

氢酶结构及催化机理研究进展

Recent Advances on the Structure and Catalytic Mechanism of Hydrogenase

刘晶晶, 龙敏南*

LIU Jing-Jing and LONG Min-Nan*

厦门大学生命科学学院微生物与海洋药物研究所, 厦门 361005

Institute of Microbiology and Marine Medicine, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

摘 要 氢酶是一类催化氢的氧化或质子还原的酶,它在微生物产氢过程中扮演着重要角色。根据氢酶所含的金属元素,可分为 NiFe-氢酶、Fe-氢酶和不含金属元素的 metal-free 氢酶。大多数氢酶含有金属原子,它们参与氢酶活性中心和 [Fe-S] 簇的形成。氢酶的活性中心直接催化氢的氧化与质子的还原, [Fe-S] 簇则参与氢酶催化过程中电子的传输。目前已有数种 NiFe-氢酶和 Fe-氢酶的 X 射线衍射晶体结构被阐明。根据 metal-free 氢酶的序列特征,推断其结构与 NiFe-氢酶和 Fe-氢酶之间存在较大差异。对氢酶活性中心和 [Fe-S] 簇的深入研究,揭示了氢酶催化反应的机理。

关键词 氢酶, 活性中心, 结构特征, 催化机理

中图分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)03-0348-06

Abstract Hydrogenases are enzymes that catalyse the oxidation of hydrogen and the reduction of protons. It plays an important role in the process of biohydrogen production. According to the metal atoms within hydrogenase, it can be classified as NiFe-hydrogenase, Fe-hydrogenase and metal-free hydrogenase. The overwhelming majority of hydrogenases are metalloenzymes. The metal atoms are involved in the forming of active site and [Fe-S] clusters. The active site directly catalyzes the reduction of protons and the oxidation of hydrogen. The [Fe-S] clusters are involved in the transport of electrons between the H₂-activating site and the redox partners of hydrogenase. Presently, the crystal structures of NiFe-hydrogenase and Fe-hydrogenase from a few kinds of microorganism have been revealed. The metal-free hydrogenase, characterized by the absence of [Fe-S] cluster and the presence of an iron-containing cofactor, shows a great diversity comparing with those of NiFe-hydrogenases and Fe-hydrogenases. Recent progress have also indicated the mechanisms of activation.

Key words hydrogenase, active site, structure property, catalytic mechanism

氢酶(hydrogenase)广泛存在于原核微生物和一些简单的真核生物中,它催化分子氢的形成以及氢的氧化: $H_2 \leftrightarrow 2H^+ + 2e^-$ 。许多微生物能够利用 H₂ 作为能源,为细胞的代谢提供还原力^[1]。另一方面,当细胞代谢过程产生过剩的还原

力时,通过形成分子氢释放过剩的还原力,维持细胞代谢平衡。随着人类对能源需求急剧增加,利用微生物制取清洁能源氢已成为科学界的热点问题,而对氢酶结构功能及催化机理的研究将为发展高效生物制氢技术提供重要理论基础。

Received: December 16, 2004; Accepted: March 1, 2005.

This work was supported by the grant from the Natural Sciences Foundation of China(No. 30270328,30470395) & Key Project of International Science and Technology Cooperation of China (No.2002AA515030).

* Corresponding author. Tel: 86-592-2185731; E-mail: longmn@jingxian.xmu.edu.cn

国家自然科学基金资助项目(No. 30270328,30470395)及国际科技合作重点项目(No.2002AA515030)。

1 氢酶的分类

1.1 氢酶的发现

19世纪, Hoppe-Seyle 观察到江河湖泊淤泥中的某些细菌能分解有机物并产生 H_2 和 CO_2 。1931年, Stephenson 和 Stüchland^[2] 发现淤泥中的细菌有一种酶能利用氢还原亚甲基蓝, 他们把这种酶命名为氢酶。至20世纪50年代, 科学家们陆续发现许多微生物含氢酶。Kamen 和 Gest 等^[3] 发现光合细菌于光照条件下, 在含氮培养基上培养时不放氢, 在无氮培养基上培养时则放氢。随后的研究发现, 氢酶广泛存在于各种微生物中, 包括光合细菌、厌氧菌、蓝绿藻等。20世纪70年代, 由于爆发世界性能源危机, 科学家建议以氢能部分取代石化能源, 从而引发了对微生物制氢的研究。1974年, Chen 等^[4] 首先从巴氏梭菌中分离纯化了可溶性氢酶, 随后有多种氢酶从不同的微生物中被分离纯化。

