

# 一酸化窒素還元酵素の電気化学制御表面増強赤外吸収分光計測

<sup>1</sup>北大院地球環境, <sup>2</sup>北大院環境科学, <sup>3</sup>理研SPring-8  
 ○加藤 優<sup>1,2</sup>, 中川省吾<sup>2</sup>, 増田侑也<sup>2</sup>, 當舎武彦<sup>3</sup>, 中田耕<sup>1,2</sup>, 八木一三<sup>1,2</sup>

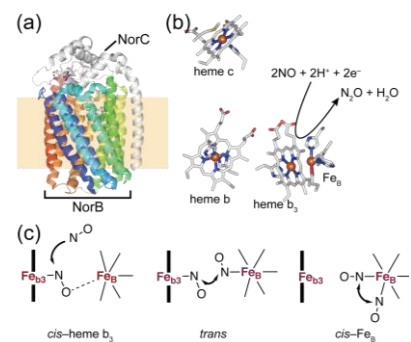
## Surface-enhanced Infrared Absorption Spectroscopy of Nitric Oxide Reductase under Potential Control

○Masaru Kato<sup>1,2</sup>, Shogo Nakagawa<sup>2</sup>, Yuya Masuda<sup>2</sup>, Takehiko Tosha<sup>3</sup>,  
 Kou Nakata<sup>1,2</sup>, Ichizo Yagi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Environmental Earth Science, Hokkaido University, <sup>2</sup> Graduate School of Environmental Science, Hokkaido University, <sup>3</sup> Spring-8 Center, RIKEN, Japan

**【Abstract】** Nitric oxide reductases (NORs) are a transmembrane metalloenzyme and reduce nitric oxide to nitrous oxide in the denitrification pathway of the global nitrogen cycle. The enzymatic NO reduction catalyzed by NORs occurs at the binuclear iron active site of heme  $b_3$  and a non-heme  $Fe_B$ . The determination of reduction potentials of these iron cofactors will help us elucidate the enzymatic reaction mechanism. However, previous reports on these potentials remain controversial. Herein, we performed electrochemical and surface-enhanced infrared absorption (SEIRA) spectroscopic measurements of *Pseudomonas aeruginosa* NOR immobilized on gold electrodes. Cyclic voltammograms exhibited a reduction peak at  $-0.44$  V vs. SHE, and a SEIRA spectrum of NOR-immobilized electrodes using a vibrational probe of CO showed a characteristic band at  $1972\text{ cm}^{-1}$  at  $-0.4$  V vs. SHE, which was assigned to  $\nu_{CO}$  of heme  $b_3$ -CO. These results suggest that the reduction of heme  $b_3$  initiates the enzymatic NO reduction.

**【序】**一酸化窒素還元酵素(NOR)は、一酸化窒素(NO)から亜酸化窒素( $N_2O$ )への還元反応を触媒する膜貫通型金属酵素である(**Fig. 1a**)。  $N_2O$ は  $CO_2$ の約300倍もの地球温暖化係数を有し、また、オゾン層破壊物質の1つでもあり、大気中の  $N_2O$ の約7割がNORによって生成されていると言われている[1]。そのため、環境変動抑制などの観点で、NORによる  $N_2O$ 生成機構の解明が望まれている。NORの触媒反応機構には、NORが持つ4つの鉄補因子のうち heme  $b_3$ と非ヘム鉄  $Fe_B$ から構成される2核鉄錯体反応サイト(**Fig. 1b**)が関与しており、3つの反応機構(**Fig. 1c**)が提案されている。反応機構を解明するために、過去に酸化還元滴定などにより heme  $b_3$ と  $Fe_B$ の酸化還元電位が決定されているが、赤外吸収分光法のような分子構造を反映した分光計測による決定は未だなされていない。



**Fig. 1.** (a) Structures of cNOR (PDB: 3O0R) from *P. aeruginosa*. (b) The arrangement of the iron cofactors in cNOR. (c) Three proposed NO reduction reaction mechanisms: *cis*-heme  $b_3$ , *trans*, and *cis*- $Fe_B$ .

本研究では、cytochrome  $c$ 依存型 NOR (cNOR)を Au 電極表面に固定化し、そのタンパク質フィルム電気化学(protein film electrochemistry)により酸化還元応答および電気化学的 NO 還元反応を調べ、そして、赤外振動プローブとして一酸化窒素(CO)を用い

た cNOR 修飾 Au 電極の表面増強赤外吸収(SEIRA)分光計測により, heme  $b_3$  および  $\text{Fe}_B$  の還元電位を決定した.

