

## 特別寄稿 1

# 水素合成分解酵素・ヒドロゲナーゼの構造化学的研究 応用利用をめざした構造機能相関の解明

兵庫県立大学 大学院生命理学研究科 教授 ひぐち よしき  
樋口 芳樹



## 1. はじめに

人類が利用できる化石燃料は楽観的にはあと 100 年分くらいは供給され得ると考えられている。しかし二酸化炭素の排出量制限や原子力エネルギーの廃棄物処理等の現状の問題を考えると、これらの代替エネルギー源を得ることは我々にとって重要な課題である。水素はエネルギー源として利用しても最終的には水を生成する。水素は宇宙空間では最も豊富に存在する元素であるが、地球表層ではほとんどが水となっているため大気組成で「H<sub>2</sub>」の濃度は 1ppm 以下である。しかし、太陽エネルギーをうまく使い、水から水素を分離することができれば、永遠のエネルギー源として利用も可能であろう。水素を利用した燃料電池は、既に 19 世紀にはその原型が考えられていた。

一方、地球上の酸素濃度が今よりずっと低かった太古の昔から、水素をエネルギー源とする微生物は存在している。これらの微生物は、ヒドロゲナーゼとよばれる酵素をもっており、水素を利用して生命活動に必要なエネルギー（還元力）を得ている。また、水素以外の栄養源が得られた場合には、過剰となったエネルギーをヒドロゲナーゼの逆反応によって水素として細胞外に放出している。微生物は 10 億年以上も前から酵素を使った燃料電池および水素発生システムを利用してきている。このようにヒドロゲナーゼは水素の分解・合成反応を常温常圧で触媒することから、バイオ電池や新規の人工燃料電池・水素合成触媒の開発につながると期待されている。筆者等は、X 線結晶解析法によりヒドロゲナーゼの立体構造を解析し、その触媒作用の構造基盤の解明をめざしてきた。本稿では、多くの種類が見出されているヒドロゲナーゼの特徴を簡単に紹介した後、ヒドロゲナーゼの結晶構造から明らかになりつつある触媒反応機構やある特殊な菌株が有する酸素耐性ヒドロゲナーゼの分子機構について概説する。

## 2. ヒドロゲナーゼの分類と性質

ヒドロゲナーゼは、X 線結晶構造解析の結果に基づき、その活性部位の金属の構成に基づいて [NiFe]、[FeFe]、[Fe] ヒドロゲナーゼと分類されるのが一般的である<sup>1-4)</sup>。これらは、それぞれ活性部位に Ni と Fe が 1 原子ずつ、

Fe が 2 原子、そして Fe が 1 原子だけから構成されている。ヒドロゲナーゼの金属活性部位の構造を図 1 に示す。

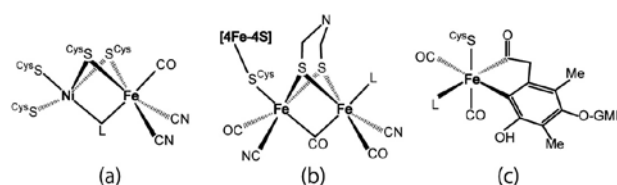


図 1 (a) [NiFe]、(b) [FeFe] および (c) [Fe] ヒドロゲナーゼの活性部位の構造

[Fe] ヒドロゲナーゼはメタン生成菌にのみ見られ、ある基質の水素化および脱水素と共役する。L: 配位子 (酵素の酸化還元状態で置き変わる、あるいは現時点では詳細が不明なもの)

図 1 の 3 種のヒドロゲナーゼのうち、[NiFe] ヒドロゲナーゼは、表 1 に示すようにゲノム解析結果に基づいてさらに 4 種のグループに分類されている。細胞内で水素の分解を触媒するタイプと水素の合成を触媒するタイプ、あるいは両方を触媒するタイプがある。我々の研究室では、標準タイプ [NiFe] ヒドロゲナーゼ (標準 H<sub>2</sub>ase、グループ 1)、膜結合性・酸素耐性 [NiFe] ヒドロゲナーゼ (グループ 1)、NAD<sup>+</sup>:H<sub>2</sub> 酸化還元酵素 (双方向性の NAD<sup>+</sup> 還元 [NiFe] ヒドロゲナーゼ、NAD<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>ase、グループ 3) および、エネルギー変換 6 量体 [NiFe] ヒドロゲナーゼ (Ech-H<sub>2</sub>ase、グループ 4) 等を研究対象としている。Ni や Fe を含む金属錯体を微生物の体内で生合成し、それをヒドロゲナーゼの分子内に埋め込むためには、数種類以上の他のタンパク質 (酵素) を必要とし、これらを成熟化タンパク質群とよぶ。このようなタンパク質群の協同作用による成熟化の過程を必要とするため、ヒドロゲナーゼの大量発現系の構築や組換え体の作成は困難を極める。

