

へム鉄・非へム鉄酵素を用いた

NO還元反応に関する理論的研究

(京大福井センター¹, エモリー大²) ○畑中 美穂¹, 諸熊 奎治^{1,2}

【諸言】

細菌の嫌気性呼吸における NO_3^- から N_2 への脱窒過程の中で、NO を N_2O に還元する反応を促進する酵素を NO還元酵素 (nitric oxide reductase; NOR) という。



この酵素を用いた還元反応は、へム鉄(b_3)と非へム鉄(Fe_B)の間で起こると考えられているが、これらの反応過程の詳細は明らかにされておらず、近年この還元反応の機構の理論的解明が急がれている。また、この還元反応では、N-O結合の切断とN-N結合の生成というユニークな反応過程を経るため、合成化学の分野でも興味深い酵素として注目を集めている。

この酵素と非常に似た構造・働きを持つ酵素に cytochrome *c* oxidase (CcO)がある。NOR と CcO の大きな違いは、NOR が反応活性点にへム鉄と非へム鉄を持つのに対し、CcO はへム鉄と非へム銅を持つという点にある。CcO は好気性呼吸に用いられる酵素であり、NOR を源に進化の過程で生まれたものであると考えられているため、NOR による還元反応の機構を解明できれば、生物が好気性呼吸を獲得した過程が明らかにできる可能性がある^[1]。そこで、本研究では、DFT 法及び ONIOM 法を用いて、NOR を用いる還元反応の機構や、へム・非へム鉄の役割、周囲のタンパク場の影響を明らかにすることを目指す。

【計算方法】

Pseudomonas aeruginosa が有する NOR の結晶構造 (PDB code 3OOR)^[1]を元に、活性点近傍の HIS207、HIS258、HIS259、GLU211、HIS347、ポルフィリンの一部をモデル化した錯体を用いた。(図 1) DFT 計算には、構造最適化では UB3LYP/[LANL2DZ(Fe), DZ(others)]を、エネルギーの評価には UB3LYP/[LANL2TZ+(Fe)/DZP+(others)]を用い、Gaussian09 プログラムを利用した。また、非へム鉄の配位数が五配位の場合と六配位(水分子を追加)の場合について検討し、構造最適化は、末端部位を固定した場合と、固定しない場合の二通りを行った。

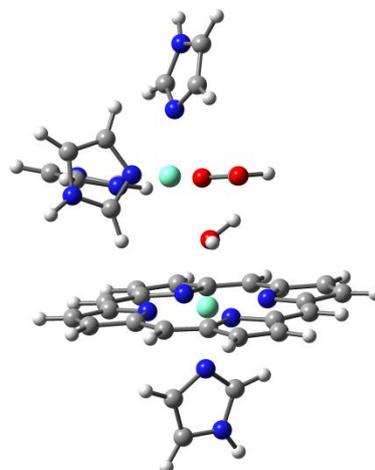


図 1 : モデル錯体

【結果・考察】

反応の第一段階は、ヘム鉄(III)・非ヘム鉄(II)系からヘム鉄(II)・非ヘム鉄(II)に還元されることから始まる。非ヘム鉄は **High Spin** 状態を、ヘム鉄は **Low Spin** 状態をとり、後述のいずれの中間体を経る場合も、ヘム鉄(III)よりヘム鉄(II)の方が反応性が高かった。次に、基質の NO 二分子が反応活性点の鉄に付加し、N₂O 分子の解離を経て、 μ -oxo 錯体を形成することで大きく安定化し、触媒サイクルのはじめに戻る。(図 2) ここで、NO 二分子が付加した中間体構造として、*cis:b₃* 機構、*trans* 機構、*cis:Fe_B* 機構の三つの説が提唱されてきた^[2-3]。(図 3) 非ヘム鉄に NO 二分子が結合した *cis:Fe_B* 機構の中間体と比べて、片方の NO がヘム鉄に結合する *cis:b₃* 機構、*trans* 機構では安定な中間体構造を持つ。通常、NO 分子同士が共有結合を形成することはないが、*cis:b₃* 機構、*trans* 機構のように、一方の NO がヘム鉄に結合することで、NO がやや還元され、NO⁻性が増すため、ONNO を含む中間体を形成することが可能になる。発表では、反応機構の詳細や、ONIOM 法によってタンパク場の効果を考慮した結果についても併せて報告する。

