

銅含有亜硝酸還元酵素におけるプロトン共役電子移動

¹京府大, ²京大院工学部○リントウルオト 正美¹, リントウルオト ユハ ミカエル²

Proton coupled electron transfer on copper-containing nitrite reductase

○Masami Linuluoto¹, Juha M. Lintuluoto²¹ Graduate school of life and environmental science, Kyoto prefectural university, Japan² Graduate school of engineering, Kyoto University, Japan

【Abstract】 The details of enzyme reaction on copper-containing nitrite reductase including the inter- and intra-electron transfer and protonation of catalytic residues were investigated by using ONIOM calculation. The unoccupied d orbital of Cu T1 site was lowered to β -LUMO by the nitrite binding to the resting state of CuNiR. Adding the electron to the nitrite binding state decreased the spin density of Cu T1 site, while the spin density of the resting state was not changed. The electron transfer from T1 to T2 Cu sites was induced by the protonation of the hydrogen bond network composed by two catalytic residues and a water molecule. We concluded that the inter-electron transfer follows the nitrite binding, and the protonation of two catalytic residues induces the intra-electron transfer from T1 to T2 Cu sites.

【序】 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。

これまでに我々は Cu T2 サイトを中心としたモデルを用い DFT 計算を行った^{1, 2)}。resting 状態 (I(Ox)) 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 サイトの還元が起こる経路の存在が明らかとなった (Fig. 1)¹⁾。このことから我々は反応機構として逐次ランダム機構を提案した¹⁾。

本研究では Cu T2 サイトに加え Cu T1 サイトを含み、プロトンチャネルや情報伝達をしていると考えられているセンサーループを構成するアミノ酸残基を含む QM/MM モデルを用い、反応機構の詳細について検討を行った。

【方法 (実験・理論)】 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*)³⁾ の X 線結晶構造をもとにした

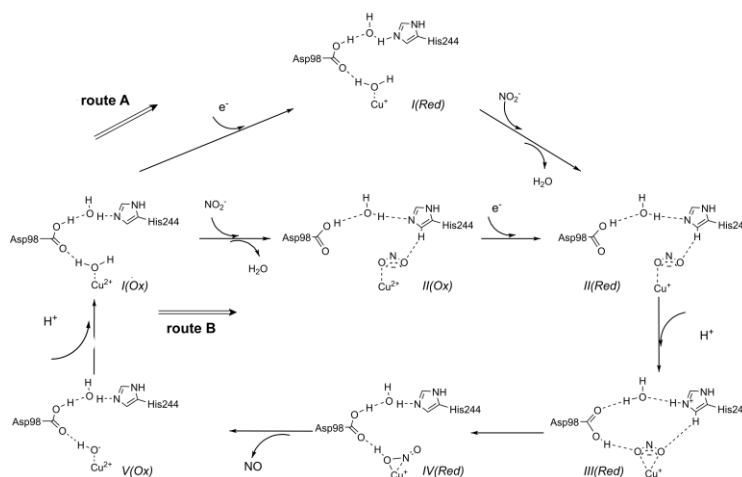


Figure 1. The enzyme catalytic cycle of CuNiR in the previous DFT study.¹⁾

QM/MM model は 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) を除くアミノ酸残基は固定した。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、QM/MM 計算には ONIOM 法を用い、Gaussian 09 プログラムを用いた。pKa や還元電位は Gibbs 自由エネルギー計算の結果を用い Born-Haber サイクルによって見積もった。溶媒和効果は polarizable continuum model を用いることで考慮した。

【結果・考察】 resting 状態 [T1Cu(II)-T2Cu(II)-H₂O Asp98-COO^δH His244N^ε] (以降 Structure I(Ox)) および亜硝酸結合状態 [T1Cu(II)-T2Cu(II)-NO₂⁻ Asp98-COO^δH His244N^ε] (Structure II(Ox)) における還元電位を Table 1 に示す。亜硝酸結合状態 (Structure II(Ox)) では ε の変化に伴い還元電位が大きく変化する。どの ε においても resting 状態 (Structure I(Ox)) の方が還元電位は大きい。亜硝酸結合状態 (Structure II(Ox)) では β-LUMO は Cu T1 サイトの d orbital を含んでいるが、resting 状態 (Structure I(Ox)) では Cu T1 サイトの d orbital の関与は上方の軌道から始まる。結合した亜硝酸の還元には 2 つの触媒残基 Asp98 と His244 のプロトン化および Cu T2 サイトが還元状態であることが重要であることを前の DFT 計算において報告した²⁾。resting 状態 (Structure I(Ox))、亜硝酸結合状態 (Structure II(Ox)) において電子を一つ外部から与えた状態では Cu T2 サイトの電荷やスピン密度に変化は見られないことから、Cu T2 サイトへの電子移動は見られないと考えられる。しかし、Asp98 と His244、その間に存在する水分子で構成する水素結合ネットワークにプロトンを付加することにより、Cu T2 サイトに電子が移動することがわかった。この状態 [T1Cu(II)-T2Cu(I)-NO₂⁻ Asp98-COO^δH His244N^εH⁺] (Structure III(Red)) では HOMO、LUMO 周辺に Cu T2 サイトの d orbital 軌道が含まれる。一方、先にプロトンを付加した状態では還元電位が小さく電子の付加が難しくなることがわかった。以上の結果より、外部タンパク質から CuNiR の Cu T1 サイトへの電子移動は亜硝酸の結合後に起こり、T1 から T2 Cu サイトへの電子移動は触媒残基のプロトン付加によって誘導されることがわかった。

Table 1. Reduction potentials[V] for the structures I, II and III.

	ε				
	4.0	10.0	20.0	40.0	78.4
Structure I(Ox)	1.08	0.53	0.55	0.50	0.31
Structure II(Ox)	0.76	0.23	0.15	0.11	0.055
Structure III(Ox)	0.92	0.11	-0.03	-0.21	-0.32

【参考文献】

- 1) M. Lintuluoto and J. M. Lintuluoto, *Biochemistry*, **55**, 4697, (2016).
- 2) M. Lintuluoto and J. M. Lintuluoto, *Biochemistry*, **55**, 210, (2016).
- 3) Y. Fukuda, *et al.*, *J. Biochem.*, **155**, 123, (2014).