

研究報告書

「[Fe]-ヒドロゲナーゼの活性中心鉄錯体の生合成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 嶋 盛吾

1. 研究のねらい

水素やメタンは有望な再生可能エネルギーとして注目され、多くの生産利用技術が提案されている。なかでも、太陽光を利用した水素生産および有用物質の生産は、無公害で理想的なエネルギー変換技術として実現が望まれている。しかしその実用化に向けていくつもの基盤技術の開発が必要である。そのひとつとして、安価高性能の触媒の開発が上げられる。例えば水素生産あるいは燃料電池触媒として白金が多く使われてきた。しかし白金は高価であるだけでなく埋蔵量に限りがあることから、水素生産利用技術の実用化には新しい触媒の開発が必要である。微生物の生産する酵素ヒドロゲナーゼは水素の発生と利用を触媒することから、白金に替わるものとして注目され、その活性中心の構造と機能およびモデル化合物合成の研究が活発になされている。また微生物のメタン代謝に含まれる酵素には、光エネルギーの物質変換技術開発の手本になるような反応を促進するものがある。

酵素機能を利用した水素あるいはメタンの生産と利用に向けて、本研究ではメタン代謝微生物に含まれる複数の酵素を研究対象とする。微生物のメタン生成代謝に必要な還元力（電子）は水素ガスから得られるが、水素ガスから還元力を取り出す反応を促進する酵素がヒドロゲナーゼである。[Fe]-ヒドロゲナーゼと呼ばれる酵素の活性中心を構成する FeGP-コファクターは担当研究者のグループにより発見された新規な有機鉄錯体である。本研究ではまず FeGP-コファクターの構造を明らかにし、本酵素のさらなる活用のために、反応促進作用における本鉄錯体の機能解析を実施する。最終的な研究目標は FeGP コファクターの生合成機構の解明である。この研究結果から新しい触媒物質の合成指針を得ることができ、本鉄錯体を模倣したモデル化合物合成の化学的基盤を構築できる。

メタン代謝には他にも有用な酵素が多く含まれている。メタン菌に含まれるもうひとつのヒドロゲナーゼである [NiFe]-ヒドロゲナーゼは水素ガスを分解して電子を取り出すことができる。その逆反応を利用して電子と水素イオンから水素ガスを生産することもできる。また、メチル補酵素 M 還元酵素はメタンの生成と分解を促進することができる。本研究ではこれらの酵素の構造と機能を総合的に理解することも重要な研究要素として位置づけた。

2. 研究成果

(1) 概要

質量分析および赤外分光分析を用いて、FeGP コファクターの化学構造を決定することに成功した [2,3] (引用は(5)主な成果リストの原著論文番号)。触媒機能を担っている特殊な鉄錯体構造を解明できたことで、触媒機能ならびに生合成機構の解明に向けての基礎を確立した。酵素反応機構を研究するため、反応阻害剤を探索し、イソシアニド化合物が[Fe]-ヒドロゲナーゼ

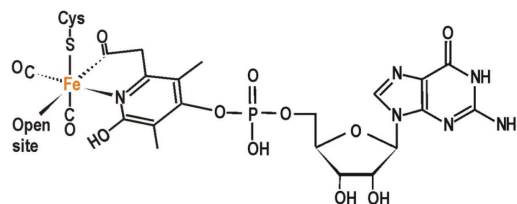
を強力に阻害することを発見し、イソシアニドが結合した [Fe]-ヒドロゲナーゼの結晶構造を解明し、触媒機構を提案した[1,4,5]。[Fe]-ヒドロゲナーゼを生産するメタン生成菌を安定同位体で標識し、FeGP コファクターへの取り込みを調べた。標識元素の位置を質量分析と NMR で解析し、逆合成によって生合成材料を解明した[8]。さらに FeGP コファクターの生合成を担う酵素 (HcgB、HcgC、HcgD、HcgE および HcgF) を大腸菌で生産し、「構造ゲノム学手法」を用いて酵素タンパク質の X 線結晶構造から機能を解明した [6,7] (プレスリリース第 992 号 平成25年10月29日) (投稿中および投稿準備中結果を含む)。

