

1. 研究の目的

昔に比べ電気の需要が都市部を中心に増えている。さらに、2011年の福島第一原子力発電所の事故により、原子力や火力発電に代わる新しいエネルギーの開発が望まれており、候補として、水素分子の生成・分解反応が注目を集めている。安価で効率の良い水素大量生成法の開発は水素の次世代エネルギーとして、また、水素分解反応は燃料電池としての利用が期待されている。

自然界には水素分子の生成・分解反応を行う微生物が存在し、微生物の水素代謝能力の本質はヒドロゲナーゼという金属タンパク質が担っている。ヒドロゲナーゼには、[NiFe]型、[FeFe]型、[Fe]型の3種類が知られており、これらの中で[NiFe]ヒドロゲナーゼの研究が最も進んでいる。ヒドロゲナーゼの反応を人工的に制御できれば大変有効であり、微生物が持つ水素酸化還元酵素の光活性化およびその反応メカニズムの解明は、基礎研究として重要である。また、新しい水素酸化還元系の設計・構築のための情報を得ることは新しい燃料電池の開発に繋がる可能性があり、本酵素の水素酸化還元反応の研究は工業化学的にも意義がある。本研究では、白色光やレーザー照射とフーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) や電子常磁性共鳴法 (EPR) を組み合わせて、[NiFe]ヒドロゲナーゼの不活性化型の一つである Ni-A 型の光応答性を調べた。また、スペクトル変化をもとに、その光応答メカニズムについても検討した。

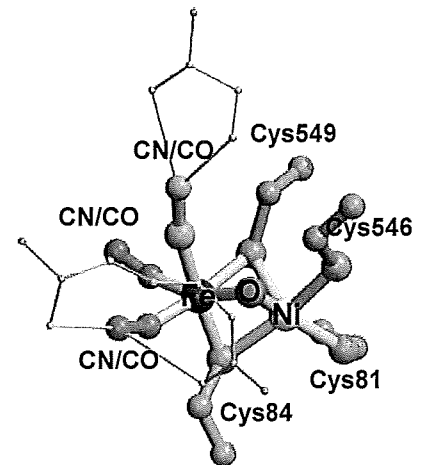


図 1. [NiFe]ヒドロゲナーゼの金属活性部位構造

2. 研究の内容(手法、経過、評価など。)

[NiFe]ヒドロゲナーゼはその「Ni-Fe 活性部位」で、水素分子の分解や合成を行い、菌体細胞膜内外のプロトン濃度勾配を調節する。[NiFe]ヒドロゲナーゼの不活性化型には、活性化されにくい Ni-A 型と比較的活性化されやすい Ni-B 型が存在する。研究代表者らはこれまでに、共鳴ラマン分光法や ESR 法により、Ni-A 型と Ni-B 型のそれぞれの活性部位構造を明らかにし、2つの型の反応性の違いが Ni イオンと Fe イオンの架橋配位子の違い (Ni-A 型では酸素分子、Ni-B 型では酸素原子) に由来することを明らかにした。本酵素の光応答性は還元型や一酸化炭素結合型では報告されているが、不活性化型での光応答性は報告されていない。

本研究では、[NiFe]ヒドロゲナーゼの Ni-Fe 活性部位の構造-機能相関および光応答性を調べるため、Ni-A 型に Ar⁺レーザー光 (457.9–514.5 nm) を室温で照射した。レーザー光照射により Ni-A 型の FT-IR スペクトルが変化し、Ni-A 型に光反応性があることが明らかとなった (図 2)。光照射を停止すると FT-IR スペクトルの変化は観

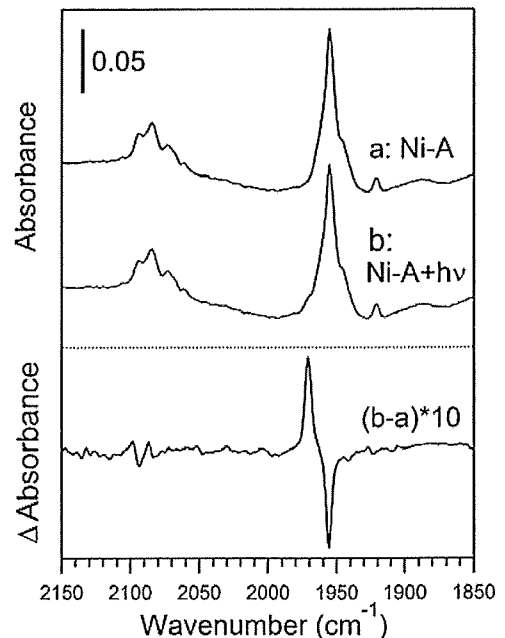


図 2. Ni-A 型 [NiFe]ヒドロゲナーゼへのレーザー光 (488 nm, 240 mW/cm²) 照射による FT-IR スペクトル変化: (a) 光照射前、(b) 光照射後とそれらの差スペクトル (10 倍拡大)。

