヒドロゲナーゼの Ni-Fe 活性中心の特異な配位子構造

京都大学大学院理学研究科 樋口芳樹

静岡大学 八木達彦

姫路工業大学理学部 安岡則武

Yoshiki HIGUCHI, Tatsuhiko YAGI, Noritake YASUOKA : Unusual Ligand Structure of The Ni-Fe Active Center in Hydrogenase

The x-ray structure of the hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F has been solved at 1.8 Å resolution, and refined to a crystallographic *R*-factor of 0.229. The high resolution crystal structure enabled us to assign the non-protein ligands to Fe atom in the Ni-Fe site, and revealed the presence of a Mg center. From the nature of the electron density map, stereochemical geometry, and atomic parameters of the refined structure, the most probable candidates for the four ligands have been proposed to be diatomic SO, CO, CN molecules and one sulfur atom.

1. はじめに

我々は、これまで硫酸還元菌の水素代謝に関するいろいろなタンパク質のX線結晶構造解析を手がけてきた。この水素代謝システムで中心的な役割を持つ酵素・ヒドロゲナーゼは、菌体内の多種多様な酸化還元反応による余剰の電子をプロトンに与え、水素を合成して菌体外に放出する。また逆に水素を分解して、菌体膜周辺のプロトン濃度の調節も行っている。これらの働きは、エネルギー代謝を円滑に進めるために重要であり、菌体の生命維持のメカニズムのうち最も重要な役割を担っていると考えられている。この酵素の働きを工業的な視点から見ると、プロトンから水素を合成する反応は、水素の生産システムとして利用可能である。現代の主要なエネルギー源である石油と比較して、水素は燃焼しても最終的に水が生成されるだけで、最もクリーンなエネルギー源のひとつであろう。このヒドロゲナーゼの立体構造が解明され水素代謝のメカニズムの本質が明らかとなれば、硫酸還元菌の特殊なエネルギー代謝機構の解明だけでなく、人工ヒドロゲナーゼの工業的な生産にも道を拓き、地球の環境問題に大きく貢献すると期待できる。

以下にヒドロゲナーゼの立体構造解明に至った経緯と、その結果活性部位の金属中心に見つかった奇妙な配位構造について紹介する。

2. ヒドロゲナーゼの分子構造解明まで

水素酸化還元酵素・ヒドロゲナーゼは、今世紀の前半に微生物中に見出された。その活性部位は、1980年代まで鉄-イオウのクラスターのみであると考えられていた。その後、Ni原子が水素代謝に関係していることがEPRの測定から示唆され、さらにNi原子の横に単独のFe原子が、また、その近くにMg原子が存在することがX線結晶解析によりはじめて確認された。ヒドロゲナーゼは、その活性部位の金属中心の構成から大別して、Fe型、Ni-Fe型、Ni-Fe-Se型の3種類であり、それぞれに膜結合性と水溶性の両方が見つかっている。本研究の酵素はこのうちNi-Fe型のグループに属し、膜結合性で、ヘテロダイマー構造をとり、分子量は91258である。生理的な電子伝達体は、4ヘムタンパク質のチトクロム c_3 であり、すでに3次元構造を解明している^{1),2)}表1にヒドロゲナーゼの特

表1 *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki Fのヒドロゲナーゼ
(Some properties of hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F.)

タイプ	Ni-Fe型, 膜結合性 (18残基のアンカー)
サブユニット構造	α (小) β (大) (ヘテロダイマー)
アミノ酸数	267 + 566 = 833
分子量	28763 + 62495 = 91258
等電点	6.2
活性部位	Ni-Fe 金属中心 (SO, CO, CN, S 配位子)
電子伝達中心	(Fe ₄ S ₄) × 2, Fe ₃ S ₄ × 1
金属原子	Ni × 1, Fe × 12, Mg × 1
電子伝達体	チトクロム c_3

徴をまとめて紹介する。Ni-Fe 活性中心のFe 原子には、3本の非タンパク質配位子が結合していることも分かってきた。この結果は、我々とヒドロゲナーゼの結晶構造解析の一番乗りを争ったフランス・グルノーブルのX線のグループによる2.85 Å 分解能の電子密度図上での発見であった。^{3), 4)} 昨年、その情報をもとにオランダの分光学のグループがFe 原子への配位子が2本のCN 分子と1本のCO 分子であると同定した。⁵⁾ 我々は1.8 Å 分解能という高分解能を武器に独立に構造解析および精密化を続け、3本のうち1本はこれまで生体分子には見られなかったSO 分子であり、また、もう1本Fe 原子とNi 原子をブリッジする単原子S 配位子があること、さらにMg 原子が1個含まれていることを見出した。⁶⁾