1.2 氢酶的分类

不同微生物的氢酶其分子特征, 包括分子量大小、催化特性、所含的金属元素及在细胞中的分布等特性都存在明显的差异。

氢酶主要催化氢的氧化或质子的还原。根据氢酶的催化特性, 可将氢酶分为吸氢酶、放氢酶和双向氢酶等类型。在细胞外几乎所有的氢酶都能催化吸氢和放氢两个反应, 但在细胞内特定的生理条件下某一种氢酶主要催化吸氢反应或放氢反应。双向氢酶则根据细胞内生理条件的改变而在不同的阶段催化不同的反应。某种微生物可能含有一种氢酶, 也可能同时含有几种不同的氢酶, 如光合细菌桃红荚蒾硫菌 (*Thiocapsa roseopersicina*) 中含有4种氢酶^[5], 它们分别以不同的方式参与调节细胞的代谢活动。蓝细菌中含有双向氢酶, 在某些固氮的蓝藻中还含有吸氢酶^[6]。氢酶与细胞的能量代谢直接或间接相关。吸氢反应(氢氧化)同能量的利用相联系, 通过氢的氧化合成 NADPH 和 ATP 等, 支持细胞的代谢活动。放氢反应则将细胞代谢过程形成的过剩还原力释放, 细胞内还原态电子载体重新被氧化, 使氧化态电子载体与还原态电子载体达到平衡。

氢酶是一类氧化还原蛋白, 绝大多数氢酶含有金属原子。根据氢酶所含金属原子的种类可将氢酶分为 NiFe-氢酶和 Fe-氢酶。目前研究的氢酶多数属于 NiFe-氢酶, 它包括吸氢酶和放氢酶, NiFe-氢酶广泛存在于各种微生物中。Fe-氢酶一般具有较高的催化产氢活性, 研究最多的是梭菌和绿藻中的 Fe-氢酶。此外, 曾报道在产甲烷菌中存在一种不含任何金属原子的 metal-free 氢酶^[7], 其结构和功能仍在进一步研究中。但有研究表明它可能含有非催化活性的功能性铁原子, 应改称为 [Fe-S] cluster-free 氢酶更合适^[8]。

氢酶在细胞中有不同的分布。某些氢酶与细胞质膜相结合, 称为膜结合态氢酶 (membrane-bound hydrogenase, MBH), 它们一般参与细胞的能量代谢过程。而另一些氢酶则存在于细胞质或细胞周质腔中, 称为可溶性氢酶 (soluble

hydrogenase, SH), 它们一般参与维持细胞内的代谢平衡。此外, 在某些生物中还存在着一种特殊的亚细胞结构—氢小体 (hydrogensome), 它的主要功能为依赖于 Fe-S 蛋白的活性表达通过代谢途径产生 ATP^[9]。

2 氢酶的分子结构

NiFe-氢酶和 Fe-氢酶由大小不同的两个亚基组成, 其活性中心包含两个金属原子, 它是质子还原和氢氧化化的中心, 两种氢酶的小亚基都含有 Fe-S 簇。尽管在其它氧化还原酶中存在类似于氢酶的 Fe-S 簇, 但除固氮酶能催化产氢外^[6], 其它酶类均都不能直接催化质子还原或氢的氧化。

2.1 NiFe-氢酶的分子结构

迄今为止已有多种细菌的 NiFe-氢酶的晶体结构被阐明, 它们包括 *Desulfovibrio gigas*^[10]、*Desulfovibrio fructosovorans*^[11]、*Desulfovibrio vulgaris*^[12]、*Desulfovibrio desulfuricans*^[13] 和 *Desulfomicrobium baculatum*^[14] 等。其中 *D. gigas* 的 NiFe-氢酶最先通过 X-射线衍射被确定其分子结构。已被阐明的五种氢酶分子的折叠十分相似, 但其活性中心 Ni、Fe 二原子上非蛋白配体的结构上仍存在差异^[15]。

2.1.1 NiFe-氢酶空间结构: *D. gigas* 的 NiFe-氢酶分子是异质二聚体的球形蛋白, 半径约为 3 nm, 分为大小两个亚基 (图1)。大亚基含有活性中心, 小亚基上则含有 [Fe-S] 簇。大、小亚基彼此紧密结合, 活性中心和较内部的两个 [4Fe-4S] 簇相互接近并位于亚基之间作用的平面上。氢酶分子共包含有 12 个 Fe 原子, 1 个 Ni 原子和 12 个酸不稳定硫化物。其中 1 个 Fe 原子和 1 个 Ni 原子构成了 NiFe-活性中心, 另外 11 个 Fe 原子构成了 [Fe-S] 簇, 即 1 个 [3Fe-4S] 簇和 2 个 [4Fe-4S] 簇。[Fe-S] 簇呈近乎直线排列, 彼此相距约 1.2 nm, 其中 [3Fe-4S] 簇位于两个 [4Fe-4S] 簇中间。距离活性中心最近的 [4Fe-4S] 簇约 1.3 nm, 称为近端 [4Fe-4S] 簇; 而另一个 [4Fe-4S] 簇则称为远端 [4Fe-4S] 簇, 它接近于氢酶分子表面^[16]。