表1 [NiFe] ヒドロゲナーゼの4種のグループとそれらのサブグループ

グループ	サブグループ	機能	含有生物
1	-	H <sub>2</sub> -分解 (標準タイプ, 膜結合性)	Archaea, Bacteria
2	a	H <sub>2</sub> -分解	Bacteria
	b	H <sub>2</sub> -センシング (ヒドロゲナーゼ転写制御)	Bacteria
3	a	F <sub>420</sub> -リンク	Archaea
	b	2機能性 NAD (P) -還元	Archaea, Bacteria
	c	メチルビオロゲン-還元	Archaea
	d	双方向性 NAD (P) -還元	Bacteria
4	-	膜結合性 H <sub>2</sub> -合成	Archaea, Bacteria

ヒドロゲナーゼの触媒活性は酵素の種類によってかなり異なるが、水素合成活性は、2,000-10,000 U/mg、水素分解活性は、5,000-50,000 U/mg (1Uは、 $\mu\text{mol H}_2/\text{min}$ ) 程度である。つまり、条件を整えば1モルのヒドロゲナーゼは、例えばスペースシャトルの液体水素燃料用の外部タンクを約2時間程度で満杯にできることになる。もちろんここでは、酵素を含む液体からの水素の分離や液化、さらには水素の転送・充填等に関わる時間を一切無視している。一般にヒドロゲナーゼは、水素の分解・合成を触媒する他に、H<sub>2</sub> (D<sub>2</sub>)と D<sub>2</sub>O (H<sub>2</sub>O) の間での同位体交換反応や、オルト-H<sub>2</sub>/パラ-H<sub>2</sub>の変換 (核スピン異性体変換) 反応を触媒することが知られている<sup>5)</sup>。

一般に、ヒドロゲナーゼの金属活性部位に酸素が進入すれば水素を押しつけて結合してしまう。例えば、[FeFe] ヒドロゲナーゼは、好氣的条件下では活性部位が不可逆的に変性失活する (活性部位が壊れて酵素は元に戻れない)。この性質は「酸素敏感性 (O<sub>2</sub>-sensitivity)」あるいは「酸素不安定性 (O<sub>2</sub>-unstability)」とよばれる。一方、ほとんどの [NiFe] ヒドロゲナーゼは、好氣的条件下でも変性は免れて安定な不活性型になる。これは水素等による還元で再活性化されるものが多く、この性質は「酸素抵抗性 (O<sub>2</sub>-resistance)」とよばれる。近年、大気中の酸素濃度でも水素があれば不活性化されない膜結合性 [NiFe] ヒドロゲナーゼが見つかった。この性質は、「酸素耐性 (O<sub>2</sub>-tolerance)」とよばれる。これらの他に、酸素安定性 (O<sub>2</sub>-stability: 酸素抵抗性はあるが、酸素耐性をもつかどうかを明確に確認されていないもの) という用語もしばしば用いられる。酸素に対する性質は、Ni-Fe 活性部位の特異的な性質 (Ni-A 型、Ni-B 型、Ni-C 型) に関する (後述)<sup>6)</sup>。

### 3. [NiFe] ヒドロゲナーゼの分子全体構造および活性部位の構造と酸化還元状態

最も単純な構造をもつ標準タイプの [NiFe] ヒドロゲナーゼ (グループ 1 に属する標準 H<sub>2</sub>ase) は、2つのサブユニット (異なるポリペプチド鎖) からなるヘテロ 2 量体構造で

