

一酸化窒素合成酵素の制御機構における di-flavin 還元酵素ファミリーの役割

井 柳 堯

di-flavin 還元酵素ファミリーは NAD(P)H に対する脱水素作用と一電子伝達体の二つの機能を兼ね備えた一群のフラビン酵素である。代表的なメンバーである NADPH-シトクロム P450 還元酵素 (P450 還元酵素) の FAD は NADPH に対して脱水素酵素として機能し、一方 FMN は一電子伝達体としてシトクロム P450 (P450) に電子を供給する。一酸化窒素合成酵素 (NOS) には P450 還元酵素と類似した機能をもつ還元酵素ドメインが存在し、カルモジュリンにより NADPH からヘムを含む酸化酵素ドメインへの電子伝達が制御されている。この二つの酵素系の還元酵素ドメインは電子伝達に伴い大きな構造変化を伴う。NOS は還元酵素ドメインの構造変化という動的なファクターを、この電子伝達の制御機構に取り入れている。また、NOS の還元酵素ドメインはアイソフォーム間で異なる制御を受けている。最近、筆者らは誘導型 NOS の FMN ドメインとカルモジュリンとの複合体の構造を明らかにしたことにより、これらの情報を基に NOS の全構造をモデリングすることが可能となってきた。本総説では、P450 還元酵素と NOS の電子伝達機構を比較検討し、NOS の電子伝達の制御機構における di-flavin 還元酵素ファミリーの役割についてそれらの構造を基盤に考察したい。

1. はじめに

フラビン (ビタミン B₂) を補酵素とするタンパク質は、ゲノム上にコードされている全体のおよそ 2~3% を占め最も多いものの一つである^{1,2)}。フラビン酵素は多様な生理機能をもつことが知られているが、主な機能としてミトコンドリア³⁾やマイクロソーム⁴⁾の電子伝達系の補酵素として、二電子系電子供与体である NAD(P)H から一電子受容体への変換体として働いている。一方、植物の光合成の電子伝達系においては、一電子系のフェレドキシン (Fd) から

フェレドキシン-NADP⁺還元酵素 (FNR) をへて二電子系の NADP⁺の還元機能している⁵⁾。しかし、シアノバクテリアなどのラン色細菌においては、鉄濃度が低い生育環境下では鉄硫黄 [2Fe-2S] クラスタをもつ Fd が、機能の上で FMN を補酵素とするフラボドキシン (Fld) と置き換わることができる^{6,7)}。



最近、NADPH-シトクロム P450 還元酵素 (P450 還元酵素)⁸⁾に代表されるように一分子中に FAD と FMN の二つのフラビンを含む、di-flavin 還元酵素ファミリーが見いだされてきている。これらの酵素の FAD は NAD(P)H の脱水素酵素として、一方、FMN は一電子伝達体として機能している。補酵素として FAD と FMN が結合するドメインはそれぞれが明確に区別され、FAD ドメインは植物の FNR に、一方 FMN ドメインはバクテリアの Fld に由来し、これらと酵素が融合したものである⁹⁻¹¹⁾。一方、一酸化窒素合成酵素 (NOS) は NADPH, FAD, FMN 結合部位を含む還元酵素ドメインとアルギニン (Arg)、テトラ

姫路工業大学 (現兵庫県立大学) 名誉教授, 生命理学研究科 (〒679-5165 兵庫県たつの市新宮町光都 2-1-10)

The role of di-flavin reductase family in the regulation of nitric oxide synthase

Takashi Iyanagi (Department of Life Science, Himeji Institute of Technology, University of Hyogo, 3-2-1 Kouto, Kamigohri, Akoh, Hyogo 678-1297, Japan)

投稿受付: 平成 22 年 9 月 7 日

ヒドロビオプテリン (H₂B), ヘム結合部位を含む酸化酵素ドメインがカルモジュリン (CaM) 結合配列により繋がれた融合酵素である。その還元酵素ドメインは P450 還元酵素と構造と機能の上で類似している^{8,12)}。しかし、還元酵素ドメイン内には P450 還元酵素にはない新たな配列が存在し、これらの配列と共役して、CaM により電子伝達が制御されている^{13,14)}。NOS には三つのアイソフォームが知られているが、これらは共通して NADPH と分子状酸素 (O₂) の存在下、L-アルギニン (L-Arg) を酸化して不対電子をもつ一酸化窒素 (NO) を産生する¹³⁾。NO は、情報の伝達、血圧の調節、免疫応答などの多彩な生理機能をもつことが知られている¹⁵⁾。血管内皮細胞においては二次メッセンジャーとしてグアニル酸シクラーゼのヘムに結合することにより、GTP を cGMP に変換し平滑筋を弛緩させる働きをしている。

NOS はマルチ補酵素、マルチドメイン酵素であることから、還元酵素ドメインと酸化酵素ドメインに分離した系を用いて研究が進められている。ヘムを含む酸化酵素ドメインはその構造から P450 に分類できないが、フラビンを含む還元酵素ドメインは進化の過程において大きな構造変化を受けることなく保存されている。最近、P450 還元酵素の FAD と FMN ドメインは P450 への電子移行の過程において、動的な構造変化を伴うことが明らかにされてきており^{16~19)}、NOS アイソフォームにおける還元酵素ドメインの構造変化が注目されている²⁰⁾。本総説では P450 還元酵素と NOS の還元酵素ドメインの構造と機能を比較検討し、電子伝達における di-flavin 還元酵素の制御のメカニズムを、最近の構造に関する知見を踏まえて考察したい。本誌には、すでに NOS に関する優れた総説が佐上らにより掲載されているので合わせて参照されたい²¹⁾。

2. di-flavin 還元酵素ファミリー

NAD(P)H を電子供与体として、特に物質代謝に関連した電子伝達系は NAD(P)H からの電子を受容する脱水素機能をもつフラビン、一電子伝達体、電子受容体の順に電子伝達が起こる^{4,22)}。基本的には、この三つの構成成分とそれらの機能を必要とする (図 1)。di-flavin 還元酵素ファミリーは一分子中に FAD と FMN を含み、脱水素作用と一電子伝達体の両者の機能を兼ね備えた一群のタンパク質である。FAD 結合ドメインは植物の FNR と、一方、FMN 結合ドメインはバクテリアの Fld とアミノ酸配列の上で高い相同性を示し、類似した構造と機能をもつことが知られている⁹⁾。電子伝達も基本的には共通した機構により行われている。これらの条件を満たした 6 種類の酵素がこれまでに報告されている。真核生物では P450 還元酵素^{8~11,23)}、NOS の還元酵素ドメイン^{12~14)}、メチオニン合成酵素の還元酵素系^{24,25)}、novel oxidoreductase²⁶⁾、一方、原核生物ではフ

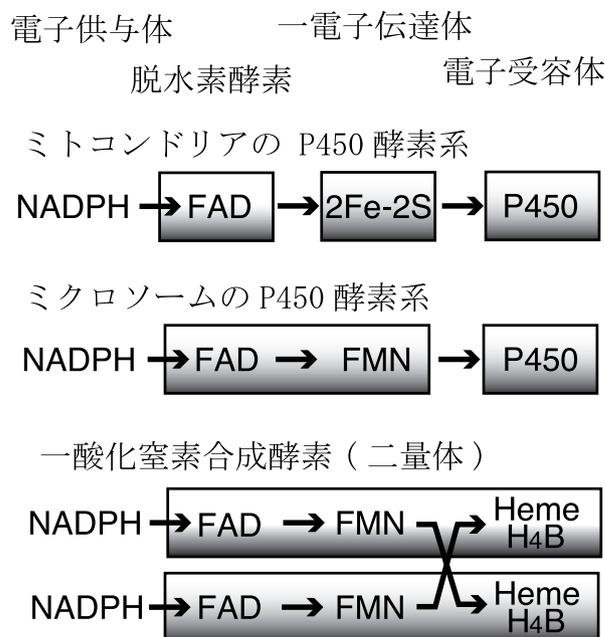


図 1 電子伝達経路

P450 を含む電子伝達系はミトコンドリアとミクロソームで異なる。ミトコンドリアにおいては非ヘム鉄 (2Fe-2S) が一電子伝達体として、一方ミクロソームにおいては FMN が一電子伝達体として機能している。一酸化窒素合成酵素においても、FMN が一電子伝達体として機能している。

ラビンシトクロム P450BM3 (P450BM3) の還元酵素ドメイン^{27,28)}、サルファイト還元酵素系の α サブユニット²⁹⁾ が知られている。メチオニン合成酵素系はバクテリアにも存在し、還元酵素系として NADPH-フラボドキシ還元酵素と Fld を含む三成分系から構成されている³⁰⁾。バクテリアの NO 合成系も、後述するように三成分系から構成されている³¹⁾。哺乳類の P450 を含む電子伝達系はミトコンドリアとミクロソームに局在し (図 1)、前者は還元系として FAD を補酵素とする NADPH-アドレノドキシ還元酵素、鉄-硫黄 [2Fe-2S] クラスタをもつアドレノドキシおよび P450 からなる三成分系^{32,33)} であるが、後者は P450 還元酵素と P450 からなる二成分系である⁸⁾。FNR は植物型とグルタチオン還元酵素型に分類されているが^{22,34)}、P450 還元酵素の FAD ドメインは前者のタイプに分類され、一方、NADPH-アドレノドキシ還元酵素は後者のタイプに分類される。FNR はスーパーファミリーを形成していることから、di-flavin 還元酵素ファミリーもこのグループに分類することが可能である。

二つのフラビンを含む di-flavin ファミリーは比較的小さなものであるが、電子伝達系タンパク質としてユニークな働きをしている。まず、FNR のパートナーとして Fd ではなく Fld が選択されたことである。この理由として、(i) FNR と Fld との親和性は Fd よりも低い。このことはドメイン間の動きがスムーズになる役割を担っている。(ii) Fld

に結合している FMN 分子の一部がタンパク質から溶媒側に露出しているのに対して、Fd の鉄-硫黄 [2Fe-2S] クラスタはタンパク質に埋もれている。このことにより Fld は Fd よりも電子の授受が容易である。(iii) FNR と Fld に含まれている活性中心の FAD と FMN の間の距離はそれらの複合体のモデリング³⁵⁾から約 4Å と予測されており、一方 FNR の FAD と Fd の鉄-硫黄 [2Fe-2S] クラスタの間の距離はそれらの複合体の X 線結晶構造解析³⁶⁾から 7.6 Å と決められている。活性中心の間の距離は前者の方が短い。これらのことから大胆な推論ではあるが、タンパク質間の電子の授受には、Fld の方が Fd よりも優れているものと考えられる。

哺乳類の P450 還元酵素は一つの遺伝子によってコードされていることから³⁷⁾、ミクロソーム型 P450 アイソフォーム (約 50 種類) の全てに電子を供給することのできる大変ユニークな電子供給系である。さらに、P450 還元酵素の FMN ドメインは電子受容体として P450 以外にも、シトクロム *b₅* (cyt *b₅*)、ヘムオキシゲナーゼ、スクワレンモノオキシゲナーゼ、7-デヒドロコレステロール還元酵素などにも電子を供与することができる。したがって、P450 還元酵素の異常は薬物代謝、ヘム代謝、ステロイドホルモンの合成などの異常を同時に引き起こす⁴⁾。P450 還元酵素はステロイドホルモンの合成に関与している P450c17 (17 位水酸化酵素/17,20-リアーゼ)、P450c21 (21 位水酸化酵素)、P450arom (アロマターゼ) に電子を供給している。Antley-Bixler 症候群³⁸⁾は、P450 還元酵素遺伝子のミスセンス変異によるアミノ酸の置換によるステロイドホルモン合成活性の低下によって引き起こされる。

P450 還元酵素に対して、一成分系としての NOS には三つのアイソフォームが知られており¹²⁻¹⁵⁾、それぞれの還元酵素ドメイン内には、次の章で述べるように P450 還元酵素にはない制御配列が挿入されていることによりドメイン間の動きが制約されているが、CaM の結合によりその制約が解除される。CaM はいろいろの細胞調節系に関与しているが、酸化還元酵素系に関与している例は大変めずらしい。

3. P450 還元酵素と NOS 還元酵素ドメインの構造

P450 還元酵素の FAD/NADPH と FMN が結合する二つのドメインは、両者をつなぐ結合ドメイン (CD) と柔軟性のあるヒンジ (H) 配列 (~15 アミノ酸残基) によってつながれている^{11,16)}。そのアミノ末端 (N 末端) 側には疎水性の膜結合領域 (TM) が存在し、そのアセチル化された N 末端を内腔側に、一方フラビンを含むカルボキシル末端 (C 末端) 側を細胞質に向けて小胞体膜に結合している^{10,39)}。N 末端側には FMN 結合ドメインが、C 末端側には FAD/NADPH が結合するドメインが配置されている (図

2A)。この C 末端側の FNR 由来の FAD/NADPH ドメインは NADPH と FAD が結合する二つのサブドメインから構成されている。

一方、NOS は一成分系として NADPH と分子状酸素の存在下 L-Arg を酸化して一酸化窒素 (NO) とシトルリン (Cit) を合成する。基質としてのアルギニン (L-Arg) と酸素分子 (O₂) を活性化する酸化酵素ドメインと、それらに電子を供給する二つのフラビンを含む還元酵素ドメインから構成されており、両者は CaM 結合配列 (~30 アミノ酸残基) によって繋がれている¹²⁻¹⁴⁾ (図 2B)。NOS には神経型 (neuronal NOS, nNOS, NOS I)、誘導型 (inducible NOS, iNOS, NOS II) および血管内皮型 (endothelial NOS, eNOS, NOS III) の三つのアイソフォームが知られている¹⁵⁾。それらの NO 合成活性は異なっており、また異なる発現調節を受けている。これらの還元酵素ドメインの構造は P450 還元酵素と非常に良く類似しているが、FAD ドメイン内に β フィンガー (βF) 配列 (~10 アミノ酸残基)、FMN ドメイン内にヘリックス構造をもつ自己阻害 (autoinhibitory, AI) 配列 (~45 アミノ酸残基)、C 末端側に P450 還元酵素より長いヘリックス構造をもつ C 末端 (CT) 配列 (~21-42 アミノ酸残基) などの制御配列が挿入されている。しかし、iNOS は AI 配列をもたず、また nNOS および eNOS に比較して βF と CT 配列は比較的短い。これらの点から iNOS の還元酵素ドメインは P450 還元酵素に比較的類似しているといえる。また iNOS には Ca²⁺/CaM が強く結合しており、常に活性型となっている。したがって、iNOS による NO 合成は Ca²⁺ 濃度には依存せず、主にその制御は転写レベルで行われている。それに対して、常に発現している構成型の nNOS と eNOS は細胞内 Ca²⁺ 濃度に依存して CaM により NO 合成が制御されている。