2. 研究の内容(続き)(書ききれない場合には、同一形態のページを追加しても結構です。)

測されなくなったが、再度光照射を開始すると同様のスペクトル変化が観測され、光反応は可逆的であることが判明した。光照射によって生じた反応生成種の CO 伸縮振動 ($\nu(\text{CO})$)は 1971 cm^{-1} 、CN⁻伸縮振動 ($\nu(\text{CN}^-)$)は 2086 と 2098 cm^{-1} に観測され、Ni-A 型の $\nu(\text{CO})$ 振動数 1956 cm^{-1} と $\nu(\text{CN}^-)$ 振動数 2084 と 2094 cm^{-1} と異なる振動数を示した。Ni-A 型の ESR スペクトルでは Ni³⁺の信号が観測されるが、室温での Xe ランプを用いた可視光照射により Ni-A 型の ESR スペクトルが変化し(図 3)、光照射を停止するとスペクトル変化は観測されなくなった。光照射により生じたシグナルの g 値は 2.29 , 2.24 , 2.02 と求まり、Ni-A 型の g 値(2.30 , 2.23 , 2.01)と異なる値を示した。以上より、Ni-A 型への光照射により新たな種が生成したと考えられ、Ni-AL 型と名付けた。一方、もう一つの不活性型である Ni-B 型に同じ条件で光を照射しても FT-IR および ESR スペクトルは変化しなかった。

Ni-A 型の Ni イオンには、4 つの Cys の硫黄原子と架橋酸素分子の一つの酸素原子(XO₂)が配位し、Ni イオンは 5 配位の四角錐構造を有している。Ni-AL 型の g 値は Ni-A 型の g 値に非常に近いことから、Ni イオンの電子状態は Ni-A 型と類似していることが推測された。一方、Ni-AL 型の $\nu(\text{CN}^-)$ 振動数は Ni-A 型の 2084 と 2094 cm^{-1} からあまり変化しなかったが、 $\nu(\text{CO})$ 振動数は Ni-A 型の 1956 cm^{-1} から 15 cm^{-1} 高波数シフトした。 $\nu(\text{CO})$ 振動数が比較的大きく高波数シフトしたことよ

り、Ni-AL 型は Ni-A 型に比べて Fe イオンに対して配位子である一酸化炭素の反対側に位置する架橋 2 原子分子配位子から Fe イオンへの電子供与が弱くなり、Fe イオンの電子密度が減少したことが示唆された。以上より、光照射により Fe イオンと架橋酸素原子の結合が切れることにより、Ni イオンの電子状態はあまり変化しないが、Fe イオンの電子状態が変化したと推測された(図 4)。

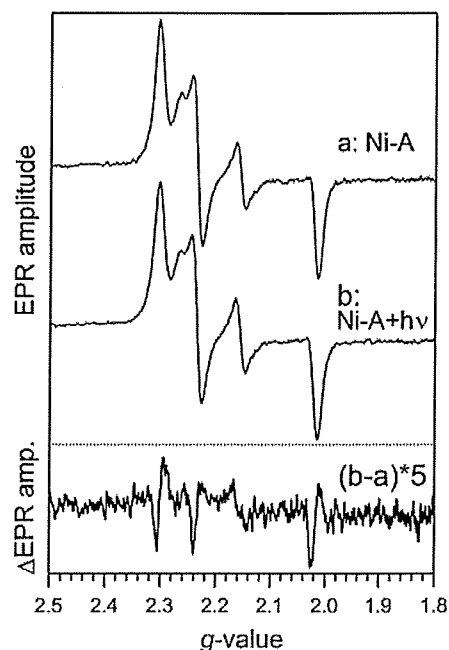


図 3. Ni-A 型[NiFe]ヒドロゲナーゼへの光照射による ESR スペクトル変化:(a)光照射前、(b)光照射後とそれらの差スペクトル(5 倍拡大)。光照射は Xe ランプ(1.8 W/cm^2)を用いた。