3. X線結晶構造解析

3.1 精製, 結晶化

硫酸還元菌, *Desulfovibrio vulgaris* (D. v.) Miyazaki F, から菌体膜成分を精製したのち、トリプシンにより膜結合

性ヒドロゲナーゼを可溶化抽出した。その後、数ステップのカラムクロマトグラフィーにより純品とした。この酵素は非常に不安定で、溶液状態では低温でも通常の酸素雰囲気下では1-2週間で、また嫌氣的に保存しても2-3週間で変性分解される。結晶状態でも2-3週間で回折斑点を与えなくなり、まさに使い捨ての繰り返しであった。結晶化は蒸気拡散法で行い、沈殿剤には、2メチル2,4ペンタンジオール、あるいは、ポリエチレングリコール1000を用いた。⁷⁾ この時マイクロシーディング法が必須であった。約10日間で0.5×0.5×1.0–5.0 mmの大きさの結晶が得られ、結晶の空間群は、どちらの沈殿剤からも $P2_12_12_1$ に属するものが得られた。結晶の回折分解能は非常に良かったが、格子定数は結晶ごとに有意な違いがあり、この同形性の乱れがその後の構造解析に大きな支障をきたした。1.8 Å 分解能の構造精密化に用いた結晶の格子定数は、 $a = 101.5$, $b = 126.5$, $c = 66.5$ Åであった。

3.2 回折データの収集, 構造解析, 構造精密化

回折データの測定は、高エネルギー物理学研究所・放

表2 結晶構造解析および精密化の統計 (Data Collection and refinement statistics.)

回折データ (ネイティブ結晶) $\lambda=1.000\text{\AA}$		20.0-1.80 (Å)				
測定反射数		251,414				
独立な反射数 (完全性%)		63,133 (81.3)				
R_{sym} (%)		4.1				
R_{merge} (%)		10.5				
構造解析 MIR ^{§)} + MAD ^{¶)}						
MIR法 [#]	Mean figure of merit=0.76	20.0-4.0 (Å)				
重原子誘導体	EMTS [§]	K ₃ UO ₂ F ₅	K ₃ IrCl ₆	K ₂ PtCl ₄	UOAC [§]	
反射数 (完全性%)	7072 (93.3)	7184 (94.8)	6925 (91.3)	6815 (89.9)	6377 (84.1)	
R_{sym}	5.28	6.37	4.7	3.34	6.23	
R_{Cullis}	0.60 (1046)	0.76 (1100)	0.77 (979)	0.98 (977)	0.96 (837)	
重原子サイト数	1	8	3	1	5	
Phasing power	2.26	1.72	1.2	0.31	0.91	
MAD法 [¶]		20.0-3.5 (Å)				
異常散乱子の数		12 (11Fe + 1Ni) *				
測定波長		1.743Å	1.730Å	1.750Å	1.487Å	
反射数 (Bijvoet)		9104 (6432)	9339 (6366)	6443 (4453)	7259 (5470)	
Phasing power		0.55	0.49	0.64	0.17	
$F_{1.040\text{\AA}}$ に対する変化率 (%)		13.3	10.9	9.0	9.7	
Bijvoet 対の変化率 (%)		7.0	8.2	6.8	6.2	
R_{sym} (%)		5.7	6.9	5.4	5.5	
$\Delta f'$ ($\Delta f''$) の理論値	Fe	−9.2 [†] (4.0)	−4.5 (3.9)	−5.3 (0.5)	−0.9 (3.0)	
	Ni	−1.8 (0.6)	−1.8 (0.6)	−1.7 (0.6)	−7.4 [†] (3.9)	
精密化		6.0-1.8 (Å)				
反射数 (完全性%)		57,233 (73.7)				
R-factor (%)		22.9 ($F>\sigma(F)$)				
原子数		6,865				
水分子数		638				
結合距離の理想値からの平均二乗誤差 (Å)		0.012				
結合角の理想値からの平均二乗誤差 (°)		2.1				
B (Å ²)	主鎖側鎖	主鎖+側鎖	Ni-Fe中心	全金属中心	水分子	全原子
平均値	22.0	23.0	15.7	13.6	43.1	24.3
Rms $\Delta B^{\ddagger}$	2.3	3.2	4.3	3.9	—	2.8

