ヒドロゲナーゼの反応機構

活性とモデルからのアプローチ

八 木 達 彦 井 口 洋 夫

Tatsuhiko YAGI

Hiroo INOKUCHI

静岡大学教育学部

東京大学物性研究所

ヒドロゲナーゼは水素ガスを吸収したり発生するバクテリアに存在し、水素分子を活性化する酵素である。すなわち、 H_2 により電子受容体 X を還元したり (反応 1)、または還元型 X より H_2 を発生する (反応 1 の逆、以後 $\bar{1}$ と記す) 反応を触媒する。

微生物が H_2 の存在でいろいろな物質を還元したり、また還元的培地から H_2 を発生するのは、この酵素作用による。

ヒドロゲナーゼの基質は H_2 で、最も簡単な 2 原子分子である。そこで、この酵素が発見されたときから反応機構に注目が集まり、多くの研究者がこの酵素の精製を試みて反応機構を解明しようとした。初期の研究で特筆されるのは、Farkas ら⁽¹⁾ と、Cavanagh, Horiuchi, Polanyi⁽²⁾ の仕事である。彼らは、ヒドロゲナーゼ分子が H_2 を活性化すれば、還元される物質 (すなわち反応 1 の X) が存在しなくても、パラ H_2 をオルト H_2^* に変換したり (反応 3)、水素分子中の H 原子と重水分子の D 原子とを交換すること (反応 2) を発見した。

* 水素分子は 2 個の水素原子が結合したものである。そこでこの 2 個の原子核すなわちプロトンのスピンの同じ向き (オルト水素分子 ($o\text{-}H_2$)) と、逆向きのパラ水素分子 ($p\text{-}H_2$)) の 2 種類が存在する。常温では、オルト H_2 とパラ H_2 の割合が 3 : 1 で平衡が成り立つ。このような水素をノルマル水素 ($n\text{-}H_2$) という。ノルマル水素を 20°K 付近で活性炭で処理すると、ほとんど 100% 近いパラ H_2 が得られる。こうして得たパラ H_2 を常温にしても、触媒がない限りパラ H_2 のままであるが、白金や活性炭などの無機触媒や常磁性物質の影響で、パラ・オルト変換 (反応 3) を行ないノルマル水素になる。ヒドロゲナーゼもこの反応を触媒する。

この現象を利用すれば、ヒドロゲナーゼの電子受容体 X とは無関係に酵素と H_2 との結合や反応機構を研究できるはずである。Rittenberg と Krasna^(3,4) は、*Proteus vulgaris* のヒドロゲナーゼを用いて次の結果を得た。すなわち、 $H_2 + D_2O$ の反応系で、まずはじめに生成するのは HD であり、 D_2 は極微量である (このことを以後 $D_2/HD \approx 0$ と略記する)。また、 D_2O 上にパラ H_2 をつめて反応させた場合、 HD が生成しはじめてもオルト H_2 は生成しない。この事実から彼らが得た結論は、次のような反応機構である。

ここで、 E は酵素分子、 EH^- は酵素分子のヒドリドで、この分子の H^- イオンは溶媒の H^+ イオンとは交換しない形のものである。酵素を D_2O に溶かして気相にパラ H_2 をつめて反応させれば、酵素とパラ H_2 とが結びついたときに生ずる H^+ イオンが直ちに D^+ イオンで希釈されるため、逆反応でオルト H_2 が生成する可能性はほとんどないわけだし、また、この反応 4 を 1 往復すれば最初に発生する分子種は HD だけのはずである。このように、彼らの研究はクリアーカットな結論を与えているようにみえるが、用いた酵素標品の純度が低いので、この反応機構をそのまま信ずることはできない。

その後、Tamiya and Miller⁽⁵⁾ は *Clostridium pasteurianum* のヒドロゲナーゼを研究し、上記の反応機構を修正した。すなわち、 $H_2 + D_2O$ の系でまず最初に生成する分子種は、よく調べてみると HD だけではなく、 D_2 もある。そこで、 H_2 と E との結合で生ずる複合体を EH_aH_b と考えた。

ここで、 H_a, H_b は酵素分子上の a 点と b 点に結合した 2 個の水素原子を区別するための符号である。 H_a が溶媒中の D^+ イオンと交換して D_a となる割合を Q_a 、 H_b が溶媒中の D^+ イオンと交換して D_b となる割合を Q_b とすれば、 HD が生成する速度は H_a と H_b のどちらか一方だけが交換する割合 $(1-Q_a)Q_b + (1-Q_b)Q_a$ に比例し、 D_2 が生成する速度は両方とも交換する割合 Q_aQ_b に比例するわけである。そこで

$$D_2/HD = Q_aQ_b / (Q_a + Q_b - 2Q_aQ_b)$$

となる。もし、 $Q_a=1, Q_b=0$ であれば $D_2/HD=0$ となり、上記の Rittenberg and Krasna⁽⁴⁾ の場合になる。Tamiya and Miller によると、 D_2/HD は 0 でなく、*P. vulgaris* の場合約 0.2、*D. desulfuricans* の場合約 1.0 であり、したがって Rittenberg らのような単純な反応機構ではない。