4. 還元酵素ドメインの酸化還元反応

この章では di-flavin 還元酵素ファミリーの補酵素としてのフラビンの酸化還元反応について概説する。フラビンは酸化型 (F_{ox})、セミキノン型 (F_{sq})、還元型 (F_{red}) の三つの電子状態をとることが知られている (図 3)。NAD(P)H から最終電子受容体への電子移動過程には二電子および一電子反応が含まれていることから、この三つのフラビンの電子状態とそれらの酸化還元電位が反応サイクルにおいて重要な役割を果たしている。

4-1. フラビンの酸化還元電位⁴⁰⁾

フラビンは全体として二電子の授受をする酸化還元分子であるが、不対電子をもつセミキノン型を経由することにより一電子反応を可能にしている。

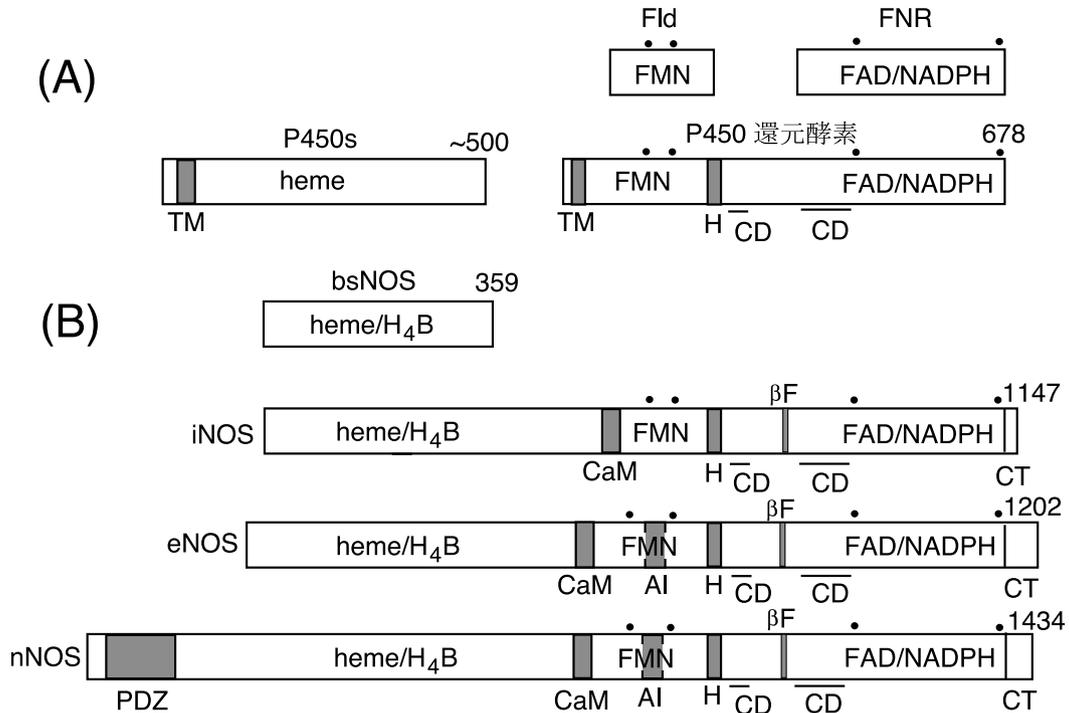


図2 P450還元酵素とNOSのドメイン構造の比較

A) P450還元酵素, P450, フラボドキシ (Fld), およびフェレドキシ還元酵素 (FNR) のドメイン構造を示す. B) バクテリア型 bsNOS (*Bacillus subtilis* NOS) および誘導型 NOS (iNOS), 構成型 NOS (eNOS, nNOS) のドメイン構造を示す. A), B) ドットはFADおよびFMN周辺に保存されている芳香族アミノ酸の位置を示す (図5Cと5Dを参照). TM: 膜結合ドメイン, heme: ヘム, H₄B: テトラヒドロビオプテリン, CD: 結合ドメイン (下線にて示した), H: ヒンジ領域, CaM: カルモジュリン結合領域, AI: 自己阻害配列, βF: βフィンガー, CT: C末端配列, PDZ: PDZドメイン. 各ドメインの右側の数字はアミノ酸の数を示す.

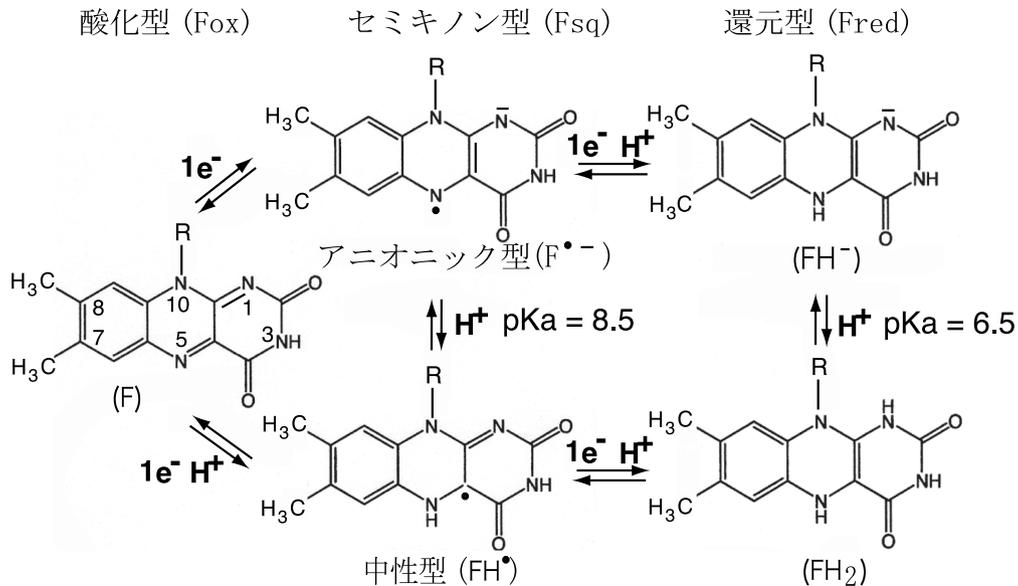


図3 フラビンの酸化還元状態

FADおよびFMNは電子伝達系において酸化型, 不対電子をもつセキノン型および還元型が機能している.



ここで、 $E_{ox/sq}(E_1)$ と $E_{sq/red}(E_2)$ は、それぞれ酸化型 (F_{ox})/セミキノン型 (F_{sq}) とセミキノン型 (F_{sq})/還元型 (F_{red}) 系の一電子還元電位と定義する。

酸化型 (F_{ox}) と還元型 (F_{red}) からのセミキノン型 (F_{sq}) の生成および消滅の間に次の平衡式



が成立すると仮定すると、セミキノンの生成定数 (K_s) は次の式で与えられる。

$$K_s = \frac{(F_{sq})^2}{(F_{ox})(F_{red})} \quad (3)$$

一電子還元電位 ($E_{ox/sq}$, $E_{sq/red}$) とセミキノンの生成定数 (K_s) との間に次の関係式が成立する。

$$E_{ox/sq} = E_m + \frac{RT}{2F} \ln K_s \quad (4)$$

$$E_{sq/red} = E_m - \frac{RT}{2F} \ln K_s \quad (5)$$

4式と5式より $E_{ox/sq}(E_1)$ と $E_{sq/red}(E_2)$ の間の電位差は、

$$E_{ox/sq}(E_1) - E_{sq/red}(E_2) = \frac{RT}{F} \ln K_s \quad (6)$$

と表される。ここで $E_m(F_{ox}/F_{red})$ は標準還元電位である。生化学では $pH=7$ の値が使用されている。R は気体定数、T は絶対温度、F は Faraday 定数である。

一電子の還元電位、 $E_{ox/sq}$ と $E_{sq/red}$ は K_s と E_m を用いて4と5式あるいは6式から求められる。また、4~6式においては、 $E_{ox/sq}$ と $E_{sq/red}$ が K_s に依存していることを示している。 K_s がゼロであればセミキノンは生成しない。 K_s が $1 > K_s > 0$ であれば $E_{sq/red}(E_2) > E_{ox/sq}(E_1)$ となる。 $K_s=1$ であれば $E_{ox/sq}(E_1)$ と $E_{sq/red}(E_2)$ は一致する。 K_s が $K_s > 1$ であれば $E_{ox/sq}(E_1) > E_{sq/red}(E_2)$ となる。

4と5式から標準還元電位、 $E_m(E_{ox/red})$ は一電子還元電位、 $E_{ox/sq}(E_1)$ と $E_{sq/red}(E_2)$ の相加平均として示される。

$$E_m = \frac{E_{ox/sq} + E_{sq/red}}{2} \quad (7)$$

遊離フラビンのセミキノンは非常に不安定(短寿命)である。この一電子還元電位 (F/F^\bullet) は、一電子還元電位が既知の化合物を基準として求めることができる。たとえば、duroquinone, DQ ($DQ/DQ^\bullet = -247\text{mV}$) と FMN の両者を含む系にパルスラジオリシス法より発生させた水和電子 (e_{aq}^-) により一電子還元すると (8式)、9式に示す酸化還元系が両者の一電子酸化還元電位に依存して非常に短い時間内 (マイクロ秒) において平衡に達する⁴¹⁾。



F/F^\bullet と DQ/DQ^\bullet の一電子還元電位の差は9式の平衡定数、 K と次式によって関係づけられる。

$$E_{ox/sq}(DQ/DQ^\bullet) - E_{ox/sq}(F/F^\bullet) = \frac{RT}{F} \ln K \quad (10)$$

したがって、実測された K の値と既知の一電子還元電位 (DQ/DQ^\bullet) の値を用いて10式から FMN の $E_{ox/sq}$ は -314mV と決められている⁴¹⁾。一方 FMN の $E_{sq/red}$ は E_m (-219mV) と7式から -124mV と算出される。また、FMN のセミキノン生成定数 (K_s) は4と5式あるいは6式から 6.03×10^{-4} と算出される。FAD においてもこれらのパラメータはほとんど同じである。また、9式の平衡定数 (K) はこの反応の正逆の速度定数の比 ($K = k_{-1}/k_1$) として置き換えることができることから、速度論的に10式を用いて一電子の酸化還元電位を測定することが可能である⁴²⁾。

電子供与体である NAD(P)H の標準酸化還元電位、 E_m ($NAD(P)^+/NAD(P)H$) は -320mV である。一電子還元電位、 $E_1(NAD(P)^+/NAD(P)^\bullet)$ と $E_2(NAD(P)^\bullet/NAD(P)H)$ はパルスラジオリシス法により、それぞれ -922mV と $+282\text{mV}$ とに決められている⁴³⁾。しかし、タンパク質に結合した FAD の NAD(P)H による還元は一電子移動によるものではなく直接のヒドリドイオン (H^- , プロトンと二つの電子) の移動による。一方、FNR の Fd あるいは Fld による還元は、連続した一電子反応により二電子還元を受けた FAD から酸化型 $NADP^+$ にヒドリドイオン (H^-) の移動が起こり還元型 NADPH を生ずる。二つのフラビンの間の電子授受、および FMN からヘムへの電子移動は一電子反応によって行われる。P450 還元酵素に結合している二つのフラビンのセミキノン状態は非常に安定である。これらの一電子還元電位は電位差滴定法によって測定されている⁴⁴⁾。この方法により di-flavin ファミリーのフラビンの一電子還元電位が以下に述べるように決められている。

4-2. 還元酵素ドメインの酸化還元電位

補酵素としてのフラビンのタンパク質との結合の強さはその結合の性質およびフラビン周辺の構造によって影響されるので、タンパク質に結合した状態では異なる電位を生ずる。したがって、個々のフラビタンパク質のもつ酸化還元電位はその酵素の機能を反映しているといえる。遊離フラビンの酸化還元電位についての関係式、1~10はフラビタンパク質にも適応される。電子伝達系に関与するフラビタンパク質の電子移動は電子供与体と電子受容体との反応である。一般に、還元剤である電子供与体は電子を放出しやすい低い酸化還元電位をもち、電子受容体は酸化剤として電子を受け入れるべく、より高い酸化還元電位を

もっている。酸還元電位は電子移動の方向を決める重要なファクターである。

di-flavin 還元酵素ファミリーの基本構造は Fld と FNR である (図 5)。Fld は α/β ドメイン構造 (5本の β ストランドからなる β シートの両側に α ヘリックスをもつ) からなる FMN を含んだ比較的分子量の一電子伝達体である。その一電子還元電位は種々のバクテリアから単離され詳細に解析されている^{45,46}。セミキノンの生成定数 (K_s) は 1 より大きく、 $E_{ox/sq}(E_1)$ の値はおおよそ -50mV から -260mV の範囲にあるが、 $E_{sq/red}(E_2)$ の値はおおよそ -400mV と低い値を示す。 $E_{sq/red}(E_2)$ は $E_{ox/sq}(E_1)$ より低い一電子還元電位を示すのが特徴である。両者の電位の開きは大きく、セミキノン型が安定化されていることから還元型が高い反応性をもつ。このことにより、FMN は還元型とセミキノン型をシャトルすることにより低い電位をもつ Fd (-412mV) と同じように一電子伝達体として機能することができる。中性セミキノンの安定化は、タンパク質に結合した FMN の N5 の pKa 値が遊離 FMN の 8.5 より大きくなることによる。また、 $E_{sq/red}(E_2)$ の値は N5 近傍のアミノ酸配列により大きく影響を受ける^{45,46}。

FNR は NAD(P)H と Fd あるいは Fld の間の可逆的な電子移行反応を触媒する。植物酵素の $E_{ox/sq}(E_1)$ と $E_{sq/red}(E_2)$ の値はそれぞれ -350mV と -335mV である⁴⁷。したがって、セミキノン生成定数 (K_s) の値は 0.55 と見積もられ、 E_m の値は -342mV となる。電位の開きは 15mV と比較的狭い。このことが、二電子系から一電子系、その逆の一電子系から二電子系への可逆的な電子移動反応を可能にしている。バクテリアの FAD を補酵素とする NADPH-フラボドキシ還元酵素と植物の FNR の間のアミノ酸配列の同一性は 17% と低いが、それらの構造はお互いに良く似ている⁴⁸。この酵素の電位、 $E_{ox/sq}(E_1)$ と $E_{sq/red}(E_2)$ の値はそれぞれ -308mV と -268mV である⁴⁹。FNR と同様に $E_{sq/red}(E_2)$ は $E_{ox/sq}(E_1)$ より高い一電子還元電位を示す。

一方、P450 還元酵素の FAD の電位の開きは比較的大きく、セミキノン生成定数 (K_s) の値は FNR や NADPH-フラボドキシ還元酵素とは異なり 1 より大きい⁴⁴。それぞれの一電子還元電位の値は -290mV ($E_{ox/sq}$) と -365mV ($E_{sq/red}$) である。P450 還元酵素の FAD ドメインの構造は FNR とよく似ているが、電位の上からは異なっている。一方、FMN の電位は、Fld と同じようにセミキノン生成定数 (K_s) は 1 より大きく、それぞれの電位は -110mV ($E_{ox/sq}$) と -270mV ($E_{sq/red}$) である。両フラビンのセミキノン種は中性型 (FADH^\bullet と FMNH^\bullet) であり、 E_m の値は FMN のほうが FAD より高い (図 4A)。電子は低い電位から高い電位に流れることから、NADPH (-320mV) から FAD、FAD から FMN への電子の移動が起こり易くなっている。P450 還元酵素の電位は脂質との相互作用により P450 に電子を

