

博士論文審査報告書

氏名 武田 英恵
学位の種類 博士（理学）
学位記番号 論博理第26号
学位授与報告番号 乙第72号
学位授与年月日 令和2年6月30日
学位授与の要件 学位規則第4条2項
論文題目 NO reduction mechanism of bacterial nitric oxide reductase as established by time-resolved spectroscopies
「時間分解分光法を用いた緑膿菌由来一酸化窒素還元酵素によるNO還元反応機構の研究」

論文審査委員 (主査) 城 宜嗣
(副査) 大岩 和弘
(副査) 阪口 雅郎
(副査) 伊東 忍

(大阪大学大学院工学研究科、教授)

1. 論文内容の要旨

脱窒は、嫌気性細菌の呼吸の一種であり、土中の硝酸塩 (NO_3^-) や亜硝酸塩 (NO_2^-) を逐次還元し、最終生成物として窒素 (N_2) を大気中に放出する、地球上の窒素循環において重要なプロセスである。脱窒において中間生成物として産生される一酸化窒素 (NO) は、細胞毒性が高いことから、脱窒菌は膜結合性の一酸化窒素還元酵素 (nitric oxide reductase: NOR) を有し、NO を速やかに還元し消去している。NOR はその活性中心に、ヘム鉄および非ヘム鉄 (Fe_B) により構成された複核錯体を有し、2 分子の NO を 2 電子と 2 プロトンを使って N_2O へと還元する反応を触媒する ($2\text{NO} + 2e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$)。この反応には N-N 結合の生成および N-O 結合の開裂という化学反応において重要な基本的要素を含んでいることから、武田英恵氏はその基礎化学的な重要性に着目し、その反応機構の詳細を分子・原子のレベルで明らかにすることを目的に研究を進めてきた。

武田氏は、まず、時間分解分光法の確立に取り組んだ。本研究では caged NO と呼ばれる紫外光照射により 2 分子の NO をマイクロ秒 (μs) の時間領域で放出できる化合物を、反応のトリガーと NO 供給源として採用した。さらに、独自に設計したマイクロフローセルを使用することで、測定での試料消費量の軽減に成功した。これらのシステムを組み合わせたフローフラッシュ時間分解可視・赤外吸収分光測定法によりマイクロ秒の時間分解能での反応追跡を実現した。その結果、NO 還元反応は、2 種類の短寿命反応中間体が生成する、数 μs 、 $\sim 100 \mu\text{s}$ 、数ミリ秒 (ms) の 3 段階の反応

により進行しすることを示し、一分子目の NO が第一相で活性中心に結合し、第三相において二分子目の NO と電子、プロトンが一気に供給され、N₂O が生成することを明らかにした。

次に、第一相目に生成される反応中間体（中間体 1）の配位構造と電子状態の決定のために caged NO の低温光解離を利用した EPR 分光法および時間分解赤外分光測定に取り組んだ。EPR 分光測定において $g = 4.13$ と 3.94 にシグナルを観測し、時間分解赤外吸収分光測定において反応開始 10 μs において 1683 cm^{-1} の $\nu(\text{NO})$ バンドを観測したことから、中間体 1 において 1 分子の NO は Fe_B に配位結合し、その O 原子はヘム鉄に相互作用していることが明らかにした。武田氏は、以上の各種分光測定を用いた研究から、今までの提案とは異なる、世界で初めての NOR による NO 還元反応の分子機構を提唱した。本論文の主要部分は、*Bull. Chem. Soc. J* に掲載予定である (<https://doi.org/10.1246/bcsj.20200038>)。

2. 論文審査結果

脱窒菌 NOR による NO 還元反応に関して、従来から 3 種類の反応機構が考えられており、そのいずれかであるかは確立していなかった。その原因は、反応がミリ秒以内に終了してしまうことと、NOR が膜結合酵素であることから分光測定のように多量の試料を必要とする測定に適さなかったためである。武田氏は、caged NO を使うこととマイクロフローセルを使うことで、これらの問題を解決した。武田氏はこれらを活用した時間分解可視・赤外・ESR 分光の結果を基に、「2 分子の NO が 3 段階の反応で段階的に活性中心に結合し、第三相でプロトン、電子と反応して N₂O を生成する」という、従来の反応機構とは全く異なる NOR 反応の分子機構を提案した。NOR は好気呼吸酵素チトクロム *c* 酸化酵素と同じスーパーファミリーに属するが、この成果により両酵素の反応機構には共通性が高いことが明らかとなり、呼吸酵素の分子進化を考える上で非常に興味深い。

本研究は、酵素反応機構を詳細に明らかにするという基礎科学的な側面だけでなく、NOR 反応の生成物 N₂O が温暖化能を有する温室効果ガスであること（環境科学）、さらに病原菌が NOR を有し、宿主が産生する抗菌ガス NO の無毒化に用いていること（医科学）などから、これらの分野における貢献も大きい。さらに、本研究で確立した時間分解分光法の技術は NOR だけでなく他の金属酵素や光反応性タンパク質の研究への応用も期待できる。

