

2P096

銅含有亜硝酸還元酵素による亜硝酸還元反応における理論的研究

(京都府大・院生命環境<sup>1</sup>, 京大工<sup>2</sup>)オリントウルオト 正美<sup>1</sup>, リントウルオト ユハ<sup>2</sup>

Theoretical study on nitrite reduction by Cu-containing nitrite reductase

(<sup>1</sup> Grad. Sch. of Life and Environ. Sci., Kyoto Pref. Univ., <sup>2</sup> Grad. Sch. of Eng., Kyoto Univ.)

○Masami Lintuluoto<sup>1</sup>, Juha Lintuluoto<sup>2</sup>

【序】亜硝酸還元酵素は脱窒過程の第2段階で亜硝酸の一酸化窒素への一電子還元を触媒している。銅含有亜硝酸還元酵素(CuNiR)はホモ3量体であり、それぞれの単量体は2つのCuサイトT1、T2を含んでいる。T1は電子輸送サイトとして単量体内部に、亜硝酸の還元サイトであるT2は2つの単量体間に存在している。X線結晶構造解析より、亜硝酸はCu T2に配位し、プロトン移動とT1からの電子伝達によりHONOを経て一酸化窒素として脱離する機構が提案されている。

一般的にCuNiR中で亜硝酸はCu T2に $\eta^2$ -O,O side-on型で配位することが知られているが、好熱性グラム陽性細菌である*Geobacillus thermodenitrificans*由来の亜硝酸還元酵素(GtNiR)中では亜硝酸はT2サイトに $\eta^1$ -O end-on型で配位していることが結晶構造解析より明らかにされている。多くのCuNiRには触媒サイトへのプロトン供給源として、2つのプロトンチャンネルが存在しており、片方がメインのプロトン供給経路であるとされている。

これまでにGtNiRのCu T2サイトを中心としたモデル(Figure 1)をもちいたDFT計算を行ったところ、亜硝酸の結合安定状態、プロトン化の過程においてT2サイトの酸化状態、亜硝酸および結晶水、触媒残基であるHis244やAsp98などによって形成される水素結合ネットワークが非常に重要な役割を果たしていることがわかった。また、亜硝酸のプロトン化においてCu T2サイトが2価の状態では47.8 kcal/mol、1価の状態では27.3 kcal/molの活性化エネルギーが必要であり、1価の方がエネルギー的に有利であることがわかった。また、亜硝酸の結合に際して、T1サイトにCys135を通じてリンクしているHis134の配向が変化することがわかった。

本研究はCu T2サイトを中心とするモデル、Cu T1サイトを中心とするモデルを用いることによって、Cu T2サイトに水が結合しているrestingの状態から亜硝酸の結合、NO生成までを含んだ大きな触媒サイクルの詳細を明らかにすることを目的として行った。

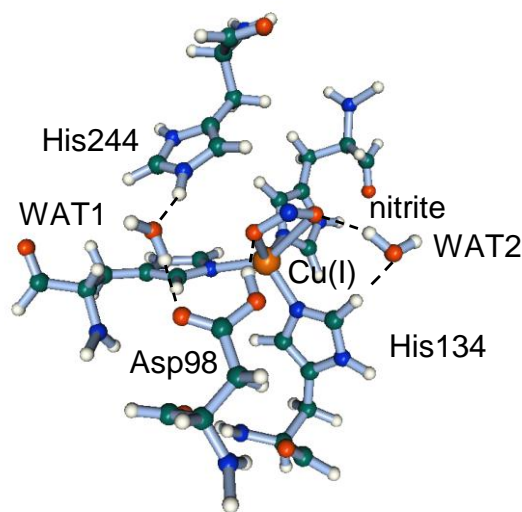


Figure 1 構造最適化したT2 Cu (I)における亜硝酸結合状態。His244はプロトン化、Asp98は中性状

【実験】Cu T2サイトを中心としたモデルではGtNiRのX線結晶構造よりCu T2サイトを中心

とし、Cu に配位している 3 つの His 残基と触媒残基である Asp98、His244 と結晶水 2 つ、T2 Cu の上部に位置する Val246 を切りだしたものをを用いた。Cu T1 サイトを中心としたモデルでは Cu に配位している 2 つの His 残基と Met148 および Cys135 を結晶構造から切り出したものをを用いた。これらの計算中、ペプチド主鎖は固定し、側鎖部分は構造最適化した。基底関数には Cu、N、O には 6-311G(d)、CH には 6-31G(d)を用い、さらに polarizable continuum model (PCM)を用いた周囲のタンパク質の影響を考慮に入れた一点計算をすべての原子に対して 6-311+G(d)を用いることで行った。交換相関関数には B3LYP を用い、Gaussian 09 プログラムを用いた。