§ EMTS: ethyl mercuri thiosalicylate, UOAC: uranyl acetate

重原子位置の精密化と位相の計算はCCP4のプログラムPHAREを使用

¶ 金属原子位置の精密化と位相の計算はCCP4のプログラムMLPHAREを使用

* この当時、Ni-Fe活性中心のFe原子の存在は知られていなかった。

† 1.743 ÅのFe原子、および1.487 ÅのNi原子の $\Delta f'$ の値は正確ではない。

‡ 結合原子間の温度因子の平均二乗誤差

射光施設のBL-6Aおよび-18Bの実験ステーションでワイセンベルグカメラを用いて行なった。ネイティブ結晶や重原子誘導体結晶の回折データ測定には1.000 Åの波長を用いた。FeとNi原子の異常分散効果を測定する実験では、Feの吸収端近傍の3波長(1.730, 1.743, 1.750 Å)のX線を、またNiについては1.487 Å線を利用した。両金属原子の吸収端から離れた波長としては1.040 Åを利用した。異常分散効果は同形性の問題を考慮して、ひとつの結晶からすべての波長の回折データを収集した。構造解析当初は重原子誘導体の調製が進まず、FeとNiの異常分散効果のみから位相問題を解決しようとしたが、結局11個のFe原子(当時は12個目の存在は知らなかった)と1個のNi原子の位置を正確に決めることはできなかった。その後、同形性が低いながらも水銀の誘導体を見出し、さらに占有率は低い4種類の重原子誘導体をつくることに成功した。この多重同相置換法による4 Å分解能の電子密度図から3個のクラスターとNi原子の位置と分子領域が決定できた。⁸⁾鉄-イオウクラスターのFeとS原子の位置は、Fe原子と配位子システインとの結合スキームから特定した。これをもとに、多波長異常分散法に基づく位相情報を多重同相置換法のそれに加え、また溶媒領域平滑化などの電子密度改良法を併用することにより、分解能を3.5 Åまで上げてモデルビルディングを行った。

結晶構造精密化はプログラムX-PLOR⁹⁾を、またモデルの再構築にはプログラム「O」¹⁰⁾や「TURBO-FRODO」¹¹⁾を用いた。1分子中には461個の水分子を同定し、1.8 Å分解能における最終モデルの結晶学的なR-およびR_{free}-因子はそれぞれ22.9%と27.6%であった。表2に構造解析および精密化の統計量等を示す。

4. 分子構造

4.1 全体構造

D. v. Miyazaki Fのヒドロゲナーゼの分子構造全体の概略を図1に示す。分子全体の大きさはa, b, c軸方向にそれぞれおよそ66, 67, 68 Åある。2つのサブユニット間は、主に疎水性の相互作用により安定化されている。本ヒドロゲナーゼと先に解析されたD. gigasの分子の構造を重ねてみると、主鎖の流れや鉄-イオウクラスターなどの金属中心の立体配置は両者で非常に良く似ていた(主鎖の原子のrms誤差は0.82 Å)。しかし、後で述べるように機能に重要な活性部位のNi周辺などではその解釈に大きな違いがあった。

4.2 小サブユニット

電子伝達を司ると考えられる3個の鉄-イオウのクラスターはすべて小サブユニットに保持されている。これらのクラスターを保持する配位子はひとつを除いてすべてシステイン残基のS原子である。最もNi原子に近いクラスター(Fe₄S₄_proximal)が、Cys17, 20, 114, 150に、

図1 D. v. Miyazaki Fのヒドロゲナーゼの立体構造の模式図。大サブユニット(白色)が左上に、小サブユニット(灰色)が右下に描いている。Ni-Fe 活性中心とMg中心は大サブユニットに、また3個の鉄イオウのクラスターは小サブユニットに保持されている。図1と図4はMOLSCRIPT (P. J. Kraulis, : J. Appl. Crystallogr. 24, 946 (1991))とRASTER-3D (E. A. Merritt and M. E. Murphy: Acta Crystallogr. D50, 869 (1994))で描いた。(Schematic drawing of the structure of hydrogenase from D. v. Miyazaki F.)

Fe₃S₄クラスターがCys231, 249, 252に、最もNi原子から遠いクラスター(Fe₄S₄_distal)が、His188, Cys191, 216, 222に配位されていた。つまりFe₄S₄_distalのひとつのFe原子だけにヒスチジンのN原子が配位していた。小サブユニットの主鎖のおりたたみ構造はおおまかに2つに分けられる。それはN-末端のフラボドキシニンモチーフ(βB, βA, βC, βD, βE)とC-末端のランダムコイルモチーフである(図1)。Fe₄S₄_proximalはこのフラボドキシニンのモチーフのβ-シートのC-末端側に保持されており、これはフラボドキシニンがフラビンモノヌクレオチドを保持する仕方と同じである。Fe₄S₄_distalクラスターが最も分子表面に近いところにある。この小サブユニットの主鎖の折りたたまれ方はフェレドキシンのそれと類似性はなかった。

