

核共鳴振動分光の生物学分野への応用 — 酵素活性中心のプロープとして —

依田芳卓

公益財団法人 高輝度光科学研究センター 〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

要旨

核共鳴振動分光は複雑な構造を有する酵素のなかで、活性中心にある鉄の振動のみを抽出できるという大きな特徴をもつ。活性中心に金属をもつ金属酵素のなかで鉄酵素は水を酸化還元するヒドロゲナーゼをはじめ、エネルギー問題・食料問題・医療などと密接に関わっているものが多い。本稿では、核共鳴振動分光について、その原理や特徴を説明するとともに、ヒドロゲナーゼやハロゲナーゼなどの酵素における活性中心の構造や電子状態を解明し、反応性との相関に迫った最近の研究を紹介する。

1. はじめに

酵素は生体内でさまざまな化学反応を促進する天然の触媒であり、高温高圧などの特別な環境を必要とせず、エネルギーを浪費しない反応をおこなう。ほとんどの場合、有害な副生成物を生成せず、その点でも環境に優しい。多くの酵素は巨大な分子量をもつタンパク質で、その中で活性中心は基質との直接的な触媒作用を担っており、活性部位とも呼ばれている。その活性中心の構造・働きを解明し、それを模写した人工触媒の開発・探索がさかんにおこなわれている。2011年に光合成をおこなうタンパク質の活性中心の構造が明らかになり¹⁾、非常に大きなインパクトを与えたことは記憶に新しい。まさに、「自然から学ぶ」という言葉がぴったりと当てはまる研究分野である。

酵素の中で活性中心に鉄・銅・亜鉛・ニッケル・マンガンなどの金属イオンを含むものは多く、金属酵素と呼ばれる。特に鉄を含む金属酵素で重要なものは枚挙にいとまがなく、水を酸化還元するヒドロゲナーゼ、窒素固定をおこなうニトロゲナーゼ、DNA合成に関わるリボスクレオチドリダクターゼ、メタンをメタノールに転換するメタンモノオキシゲナーゼなどが挙げられる。ヒドロゲナーゼはクリーンな水素社会の実現に、ニトロゲナーゼは安価な窒素肥料の作製を通じて発展途上国の食糧問題の解決につながる。リボスクレオチドリダクターゼは抗がん剤の開発に、メタンモノオキシゲナーゼはシェールガスやメタンハイドレート等から産出したメタンの容易な運搬に利用できる。これらの酵素を有効に活用できれば、社会に大きな恩恵をもたらすと期待されている。

金属酵素の触媒作用発現機構を理解するためには、反応の各段階における活性中心の構造および電子状態の解明が大きな鍵となる。広く知られるように、構造の決定には結晶構造解析やNMR (Nuclear Magnetic Resonance) など

が、電子状態の決定にはEPR (Electron Paramagnetic Resonance) などが広く利用されてきた。ターゲットの金属イオンに着目したEXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) やメスバウアー分光なども重要な役割を果たしてきた。また、原子間の結合の様子から構造や電子状態を探ることを目的として、赤外吸収分光およびラマン分光などの振動分光が一般的におこなわれている。

一方、金属酵素の活性中心を研究する特異な手法として最近注目を集めているものに核共鳴振動分光がある^{2,3)}。核共鳴振動分光は、複雑な構造を有する酵素のなかで、“活性中心にある金属イオンの振動のみを抽出できる”という大きな特徴をもつ。他の手法で得られた情報とあわせて用いることにより、構造および電子状態に関して重要な決定的な知見を与えている。次節以降では、この核共鳴振動分光について、その原理や特徴を説明するとともに、SPring-8でおこなわれた最近の研究のなかから2つの事例を紹介する^{4,7)}。

2. 核共鳴振動分光

核共鳴振動分光は原子核の共鳴準位を経たX線の非弾性散乱である核共鳴非弾性散乱を利用し、着目する原子の振動状態を求めることができる分光法である。Nuclear resonance vibrational spectroscopyの頭文字をとってNRVSと呼ばれることもある。また、この手法は非弾性散乱とも核共鳴振動分光とも呼称されるが、同一であり、物理・地学の分野では非弾性散乱、化学・生物の分野では核共鳴振動分光と呼ばれることが多い。

通常、原子核の準位のエネルギー幅はneVから μeV 程度と非常に狭いため、不確定性原理からその励起寿命はnsecから μsec 程度となる。酵素の核共鳴振動分光によく用いられる鉄の同位体⁵⁷Feの場合、第一励起準位の共鳴

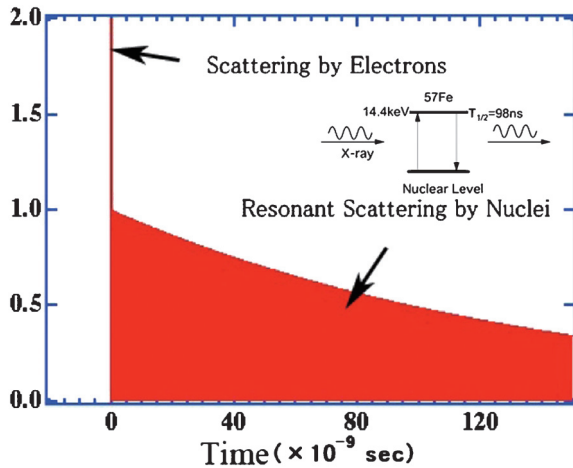


Fig. 1 (Color online) Time structure of the nuclear resonant scattering. The half lifetime for ^{57}Fe is 98 ns.

