

博士論文審査報告書

論文題目：A spectroscopic study on photo-reactivity of oxidized [NiFe] hydrogenase
「酸化型[NiFe]ヒドロゲナーゼにおける光反応性の分光学的研究」

申請者：大須賀 久織

1. 論文内容の要旨

[NiFe]ヒドロゲナーゼは、主に微生物がもつ酵素で、水素分子の分解・合成反応を触媒する。酵素の Ni-Fe 触媒活性部位は、Ni と Fe で構成された金属錯体で、アミノ酸側鎖による配位結合で分子内部に保持されている。酵素は触媒反応に呼応してその活性部位の配位構造を変化させる。活性型には、Ni-SI、Ni-C、Ni-R 型があり、また不活性型には Ni-A 型と Ni-B 型があり、Ni-A 型には 2 原子配位子が、Ni-B 型には単原子配位子が Ni と Fe の間に架橋している。さらに、阻害剤 CO が結合した Ni-CO 型も知られている。これらのうち Ni-SI、Ni-C および Ni-CO 型は光照射により配位子構造が変化することがわかっていた。本研究では分光学的手法により不活性型の Ni-A 型の光反応性を調べ、その反応機構と配位構造を明らかにすることを目的とした。

光反応の測定はフーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) と電子常磁性共鳴法 (EPR) を用いて行った。光照射と測定の温度は、77K、273K および室温の組み合わせで行い、それぞれに光反応性を見出した。

77K (光照射)–77K (測定) の EPR スペクトルには、トリプトファン残基に由来するラジカルが観測された。また、273K (光照射)–77K (測定) の EPR スペクトルでは、Ni-B 型とほぼ同じ g 値が得られたことから、この光反応生成種を Ni-B-like 型と名付けた。この光反応生成種は、Ni と Fe の間の 2 原子架橋配位子の 2 原子間結合が弱められた結果であると考察した。

室温 (光照射)–室温 (測定) の FT-IR スペクトルでは Fe に配位する CO と CN の伸縮振動 ($\nu(\text{CO})$ と $\nu(\text{CN}^-)$) に、また EPR スペクトルでは Ni の g 値に変化があり、この光反応生成種を Ni-AL 型と名付けた。Ni-AL の g 値は、Ni-A と非常に近いものであった。一方、FT-IR スペクトルでは Ni-A に比べて $\nu(\text{CO})$ が高波数側に大きく移動していた。従って、Fe に対して CO の反対側に位置する 2 原子架橋配位子と Fe との結合が弱められていると考察した。

以上の結果から、Ni-A型の光反応性は、光照射により生成されたトリプトファンのラジカル化を引き金として、2原子架橋配位子の構造変化によるものと結論した。

2. 論文審査結果

本研究では、ヒドロゲナーゼの不活性型の Ni-A 型が、光照射によりこれまで知られていなかった新しい型 (Ni-B-like 型と Ni-AL 型) に変化することを分光学的手法により示した。また、77K で得られた EPR スペクトルの結果から、光照射によりラジカルが生成されることを見出し、それが分子表面に位置するトリプトファン残基に由来する可能性を示した。さらに様々な温度で得られた分光学的データをまとめることにより、その反応機構を提唱した。すなわち、まず光照射により発生したラジカル由来の電子が鉄-硫黄クラスターを通して Ni-Fe 活性部位に伝えられる。それにより、Ni と Fe の間を架橋する 2 原子配位子自身の原子間結合距離や Fe との配位結合距離に変化を引き起こすことにより、Ni-B-like 型や Ni-AL 型が生じるというものである。

水素は、エネルギーとして利用しても水を生じるだけであり、次世代の究極のクリーンエネルギー源の有力候補である。ヒドロゲナーゼは、燃料電池や水素合成触媒としての応用利用に期待されている。しかし、一般に酸素の下では不活性化されて機能を失うことが知られおり、その原因は酵素が酸化されると Ni-A 型を生じるためであると考えられていた。Ni-A 型は、酸素によって強く不活性化された型であり、これを活性化されやすい Ni-B 型や活性型の Ni-SI 型に移行させることは酵素の応用利用の観点から極めて重要である。本研究により、これまで安定とされていた Ni-A (不活性) 型が光照射により構造変化する可能性が明らかになった。これらは、今後、活性部位の研究に新しい展開をもたらし、当該研究分野の発展に大いに寄与するものと期待される。

よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として価値のあるものと認める。

また、平成 25 年 1 月 31 日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

主査：樋口芳樹 印

副査：小倉尚志 印

：吉田秀郎 印

：廣田 俊 印

(奈良先端科学技術大学院大学、教授)