渡し易くなるように変動することが報告されている⁵⁰。NOS アイソフォームの還元酵素ドメインの FAD および FMN の電位は、基本的には P450 還元酵素と類似しており、FMN が一電子伝達体として酸化酵素ドメインのヘムに電子を供給している^{51,52}。また、それらの電位は CaM の結合による影響を受けない。

メチオニン合成酵素の還元酵素系⁵³、novel oxidoreductase⁵⁴、サルファイト還元酵素系の α サブユニット⁵⁵ についても P450 還元酵素と類似した電位が報告されている。これらの系においても、FAD は脱水素酵素として、一方 FMN は一電子伝達体として機能している。di-flavin 還元酵素ファミリーにおいては、FMN の N5 の位置にグリシンの主鎖のカルボニル基が水素結合することにより、中性セミキノン (FMNH^\bullet) 型が安定化されている。しかし、NOS に類似した一成分系の二量体構造をもつ P450BM3⁵⁶ においては、この位置に相当するグリシン (Gly537) が欠失していることから、ここに位置するアスパラギン (Asn 537) の主鎖のアミドグループが N5 と水素結合している。このことによりセミキノンはプロトンの解離したアニオン型 ($\text{FMN}^{\bullet-}$) 型となる。この酵素の $E_{ox/sq}$ と $E_{sq/red}$ の値はそれぞれ -206mV と -177mV である。この欠失している位置にグリシンを挿入すると $E_{ox/sq}$ と $E_{sq/red}$ の値はそれぞれ -198mV と -245mV とに変化し、各々の一電子還元電位の値は逆転する。ここで挿入されたグリシン (Gly537) はフラビンの N5 との間に水素結合を形成し、中性セミキノン (FMNH^\bullet) が安定化されるようになるが、Fld に見られるような大きな電位の開きは観測されない。逆に、nNOS の FMN (N5) との間に水素結合を形成している Gly 810 を欠失すると、 $E_{ox/sq}/E_{sq/red}$ の値はそれぞれ $-179\text{mV}/-314\text{mV}$ から $-280\text{mV}/-190\text{mV}$ に変化し、セミキノンは中性型からアニオン型に変わる⁵⁷。この変異体による非生理的電子受容体であるシトクロム *c* (cyt *c*) の還元活性は CaM の有無により変わらず、両者は野生型に近い値を示す。NO 合成活性も CaM の有無により変わらなかったが、その値はそれぞれ野生型の 5% にまで低下していた。P450BM3 は P450 の系や NOS よりも高い酵素活性を示すことから、NOS からグリシン (Gly810) を削除することにより高い活性をもつ酵素に変換することができるものと期待されたが、FMN セミキノンからアニオン型に変換するだけでは酵素活性に大きな変化はみられない。一方、P450BM3 においてはグリシンの挿入によりある程度の活性の低下が観測されたが著しい減少はみられない。P450BM3 と NOS における酵素活性の著しい違いは一つのアミノ酸によるものではなく酵素全体に反映されているものと推測される。特に、P450BM3 は NOS に比較して触媒反応に必要な最適な構造を形成しているものと推測される。

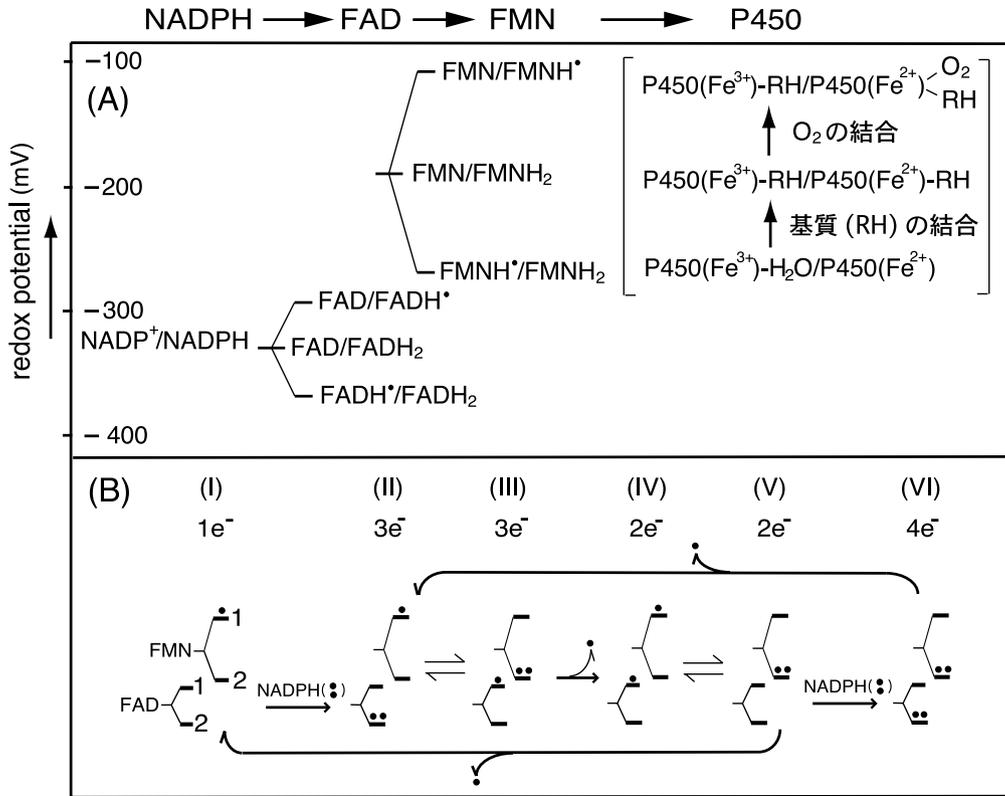


図4 P450還元酵素およびP450の酸化還元電位と反応サイクル
 (A) P450還元酵素に含まれるFADとFMNの一電子還元電位および二電子還元電位⁴⁴⁾を示す。P450の酸化型、基質(RH)結合型および酸素(O₂)結合型のそれぞれの一電子還元電位はアイソフォームと基質により異なることから、相対的な値として括弧内に示した。(B) P450還元酵素の反応サイクルにおける電子の移動はドットで示した。二つのドットは還元状態(FADH₂とFMNH₂)を示し、一つはセミキノン状態(FADH[•]とFMNH[•])を示す。FADとFMNに付記してある1および2の数値はそれぞれE_{ox/sq}(E₁)とE_{sq/red}(E₂)に相当する電位を示す。

4-3. シトクロム P450 の酸化還元電位

P450は基質として薬物、ステロイドなどに分子状酸素の一原子を導入する反応を触媒する。この反応による基質(RH)の酸化(水酸化)反応は分子状酸素(O₂)とNAD(P)Hから供給される二個の電子を必要とする。



ここで二個の電子はP450還元酵素のFMN部位から一個ずつ供給されることにより、酸素分子は還元的に活性化され一原子が基質(ROH)に取り込まれ、もう一原子は水になる(後述する図12を参照)。

一般にP450還元酵素によるP450のヘムの還元速度は基質が存在すると著しく加速される⁵⁸⁾。この現象は、酸化型P450のヘムの第六配位子に結合している水分子が基質により排除されることによる。水が配位している酸化型ヘムにおいては、水分子からヘム鉄に電子が供給されることによりヘム鉄の電子密度は高くなる。このことにより水が配位していない場合に比べてヘム鉄への負の電荷を持つ電子の導入が困難となる⁵⁹⁾。基質が存在しない場合には、P450の還元電位は低く保たれていることにより、電子が無

駄に消費されないように制御されている。一方、基質の結合に伴いP450のヘム鉄は水の配位した低スピン状態から水のはずれた高スピン状態に変換することにより、電位が上昇しFMNからヘムに電子が導入され易くなる⁶⁰⁾。例えば、P4503A4(CYP3A4)は基質が無い場合の高スピン状態の割合は11%であり、その電位は-220mVを示す。一方、基質(テストステロン)の存在下高スピン状態の割合は92%と増加し、その電位は-140mVとなる。還元型ヘムへの水の結合は弱いことから、還元型ヘムは高スピン状態にある。したがって、この電位差(80mV)は酸化型低スピン状態と酸化型高スピン状態の還元電位の差によるものである。

ミクロソーム型P450の一電子還元電位、P450(Fe³⁺)-H₂O/P450(Fe²⁺)はアイソフォームにより異なり、おおよそ-200mVから-300mVの範囲にある。また、それらの基質結合型の電位は基質の種類によっても異なる。とくに、低スピン型から高スピン型への変換の程度に依存して上昇する⁶⁰⁾。さらに、還元型ヘムに酸素分子(O₂)が強く結合することによって還元型が安定化される(図4A)。こ

のにより酸素が結合した酸素化型の系, P450(Fe³⁺)-H₂O/P450(Fe²⁺)-O₂ は P450(Fe³⁺)-H₂O/P450(Fe²⁺) の系より電位が上昇する. 熱力学的な考察から酸素化型を含む系の電位は+6mVと見積もられている⁶¹. NOSの場合には, L-Argの結合によるP450の系に見られるような大きな電位変化は報告されていない.

4-4. 還元酵素ドメインの反応サイクル

di-flavin 還元酵素による電子受容体への電子移動は, (i) NADPHからFADへの直接のヒドリドイオン(H⁻)の移動, (ii) 次いで還元型FADからFMNへの分子内一電子移動, (iii) 還元型FMNから最終電子受容体への一電子移動の三段階に分けられる. P450還元酵素とNOSにおいては, (iii)の段階が全体の律速段階となっている. これらの酵素の還元酵素ドメインの反応機構は非生理的な電子受容体を用いて解析されてきた. その結果, フェリシアン化カリウム(K₃[Fe(CN)₆])は主にFADから電子を受容し, 一方, cyt cはFMNから電子を受容することが明らかにされている. 反応サイクルにおいては, FADからFMNへの電子移動のための閉鎖型と, FMNから電子受容体への電子移動のためのオープン型の構造をもつことが必要である. この構造の詳細については, 後述する.

反応サイクルは酸化型から始まるのが一般的であるが, P450還元酵素とNOS還元酵素ドメインにおいては, フラビンの一電子状態, FAD-FMNH[•]が非常に安定でありその反応性が低いことから, この状態からスタートする機構について述べる(図4B). NADPHの2個の電子は反応サイクルを通して一個ずつ電子受容体に渡され, 最初の一電子状態に戻る^{4,8,62}. 反応サイクルは一電子(FAD-FMNH[•])→三電子(FADH₂-FMNH[•] ⇌ FADH[•]-FMNH₂)→二電子(FADH[•]-FMNH[•] ⇌ FAD-FMNH₂)→一電子(FAD-FMNH[•])となる. ここでFMNはFidと同じように還元型とセミキノ型を往復することによって一電子伝達体として機能する. したがって, 電子受容体に電子を供与できる活性中間体は, FADH[•]-FMNH₂とFAD-FMNH₂であることから, この状態の酵素はオープン型の構造を必要とする. 一方, FADH₂-FMNH[•]とFADH[•]-FMNH[•]状態の酵素は分子内電子移動のために閉鎖型の構造を必要とする. ここで, 反応サイクルの中間体である二電子状態, FAD-FMNH₂が, さらにNADPHによって還元される場合には二電子(FAD-FMNH₂)→四電子(FADH₂-FMNH₂)→三電子(FADH₂-FMNH[•] ⇌ FADH[•]-FMNH₂)→二電子(FADH[•]-FMNH[•] ⇌ FAD-FMNH₂)サイクルとなる. 生理的条件下ではNADP⁺/NADPH濃度比に依存して両サイクルが併発して機能しているものと考えられる. P450還元酵素は, このような反応サイクルを通してNADPHの二個の電子を一電子受容体としてのP450へ一電子ずつ供給している(後述する図12

を参照). 一方, CaMが結合したNOSの還元酵素ドメインから酸化酵素ドメインのヘムへの電子導入過程はP450還元酵素と類似した機構により行われているが, 後述するようにヘムの他に補酵素としてH₂Bが関与していることからヘムへの電子移行過程はP450の系に比較して複雑である.

バクテリア(*Bacillus megaterium*)のP450BM3の系においては, すでに述べたようにFMNのE_{ox/sq}とE_{sq/red}の電位が比較的接近していることから, FMNはセミキノン(FMN^{•-})を経由して一電子ずつ電子をヘムに渡し, 酸化型に戻る酸化型(FAD-FMN)→二電子(FADH₂-FMN ⇌ FADH[•]-FMN^{•-})→一電子(FADH[•]-FMN ⇌ FAD-FMN^{•-})→酸化型(FAD-FMN)サイクルとなる⁵⁶.

5. 電子伝達に伴う構造変化とその制御機構

di-flavin 還元酵素の基本構造となるFNRとFidは電子伝達に伴い複合体を形成することにより電子の授受を行う. この複合体モデルにおいてFADとFMN間の距離, およびそれらの配置はP450還元酵素のものと類似している³⁵. FNRから電子を受容した還元型Fidは複合体から解離し, さらに電子受容体と新たに複合体を形成することによって電子を供与する. ここでFidは電子の受容と供与に同じFMN結合部位が関与している. これらの分子間の二分子反応に対して, FNRとFidが融合したP450還元酵素及びNOSの還元酵素ドメインにおいては, 効率のよい分子内電子移動反応が行われる. したがって, FADドメインから電子を受容したFMNドメインが, 電子受容体へ電子を供与するためには構造変化を必要とする⁸. 最近, 分子内電子伝達のための閉鎖型と, 電子受容体への電子移動を行うオープン型の構造が明らかにされてきている¹⁶⁻¹⁹. NOSにおいては還元酵素ドメイン内にさらに新たな配列を獲得したことにより, 電子伝達に伴う構造変化が厳密に制御されている.