エネルギーは14.4 keV, そのエネルギー幅は4.7 neVで, 半減期寿命は98nsecである。放射光 X 線の時間構造を利用することにより, Fig. 1に示すように, 電子によって瞬時におきる通常の散乱と原子核の準位を経た核共鳴散乱を時間的に切り分けることができる。例えば, SPring-8において ^{57}Fe の核共鳴振動分光で利用される蓄積リングのバンチ構造Cモードではバンチ間隔が145.5nsecであり⁸⁾, 半減期寿命と比較して長いために, 核共鳴散乱のみをシグナルとして取り出すことが可能となっている。

現在, 核共鳴振動分光を利用できる核種は ^{57}Fe , ^{119}Sn , ^{151}Eu , ^{149}Sm , ^{161}Dy , ^{83}Kr , ^{125}Te など多数存在するが, 活性中心に存在し, かつ希薄な酵素試料で十分な強度が得られるものは ^{57}Fe である。 ^{119}Sn を利用する試みも始まっているが, これまでの研究は ^{57}Fe が圧倒的に多い。そこで以下では ^{57}Fe に絞って話を進める。なお, これらの元素は同位体であるが, 放射性ではない。

14.4 keVの ^{57}Fe 共鳴エネルギーよりも高いエネルギーの X 線が ^{57}Fe を含む試料に入射した場合, ある断面積でフォノンの生成を伴った核の励起が生じる。シングルフォノンの過程だけを考慮した場合, 生成したフォノンのエネルギーは共鳴エネルギーと X 線のエネルギー差に等しくなる。また断面積はあるフォノンのエネルギーでは, フォノン部分状態密度に比例する⁹⁾。逆に共鳴エネルギーよりも低いエネルギーの X 線が ^{57}Fe を含む試料に入射した場合, フォノンの消滅を伴った核の励起が生じる。この場合も消滅したフォノンのエネルギーは共鳴エネルギーと X 線のエネルギー差となる。

核共鳴振動分光では100 meV程度のエネルギー走査を行う。Fig. 2(a)に示すように, ビームラインモノクロメータからの X 線を高分解能モノクロメータにより meV 程度に分光し, 試料に照射する。核の準位を経た時間遅れを伴う X 線が試料側方に置かれた1 nsec程度もしくはそれ以下の優れた時間分解能をもつ APD 検出器などで記録され

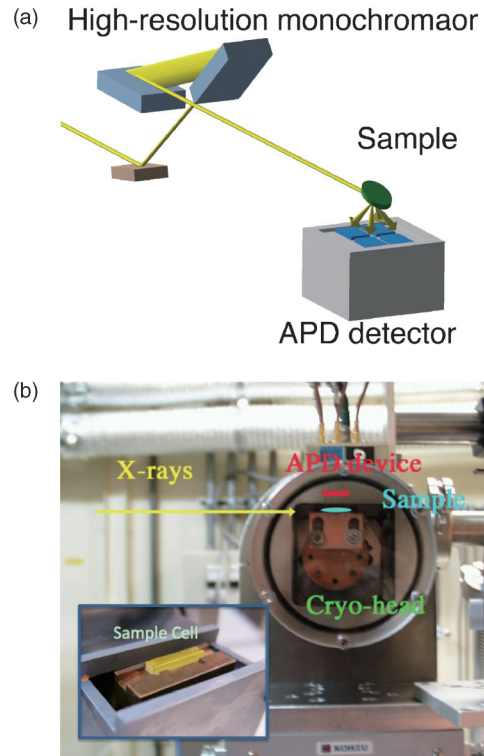


Fig. 2 (Color online) (a) Schematic view of the set up for nuclear resonant vibrational spectroscopy. (b) Cryostat for cooling the sample. The APD detector is placed as near as possible to the sample. The sample cell with a Kapton film is shown in the inset photo.

る。通常, 酵素試料は検出器側にカプトンテープを貼った内寸, 幅 3 mm, 長さ 12 mm, 高さ 1 mm ほどのプラスチックセルに挿入される。酵素試料では放射線損傷の影響を軽減するために Fig. 2(b)に示すようにクライオスタットで試料を冷却して測定をおこなう。また冷却により, 溶媒中での動きが制限されスペクトルがクリアになるとともに, マルチフォノンの影響が軽減される。APD 検出器は大きな立体角をカバー出来るようにできるだけ試料に近づけて設置される。入射 X 線のエネルギーを走査しながら強度を測定することにより, Fig. 3に示すような非弾性散乱スペクトルが得られる。

スペクトルからモノクロメータの分解能関数をデコンボリューションするとともに, 弾性散乱成分を差し引くと非弾性散乱の断面積に比例するデータとなる。さらに調和振動を仮定してマルチフォノンの寄与を差し引くと, シングルフォノンの断面積に比例するデータとなり, そこから着目する鉄のフォノン部分状態密度を導出することができる。

核共鳴振動分光の大きな特徴として“活性中心にある鉄の振動のみを抽出できる”点がある。それは先に述べたように, 核共鳴散乱が特定の同位体 ^{57}Fe の核の準位を経ていることに由来する。酵素の分子量は小さいものでも1万, 大きいものでは数百万に達し, その活性中心だけの情報をとらえることは通常, 容易ではない。核共鳴振動分光