メタン代謝に含まれる酵素の構造と機能を明らかにするため、メタン生成菌に含まれる酵素および黒海海底の微生物マットに生息する嫌氣的メタン分解菌の酵素の構造と機能を明らかにした [10,12,13]。特に嫌氣的メタン酸化酵素の結晶構造解析[12]は、嫌氣的メタン酸化の反応基質の構造解明に成功した点で重要であった(プレスリリース第 848 号 平成23年11月25日)。メタン生成微生物のヒドロゲナーゼのひとつである F_{420} 還元[NiFe]-ヒドロゲナーゼの立体構造を電子顕微鏡解析により明らかにした。本酵素は、酵素としては非常に珍しい内部に空洞をもつ球状構造(ナノボール構造)を持つことを発見した[9,11]。また、メタン生成菌のエネルギー獲得反応において重要な役割を担う膜結合メチル基転移酵素の部分構造を結晶構造解析で解明した(投稿準備中)。さらに化学的に合成した FeGP コファクターの類似体をタンパク質に導入し、半合成[Fe]-ヒドロゲナーゼの作製に成功した (投稿中)。

(2) 詳細

研究テーマ A 「FeGP コファクターの構造と機能」

質量分析および赤外分光分析を用いた実験で、FeGP コファクターに含まれる鉄錯体の化学構造を決定した(図 1)。知られている生体物質でアシル炭素配位子を含む錯体は FeGP コファクターだけであり、その触媒機能ならびに生合成機構が注目された[2,3]。イソシアニドが本酵素を特異的に阻害することを発見し[4]、イソシアニドが結合した[Fe]-ヒドロゲナーゼの結晶構造を解明し、本酵素の触媒機構を提案した[1,5]。メタン菌には生育のための炭素源として酢酸などを細胞内に取り込むこともあるものがある。数種類のメタン菌を利用して FeGP-コファクターに含まれるグアニリルピリジノールおよび一酸化炭素鉄配位子への ^{13}C 炭素安定同位体標識した化学物質の取り込みを調べた。標識元素の位置を質量分析と NMR で解析し、逆合成によって生合成経路を推定した [8]。FeGP-コファクターのリング構造の生合成材料が 2,3-ジヒドロキシ-4-オキソペンタノエートとアスパラギン酸であることを提案した。またメチル基のひとつがメチオニンから生成することが解明された。一酸化炭素およびアシル配位子は CO_2 から生成することが示された。



FeGP-コファクター

図 1 本さがけ研究で証明された FeGP コファクターの化学構造

研究テーマ B「FeGP コファクター生合成経路の解明」

Hcg と呼ばれる酵素群がメタン菌の生体内で FeGP コファクターを作ると推定されていた。タンパク質である酵素の機能を推定するために、一般的にアミノ酸配列を既知の酵素と比較する方法が用いられるが、その手法では祖先が異なるたんぱく質同士の場合、機能が似ていてもアミノ酸配列は似ていないため、実際にたんぱく質の機能を解明することは困難であった。本研究では立体構造が類似しているたんぱく質は同じ機能を持つことに着目し、立体構造からたんぱく質の機能を探索する構造ゲノム学の手法を用いて、HcgB タンパク質の機能を予測し、化学分析と X 線結晶構造解析によってその機能を証明した[7] (図 2)。具体的には、HcgB は FeGP コファクターの有機部分である「グアニリルピリジノール」を完成する反応を促進する機能を持つことが分かり、さらにこの酵素で合成された物質の構造も明らかになった。この構造ゲノム学のコンセプトを応用し、さらに HcgD [6]、HcgE および HcgF の機能を結晶学的な手法と融合することで機能を解明できた (投稿中)。