以上の研究では、 H_2 とヒドロゲナーゼとの結合だけが注目されているので、ヒドロゲナーゼと電子受容体 X については何も触れていない。しかし、ヒドロゲナーゼと H_2 とが結合したとき、これにより還元される天然の電子受容体 X が何かを知らずに、この酵素の真の反応機構を論ずることはできまい。

ヒドロゲナーゼと X との反応を調べるには 2 通りの方法がある。1 つは、ヒドロゲナーゼと X とを混ぜ H_2 中での還元速度を測定する方法 (反応 1) である。Stephenson and Stickland⁽⁶⁾ が 1931 年に、ツンベルグ管に大腸菌 *E. coli* とメチレンブルーを入れ、気相を H_2 で満たすことによりメチレンブルーが脱色するのを観察したのが、ヒドロゲナーゼ発見の端緒であった。その後も、

表 1 種々のヒドロゲナーゼ活性の比較^a

バクテリアの種類	H-D 交換 (反応 2)	メチレンブルーの還元 (反応 1)	還元型ベンジルビ オロゲンからの H_2 発生 (反応 1)	パラ・オルト 変換 (反応 3)
<i>Escherichia coli</i>	41,000	24,000	450 ^b	
<i>Proteus vulgaris</i>	6,000	4,500	380	10,000
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	40,000	58,000	3,100	
<i>Clostridium pasteurianum</i>	2,500	9,200	0 ^b	
<i>Acetobacter peroxydans</i>	170	670		
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	24(0°)	153	0(0°)	25
<i>Azotobacter vinelandii</i>	260(0°)	7,500	0(0°)	

a. 文献 4), 12) より。

b. 文献 13) によると、還元型メチルビオロゲンよりの H_2 発生は反応 1 よりもすみやかに進行する。

c. 文献 13) による。

ワールブルグマノメーターで H_2 の吸収速度を測定する方法が広く行なわれている (たとえば文献 7)。しかし、ヒドロゲナーゼは O_2 に敏感で、酸化されて不活性化される⁽⁸⁾。たとえば、精製操作中に空気中の O_2 と接触して少しずつ不活性化されてゆき、ある精製段階でまったく活性が現われなくなることもある。そこで、この方法では、ヒドロゲナーゼを活性に保つため細心の注意を払わなければならない。

もう 1 つの方法は、反応 1 の逆行 (反応 $\bar{1}$) を利用する^(9,10)。 X とヒドロゲナーゼを混ぜ、窒素中で $Na_2S_2O_4$ を加えてやれば、 X は $Na_2S_2O_4$ で還元されて還元型 X となる。これがヒドロゲナーゼの作用で H_2 を発生するので、この発生速度を測定すればよい。かりに、ヒドロゲナーゼが酸化され不活性化されていても、 $Na_2S_2O_4$ を加えると同時に活性化されるので⁽⁸⁾、どんな場合にも満足できる測定結果が得られる。 X としてよく用いられる物質は、メチルビオロゲン (図 1) やベンジルビオロゲンである。

以上の諸反応 (1, $\bar{1}$, 2, 3) はすべて同一の酵素、ヒドロゲナーゼにより触媒されるのであろうか？ これらの活性を比較してみると、表 1 に示すように、あまりよい相関関係がないことは気になることである。

これらの諸反応を速度論的に解析してヒドロゲナーゼの反応機構を解明するには、これらの反応が確かに同一の酵素の働きによることを精製酵素で証明することが先決であり、天然の X が何であるかをはっきりつきとめる必要がある。

これから、これらの点に関する筆者の研究結果を述べてみよう。従来の研究結果については、総説⁽¹⁴⁾を参照されたい。

ヒドロゲナーゼをもつバクテリアは数多いが、主とし

図 1 メチルビオロゲン

メチルビオロゲンは電子 1 個の授受で酸化還元される。還元型は不対電子をもつフリーラジカルであるが、共鳴によりかなり安定化される。pH 7 における標準酸化還元電位は、 $E_0' = -0.446V$ である⁽¹¹⁾。

図4 *D. vulgaris* のヒドロゲナーゼのセファデックスカラムクロマトグラフィーによる溶出曲線

○—○ メチルビオロゲンによる反応 (I), ●—● 反応 (2) による HD 発生, ●—● 反応 (2) による D_2 発生, 無印は 230 m μ の吸光度.

