

「光解離性ケージド化合物を用いた膜結合型 NO 還元酵素の反応中間体の構造解析」

兵庫県立大学大学院理学研究科

當舎 武彦

1 研究の背景と目的

活性部位に鉄などの遷移金属を有する金属酵素は生体内の温和な条件で化学反応を高効率・高選択的に行っており、様々な生理反応に関与している。そのため、金属酵素に秘められた高活性な触媒反応の仕組みを解明することは、生命現象の分子論的な理解のために必要であるのは、もちろんこと、高活性な新規触媒の設計指針ともなりうる。金属酵素の反応機構を理解するためには、触媒反応中に過渡的に形成される短寿命反応中間体の分子構造や電子状態を理解することが重要である。申請者は、これまで活性部位に鉄をもつ一酸化窒素還元酵素（NOR）を研究対象とし、光照射により基質である NO を放出するケージド NO を利用し、短寿命反応中間体の捕捉を目指した研究に取り組んできた[1,2]。本申請課題では、申請者のこれまでの研究を発展させ、金属酵素の短寿命反応中間体の分子構造および電子状態を解明するための手法開発に取り組んだ。

具体的には、緑膿菌由来膜結合型一酸化窒素還元酵素（cNOR）を研究対象とする。本酵素は、ヘム鉄と鉄からなる活性部位において、2 等量の電子とプロトンを利用することで、2 分子の NO を亜酸化窒素（ N_2O ）と水分子に還元する反応を触媒する（図 1）。

本課題では、光照射により電子が供給できるケージド電子（光還元剤）および光照射により基質を発生させるケージド基質（ケージド NO）を利用することで、金属酵素の酸化状態と基質との反応を光により制御することを目指した。そして、cNOR の短寿命反応中間体を捕捉し、その分子構造や電子状態を明らかにすることに挑戦した。

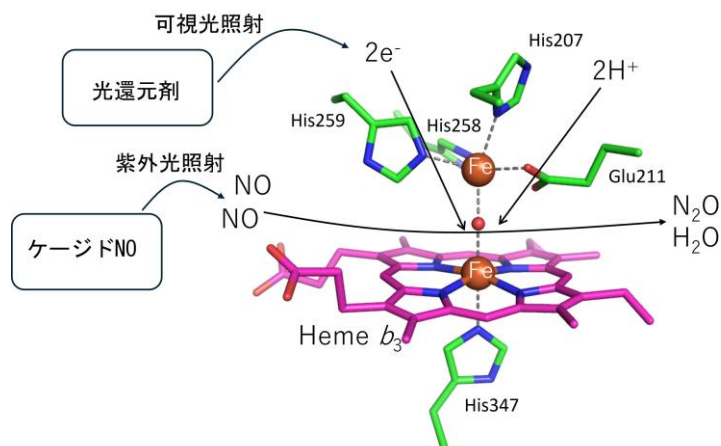


図 1. cNOR の活性部位の構造。本研究では、光還元剤とケージド NO を利用することで、光照射により酵素反応を制御し、反応中間体を捕捉することを計画した。

2 研究方法・研究内容

本課題では、以下に示す 2 点について研究に取り組んだ。

・溶液試料を用いた cNOR の反応中間体の捕捉条件の検討

酸化型 cNOR に光還元剤であるリボフラビンと犠牲試薬として EDTA を加え、紫外可視吸収スペクトル測定用セルに入れた。セル内を窒素置換し、嫌気条件にした後、可視光を照射することで、cNOR が還元可能か検討した。次に、同試料にケージド NO も添加し、可視光照射による光還元後に、紫外光を照射し NO を発生させ、cNOR

による NO 還元反応が進行するかを検討した。また、凍結した試料においても、低温化での光還元が起きるかを ESR スペクトル測定により検討した（低温化でケージド NO の光解離が起こることと、その後、試料の温度を 170 K まで昇温することで、NO が拡散し、cNOR と反応することは、過去の研究で確認している[2]）。

・ cNOR の結晶化条件の最適化

本課題の最終目標は、上述した溶液試料での条件検討を基に、結晶試料でも同様の実験操作により反応中間体を捉え、その構造を決定することにある。良質な cNOR の結晶を再現良く得るために、脂質キュービック相 (LCP) 法を用いた結晶化条件の最適化に取り組んだ。