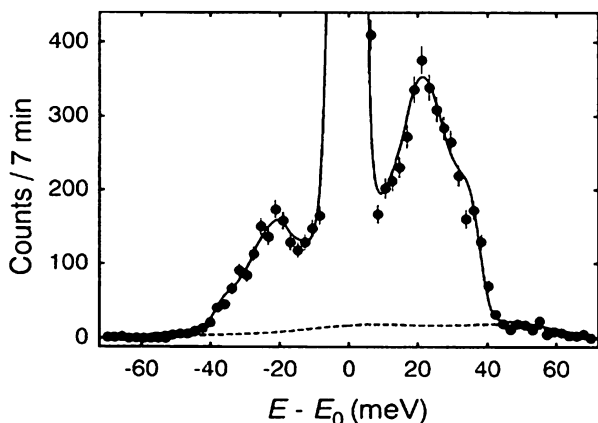


Fig. 3 Nuclear resonant vibrational spectrum for a polycrystalline α - ^{57}Fe foil⁸⁾.

では時間による切り分けをおこなっているため、鉄以外の原子からのバックグラウンドが完全にフリーであることは大きな魅力である。

核共鳴振動分光のもうひとつの大きな特徴として“定量解析が可能である”ことが挙げられる。測定から導かれたフォノン部分状態密度はピーク位置だけでは無く、その強度も重要な情報をもつ。最近のめざましい密度汎関数法 (DFT) 計算の発展により、活性中心近傍の複雑な系においても信頼性の高い基準振動解析が可能となっており、さまざまな構造および電子状態のモデルに対してフォノン部分状態密度をシミュレートし、実験結果とあわせることが可能である。振動モードのアサインを確かなものにするために、鉄と結合する炭素、酸素、窒素や硫黄などを同位体置換してピークエネルギーのシフトの有無やその量を測定することが一般的である。代表的な振動分光である赤外吸収分光やラマン分光での遷移には双極子モーメントや分極率の変化が必要などの選択則があるが、核共鳴振動分光では ^{57}Fe 核が変位する全ての振動モードが活性で選択則はない。観測される振動モードの制限がないこともこの分光をより有用なものにしている。

核共鳴振動分光で用意する酵素試料は結晶化されている必要はない。また不対電子が必要な EPR とは対照的に、どのようなスピン状態、酸化状態でも観測可能である。また、赤外吸収分光が不得意とする水溶液中でも測定が可能である。ラマン分光でみられるような、強い光による不安定な状態の試料の状態変化もないため、酵素の反応中間体の測定に利用可能である。入射強度は通常利用される SPring-8 の核共鳴散乱ビームラインにおいて、 $0.5\text{ mm} \times 1.2\text{ mm}$ のビームサイズで 2×10^9 cps 程度と放射光 X 線結晶構造解析に用いられるアンジュレータ X 線に比べて 4 桁程度弱く、これまで放射線損傷は報告されていない。

核共鳴振動分光は 1995 年、PF-AR において瀬戸らによって初めておこなわれた¹⁰⁾。その時に測定された ^{57}Fe 単体のスペクトルが Fig. 3 である。生物学的分野への応用は

1996 年に報告された原見らによるヘモグロビンの研究があるが¹¹⁾、その後は化学合成された錯体やモデル化合物のスペクトルの解釈などの基礎的な研究に軸足を移していった^{12,13)}。2006 年頃から酵素の活性中心に焦点を当てる研究が Cramer 教授のグループなどによって始められた^{14,15)}。測定の高度化や DFT 計算の発展により、近年になって未知の生物学的試料、特に酵素の活性中心の構造や電子状態について非常に有益な情報を与えると認識されつつある。

3. ヒドロゲナーゼにおける水素架橋の分光学的証明

水素をエネルギーの媒介とする水素社会は地球温暖化の脅威をなくし、都市の環境汚染を極小なものにすると期待されている。水素分子を可逆的に酸化還元するヒドロゲナーゼは、高価な白金を使用しない燃料電池電極として直接的にも、また人工触媒合成のヒントを与えるものとしても、非常に多くの注目を集めてきた。ヒドロゲナーゼはクリーンで持続可能な水素社会実現のため、その活性機構の全容の解明が最も待たれる酵素のひとつである。この節では California 大学 Davis 校の Cramer 教授が主導しておこなった核共鳴振動分光によるヒドロゲナーゼの研究を紹介する⁴⁾。

ヒドロゲナーゼは活性中心に [FeFe] の構造をもつ鉄ヒドロゲナーゼと [NiFe] の構造をもつニッケル-鉄ヒドロゲナーゼに分類される。より酸素耐性が強いとされるニッケル-鉄ヒドロゲナーゼの活性中心はニッケルと鉄を 2 つのシステイン基が架橋するとともに、ニッケルにはさらに 2 つシステイン基が結合している。ニッケル-鉄ヒドロゲナーゼは Ni-SI_a, Ni-C および Ni-R の 3 つの酸化還元状態をとる。その中間状態の構造や電子状態にはまだ多くの議論の余地が残されているが、最も還元された、活性の高い状態の Ni-R は EPR サイレントで、強い光による状態変化があるためラマン分光が使えず、また水素との結合であるため、その同定は困難であった。最近おこなわれた結晶構造解析が示唆する Fig. 4b (Ni(μ -H)Fe) の構造をはじめ¹⁶⁾、これまで Fig. 4c (HNi(μ -H)Fe), Fig. 4d NiFe (η^2 -H₂) などの構造が提案されてきた。また仮に水素架橋された構造をとった場合でも、Ni サイトのスピン状態や水素が Ni と Fe のどちらと強く結合しているかに関しては不明であった。