このように、バクテリアの種類が異なることにより、ヒドロゲナーゼの電子受容体の特異性にはっきりと差異のあることが証明された。

フェレドキシンは 1962 年に Mortenson ら⁽¹⁷⁾ が *Cl. pasteurianum* より抽出し、ヒドロゲナーゼの電子受容体として発表したもので、分子量約 7,000、1 分子中に各 7 個の鉄原子と S^{2-} イオンを含む褐色のタンパク質である^(18,19)。Clostridium に属するいろいろのバクテリアや *Micrococcus lactilyticus* などのヒドロゲナーゼの電子受容体となりうる⁽²⁰⁾ ので、すべてのヒドロゲナーゼはフェレドキシンに作用すると早合点されたようで、国際生化学連合発行の酵素表⁽²¹⁾には、ヒドロゲナーゼの正式名称として H_2 : ferredoxin oxidoreductase [EC 1.12.1.1] だけが記載されている。しかし、このほかにチトクローム c_3 に作用する H_2 : ferricytochrome c_3 oxidoreductase [EC 1.12.1.2] が存在することが証明されたわけである。なお、大腸菌 *E. coli* や *Proteus vulgaris* のヒドロゲナーゼの天然電子受容体が何であるかはまだ決定されていないよ

うであるが、メチルビオロゲンの存在で $Na_2S_2O_4$ から H_2 を発生するので、*D. vulgaris* と同じ型、すなわちチトクローム連結型のものではないかと想像される(精製してみなければ何ともいえないが)。ほかに、NADH より直接 H_2 を発生させる酵素も存在するらしい。

以後はすべて、*Desulfovibrio vulgaris* のヒドロゲナーゼについての結果である。

ヒドロゲナーゼの精製と性質⁽¹⁶⁾

図4のB区分を集めてさらに DE AE セルロースカラムでクラマトグラフィーを行なうことにより、125 倍の比活性をもつ精製酵素標品を得た。この精製過程を表2に示した。このようにして得たヒドロゲナーゼ

標品は、まだタンパク化学的研究の材料に使えるほど純粋ではないことが、セロゲル電気泳動結果などより示された。この標品の最適 pH は、図6に示すように、チトクローム c_3 を電子受容体とする H_2 発生法(反応 I)では 5~6、 H_2 吸収法(反応 I)では 8~9、重水素交換反応では 7~8 である。還元型チトクローム c_3 に対するミカエリス定数は約 $10^{-4}M$ である。

図5 バクテリアの抽出液に精製ヒドロゲナーゼを加えたときの H_2 の発生能

○—○ メチルビオロゲン, ○—○ チトクローム c_3 ,
△—△ フェレドキシン, ●—● 無添加.

表 2 *D. vulgaris* のヒドロゲナーゼの精製

	体積 (ml)	吸光度 (A_{280})	交換反応		活 性		
			(a) (units/ml)	(b) (units/ml)	活性比 (a/b)	全活性 (units)	比活性 (units/ A_{280})
抽 出 液	140	46		3.77		530	0.08
ストマイ処理上清	140	10	0.36	2.00	0.18	280	0.20
硫 安 沈 澱	15	51	2.82	12.6	0.22	190	0.25
ヒドロゲナーゼA	200	0.57	0.048	0.193	0.25	39	0.34
ヒドロゲナーゼB	320	0.89	0.052	0.220	0.23	71	0.25
ヒドロゲナーゼB1	192	0.23		0.147		28	0.61
同 上 (再クロマト後濃縮)	2.3	0.70	0.81	4.44	0.18	10	6.3

a : $H_2 + D_2O$ の反応系において $HD + D_2$ の生成する速度.

b : メチルビオロゲンを用いる標準測定条件下での H_2 発生速度.

酵素反応における 1 unit は $1 \mu\text{mole/min}$ の反応速度を与えるような酵素量をさす.

図 6 反応速度と pH との関係

A : チトクローム c_3 を用いた反応 I.

B : チトクローム c_3 を用いた反応 1.

C : 重水素交換反応.

D. vulgaris の他のヒドロゲナーゼ標品*

図 4 に示すように、ヒドロゲナーゼ活性はセファデックス G-200** カラムで A, B 2 区分に分かれて溶出する. 今までは B 区分より精製したヒドロゲナーゼについて述べたが、A 区分のヒドロゲナーゼも電子受容体としてチトクローム c_3 を要求し、フェレドキシンとは反応しない点で、B と同様である. 両者に根本的差異があるとは思えず、単に分子量だけが異なるのかもしれない. A 区分をさらにセファロース 4B*** カラムクロマト

グラフィーにかけると、ヒドロゲナーゼ活性は相当多数のピークに分かれるから、A 区分は単一なものではなく、分子量 100 万以上のいろいろな多量体の混合物であろう. おそらく、B 区分のヒドロゲナーゼが分子量最小のサブユニットだと考えられる. A 区分をパンクレアチンなどの消化酵素で消化すると、B 区分と同じ分子量のものが得られることが、セファデックス G-200 カラムクロマトグラフィーの挙動から観察されたが、

B 区分とまったく同じタンパク分子になったのかどうかはわからない. 一方、B 区分を A 区分に変えることはできない.