3 研究成果

・ 溶液試料での実験

酸化型 cNOR にリボフラビンと EDTA を加え、嫌気条件下で可視光照射を行い、可視吸収スペクトルを測定したところ、cNOR が還元されることが確認できた（図 2）。次に、上記試料にケージド NO も加え、はじめに可視光照射で還元型 cNOR を生成し、その後、紫外光照射を行うことで、ケージド NO からの NO と還元型 cNOR が反応するか検討した。その結果、ケージド NO 存在下でも cNOR の還元が確認できたが、ケージド NO から NO を発生させても、可視吸収スペクトルには変化がみられず、cNOR による NO 還元反応が起きていないものと推察された。そこで、光還元電子源となる EDTA の濃度を下げ、同実験を行ったところ、cNOR の光還元後に紫外光照射を行うことで、cNOR が NO と反応したことを示唆する結果が得られた（図 2）。

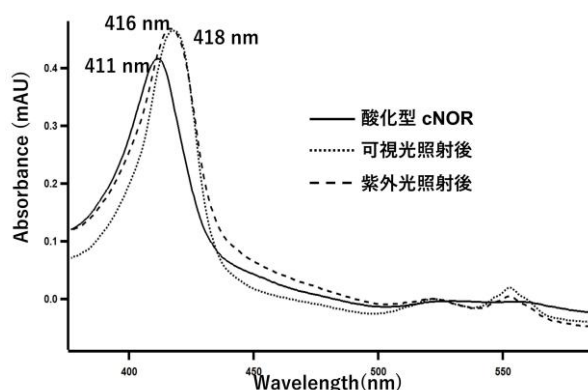


図 2. リボフラビン、EDTA、ケージド NO 存在下での cNOR の可視吸収スペクトル。可視光を照射すると酸化型でみられていた 411 nm の吸収が 418 nm にシフトしており、cNOR が還元されていることがわかった。その後、紫外光を照射すると、吸収ピークが 416 nm にシフトするとともに、550 nm 付近の吸収の減少が見られた。この結果は、還元型 cNOR が NO と反応したことを示唆している。

次に、反応中間体の捕捉を目指し、低温下での光還元の可能性について検討した。酸化型 cNOR にリボフラビンと EDTA を加え、嫌気条件にしたものを凍結し、液体窒素温度で可視光を照射し、光還元が進行するかを ESR スペクトルから検討した結果、可視光照射を行っても酸化型 cNOR のシグナルの減少が確認できず（図 3）、還元反応は進行していないものと考えられた。そこで、試料温度を徐々に昇温させ、cNOR の還元が起こるか調べたが、cNOR の還元は観測できなかった。この結果は、低温下での光照射では、光還元を起こすことができないことが明らかとなった。つまり、今後、光還元剤とケージド NO を利用して、cNOR の反応中間体を捕捉するためには、まず室温で光照射を行い、cNOR を還元し、その後凍結した試料について、低温下で紫外光照射、昇温という過程を経るという方法が有効であると考えられた。

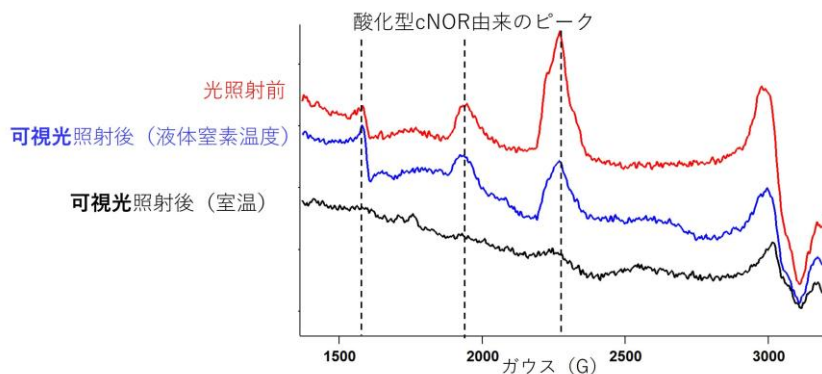


図 3. リボフラビン、EDTA、ケージド NO 存在下での cNOR の ESR スペクトル。液体窒素温度で可視光を照射したが、酸化型 cNOR のシグナルの消失は観測できず、低温下では、光還元が起きないことが示された。また、その後に昇温させて、どれくらいの温度で cNOR の還元が起こるか検討したが、室温でないとも光還元が起きないことが示された。

