

# 一酸化窒素還元酵素 cNOR 及び qNOR における 一酸化窒素還元反応機構の理論的研究

(京大福井謙一<sup>1</sup>、エモリー大化学<sup>2</sup>)

畑中 美穂<sup>1</sup>、阿部 恵理花<sup>1</sup>、諸熊 奎治<sup>1,2</sup>

## Theoretical study of the mechanism of NO reduction in bacterial nitric oxide reductase cNOR and qNOR

(Fukui Institute for Fundamental Chemistry Kyoto University<sup>1</sup>, Emory University<sup>2</sup>)

Miho Hatanaka<sup>1</sup>, Erika Abe<sup>1</sup>, Keiji Morokuma<sup>1,2</sup>

### 【序】

嫌気性呼吸のプロセスの中で、有毒な NO を無毒な N<sub>2</sub>O に変換する酵素を一酸化窒素還元酵素(NOR)と言う。この酵素は、好気性呼吸において酸素を水に還元する酵素(CcO)と同じ祖先から進化したため、嫌気性呼吸から好気性呼吸への進化の謎を解き明かす鍵を握ると考えられている。NOR から CcO への進化の過程で大きく変化した点は二点ある。一つ目は、反応中心に含まれる金属が、NOR ではヘム鉄・非ヘム鉄であったのに対し、CcO ではヘム鉄・非ヘム銅に変化したことである。二つ目は、NOR では電子とプロトンの供給源が、共に細胞の外側にあったのに対し、CcO では、プロトンの供給源だけが、細胞の内部に変わったことにより、プロトンポンプの機能が生まれたという点である。

しかし、最近になって、これまでに結晶構造が明らかにされていた NOR の一種である cNOR とは別の qNOR の結晶構造が報告され、qNOR の全体構造は、cNOR や CcO と似ており、反応中心も cNOR と似ているものの、プロトンの通り道が cNOR とは異なり、細胞の内側からのびていること、その通り道は CcO と似ていることが明らかにされた。このことから、qNOR には、CcO におけるプロトンポンプの原型ともいえる“試作品”が存在しており、cNOR よりも、より CcO に近い酵素であることが推測された。

cNOR と qNOR の違いは、プロトンの通り道だけではない。両者の反応活性点は、同じ金属、アミノ酸残基で形成されているものの、一つのアミノ酸残基(Glu)が cNOR では非ヘム鉄に配位し、図 1 の Cmp1 の段階で非ヘム鉄が五配位になっているのに対し、qNOR では、Glu が非ヘム鉄から大きく離れた場所に位置するため、非ヘム鉄が(水の配位を除くと)三配位の状態になっている。そのため、qNOR では、NO が非ヘム鉄に配位する水分子と配位交換を起こせば、cNOR よりも多くの NO が非ヘム鉄に配位し得るため、異なる反応機構を経る可能性がある。

従来、ヘム鉄・非ヘム鉄を含む反応中心で NO 二分子が N<sub>2</sub>O へ還元される機構として、*cis:b<sub>3</sub>* 機構、*cis:Fe<sub>6</sub>* 機構、*trans* 機構などが提唱されてきた。cNOR のモデル錯体を用いた DFT 法による先行研究<sup>1,2</sup>では、反応の初期段階で非ヘム鉄と NO 二分子による五員環構造(図 1 の Cmp7)