いろいろなバクテリアのヒドロゲナーゼは、主として不溶性区分に存在する⁽²²⁾. この菌のソニケート (図 2 参照) を超遠心分離すると、全活性の 97% は沈澱部に集まり、上清の抽出液には 3% しかこない. 可溶性酵素のほうが精製その他のいろいろの解析に都合がよいので、今まではこの“3%”を材料とする精製酵素を用いたが、反応機構などを組織的に研究するには大量の精製酵素が必要で、そのためには不溶性の沈澱部ヒドロゲナーゼを利用しなければ能率が悪すぎる. そこで、その可溶化を試みた.

不溶性ヒドロゲナーゼの可溶化には、Kondo ら⁽²³⁾、Krasna ら⁽²⁴⁾、Aspen and Wolin⁽⁷⁾ などの報告があり、トリプシン処理^(23,24) やアルカリ処理⁽⁷⁾ が利用されるが、筆者はパンクレアチンを用いた. 沈澱部 (図 2) を湿重量の 5% のパンクレアチン (日本薬局法) とともに 5 倍量の水にサスペンドし、気相を N_2 で置換して 4°C で約 20 時間スターラーで攪拌する. この混合物を超遠心すると、全ヒドロゲナーゼ活性の 55% が可溶化される. 活性区分を硫酸アンモニウム沈澱で集め、セファデックス G-200 カラムにかけると、図 4 の A 区分には活性は現われず、B 区分と同じところに強い活性が集まる. これを PB 区分と呼ぶことにする. おそらく、パンクレア

* T. Yagi, 未発表データより.

** セファデックスカラムクロマトグラフィーは、分子量の差によってタンパク質を分画する手段である. ここで、早く溶出するものは高分子量のものである. B 区分は分子量約 6 万のタンパク質と同じところに溶出する. A 区分は分子量 100 万以上のタンパク質に相当する位置である.

*** セファロース 4B は分子量 100 万以上のタンパク質を分画しうる.

図 7 精製ヒドロゲナーゼ PB 1 の電子受容体に対する特異性

●-● メチルビオロゲン, ○-○ チトクローム c_3 ,
△-△ フェレドキシン, ●-● 無添加.

チン消化で、高分子多量体はみなサブユニットに分解してしまったのであろう。ヒドロゲナーゼ PB 区分を DE AE セルロースカラムにかけると、従来のヒドロゲナーゼ B1 区分と同じような溶出位置に活性が溶出する。こうして得たヒドロゲナーゼ PB 1 区分は、従来の B1 区分に比べ 10 倍以上の比活性をもつ。アンフォラインエレクトロフォーカシング法で測定した等電点は 6.2 である。

ヒドロゲナーゼ PB 1 区分は、褐色で 0.72% の鉄を含む。分子量 6 万とすれば、1 分子に 7~8 原子の鉄を含むことになる。しかし、アンフォラインエレクトロフォーカシング法でさらに精製すると、ほとんど無色の酵素が得られる。この鉄含量は 1 分子中約 4 原子である。

この標品もチトクローム c_3 に対してのみ強い活性をもち、フェレドキシンに対してはまったく作用しない点で、抽出液のヒドロゲナーゼと同じである (図 7)。しかし、メチルビオロゲンに対する活性よりもチトクローム c_3 に対する活性のほうが強いので、従来の標品よりも天然電子受容体に対し特異的であるといえる。すべて酵素というものは精製するに従って基質特異性が厳密になるものだから、完全に純粋なヒドロゲナーゼ標品はメチルビオロゲンに対しまったく反応しないのかもしれない。この反応において、還元型チトクローム c_3 に対するミカエリス定数は約 $2 \times 10^{-4} M$ 、活性化エネルギーは 12.5 kcal/mole である。

このヒドロゲナーゼ標品は、チトクローム c_3 を電子

受容体とする反応 1、反応 $\bar{1}$ のほか、チトクローム c_3 が存在しなくても重水素交換 (反応 2)、パラ・オルト変換 (反応 3) すべてを触媒する。チトクローム c_3 を添加すれば、反応 2、3 は促進される。パラ・オルト変換反応の活性化エネルギーは約 6.0 kcal/mole である。

重水素交換反応とパラ・オルト変換反応*

本稿のはじめに述べたように、Rittenberg and Krasna⁽⁴⁾ は、 $H_2 + D_2O$ の反応で最初に生成する分子種は HD だけで、 D_2 はない ($D_2/HD=0$) と発表した。その後、Krasna 自身⁽²⁴⁾および Tamiya and Miller⁽⁵⁾ は、 D_2/HD が 0 でないという結果を出した。しかし、純度の高いヒドロゲナーゼ標品で D_2/HD を測定した例はないようである。

D. vulgaris の精製ヒドロゲナーゼ標品による D_2/HD の測定結果を以下に示す。この比率は用いた酵素量により変動するので (図 8)、酵素濃度 0 に外挿すると、 $D_2/HD=0$ になるらしい。チトクローム c_3 を添加してやると反応速度が増加するので、それにつれて D_2/HD も増大する。