試料には硫酸還元細菌 *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F 株から単離、精製されたニッケル-鉄ヒドロゲナーゼが用いられた。核共鳴振動分光のため ^{57}Fe をエンリッチし、水素で還元した試料と重水素で還元した試料の 2 種類が用意された。実験は SPring-8 核共鳴散乱ビームライン BL09XU およびロングアンジュレータを有する理研物理科学ビームライン BL19LXU でおこなわれた。測定

中、試料はクライオスタットで 50K 程度に保たれた。

Fig. 5a に測定データから導出されたフォノン部分状態密度を示す。D₂O で還元したヒドロゲナーゼの結果が赤のライン、H₂O で還元したヒドロゲナーゼの結果が青のラインである。高波数の領域は 4 倍した状態密度もあわせて示してある。このヒドロゲナーゼには電子伝達を担う 3

つの鉄硫黄クラスターが存在するが、その振動モードは 420 cm⁻¹ 以下に現れることがわかっており¹⁷⁾、420 cm⁻¹ 以上の領域には水素の酸化還元に関与する **Fig. 4** に示された活性中心からの振動モードが現れている。以前の結果とも一致するが、549 cm⁻¹ にピークをもつ Fe-CO の伸縮モードをはじめ、420 cm⁻¹ から 620 cm⁻¹ の領域の振動モードは Fe と CO および Fe と CN が関わる振動モードとアサインされた。 **Fig. 5b, 5c** に示す DFT による計算にも現れているが、重水素の場合と水素の場合でプロファイルが異なるのはこれらの振動と Fe-D および Fe-H の振動とのカップリングの結果である。

この測定データで特筆すべきは、重水素の場合にはなく水素の場合に観測された 675 cm⁻¹ のピークである。このピークはニッケルと鉄を支点とする架橋した水素 (H⁻) の振り子モードとアサインされた。重水素でこの波数にピークがないのは DFT 計算でも示されているが、質量数の違いからピークが低波数にシフトして他の振動モードと重複したためである。この振り子モードは水素架橋した活性中心を模したモデル化合物でもクリアに観測されており、DFT 計算により理論的にも確認されている⁴⁾。その結果、振り子モードが観測されたことはニッケルと鉄に水素が架橋されていることを示す大きな直接的証拠といえる。

FT-IR や結晶構造解析などの結果から提案された活性

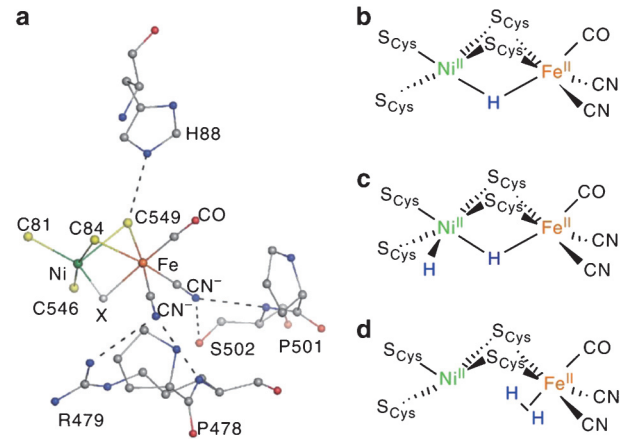


Fig. 4 (Color online) The Ni-R reduced state of [NiFe]-hydrogenase. (a) X-ray structure of the *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F[NiFe]-hydrogenase active site¹⁵⁾. (b-d) Some of the structures proposed for isoelectronic Ni-R forms⁴⁾.