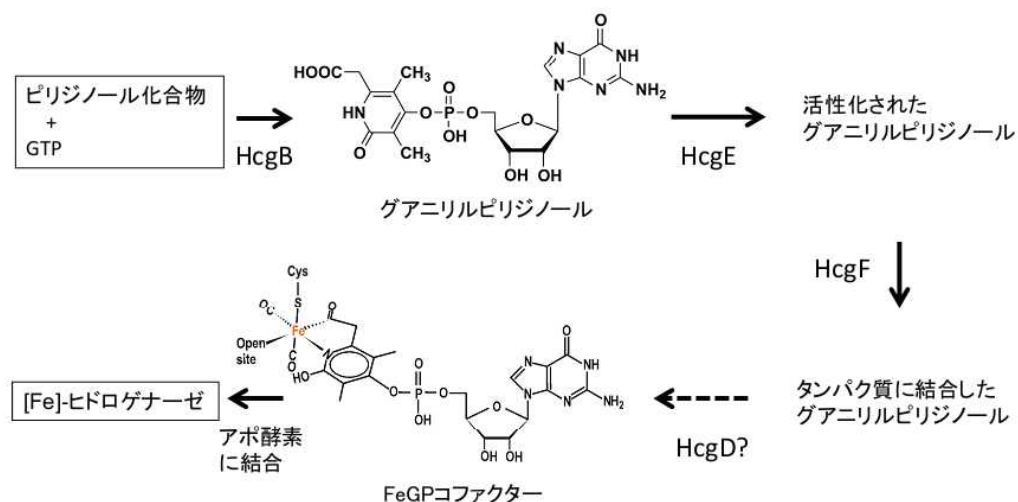


図 2 本さがけ研究で解明された FeGP コファクター生合成経路

研究テーマ C「メタン代謝酵素の構造と機能」

メタン代謝に含まれる酵素の反応機構を解明し、人工光合成に向けての基盤的情報を得るため、これらの代謝に含まれる重要な酵素の構造と機能を明らかにした。嫌気メタン酸化の研究材料としては黒海微生物マットを使用し[13]、メチル補酵素 M 還元酵素の立体構造を明らかにした [12]。またメタン生成菌の F_{420} 還元性[NiFe]ヒドロゲナーゼの立体構造を明らかにした [9,11]。メタン生成代謝でエネルギー獲得反応に直接関わっている膜結合メチル基転移酵素のなかでメチル基転移反応を触媒するタンパク質の結晶構造解析に成功した(投稿準備中)。本研究成果は、微生物のエネルギー獲得反応を理解する上において重要な成果である。

メチル補酵素 M 還元酵素の結晶構造

酸素がない海洋環境でメタンを分解する微生物酵素の立体構造を、画期的な手法で明らか

にした[12]。メタンは地球上のさまざまな自然環境で微生物の働きによって生産されている。海洋でも海底に堆積した有機物を原料にメタンが発生しているが、酸素がない条件でも微生物がメタンを分解していることが知られてきた。これまでに「メタン分解の最初の反応は、メタン生成反応を逆転させたような反応である」という仮説が提唱されてきたが、技術的な困難から証明されていなかった。我々はメタン分解反応を行っている黒海海底の微生物層を採取し、ある程度精製しただけの、混ざりものがある試料からメチル補酵素 M 還元酵素だけを結晶化することに成功し、X線解析によってその立体構造を世界で初めて明らかにした(図 3)。最も重要な発見は、無酸素メタン分解の最初の化学反応が明らかにできたことである。またメタン生成微生物に存在するメチル補酵素 M 還元酵素の解析を進め、新しいアミノ酸残基を発見した(投稿準備中)。