分子量約 9 万である。Ni-Fe 活性部位は、大サブユニットに保持され、分子全体のほぼ中心部分に位置している。標準 H<sub>2</sub>ase は、酵素触媒反応で電子の経路となる鉄硫黄クラスターを 3 個もつ。これらは、Ni-Fe 活性部位から分子表面まで約 12-13 Å の距離をもってほぼ直線上に配置され、活性部位に近いものから、それぞれ近位 ([4Fe-4S])、中位 ([3Fe-4S])、遠位 ([4Fe-4S]) の鉄硫黄クラスターとよばれる (膜結合性ヒドロゲナーゼ等では近位クラスターの構造が異なる)。他に、基質・水素分子が入り出す H<sub>2</sub> 経路とプロトン経路 (水素結合ネットワーク) が分子表面から活性部位までつながっている (図 2)<sup>1, 2)</sup>。これらの部品が最適な位置関係にあって、高効率な触媒反応と電子伝達およびプロトン伝播が進行する。

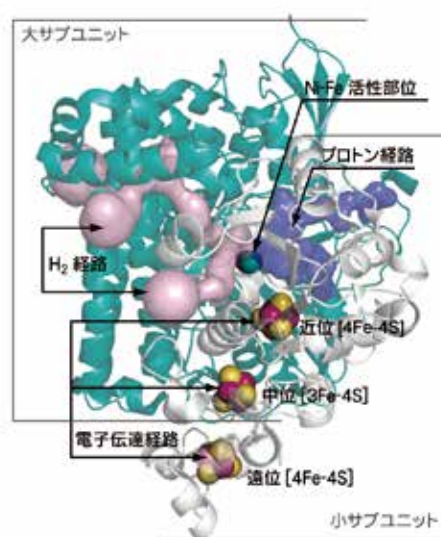


図 2 硫酸還元菌由来の標準的 [NiFe] ヒドロゲナーゼ (PDB; 1D1WUH) の分子構造模式図

標準的 [NiFe] ヒドロゲナーゼは、大サブユニットおよび小サブユニットとよばれる 2 つのポリペプチド鎖で構成される。酵素分子は Ni-Fe 活性部位 (大サブユニット)、H<sub>2</sub> 経路 (ほぼ大サブユニットにある水素のチャネル)、電子伝達経路 (小サブユニット)、プロトン経路 (サブユニット界面) の部品をもつ。近位のクラスターは、膜結合性の酸素耐性ヒドロゲナーゼでは、[4Fe-3S] タイプである。

活性部位の各酸化還元状態は図 3 のようにまとめられている。Ni-Fe 活性部位の Ni は、タンパク質中のシステイン残基側鎖の S 原子 4 個に配位保持され、これらのうちの 2 個の S 原子は、Fe にも配位して両金属を架橋している。Fe にはこれら以外に CN 分子 2 本と CO 分子 1 本が結合している。酸化型不活性の酵素では、Ni と Fe にさらに両金属を架橋する酸素種と考えられる配位子が結合して水素の結合を阻止している。活性型酵素の Ni (III) の電子常磁性共鳴 (EPR) スペクトルは Ni-C (活性型・水素化還元) とよばれる (図 3、図 4c)<sup>7)</sup>、最近、超高分解能 X 線結晶解析によってヒドリド (H<sup>-</sup>) が同定された (図 4c)<sup>8)</sup>。一方、

標準 H<sub>2</sub>ase の不活性状態の Ni (III) の EPR スペクトルは、Ni-A (不活性型・酸化) または Ni-B (活性準備型・酸化) とよばれる (図 3、図 4a, b)。それらの第 3 ブリッジ配位子は O<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>H または O/OH と報告されているが<sup>9)</sup>、これには異論もある<sup>10)</sup>。一方、EPR 不活性な Ni (II) については、Fe に配位している CO や CN 配位子の赤外吸収スペクトルのバンド位置で区別される (図 3 の Ni-SU、Ni-SIr、Ni-SIa、もちろん Ni (I) や Ni (II) においても区別可能である)。この [NiFe] ヒドロゲナーゼの触媒活性サイクルにおいて、反応が時計回りに進めば水素合成が、また反時計回りに進めば水素分解が進む<sup>11)</sup>。