酵素濃度が高いとき D_2/HD が 1 を越える理由は、水溶液中の酵素が水に溶解した水素分子だけと反応すると考えれば説明がつく。いったん生成した HD が溶液から気相に逃げだす過程と、他の酵素分子につかまってもう 1 度交換反応を行ない D_2 となる過程とが競争するため、酵素が濃くなると D_2 の割合がふえるのである (図 9)。

図 8 重水素交換反応速度と D_2/HD の関係

図中の数字は反応時の H_2 の圧力である。

* T. Yagi, M. Tsuda, H. Inokuchi, 未発表データより。

図9 高濃度水溶液中での酵素の作用

いったん生成した HD が気体となって逃げ去る過程と、もう1度別な酵素Eにつかまって交換反応をうける過程とが競争になる。

図10 Cage effect の説明

いったん生成した HD が酵素表面から逃げ出すまえにもう1度つかまって交換反応をうける⁽²⁾。

いわゆる cage effect (図10) であれば、酵素がうすくなくても D₂/HD は一定でなければならない。

Krasna and Rittenberg⁽³⁾ は D₂O 上でパラ・オルト変換反応が起こらないと報告したが、彼らのデータをよく見ると少しは起きているようである。筆者らの結果によると、D₂O 上でのパラ・オルト変換反応速度は、H₂O 上での反応速度に比べ、場合により 1/5 から 1/2 の速さで進行する。チトクローム c₃ が共存すると、H₂O 上でのパラ・オルト変換反応が促進されるにもかかわらず、D₂O 上でのパラ・オルト変換反応はおさえられる。

ヒドロゲナーゼの固相反応⁽²⁵⁾

ヒドロゲナーゼの諸反応のうち、パラ・オルト変換反応は酵素と水素ガスだけの反応であり、反応式(3)を見るかぎり、水などの溶媒は関与しない。一般に、酵素反応は水溶液中で行なわれるものであるという常識があるが、ヒドロゲナーゼのパラ・オルト変換反応は水溶媒の影響なしに反応を調べることができるかもしれない。このアイディアはすでに 1955 年に Couper ら⁽²⁶⁾ が思いつき、強力なヒドロゲナーゼをもつ *E. coli* と *Proteus vulgaris* の乾燥菌体を用いてこの反応を試みたが、彼らはこの反応が起こらないと結論した。物理化学者は酵素の扱いがうまくないのであろう。

これに対し、筆者らが行なった実験は次のようなものである。

ヒドロゲナーゼA標品*を今までの実験と同じように緩衝液に溶かし、Na₂S₂O₄で活性化しうえて真空凍結

* はじめA標品を用いたが、その後、B1 標品でも PB1 標品でも同様の結果が得られた。

乾燥した。こうして、緩衝液成分 (Na₂HPO₄ と KH₂PO₄ の 3:2 混合物) に Na₂S₂O₄ と活性化されたヒドロゲナーゼとが付着したような混合物が得られる。ここで、酵素表面上の水分が問題になるが、目で見えて乾燥したのち、10⁻⁶ mmHg の減圧下で室温で 6 時間以上も真空乾燥した試料の水分は、結合水、すなわち酵素分子の一部と考えてよいと思う。こうして、無溶媒のヒドロゲナーゼ標品を得た。この上にパラ H₂をつめ、室温約 25°C に保ちながら一定時間ごとにサンプリングして、水素中のパラ H₂ 含量をガスクロマトグラフィー法⁽²⁷⁾で測定した。図11に示すように、パラ・オルト変換は確実に起きている。Na₂S₂O₄を加えずにヒドロゲナーゼだけをいきな

図11 ヒドロゲナーゼ(固相)上での $p\text{-H}_2 \rightleftharpoons o\text{-H}_2$ 転換反応

○—○ ヒドロゲナーゼ A+Na₂S₂O₄(10 units) 上での反応。
△—△ ヒドロゲナーゼ A(Na₂S₂O₄を除く)のみ。
●—● Na₂S₂O₄のみ。

(反応7)

り乾燥したものや、ヒドロゲナーゼ以外のタンパク質(代表としてウシ血清アルブミン)と FeSO_4 を混ぜて $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ で還元したもの、または $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 自身、あるいは活性ヒドロゲナーゼ標品を 200°C の熱処理で失活させた標品などでは、パラ・オルト変換反応はほとんど起こらない。わずかに起こるのはガラス表面の触媒作用によるものらしく、保存容器中でわずかに進行する割合に近い。

次に、同様に調製した活性乾燥ヒドロゲナーゼ標品と、 $\text{H}_2:\text{D}_2$ (1:1) 混合気体とを数週間接触させたところ、微量の HD が生成した。 H_2 が乾燥酵素と結合すると実際に H-H 結合が開裂し、少なくとも一方の H は酵素タンパク分子の表面上の結合プロトン ($-\text{NH}_2$) と交換しうるものであることが証明されたわけである。もちろん、このような結合プロトンは水溶液中とちがいで数個ぐらいしか存在しないであろうから、重水素交換(反応6)がパラ・オルト変換(反応3)に比べればずっとおそいことも納得できる。