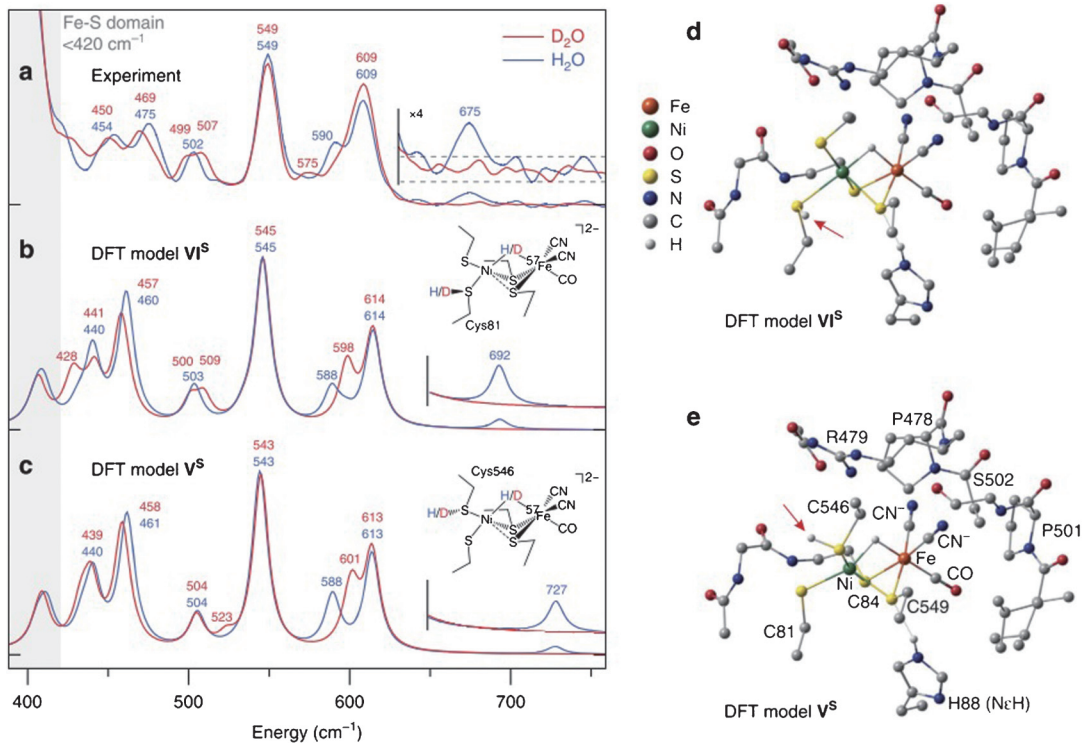


Fig. 5 (Color online) Ni-H-Fe-hydride was exposed in the reduced state Ni-R of [NiFe]-hydrogenase⁴⁾. (a-c) High-frequency NRVs for [NiFe]-hydrogenase reduced in H₂O (blue trace) and D₂O (red trace); a) and the corresponding ⁵⁷Fe PVDOS simulations given for the representative DFT models VI^S (b) and V^S (c). (d, e) Representative DFT-optimized models VI^S (d) and V^S (e) for the Ni-R active site.

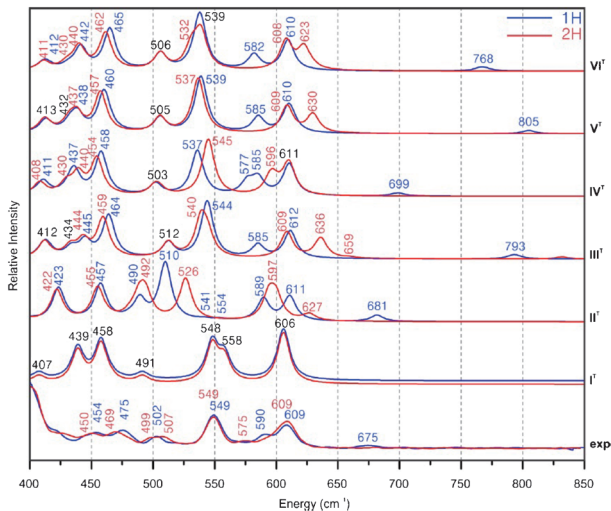


Fig. 6 (Color online) Experimental NRVs for Ni-R and DFT-calculated spectra for 6 kinds of high-spin models⁴⁾. H/D isotopomers are given in blue/red.

中心のモデルおよびその亜種のモデル、6種類に対してDFT計算をおこなった。4つはニッケルに水素分子が結合したモデルI、鉄に水素分子が結合したモデルII (Fig. 4d)、水素が架橋したモデルIII (Fig. 4b)、ニッケルに架橋した水素ともうひとつ水素が結合したモデルIV (Fig. 4c)である。VIとVはFig. 5d, 5eに示す様な、モデルIIIのシステイン基の硫黄に水素が結合したモデルである。また、6種類それぞれのモデルに対してニッケルがロースピンの場合(S)と、ハイスピン(T)の場合が計算された。

その中で実験と最も一致したものはFig. 5b, 5cに示すように水素架橋があり、ニッケルがロースピンであるVI^SとV^Sであった。ハイスピンの計算結果をFig. 6に示すが、どのモデルの場合でも、実験結果とはそのプロファイルが大きく異なっている。その結果、ニッケルはロースピンであることが確かめられた。またロースピンの場合のDFT計算はニッケルが鉄よりも、より水素と強く結合していることを示唆していた。

以上、核共鳴振動分光による結果により、最も中心的な役割を果たすニッケル-鉄ヒドロゲナーゼの還元状態において、活性中心はニッケルと鉄が水素(H⁻)で架橋されていることを初めて分光学的に示すことができた。また、ニッケルはロースピンであり、ニッケルが鉄よりもより水素と強く結合していることを示唆しており、ヒドロゲナーゼの活性機構全容の解明に大きな助けとなるとともに、人工触媒設計の際のヒントとなると期待される。

4. ハロゲナーゼ反応中間体の解明

活性中心にヘム鉄ではない鉄をひとつ有する単核非ヘム

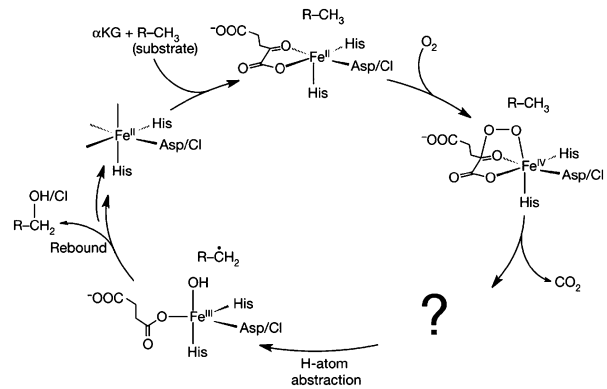


Fig. 7 Catalytic cycle of α KG-dependent NHFe enzymes⁵⁾. Hydrogen-atom abstraction (bottom left) and subsequent rebound hydroxylation or halogenation (left).