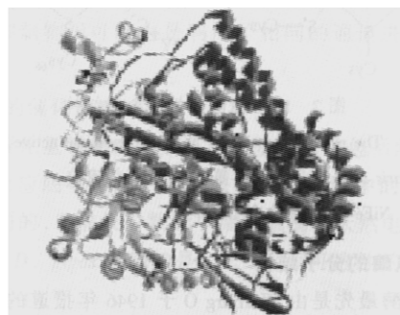


图1 *D. gigas* NiFe-氢酶晶体结构成带模式图

Fig.1 Ribbons model of NiFe-hydrogenase from *D. gigas*

在大亚基 C 端的 His 附近可以检测到一个很大的电子密度峰。依据对金属成分的 ICP 分析以及异常的 X-衍射数据, 这个密度峰在 *D. gigas* 氢酶中被认为是 Mg, 在 *Dm. baculatum* 中是 Fe^[14]。而在 *D. vulgaris* 中, 依据电子密度峰的大小和形状, 认为在大亚基 C 端的相同位置上是个 Mg 原

子^[17]。此外,氢酶活性中心深埋于酶蛋白分子内部,催化反应的组分如 H₂、质子以及电子在活性中心和分子表面之间穿梭所经过的距离达到 3 nm,因而在分子内部还存在各种组份的特定通道。

功能与序列分析以及 X-衍射研究表明,NiFe-氢酶可以划分为两个功能性单位。单位 I 包括大亚基,小亚基 N 端区域以及近端[4Fe-4S]簇区域,这个功能单位对于氢酶活性的表达是至关重要的。单位 II 在一些 NiFe-氢酶中是缺失的,它包括小亚基 C 端区域、[3Fe-4S]簇和远端[4Fe-4S]簇区域。

2.1.2 NiFe-氢酶的活性中心: NiFe-氢酶活性中心是由 Ni 和 Fe 组成的异质双金属原子中心,并通过 4 个 Cys 残基以硫键形式连接在蛋白质分子上(图 2)。在 NiFe-氢酶活性中心存在着不寻常的配体结构。氧化态形式中,Ni 原子有三个近距离的配体和两个远距离的配体,形成了高度扭曲的直角金字塔构造,其中轴上的第六个配体位置是空的,而 Fe 原子有六个配体形成扭曲的八面体结构。氧化态形式下大亚基上四个 Cys 残基通过 S 原子与 Ni 相连接,其中两个还与 Fe 原子连接从而连接了两个金属原子。与 Fe 原子连接的非蛋白配体已经报道确认在 *D. vulgaris Miyazaki F* 氢酶中为 SO、CO 和 CN⁻,在 *D. gigas* 氢酶中为 CO 和两个 CN⁻,而对光合细菌 *Chromatium vinosum* FTIR 谱的研究表明与 Fe 原子相连的非蛋白配体可能包括三个 CN⁻ 基团和一个 CO 基团^[18]。两个金属之间还存在桥连配体,*D. vulgaris Miyazaki F* 氢酶中为 S 原子,*D. gigas* 氢酶中为 O 原子^[19]。Ni、Fe 以及桥连配体之间的角度扭曲而敏感,酶活性可能涉及到桥连配体的丢失以及 Ni-Fe 距离的收缩。在所有还原形式中,两个金属之间的桥连配体可能是不存在的。

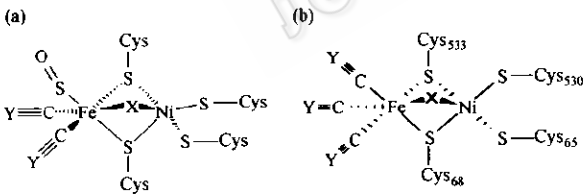


图 2 NiFe-氢酶活性中心结构

Fig. 2 The mimic structure of NiFe-hydrogenase active center

a: *D. vulgaris Miyazaki F* NiFe-氢酶活性中心结构;

b: *D. gigas* NiFe-氢酶活性中心结构

2.2 Fe-氢酶的分子结构

Fe-氢酶最先是 Warburg 于 1946 年报道的^[20]。它除了 Fe 以外检测不到其它金属原子的存在。目前已经从许多菌种中分离纯化了 Fe-氢酶,并对 Fe-氢酶结构进行了研究。