よって本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、2020 年 4 月 29 日に論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

博士論文審査報告書

論文題目 : NO reduction mechanism of bacterial nitric oxide reductase as established by time-resolved spectroscopies

「時間分解分光法を用いた緑膿菌由来一酸化窒素還元酵素による NO 還元反応機構の研究」

申請者 : 武田 英恵

1. 論文内容の要旨

脱窒は、嫌気性細菌の呼吸の一種であり、土中の硝酸塩 (NO_3^-) や亜硝酸塩 (NO_2^-) を逐次還元し、最終生成物として窒素 (N_2) を大気中に放出する、地球上の窒素循環において重要なプロセスである。脱窒において中間生成物として産生される一酸化窒素 (NO) は、細胞毒性が高いことから、脱窒菌は膜結合性の一酸化窒素還元酵素 (nitric oxide reductase: NOR) を有し、NO を速やかに還元し消去している。NOR はその活性中心に、ヘム鉄および非ヘム鉄 (Fe_B) により構成された複核錯体を有し、2 分子の NO を 2 電子と 2 プロトンを使って N_2O へと還元する反応を触媒する ($2\text{NO} + 2e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$)。この反応には N-N 結合の生成および N-O 結合の開裂という化学反応において重要な基本的要素を含んでいることから、武田英恵氏はその基礎化学的な重要性に着目し、その反応機構の詳細を分子・原子のレベルで明らかにすることを目的に研究を進めてきた。

武田氏は、まず、時間分解分光法の確立に取り組んだ。本研究では caged NO と呼ばれる紫外光照射により 2 分子の NO をマイクロ秒 (μs) の時間領域で放出できる化合物を、反応のトリガーと NO 供給源として採用した。さらに、独自に設計したマイクロフローセルを使用することで、測定での試料消費量の軽減に成功した。これらのシステムを組み合わせたフローフラッシュ時間分解可視・赤外吸収分光測定法によりマイクロ秒の時間分解能での反応追跡を実現した。その結果、NO 還元反応は、2 種類の短寿命反応中間体が生成する、数 μs 、 $\sim 100 \mu\text{s}$ 、数ミリ秒 (ms) の 3 段階の反応により進行することを示し、一分子目の NO が第一相で活性中心に結合し、第三相において二分子目の NO と電子、プロトンが一気に供給され、 N_2O が生成することを明らかにした。

次に、第一相目に生成される反応中間体 (中間体 1) の配位構造と電子状態の決定のために caged NO の低温光解離を利用した EPR 分光法および時間分解赤外分光測定に取り組んだ。EPR 分光測定において $g = 4.13$ と 3.94 にシグナルを観測し、時間分解赤外吸収分光測定において反応開始 $10 \mu\text{s}$ において 1683 cm^{-1} の $\nu(\text{NO})$ バンドを観測したことから、中間体 1 において 1 分子の NO は Fe_B に配位結合し、その O 原子はヘム鉄に相互作用していることを明らかにした。武田氏は、以上の各種分光測定を用いた研究から、今までの提案とは異なる、世界で初めての NOR による NO 還元反応の分

子機構を提唱した。本論文の主要部分は、*Bull. Chem. Soc. J* に掲載予定である (<https://doi.org/10.1246/bcsj.20200038>)。

2. 論文審査結果

脱窒菌 NOR による NO 還元反応に関して、従来から 3 種類の反応機構が考えられており、そのいずれかであるかは確立していなかった。その原因は、反応がミリ秒以内に終了してしまうことと、NOR が膜結合酵素であることから分光測定のように多量の試料を必要とする測定に適さなかったためである。武田氏は、caged NO を使うこととマイクロフローセルを使うことで、これらの問題を解決した。武田氏はこれらを活用した時間分解可視・赤外・ESR 分光の結果を基に、「2 分子の NO が 3 段階の反応で段階的に活性中心に結合し、第三相でプロトン、電子と反応して N₂O を生成する」という、従来の反応機構とは全く異なる NOR 反応の分子機構を提案した。NOR は好気呼吸酵素チトクロム c 酸化酵素と同じスーパーファミリーに属するが、この成果により両酵素の反応機構には共通性が高いことが明らかとなり、呼吸酵素の分子進化を考える上で非常に興味深い。

本研究は、酵素反応機構を詳細に明らかにするという基礎科学的な側面だけでなく、NOR 反応の生成物 N₂O が温暖化能を有する温室効果ガスであること（環境科学）、さらに病原菌が NOR を有し、宿主が産生する抗菌ガス NO の無毒化に用いていること（医科学）などから、これらの分野における貢献も大きい。さらに、本研究で確立した時間分解分光法の技術は NOR だけでなく他の金属酵素や光反応性タンパク質の研究への応用も期待できる。

よって本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、2020 年 4 月 29 日に論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

主査：城 宜嗣



副査：大岩 和弘



：阪口 雅郎



：伊東 忍



(大阪大学大学院工学研究科、教授)