

時間分解赤外分光法および凍結トラップX線結晶構造解析によるP450nor 反応中間体の解析

¹兵庫県立大 院生命, ²理研 SPring-8, ³理研 CLST, ⁴University of Liverpool,
⁵東大 院理

○ 野村高志¹, 當舎武彦², 杉本宏², 久野玉雄³, 山際来佳¹, ChaiGopalasingam⁴,
山下恵太郎⁵, 平田邦生², 山本雅貴², 城宣嗣¹, 久保稔¹

Reaction Intermediate Analysis of P450nor by Using Time-resolved IR Spectroscopy and Freeze-trap X-ray Crystallography

○ Takashi Nomura¹, Takehiko Tosha², Hiroshi Sugimoto², Tamao Hisano³, Raika Yamagiwa¹,
Chai Gopalasingam⁴, Keitaro Yamashita⁵, Kunio Hirata², Masaki Yamamoto², Yoshitsugu
Shiro¹, Minoru Kubo¹

¹ Graduate School of Life Science, University of Hyogo, Japan

²RIKEN SPring-8 center, Japan

³RIKEN CLST, Japan

⁴Institute of Integrative Biology, University of Liverpool, United Kingdom

⁵Department of Biological Sciences, The University of Tokyo, Japan

【Abstract】 P450nor is a heme enzyme that catalyzes the reduction of NO to N₂O in the denitrification. In the catalytic reaction, NO is reduced by two electrons directly transferred from NADH. The resulting highly-activated species (intermediate-I) is the key intermediate to understand NO reduction reaction of P450nor. However, its electronic and geometric structures are not yet known. Here, we successfully characterized the coordination and protonation structures of intermediate-I of P450nor by the combinational use of freeze-trap XFEL crystallography at SACLA and time-resolved IR spectroscopy. The crystallography revealed that NO in intermediate-I is bound to the heme in a highly bent form, with a Fe-N-O angle of ca. 120°. On the other hand, the NO stretching IR signal of intermediate-I was observed at 1330 cm⁻¹, assignable to the single protonated state (Fe-NHO). On the basis of the N-O vibrational data and the Fe-N-O coordination geometry, the QM/MM calculation is underway to further elucidate the electronic structure and reactivity of intermediate-I.

【序】 脱窒カビ (*Fusarium oxysporum*) 由来の一酸化窒素還元酵素 P450nor は、地球上の窒素循環において、一酸化窒素 (NO) を亜酸化窒素 (N₂O) へと還元するヘム酵素である。P450nor の酵素反応では、(1) 酸化型のヘム (Fe³⁺-H₂O) に NO が結合した後、(Fe³⁺-NO 型の生成) (2) NADH からのヒドリド (H⁻) 移動によって、NO が 2 電子還元される (中間体 I の生成)。最後に (3) 中間体 I と 2 分子目の NO が反応することで N₂O が生成し、系は酸化型に戻る (2NO + NADH + H⁺ → N₂O + H₂O + NAD⁺) (Fig. 1)。

中間体 I は NO 活性型であり、NO 還元反応の鍵を握っている中間体である。しかし、中間体 I は不安定種であり観測が困難なため、その配位構造やプロトン化状態 (Fe-

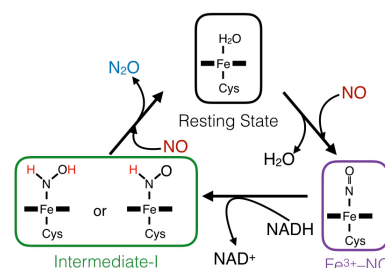


Fig. 1 Reaction cycle of P450nor

NHO or Fe-NHOH) は未だ明らかになっていない。そこで本研究では、P450nor の反応機構を解明するために、X線結晶構造解析と赤外分光法を併用し、中間体 I の配位構造とプロトン化状態の決定を目指した。

【方法】 P450nor の酵素反応を駆動するために、紫外光励起により NO を放出するケージド NO を用いた。P450nor にケージド NO と NADH を混合し、紫外光を照射することで NO 還元反応を開始できる。これまでに時間分解可視吸収分光法を適用し、中間体 I はケージド NO 光励起後、結晶相では秒、溶液相ではサブミリ秒の時間スケールで生成することを明らかにしている¹。そこで、X線結晶構造解析では凍結トラップ法、赤外分光測定ではポンププローブ法により中間体 I を観測することにした。

