

様 式 C - 7 - 1

平成 27 年度科学研究費助成事業（科学研究費補助金）実績報告書（研究実績報告書）

1. 機 関 番 号

1 4 6 0 3

2. 研究機関名

奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名

新学術領域研究（研究領域提案型）

4. 研究 期 間

平成 27 年度～平成 28 年度

5. 課 題 番 号

1 5 H 0 0 9 4 5

6. 研究課題名

光活性化を利用した[NiFe]ヒドロゲナーゼの触媒反応機構の分光学的研究

7. 研究代表者

研究 者 番 号	研究 代 表 者 名	所 属 部 局 名	職 名
9 0 2 8 3 4 5 7	ヒロタ シュン 廣田 俊	物質創成科学研究科	教授

8. 研究分担者

研究 者 番 号	研究 分 担 者 名	所属研究機関名・部局名	職 名

9. 研究実績の概要

標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼの触媒サイクルの1つの状態であるNi-Cへの光照射で生じるNi-Lには、Niの配位環境が僅かに異なる3つの状態（Ni-L1、Ni-L2、Ni-L3）が存在することはEPRを用いた研究により報告されているが、それらの違いは不明であった。本年度は、水素活性化で得られたNi-Cへのレーザー光照射により、Ni-Lの異なる2状態を同時にFT-IRにより観測することに成功した。弱塩基性条件下では、Ni-Cへの光照射により1911 cm⁻¹にCO伸縮振動（CO）、2047 cm⁻¹と2061 cm⁻¹にCN-伸縮振動（CN）を示すNi-L2の生成が観測されたが、塩基性条件下での光照射では、1890 cm⁻¹にCO、2034 cm⁻¹と2047 cm⁻¹にCNを示す新たな状態が検出された。Ni-L3のEPRシグナルは塩基性条件下で観測されることから、塩基性条件下で観測された1890 cm⁻¹のバンドをNi-L3のCOに帰属した。標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼの水素分解過程で生じるヒドリド（H⁻）はNi-Fe間に架橋してからH⁺として放出されると考えられている。Ni-Cへの光照射で生じるNi-L2では、放出されたH⁺はNiに末端配位しているシステイン（Cys546）配位子の硫黄に結合することが報告されていることから、Ni-L3はCys546の脱プロトン化状態であることが示唆された。Ni-L3のCOバンドは、Ni-L2に比べて20 cm⁻¹低波数シフトし、標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼの各種状態のCOバンドの中で最も低波数に観測された。Ni-L3では、Ni配位している硫黄の脱プロトン化のため、Niの電子密度が上昇し、COの振動数が減少したと推測される。Ni-L2とNi-L3のCOバンドの強度比を温度の逆数に対してプロットし、Ni-L2のプロトン解離に伴うエンタルピー変化およびエントロピー変化を求めたところ、それぞれ6.4±0.8 kJ mol⁻¹および25.5±10.3 J mol⁻¹ K⁻¹と非常に小さい値が得られ、[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性部位ではプロトン移動が効率よく行われることが示された。

10. キーワード

(1) 蛋白質	(2) 酵素	(3) 光活性化	(4) 赤外分光法
(5) ヒドロゲナーゼ	(6) 金属蛋白質	(7) 反応機構	(8)

11. 現在までの進捗状況

(区分) (2) おおむね順調に進展している。

(理由)

本年度は、塩基性条件下で[NiFe]ヒドロゲナーゼのNi-L3をFT-IRにより検出することに初めて成功し、Ni-L2からNi-L3への遷移にCys546の硫黄の脱プロトン化が関与し、プロトン移動が効率よく行われることを示した。これらの研究成果は[NiFe]ヒドロゲナーゼの反応機構に関する新しい知見である。

12. 今後の研究の推進方策

(今後の推進方策)

[NiFe]ヒドロゲナーゼによる水素分子のヘテロリティックな分解過程で生じるヒドリドはNiとFe間に架橋するのに対し、プロトンはNiに末端配位しているシステインの側鎖硫黄に結合することが提唱されている。嫌気性細菌の持つほとんどの[NiFe]ヒドロゲナーゼで、Niに末端配位しているシステインは酸素存在下で酸化修飾され、システインスルフェン酸になった状態を取り、ヒドロゲナーゼは活性化に時間を要する。これは、ヒドロゲナーゼを燃料電池や光合成システムと組み合わせるには決定的な障害であるが、酸化型[NiFe]ヒドロゲナーゼが活性化されると、修飾システインは未修飾システインに変換される。そこで、今後は光照射による不活性状態から活性状態への変換をFT-IRスペクトルを用いて調べ、本酵素の活性化機構を明らかにする予定である。

13. 研究発表(平成27年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(0)件/うち査読付論文 計(0)件/うち国際共著論文 計(0)件/うちオープンアクセス 計(0)件

著 者 名	論 文 標 題				
雑 誌 名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
オープンアクセス					

(学会発表) 計(2)件/うち招待講演 計(0)件/うち国際学会 計(1)件

発 表 者 名	発 表 標 題	
太虎林、西川幸志、井上誠也、樋口芳樹、廣田俊	[NiFe]ヒドロゲナーゼの光照射で生じるNi-L状態の分光学的研究	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第42回生体分子科学討論会	2015年06月12日 ~ 2015年06月13日	高崎シティーギャラリー(群馬県高崎市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
Hulin Tai, Koji Nishikawa, Seliya Inoue, Masayuki Suzuki, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota	Control of the Transition between Ni-C and Ni-SIa States in the Catalytic Cycle of [NiFe] Hydrogenase by the Redox State of the Proximal Fe-S Cluster	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
17th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC17)(国際学会)	2015年07月20日 ~ 2015年07月24日	China National Convention Center (Beijing, China)

(図書) 計(0)件

著 者 名	出 版 社		
書 名	発行年	総ページ数	
	<div></div> <div></div> <div></div>		

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

(出願) 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

(取得) 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 科研費を使用して開催した国際研究集会

(国際研究集会) 計(0)件

国際研究集会名	開催年月日	開催場所

16. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

(1) 国際共同研究: -

17.備考

--