鉄酵素は、ハロゲン化、水酸化、閉環反応などのさまざまな酸化反応を触媒し、フェニルアラニン代謝、神経伝達物質の産生、低酸素応答、二次代謝産物の生合成など、多くの重要な生物学的過程に関与していることが知られている。この節ではStanford大学のSolomon教授が主導しておこなった核共鳴振動分光によるハロゲナーゼ反応中間体の研究を紹介する⁵⁾。

Fig. 7にハロゲン化を促すハロゲナーゼSyrB2(シリンゴマイシン生合成酵素2)をはじめとする α -KG依存単核非ヘム鉄酵素の触媒サイクルを示す。図中、?で示された反応中間体として、ハイスピン鉄が酸素と二重結合したFe(IV)=Oが捕捉されていたが、その構造は不明のままであった。また天然基質L-トレオニン(L-Thr)の場合は水素原子の引き抜きに続いてハロゲン化を引き起こす一方、非天然性基質L-ノルバリン(L-Nva)の場合には水素原子の引き抜きに続いてヒドロキシル化を引き起こすことが知られていた。しかし、どうしてそのような選択性があるのかは謎であった。

試料には細菌*Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*より単離、精製されたハロゲナーゼSyrB2が用いられた。核共鳴振動分光のために⁵⁷Feがエンリッチされた。また、比較のために活性中心にあるFe(IV)にCl⁻とBr⁻が結合した2種類の試料(SyrB2-Cl, SyrB2-Br)が用意された。測定はAPSのビームライン3-IDおよびSPring-8の核共鳴散乱ビームラインBL09XUで試料を低温に保持しておこなわれた。

Fig. 8に測定データから導出されたフォノン部分状態密度を示す。波数領域を図にあるように3つに分けると、領域1と2ではSyrB2-Clのスペクトル強度が強いに対して、領域3ではSyrB2-Brの強度が強く、さらにSyrB2-Clと比べると低波数にシフトしていることが分かる。これまでに提案された種々の6配位の構造の中間反応体のモデルに対してDFT計算をおこなったが、これらの特徴を再現することはできなかった。一方、Fig. 9に計

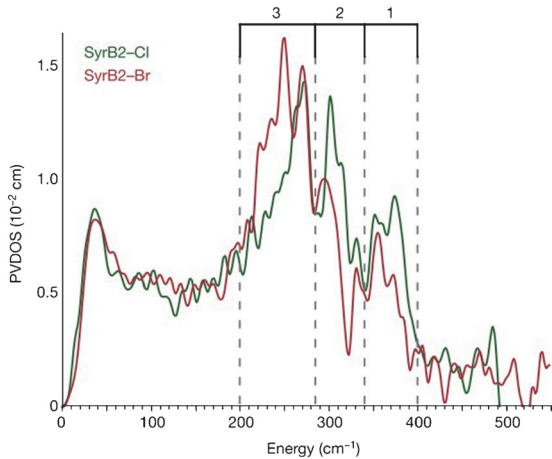


Fig. 8 (Color online) NRVs PVDOS spectra of SyrB2-Cl and SyrB2-Br⁵⁾. Regions 3, 2 and 1 that contain intense features are indicated at the top.

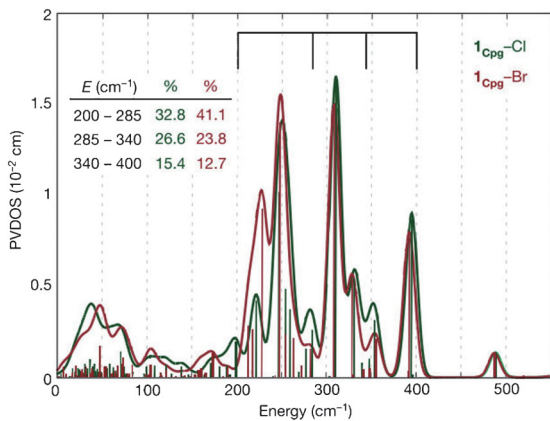


Fig. 9 (Color online) DFT-predicted PVDOS NRVS spectra of five-coordinate TBP structural candidate 1_{Cpg}-X for the Fe(IV)=O intermediate of SyrB2⁵⁾. Vertical bars represent relative calculated mode-composition factors of vibrational modes, and brackets at top correspond to energy regions from Fig. 8. Inset, peak intensity contributions (from the three bracketed regions) to the overall PVDOS envelope.