2.2.1 Fe-氢酶的空间结构: *Clostridium pasteurianum* 和 *D. vulgaris* 的 Fe-氢酶分子构造最为典型。*C. pasteurianum* 的 Fe-氢酶分子只由单一的多肽链组成,分子量大小为 60 kD。而 *D. vulgaris* 的 Fe-氢酶分子则是由两条多肽链组成,分子量大小分别为 46 kD 和 10 kD(图 3)。*D. vulgaris* 的大亚基与 *C. pasteurianum* 60 kD 的亚基在氨基酸序列上有很大的相似

性。*D. vulgaris* 的 Fe-氢酶分子含有 13~15 个 Fe 原子以及数目大致相同的 S 原子,其中的 8 个构成了两个[4Fe-4S]簇称为 F 簇,剩余的 6 个 Fe 原子则构成了与活性表达相关的 H 簇。而在 *C. pasteurianum* 的 Fe-氢酶中还另外具有不寻常的[2Fe-2S]簇和[4Fe-4S]簇^[21,22]。



图 3 *D. vulgaris* Fe-氢酶晶体结构成带模式图

Fig. 3 Ribbons model of Fe-hydrogenase from *D. vulgaris*

2.2.2 Fe-氢酶活性中心(图 4): Fe-氢酶活性中心是两个 Fe 原子组成的双金属中心(两个 Fe 原子分别标记为 Fe₁ 和 Fe₂)。活性中心是通过 Fe₁ 上的一个硫代半胱氨酸与近端的[4Fe-4S]簇相连而连接在酶蛋白上的,这一点与 NiFe-氢酶有很大不同。每个 Fe 原子都有两个双原子配体,可能是 CN⁻ 和 CO。每个 Fe 原子除了通过两个 S 原子与另外一个配体连接之外,两个 Fe 原子之间还存在一个桥连配体。因此,Fe₁ 有六个配体形成高度扭曲的八面体结构,而 Fe₂ 在 *D. desulfuricans* 氢酶中只有五个配体从而带有一个空的位点,在 *C. pasteurianum* 氢酶中则带有第六个配体即水分子^[6]。该位点可能同结合 H₂ 有关,因为研究表明,氢酶的竞争性抑制剂 CO 曾被发现结合在该位点上^[23]。

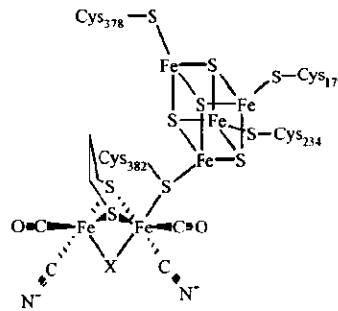


图 4 Fe-氢酶活性中心结构

Fig. 4 The mimic structure of Fe-hydrogenase active center

2.3 NiFe-氢酶与 Fe-氢酶的共同结构特征

虽然 NiFe-氢酶与 Fe-氢酶具有完全不同的结构,但它们具有一些共同特征。其一是活性中心含有一个空的或是电位上空的位点。还原态的 NiFe-氢酶上有一个容纳第三个桥连配体的位点,在氧化态时被 O 原子或 S 原子所占据;而 Fe-氢酶中,该位点是被一个起桥连作用的羧基占据并带有一个末端空位点。这样一个开放性位点可能就是高效结合 H₂ 的关键所在^[6]。其二是存在内源的 CO 和 CN⁻ 配体与 Fe 原子

相联结。这种结构特征至今没有在其它酶中发现,推测这两种通常有毒性的分子可能通过修饰活性中心的 Fe 原子而对氢酶的催化起作用。事实上,Fe 原子周围强烈的磁场导致 Fe 原子低度自旋,类似于过渡金属如钌、铂和钨。这些元素恰好是 H_2 裂解的很好的催化剂。另一个共同特征是 Fe-S 簇的存在,这些 [Fe-S] 簇可能促进了活性中心和分子表面的电子传递^[15]。

3 氢酶的催化机理

3.1 电子传递通道

不同类型的氢酶含有数目和类型各异的 Fe-S 簇。NiFe-氢酶分子中三个 [Fe-S]₂ 簇接近直线排列的空间构型以及光谱学数据表明它们可能与电子传递有关。近端的 [4Fe-4S]₂ 簇能够直接从活性中心获得电子,远端的 [4Fe-4S]₂ 簇可能是调节氢酶同电子载体之间的电子交换。许多氢酶如 *D. gigas* 和 *D. fructosovorans* NiFe-氢酶中间的 [3Fe-4S]₂ 簇的氧化还原电势比两端的 [4Fe-4S]₂ 簇还要高,因而中间的 Fe-S 簇在电子传递中的功能则引起争议。科学家们研究如果电子传递链的氧化还原电势具有更合理的分布是否能使氢酶活性提高:1998 年, Rousset 等^[11] 通过基因工程技术,将 *D. fructosovorans* 氢酶中的一个 Pro₂₃₈ 突变为 Cys₂₃₈ 从而将 [3Fe-4S]₂ 簇转变为 [4Fe-4S]₂ 簇。氧化还原电势的改变对氢酶活性没有显著影响,反而使氢酶对氧的敏感性略微增加。对这种结果的一种解释是电子的传递并非氢酶催化反应的限速步骤,另外一种解释是可能中间的 [3Fe-4S]₂ 并不参与电子传递,只是起到稳定小亚基结构的功能,电子越过 [3Fe-4S]₂ 簇直接在两个 [4Fe-4S]₂ 簇之间传递了将近 20Å 的距离^[11]。