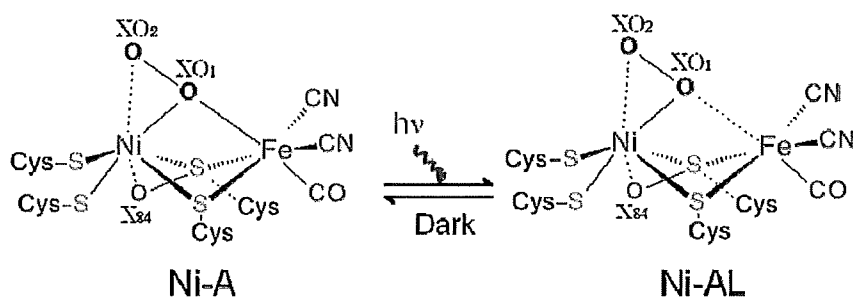


図 4. Ni-A 型[NiFe]ヒドロゲナーゼの光応答性の模式図

3. 研究の結論、今後の課題

[NiFe]ヒドロゲナーゼの不活性型の一つであるNi-A型に室温で光を照射するとFT-IRおよびESRスペクトルが変化し、Ni-A型に光応答性があることが初めて見出された。Ni-A型が光応答性を示したのに対して、Ni-B型は光応答性を示さなかった。本研究で得られた結果は本酵素の新たな性質を明らかにしたものであるが、本酵素のいくつかの還元型や一酸化炭素結合型などの状態でも光応答性が報告されており、本酵素の光応答性は機能と関係がある可能性がある。

今後は、本酵素の光応答性の利用による水素発生・分解機構の解明が期待される。また、本酵素の還元型ではヒドリドが架橋していると考えられているが、直接検出されていない。Ni-B型が1電子還元されたNi-SIa型が活性化サイクルの一つの状態と考えられているが、Ni-SIaの構造も推測の域を出ず、本酵素の水素発生・分解機構に不明な点が多い。様々な手法により本酵素の反応機構の理解が深まり、その知見をもとに新しい燃料電池などが開発されることを望む。

4 成果の価値(とくに判りやすく書いてください。)

1. 社会的価値

近年、都市部を中心に電気の需要が増え、原子力や火力発電に変わる新しいエネルギーの開発が望まれている。その中で、新しいエネルギーの候補として水素を用いる燃料電池の利用が提唱されている。実際、燃料電池を使った車の開発も始まっているが、より有効な燃料電池への改良が必要である。そこで、微生物が持つ水素酸化還元酵素の反応の光制御に成功すれば、新しい触媒開発につながる。本研究では、新しい燃料電池の開発に役立つよう、水素発生・分解酵素である[NiFe]ヒドロゲナーゼの基礎研究を行った。

2. 学術的価値

微生物が持つ水素の代謝能力の本質は水素酸化還元酵素・ヒドロゲナーゼという金属タンパク質であり、[NiFe]ヒドロゲナーゼは活性部位にNiイオンとFeイオンを有する。本研究では、不活性型の一つであるNi-A型に光応答性があることが初めて見出され、光照射によりFeイオンと架橋酸素原子の結合が切断されるメカニズムを提唱した。本研究成果によりヒドロゲナーゼの反応機構の理解が深まり、水素生成・分解反応を光制御する新しい酵素科学の展開が期待される。

3. 成果論文(本研究で得られた論文等を年代順に書いてください。未発表のものは公表予定を書いてください。)

学術論文

Photosensitivity of the Ni-A State of [NiFe] Hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F with Visible Light

H. Osuka, Y. Shomura, H. Komori, N. Shibata, S. Nagao, Y. Higuchi, S. Hirota, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **430**, 284-288 (2013).

招待講演

1. Shun Hirota, Protein and Peptide Structural Changes: Protein Aggregation and Photoactive Biomaterials, *Nanotechnology and Medical Sciences (ICNMS-2010)*, Kolhapur, India, 2010年10月22日.
2. Shun Hirota, Investigation and Regulation of Protein and Peptide Structural Changes, *Japanese-German Scientific Cooperation in the 21st Century: Biocatalysts for Future Feedstock Utilization*, Nara, 2011年4月26日.