5-1. P450還元酵素

P450還元酵素のX線結晶構造解析¹¹からFADとFMNの両isoalloxazine環のジメチルベンゼン環部分はお互いに向き合っており, その距離は約4Åであることから直接電子の授受可能なvan der Waalsの接触距離にある(図5A). FMN分子のジメチルベンゼン環部分はタンパク質から溶媒に接触した形で結合しており, その近傍の表面には負の電荷をもったアミノ酸が局在していることから, この箇所が電子の授受を行う領域として考えられてきた^{63,64}. 図5に示すように閉鎖型の構造においてはFMN結合部位がFADドメインによりカバーされていることから, FADから電子を受け取った還元型FMNが大きなサイズ(分子量)をもつP450に電子を渡すためにはオープン型の構造を必

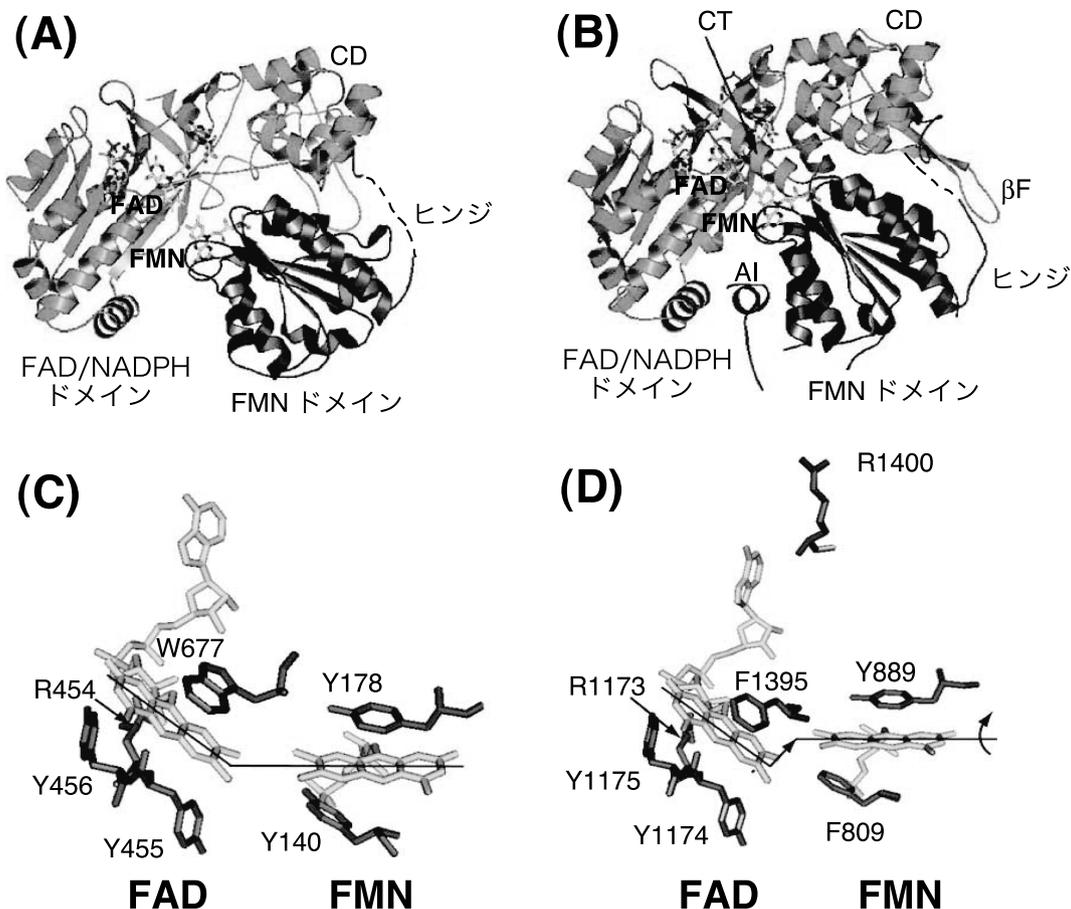


図5 P450還元酵素とnNOSの還元酵素ドメインの構造とフラビン結合部位
 (A) P450還元酵素 (PDB code: 1 AMO), (B) nNOSの還元酵素ドメイン (PDB code: 1 TLL). (C), (D) P450還元酵素とnNOSの還元酵素ドメインのそれぞれのフラビン結合部位周辺のアミノ酸残基を示す. 両者のFADとFMNの配置のずれはDに矢印により示してある.

要とする⁸⁾. 最近, Hamdane ら¹⁶⁾は柔軟性なヒンジ領域のよく保存されている四つのアミノ酸を欠失した変異体 (Δ TGEE) を作成し, そのX線結晶構造解析から, 非対称ユニットに三つの構造 (Mol A, B, C) が含まれていることを明らかにしている (図6). Mol Aについては全構造が観察されたが, Mol BとMol Cにおいては部分構造しか観察されなかった. しかし, それらのFMNドメインのヒンジ領域に近いヘリックスFとFMNの位置から両者の正確な位置が推定されている. FADドメインの構造にも変化がみられず, またフェリシアン化カリウムに対する還元活性もかわらなかった. Mol AのFMNドメインの構造は野生型と同じであることから, Mol BとMol Cも野生型と同じ構造をとっているものと推定された. Mol A, BおよびCにおけるFADとFMNの間の距離はそれぞれ $\sim 29\text{\AA}$, $\sim 59\text{\AA}$, $\sim 60\text{\AA}$ と見積もられた. Hamdane ら¹⁶⁾はMol Aを基本とした閉鎖型とオープン型間のダイナミックな構造変化を動画として公開している (<http://www.molmovdb.org/cgi-bin/morph.cgi?ID=135707-8492>). この

構造変化は単にドメインの動きだけではなく酵素全体に反映されていることから, NOSの制御機構を考える上で重要なヒントを提供している. また, Mol AとP4502B4とのドッキング解析から, FMN周辺の酸性アミノ酸残基とP450のヘムの第五配位座側周辺の塩基性アミノ酸残基の間の静電的な相互作用が, 両者の間の距離と配向を決める重要なファクターとなっていることが示された. ここでFMNとP450の間の距離は約 12\AA と見積もられ, FMNからヘムへの電子移動にはP450側のアミノ酸, Phe429とGlu439を介していることが示された (図7C). 変異体酵素のFADからFMNへの電子移動速度は野生型に比較して410倍低下しており, またP4502B4の還元速度は野生型の5%であった. このことは, ヒンジ領域によってFADからFMNへの分子内電子移動, およびFMNからP450への電子移動が制御されていることを示す.

一方, Ellis らはX線小角散乱とNMRの手法を用いて, 溶液中での酵素の構造変化を解析したところ, X線結晶構造解析で示されたような大きな構造変化が起きていること

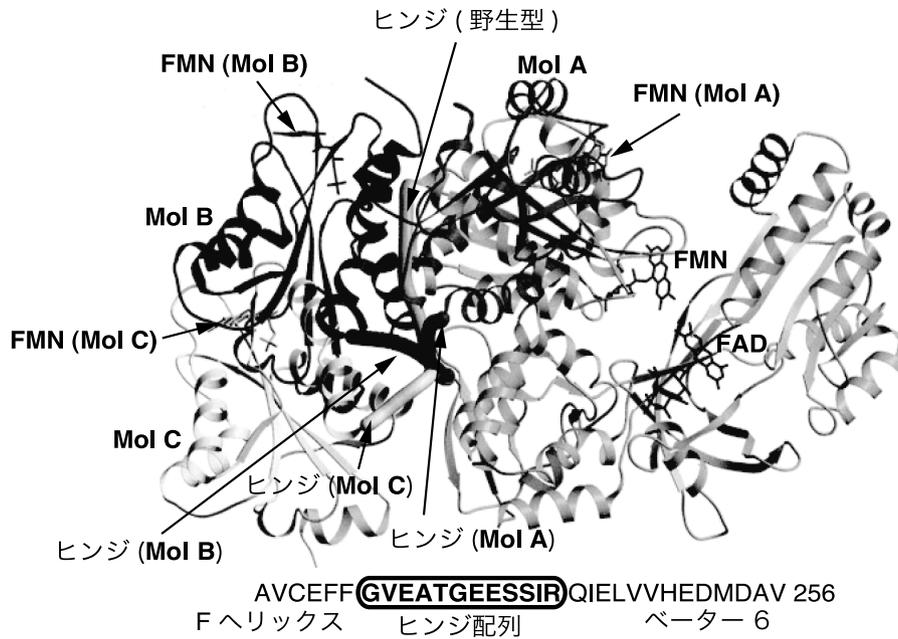


図6 P450還元酵素の閉鎖型とオープン型の構造
 野生型は閉鎖型構造として示してある。変異体の三つのオープン型の構造 (Mol A, B, C) はヒンジ配列を中心に構造変化がFMNドメイン単位で起こっている。(文献¹⁶⁾より改変)

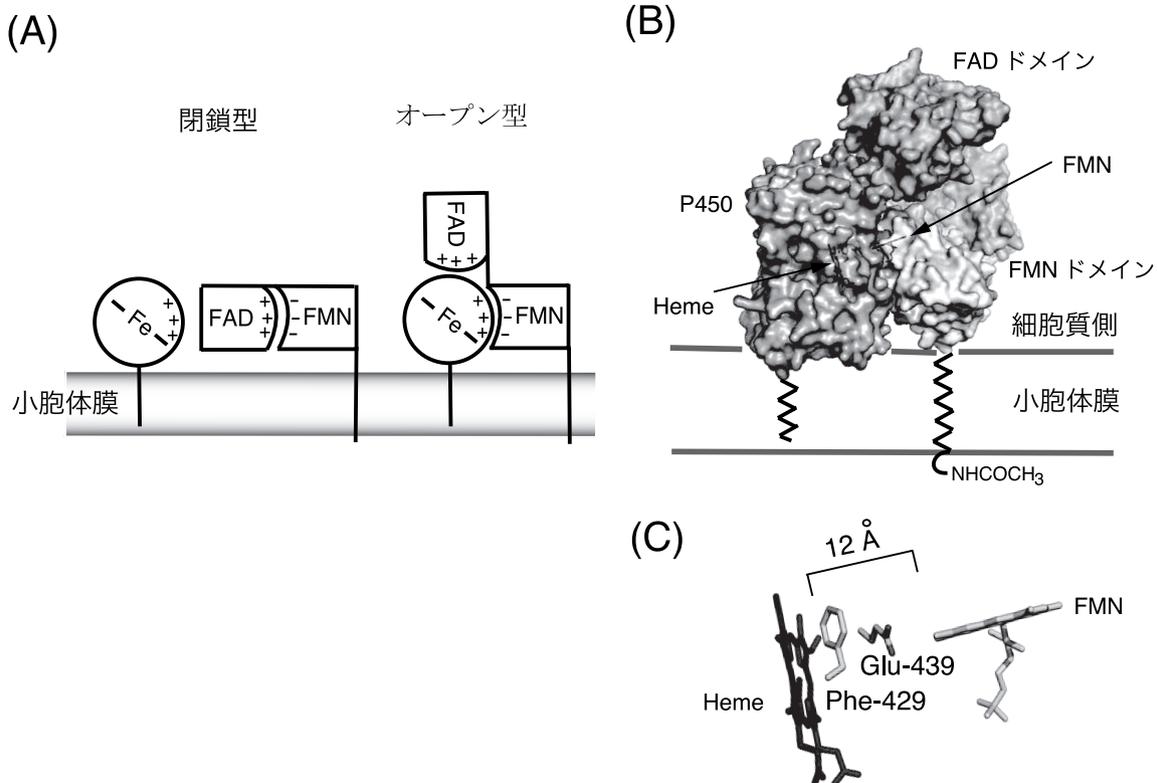


図7 小胞体におけるP450とP450還元酵素の相互作用

(A) P450とP450還元酵素は、それらのN末端側の疎水性の膜結合領域をアンカーとして小胞体膜の細胞質側を向いて結合している。P450還元酵素の閉鎖型は分子内電子移動に関与し、一方オープン型はFMNドメインからP450に電子を供給できる。プラス(+)とマイナス(-)の表示は電子伝達に関与する部位のタンパク質表面の電荷を示す。(B) P450還元酵素のオープン型とP450との相互作用を示す。(C) ヘムとFMNの配置を示す(BとCは文献¹⁶⁾より改変)。図4Bに示したI, II, IVは分子内電子移動のために閉鎖型の構造を必要とする。一方FMNが還元型の状態にあるIII, V, VIはP450に電子を供与することのできるオープン型の構造を必要とする。

を明らかにしている¹⁷⁾。ここで閉鎖型とオープン型の存在比は酵素の酸化還元状態と NADP⁺ の結合に依存していることが示された。また、Hay らは FAD と FMN ドメインの二つのフラビンラジカル (FADH[•]-FMNH[•]) の間の双極子-双極子相互作用を電子-電子二重共鳴法 (EIDOR: electron double resonance) によって解析し、そこからフラビンの間の距離を見積もることにより、ドメイン間に構造変化が起こっていることを明らかにしている⁶⁵⁾。P450 還元酵素の FMN ドメインは N 末端側に配置されていることから、その膜結合ドメインにより小胞体膜上に固定されている。そのため C 末端側の FAD ドメインが動くことにより、FMN ドメインが膜に結合している P450⁶⁶⁾ と相互作用しやすいオープン型の構造をとる (図 7A, B)。したがって、小胞体膜は P450 還元酵素から膜に結合した P450 への電子移動が起こるための電子の授受を可能にする正確な配置を決める役割と、さらに還元酵素と約 20 倍多く存在する P450 分子との相互作用を可能にする流動的な場を提供している⁶⁷⁾。

5-2. 一酸化窒素合成酵素 (NOS)

完全長 NOS の X 線結晶構造解析はまだ成功していな

い。その理由の一つとして、酵素がマルチドメイン構造をもつことにより溶液中ではさまざまな状態をとっていることが挙げられる。しかし、部分構造ではあるが、nNOS の還元酵素ドメイン (CaM 結合ドメインを含まない)¹⁴⁾、nNOS の FAD ドメイン⁶⁸⁾、eNOS の CaM 結合ペプチドと CaM との複合体⁶⁹⁾、およびすべての NOS の酸化酵素ドメインの構造が、各種リガンドや基質、基質類似体が結合した状態で解析されている⁷⁰⁻⁷⁴⁾。nNOS の還元酵素ドメインは、P450 還元酵素のアミノ酸配列との同一性 (30-40%) も高く、構造もよく似ている (図 5A, B)。ヘムを含む酸化酵素ドメインは三つのアイソフォームの全てにおいて二量体構造を形成している。しかし、これらの部分構造を基に全体の構造を構築することには情報が不足していた。最近、筆者らはヒト iNOS の FMN ドメインと CaM との複合体の X 線結晶構造解析に成功した²⁰⁾。その FMN ドメインの構造はラット nNOS のものと非常によく似ており、また P450 還元酵素の FMN ドメインの構造とも驚くほど類似していた (図 8)。そこで、nNOS の還元酵素ドメイン (FAD-FMN)¹⁴⁾ に iNOS の FMN ドメイン²⁰⁾ を重ね合わせることで、還元酵素ドメインと CaM 複合体の閉鎖型のキメラ構造を構築することが可能となった (図 9)。さらに、P450