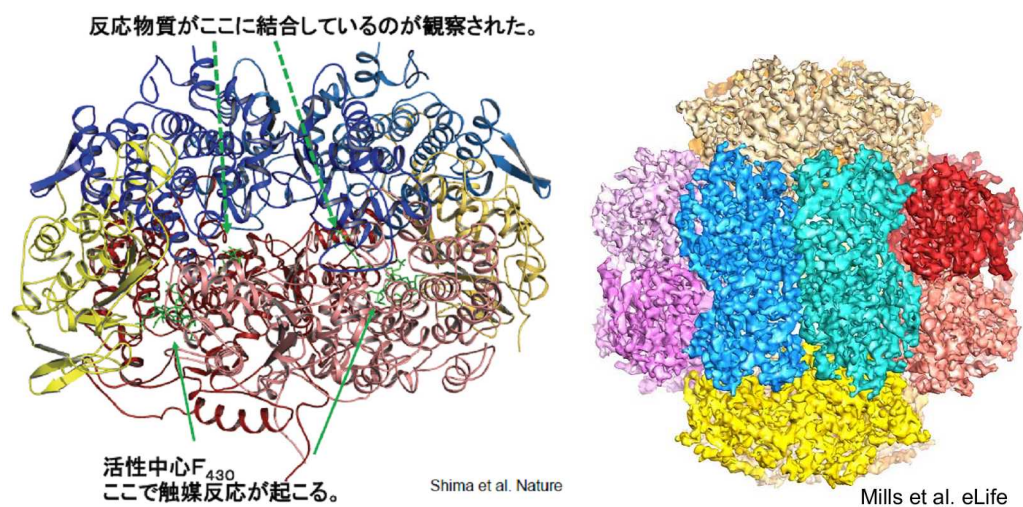


図 3 メタンを無酸素条件で酸化するメチル補酵素 M 還元酵素(左)と F₄₂₀還元性[NiFe]ヒドロゲナーゼ(右)の構造モデル

F₄₂₀還元性[NiFe]ヒドロゲナーゼの構造解析

メタン生成微生物では[Fe]-ヒドロゲナーゼとともに、[NiFe]-ヒドロゲナーゼと呼ばれる酵素も働いている。[NiFe]-ヒドロゲナーゼの活性中心はニッケルと鉄からなる二核の金属錯体であることからこの名前がついている。メタン生成菌の電子運搬物質 F₄₂₀を還元できる[NiFe]-ヒドロゲナーゼ構造は電子顕微鏡解析と X 線結晶構造解析によって明らかにした(図 3)[9,11]。本酵素は非常に珍しいナノボール型構造を有していることを発見した。[NiFe]-ヒドロゲナーゼは水素ガスから得られたヒドリドから電子を引き抜き電子運搬物質に渡す反応を触媒する。逆反応も触媒し、その場合電子キャリアーの電子をプロトンに渡して水素ガスを発生する。その触媒機能は人工光合成において白金に替わる水素ガス発生触媒として応用できる可能性がある。

3. 今後の展開

FeGP コファクターの生合成に関与する Hcg タンパク質のうち、HcgA と HcgG の結晶構造解析を

行う。構造ゲノム学手法による解析で他の Hcg タンパク質と同様に機能解析を行う。遺伝子破壊実験を並行して行い、Hcgタンパク質の詳細な解析を行う。これまでに得られた知見を総合して FeGP コファクターの試験管内での合成を試みる。化学合成した新しい形態のコファクターを作成し、コファクターの構造と機能の関係を明らかにする。試験管内合成系と化学合成系を組み合わせる様々な形態のコファクターを半合成的に作成し、高性能の水素変換触媒を構築する。

メタン代謝酵素の解析に関しては、膜結合メチル基転移酵素とヘテロジスルフィド還元酵素の結晶構造を解析し、酵素触媒機構を解明する。これらの酵素はメチル補酵素 M 還元酵素とともにメタン生成と嫌気メタン酸化代謝の中核を担う酵素であり、その触媒機構の総理解は、今後の人工光合成におけるメタン生成反応に役立つだけでなく、メタンは強力な温室効果ガスである懸念があることから、将来の地球環境問題を考える上でも重要となる。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