【方法 (実験)】 cNOR は緑膿菌である *P. aeruginosa* から単離生成した[2]. 無電解メッキ法[3]により, 半円筒 Si プリズム表面に Au メッキすることで cNOR 修飾用 Au 基板を作製した. cNOR は Au 基板表面に直接修飾, または, カルボキシ基を末端に有するアルカンチオールにより自己組織化単分子層を Au 表面に形成し, アミド結合形成試薬を用いた共有結合により修飾した. SEIRA スペクトルは, Kretschmann 配置, 入射角度  $70^\circ$  で取得した. 電極構成は 3 電極式を採用し, 作用極に NOR 修飾 Au 電極, 対極に Pt, 参照極に  $\text{Ag}|\text{AgCl}$  (sat. KCl)を用いた.

【結果・考察】 cNOR の電極表面固定化前後で SEIRA スペクトルを測定した結果, cNOR 電極表面修飾後の電極においてアミド I とアミド II に由来するバンドを確認した. この結果は cNOR が電極表面に固定化されていることを示唆している. また, cNOR 修飾 Au 電極の電気化学的 NO 還元活性を調べるために, cNOR 修飾および未修飾 Au 電極を用いて, Ar および NO 雰囲気下でリニアスイープボルタモグラム(LSV)を取得したところ, cNOR 固定化電極において NO 雰囲気下で  $-0.4 \text{ V vs. SHE}$  付近に還元電流を観測した (Fig. 2). これは電極表面に固定化された cNOR が触媒活性を保持した状態で固定化されている, すなわち変性していないことを示唆している. 更に, 電位制御下で Au 電極表面に固定化した cNOR に CO を吸着させた後に, SEIRA スペクトルを取得したところ,  $-0.4 \text{ V vs. SHE}$  において  $1972 \text{ cm}^{-1}$  に特徴的なバンドを観測し (Fig. 3), 過去の報告[4]から, heme  $b_3$ -CO に帰属することができた. このことから heme  $b_3$  が  $-0.4 \text{ V vs. SHE}$  で鉄イオンが還元( $\text{Fe}^{\text{III}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}}$ )されることで, CO が heme  $b_3$  に配位したと考えられる.

以上の結果を踏まえると, heme  $b_3$  の還元が引き金となり, cNOR による電極触媒的 NO 還元が起こることが明らかとなった. このことから heme  $b_3$  が反応に関与していることは明らかであり, 過去に提案されている 3 つの反応機構のうち, heme  $b_3$  が介在しない *cis*  $\text{Fe}_B$  反応機構 (Fig. 1c)を否定する結果となった[5].

### 【参考文献】

- [1] D.J. Wuebbles, *Science* **326**, 56 (2009).
- [2] T. Hino, Y. Matsumoto, S. Nagano, H. Sugimoto, Y. Fukumori, T. Murata, S. Iwata and Y. Shiro, *Science* **330**, 1666 (2010).
- [3] M. Yaguchi, T. Uchia, K. Motobayashi and M. Osawa, *J. Phys. Chem. Lett.* **7**, 3097 (2016).
- [4] N. Sato, S. Ishii, H. Sugimoto, T. Hino, Y. Fukumori, Y. Sako, Y. Shiro, T. Tosha, *Proteins* **82**, 1258 (2014).
- [5] M. Kato, S. Nakagawa, T. Tosha, Y. Shiro, Y. Masuda, K. Nakata, I. Yagi, *submitted*.

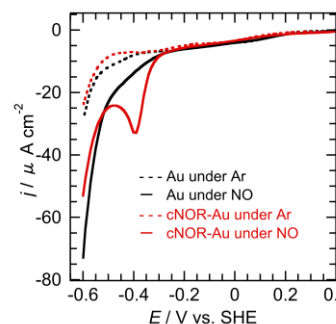


Fig. 2. (a) LSVs of cNOR-modified and unmodified Au electrodes recorded under Ar or NO.

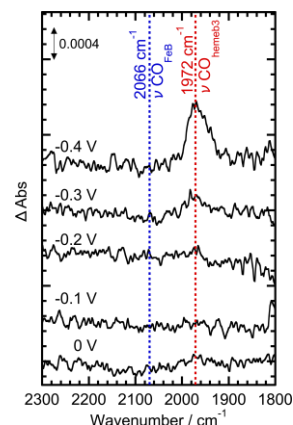


Fig. 3. SEIRA spectra of CO-adsorbed cNOR under potential control.