Methanococcus voltae 的氢酶具有三个 [4Fe-4S]₂ 簇, Ruth 等^[34] 以其为研究对象做了类似的实验,将中间的 [4Fe-4S]₂ 簇的 Cys 突变为 Pro 从而将 [4Fe-4S]₂ 簇转变为 [3Fe-4S]₂ 簇,结果发现中间的 Fe-S 簇的氧化还原电势增高了 400 mV,但经 EPR 检测活性中心并没有受到显著影响,与人工电子受体反应时活性没有明显变化,而与天然电子受体 F_420 反应时活性增加了 10 倍。

3.2 质子传递通道

质子在蛋白质分子内的空间位移约为 0.1 nm,它是依靠载体和受体基团旋转式或振动式运动而实现的。这些基团包括氨基酸、硫配基、羟基、羧基等,它们都具有适合传递质子的 pKa 值。此外,内部的水分子由于可以同时提供或接受两个 H 键,因此很容易进行 H 键的交换,也是很好的转运基团。这些基团的运动是十分迅速的,因此质子的传递并不会限制催化反应的速率。大亚基中可能存在的质子通道起始于连接在 Ni 上的硫代半胱氨酸,它通过 H 键连接着一个非常保守的 Glu 残基(在 *D. gigas* 氢酶中为 Glu₈)。随后由 4 个水分子,C 末端主链上的羧基,又一个水分子以及另一个非常保守的 Glu 残基(在 *D. gigas* 氢酶中为 Glu₄₆),通过 H 键组成了网络,并与接近酶蛋白分子表面的 C 端位点或是

Fe 位点的一个水分子配体联结。这个水分子配体又通过另外两个水分子的 H 键的作用与第三个保守的 Glu 残基(在 *D. gigas* 氢酶中为 Glu₃₂₁)相联结。质子可能就是经由这样的质子通道从活性中心释放到酶蛋白分子表面的。水分子如果与金属连接,它的 pKa 值会下降,从而更适于传递质子。这也论证了大亚基 C 端的金属位点不仅是氢酶的结构组分,而且还在质子传递过程中起重要作用^[6]。

3.3 气体分子通道

氢酶催化过程中的另一个重要问题是分子氢是如何接近活性中心的。早期推测氢分子作为小分子可能不需要任何特殊的通道。然而氢酶结构的拓扑分析结合氦气扩散的 X-衍射研究以及分子动力学计算表明分子氢的进入是由狭窄的隧道连接而成的疏水性内部空腔介导的。网络状隧道的一端连接着活性中心的 Ni,而其它几个端口则通向外部介质^[35]。利用蛋白数据库中的晶体模型进行分析,在 *D. fructosovorans*、*D. gigas*、*D. vulgaris* 以及 *D. desulfuricans* 这 4 种结构特征高度相似的氢酶中都存在类似的由许多疏水性孔洞和通道组成的大面积的网络联结着分子表面和活性中心^[35]。而且研究发现保守性较小的 *Dm. baculatum* 氢酶中也存在类似孔道^[35]。最近,将 *C. vinosum* 氢酶与电极连接进行的伏安特性测定(Voltammetric),结果表明氢气的逸散是 H_2 氧化周转率的限制因素^[26]。*D. fructosovorans* 氢酶中的孔道网络已经由 CAVEnc 计划计算出它的外形像是个平面大写的 N', 对角线部分主要位于大、小亚基的表面^[27]。孔道上的残基有 2/3 以上是构成二级结构的部分,这一特征可能利于蛋白折叠过程中孔道的形成。孔道上的大多数残基是疏水性的,它们延伸到分子表面形成几个疏水性斑点作为气体的入口。比较几个晶体结构已知的氢酶,可以发现表面斑点状的残基疏水性特征也是明显保守的,从而减少水分子的侵入。对氢酶内部分子氢逸散的动力学研究表明气体从蛋白分子内逸出主要利用的就是这条通道,推测分子氧作为大多数氢酶的抑制物很可能也是利用了相同的通道进入活性中心的^[35]。