ヒドロゲナーゼの反応機構

以上の結果からヒドロゲナーゼの反応機構を論ずるのは大胆すぎるだろうが、次のようなモデルを考えてみた。

酵素 ($+\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 溶液の場合、 $\text{H}_2+\text{D}_2\text{O}$ の反応で最初に生ずる分子種は、酵素が非常にうすければほとんど HD である ($\text{D}_2/\text{HD} \approx 0$)。このことから Krasna and Rittenberg⁽³⁾ の考え(反応4)が正しいと解釈してもよいが、Tamiya and Miller の考え(反応5)で $Q_b = 0$ とするほうが一般的だろう。

次に、 D_2O 上でのパラ・オルト変換反応は、Krasna and Rittenberg⁽³⁾ のいうようにまったく起こらないのではなく、ある程度は起こるのだから、Tamiya and Miller⁽⁵⁾ の式で $Q_a < 1$ でなければならない。すなわち、彼らの EH_aH_b 複合体のうち、 H_a は溶媒中の D^{2+} イオンと交換可能である ($0 < Q_a < 1$) が、 H_b はまったく交換しない ($Q_b = 0$) ということになる。このような EH_aH_b の形を具体的に上のように考えてみた。

この反応式(7)をもとに、今までの実験事実を説明

してみよう。 EH_aH_b は反応式(7)の II に相当し、その中で H_a は H^{2+} に、 H_b は H^{2+} に対応するものと考ええる。

$\text{H}_2+\text{D}_2\text{O}$ の系で、 $\text{II} \rightarrow \text{III} \rightarrow \text{IV}$ と進行すれば HD が生成するが、たとえば III の段階で H^{2+} と D^{2+} とがすみやかに交換したり、または $\text{II} \rightleftharpoons \text{III}$ を何度往復しても、 D_2 が発生することはない。また、II から III に進まずに逆もどりすれば、パラ・オルト変換反応になるわけである。

溶媒がなくても I (これを $\epsilon\text{-N-H}$ と略す) と H_2 とが結合すれば II となり、 $\text{II} \rightarrow \text{III} \rightarrow \text{IV}$ と進行しても、I に逆もどりしても、パラ・オルト変換が起こるが、 $\text{H}_2 + \text{D}_2 \rightleftharpoons 2\text{HD}$ の反応が進行するには次の諸過程を経なければならない。まず、 D_2 と I ($\epsilon\text{-N-H}$) とが結合して II ($\epsilon\text{-N} \begin{smallmatrix} \text{H} \\ \text{D} \end{smallmatrix} / \text{D} \end{smallmatrix}$) となり、III を経て IV ($\epsilon\text{-D}$) + HD となる。次に、これ (IV) と H_2 とが結合して III' ($\epsilon\text{-N} \begin{smallmatrix} \text{D} \\ \text{H} \end{smallmatrix} / \text{H} \end{smallmatrix}$) となり、II' を経て I' ($\epsilon\text{-N-H}$) + HD となる。これをくりかえせば、HD が生成する。はじめに I ($\epsilon\text{-N-H}$) が H_2 と結合してしまえば、重水素交換反応はまったく起こらない。50% の確率で D_2 と結合しても、II から I に逆もどりすればパラ・オルト変換だけで終るし、無事に IV まで行っても IV' ($\epsilon\text{-N-D}$) が H_2 と結合する確率は 50% で、運わるく D_2 と結合すれば III' $\rightarrow$ II' $\rightarrow$ I' と進行しても HD は生成しない。このように、乾燥状態では重水素交換反応は非常に起こりにくいが、とにかくわずかながら確実に起こるという実験事実が説明できる。一酸化炭素 ($\text{C} \equiv \text{O}^+$) がヒドロゲナーゼを強力に阻害する理由は、説明を要すまい。

また、チトクローム c_3 は、II の活性化された水素 ($\text{H}^{2+}-\text{H}^{2+}$) を受けとって還元されるのであろう。

このようなモデルをもとに、実験事実を満足に説明できるように速度論的解析を近く別誌に発表したい。

以上のように、ヒドロゲナーゼもその本質をつくことができるような清浄な状態で得られるところまで精製がすすみ、さらに突っ込んだ議論ができるようになってきた。しかし、化学の3つの柱である反応、構造、物性の相関性を、この複雑な構造をもつ酵素を用いて研究して

行くには、まだ解明しなければならないことが多過ぎる。そこで、ここではモデルを用いてのその可能性について少し触れておこう。

それは、本稿の頭初に述べた水素交換反応 ($H_2 + D_2 \rightleftharpoons 2HD$) および水素転換反応 ($p-H_2 \rightleftharpoons o-H_2$) を用いて、アルカリ金属、あるいはアルカリ土類金属と芳香族化合物との間に形成される錯体（イオン塩）の触媒作用についての結果との対比である。