アシル配位子や CO 配位子を含む FeGP コファクターの特殊な錯体構造を解明できたことは、本さがけ研究の重要な出発点であった。第一目標である「[Fe]-ヒドロゲナーゼの活性中心鉄錯体の生合成」については、生合成機構のほぼ全容を明らかにすることができた。構造ゲノム学手法をうまく活用できたことが、その主な理由であると考えられる。構造ゲノム学手法が提唱されてから 20 年近くなり、コンセプトとしては新しくはないが、実際にタンパク質の機能を明らかにできた事例は極めて少なかった。今回は、酵素の反応物質と酵素タンパク質をいっしょに結晶化(共結晶化)することで、触媒反応に関する有用な情報が得られたことが大きかった。FeGP コファクターおよびその類似物質を将来活用していくための触媒化学および合成化学の基盤づくりができたと考えられる。また、本さがけ研究で活用した酵素タンパク質機能解析法は他分野の未知タンパク質の機能解析に役立つだろう。

メタン代謝系酵素の結晶構造研究にも、新しい研究手法を採用した。嫌気メタン酸化を促進するメチル補酵素 M 還元酵素を、メタン分解反応を行っている黒海海底の微生物層から直接採取し、混ざりものが残る試料からメチル補酵素 M 還元酵素だけを結晶化することに成功し、注目を集めた。また、F₄₂₀還元性[NiFe]ヒドロゲナーゼ巨大複合体を電子顕微鏡で世界最高レベルの解像度で解析することに成功し、同時に X 線結晶構造解析で詳細な触媒機構を解明できたことは、ヒドロゲナーゼ分野のみならず、タンパク質構造解析全般に関しても大きなインパクトを与えたと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究は、メタン生産菌内での多電子変換、ヒドリド移動などの解明を手掛かりに「自然を理解し」、「自然に学ぶ」視点から、人工光合成研究の中で最も重要な反応のひとつである CO₂ の多電子還元触媒反応を総合的に理解することに挑戦する大変意欲的な取り組みである。研究提案が採択されるまでの嶋博士の[Fe]-ヒドロゲナーゼに関する最先端の研究実績を基礎

に、研究開始から短期間に、既にメタン生産菌で発見された酵素[Fe]-ヒドロゲナーゼの活性中心である鉄錯体(FeGP-コファクター)の構造解明に初めて成功し、その生合成経路の全容をほぼ解明した。また、メタン生成の逆反応と推定されるメタン代謝酵素を黒海海底微生物から直接採取し嫌気メタン酸化を促進するメチル補酵素M還元酵素を、混合物状態の試料からメチル補酵素M還元酵素だけを結晶化することに成功し、そのX線構造解析に成功するという大変大きいインパクトを与える研究成果をあげている。[Fe]-ヒドロゲナーゼと共にメタン生成微生物の中で重要なもう一つの酵素[NiFe]-ヒドロゲナーゼが大変興味深い「ナノボール」構造を有することも発見している。さらに進んでは、化学的に合成したFeGPコファクターの類似体をタンパク質に導入再構成し、半合成[Fe]-ヒドロゲナーゼの作製に成功するなど、他にも多くの、興味深い研究成果をあげつつある。このように研究進展は瞠目すべき速度で極めて順調に進んでいると高く評価される。今後、生体内でのCO₂還元の総合理解に向けて一層の加速度的研究進展を期待している。人工光合成系では可視光照射により1電子単位の電荷分離を達成した後、如何にして酸化側、還元側で多電子変換過程を進行させ得るかが最大の課題の一つであるが、[Fe]-ヒドロゲナーゼ研究の第一人者と言える嶋博士の本さがけ研究で得られた研究成果は人工光合成系の還元系設計に極めて大きい指導原理を提示している。異分野融合、Multiple cross-fertilization、の視点においても、さがけ領域内の光合成系研究者と人工光合成系研究者の相互啓発を可能にした嶋博士の研究展開を研究総括として高く評価している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