3.4 氢酶的催化反应过程

氢酶催化氢氧化或质子还原的基本条件包括酶分子、电子载体和反应底物等。不同氢酶在催化反应中的天然电子载体是不同的,目前仅少数几个细菌氢酶的天然电子载体已被确定,如 *D. gigas* 氢酶的是 Cyt_1 ^[28],而可溶性的巴氏梭菌氢酶的则是 Fd^[29]。

氢酶催化的反应过程由一系列步骤组成,其中一些关键性步骤是连续的,无法被中断的,但有些步骤是可以被中途停止而形成不同的中间状态。因此,氢酶可以在不同的氧化状态或是还原状态下被冻结或分离,对这些状态下的氢酶进行结构检测和光谱学分析可以了解其反应的过程。

在 NiFe-氢酶中,EPR 光谱学研究表明 Ni 具有氧化还原活性。氧化态下氢酶是没有活性的,需要被 H_2 还原激活。在氢酶被激活的过程中 Ni 经历了不同的氧化还原变化,其

中有些变化是可以通过 EPR 检测的。NiFe-氢酶的催化反应主要过程如下:氧化态的氢酶中 Ni 处于 Ni³⁺ 状态,可以产生 Ni-A 和 Ni-B 的信号。Ni-A 和 Ni-B 在氢气存在条件下均可被还原和激活,但它们的反应不同。Ni-A 称作非准备态,处于该状态的氢酶不能迅速地催化 H₂ 的异裂,需要经历较长的时间才能处于活性状态,它的活化是缓慢的,依赖于温度的。而 Ni-B 称作准备态,该状态的氢酶在无氧的条件下能立即进入迅速的反应循环。Ni-B 的还原可以产生 EPR 静止的 Ni-S 状态,此时 Ni 处于 Ni²⁺。Ni-S 无氧氧化可以专一再生 Ni-B,而有氧存在时则形成 Ni-B 和 Ni-A 的混合^[16]。Ni-S 处于两种状态的平衡中,即 Nir-S 和 Nia-S 状态。此时氢酶处于活跃状态,能够结合 H₂。金属位点上的分子 H₂ 进行异裂,形成 EPR 静止的完全还原态 Ni-R (Ni²⁺-H⁻-Fe²⁺),质子提供给与 Ni 连接的 Cys 残基(*D. gigas* 氢酶中为 Cys₅₃₀^[16], *Dm. baculatum* 氢酶中为 SeCys^[14])。Ni-R 被氧化失去一个电子,由近端 [4Fe-4S] 簇将电子传递到外部电子受体,并留下氢负离子结合在 Fe 上形成 EPR 活跃的 Ni-C 状态 (Ni³⁺-Fe²⁺-H⁻)。氢负离子产生两个电子,其中一个将 Ni³⁺ 还原为 Ni²⁺,另一个电子传递到近端的 [4Fe-4S] 簇上,从而形成 Ni-S 状态并产生一个质子。由 [4Fe-4S] 簇第二次传递电子给外部电子受体,同时两个质子也被传递到外部介质中^[30] (图 5)。

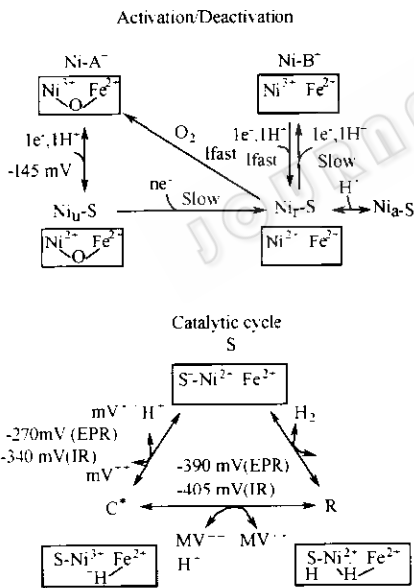


图 5 NiFe-氢酶活性中心在催化过程中氧化还原及配位状态的变化

Fig. 5 Diagram illustrating the oxidation states and coordination of the active site NiFe center during catalysis (adapted from [31])

Fe-氢酶的催化反应大致与 NiFe-氢酶相同,只不过由 Fe-[4Fe-4S] 复合物替代了 Ni。NiFe-氢酶的 Ni 原子与 Fe-氢酶的 Fe-[4Fe-4S] 复合物都接近于 [4Fe-4S] 簇,暗示了电子的传递是经由 [Fe-S] 簇的。此外,两种氢酶都含有具有 CO 与 CN⁻ 配体的 Fe 原子,它在催化反应中作为氢负离子的结合

位点。硫代半胱氨酸的功能仍有待研究,它可能作为一种布朗斯泰德碱而参与了酶的催化。事实上,具有路易士酸性质的金属与具有布朗斯泰德碱性质的硫代半胱氨酸彼此协调作用是有利于 H₂ 的异裂的^[16]。