4.3 大サブユニット

このサブユニットは四角錐状の形をしており、大きさは底面が65×56 Å、高さが35 Åあった。全体は4つのドメインに分けられる。それらはα-ヘリックス領域(主にα4-α13)、2つのα/β領域(α/β^I: α15-α17, βA-βCとα/β^{II}: α1-α3, α14, βHa-βJ)、およびβ/ランダムコイル領域(βD-βGa)である。この大サブユニットはNi-Fe活性中心と本研究で発見されたMg中心を持つ。Ni-Fe

活性中心は α/β' と α/β'' に挟まれて保持され, まわりを α -ヘリックスと β /ランダムコイル領域で覆われて溶媒領域から隔てられている(図1). これに対してMg中心は分子表面に近い. Mg中心はC-末端に保持されている. C-末端側の552番のヒスチジン以後の残基は電子密度上には見えない(後述).

N-末端は19番のセリンより上流の残基がすべて電子密度図から消えている. 本研究では膜タンパク質のヒドロゲナーゼをトリプシンで切断して可溶性の部分のみ結晶構造解析をした. トリプシンはリジンあるいはアルギニンのC-末端側を切断することが知られている. これにより本酵素は大サブユニットのN-末端からLys18までの部分がアンカーとして膜に結合しており, ここがトリプシンにより除去されて可溶化されたと考えられる. トリプシン処理した本酵素のN-末端はセリン残基であった.

5. Ni-Fe 活性中心

5.1 Ni-Fe 活性中心の構造

Ni-Fe 水素活性中心のNi原子の配位子は, Cys81, 84, 546, 549の4個のシステイン残基のS原子である. 構造の精密化を進めた結果, Ni原子の横にはFe原子の存在することがその異常分散効果より明らかとなり, これは*D. gigas*の分子の結果⁴⁾と一致した. Fe原子の異常分散について, ($F_{1.040} \text{ \AA} - F_{1.743} \text{ \AA}$)を係数とする dispersive (図2の濃い電子密度) および Bijvoet (図に示さず) の差フーリエ図を

図2 Fe原子($F_{1.040} \text{ \AA} - F_{1.743} \text{ \AA}$ = C 黒色)とNi原子($F_{1.040} \text{ \AA} - F_{1.487} \text{ \AA}$ = C 灰色)の Δf に基づく異常分散の差フーリエ図. Fe原子の異常分散効果を示す電子密度は鉄イオウのクラスターのFe原子とNi-Fe中心のFe原子のみを覆っており, Ni原子の異常分散に基づく電子密度はNi原子のまわりだけにピークを示している. 位相は精密化されたモデルから計算したものを使った. 図2と図3はプログラム, O (T. A. Jones, J. Y. Zou, S. W. Cowan, and Kjeldgaard, M. *Acta Crystallogr.* **A47**, 110 (1991))で描いた. (Dispersive anomalous difference Fourier maps for Fe ($F_{1.040} \text{ \AA} - F_{1.743} \text{ \AA}$ in black) and Ni ($F_{1.040} \text{ \AA} - F_{1.487} \text{ \AA}$ in gray) atoms with a ball-and-stick model.)

計算するとFe原子だけを覆う電子密度ピークが現れた. またNi原子の dispersive ($F_{1.040} \text{ \AA} - F_{1.487} \text{ \AA}$)の異常分散の差フーリエ図上(図2の薄い電子密度)にはNi原子の上だけにピークが現れた. これよりNiとFe原子が完全に区別され, それぞれの立体配置を初めて証明できた.⁶⁾ Fe原子にはNi原子の4本のシステイン配位子のうち2つ(Cys84と549)が配位しており, これらは両金属原子をブリッジしている.

Fe原子を加えて構造精密化を進めた結果, これにはシステイン残基の他に合計4本の非タンパク質配位子が結合していることが分かった(グルノーブルのX線グループは当初, 3本のみを指摘した). 1.8 Åまで分解能を上げた結果, この4本は図3に示すように3本の2原子分子とひとつの原子であることが電子密度の大きさから容易に判断できた. 特に3本の2原子分子はちょうど「狼の頭」のような形をしている. つまり, 大きなひとつの鼻とそれよりやや小さなほぼ同じ大きさの2本の耳のようであった.

