

平成28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
90283457	ヒロタ シュン	物質創成科学研究科	教授
	廣田 俊		

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]ヒドロゲナーゼは酸化型で安定であり、酸塩基平衡により活性準備状態Ni-SIrが触媒サイクルの1つの状態であるNi-SIaに変換され、触媒反応（H₂の分解/合成）が可能となる。したがって、本酵素の触媒反応機構の理解には、Ni-SIrからNi-SIaへの変換機構の理解が不可欠であるが、その変換機構の詳細は不明であった。本年度は、103–238 Kでレーザー光(514.5 nm)照射下のFT-IRスペクトルを測定することで、Ni-SIrとNi-SIa間の酸塩基平衡の反応機構を明らかにした。まず、好氣的に精製した酵素を37℃でH₂と5.5時間反応させることでH₂還元型酵素を調製した。次に、H₂還元型酵素を5当量のフェノサフラニン(E_m = -252 mV)を用いて部分的に酸化させ、主にNi-SIrとNi-SIaを含むフェノサフラニン酸化型酵素を調製した。フェノサフラニン酸化型酵素の（光照射時）－（光照射前）のFT-IR差スペクトルには、Ni-SIaのCO伸縮振動（ν_{CO}：1943 cm⁻¹）とCN－伸縮振動（ν_{CN}：2077と2089 cm⁻¹）に由来する正のピークおよびNi-SIrのν_{CO}（1924 cm⁻¹）とν_{CN}（2056と2071 cm⁻¹）に由来する負のピークが観測された。差スペクトルにおける正のピークは生成物、負のピークは反応物に由来し、Ni-SIrがNi-SIaに光活性化されることが明らかとなった。さらに、溶液のpHを8.0から9.6に上げるとNi-SIrの光活性化が著しく抑制されたことから、この光活性化反応ではNiとFe間の架橋配位子OH⁻がプロトン化され、H₂O分子として解離すると解釈した。また、酵素反応を追跡するためのストップフロー共鳴ラマン装置を開発した。これらの研究成果は[NiFe]ヒドロゲナーゼの反応機構の理解に役立つものである。

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)

(理由)
28年度が最終年度であるため、記入しない。

12. 今後の研究の推進方策

(今後の推進方策)
28年度が最終年度であるため、記入しない。

13.研究発表（平成28年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計（2）件／うち査読付論文 計（2）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				
H. Tai, L. Xu, S. Inoue, K. Nishikawa, Y. Higuchi, and S. Hirota	Photoactivation of the Ni-SIr State to Ni-SIa State in [NiFe] Hydrogenase: FT-IR Study on the Light Reactivity of the Ready Ni-SIr State and As-isolated Enzyme Revisited				
雑 誌 名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著
Physical Chemistry Chemical Physics	有	18	2016	22025-22030	—
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）					
10.1039/c6cp04628b					
オープンアクセス					
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難					

著 者 名	論 文 標 題				
S. Yanagisawa, M. S. Deshpande, S. Hirota, T. Nakagawa, and T. Ogura	Improved Stopped-Flow Time-Resolved Resonance Raman Spectroscopy Device for Studying Enzymatic Reactions				
雑 誌 名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著
Journal of Raman Spectroscopy	有	48	2017	680-685	—
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）					
10.1002/jrs.5100					
オープンアクセス					
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難					

〔学会発表〕 計（6）件／うち招待講演 計（1）件／うち国際学会 計（2）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	FT-IRとEPRを用いた[NiFe]ヒドロゲナーゼの新規中間体の特定と鉄硫黄クラスターによる反応制御機構の解明	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第16回日本蛋白質科学会年会	2016年06月07日～ 2016年06月09日	福岡国際会議場（福岡県福岡市）

発 表 者 名	発 表 標 題	
S. Hirota, H. Tai, K. Nishikawa, S. Inoue, and Y. Higuchi	Characterization of the Light-induced Ni-L States of [NiFe] Hydrogenase from <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Miyazaki F	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
11th International Hydrogenase Conference (Hydrogenase 2016) (国際学会)	2016年07月10日～ 2016年07月14日	Marseille, France

発 表 者 名	発 表 標 題	
Y. Higuchi, N. D. M. Noor, H. Matsuura, K. Nishikawa, H. Nishihara, K-S. Yoon, S. Ogo, H. Tai, S. Hirota, and Y. Shomura	Structural and Biochemical Studies of Hyd-2 Type [NiFe]-hydrogenase from <i>Citrobacter</i> sp. S-77 - Proposal of the General Mechanism of O ₂ -tolerance of Hydrogenases	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
11th International Hydrogenase Conference (Hydrogenase 2016) (招待講演) (国際学会)	2016年07月10日～ 2016年07月14日	Marseille, France

発 表 者 名	発 表 標 題	
許力揚、太虎林、井上誠也、西川幸志、樋口芳樹、廣田俊	[NiFe]ヒドロゲナーゼにおけるNi-SIr状態からNi-SIa状態への光活性化	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第10回バイオ関連化学シンポジウム	2016年09月07日～ 2016年09月09日	石川県立音楽堂・もてなしドーム地下イベント広場（石川県金沢市）

発 表 者 名	発 表 標 題	
太虎林、許力揚、井上誠也、西川幸志、樋口芳樹、廣田俊	光照射を利用した硫酸還元菌由来[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性化機構のFT-IR研究	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第54回日本生物物理学会年会	2016年11月25日～ 2016年11月27日	つくば国際会議場（茨城県つくば市）

発 表 者 名	発 表 標 題	
太虎林、許力揚、西川幸志、樋口芳樹、廣田俊	光照射を利用した[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性化機構のFT-IR研究	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
日本化学会第97春季年会	2017年03月16日～ 2017年03月19日	慶應義塾大学日吉キャンパス（神奈川県横浜市）

〔図書〕 計（0）件

著 者 名	出 版 社		
書 名	発行年	総ページ数	

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