此外,甲烷菌的 metal-free 氢酶中存在一种新的反应机制,并不需要金属原子参与,而是需要 CH≡H₂MPT⁺ 与 H₂ 反应^[31]。这种不寻常的氢酶简称为 Hmd,分子量大小约为 40 kD,催化反应式如下:CH≡H₂MPT⁺ + H₂ = CH₂=H₂MPT + H⁻。这个反应可能是 CO₂ 和 H₂ 形成 CH₄ 的一个中间过渡步骤^[31]。近年研究表明有一种小分子量的辅因子和 Hmd 紧密结合,当 Hmd 发生变性时辅因子会被释放出来^[32]。这种辅因子的结构和功能还有待于进一步的研究。

4 展望

氢能是一种理想的能源,能量密度高而且对环境的污染几乎为零。随着质子膜燃料电池等氢能应用技术的不断发展,氢的规模制备将成为一个亟需解决的问题,而生物制氢则为解决氢源问题提供了一条理想的途径。氢酶是生物产氢过程中的关键酶,对氢酶及活性中心结构的深入研究不仅有助于揭示氢酶的催化机理,同时也为利用基因工程技术和蛋白质工程技术改造氢酶、构建高效生物产氢系统奠定基础。如 Ohmiya 等^[33,34] 将氢酶基因在类腐败梭菌 *Clostridium paraputrificum* 中表达,使菌株的产氢量提高了 1.5 倍。

厦门大学生物制氢课题组从事生物质发酵制氢与太阳能生物光解水制氢的基础与应用研究。从高产氢活性的微生物中分离纯化氢酶,通过对氢酶结构和功能的研究,利用蛋白质工程技术定向改造氢酶分子,利用氢酶突变体构建高效生物制氢系统,实现生物质能与氢能的高效转化。与此同时,构建耐氧氢酶突变体,与蓝藻等光合系统整合,利用蓝藻光解水产生的质子和电子,实现生物光解水制氢的目标。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Adams MWW, Mortenson LE, Chen JS. Hydrogenase. *Biochim Biophys Acta*, 1981, **594**: 105 - 176
- [2] Stephenson M, Stickland LH. Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen 1. The properties of hydrogenase. *J Biochem*, 1931, **25**: 205 - 214
- [3] Gest H, Kamen MD. Photoproduction of molecular hydrogen by *Rhodospirillum rubrum*. *Science*, 1949, **109**: 558 - 559
- [4] Chen JS, Mortenson LE. Purification and properties of hydrogenase from *Clostridium pasteurianum* W5. *Biochim Biophys Acta*, 1974, **371**: 283 - 298
- [5] Kovacs KL, Fodor B, Kovacs AT et al. Hydrogenases, accessory genes and the regulation of [NiFe] hydrogenase biosynthesis in *Thiocapsa roseopersicina*. *Int J of Hydrogen Energy*, 2002, **27**: 1463 - 1469
- [6] Cammack R, Frey M, Robson R. *Hydrogen as Fuel*. London: Taylor & Francis, 2001