1964 年以来、これらイオン塩について行なっている結果を総合すると、次のような結論めいたものが得られる（もちろん、今後のより精密な結果を待たなければならない点が多いが）。

これらイオン塩は、アルカリ金属 (Li, Na, K, Rb, Cs), およびアルカリ土類金属 (Ba) と芳香族化合物からでき上がっているが*, これらイオン塩の表面で起こる交換反応を分類すると次のようになる。

(1) 水素分子 (H_2 または D_2) が固体錯体（イオン塩）の上に化学吸着されて水素交換反応が起こる場合：

(2) イオン塩を形成している有機物（芳香族化合物）の水素原子 ($H-\phi$) と、気相の水素が交換反応を起こす場合で、この反応は化学反応に属する。

* イオン塩をつくるには、アルカリ金属およびアルカリ土類金属の反応性（とくに水に対して）が強いので、真空中または、水を完全に除去して試料作製を行なう必要がある。そのため、真空中で有機物の薄膜と金属の蒸気を接してイオン塩をつくるか、あるいは完全に水を除去した溶媒（たとえばテトラヒドロフラン）中で、溶解した有機物とアルカリ金属（固相）とを作用させてつくる。後者の場合、操作はやっかいであるが、有機物のイオン価を正確に決めることができ、定量的測定には便利である。

なお、一般に電荷移動が2種の有機物どうしあるいは有機物と無機物との間に起こると、常磁性(paramagnetism)をもった電荷移動型錯体ができる。この種の電荷移動型錯体では、その常磁性に基づいて、 $o-H_2 \rightleftharpoons p-H_2$ の水素転換反応は起こるが、ここではこの問題についてはいささい触れず、軽水素-重水素交換反応を引き起こす、いわゆる化学機構にしばらく取り扱う。

表 3 アルカリ金属・芳香族イオン塩の水素反応

試料	反応速度定数 (hr ⁻¹)	活性化エネルギー (kcal/mole)
· Ba ²⁺	2.7	2.7
· 2Cs ⁺	1.5	6.9
· 2K ⁺	3.8 × 10 ⁻²	7.8
· 2Li ⁺	5.0 × 10 ⁻³	6.7
<hr/>
· Cs ⁺	(5 × 10 ⁻³)	~0
· K ⁺	(6 × 10 ⁻²)	~0

これらの反応は、両者の合計として $H_2 + D_2 \rightleftharpoons 2HD$ の反応で求められるが、(2)の反応のみは D_2 をイオン塩と反応させて観測され、両者を組み合わせることによって(1), (2)の機構を分離することができる。

いま、一例を示してみよう。

芳香族化合物からナフタセン ($C_{10}H_{12}$,) を選び、アルカリ金属を変えることによって、交換反応が著しく異なる組合わせが見いだされている⁽²⁸⁾ (表 3)。

この関係でとくに著しいことは、ナフタセンアニオンが1価の場合 (· M⁺) には交換反応はほとんど観測されず、表 3 に示す反応速度は、塩のもつ常磁性による水素転換反応 ($p-H_2 \rightleftharpoons o-H_2$) の速度を示したものである。

また、アルカリ金属を変えていくと、Li < K < Cs の順で交換反応速度が増大し、さらに Ba²⁺ 塩では Cs⁺ 塩の2倍にも及ぶ反応速度をもつ。これらの結果は、まずイオン塩を形成する芳香族有機化合物のもつ過剰な電荷 (excess charge) が反応に貢献し、またカチオン (M⁺, M²⁺ など) の作用も著しい。

イオン塩を形成する成分のおおのについて、まったく反応性のないものを組み合わせることによって著しい水素交換反応を示す原因についてはまだ結論を出すことはできないが、これらイオン塩は固体を形成してのみ交換反応を起こすようであり**, したがって、イオン塩が

** イオン塩の不安定性から、気相状態での反応を調べることができていないが (H. Inokuchi, M. Tsuda and T. Kondow : *J. Catalysis*, 8, 91(1967)), 溶液中——たとえばテトラヒドロフラン溶液、あるいはシアノベンゼン・金属では、シアノベンゼン (mp-13°C) 自身を溶媒とするイオン塩溶液——では、水素交換反応は観測されていない。

形成する固体表面での解離交換反応として取り扱うべきであろう。

このような系と、ヒドロゲナーゼのような複雑な機構をもつものとの間に関連をもたせることが、果たして意味があるか否かはむずかしい問題である。とくに、ヒドロゲナーゼは分子（といっても、分子量が有機イオン塩に比べると10~100倍もあるから、見方を変えればイオン塩の集合体に相当するかもしれない）でも強い反応性を示すなどの問題点を含むが、その骨格をつくっている有機物だけで水素を解離吸着する能力を考えるとできるだろうか？むしろ、その中に含まれ金属——たとえそれが微量であっても——との相互作用のモデルに、このイオン塩のアルカリ（アルカリ土類）金属と有機物との間に相互作用の考え方を導入できないだろうか？

以上、筆者のヒドロゲナーゼの研究の概要をまとめてみた。酵素を純粋にするほど特異性は厳密となり、電子受容体としてチトクローム c_3 だけに作用するようになり、また、交換反応や転換反応のキネティックスも不純な酵素によるものとはだいぶおもしろきを異にする。このうえ、さらに酵素標品の純度を上げ、タンパク化学的アプローチにより反応機構を明らかにすることができるものと信じている。

E. Racker が、かつて

First purify, then think.