・結晶化条件の検討

これまでの当研究室での研究結果を基に、1-モノリノレインを利用した LCP 法による結晶化条件の最適化を行った。タンパク質濃度や沈殿剤濃度など、様々な条件を検討した結果、1-モノリノレインと cNOR を混合し、LCP 試料を作成するときの温度、および LCP 試料を作成してから結晶化を行うまでの時間が良質な結晶を得るために重要であることがわかった。図 4 に得られた結晶を示しているが、本研究で結晶化方法を最適化することで、比較的大きな結晶が得られるようになった。また、この結晶を用いて SPring-8 のマイクロフォーカスビームライン (BL32XU) での X 線回折実験を行ったところ、分解能 2.1 Å 程度のデータが得られた (図 4)。図 4 からわかるように、活性部位の構造を決定することが可能な分解能でのデータが得られており、今後の中間体の構造解析に期待がもてる成果が得られたといえる。

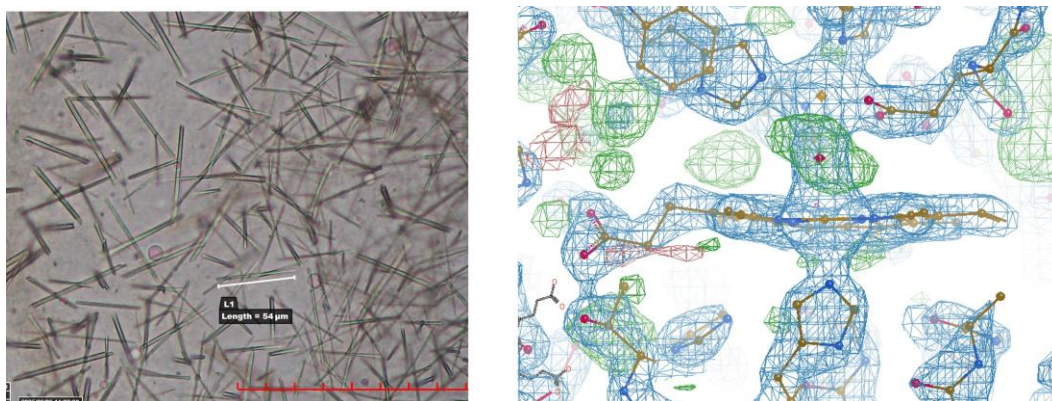


図 4. cNOR の結晶 (左図) と結晶構造解析の結果 (右図)。本課題で条件検討を行った結果、針状で長辺が 50 μm 程度の結晶が得られるようになった。得られた結晶を用いて、SPring-8 のマイクロフォーカスビームラインで X 線回折実験を行い、構造解析を行ったところ、分解能 2.1 Å の構造を得ることができた。

以上、本研究では、目標としていた cNOR 反応中間体の構造解析までには至らなかったが、光還元剤とケージド NO を組み合わせることで、反応中間体が捕捉できる

可能性を示唆できた。今後は、リボフラビン、EDTA およびケージド NO 存在下で cNOR の結晶化を行い、可視光照射による還元、凍結後の紫外光照射と昇温による反応中間体の捕捉と、その構造解析に挑戦する。

4 生活や産業への貢献および波及効果

金属酵素に秘められた高活性の仕組みを紐解くことは、新規触媒開発の設計指針になりうる。本課題をもとに取り組んできた金属酵素反応中間体の捕捉手法がより洗練されれば、金属酵素の反応機構研究の飛躍的な進展が期待でき、触媒設計に貢献するであろう。

研究対象である緑膿菌由来 cNOR は、緑膿菌がヒトに感染し生育する際に必須の酵素であることから、その阻害剤は、抗菌薬として利用できる可能性がある。本研究で反応機構に関する理解が進めば、構造機能を基盤とした新規抗菌薬開発にも期待がもてる。

cNOR の反応生成物である亜酸化窒素 (N_2O) は、強力な温室効果ガスであることが知られている。特に、圃場で利用される窒素系の肥料を微生物が代謝することで発生する N_2O が近年問題となっている。地球上での N_2O の主たる発生源は、NOR の働きであることがわかっており、cNOR の反応機構を理解することで、その反応が人為的に制御できるようになれば、地球温暖化問題の解決の一助になるであろう。

5 参考文献

- [1] Takeda *et al.* *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2020, 825-
- [2] Takeda *et al.* *J. Phys. Chem. B*, 2023, 846-