- [7] Zimigbi C, Hedderich R, Thauer RK. N^5 , N^{10} -Methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* has hydrogenase activity. *FEBS Lett*, 1990, **261**: 112 – 116
- [8] Lyon EJ, Shima S, Buurman G *et al*. UV-A/blue-light inactivation of the metal-free-hydrogenase (Hmd) from methanogenic archaea. *Eur J Biochem*, 2004, **271**: 195 – 204
- [9] Ren NQ, Wang XJ, Xiang WS, Guo WQ. Effects of iron on H_2 production capacity and hydrogenosomal activities of a novel fermentative H_2 -producing bacterial strain B49. Proc. of 1st European Hydrogen Energy Conf. Grenoble, France. kopie: 20030805EHECO1-56.pdf. 09 – 2003
- [10] Volbeda A, Charon MH, Pieras C *et al*. Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfohalobium gigas*. *Nature*, 1995, **373**: 580 – 587
- [11] Rousset M, Montet Y, Guigliarelli B *et al*. [3Fe-4S] to [4Fe-4S] cluster conversion in *Desulfohalobium fructosovorans* [NiFe] hydrogenase by site-directed mutagenesis. *PNAS*, 1998, **95**(20): 11625 – 11630
- [12] Higuchi Y, Yasuoka N, Kakudo M *et al*. Single crystals of hydrogenase from *Desulfohalobium vulgaris*. *J Biochem*, 1987, **262** (6): 2823 – 2825
- [13] Matias PM, Soares CM, Saraiva LM *et al*. [NiFe] hydrogenase from *Desulfohalobium desulfuricans* ATCC 27774: gene sequencing, three-dimensional structure determination and refinement at 1.8Å and modelling studies of its interaction with the tetrahaem cytochrome C_3 . *J Biol Inorg Chem*, 2001, **6**(1): 63 – 81
- [14] Garcin E, Vermede X, Hatchikian EC *et al*. The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure*, 1999, **7**: 557 – 566
- [15] Volbeda A, Montet Y, Vermede X *et al*. High-resolution crystallographic analysis of *Desulfohalobium fructosovorans* [NiFe] hydrogenase. *Int J of Hydrogen Energy*, 2002, **27**: 1449 – 1461
- [16] Marr AC, Spencer DJE, Schroder M. Structural mimics for the active site of [NiFe] hydrogenase. *Coord Chem Rev*, 2001, **219** (221): 1055 – 1074
- [17] Higuchi Y, Yagi T, Yasuoka N. Unusual ligand structure in NiFe-active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis. *Structure*, 1997, **5**: 1671 – 1680
- [18] Long MN (龙敏南), Su WJ (苏文金), Albracht SPJ *et al*. Studies on FTIR spectra of soluble hydrogenase from *Chromatium vinosum*. *Acta Biophysica Sinica* (生物物理学报), 2001, **2** (17): 267 – 274
- [19] Higuchi Y, Ogata H, Miki K *et al*. Removal of the bridging ligand atom at the NiFe-active site of NiFe-hydrogenase upon reduction with H_2 , as revealed by X-ray structure analysis at 1.4 Å resolution. *Structure*, 1999, **7**: 549 – 556
- [20] Warburg O. *Schwermetalle Als Wirkungsgruppe Von Fermenten*. Berlin: GmbH AMV, Saenger VDW, 1946
- [21] Albracht SPJ. Nickel hydrogenases: In search of the active site. *Biochim Biophys Acta*, 1994, **1188**: 167 – 204
- [22] Thauer RK, Klein AR, Hartmann GC. Reactions with molecular hydrogen in microorganisms: evidence for a purely organic hydrogenation catalyst. *Chem Rev*, 1996, **96**: 3031 – 3042
- [23] Lemon BJ, Peters JW. Binding of exogenously added carbon monoxide at the active site of the iron-only hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem*, 1999, **38**: 12969 – 12973
- [24] Bingemann R, European AK. Conversion of the central [4Fe-4S] cluster into a [3Fe-4S] cluster leads to reduced hydrogen-uptake activity of the F_420 -reducing hydrogenase of *Methanococcus voltae*. *Eur J Biochem*, 2000, **267**(22): 6612 – 6618
- [25] Montet Y, Amara P, Volbede A *et al*. Gas access to the active site of NiFe-hydrogenase probed by X-ray crystallography and molecular dynamics. *Nat Struct Biol*, 1997, **4**: 523 – 526
- [26] Pershad HR, Duff JL, Heering HA *et al*. Catalytic electron transport in *Chromatium vinosum* [NiFe]-hydrogenase: application of voltammetry in detecting redox-active centers and establishing that hydrogen oxidation is very fast even at potentials close to the reversible H^+/H_2 value. *Biochem*, 1999, **38**(28): 8992 – 8999
- [27] Volbeda A. Speleologie des hydrogenases nickel eta fer. *Ecoles Phys Chim Vivant*, 1999, **1**: 47 – 52
- [28] Bruschi M, Leroy G, Bonicel J, Campese D, Dolla A. The cytochrome c_3 superfamily: amino acid sequence of a dimericoctahaem cytochrome c_3 (Mr 26000) isolated from *Desulfohalobium gigas*. *J Biochem*, 1996, **320**: 933 – 938
- [29] Knight JE, Hardy RWF. Isolation and characteristics of flavodoxin from nitrogen-fixing *Clostridium pasteurianum*. *J Biochem*, 1966, **241**: 2752 – 2756
- [30] Vignais PM, Courmac L, Hatchikian EC *et al*. Continuous monitoring of the activation and activity of [NiFe]-hydrogenases by membrane-inlet mass spectrometry. *Int J of Hydrogen Energy*, 2002, **27**: 1441 – 1448
- [31] Thauer RK. Biochemistry of methanogenesis: A tribute to Marjory Stephenson. *Microbiol*, 1998, **144**: 2377 – 2406
- [32] Buurman G, Shima S, Thauer RK. The metal-free hydrogenase from methanogenic archaea; evidence for a bound cofactor. *FEBS Lett*, 2000, **485**: 200 – 204
- [33] Ohmiya K, Sakka K, Kimura T, Morimoto K. Application of microbial genes to recalcitrant biomass utilization and environmental conservation. *J Biosci Bioeng*, 2003, **95**: 549 – 561
- [34] Ohmiya K, Sakka K, Kimura T, Morimoto K. *Clostridium paraputrificum* hydrogenase gene hyd and recombinant expression for enhanced hydrogen gas production. US. Patent, 2003, 2001 – 300572