図3 Ni-Fe 活性中心のまわりの構造モデルとオミット電子密度図. Fe原子に配位している3本の2原子分子配位子のうち最も大きな電子密度(狼の鼻)にはSO分子を, また残りの2つの電子密度(狼の耳)にはCOかCN分子を同定している. またNi原子とFe原子をブリッジする1原子配位子にはS原子を置いている. Ni原子はこのS原子と4つのシステイン残基(Cys81, 84, 546, 549)の5つのS原子による5配位構造をとる. Niに配位する4つのシステインのうちの2つはFe原子にも配位してブリッジを形成している. その結果Fe原子は4つの非タンパク質配位子と合わせて6配位構造をとる. 配位結合距離と配位結合角を示す. (Omitted electron density map at 1.8 Å with a ball-and-stick model in the vicinity of the Ni-Fe active center of hydrogenase).

5.2 配位子の同定

5.2.1. 「狼の鼻」を形成する SO 配位子

図3の「狼の鼻」を形成している2原子分子は、その配位結合角が直線に近いことから、精密化の初期の段階ではCN分子を予想した。しかし、個々の原子の温度因子を精密化すると、CNのC原子の温度因子が1サイクルで最小値としていた「 $5 \text{ \AA}^2$ 」になってしまった。これは、この電子密度への原子種の割当てが間違っていることを示唆している。実際この電子密度ピークはCNやCO等の電子密度としては少し大きすぎるものであった。そこで、C原子の代わりにS原子をおいて精密化をしたところ温度因子も合理的な値に収束する傾向にあった。

この配位子の分子種を決めるためにヒドロゲナーゼの熱分解ーマススペクトルを測定した。一般に、タンパク質内の金属原子への配位結合はタンパク質内の共有結合より弱い。したがって、タンパク質に熱をかけて徐々に温度を上げていくと分子の熱分解の前に配位子が飛び出してくると思われる。この配位子をマススペクトルで観測しようと試みた。イオンクロマトグラム上にタンパク質の分解(およそ300℃)の始まる手前の220℃あたりに小さなピークが観測され、その部分のガスのマススペクトルをみると、質量数32, 33, 34, 35, 36, 48, 64, 88, 101が確認された。質量数88, 101のものは完全には同定できなかったが、質量数32-36は H_2S 由来のピークと同定できた。残りの64は SO_2 で、48はSOあるいは SHCH_3 と考えられるが、その標準スペクトルから、48と64はSOと SO_2 由来のピークと同定した。一般に、SOと SO_2 は高温では常に平衡に有り、同時に検出される。電子密度の大きさから見て、 SO_2 は大きすぎるため、配位子はSOであると結論した。この質量数48と64に相当するピークがヒドロゲナーゼに特徴的なものであることを調べる必要がある。そこで、単純な鉄-イオウ・タンパク質であるフェレドキシンについて同様の測定したところ、 H_2S は同定できたが、質量数48と64に相当するピークは出現しなかった。これよりこの質量数48と64は本ヒドロゲナーゼ固有のものであることが分かった。

赤外吸収スペクトルではSOの伸縮振動は低波数領域(1100cm^{-1} 付近)に吸収を与えると予想できるが、この領域は他の吸収バンドと重なるためはっきりと同定することはできなかった。

SOを配位子のひとつとして結晶学的な精密化を進めた結果、SとO原子の温度因子は、それぞれ12.7と11.8 $\text{\AA}^2$ と非常に合理的な値に収束した。また、Fe原子との配位結合の距離と角度は、それぞれ2.11 $\text{\AA}$ と 168° あった(図3)。また、SOのSとO原子の結合距離は、1.54 $\text{\AA}$ になった。SOのO原子は、近くのSer502のペプチドN原子および側鎖のO原子と水素結合をして、堅く保持された構造をとっていた。この水素結合がSO分子のFe原子への直線

的な配位結合角に寄与しているものと考えている。 SHCH_3 は、この水素結合を形成することができないことから候補から外した。

5.2.2 2本の「狼の耳」を形成するCOおよびCN配位子

図3の「狼の耳」に相当する電子密度の2原子分子は、他のヒドロゲナーゼの赤外吸収スペクトルの結果からCNやCO分子が結合していることが示唆されていた。³⁾本ヒドロゲナーゼの赤外吸収スペクトルにも同様に波数1955(強)、2080(弱)、2089(弱) cm^{-1} に吸収バンドが観測された。これから本ヒドロゲナーゼにもCNあるいはCOがFe原子の配位子として考えられた。CNとCOを現在の電子密度から区別することは難しいので、 CO_2 本(CO^I と CO^{II})をこの「狼の耳」に置き、構造精密化を進めた。その結果、 CO^I と CO^{II} の配位結合距離、結合角はそれぞれ1.82 $\text{\AA}$ と1.93 $\text{\AA}$ 、 152° と 154° あった(図3)。また各原子の温度因子は、13.4(C^I)、25.4(O^I)と14.9(C^{II})、13.0(O^{II}) $\text{\AA}^2$ となった。 O^I の温度因子以外はNi-Fe活性中心の他の原子の温度因子とほぼ同様の値(10-15 $\text{\AA}^2$)を示した。 O^I の温度因子が大きいのは、 O^{II} が近くに存在するArg479の主鎖のN原子および側鎖のN η 原子との間の2つの水素結合で安定化されているのに対して、 O^I はまったくどの原子とも水素結合をしていないためと考えられる。なお、CとO原子の結合距離は1.22(CO^I)と1.23(CO^{II}) $\text{\AA}$ になり、これはSOの原子間距離(1.54 $\text{\AA}$)より明らかに小さな値であった。