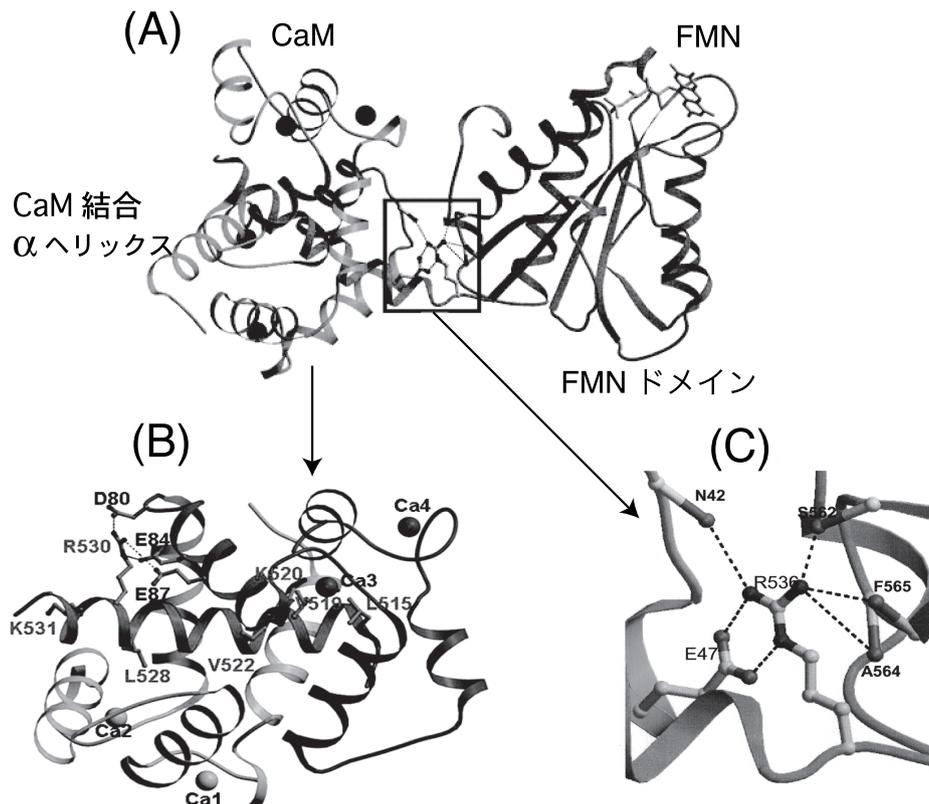


図 8 誘導型 NOS の FMN-CaM 複合体の構造

(A) ヒト誘導型 FMN ドメインと CaM 複合体の構造, (B) CaM と CaM 結合領域との相互作用を示す. (C) CaM 結合領域と FMN 結合ドメインの間のヒンジ領域の拡大図を示す. (A), (B) 黒丸はカルシウム (Ca) の位置を示す. (文献²⁰⁾より改変)

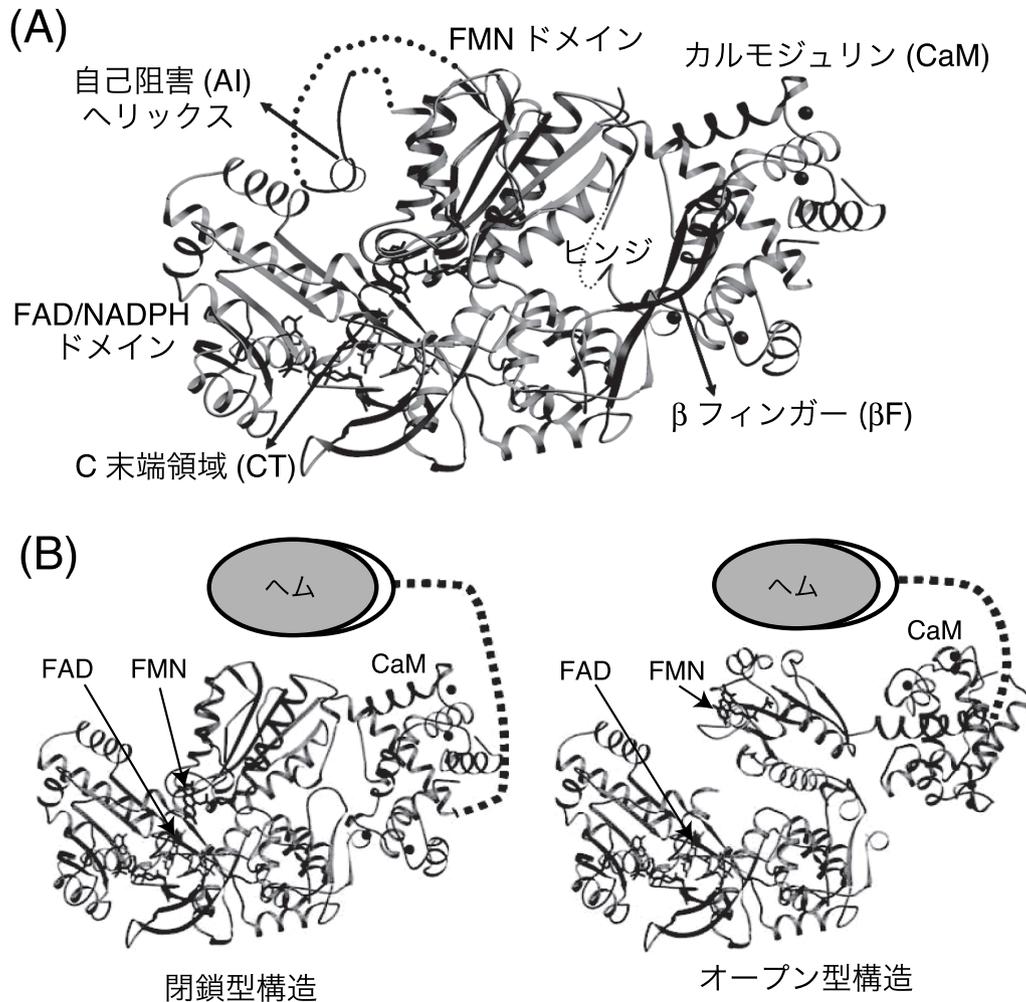


図9 神経型 NOS (nNOS) の還元酵素ドメインと誘導型 NOS の FMN-CaM 複合体から構成されたキメラ構造

(A) nNOS の FMN ドメインに iNOS の FMN ドメインを重ね合わせることで作成された。ここで nNOS の β フィンガー (β F) は CaM と直接相互作用している。(B) iNOS の閉鎖型 (左) とオープン型 (右) の構造を示す。ヘムは二量体として示してある。(文献²⁰より改変)

還元酵素のドメインの構造変化についての解析データを参考に、iNOS の還元酵素ドメインに CaM が結合したオープン型の構造を構築した。このオープン型の構造に二量体構造をもつ iNOS 酸化酵素ドメインを組み込むことにより完全長 iNOS の二量体構造をモデリングすることが可能となり、CaM による電子伝達の制御のメカニズムが構造レベルで考察できるようになってきた (図 10)。NOS の電子伝達の制御機構における CaM の役割は、(i) NADPH による FAD の還元、(ii) FAD から FMN への電子移動、(iii) FMN からヘムへの電子移動にどのように関与しているかに要約される。以下に、これらの問題点について構造を基盤に考察したい。

5-2-1 カルモジュリン (CaM) の役割

すでに述べたように iNOS は nNOS や eNOS に比較して

CaM に高い親和性を示す。iNOS FMN ドメインと CaM との複合体の構造解析からこの違いが説明できるようになってきた²⁰。CaM は二つの球状ドメインをもち、その両ドメインには Ca^{2+} が二個ずつ結合するヘリックス-ループ-ヘリックス (EF ハンド) モチーフから構成されている (図 8A)。還元酵素ドメインと酸化酵素ドメインの間にある CaM 結合配列は、CaM が結合していない状態においては比較的ランダムな構造をとっているが、CaM が結合することにより典型的な α ヘリックス構造となる⁷⁵。iNOS FMN ドメインと CaM との複合体の構造解析から²⁰、CaM 結合ペプチドと CaM との複合体形成には、主に疎水性相互作用が働いているが、iNOS においてはさらに正電荷をもつ Arg530 が CaM の負電荷をもつアミノ酸、Asp80, Glu84, Glu87 と塩結合していることが明らかとなった (図 8B)。nNOS および eNOS アイソフォームでは、この位置

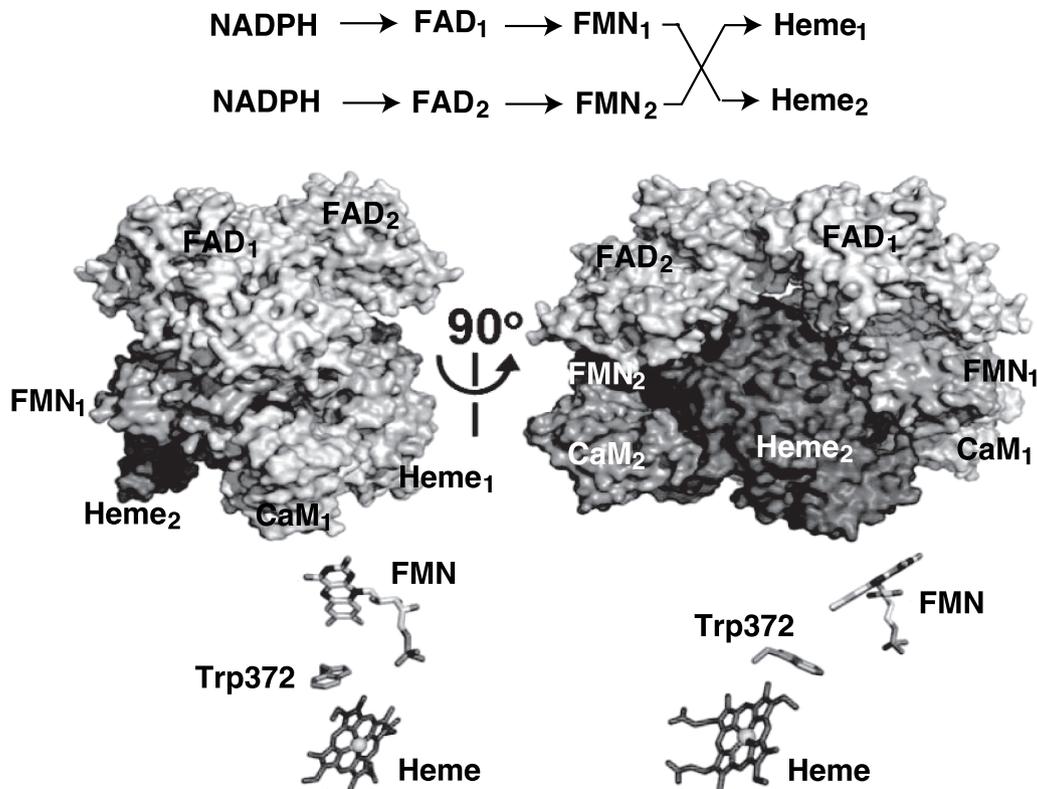


図10 誘導型 NOS (iNOS) の二量体構造モデル

iNOS ヘム二量体と iNOS 還元酵素ドメインのドッキングモデルは GRAMM-X software を用いて作成された。下側にモデルから推定された FMN とヘムの配置を示した。(文献²⁰⁾より改変)

のアミノ酸はグリシンであることから、iNOS に見られるような塩結合は形成されない。このことにより iNOS は nNOS や eNOS に比較して CaM に対して高い親和性を示す。また、CaM 結合配列の端の Arg536 と CaM の Glu47 との間に塩結合がつくられる。この部位は CaM 分子と FMN ドメインをつなぐヒンジ領域 (H2a) を形成しているが、その柔軟性はそれほど大きくはない²⁰⁾ (図 8C)。ヒト iNOS の構造を基に、ラット nNOS の FMN-CaM 複合体の構造がモデリングされ、iNOS の Arg536 に相当するアミノ酸、Arg753 を変異 (Arg752Glu) すると、cyt *c* 還元活性、ヘムの還元速度、および NO 合成活性が著しく低下する⁷⁶⁾。このことから、この領域は構造変化とヘムへの電子伝達に重要な役割を果たしていることが示された。

5-2-2 自己阻害 (AI) 配列と C 末端 (CT) 配列の役割

nNOS フラビンドメインの構造から、AI 配列は FAD ドメインと FMN ドメインの間に挟まれている (図 5B)。また、CT 配列は、FMN ドメインを横切るようにして FAD ドメインの近くに接近している。P450 還元酵素にはこの両者の配列は存在しないことから、nNOS においては両者とも FAD ドメインと FMN ドメインに接触することにより、閉鎖型の構造の安定化に参与している。

nNOS の AI 配列に変異 (Lys842Glu) を導入すると FAD から FMN への分子内電子移動反応が増加する⁷⁷⁾。FAD と FMN の間の距離は約 5Å であることから、フラビン間の電子伝達の速度は十分速いものと考えられてきたが⁷⁸⁾、溶液中においては分子内電子移動反応が抑制された状態にあることが示唆される。このことは、CaM により FAD から FMN への分子内電子移動速度が加速されること⁷⁹⁻⁸¹⁾および閉鎖型構造の FMN 部位に接近可能な低分子量の電子受容体であるメナジオン (ビタミン K3) の一電子還元が CaM により加速されることから支持される⁸²⁾。AI 配列を欠失した変異体においては cyt *c* の還元活性が増加し、しかも CaM が存在しない場合でも NADPH からヘムへの電子移動と NO の合成が起こり^{83,84)}、また逆にヘムから還元酵素ドメインへの電子移動も観察されるようになる⁸⁵⁾。eNOS アイソフォームにおいては、AI 配列内の Ser617 および CT 配列内の Ser1179 はリン酸化を受け活性化される。これらのアミノ酸を各々リン酸と同様の負の電荷をもつグルタミン酸に置換すると、CaM 存在下での NO 合成活性は野生型より約 2 倍に増加する^{86,87)}。AI 配列を欠失した変異体においては CaM が無くても NO 合成活性は認められるが、最大酵素活性を得るためには CaM の存在が必要である^{86,87)}。CT 配列を欠失した nNOS 変異体においては

CaM が存在しない場合でも 15% 程度の NO 合成活性が観察されるようになるが、この効果は AI 欠失変異体よりも大きい⁸⁸⁾。これらのことから、AI 配列と CT 配列は共に FAD から FMN、および FMN からヘムの電子移動を制御する働きをしている。また、nNOS の CT 配列に含まれる Arg1400 は酵素に結合している NADP(H) の 2'リン酸とイオン結合することにより、閉鎖型の構造を安定化している⁸⁹⁾。このアミノ酸残基は eNOS アイソフォームにも保存されているが、iNOS ではセリンに置き換わっていることから、iNOS が nNOS や eNOS よりも高い活性をもつ要因の一つとも考えられる。また Arg1229 は静電的相互作用により閉鎖型の構造を安定化している⁹⁰⁾。

一方、nNOS の閉鎖型の状態においては NADPH による FAD の還元が CT 配列や FMN ドメインにより抑制されているが、CaM の結合により還元が起り易くなることが提唱されている⁹¹⁾。この報告において、このステップが還元酵素ドメインの律速段階であると考察されているが、この抑制効果は FAD ドメインのみを単独に発現した酵素系と FAD-FMN ドメインを発現した酵素系のフェリシアン化カリウムに対する活性の比較からそれほど大きなものではない^{80,81)}。しかし、後述するドメインの大きな構造変化が FAD 周辺の局所的な構造変化にも影響を及ぼしているものと推測される。図 5D に示すように nNOS の FAD 分子は芳香族アミノ酸によってスタッキングされているが、Phe1395 が移動することにより NADPH のニコチンアミド部分が入り込み、ニコチンアミドから FAD の N5 の位置にヒドリドイオンの転移が起こる機構が提案されている。P450 還元酵素においてはこの位置に Trp677 (図 5C を参照) が位置しており、NADPH の結合に伴いこのアミノ酸残基が移動することが明らかにされている⁹²⁾。したがって、CaM が結合していない状態においては Phe1395 の動きが抑制されているものと推測される⁹¹⁾。また、AI 配列と CaM は酵素に対する補酵素の親和性に影響を与える⁹³⁾。ここで P450 還元酵素に対する NADP⁺ と 2',5'-ADP の解離定数の値は類似しているが、nNOS 還元酵素ドメイ