X線結晶構造解析では、ケージド NO と NADH を浸潤させた微結晶をメッシュループに多数散布し、ケージド NO 光励起 3 秒後に微結晶を急速凍結することで中間体 I の凍結微結晶を調製した。凍結微結晶を X線自由電子レーザー (XFEL) 施設 SACLA に持ち込み、シリアル測定によって 1 結晶 1 照射条件で無損傷構造解析した。

一方、時間分解赤外分光では、ケージド NO 光励起後の時間分解スペクトルを測定した。スペクトルは、(1) ケージド NO 光励起前との差スペクトルを計算し、(2) その差からケージド NO 由来のピークを差し引き、最後に(3) ¹⁴NO を用いた結果と ¹⁵NO を用いた結果の差を評価することで (triple difference)、ヘムに結合した NO 伸縮振動を検出した。

【結果・考察】 中間体 I の XFEL 結晶構造解析結果を Fig. 2 に示す (分解能 1.8 Å)。Fe-N-O 角は約 120° であった。Fe³⁺-NO 型の Fe-N-O 角は約 160° のため¹、ヒドリドによる 2 電子還元によって、ヘムに結合した NO はヘム法線から大きく傾くことがわかる。一方、Fe-N 結合軸は、中間体 I では 90° に近かった。

Fig. 3 に時間分解赤外分光測定の結果を示す。赤が実測スペクトル、黒がガウシアンでフィッティングしたスペクトル、青と緑がその分割成分である。この時間分解スペクトルには、同位体シフトを示す 2 本のシグナルが含まれていた。1 つは 1330 cm⁻¹ ($\Delta^{15}\text{N} = 32 \text{ cm}^{-1}$ 、青) のシグナルで、サブミリ秒のタイムスケールで増加した。もう 1 つは 1289 cm⁻¹ ($\Delta^{15}\text{N} = 27 \text{ cm}^{-1}$ 、緑) のシグナルで、1330 cm⁻¹ の減少に伴いミリ秒で増加した。1330 cm⁻¹ のシグナルは、NHO が結合したヘムモデル化合物の NO 伸縮振動数² とほぼ一致する事から、Fe-NHO の NO 伸縮振動に帰属される。一方、1289 cm⁻¹ のバンドは、まだ帰属に至っていない。

現在、1289 cm⁻¹ の帰属のために重水や NADD を使った解析を進めるとともに、得られた配位構造とプロトン化状態を踏まえて QM/MM 電子状態解析を進めている。

【参考文献】

- [1] Tosha et al., *Nat Commun.*, **8**, 1585 (2017)
 [2] Abucayon, E. G. et al., *Dalton Trans.*, **45**, 18259 (2016).

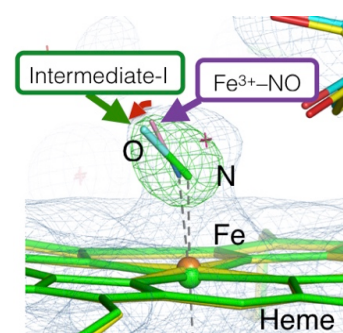


Fig. 2 X-ray structures of Fe³⁺-NO and intermediate-I

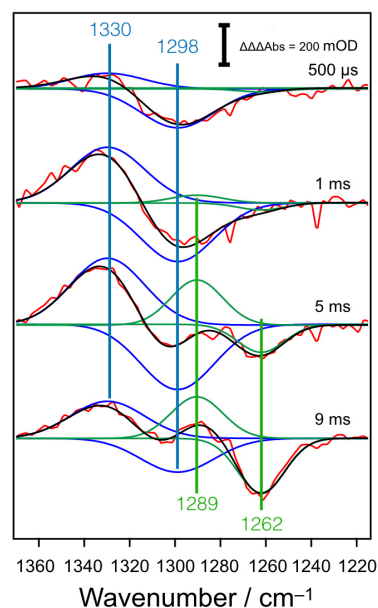


Fig. 3 Time-resolved IR spectra of P450nor