算結果を示すように、5配位の三方両錐形構造をもつモデルのみ、この特徴を再現することができた。Fig. 10には、計算でのそれぞれのピークに対応する振動モードを示す。

この5配位のモデルを仮定して、水素原子の引き抜く反応過程をTurboMole 6.3を用いたQM/MM法によりシミュレートすると、Fig. 11左に示すように、天然基質L-トレオニン(L-Thr)の場合はFe(IV)=Oの結合方向は基質のC-H結合方向に対して垂直であり、 π 電子軌道が引き抜きに寄与するのに対して、非天然性基質L-ノルバリン(L-Nva)の場合はFe(IV)=Oの結合方向は基質のC-H結合方向に対して平行であり、 σ 電子軌道が引き抜きに寄与することがわかった。水素引き抜きの反応の結果、Fig. 11右に示すように、天然基質の場合には基質中のラジ

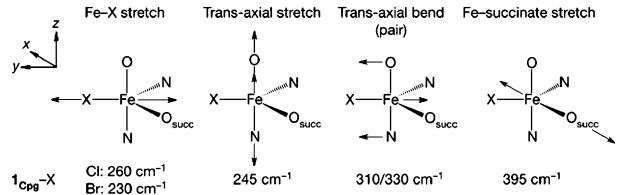


Fig. 10 DFT-predicted normal modes of 1_{Cpg}-X . Four normal modes of the five-coordinate TBP Fe(IV)=O structure are shown⁵⁾.

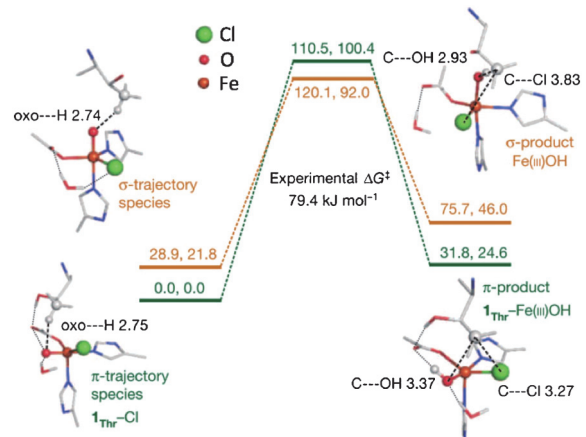


Fig. 11 (Color online) Hydrogen-atom abstraction reaction coordinates⁵⁾. Energies (given as ΔE , ΔG in kJ mol^{-1}) for the π -trajectory (1_{Thr}-Cl , green numerals and levels) and the σ -trajectory (orange numerals and levels) are shown. Reactants are on the left; energies for the transition state (where the Fe has developed $S=5/2$ spin character) are given at the top; structures of Fe(III)-OH products are displayed on the right, showing the π -product $1_{\text{Thr}}\text{-Fe(III)-OH}$ (with hydrogen-bonding interactions indicated) set up for chlorination and the σ -product set up for hydroxylation. Distances are given in Å.

カルはイオン半径を考慮するとCl基がOH基より0.05 nm近く存在するのに対して、非天然性基質の場合には、逆にOH基がCl基より0.05 nm近くに存在することがわかった。この結果、基質によるこの距離の違いが、基質によるハロゲン化とヒドロキシル化という選択性を与えると理解された。一方、6配位のモデルではこのような反応過程の違いは説明できなかった。

以上、核共鳴振動分光により、単核非ヘム鉄酵素であるハロゲナーゼの活性中心の反応中間体の構造を特定することができた。その構造は計算によるシミュレーションで予測されていた6配位ではなく、5配位の三方両錐形構造であった。また、得られた構造により、長い間謎であったハロゲナーゼの基質による選択性を明瞭に説明することに成功した。この結果は他の酵素の触媒反応においても、構造と反応性の相関についての深い洞察を与えるものと期待される。

5. 今後の展開

核共鳴振動分光は酵素の活性中心を元素選択的にプローブする手法である。“活性中心にある鉄の振動のみを抽出できる”，“選択則がなく定量分析可能である”などのさまざまな特徴を有する。DFT 計算の発展と相まってその有用性が認識されつつあり，紹介したような興味深い研究もおこなわれている。

一方，実験データとモデル計算との比較が必要であり，他の手法との相補的な利用は不可欠である。また，核共鳴振動分光では巨大分子量の酵素 1 分子に 1 個から数個しかない鉄からのシグナルは微弱となる。その結果，観測したい振動モードが測定可能かどうかはシグナルと検出器のノイズレベルとのせめぎあいとなる。振動モードにもよるが，通常利用される SPring-8 の核共鳴散乱ビームラインにおいては鉄 1 mmol/L の濃度がおおむね測定限界となっている。また，エネルギー分解能においては meV 程度であり，ラマン分光における典型的な分解能 0.1 meV に比べて 1 桁程度劣っている。

一部でロングアンジュレータの利用などが始まっているが，さまざまな工夫により検出感度が向上すれば，観測可能な試料・振動モードが格段に増えると期待される。また，高分解能化が進めば，モードによっては微小である同位体置換によるピークエネルギーのシフトの判別が容易になるとともに，重複する振動モードを分離することが可能となり，その有用性も増すと期待される。また，蓄積リングの低エミッタンス化により，今後バンチモードに制約ができる可能性も考慮し，その影響を最小限に抑えるための装置開発を進める必要がある。

本稿で研究例を示した酵素以外にも，窒素固定をおこなうニトロゲナーゼ，DNA 合成に関わるリボヌクレオチドリダクターゼ，メタンをメタノールに転換するメタンモノオキシゲナーゼ，ミトコンドリアで電子伝達系に関わるシトクロム c，および，呼吸末端酵素のシトクロム酸化酵素など鉄を活性中心にもつ興味深いタンパク質は多数存在する。今後，核共鳴振動分光によりこれらの酵素の詳細な活性機構が解明され，それらの知見がより良い社会の構築に役立つことを期待したい。

参考文献

- 1) Y. Umena, K. Kawakami, J. R. Shen and N. Kamiya: *Nature* **473**, 55 (2011).
- 2) 依田芳卓: *RADIOISOTOPES* **63**, 317 (2014).
- 3) 太田雄大, 瀬戸誠: *日本結晶学会誌* **56**, 329 (2014).