ンに対しては著しく異なった値を示す。nNOS においては制御配列と CaM の結合による酵素の構造変化が補酵素の結合に影響を及ぼしているものと推察される。

eNOS の FAD と FMN ドメインの接触面に存在する Cys 689 と Cys908 がグルタチオンとジスフィド結合を形成することにより NO 合成活性が阻害されると同時に還元酵素ドメインからスーパーオキシドラジカルが生成するようになる⁹⁴⁾。このことはフラビン間の電子伝達がグルタチオンによる修飾によって阻害されることを示唆している。

5-2-3 ヘムとテトラヒドロビオプテリン (H₄B) の役割

NOS は P450 と類似して第 5 配位子座にヘム-チオレートアニオンが配位したヘムタンパク質⁹⁵⁾であるが、酸素分子の活性化には補酵素として H₄B を必要とする点で P450 の系とは異なる^{96,97)}。二量体酵素は、L-Arg を基質として、N^G-ヒドロキシ-L-アルギニン (NHA) を中間体として、二段階の P450 類似の一原子酸素添加反応によって、NO ラジカルと L-シトルリン (Cit) の合成反応を触媒する (図 11)。第一段階においては酸素分子の一原子は L-Arg のグアニジニウム基の窒素原子 (N) に取り込まれ、もう一原子は水になる。第二段階においても酸素分子の活性化を必要とし、酸素分子の一原子は Cit に取り込まれ、もう一原子は水になる。

図 12 には P450 と NOS のヘムへの電子の導入過程と酸素分子 (O₂) の活性化の機構を示す。P450 の系に必要な二個の電子は共に還元酵素から導入されるが、P450 のアイソフォームと基質の種類によっては二番目の電子は cyt b₅ から導入される。一番目の電子の導入により還元された P450 は酸素との結合により酸素化型 (Fe^{II}-O₂) が安定化されることから、cyt b₅ (0mV) から二番目の電子の導入が可能となる。NOS の第一段階の反応に必要な二個の電子のうち、一番目の電子はヘムの一電子還元電位 (iNOS, -270mV; nNOS, -290mV; eNOS, -280mV) が比較的低いことから、還元酵素ドメインの還元型 FMN (iNOS, -245mV; nNOS, -220mV; eNOS, 240mV) から電子が

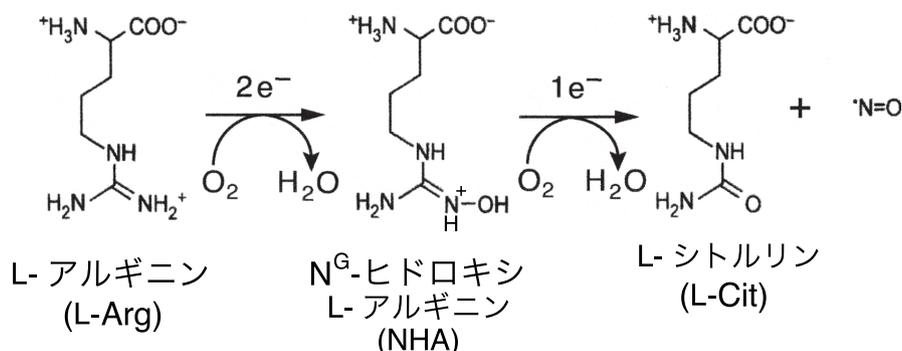
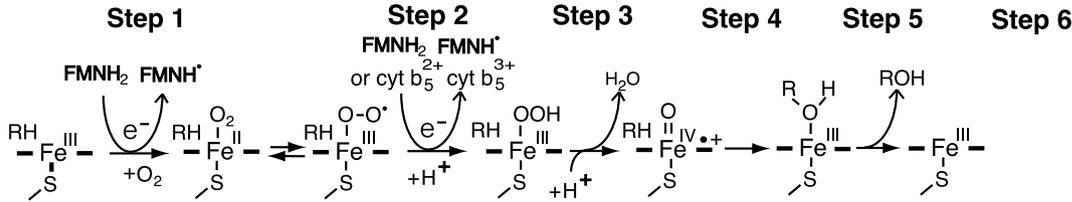
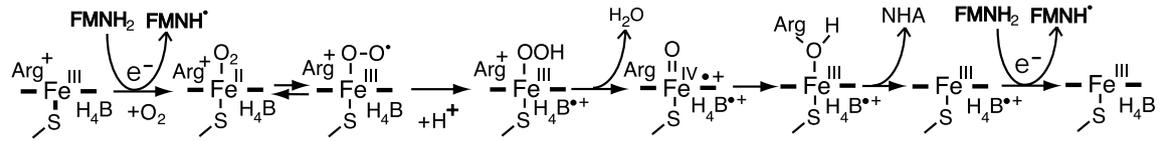


図 11 一酸化窒素合成酵素 (NOS) によるアルギニン (L-Arg) の酸化機構

P450



NOS 第一段階



NOS 第二段階

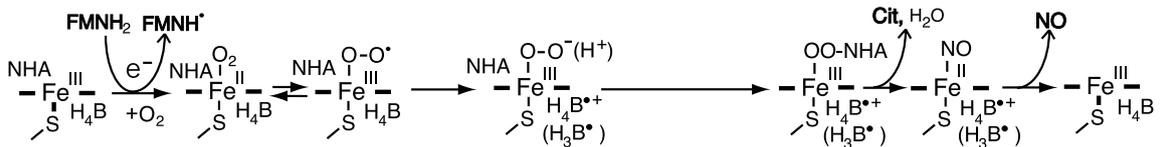
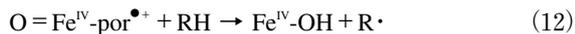


図12 P450と一酸化窒素合成酵素(NOS)のヘムへの電子の導入過程と酸素の還元的活性化機構

P450とNOSのヘム鉄には、第五配位子としてCys残基の硫黄原子(S)が配位している。FMNからの電子はこの第五配位子座側からヘム鉄に伝達される。ヘム面に対して第五配位子の反対側の第六配位子座には、水(H₂O)や酸素(O₂)などの分子が外部配位子として結合する。この周辺には基質(ArgとNHA)が結合するポケットが存在する。Step 1, 第一電子の導入と酸素の付加; Step 2, 第二電子の導入とプロトンの付加; Step 3, プロトンの付加に伴う活性酸素種の生成; Step 4, 水酸基の導入; Step 5, 生成物の遊離; Step 6, H₂B^{•+}ラジカルの還元(NOS第一段階)とFe^{II}-NO複合体の酸化に伴うNOの遊離(NOS第二段階)。P450系とNOSの第一段階反応においては活性酸素種の生成(Step 3)には二個のプロトンを必要とする。NOSの第一段階反応において必要なプロトンは水(H₂O⁺→H₂O+H⁺)と基質のArgより供給(Arg⁺→Arg+H⁺)される¹⁰⁸。このことからNOS第一段階反応においてはArgをArg⁺として示した。第二段階反応においてH₂Bは電子のみを供給(H₂B→H₂B^{•+}+e⁻)する場合と、電子とプロトンを供給(H₂B→H₃B^{•+}+e⁻+H⁺)する二つの機構が提案されている¹⁰⁸。後者はカッコ内に示してある。

供給される⁹⁸(Step 1)。しかし、二番目の電子はH₂B(+150mV)から導入される⁹⁶(Step 2)。

P450の反応においてはペルオキシ中間体(Fe^{III}-O-OH)のプロトン化に伴うO-O結合のイオニック開裂により、O=Fe^{IV}ポルフィリンπ-カチオンラジカル(O=Fe^{IV}-por^{•+})が酸化活性種として生じる(Step 3)。このO-O結合の開裂には第5配位子としてのチオレートアニオンからの電子の供給とヘムに結合したペルオキシ酸素(Fe^{III}-OO⁻)とこの近傍に存在するアミノ酸残基(トレオニンやアスパラギン酸など)および水分子からなるプロトンネットワークが重要な役割を果たしている⁹⁹⁻¹⁰¹。酸化活性種は強い酸化力を持ち基質(RH)から水素(電子とプロトン)を引き抜き(式12)、ここで生じた基質ラジカル(R•)とヘムに結合した水酸基ラジカル(Fe^{IV}-OH)との再結合反応(式13)により基質に水酸基(R•OH)が導入される¹⁰²⁻¹⁰⁴(step 4)。



NOSの第一段階反応においては、P450との類似の反応によりグアニジン基の窒素原子に水酸基(-OH)が導

入される(Step 4)。ここで活性酸素種(O=Fe^{IV}-por^{•+})の生成に必要なプロトンは水分子とL-Argから供給される(Step 2/3)。NOSにおいてもO-O結合の開裂にはL-Argと水分子を含むプロトンネットワークの関与が示唆されている¹⁰⁵。しかし、第二段階においてはNHAのヒドロキシグアニジン基のpKa値(8.1)がL-Arg(12.48)の値より低いことから、ペルオキシ酸素(Fe^{III}-O-O⁻(H⁺))がヒドロキシグアニジン基との強い水素結合により安定化され、この中間体がNHAのヒドロキシグアニジン基の炭素原子を求核攻撃し、付加体(テトラヘドラル中間体)をへて反応が進行するものと推定されている¹⁰⁵⁻¹⁰⁹(Step 3)。

NOSにおいては、二番目の電子の導入にH₂Bが関与している。FMNとヘムとの距離(~12Å)は比較的長い。それに対して、H₂Bはヘムのプロピオン酸基と水素結合を形成しており、ヘムのすぐ近傍に位置していることから、H₂Bから直接ヘムに電子が供給されることにより、酸化型中間体の自動酸化(Fe^{III}-O₂⁻→Fe^{III}+O₂⁻)を抑える働きをしているものと考えられている¹⁰⁵。ここで生じたH₂B^{•+}

カチオンラジカルは FMN から供給される電子によってヘムを介して還元される⁹⁷⁾ (Step 6). 第二段階の反応に必要な一番目と二番目の電子の導入は、第一段階の反応と同様であるが、二番目の電子の導入により生じた $H_4B^{\bullet+}$ カチオンラジカルは、最終段階において還元型ヘムが NO と複合体 ($Fe^{\text{II}}\text{-NO}$) を形成することから、ここから NO を解離するために必要な酸化剤として使用される (Step 6). これらの理由から比較的高い電位をもつ H_4B が補酵素として使われている。したがって、 H_4B ($H_4B \rightleftharpoons H_4B^{\bullet+} + e^-$) は NO の合成反応を通して電子の供与体として、また電子の受容体として機能していることになる¹⁰⁹⁾。最終的に、NADPH から還元酵素ドメインを経て三電子が供給されることになる。

では、なぜ NOS においては H_4B が補酵素として選択されたのだろうか。最近、バクテリア (*Bacillus subtilis*) から、哺乳類の酸化酵素ドメインとアミノ酸配列が類似したヘムタンパク質 (bsNOS) が単離された^{110,111)}。この株には、 H_4B 合成系をコードする遺伝子が存在しており、 H_4B は bsNOS に高い親和性を示し、その存在下 NO 合成活性が観察される。NO 合成活性はバクテリアの FAD を含む NADPH-フラボドキシニン還元酵素と Fld により再構成され、また、哺乳類の nNOS の還元酵素ドメインを用いた再構成系によっても NO 合成が観察される^{111,112)}。これらのことから、 H_4B の起源はバクテリアの時代にさかのぼることができる。さらに、バクテリアにおいてはテトラヒドロ葉酸 (H_4F) が補酵素として使用されている例も報告されている^{113,114)}。また、バクテリア (*Sorangium cellulosum*) からは H_4B と H_4F の両者を補酵素とすることのできる scNOS が単離されている¹¹⁴⁾。この酵素は FAD と FNR 型の鉄-硫黄 [2Fe-2S] クラスタからなる還元酵素ドメインとヘムを含む酸化酵素ドメインからなる一成分系である。この酵素の発見は NOS の分子進化を考察する上でも大変興味深いものである。

5-2-4 NOS アイソフォームによる NO 合成活性

NOS アイソフォームのうちで NO 合成活性は iNOS (~200/min) が最も高く、nNOS (~100/min)、eNOS (~20/min) の順である¹¹⁵⁾。この活性の違いはどのようにして生じるのであろうか。Nishida と Montellano は、NOS アイソフォームの還元酵素ドメインと酸化酵素ドメインを入れ替えたキメラ酵素を作成し、それらの NO 合成活性を調べたところ、NO 合成活性は酸化酵素ドメインよりも還元酵素ドメインに依存していることを示した¹¹⁶⁾。NOS アイソフォームの FMN から電子を受容する cyt c およびヘムの還元速度はともに iNOS > nNOS > eNOS の順である。これらの順番は NO 合成活性の相対比とよく一致している¹¹⁷⁾。このことは NOS アイソフォームの NO 合成活性がそれぞ

れの還元酵素ドメインの還元能力に大きく依存していることを示している。この違いは還元酵素ドメインのどのような性質の差異によって引き起こされるのだろうか。その主因の一つとしてヘムへの電子供与可能なフラビンの活性種の生成量が、NO 合成活性の違いを引き起こすことが挙げられる。フラビン活性種、 $FADH^{\bullet}\text{-FMNH}_2$ の生成量は、一電子状態、 $FAD\text{-FMNH}^{\bullet}$ の NADPH による還元過程のスペクトル解析から直接見積もることが可能である^{118,119)}。その結果、iNOS アイソフォームにおいては主に $FADH^{\bullet}\text{-FMNH}_2$ の状態が観察された。これに対して、eNOS アイソフォームにおいては、主に $FADH_2\text{-FMNH}^{\bullet}$ 状態が観察された。このことは、三電子状態 ($FADH_2\text{-FMNH}^{\bullet} \rightleftharpoons FADH^{\bullet}\text{-FMNH}_2$) の間の平衡が、iNOS においては右側に、eNOS においては左側に傾いていることを示す。eNOS の NO 合成活性が著しく低いのは、フラビンの活性中間体の生成量が NO 合成活性に反映されていると考えることができる。また反応サイクルにおいてヘムの酸化型が主な中間体として蓄積することから、還元酵素ドメインの FMN からヘムへの一電子目の導入が NO 合成の律速段階であると考えられている。しかし、ヘムの還元速度に比較して NO の合成速度は一桁低い値を示す。このことは基質の酸化反応には還元酵素ドメインから三電子の供給を必要とし、また基質 (L-Arg) の酸化反応は2段階で起こることによる複雑な反応過程を反映しているものと推測される (図 12)。一方、NOS の還元酵素ドメインは閉鎖型とオープン型の構造を繰り返しながら NADPH からヘムに電子を供給している。この変換速度がアイソフォーム間で異なる可能性が指摘されている¹²⁰⁾。このことは、nNOS のヒンジ配列を eNOS のものと入れ替えることにより、nNOS の NO 合成活性が著しく低下することから支持される。しかし、ヒンジ配列による閉鎖型とオープン型の構造変換の速度の違いは、フラビンの活性中間体の生成量にも影響を及ぼすことにもなる。NOS アイソフォームが異なる NO 合成活性を示す原因として、活性フラビン種の生成速度、閉鎖型とオープン型の間の構造変換の速度、FMN からヘムへの電子伝達経路、ヘムの酸化還元電位、ヘムから NO の解離速度などを考慮する必要性が残されている。今後、NOS アイソフォームが異なる NO 合成活性を示す生理的な意義を含め、その機構の解明にはさらに詳細な検討が必要である。