質量数26(CN)と質量数28(CO)の分子種は、ともに熱分解ーマススペクトル上の広い温度範囲に観測されたが、標準スペクトルと一致しなかったため、この方法では同定できなかった。

5.2.3 NiとFeをブリッジで結ぶ1原子配位子

*D. gigas*のヒドロゲナーゼの2.85 $\text{\AA}$ 分解能の分子構造では、Ni-Fe活性中心のFe原子は5配位構造で、Ni原子は4配位構造であると報告されていた。³⁾しかし、その後の2.54 $\text{\AA}$ 分解能の結果では、両金属原子をブリッジする電子密度ピークの存在を示し、これをO原子と予想している。⁴⁾Miyazaki株のヒドロゲナーゼでは3.0 $\text{\AA}$ 分解能の段階で、すでにこのブリッジ位置に大きな電子密度ピークが現れていた。精密化の段階ではここにO原子を置いていたが、先のSO配位子の時と同様、温度因子が異常に低くなってしまった。この温度因子の傾向とNi-Fe活性中心が分子の内部にあり、疎水性の高い領域であることから、S原子をこの配位子に当てはめ構造の精密化を進めた。その結果、温度因子は19.4 $\text{\AA}^2$ に収束し、NiとFe原子からの距離はそれぞれ、2.16と2.22 $\text{\AA}$ なった(図3)。しかし、現時点でO原子あるいはその水素化物を候補から外すことはできないが、Fe-S-Niの 71° という結合角(図3)はFe-O-Niではかなり厳しい値である。

5.2.4 配位子についてのまとめ

本研究の結果, 水素活性中心はNiとFe原子の2つの金属原子から構成され, Ni原子は4つのシステイン残基のS原子と1個の単独のブリッジS原子により配位された5配位構造をとることが明らかとなった. またFe原子は2本のシステインとブリッジS原子, それにSO, CO, CN (精密化時には仮にCO^IとCO^{II}とした) 分子が1本ずつの合計6本の配位子を持つ6配位構造をとっている.

この(SO, CO, CN, S)という4本の非タンパク質配位子のセットは, 分光学的グループの指摘する(2CN, CO, O)というセットと異なり, これが現在論争的となっている. 3つの2原子分子配位子がすべてCOかCNであるという他のグループの主張は(1) SOという配位子が今までに見つかっていない, (2) 赤外吸収スペクトルの2000cm⁻¹あたりに3本のバンド(強い1本と弱い2本)が見られる, ということが主な根拠となっている. Miyazaki 株のヒドロゲナーゼの電子密度図を詳しく検討すると, 一方のCO (CO^I) は, 2つのコンフォーマーをとり得ることが分かってきた. 赤外吸収スペクトルのバンドのうち弱い2本はこの2つのコンフォーマーによる分離ではないか, というのが私たちの主張であり, さらにこちらがCN分子ではないかと考えている. 単原子配位子がSなのか, あるいはOなのかについても両陣営でホットな議論が続いている.

5.3 Ni-Fe 活性中心の構造と機能の関係について

Fe原子の3本の2原子配位子は, 一般的に非常に強い配位子であり, Fe原子の価数を酵素反応の間, 低スピン2価に保つために存在しているように思われる. これまでの分光学的な研究から水素分子はNiに配位することが示唆されており, 現在のところ水素はNi原子の空いている6番目の配位子となると考えられている. もしFe原子にあるいは両金属原子にブリッジするように配位するとすれば, 他の配位子がひとつははずれなければならない.

水素分子の分解/合成に関する反応は2電子反応である. 3本の2原子分子配位子のうちの2つ(SOとCOあるいはCNのうち1つ)はタンパク質部分と水素結合している. Fe原子とその配位子群は周りの水素結合ネットワークも含めて, 2個の電子がヒドロゲナーゼから完全に解放されるまでのいわゆる「電子溜め」という働きをしているのかもしれない. また, 1.8 Åの電子密度図からSOは非常に強く配位結合しているが, CO, CNや単独のS原子の結合部の電子密度ピークはSOに比べて小さい. この特徴も酵素反応の制御に何らかの意味を持っているのかもしれない.