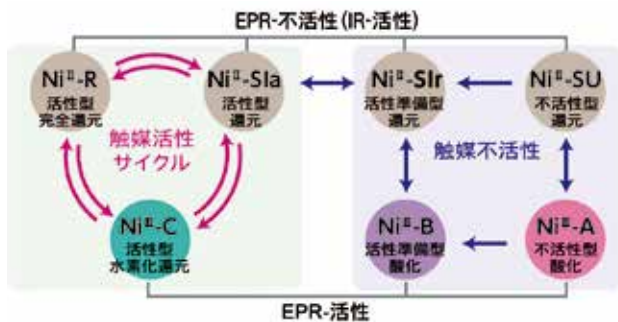


図 3 Ni-Fe 活性部位の各酸化還元状態

通常の触媒活性は、図の左側の Ni<sup>II</sup>-SIa、Ni<sup>III</sup>-C、Ni<sup>II</sup>-R の 3 種類の間で反応が進む。空气中で精製した酵素は、右側の Ni<sup>III</sup>-A の不活性または Ni<sup>III</sup>-B の活性準備状態となる。酸素耐性酵素は、空气中でも Ni<sup>III</sup>-B になるのみで Ni<sup>III</sup>-A にはならない。Ni<sup>III</sup>-A と Ni<sup>III</sup>-B は、それぞれ 1 電子還元で、Ni<sup>II</sup>-SU と Ni<sup>II</sup>-SIr になる。Ni<sup>II</sup> は、EPR シグナルは観測されないが、Fe の CO や CN 配位子の赤外吸収スペクトルのバンド位置で区別される。Fe の価数は、常に Fe<sup>II</sup> である。

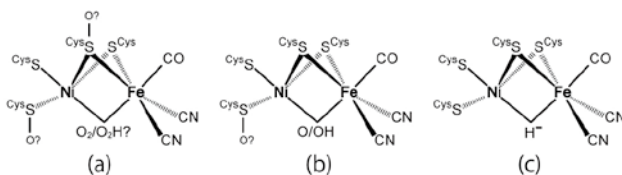


図 4 Ni-Fe 活性部位の構造  
(a): Ni-A 型, (b): Ni-B 型, (c): Ni-C 型

Ni-A では、Ni と Fe の間に O<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>H が、Ni-B には O/OH が配位するとされているが、無酸素状態でも Ni-A が生成されることから Ni-A については異論がある。Ni-C ではヒドリド (H<sup>-</sup>) が配位すると考えられており超高分解能 X 線結晶解析でも示された<sup>8)</sup>。Ni-A や Ni-B では空气中で酸化された時にシステインの S 原子が不均一に酸素化されることが多い (a, b)。

#### 4. [NiFe] ヒドロゲナーゼの酸素耐性の分子機構

不活性酸化型で容易に活性化できない Ni-A は、活性部位に電子の不足した状態で酸化されることによって生成することが知られている。一方、Ni-B は十分な電子がある

状態で酸化されて生成し、速やかに再活性化される。両者は第 3 ブリッジ配位子の種類が異なると報告されているが、まだ決着していない。酸素耐性をもつ [NiFe] ヒドロゲナーゼは Ni-A を示さない。従って、Ni-A にならないことは、酸素耐性獲得に重要であると考えられる。酸素耐性 [NiFe] ヒドロゲナーゼの結晶解析からその酸素耐性の分子機構が明らかになった。酸素耐性酵素の分子全体や活性部位の構造は標準 H<sub>2</sub>ase とほとんど変わらない。しかし、3 個の鉄硫黄クラスターのうち近位クラスターが、標準 H<sub>2</sub>ase に見られる [4Fe-4S]-4Cys タイプではなく、[4Fe-3S]-6Cys タイプ (図 5) であった<sup>12, 13)</sup>。このクラスターによる酸素耐性の分子機構は次のように説明できる。酸素がなく水素がある状態では、図 5 左に示すように活性部位で水素が分解され、得られた電子は、近位-中位-遠位のクラスター順に流れる。酸素に暴露された時、活性部位は酸化されて標準 H<sub>2</sub>ase では強い不活性型の Ni-A になる。この時、酸素耐性酵素の活性部位は [4Fe-3S]-6Cys クラスターから余分の電子を取り込み Ni-B になる。なぜなら、[4Fe-3S]-6Cys のクラスターは構造変化 (図 5 の Fe2 が、移動して脱プロトンした近傍の主鎖アミド窒素 (Cys26N) と結合する) を起こせるからである。つまり、活性部位に電子を与えて超酸化状態 (図 5 右) になったクラスターは、アミド窒素の負電荷によって安定化され得る構造をもっているわけである<sup>12)</sup>。この時、電子は活性部位に逆流することになる。このアミド窒素は酵素のプロトン経路に含まれている可能性があるため、この分子機構はプロトン移動と共役した電子移動と説明できる。

