

呼吸酵素における電子移動とプロトン移動 Proton and Electron Transfer in Respiratory Enzymes

¹理研・放射光科学総合研究センター、²理研・基幹研究所
¹城 宜嗣、¹當舎武彦、¹杉本 宏、²Andrei Pisliakov、²杉田有治

脱窒は硝酸イオンあるいは亜硝酸イオンを基質とする微生物の嫌気呼吸の一種である ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$)。この過程で生じる一酸化窒素 NO は、強い細胞毒性を有するために、微生物は一酸化窒素還元酵素 (Nitric Oxide Reductase; NOR) により、速やかに無毒化している。また、病原性微生物においては、宿主細胞が生体防御のためにマクロファージが産生する NO を、NOR を用いて無毒化している。NOR の触媒反応の活性中心は、ヘム鉄と非ヘム鉄 Fe_B よりなる複核中心であり、これらの鉄に 2 分子の NO が結合する事が、反応の開始となる。我々は最近チトクロム *c* を電子供与体とする cNOR (*Pseudomonas aeruginosa*) とキノールを電子供与体とする qNOR (*Geobutillus stearothermophilus*) の 2 種類の膜結合性 NOR の結晶構造を決定する事に成功した。また、結晶構造を基盤にした分子動力学シミュレーションの結果と合わせて、NOR の触媒反応 ($2\text{NO} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$) において利用されるプロトン H^+ と電子 e^- の供給経路を明らかにした。得られた結果を、呼吸酵素の分子進化の上で、NOR と共通の祖先を有していると考えられている好気呼吸酵素チトクロム酸化酵素 COX のプロトン・電子輸送と比較し、議論する。

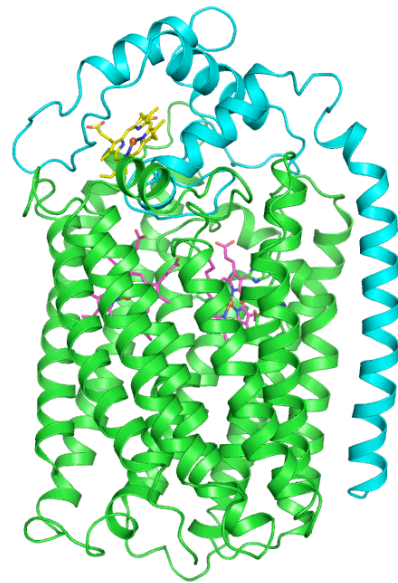


図 1 cNOR の結晶構造

電子伝達 : cNOR の NorC サブユニットに存在するヘム *c* からヘム *b* を経て複核中心にいたる電子伝達経路と、qNOR におけるキノールから複核中心への電子移動経路を図 1 に示した。これらの酸化還元中心の配置は、対応するチトクロム酸化酵素と同じであり、類似の電子伝達経路を利用している事が明らかとなった。しかし、NOR には 2 つのヘム *b* のプロピオン酸をつなぐ位置にカルシウムイオン Ca^{2+} が存在していた。この Ca^{2+} は好気呼吸酵素のチトクロム *cbb*₃ にも発見されており、一方、好気呼吸酵素では 2 つのアルギニン Arg の側鎖 (グアニジル基) が Ca^{2+} の代わりに存在している。

qNOR のキノールと直接コンタクトする残基は、qNOR ではよく保存されており、cNOR や COX では見られない。qNOR においては、NO 還元の触媒反応時、活性中心への電子供与に伴い、プロトンがペリプラズム側に放出される可能性を示唆している。

