

博士論文審査報告書

氏名	Kim Jaehyun(キム ジェヒョン)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博理第105号
学位授与報告番号	甲第323号
学位授与年月日	平成30年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当
論文題目	Theoretical analysis of electronic structure of iron-sulfur clusters in hydrogenases「ヒドロゲナーゼにおける鉄-硫黄クラスターの電子構造の理論解析」
論文審査委員	(主査)教授 樋口 芳樹 (副査)教授 阪口 雅郎 (副査)教授 舘野 賢 (副査)教授 緒方 英明 (北海道大学低温科学研究所、特任准教授) (副査) Martin J. Field (Permanent Staff (CEA), Institut de Biologie Structurale, France)

※ Field 委員の審査結果については別紙（英文）として添付する。

1. 論文内容の要旨

ヒドロゲナーゼは、水素(H_2)の生成および分解の両反応を触媒し、主に微生物が保持する酵素である。酸素(O_2)の存在下においても活性を維持する酸素耐性ヒドロゲナーゼも存在し、燃料電池の極板など、実用的な用途への応用も期待されている。そのため近年、ヒドロゲナーゼによる触媒反応、特にその酸素耐性発現のメカニズムが、国際的に精力的な研究の対象とされてきた。Kim氏は、膜結合性ヒドロゲナーゼ(Membrane-Bound Hydrogenase; MBH)が有するNi-Fe活性部位最近傍の[4Fe-3S]クラスター(プロキシマル・クラスター)の電子構造を理論的に調べて、酸素耐性発現のメカニズムを電子状態に基づいて解明することを目的に研究を行った。近年、膜結合性ヒドロゲナーゼの一種で、そのプロキシマル・クラスターが超酸化状態に遷移した際に、鉄(Fe)原子に水酸基(OH^-)の結合が同定されたが、その機能的な役割はほとんど不明であった。そこでKim氏は、プロキシマル・クラスターの電子状態が、水酸基の結合によってどのような影響を受けるかについて、*ab initio*電子構造計算を駆使して解析した。その結果、プロキシマル・クラスター(超酸化状態)のフロンティア軌道は、水酸基の結合により大きく変化することが明らかになった。

これまでに、酸素によるNi-Fe活性部位の不活性化、およびその再活性化(酸素耐性)の双方で、プロキシマル・クラスターへの電子移動が重要な役割を果たすことが明らかになっている。こうした電子移動と密接な連関を有すると考えられる分子軌道は、非占有最低軌道(LUMO)等である。そこで

Kim氏は、分子軌道とそれらを構成する原子軌道に関する詳細な軌道解析を行い、LUMOなどに対する水酸基の影響を詳細に解析した。その結果、プロキシマル・クラスタに水酸基が結合していない場合には、LUMOはひとつのFe原子(Fe4)に局在化するのに対して、水酸基がFe原子(Fe1)に結合すると、その近傍に存在する2個の硫黄(S)原子および1個のFe原子(Fe4)の最外殻電子軌道と混成を形成することにより、LUMOの非局在化が誘導されることを明らかにした。他方でKim氏は、プロキシマル・クラスタへ電子を供給し得る電子移動経路を、経験的探索法によって解析し、電子移動経路の候補を同定した。これらの解析結果により、水酸基が結合していないプロキシマル・クラスタのLUMO(局在)は、同定された電子移動経路と空間的にほとんど無関係であるのに対して、水酸基が結合したプロキシマル・クラスタのLUMO(非局在)は、同定された電子移動経路上で両者が非常によく重なることが分かった。これは、プロキシマル・クラスタへ電子を供給するための電子移動経路が、水酸基の結合によって誘導・形成されることを意味するものである。

このようにして、プロキシマル・クラスタにおける電子移動経路形成のメカニズムが、電子構造レベルで初めて詳細に明らかになった。

2. 論文審査結果

本研究の解析対象である膜結合性ヒドロゲナーゼは、その酸素耐性発現のメカニズムの研究が国際的にも極めて精力的に推進されており、近年では、機能部位の酸化還元状態、電子およびプロトン輸送、およびそれらに伴う酵素の立体構造変化などについて、関連性が明らかになってきた。他方で、酵素の酸化還元状態の遷移に伴うそれらのメカニズムを、電子構造のレベルで解明しようとする研究は、Ni-Fe活性部位などにいまだ限られている。本研究は、酸素耐性の発現に不可欠なプロキシマル・クラスタの役割とそのメカニズムを、電子構造の詳細な解析に基づいて明らかにした初めての研究であり、先鋭的な成果といえるものである。