研究テーマ A 「FeGP コファクターの構造と機能」

1. Tamura, H., Salomone-Stagni, M., Fujishiro, T., Warkentin, E., Meyer-Klaucke, W., Ermler, U. & Shima, S. (2013) Crystal structures of [Fe]-hydrogenase in complex with inhibitory isocyanides: implications for H₂-activation site. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 9656 -9659
2. Shima, S., Schick, M., Kahnt, J., Ataka, K., Steinbach, K. & Linne, U. (2012) Evidence for acyl-iron ligation in the active site of [Fe]-hydrogenase provided by mass spectrometry and infrared spectroscopy. *Dalton Trans.* 41, 767-771.
3. Salomone-Stagni, M., Stellato, F., C. Matthew Whaley, M., Vogt, S., Morante, S., Shima, S., Rauchfuss, T.B. & Meyer-Klaucke, W. (2010) The iron-site structure of [Fe]-hydrogenase and model systems: an X-ray absorption near edge spectroscopy study. *Dalton Trans.* 39, 3057-3064.
4. Shima, S. & Ataka, K. (2011) Isocyanides inhibit [Fe]-hydrogenase with very high affinity. *FEBS Lett.* 585, 353-356.
5. Shima, S., Vogt, S., Göbels, A. & Bill E. (2010) Iron-chromophore circular dichroism of [Fe]-hydrogenase: the conformational change required for H₂ activation. *Angew.*

研究テーマ B 「FeGP-コファクター生合成経路の解明」

6. Fujishiro, T., Ermler, U. Shima, S. (2014) A possible iron delivery function of the dinuclear iron center of HcgD in [Fe]-hydrogenase cofactor biosynthesis. *FEBS Lett.* 588: 2789–2793.
7. Fujishiro, T., Tamura, H., Schick, M., Kahnt, J., Xie, X., Ermler, U. & Shima, S. (2013) Identification of the HcgB enzyme in [Fe]-hydrogenase-cofactor biosynthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 12555–12558.
8. Schick, M., Xie, X., Ataka, K., Kahnt, J., Linne, U. and Shima, S. (2012) Biosynthesis of the iron-guanylylpyridinol cofactor of [Fe]-hydrogenase in methanogenic archaea as elucidated by stable-isotope labeling. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 3271–3280.

研究テーマ C 「メタン代謝酵素の構造と機能」

9. Vitt, S., Ma, K., Warkentin, E., Moll, J., Pierik, A., Shima, S. & Ermler, U. (2014) The F_{420} -reducing [NiFe] hydrogenase complex from *Methanothermobacter marburgensis*, the first X-ray structure of a group 3 family member. *J. Mol. Biol.* 426, 2813–2826.
10. Kojima, H., Moll, J., Kahnt, J., Fukui, M. & Shima, S. (2014) A reversed genetic approach reveals the coenzyme specificity and other catalytic properties of three enzymes putatively involved in anaerobic oxidation of methane with sulfate. *Environ. Microbiol* 16, 3431–3442. .
11. Mills, D.J., Vitt, S., Strauss, M., Shima, S. & Vonck, J. (2013) De novo modeling of the F_{420} -reducing [NiFe]-hydrogenase from a methanogenic archaeon by cryo-electron microscopy. *eLife*, 2, e00218.
12. Shima, S., Krueger, M., Weinert, T., Demmer, U., Kahnt, J., Thauer, R.K. & Ermler, U. (2012) Structure of a methyl-coenzyme M reductase from Black Sea mats that oxidize methane anaerobically. *Nature* 481, 98–101.
13. Basen, M., Krüger, M., Milucka, J., Kuever, J., Kahnt, J., Grundmann, O., Meyerdierks, A., Widdel, F. & Shima, S. (2011) Bacterial enzymes for dissimilatory sulfate reduction in a marine microbial mat (Black Sea) mediating anaerobic oxidation of methane. *Environ. Microbiol.* 13, 1370–1379.

(2)特許出願

研究期間累積件数: 該当なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

1. Shima, S. Gordon Research Conference on “Crystal structure of F_{420} -reducing