プロトン移動：cNOR、qNOR 共に、細胞内部（サイトプラズム側）と外部（ペリプラズム側）をつなぐチャネルは存在しなかった、この事は、「NOR はプロトンポンプ機能を有していない」という過去の結果とよく一致した。一方、触媒反応で利用されるプロトンの輸送経路として、cNOR では、ヘム b および b_3 のプロピオン酸側鎖周辺に存在する水分子クラスターとペリプラズム側をつなぐ2つの水素結合ネットワークを見いだした。しかし、qNOR では同様の位置には疎水性のアミノ酸側鎖が存在していた。代わりに、複核中心とサイトプラズム側をつなぐ水チャネルを見いだした。これらの結果は、同じ NO 還元反応を触媒する酵素でありながら、プロトンの供給経路の方向性が全く異なっている事を示している。

qNOR の構造から発見された電子・プロトン移動経路は、NO 還元触媒反応に伴って、サイトプラズム側で H^+ が消費され、ペリプラズム側に H^+ が放出される事を示しており、結果的に細胞をはさんで H^+ の濃度勾配を作り出していることを示している。この結果を確認する為の実験を現在行っている。また、qNOR の水チャネルの位置は、好気ならびに微好気呼吸酵素のプロトンポンプの K-チャネルの位置と一致しており、呼吸酵素のプロトンポンプの原型かもしれない。

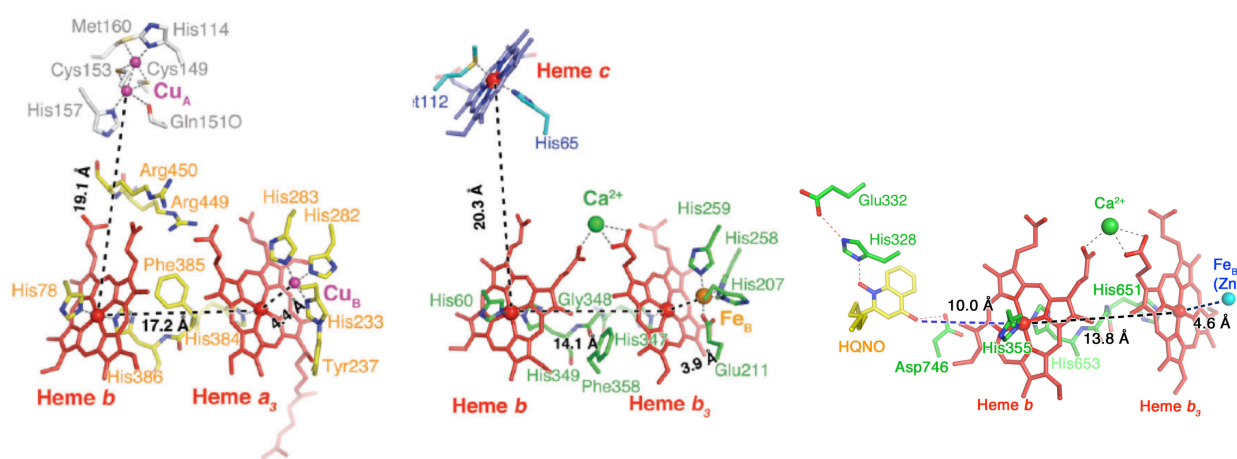


図2 呼吸酵素の酸化還元中心の配置；(左) cyt ba_3 、(中) cNOR、(右) qNOR

T. Hino, Y. Matsumoto, S. Nagano, H. Sugimoto, Y. Fukumori, T. Murata, S. Iwata, Y. Shiro: “Structural Basis of Biological N_2O Generation by Bacterial Nitric Oxide Reductase” *Science* **330**, 1666-1670 (2010)

Y. Matsumoto, T. Tosha, A. V. Pislakov, T. Hino, H. Sugimoto, S. Nagano, Y. Sugita, Y. Shiro: “Crystal Structure of Quinol-Dependent Nitric Oxide Reductase from *Geobacillus stearothermophilus*” *Nat. Strl. Mol. Biol.* (2011) *in press*

A. V. Pislakov, T. Hino, Y. Shiro, Y. Sugita: “Molecular Dynamic Simulations Reveal Proton Transfer Pathways in Cytochrome c -dependent Nitric Oxide Reductase” *submitted for publication*