

様 式 F - 7 - 1

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成 2 8 年度）

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 若手研究(B) 4. 補助事業期間 平成 2 8 年度 ~ 平成 2 9 年度
5. 課 題 番 号 

1	6	K	1	7	9	3	6
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題名 活性部位システイン配位子の酸化修飾による[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性阻害機構
7. 研究代表者

研究 者 番 号	研究 代 表 者 名	所 属 部 局 名	職 名
4 0 5 1 2 5 5 4	タイ コリン 太 虎林	物質創成科学研究科	特任助教

## 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

硫酸還元菌由来[NiFe]ヒドロゲナーゼでは、活性準備状態Ni-SIrは酸塩基平衡により活性状態の一つであるNi-SIaに変換され、H<sub>2</sub>の分解/合成が可能となるが、この酸塩基平衡反応機構の詳細は不明であった。2016年度では、H<sub>2</sub>還元型酵素を5当量のフェノサフラニン（E<sub>m</sub> = -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。低温（103 - 238 K）でレーザー光（514.5 nm）照射下のフェノサフラニン酸化型酵素のFT-IRスペクトルを測定することで、Ni-SIrはNi-SIaに光活性化することを発見した。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架橋配位子OH<sup>-</sup>とFe或いはNi間の配位結合の一つが切れることでプロトン化され、H<sub>2</sub>Oとして解離すると解釈した。一方、従来の研究により、Ni-SIrは不活性状態Ni-SLに光変換されると提唱されていたが、好氣的に精製した不活性状態の酵素への光照射により、Ni-SLは本酵素で報告されているどの不活性状態よりも活性化されにくい新しい不活性状態（Ni-SXと命名）から光変換されることを突き止めた。Ni-SXはin vitroでのO<sub>2</sub>による本酵素の不活性化では形成されないが、細胞（硫酸還元菌）内環境下で形成されることが示された。硫黄の代謝に関与するほかの[NiFe]ヒドロゲナーゼで、システイン配位子の一つがペルスルフィド化された不活性状態がX線結晶構造解析より提唱されており、その不活性状態の分光学的性質がNi-SXと酷似していることから、Ni-SXでも類似した活性部位構造が形成され、酵素の活性化が阻害されたと解釈した。これらの結果は、[NiFe]ヒドロゲナーゼの活性化/不活性化機構の理解に寄与するものである。

## 10. キーワード

(1) 水素	(2) ヒドロゲナーゼ	(3) 酸塩基平衡	(4) 光活性化
(5) FT-IR	(6)	(7)	(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 )

活性準備状態Ni-SIrが不活性状態であるNi-SLに光変換されると考えられていたことが間違いで、Ni-SIrはNi-SIaに光活性化することを発見した。Ni-SLは本酵素で報告されているすべての不活性状態よりも活性化されにくい新たな不活性状態(Ni-SXと命名)への光照射により生成することを突き止めた。Ni-SXでは、Niに末端配位しているシステイン配位子の一つがペルスルフィド化されることで、活性化が阻害されたと解釈した。これらの研究成果をPhysical Chemistry Chemical Physics誌(2016)に発表した。

## 12. 今後の研究の推進方策 等

( 今後の推進方策 )

2017年度では、光照射後のNi-SIaからNi-SIrへの再平衡化反応のキネティクスの温度依存性をFT-IRスペクトルにより追跡し、Ni-SIaからNi-SIrへの脱プロトン化反応の活性化エンタルピーと活性化エントロピーを求めることで、本酵素の酸塩基平衡機構を明らかにする。さらに、Ni-SIrとNi-SIa間の酸塩基平衡反応過程で供給・放出されるプロトンの輸送に関与するアミノ酸を特定し、本酵素の活性化・不活性化機構の全容解明を目指す。

( 次年度使用額が生じた理由と使用計画 )

( 理由 )

特注品の納品が若干遅れたためである。

( 使用計画 )

2017年度の物品費に充てる。

( 課題番号 : 16K17936 )

( 注 ) ・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

( 2 / 6 )

## 13. 研究発表（平成28年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計（1）件／うち査読付論文 計（1）件／うち国際共著 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. Hirora		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						

〔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	福岡国際会議場（福岡県福岡市）

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 Citrobacter sp. S-77 - proposal of the general mechanism of O <sub>2</sub> -tolerance of [NiFe]-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13日	Marseille, France

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11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	石川県立音楽堂 (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 5 4 回日本生物物理学会年会	2016年11月25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)	2017年03月16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	
	<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

超分子集合体科学研究室

<http://mswebs.naist.jp/LABs/hirota/index.html>