- 4) H. Ogata, T. Krämer, H. Wang, D. Schilter, V. Pelmenchikov, M. van Gastel, F. Neese, T. B. Rauchfuss, L. B. Gee, A. D. Scott, Y. Yoda, Y. Tanaka, W. Lubitz and S. P. Cramer: *Nat. Commun.* **6**, 7890 (2015).
- 5) S. D. Wong, M. Srncic, M. L. Matthews, L. V Liu, Y. Kwak, K. Park, C. B. Bell, E. E. Alp, J. Zhao, Y. Yoda, S. Kitao, M. Seto, C. Krebs, J. M. Bollinger and E. I. Solomon: *Nature* **499**, 320 (2013).
- 6) L. Lauterbach, H. Wang, M. Horch, L. B. Gee, Y. Yoda, Y. Tanaka, I. Zebger, O. Lenz and S. P. Cramer: *Chem. Sci.* **6**, 1055 (2015).
- 7) K. Park, C. B. Bell, L. V Liu, D. Wang, G. Xue, Y. Kwak, S. D. Wong, K. M. Light, J. Zhao, E. E. Alp, Y. Yoda, M. Saito, Y. Kobayashi, T. Ohta, M. Seto, L. Que and E. I. Solomon: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 6275 (2013).
- 8) http://www.spring8.or.jp/ja/users/operation_status/schedule/bunch_mode_b16/
- 9) W. Sturhahn, T. Toellner, E. Alp, X. Zhang, M. Ando, Y. Yoda, S. Kikuta, M. Seto, C. Kimball and B. Dabrowski: *Phys. Rev. Lett.* **74**, 3832 (1995).
- 10) M. Seto, Y. Yoda, S. Kikuta, X. Zhang and M. Ando: *Phys. Rev. Lett.* **74**, 3828 (1995).
- 11) T. Harami, G. Miyazaki, M. Seto and Y. Kobayashi: *Proceeding of the international conference on the applications of the Mössbauer effect 1995*, 831 (1996).
- 12) B. M. Leu, M. Z. Zgierski, G. R. A. Wyllie, W. R. Scheidt, W. Sturhahn, E. E. Alp, S. M. Durbin and J. T. Sage: *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 4211 (2004).
- 13) T. Ohta, J.-G. Liu, M. Saito, Y. Kobayashi, Y. Yoda, M. Seto and Y. Naruta: *J. Phys. Chem. B* **116**, 13831 (2012).
- 14) Y. Xiao, K. Fisher, M. C. Smith, W. E. Newton, D. A. Case, S. J. George, H. Wang, W. Sturhahn, E. E. Alp, J. Zhao, Y. Yoda and S. P. Cramer: *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 7608 (2006).
- 15) K. L. Adams, S. Tsoi, J. Yan, S. M. Durbin, A. K. Ramdas, W. A. Cramer, W. Sturhahn, E. E. Alp and C. Schulz: *J. Phys. Chem. B* **110**, 530 (2006).
- 16) H. Ogata, K. Nishikawa and W. Lubitz: *Nature* **520**, 571 (2015).
- 17) S. Kamali, H. Wang, D. Mitra, H. Ogata, W. Lubitz, B. C. Manor, T. B. Rauchfuss, D. Byrne, V. Bonnefoy, F. E. Jenney, M. W. W. Adams, Y. Yoda, E. Alp, J. Zhao and S. P. Cramer: *Angew. Chemie-Int. Ed.* **52**, 724 (2013).

著者紹介

依田芳卓

(公財)高輝度光科学研究センター 利用研究促進部門 主幹研究員

E-mail: yoda@spring8.or.jp

専門: 核共鳴散乱, 放射光物理

【略歴】

1991年東京大学大学院工学系研究科物理工学専攻博士課程途中退学, 1999年東京大学にて博士(工学)。東京大学工学部文部技官, 同助手, 高輝度光科学研究センター副主幹研究員を経て2004年4月より現職



Nuclear resonant vibrational spectroscopy and its application to the biological research — Probe for the active center of enzymes —

Yoshitaka YODA Japan Synchrotron Radiation Research Institute (JASRI)
1-1-1 Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5198 Japan

Abstract Nuclear resonant vibrational spectroscopy is a site-selective technique allowing the observation of only the vibrational modes of Fe in the active center of the enzymes, which makes it ideal for studying active center without interference from protein backbone modes. Many iron-dependent enzymes including hydrogenase, which catalyze both production and consumption of H₂, have a close relation to the energies, environments, medical and so on. The principle and features of the nuclear resonant vibrational spectroscopy and its application to the hydrogenase and halogenase is introduced. The structures and electronic states of their active centers and its relation to the activities were elucidated.