NOS アイソフォームはアシル化、リン酸化などによる修飾、カベオリン、hsp90 などのタンパク質との相互作用により異なる調節を受けている。これらの詳細については他の総説を参照されたい¹²¹⁾。

5-2-5 全構造モデルからの考察

CaM が結合していない状態においては閉鎖型の構造が

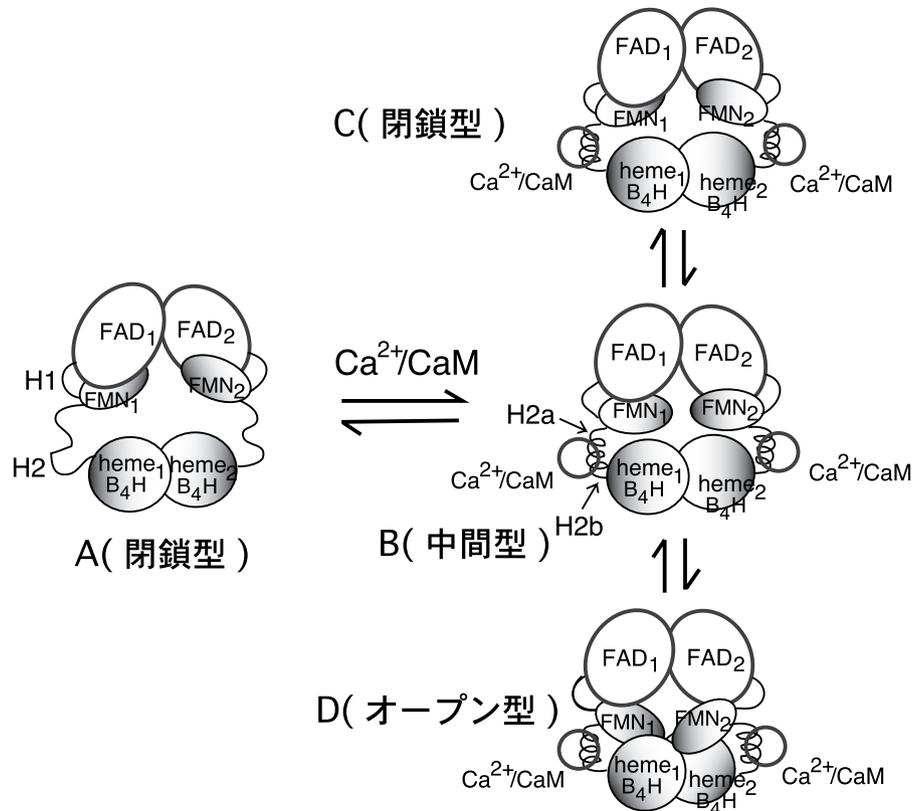


図13 カルモジュリン (CaM) による NOS の活性化機構

カルモジュリン (CaM) 結合領域をヒンジ, H2 と記し, CaM の結合により分割されたヒンジ領域を H2a と H2b として記した. CaM が結合していない H2 配列はランダムな構造であるが, CaM の結合により α ヘリックスを形成する. 酸化酵素ドメインは二量体構造として示した. 二量体構造のサブユニットは数値 1 と 2 により示した. 閉鎖型 (A および C) においては同じサブユニット内の FAD から FMN に電子伝達が起こるが, オープン型 (D) においては異なるサブユニットの FMN₁ から heme₂ に, また FMN₂ から heme₁ に電子伝達が起こる. オープン型の構造 (D) は図 10 の構造を模式化して描いた.

制御配列により安定化されているが, CaM が結合することにより還元酵素ドメインはオープン型の構造をとり, FMN からパートナーとしての別のサブユニットの酸化酵素ドメインのヘムに電子移動が起こることによって NO が産生されるようになる¹²²⁻¹²⁵. FMN ドメインとヘムドメインのスイッチングによる電子移動は, 最小限の構造変化を伴う効率よいものと考えられてきたが, その全体像を構造レベルにおいて理解するための情報は不足していた. しかし, iNOS の全構造がモデリング²⁰されたことにより, nNOS の全構造のモデリング¹²⁶が報告され, 両アイソフォームの全体の構造は非常によく似ていることが明らかにされてきている. このことにより, 構成型 NOS の CaM による活性化の機構を構造レベルで解明する手がかりが得られてきた.

では CaM はどのようにして FMN からヘムへの電子伝達を引き起こす引き金となるのだろうか, この作業仮説を, 図 13 に示す. この過程には, cyt c 還元活性をもつ NO 合成活性を示さない“中間型の構造 (B)”を含め, 現

在のところ少なくとも四つの状態 (A~D) を考慮することが必要である. CaM が結合していない状態, A は閉鎖型として制御配列によりヘムドメインへの電子伝達が抑制されている. しかし, CaM が CaM 結合配列に結合することにより, そのランダムな構造から α ヘリックス構造へと変換し, 高い柔軟性をもつヒンジ領域, H2 (ここでは CaM 結合配列をヒンジ, H2 と記した) は H2a と H2b とに分割される. このことにより, B, C および D の状態においてその柔軟性が制約されることになる. 先に述べたように FMN ドメインと CaM をつなぐヒンジ領域, H2a の柔軟性は比較的低いことから, FMN-CaM 複合体は一つの機能単位として振る舞うことができる. この複合体の柔軟性は主に H1 と H2b の両者により決められる. FMN ドメインは CaM と複合体を形成することにより同じサブユニットのヘムドメインよりもパートナーのヘムドメインに電子を供与できる構造をもつようになると同時に, FAD ドメインとの相互作用もできるような柔軟性を獲得する. ここで, FMN とヘムの間の相互作用と電子伝達のための

最適な配置はヒンジ, H2bにより, 一方FMNとFADの間の相互作用はヒンジ, H1により決められる. これらのヒンジ領域が, FADからFMNへ, およびFMNからヘムへの電子伝達を可能としているものと推測される. モデリングされたオープン型のiNOSの全構造(図10)から, FMNのメチル基とヘムのピニールグループ間の距離は約12Åであり, 酸化酵素ドメインのヘムへの電子の移動には芳香族アミノ酸, Trp372を介していることが示された²⁰. 同じように, nNOSにおいても, Trp587がFMNドメインとヘムの間に位置していることから⁷⁶, FMNからヘムへの電子伝達のための両者の配置は極めて類似しているといえる. 最終的に, FMN-CaM複合体の形成がトリガーとなりAI配列, CT配列および静電的相互作用により保持されている安定な閉鎖型の構造から解き放たれることにより, 閉鎖型とオープン型の間の可逆的な構造変換が可能となる. ではどのようにしてFMNドメインはFADドメインと酸化酵素ドメインの間の電子伝達に伴う構造の組み替えを可能にしているのだろうか. たとえば, FMNドメインのセミキノン状態(FMNH[•])の構造はFADドメインの還元状態(FADH₂)の構造に高い親和性を示し, 一方FMNドメインの還元状態(FMNH₂)の構造は酸化酵素ドメインに高い親和性を示すことにより電子伝達に伴う構造変換を可能にしているものと推察される. P450還元酵素とP450の間の電子の授受には, 酵素のリドックス(酸化還元)状態に依存した構造変化の重要性が指摘されている⁸. またFMN-CaM複合体の構造がFADドメインと酸化酵素ドメイン間を一電子伝達体としてシャトルする最適な構造を提供している. iNOSのFMNと酸化酵素ドメイン領域を発現したタンパク質を用いて, FMNのC8のメチル基とヘムのピニールグループの間の距離がパルス電子スピン共鳴法から13.1Åと測定されている¹²⁷. この値はドッキングモデルから推定された値とよく一致する. 構成型NOSにおいてはFMN-CaM複合体の形成に伴い, CaMがβFと直接相互作用するようになるが(図9Aを参照), このことがどのようにして構造変化を引き起こす引き金となるのかについても, 現在のところその詳細な機構は不明である^{20,128}. 現段階においてはきわめて大雑把な推論しかできないが, 今後iNOS^{20,127}とnNOS¹²⁶のモデル構造の妥当性が生化学的あるいは物理化学的手法により, 詳細に検証されることが必要である.

6. おわりに

物質代謝に関連した電子伝達系は, 一般にNAD(P)Hから最終電子受容体への電子移動において, 脱水素作用をもつフラビン, 一電子伝達体, 最終電子受容体の三つの構成成分とそれらの機能を必要とする. di-flavin還元酵素ファミリーはフラビンを含む脱水素酵素と一電子伝達体が融合

してつくられたことにより, 電子伝達系は二成分系となる. さらに, 二つのフラビンを含む還元酵素ドメインと最終電子受容体とが融合したことにより一成分系となり, 効率のよい電子伝達系へと進化してきた. 一成分系の代表的な酵素であるNOSは, その還元酵素ドメインの修飾により, さらに二量体を形成することにより電子伝達の制御の機構を獲得している. ここにドメイン単位の構造変化という動的なファクターが電子伝達の制御のために組み込まれた. 最終的に, CaMの結合によりFMNからヘムへの電子伝達が起こる一連の過程に, 制御因子がどのように共同作業をしているのか, その解明のためには少なくともCaMが結合したものと結合していない二つの状態の構造解析が必要となることはいうまでもない. また, FNRとFldの融合から始まり, di-flavin還元酵素(P450還元酵素)を経由してNOSにいたる機能分化は, 生化学的な代謝経路の進化を反映していることから, DNAにおける構造遺伝子領域の融合という生物学的にも大変興味ある話題を提供している^{111,129-131}.

謝辞

本稿で取り上げたヒトiNOSのFMNドメインとCaMとの複合体の構造解析はMedical College of WisconsinのJung-Ja P. Kim博士のグループとの共同研究によるものであり, この場を借りてお礼申し上げます.

文 献

- 1) De Colibus, L. & Mattevi, A. (2006) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16**, 722-728.
- 2) Joosten, V. & van Berkel, W.J. (2007) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **11**, 195-202.
- 3) Efremov, R.G., Baradaran, R., & Sazanov, L.A. (2010) *Nature*, **465**, 441-445.
- 4) Iyanagi, T. (2007) *Int. Rev. Cytol.*, **260**, 35-112.
- 5) Medina, M. (2009) *FEBS J.*, **276**, 3942-3958.
- 6) Tognetti, V.B., Zurbriggen, M.D., Morandi, E.N., Fillat, M.F., Valle, E.M., Hajirezaei, M.R., & Carrillo, N. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 11495-11500.
- 7) Utschig, L.M., Tiede, D.M., & Poluektov, O.G. (2010) *Biochemistry*, **49**, 9682-9684.
- 8) Iyanagi, T. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 520-528.
- 9) Porter, T.D. & Kasper, C.B. (1986) *Biochemistry*, **25**, 1682-1687.
- 10) Haniu, M., Iyanagi, T., Miller, P., Lee, T.D., & Shively, J.E. (1986) *Biochemistry*, **25**, 7906-7911.
- 11) Wang, M., Roberts, D.L., Paschke, R., Shea, T.M., Masters, B.S., & Kim, J.J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 8411-8416.
- 12) Bredt, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed, R.R., & Snyder, S.H. (1991) *Nature*, **351**, 714-718.
- 13) Alderton, W.K., Cooper, C.C., & Knowles, R.G. (2001) *Biochem. J.*, **357**, 593-615.