6. Mg 金属中心

大サブユニットのC-末端はHis552で切れており, 電子密度はそれ以上存在しない. これまでにヒドロゲナー

ゼ分子が成熟するときにC-末端側が切られることが示唆されており, 立体構造はこれと一致する. このC-末端のHis552側鎖は近くの遊離の電子密度ピークと水素結合をしていた. このピークは*D. gigas*のヒドロゲナーゼにも見つかっていたが, それは水分子と同定されていた.³⁾ 本研究における高分解能X線結晶構造解析の結果, この電子密度ピークはHis552の側鎖の原子の他に5つの原子と結合していることが分かった. この結合の様式は整った8面体であり, これは水分子以外のMgやCaのような元素であることを示唆していた.

この電子密度ピークの原子種は, 誘導結合高周波プラズマ発光分光分析法により, Mg原子であると同定した. 精密化時, これを水のO原子とすると, 温度因子はすぐに計算上の最小値になってしまった. このことから本精密構造の原子パラメータ(特に温度因子)は精度と信頼性の高いものであることがうかがえ, 先のFe原子への配位子の原子種の同定に対して大きな説得力を与えるものと言える. 精密化されたMg原子の温度因子は5.6 Å²に収束した. Mg原子の配位子は, His552のNe2原子, Glu62のOε2原子, Leu498のペプチドO原子, 3個の水のO原子の合計6原子である(図4). これらの原子とMg原

図4 Mg中心のまわりの構造モデル. Mg原子は整った6配位構造をとる. その配位子は, 大サブユニットのC-末端のHis552のNe2原子, Glu62のOε2原子, Leu498のペプチドカルボニルO原子と3つの水分子のO原子である. 配位結合距離と配位結合角を示す. (A ball-and stick model of the structure around the Mg atom of hydrogenase at 1.8 Å resolution.)

子との配位結合距離は2.1-2.3 Åあった。

このMg原子がC-末端付近の立体構造の安定化に寄与していることは確実であるが、酵素反応への役割についてははっきりしない。この原子がNi-Fe活性中心から13 Åほど離れており、しかも電子伝達を担うと思われる鉄-イオウのクラスターとは反対側に位置していることから、水素の分解/合成の反応に直接関与しているとは考えにくい。しかし、ちょうどNi-Fe活性中心を保持する2つのドメイン α/β^I と α/β^{II} の間の分子表面に存在することは、反応の結果として引き起こされるであろう構造変化に対してなんらかの役割を持つことも予想される。またNi-Feの活性中心からMg原子までの水素結合ネットワークはプロトンチャネルの可能性から検討する価値がある。

7. 電子伝達について

Ni-Fe活性中心からの電子移動の解明は今後の課題である。Mg, Ni-Fe, Fe₄S₄_proximal, Fe₃S₄, Fe₄S₄_distalと連続して続く5つの金属中心の直線的な中心間距離は順に13, 14, 13, 12 Åある。しかし、各金属中心の配位原子も考慮に入れたいわゆるエッジ-エッジ間距離はもっと短く5 Å以下である。これは十分これらの金属中心間で電子伝達が起こりうる距離である。現在これらの金属中心間に位置している残基の構造をさらに詳しく検討している。電子の流れが上に述べたように直線的に起こると仮定すれば、このヒドロゲナーゼの生理的電子伝達体であるチトクロムc₃はFe₄S₄_distalと電子交換を行うと考えられる。Fe₄S₄_distalだけが分子表面に近いことからこの仮説は自然である。Miyazaki 株のチトクロムc₃は中性水溶液中では塩基性タンパク質であるため、酸性側鎖を持つアミノ酸の多い部分と相互作用をすると考えられる。実際、このFe₄S₄_distalの周りには酸性側鎖を持つアミノ酸残基が多く存在する。このことを証明するには、今後、部位特異的変異体を用いた電子伝達反応の研究および、ヒドロゲナーゼとチトクロムc₃の複合体の結晶構造解析を遂行しなければならない。

8. おわりに

ヒドロゲナーゼのX線結晶構造を解明することはできた。その結果、Ni-Feのヘテロ2核金属活性中心、その特異な非タンパク質配位子、さらにはMg中心など、予想もしていなかった多くの新しい構造が見出された。これは、最も単純な分子・水素の合成/分解という反応の制御が当初考えられていたよりずっと複雑であることを物語っている。今後、X線結晶構造解析からは水素および阻害剤(COやアセチレン等)結合型ヒドロゲナーゼの構造の解明が必要である。しかし、もはや静的な立体構造だ