**【結果と考察】** Cu T2 サイトを中心としたモデルを用いたこれまでの研究において、亜硝酸のプロトン化によって HONO が生成、続く NO の脱離によって Cu T2 サイトには OH-が生成する過程が最も安定であった。この構造へのプロトン供給による resting 状態の再生と亜硝酸の結合について調べた。Fig. 2 に示した WAT2 はメインのプロトンチャンネル内の他の数個の水と水素結合しており、外部とつながっている。この WAT2 をプロトン化した場合、どのようにプロトンが移動していくか、について調べた。また、プロトン供給を経ずに OH-が亜硝酸イオンに置換される場合についても調べた。その結果、HO-の脱離と亜硝酸イオンの置換は 29.9 kcal/mol のエネルギーが必要であるのに対し、プロトン化によって実験的に観察されている水が配位している resting の状態を再生する場合には 45.1 kcal/mol の安定化が得られることがわかった。resting の状態からの亜硝酸イオンの置換では 33.8 kcal/mol の安定化が得られた。

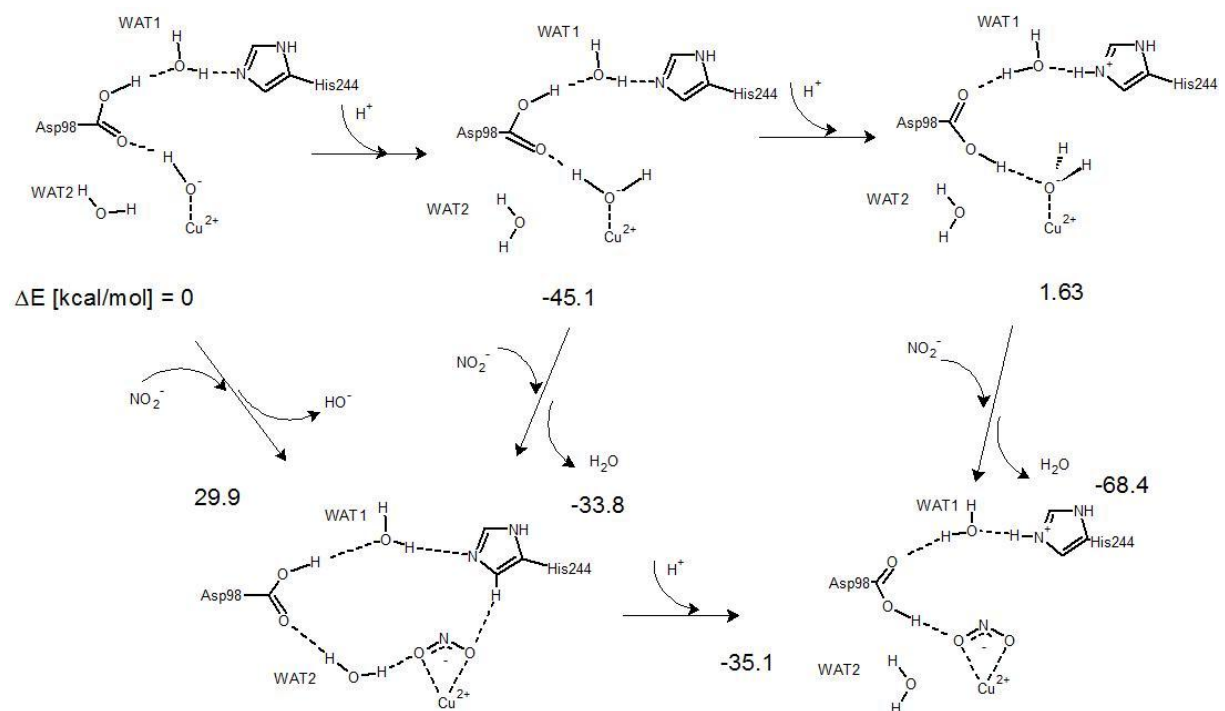


Fig. 2 Cu T2 サイトにおける亜硝酸還元によって生じた NO 脱離後のプロトン化による resting 状態の再生および亜硝酸イオンの結合に関する反応過程。数値は出発状態からのエネルギー差を示す。

Cu T1 サイトを中心としたモデルを用いた計算を行った結果、T1 サイトの酸化状態の変化によって Cys135 の配向が変化することがわかった。電子移動との関連性について検討中である。