- 14) Garcin, E.D., Bruns, C.M., Lloyd, S.J., Hosfield, D.J., Tiso, M., Gachhui, R., Stuehr, D.J., Tainer, J.A., & Getzoff, E.D. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 37918–37927.
- 15) Roman, L.J. & Masters, B.S. (2010) *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations* (Devlin, T.M. Ed), 7th ed., pp. 425–456, John Wiley & Sons, Inc.
- 16) Hamdane, D., Xia, C., Im, S.C., Zhang, H., Kim, J.J., & Waskell, L. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 11374–11384.
- 17) Ellis, J., Gutierrez, A., Barsukov, I.L., Huang, W.-C., Grossmann, G., & Roberts, G. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 36628–36637.
- 18) Aigrain, L., Pompon, D., Morera, S., & Truan, G. (2009) *EMBO Rep.*, **10**, 742–747.
- 19) Laursen, T., Jensen, K., & Moller, B.L. (2011) *Biochim. Biophys. Acta*, **1814**, 132–138.
- 20) Xia, C., Misra, I., Iyanagi, T., & Kim, J.J. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 30708–30717.
- 21) 佐上郁子, 佐藤藤裕, 清水 透 (2003) 生化学, **75**, 351–358.
- 22) Senda, T., Senda, M., Kimura, S., & Ishida, T. (2009) *Anti-oxid. Redox. Signal.*, **11**, 1741–1766.
- 23) Iyanagi, T. & Mason, H.S. (1973) *Biochemistry*, **12**, 2297–2308.
- 24) Olteanu, H. & Banerjee, R. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 35558–35563.
- 25) Wolthers, K.R., Lou, X., Toogood, H.S., Leys, D., & Scrutton, N.S. (2007) *Biochemistry*, **46**, 11833–11844.
- 26) Paine, M.J., Garner, A.P., Powell, D., Sibbald, J., Sales, M., Pratt, N., Smith, T., Tew, D.J., & Wolf, C.R. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 1471–1478.
- 27) Kitazume, T., Haines, D.C., Estabrook, R.W., Chen, B., & Peterson, J.A. (2007) *Biochemistry*, **46**, 11892–11901.
- 28) Sevrioukova, I.F., Li, H., Zhang, H., Peterson, J.A., & Poulos, T.L. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 1863–1868.
- 29) Sibille, N., Blackledge, M., Brutscher, B., Coves, J., & Bersch, B. (2005) *Biochemistry*, **44**, 9086–9095.
- 30) Hall, D.A., Vander Kooi, C.W., Stasik, C.N., Stevens, S.Y., Zuiderweg, E.R., & Matthews, R.G. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9521–9526.
- 31) Wang, Z.Q., Lawson, R.J., Buddha, M.R., Wei, W.W., Crane, B.R., Munro, A.W., & Stuehr, D.J. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 2196–2202.
- 32) Muller, J.J., Lapko, A., Bourenkov, G., Ruckpaul, K., & Heinemann, U. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 2786–2789.
- 33) Ewen, K.M., Kleser, M., & Bernhardt, R. (2011) *Biochim. Biophys. Acta*, **1814**, 111–125.
- 34) Aliverti, A., Pandini, V., Pennati, A., de Rosa, M., & Zanetti, G. (2008) *Arch. Biochem. Biophys.*, **474**, 283–291.
- 35) Medina, M. & Gómez-Moreno, C. (2004) *Photosynthe. Res.*, **79**, 113–131.
- 36) Kurisu, G., Kusunoki, M., Katoh, E., Yamazaki, T., Teshima, K., Onda, Y., Kimata-Arigo, Y., & Hase, T. (2001) *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 117–121.
- 37) Shen, A.L., O'Leary, K.A., & Kasper, C.B. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 6536–6541.
- 38) Nicolo, C., Fluck, C.E., Mullis, P.E., & Pnadey, A. (2010) *Molecular and Cellular Endocrinology*, **321**, 245–252.
- 39) Kida, Y., Ohgiya, S., Mihara, K., & Sakaguchi, M. (1998) *Arch. Biochem. Biophys.*, **351**, 175–179.
- 40) Michaelis, L. (1932) *J. Biol. Chem.*, **96**, 703–715.
- 41) Anderson, R.F. (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, **722**, 158–162.
- 42) Ohnishi, T., Yamazaki, H., Iyanagi, T., Nakamura, T., & Yamazaki, I. (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, **172**, 357–369.
- 43) Anderson, R.F. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, **590**, 277–281.
- 44) Iyanagi, T., Makino, N., & Mason, H.S. (1974) *Biochemistry*, **13**, 1701–1710.
- 45) Hoover, D.M., Drennan, C.L., Metzger, A.L., Osborne, C., Weber, C.H., Pattridgeand, K.A., & Ludwig, M.L. (1999) *J. Mol. Biol.*, **294**, 725–743.
- 46) Ishikita, H. (2008) *Biochemistry*, **47**, 4394–4402.
- 47) Carrado, M.E., Aliverti, A., Zanetti, G., & Mayhew, S.G. (1996) *Eur. J. Biochem.*, **239**, 662–667.
- 48) Ingelman, M., Bianchi, V., & Eklund, H. (1997) *J. Mol. Biol.*, **268**, 147–157.
- 49) McIver, L., Leadbeater, C., Campopiano, D.J., Baxter, R.L., Daff, S.N., Chapman, S.K., & Munro, A.W. (1998) *Eur. J. Biochem.*, **257**, 577–585.
- 50) Das, A. & Sligar, S.G. (2009) *Biochemistry*, **48**, 12104–12112.
- 51) Noble, M.A., Munro, A.W., Rivers, S.L., Robledo, L., DaV, S.N., Yellowlees, L.J., Shimizu, T., Sagami, I., Guillemette, J. G., & Chapman, S.K. (1999) *Biochemistry*, **38**, 16413–16418.
- 52) Gao, Y.T., Smith, S.M., Weinberg, J.B., Montgomery, H.J., Guillemette, J.G., Ghosh, D.K., Roman, L.J., Martasek, P., & Salerno, J.C. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 18759–18766.
- 53) Wolthers, K.R., Basran, J., Munro, A.W., & Scrutton, N.S. (2003) *Biochemistry*, **42**, 3911–3920.
- 54) Finn, R.D., Basran, J., Roitel, O., Wolf, C.R., Munro, A.W., Paine, M.J., & Scrutton, N.S. (2003) *Eur. J. Biochem.*, **270**, 1164–1175.
- 55) Ostrowski, J., Barber, M., Rueger, D., Miller, B., Siegel, L., & Kredich, N. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 15796–15808.
- 56) Chen, H.-C. & Swenson, R.P. (2008) *Biochemistry*, **47**, 13788–13799.
- 57) Li, H., Das, A., Sibhatu, H., Jamal, J., Sligar, S.G., & Poulos, T.L. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 34762–34772.
- 58) Imai, Y., Sato, R., & Iyanagi, T. (1977) *J. Biochem.*, **82**, 1237–1246.
- 59) Watanabe, Y. & Groves, J.T. (1992) *The Enzymes* (Sigman, S.D., ed.), Vol. 20, pp. 405–452, Academic Press.
- 60) Das, A., Grinkova, Y.V., & Sligar, S.G. (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 13778–13779.
- 61) Koppenol, W.H. (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 9686–9690.
- 62) Iyanagi, T., Makino, R., & Anan, F.K. (1981) *Biochemistry*, **21**, 1722–1730.
- 63) Nisimoto, Y. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 14232–14239.
- 64) Zhao, Q., Modi, S., Smith, G., Paine, M., McDonagh, P.D., Wolf, C.R., Tew, D., Lian, L.Y., Roberts, G.C., & Driessen, H.P. (1999) *Protein Sci.*, **8**, 298–306.
- 65) Hay, S., Brenner, S., Khara, B., Quinn, A.M., Rigby, S.E., & Scrutton, N.S. (2010) *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 9738–9745.
- 66) Ghosh, D., Griswold, J., Erman, M., & Pangborn, W. (2009) *Nature*, **457**, 219–223.
- 67) Taniguchi, H., Imai, Y., Iyanagi, T., & Sato, R. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, **19**, 341–356.
- 68) Zhang, J., Martasek, P., Paschke, R., Shea, T.M., Masters, B. S.S., & Kim, J.J. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 37506–37513.
- 69) Aoyagi, M., Arvai, A.S., Tainer, J.A., & Getzoff, E.D. (2003) *EMBO J.*, **22**, 766–775.
- 70) Crane, B.R., Arvai, A.S., Ghosh, D.K., Wu, C., Getzoff, E.D., Stuehr, D.J., & Tainer, J.A. (1998) *Science*, **279**, 2121–2126.
- 71) Fischmann, T.O., Hruza, A., Niu, X.D., Fossetta, J.D., Lunn,

- C.A., Dolphin, E., Prongay, A.J., Reichert, P., Lundell, D.J., Narula, S.K., & Weber, P.C. (1999) *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 233-242.
- 72) Crane, B.R., Arvai, A.S., Ghosh, D.K., Wu, C., Getzoff, E.D., Stuehr, D.J., & Tainer, J.A. (1998) *Science*, **279**, 2121-2126.
- 73) Raman, C.S., Li, H., Martasek, P., Kral, V., Masters, B.S., & Poulos, T.L. (1998) *Cell*, **95**, 939-950.
- 74) Li, H., Shimizu, H., Flinspach, M., Jamal, J., Yang, W., Xiang, M., Cai, T., Wen, E.Z., Jai, Q., Wang, P.G., & Poulos, T.L. (2002) *Biochemistry*, **41**, 13868-13875.
- 75) Matsubara, M., Hayashi, N., Titani, K., & Taniguchi, H. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 23050-23056.
- 76) Tejero, J., Haque, M.M., Durra, D., & Stuehr, D.J. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 25941-25949.
- 77) Guan, Z.W., Haque, M.M., Wei, C.C., Garcin, E.D., Getzoff, E.D., & Stuehr, D.J. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 3064-3075.
- 78) Page, C.C., Moser, C.C., Chen, X., & Dutton, P.L. (1999) *Nature*, **402**, 47-52.
- 79) Matsuda, H. & Iyanagi, T. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1473**, 345-355.
- 80) Guan, Z.W., Kamatani, D., Kimura, S., & Iyanagi, T. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 30859-30868.
- 81) Guan, Z.W. & Iyanagi, T. (2003) *Arch. Biochem. Biophys.*, **412**, 65-76.
- 82) Fu, J., Yamamoto, K., Guan, Z.W., Kimura, S., & Iyanagi, T. (2004) *Arch. Biochem. Biophys.*, **427**, 180-187.
- 83) Daff, S., Sagami, I., & Shimizu, T. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 30589-30595.
- 84) Roman, L.J. & Masters, B.S.S. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 23111-23118.
- 85) Kobayashi, K., Tagawa, S., Daff, S., Sagami, I., & Shimizu, T. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 39864-39871.
- 86) Tran, Q-K., Leonard, J., Black, D.J., & Persechini, A. (2008) *Biochemistry*, **47**, 7557-7566.
- 87) Tran, Q-K., Leonard, J., Black, D.J., Nadeau, O.W., Boulatnikov, I.G., & Persechini, A. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 11892-11899.
- 88) Chen, P-F. & Wu, K.K. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 13155-13163.
- 89) Tiso, M., Konas, D.W., Panda, K., Garcin, E.D., Sharma, M., Getzoff, E.D., & Stuehr, D.J. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 39208-39219.
- 90) Welland, A., Garnaud, P.E., Kitamura, M., Miles, C.S., & Daff, S. (2008) *Biochemistry*, **47**, 9771-9780.
- 91) Welland, A. & Daff, S. (2010) *FEBS J.*, **277**, 3833-3843.
- 92) Hubbard, P.A., Shen, A.L., Paschke, R., Kasper, C.B., & Kim, J.J.P. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 29163-29170.
- 93) Sanae, R., Kurokawa, F., Oda, M., Ishijima, S., & Sagami, I. (2011) *Biochemistry*, **50**, 1714-1722.
- 94) Chen, C.A., Wang, T.Y., Varadharaj, S., Reyes, L.A., Hermann, C., Talukder, M.A., Chen, Y.R., Druhan, L.J., & Zweier, J.L. (2010) *Nature*, **468**, 1115-1118.
- 95) Omura, T. (2010) *J. Biochem.*, **147**, 297-306.
- 96) Wei, C.C., Crane, B.R., & Stuehr, D.J. (2003) *Chem. Rev.*, **103**, 2365-2383.
- 97) Stuehr, D.J., Tejero, J., & Haque, M.M. (2009) *FEBS J.*, **276**, 3959-3974.
- 98) Gao, Y.T., Smith, S.M.E., Weinberg, J.B., Montgomery, H.J., Newman, E., Guillemette, J.G., Ghosh, D.K., Roman, L.J., Martasek, P., & Salerno, J.C. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 18759-18766.
- 99) Imai, M., Shimada, H., Watanabe, Y., Matsushima-Hibiya, Y., Makino, R., Koga, H., Horiuchi, T., & Ishimura, Y. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7823-7827.
- 100) Nagano, S. & Poulos, T.L. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 31569-31663.
- 101) 当舍武彦, 石森浩一郎, 森島 績 (2005) 生物物理, **45**, 78-83.
- 102) Watanabe, Y., Iyanagi, T., & Oae, S. (1982) *Tetrahedron Lett.*, **23**, 533-536.
- 103) Ortiz de Montellano, P.R. (2010) *Chem. Rev.*, **110**, 932-948.
- 104) Rittle, J. & Green, M.T. (2010) *Science*, **330**, 933-937.
- 105) Giroud, C., Moreau, M., Mattioli, T.A., Balland, V., Boucher, J.L., Xu-Li, Y., Stuehr, D.J., & Santolini, J. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 7233-7245.
- 106) Woodward, J.J., Chang, M.M., Martin, N.I., & Marletta, M.A. (2009) *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 297-305.
- 107) Woodward, J.J., Nejatjahromy, Y., Britt, R.D., & Marletta, M.A. (2010) *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 5105-5113.
- 108) Santolini, J. (2011) *J. Inorg. Biochem.*, **105**, 127-141.
- 109) Stoll, S., Nejatjahromy, Y., Woodward, J.J., Ozarowski, A., Marletta, M.A., & Britt, R.D. (2010) *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 11812-11823.
- 110) Pant, K., Bilwes, A.M., Adak, S., Stuehr, D.J., & Crane, B.R. (2002) *Biochemistry*, **41**, 11071-11079.
- 111) Brian, R., Crane, B.R., Sudhamsu, J., & Patel, B.A. (2010) *Annu. Rev. Biochem.*, **79**, 445-470.
- 112) Wang, Z-Q., Lawson, R.J., Buddha, M.R., Wei, C.C., Crane, B.R., Munro, A.W., & Stuehr, D.J. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 2196-2202.
- 113) Reece, S.Y., Woodward, J.J., & Marletta, M.A. (2009) *Biochemistry*, **48**, 5483-5491.
- 114) Agapie, T., Suseno, A., Woodward, J.J., Stoll, S., Britt, R.D., & Marletta, M.A. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 16221-16226.
- 115) Roman, L.J., Martasek, P., & Masters, B.S. (2002) *Chem. Rev.*, **102**, 1179-1190.
- 116) Nishida, C.R. & Ortiz de Montellano, P.R. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 5566-5571.
- 117) Miller, R.T., Martasek, P., Omura, T., & Masters, B.S.S. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **265** (1999) 184-188.
- 118) Yamamoto, K., Kimura, S., Shiro, Y., & Iyanagi, T. (2005) *Arch. Biochem. Biophys.*, **440**, 65-78.
- 119) Nishino, Y., Yamamoto, K., Kimura, S., Kikuchi, A., Shiro, Y., & Iyanagi, T. (2007) *Arch. Biochem. Biophys.*, **465**, 254-265.
- 120) Haque, M.M., Panda, K., Tejero, J., Aulak, K.S., Fadlalla, M. A., Mustovich, A.T., & Stuehr, D.J. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 9254-9259.
- 121) 佐上郁子 (2005) 化学と生物, **43**, 809-816.
- 122) Craig, D.H., Chapman, S.K., & Daff, S. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 33987-33994.
- 123) Siddhanta, U., Wu, C., Abu-Soud, H.M., Zhang, J., Ghosh, D. K., & Stuehr, D.J. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 7309-7312.
- 124) Siddhanta, U., Presta, A., Fan, B., Wolan, D., Rousseau, D.L., & Stuehr, D.J. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 18950-18958.
- 125) Sagami, I., Daff, S., & Shimizu, T. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 30036-30042.
- 126) Tejero, J., Hannibal, L., Mustovich, A., & Stuehr, D.J. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 27232-27240.
- 127) Astashkin, A.V., Bradley, O., Elmore, B.O., Fan, W., Guillemette, J.G., & Feng, C. (2010) *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 12059-12067.

- 128) Jones, R.J., Smith, S.M.E., Gao, Y.T., DeMay, B.S, Mann, K. J., Salerno, K.M., & Salerno, J.C. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 36876–36883.
- 129) Inada, M., Mekata, T., Sudhakaran, R., Okugawa, S., Kono, T., El Asely, A.M., Linh, N.T., Yoshida, T., Sakai, M., Yui, T., & Itami, T. (2010) *Fish Shellfish Immunol.*, **28**, 710–711.
- 130) Andreakis, N., D’Aniello, S., Albalat, R., Paolo Patti, F., Garcia-Fernández, J., Procaccini, G., Paolo Sordino, P., & Palumbo, A. (2011) *Molecular Biology and Evolution*, **28**, 163–179.
- 131) Orengo, C.A. & Thornton, J.M. (2005) *Annu. Rev. Biochem.*, **74**, 867–900.
-