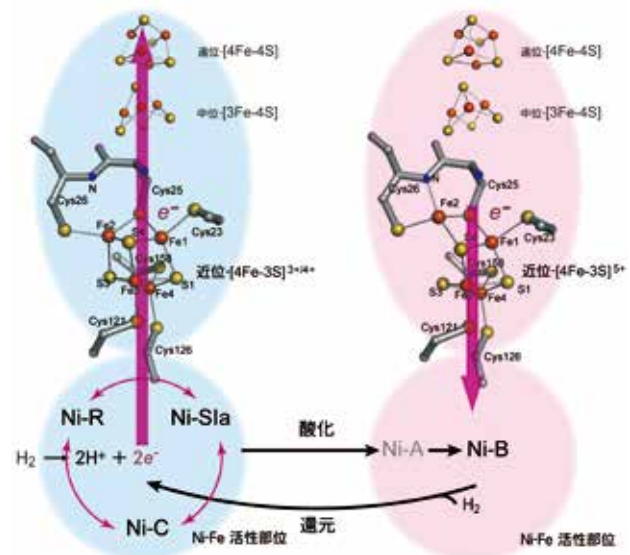


図 5 水素酸化細菌由来の酸素耐性 [NiFe] ヒドロゲナーゼの還元型 (3AYX) および強制酸化型 (3AYY) の [4Fe-3S]-6Cys クラスターの構造変化による電子の流れ

酸素耐性ヒドロゲナーゼに見出された [4Fe-3S]-6Cys クラスターは、酵素の触媒活性サイクルではサイコロ型の [4Fe-4S] 型の構造をとる (左側の構造図)。しかし、空气中の O<sub>2</sub> に暴露され酸化されると [Fe2] が近傍の Cys26 のアミド窒素 (脱プロ

ンされている)の方向に動き配位結合をつくる(右側の構造図)。この時クラスターは、活性部位に電子を逆流させて超酸化状態になる。酸素耐性酵素は、この [4Fe-3S]-6Cys クラスターから供給される余分の電子で酸化されても Ni-A にはならず Ni-B になって、すぐに活性状態に戻ることができる。触媒サイクルと(左図)と分子内の電子の流れの方向を赤い矢印で示す。Ni-A および Ni-B は不活性な状態で、Ni-C、Ni-R および Ni-S1a は触媒活性状態である(図3参照)。

## 5. ヒドロゲナーゼの応用利用

酸素耐性 [NiFe] ヒドロゲナーゼが発見されたことにより、ヒドロゲナーゼのバイオ燃料電池としての応用利用が期待されるようになった<sup>14)</sup>(図6a)。現在燃料電池等に利用されている触媒は白金コロイド等の希少かつ高価な材料を使用している。ヒドロゲナーゼやそれを模倣したモデル化合物(図6b)を利用した新しい電池システムの構築は、現在の燃料電池が抱える問題の解決策になるかもしれない。酵素は純度の高い水素でも利用できるという長所もあるからである。しかし、酵素電極の実用化にはまだまだ解決すべき問題が多い。大きな表面積をもつ電極素材の開発、構造に基づいた酵素の電極への吸着配向の最適化、pH安定性、熱安定性、あるいはさらなる酸素耐性をもった変異体酵素の作成、溶液への溶解度の低い水素を高効率に分解するための三相界面電極の研究等が進んでいる。現時点では、酵素を使ったバイオ電池は、余剰の電力を水素に変換するようなゆるやかな反応を進める電極としての利用価値が考えられている。一方、今後水素を主なるエネルギー源としていくならば、太陽エネルギーを利用した水の分解反応で得られる還元力とヒドロゲナーゼの水素合成反応を組み合わせた方法、つまり、バイオ水素生産システムの開発が必要である。