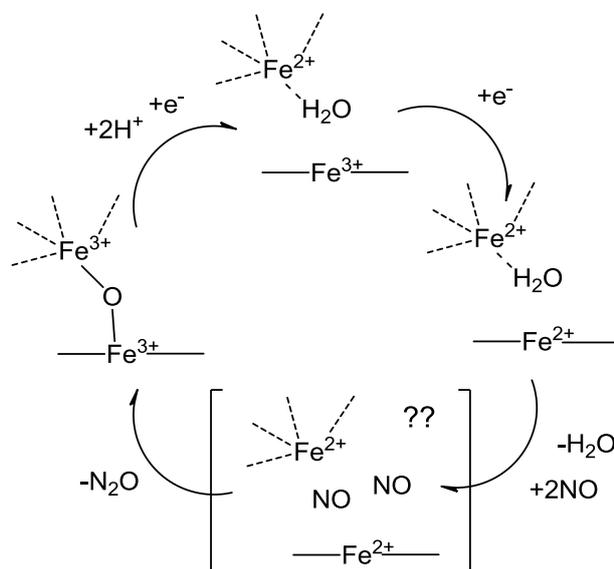


図 2 : NOR 還元反応機構

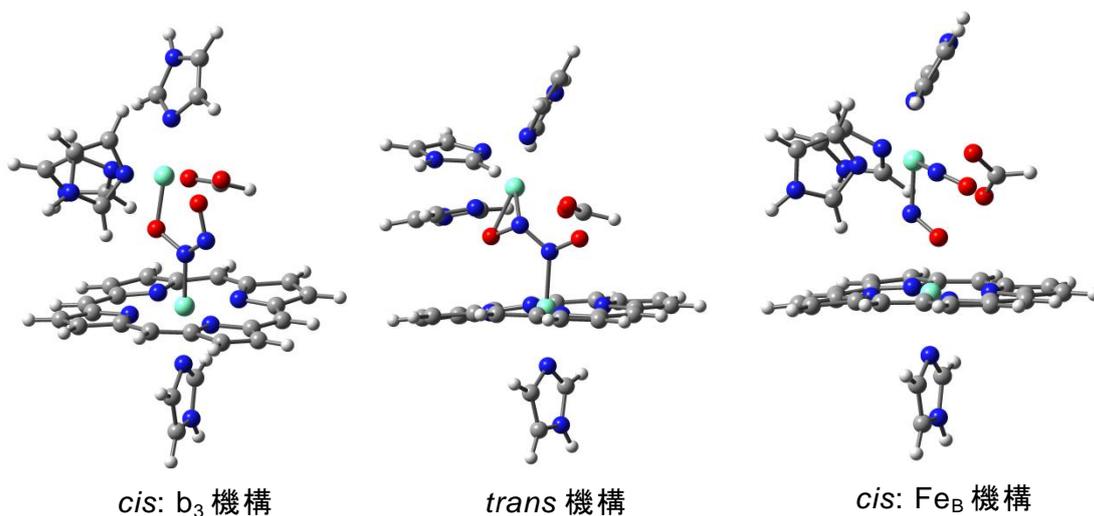


図 3 : NOR 還元反応の中間体

【参考文献】

- [1] T. Hino, *et al.*, *Science* **17**, 1666 (2010).
- [2] L.M. Blomberg, *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta* **1757**, 240 (2006).
- [3] J.P. Collman, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 15660 (2008).