

4C04

マイクロ流体フロー・フラッシュ赤外分光測定系による 一酸化窒素還元酵素の触媒反応の実時間観察

(理研・SPring-8¹, 兵庫県大・院理・生命², JST・さきがけ³)

○木村哲就¹, 石井頌子^{1,2}, 當舎武彦¹, 城宜嗣^{1,2}, 久保稔^{1,3}

Development of micro-channel flow-flash infrared spectroscopy realizing real-time observation of catalytic reaction mediated by nitric oxide reductase.

(RIKEN/SPring-8 Center¹, Univ. of Hyogo/Grad. Sch. of Life Sci.², JST/PRESTO³)

○Tetsunari Kimura¹, Shoko Ishii^{1,2}, Takehiko Toshi¹, Yoshitsugu Shiro^{1,2}, Minoru Kubo^{1,3}

一酸化窒素還元酵素 (NOR) は、ヘム鉄と非ヘム鉄からなる活性中心で 2 分子の NO を N₂O に還元する膜タンパク質であり ($2\text{NO} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$)、細胞毒性の高い NO を速やかに無毒化する。近年、我々は X 線結晶構造解析によって、本酵素の活性中心の構造や電子・プロトン供給経路を明らかにした (Hino et al. (2010) *Science* **330**, 1666-70)。しかし、反応機構に関しては、(i) 2 分子の NO がヘム鉄と非ヘム鉄それぞれに結合した NO 結合型が生成した後、N-N 結合が形成される *trans* 機構と、(ii) 1 分子の NO がヘム鉄と非ヘム鉄を架橋した NO 結合型が生成した後、2

分子目の NO が NO 結合型にアタックする *cis* 機構が提案されているが、まだ決着がつかない (Fig. 1)。これは機構解明の鍵となる NO 結合型が極めて短寿命の中間体であるために、従来の方法では解析が不可能であったためである。そこで、酵素反応 (不可逆反応) に適用可能なマイクロ秒時間分解顕微可視・赤外吸収分光装置を新規に

開発し、中間体を直接観察することで反応機構の決着を目指した。

本装置では、紫外光照射によってマイクロ秒で NO を放出するケージド NO を反応トリガ

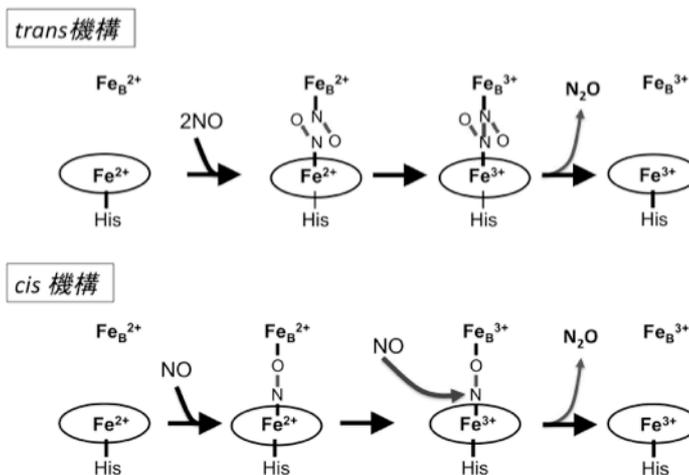


Fig. 1: 提案されている NO 還元反応機構. *trans* 機構では NO 結合型が形成した後、分子内で N-N 結合が形成する。一方 *cis* 機構では 2 つ目の NO が NO 結合型にアタックする分子間反応によって N-N 結合が形成する。

ーとして用いた。さらに、光照射と同期して~10 ナノリットルの未反応試料をマイクロ流路フローセル（光路長 20 μm , 流路幅 200 μm ）に送液し、試料交換することのできる、極微量送液システムの開発を行い、計測に要する試料の消費量を大幅に抑制した。我々はこの測定系を可視吸収分光装置、およびフェムト秒赤外レーザーを光源に用いた高輝度赤外吸収分光装置と組み合わせ、収量の低い膜タンパク質の反応をマイクロ秒の時間分解能で追跡できるマイクロ流体フロー・フラッシュ分光システムを構築した。可視吸収分光はヘムの、赤外吸収分光は基質（NO）や生成物（ N_2O ）の電子状態・配位状態解析に有用である。

まずは時間分解可視吸収スペクトルを計測し、グローバル近似解析を行ったところ、スペクトルは時定数 5 μs , 100 μs , 5 ms からなる 3 相の変化を示すことがわかった (Fig. 2)。第 1 相と第 3 相の速度には NO 濃度依存性が見られたのに対し、第 2 相の速度は NO 濃度に依存しなかった。次に、生成物 N_2O の NN 伸縮振動 (2230 cm^{-1}) を時間分解赤外分光計測したところ、 N_2O は 500 μs 以内に生成し、その後の N_2O 生成は無いことがわかった。以上の結果を併せると、NO 結合型が数 μs で生成した後、100 μs で NO 還元反応が起こり、 N_2O が生成することが明らかとなった。さらには、NO 還元速度（第 2 相）が NO 濃度に依存しないことから、分子内反応として NO 還元が起こる *trans* 機構で反応が進むことが示唆された。現在、NO の配位状態を直接観察するための時間分解赤外分光計測を進めている。

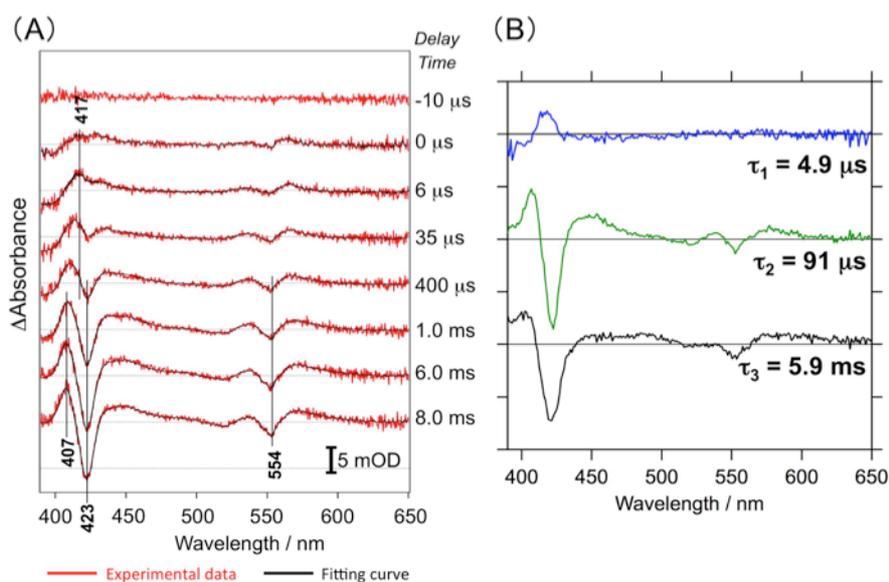


Fig. 2: NOR 酵素反応の時間分解可視吸収スペクトルおよび解析結果. (A) 時間分解可視吸収スペクトル(赤線)および解析によって得られた近似曲線 (黒線). (B) グローバル近似解析によって算出された時定数とスペクトル変化成分.