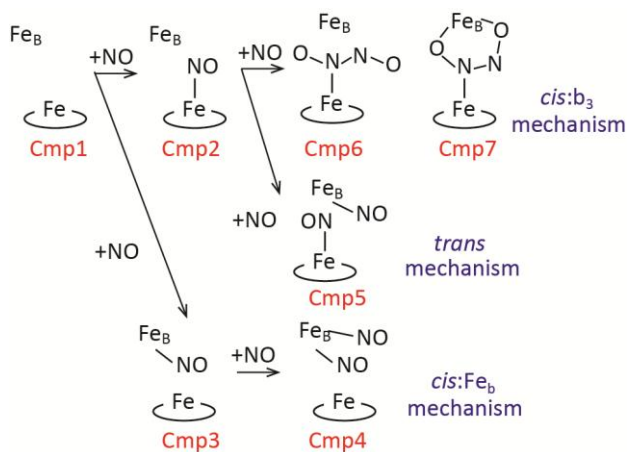


図 1：提唱されてきた反応機構

を形成するという段階までは一致するものの、その後続く N-O 結合の解離には、異なる機構が提唱されていた。qNOR の場合は、非ヘム鉄の配位数の違いから、cNOR では不利な機構と考えられている *cis:Fe<sub>B</sub>* 機構も十分に起こり得ると予測できるが、これまで検討されていなかった。そこで我々は、モデル錯体を用いた DFT 法、タンパク全体を考慮した ONIOM 法及び、反応経路を自動的に探索するために人工力誘起反応(AFIR)法を用いることで、cNOR、qNOR の NO 還元機構の違いを調べ、非ヘム鉄の配位数や、反応活性点の周囲のタンパクが、反応機構にどのように影響を及ぼすのかを明らかにすることを旨とする。

### 【計算方法】

計算モデルを結晶構造(cNOR は PDB ID =3O0R、qNOR は PDB ID = 3AYF)を元に作成し、活性中心を取り出したモデル錯体に対する DFT 計算と、酵素全体に対する ONIOM (DFT : MM)計算を行った。DFT 計算には、UB3LYP/[LANL2DZ(Fe),6-31G\*]を用い、図 2 の\*の原子を固定して構造最適化を行った。また、ONIOM 法の MM 計算には Amber 力場を使用した。

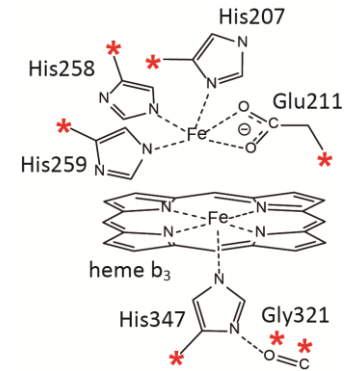


図 2 : モデル錯体

### 【結果】

まず、cNOR における NO 還元機構について DFT 法を用いて調べたところ、図 3 のように非ヘム鉄と NO 二分子が五員環構造を形成した後(*cis:b<sub>3</sub>* 機構)、一プロトン、一電子の N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> への移動が起き、N-O 結合が開裂することで、N<sub>2</sub>O が生成するという機構が、最も反応障壁の実験値をよく再現することを明らかにした。この反応の中で律速となるのが、N-O 結合の開裂である。非ヘム鉄と NO 二分子の五員環(図 1 Cmp7)から直接 N-O 結合が開裂する場合、その反応障壁は 31 kcal/mol もあり、実験値 13.3 kcal/mol と比べると明らかに高い値であったが、電子、プロトンをつずつ付加した場合の N-O 結合開裂の反応障壁が 11.0 kcal/mol と、実験値と良い一致を示すことが分かった。また、ONIOM 法を用いて周囲のタンパクを考慮しても、N-O 開裂の反応障壁に大きな変化はないことも分かった。

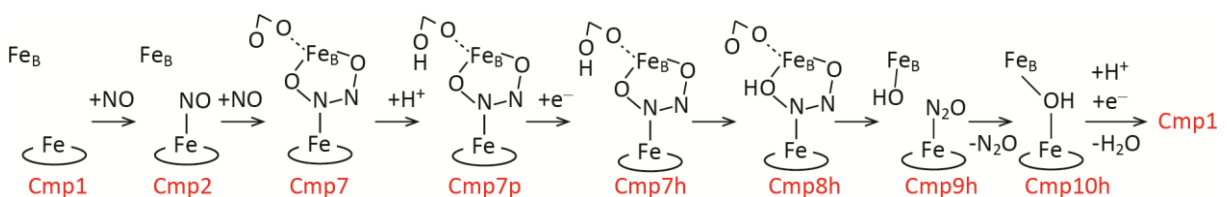


図 3 : cNOR における NO 還元機構

さて、cNOR では、非ヘム鉄に配位する Glu がプロトンに渡す役目を果たすが、qNOR では、この Glu が非ヘム鉄から遠くに位置しているため、プロトンの受け渡しができないと考えられる。そこで、改めて AFIR 法を用い、qNOR のモデル錯体に NO 二分子を付加させる人工力を加えて、反応経路を探索したところ、cNOR では得られなかった反応経路を複数得た。発表では、cNOR と qNOR の反応機構の違いについて議論する。

【参考文献】 [1] M.R.A. Blomberg, et al, *Biochemistry*, **2012**, *51*, 5173. [2] L.M. Blomberg, et al, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1747*, 240.