

2P121

銅亜硝酸還元酵素の反応機構の理論的解明

(京都府大・院生命環境¹, 京大工²) ○リントウルオト 正美¹, リントウルオト ユハ²

Theoretical study on reaction mechanism of Cu-containing nitrite reductase

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

○Masami Lintuluoto¹, Juha Lintuluoto²

【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 ordered mechanism が提案されている。一方で亜硝酸の結合前に電子移動が起こるパスと亜硝酸結合後に電子移動が起こるパスが競合する random sequential mechanism が電気化学的手法を用いた実験結果などから提案されている。

我々は好熱性グラム陽性バクテリアである *Geobacillus thermodenitrificans* 由来の亜硝酸還元酵素 (GtNiR) の Cu T2 サイトを中心としたモデルを用いた DFT 計算を行ってきた。pKa や還元電位の結果から、resting 状態において、吸熱的な亜硝酸結合に先んじて Cu T2 サイトの還元が起きる経路と発熱的な亜硝酸結合に続いて Cu T2 サイトの還元が起きる経路が存在が明らかとなった。このことから我々は反応機構として random sequential mechanism を提案している。

我々の先の研究結果において Cu T2 まわりのアミノ酸残基の構造変化を調べた結果、Cu T2 サイトに配位している His100 や His134 は亜硝酸結合や Cu の還元過程において、構造変化をすることがわかった。His100 はたんぱく質表面につながっているセンサーループの末端に存在し、His134-Cys135 は T1 および T2 サイトをリンクしている。センサーループは ordered mechanism において、亜硝酸結合の情報伝達に関与していることが示唆されている。また、触媒残基である His244 は Cu T2 周辺の水素結合ネットワークの変化に伴って構造変化することがわかった。His244 は周りのアミノ酸残基との水素結合を組み替えることによりプロトン移動のスイッチングを制御していることが実験的に提案されている。

本研究では Cu T1 および T2 やセンサーループなどの反応に関与が示唆されている第 2 配位圏のアミノ酸残基を含む QM/MM モデルを用い、これらの第 2 配位圏のアミノ酸残基の機能を明らかにする。また、一般的に CuNiR には Cu T2 サイトとタンパク質表面をつなぐ 2 つのプロトンチャネルが存在しており、触媒 Asp 残基と表面をつなぐチャネルがメインのチャネルとされており、GtNiR にはこのチャネルは存在するが他方は途中で途切れたプロトンプールと呼ばれる構造をとっている。この 2 つのチャネルのそれぞれの役割も明らかにする。

【実験】 GtNiR の X 線結晶構造をもとに QM/MM model は Fig. 1 に示すように T1、T2 Cu サイトおよび 122 のアミノ酸残基と 16 個の結晶水からなる。T1、T2 Cu サイトに配位しているア

ミノ酸残基および2つの触媒残基)、5つの水(WAT1~5)がQM領域に含まれる。

MM領域中のセンサーループ (Met89~Ala101) を除く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 6-31G(d,p)、Cu には SDD を用いた。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 QM モデルを用いたこれまでの研究によって亜硝酸の還元には触媒残基 Asp98 や His244 のプロトン化が必要であり、亜硝酸のプロトン化に必要な水素結合ネットワークが形成されることを報告してきた。今回の QM/MM モデルにおいても同様に亜硝酸結合状態で触媒残基のプロトン化により Cu T2 サイト周辺の水素結合ネットワークの構造変化が見られたが、T1 サイト周辺では構造変化は見られなかった。我々が提案している触媒反応サイクル中 Asp98 の側鎖は常にプロトン化されており、亜硝酸が結合し、Cu T2 サイトの還元を経て、His244 のプロトン化が起きる。Asp98 の側鎖のプロトン化の前後で His244 の $N^{\delta}-C^{\gamma}-C^{\beta}-C^{\alpha}$ の2面角は 55.34 度から 74.9 度へと変化した。Asp98 のプロトン化前には HN^{δ} -His244 は GLN267 の骨格酸素のみと相互作用しているが、Asp98 のプロトン化により GLN267 の骨格酸素と O^{γ} -Thr268 と相互作用する。 HN^{δ} -His244 と GLN267 骨格酸素および O^{γ} -Thr268 との距離は 2.24 および 2.55 Å であった。

酵素反応サイクル中に含まれる各反応ステップにおける構造変化などの詳細について検討中である。

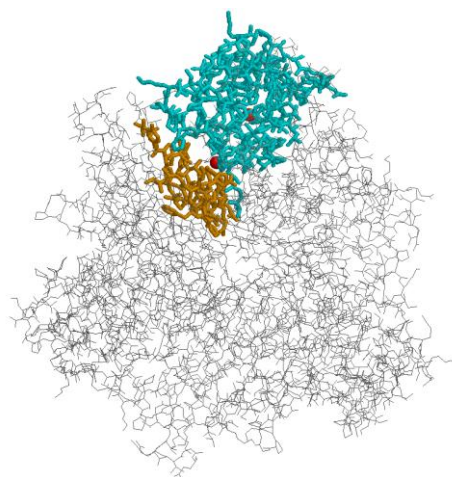


Figure 1. QM/MM 計算に用いたモデル。緑とオレンジのスティックで表した領域が QM/MM 領域。赤い球は T1 および T2 Cu サイト。

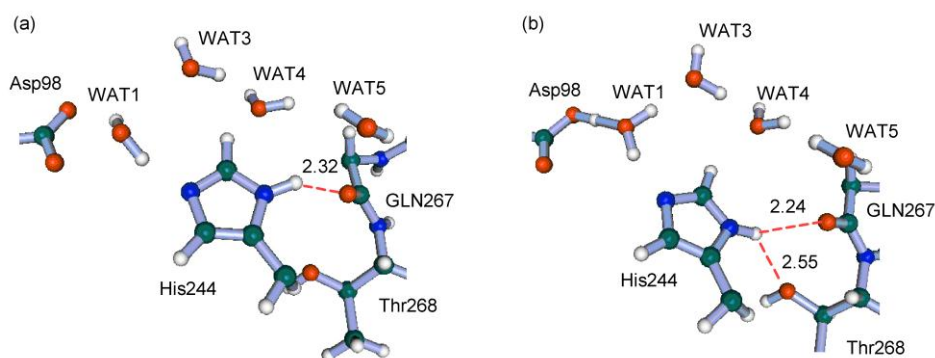


Figure 2. Asp98 のプロトン化による His244 の構造変化と周囲のアミノ酸残基との相互作用変化。(a) プロトン化前の構造。 HN^{δ} -His244 は GLN267 の骨格酸素のみと相互作用。(b) プロトン化後の構造。 HN^{δ} -His244 は GLN267 の骨格酸素と O^{γ} -Thr268 と相互作用する