けでは反応メカニズム解明への展開は難しい。結晶および溶液状態における電子スピン共鳴分光、赤外分光、ラマン分光法などあらゆる分光学的手法を用いて研究していく必要がある。最近、これらの分光学的手法を組み合わせヒドロゲナーゼが水素と反応した時、Ni-Fe活性中心の配位子のひとつが大きく構造変化を起こすことを酵素学的に見出した。この反応中の電子密度の変化をX線結晶学的に動的に証明することもこれからの目標である。また、これらの物理化学的手法のみならず、モデル錯体の合成や理論計算からのアプローチも非常に重要な課題であろう。X線結晶構造はすべてを明らかにする「終わり」ではなく、反応メカニズムを構造から解明するための「始まり」であることをあらためて痛感している。

本研究は、姫路工業大学・工学基礎研究所および理学部・生命科学科・生体物質構造学I研究室に籍を置いていた多くの方々との共同研究の成果である。菌体の培養、精製、結晶化、回折データ測定など多くの仕事を共有してくれた、教員・学生諸氏に厚く感謝する。

最後に、本研究の一部は、文部省科学研究費補助金(10129214, 08458209)、新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)/財団法人地球環境産業技術研究機構(RITE)の研究委託助成および、関西エネルギーリサイクル科学研究振興財団の助成などの援助により行なわれたものである。

文 献

- 1) Y. Higuchi, M. Kusunoki, Y. Matsuura, N. Yasuoaka and M. Kakudo: *J. Mol. Biol.* **172**, 109 (1984).
- 2) Y. Morimoto, T. Tani, H. Okumura, Y. Higuchi and N. Yasuoaka: *J. Biochem.* **110**, 532, Tokyo (1991).
- 3) A. Volbeda, M-H. Charon, C. Piras, E. C. Hatchikian, M. Frey and J. C. Fontecilla-Camps: *Nature*, **373** No.6515, 580 (1995).
- 4) A. Volbeda, E. Garcin, C. Piras, A. L. de Lacey, V. M. Fernandez, E. C. Hatchikian, M. Frey and J. C. Fontecilla-Camps: *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 12989 (1996).
- 5) R. P. Happe, W. Roseboom, A. J. Pierik, S. P. J. Albracht and K. A. Bagley: *Nature*, **385** 126 (1997).
- 6) Y. Higuchi, T. Yagi and N. Yasuoaka: *Structure*, **5**, 1671-1680 (1997).
- 7) Y. Higuchi, N. Yasuoaka, M. Kakudo, Y. Katsube, T. Yagi and H. Inokuchi: *J. Biol. Chem.* **262**, 2823 (1987).
- 8) Y. Higuchi, T. Okamoto, K. Fujimoto, S. Misaki, Y. Morimoto and N. Yasuoaka: *Acta Crystallogr.* **D50**, 781 (1994).
- 9) A. T. Brünger: *X-PLOR, Version 3.1, A System for X-ray Crystallography and NMR.* (Yale University Press, New Haven) (1992).
- 10) T. A. Jones, J. Y. Zou, S. W. Cowan, and M. Kjeldgaard: *Acta Crystallogr.* **A47**, 110 (1991).
- 11) A. Roussel and C. Cambillau: *TURBO-FRODO, in Silicon Graphics Geometry Partner Directory* (Silicon Graphics, Mountain View, CA) **77** (1989).

プロフィール

樋口芳樹 yoshiki HIGUCHI
京都大学大学院理学研究科・化学専攻
京都市左京区北白川追分町
e-mail: higuchi@kuchem.kyoto-u.ac.jp
最終学歴：大阪大学大学院理学研究科
専門分野：タンパク質結晶学・構造生物学
趣味：軽い園芸（シャクヤク、野菜の栽培）

八木達彦 Tatsuhiko YAGI
静岡大学
Shizuoka University
〒422-8529 静岡県静岡市大谷836
836 Oya, Shizuoka 422-8529, Japan
TEL. 054-237-3354, FAX. 054-237-3354
最終学歴：東京大学理学部化学科 卒業
専門分野：化学・生化学
趣味：ネコ好きとして有名

安岡則武 Noritake YASUOKA
姫路工業大学理学部 生命科学科
Department of Life Science, Faculty of Science,
Himeji Institute of Technology
〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町金出地1475-2
Kanaji 1472-2, Kamigori, Akogum, Hyogo 678-1297,
Japan
TEL. 07915-8-0179, FAX. 07915-8-0177 or 01323
e-mail: yasuoka@sci.himeji-tech.ac.jp
最終学歴：京都大学工学部 工業化学科 1959年
卒業
専門分野：X線結晶学・生物物理学
趣味：囲碁とテニス（最近はごぶさた）