したがって本研究の成果は、膜結合性ヒドロゲナーゼの電子およびプロトン輸送メカニズムや他の酸化還元状態への遷移、およびそれらに伴う酵素の立体構造変化など、今後の研究における基盤になり得るものである。さらには、他のヒドロゲナーゼにおける電子構造や酸素耐性メカニズムとの異同を探究し、統合的なメカニズムを電子構造レベルで解明するためにも、将来の研究の基礎となり得るものである。このように本研究は、ヒドロゲナーゼの触媒反応および酸素耐性メカニズムを、電子構造を基盤として本質的に理解するために、実験・理論の両面で重要な意義を有する成果であると評価できる。

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30年1月22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。

Report on the Doctoral Thesis of Jaehyun Kim

Candidate: Jaehyun Kim, Theoretical Biology Group, School of Science, University of Hyogo

Date: 22nd January 2018

Examiner: Martin Field, Laboratory for the Chemistry and Biology of Metals, Grenoble, France

Result: Passed

Report:

The thesis presented by Mr. Jaehyun Kim employs *ab initio* density functional theory (DFT) electronic structure calculations and electron transfer pathway simulations to understand the behavior and reaction mechanism of an O₂-tolerant membrane-bound [Ni-Fe] hydrogenase (MBH). In particular, Mr Kim's work focuses on the proximal and medial iron-sulfur clusters within MBH. Whereas the medial cluster has a similar structure to those in other hydrogenases, the structure of the proximal cluster is unique to MBH. Overall this study is important because hydrogenase proteins are of fundamental interest, and have potentially significant technological applications in the renewable energy and other sectors.

The thesis is divided into four chapters. Chapter 1 is introductory and gives a concise presentation of the principal themes in the thesis, a description of the scope of the thesis work, and a rationale for the value of theoretical approaches in this area of research.

Chapter 2 starts the research in the thesis proper by investigating the electronic structure of two models of the super-oxidized state of the [4Fe-3S] proximal iron-sulfur cluster in MBH – one with, and one without, bound hydroxyl ion. For each model the most favorable spin couplings of the iron atoms in the cluster were determined using DFT calculations. The results were then rationalized in terms of an analysis of the frontier molecular orbitals of each of the models, and extended to understand how the electronic structure of the cluster influences possible electron

transfer pathways, the latter evaluated using a standard empirical model. Interestingly, it was found that attachment of the hydroxyl ion would likely enhance electron transfer between the proximal cluster and the [Ni-Fe] active site, thereby suggesting that the proximal cluster acts as a “functional hub” in the catalytic cycle of MBH.

Chapter 3 mirrors chapter 2, except that it explores the electronic structure of the [3Fe-4S] medial iron-sulfur cluster in its reduced and oxidized forms (with no exogenous ligands). In addition, calculations were performed on a combined medial-proximal cluster model, in which the proximal cluster was forced to remain in its super-oxidized form, but the medial cluster was studied in both its reduced and oxidized forms.

Chapter 4 terminates with a succinct but comprehensive discussion about possible avenues for future research. There are clearly a number of priorities, including a more complete description of the environment of the clusters via QM/MM approaches, a fuller sampling of the range of conformations that the clusters and their environment can adopt via molecular dynamics simulations, and the use of free energy calculations to more accurately determine, for example, the redox potentials of the various electronic states.

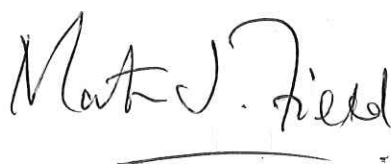
Conclusions:

The thesis is very nicely presented in a didactic fashion, and the text, references, tables and figures are of a high standard. The work it describes is of a consistently high quality and forms a coherent whole. The author has had to master a number of complementary state-of-the-art theoretical methods and it is evident that he is aware of the strengths and weaknesses of the approaches due to the critical nature in which he assesses his results and, when possible, compares them to experiment.

It is clear from the content of the thesis and its presentation that the author is a promising researcher who has the scientific maturity to engage in cutting-edge research at the frontier of molecular biology, chemical physics and numerical simulation.

In summary, I wholeheartedly recommend that Jaehyun Kim be awarded the degree of Doctor of Philosophy.

Signature:



Dr. Martin J. Field
CBM
Grenoble
22nd January 2018