Don't waste your pure thinkings on
dirty enzymes.

といったことがある。ヒドロゲナーゼの研究も、thinking できる段階に入ったわけである。

稿を終るにあたり、田宮信雄先生、丸尾文治先生や、津田基之氏、森佳洋氏、相沢登美男氏、ならびに財政援助をしてくださった偕成会に感謝する。また、鉄分析に多大の援助を与えてくださった物性研究所田村正平博士に心よりお礼申し上げる。

文 献

- 1) A. Farkas, L. Farkas and J. Yudkin: *Proc. Roy. Soc. (London)*, **B** 115, 373 (1934).
- 2) B. Cavanagh, J. Horiuchi and M. Polanyi: *Nature*, **133**, 797 (1934).
- 3) A. I. Krasna and D. Rittenberg: *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 3015 (1954).
- 4) D. Rittenberg and A. I. Krasna: *Disc. Faraday Soc.*, **20**, 185 (1955).
- 5) N. Tamiya and S. L. Miller: *J. Biol. Chem.*, **238**,

2194 (1963).

田宮信雄: 科学, Vol. 27, 1957, p. 514.

- 6) M. Stephenson and L. H. Stickland: *Biochem. J.*, **25**, 205, 215 (1931).
- 7) A. J. Aspen and M. J. Wolin: *J. Biol. Chem.*, **241**, 4152 (1966).
- 8) H. F. Fisher, A. I. Krasna and D. Rittenberg: *J. Biol. Chem.*, **209**, 569 (1954).
- 9) N. Tamiya, Y. Kondo, T. Kameyama and S. Akabori: *J. Biochem.*, **42**, 613 (1955).
- 10) H. D. Peck, Jr. and H. Gest: *J. Bacteriol.*, **7**, 70 (1956).
- 11) L. Michaelis and E. S. Hill: *J. Gen. Physiol.*, **16**, 859 (1933).
- 12) A. I. Krasna and D. Rittenberg: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **42**, 180 (1956).
- 13) H. D. Peck, Jr., A. San Pietro and H. Gest: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **42**, 13 (1956).
- 14) C. Fromageot and J. C. Senez, in "Comparative Biochemistry", M. Florkin and H. S. Mason, ed., Vol. 1, 1960, p. 382.
- 15) N. Tamiya, Y. Yamaguchi, M. Honya and T. Yagi: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **22**, 43 (1966).
- 16) T. Yagi, M. Honya and N. Tamiya: *Biochim. Biophys. Acta*, **153**, 699 (1968).
- 17) L. E. Mortenson, R. C. Valentine and J. E. Carnahan: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **7**, 448 (1962).
- 18) W. Lovenberg, B. B. Buchanan and J. C. Rabinowitz: *J. Biol. Chem.*, **238**, 3899 (1963).
- 19) R. C. Valentine: *Bacteriol. Rev.*, **28**, 497 (1964). R. Malkin and J. C. Rabinowitz: *Ann. Rev. Biochem.*, **36**, 113 (1967).
- 20) 田中英: 化学の領域, Vol. 20, 1966, p. 504. 松原央: 蛋白質 核酸 酵素, Vol. 13, 1968, p. 632.
- 21) Enzyme Nomenclature, Recommendations 1964 of the International Union of Biochemistry, Elsevier (1965).
- 22) B. A. C. Ackrell, R. N. Asato and H. F. Mower: *J. Bacteriol.*, **92**, 828 (1966).
- 23) Y. Kondo, T. Kameyama and N. Tamiya: *J. Biochem.*, **44**, 61 (1957).
- 24) A. I. Krasna, E. Riklis and D. Rittenberg: *J. Biol. Chem.*, **235**, 2717 (1960).
- 25) T. Yagi, M. Tsuda, Y. Mori and H. Inokuchi: *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 2801 (1969).
- 26) A. Couper, D. D. Eley and A. Hayward: *Disc. Faraday Soc.*, **20**, 174 (1955).
- 27) H. Inokuchi, N. Wakayama, T. Kondow and Y. Mori: *J. Chem. Phys.*, **46**, 837 (1967).
- 28) Y. Mori, N. Wakayama and H. Inokuchi: *J. Catalysis*, **12**, 15 (1968). N. Wakayama and H. Inokuchi: *J. Catalysis*, **15**, (1969). (in press)