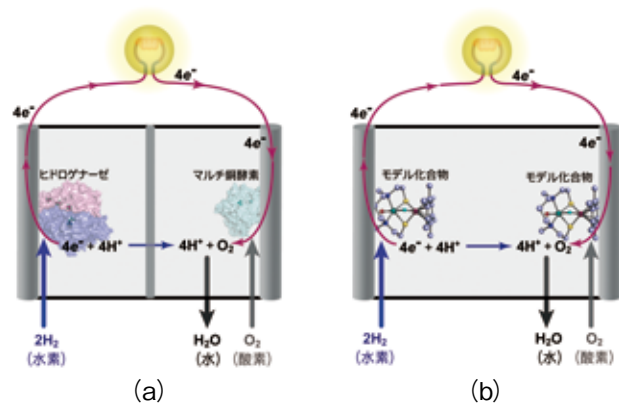


図6 ヒドロゲナーゼおよび酵素モデル化合物の電極としての応用利用の概念図

(a): 酵素電池、(b): 酵素モデル化合物電池システム。酵素電池システムでは、既に陽極側の酵素(マルチ銅酸化酵素)は高効率なものが試作されている。陰極側(ヒドロゲナーゼ)では、溶解度の低い水素を効率的に分解して電流密度を上げるための工夫(酵素担持表面積や反応界面表面積の増大)が必要である。

## 6. おわりに

持続可能な社会基盤の構築のためにはエネルギー問題を避けては通れない。これまでも何度かエネルギー危機があり、その度に再生可能エネルギーの利用が謳われてきた。しかし、新しい化石燃料が見出される度に、結局経済効果のみに重点が置かれて代替エネルギー開発のための研究は大きな進展を見せていない。エネルギー資源の乏しい我が国が次世代においてエネルギー大国となるためには、水素エネルギー利用のための基礎・応用研究を推進させることは特に重要であろう。本稿で述べたように、生物酵素・ヒドロゲナーゼは、水素合成触媒や生物燃料電池等の応用が模索されており、酵素の活性部位のモデル化合物の合成研究やその改良も進んでいる。また、ヒドロゲナーゼを担持するための基板として、多孔性ガラスやグラフシーカーボン等の電極素材の開発や微細加工技術の開発も進展著しい。しかし、持続可能なエネルギー源として水素を利用するためには、水素の生成法や利用法の開発に加えて、貯蔵、運搬等社会インフラの整備も含めて様々な課題を解決していかねばならない。そのためには、生命および物質科学のあらゆる研究分野を統合した水素の科学を展開していく必要がある。なお、一方で、生物のエネルギー代謝システムの進化を解明するという基礎生物学的な見地からも本ヒドロゲナーゼの構造研究は重要であることを末筆ながら付け加えておきたい。

最後になりましたが、2012年度 ENEOS 水素基金にご援助いただいたことを改めてお礼申し上げます。貴基金の取り組みが、水素エネルギー利用のための基礎および応用科学に身をおく研究者にとって大きな助けになることを信じて疑いません。ENEOS 水素基金およびその助成を受けられた方々の今後のご発展をお祈りいたします。

## — 参考文献 —

- 1) Volbeda, A. et al., ; Nature, 373, 580 (1995)
- 2) Higuchi, Y. et al., ; Structure, 5, 1671 (1997)
- 3) Peters, J.W. et al., ; Science, 282, 1853 (1998)
- 4) Shima, S. et al., ; Science, 321, 572 (2008)
- 5) Yagi, T. et al., ; J. Biochem., 73, 1069 (1973)
- 6) Lubitz, W. et al., ; Chem. Rev., 107, 4331 (2007)
- 7) Higuchi, Y. et al., ; Structure, 7, 549 (1999)
- 8) Ogata, H. et al., ; Nature, 520, 571 (2015)
- 9) Ogata, H. et al., ; Structure, 13, 1635 (2005)
- 10) Hamdan, A.A. et al., ; Nat. Chem., Biol. 9, 15-18 (2013)
- 11) Yagi, T. & Higuchi, Y. ; Proc. Jpn. Acad., Ser. B 89, 16 (2013)
- 12) Shomura, Y. et al., ; Nature, 479, 253 (2011)
- 13) Fritsch, J. et al., ; Nature, 479, 249 (2011)
- 14) Friedrich, B. et al., ; Curr. Opin. Biotech., 22, 358 (2011)