

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 23 日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22105012

研究課題名（和文）生体反応場の高特異性の解析と機能制御

研究課題名（英文）Regulation of High Specificity and Function of Biological Reaction Sphere

研究代表者

城 宜嗣（Shiro, Yoshitsugu）

独立行政法人理化学研究所・放射光科学総合研究センター・主任研究員

研究者番号：70183051

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 56,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、微生物の嫌気呼吸酵素である一酸化窒素還元酵素を研究対象として、その構造を基盤に分子機能を理解する事に成功した。この酵素は、2つの鉄で構成された活性中心において、一酸化窒素NOを亜酸化窒素N2Oへと変換しているが、その際の、N-O結合の開裂とN-N結合の生成の機構を提案した。化学結合の開裂と生成は化学反応の本質であり、本研究の成果により、生体触媒である酵素に学び、鉄という地球上に多量に存在する金属を活用できる触媒開発への第一歩である。加えて、本研究からは、地球上の生物が、酸素を使わない呼吸から酸素を使う呼吸へと進化した際の、呼吸酵素の分子進化に関する構造化学的な情報が得られた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have been studying nitric oxide reductase (NOR), which catalyzes NO reduction to N2O in anaerobic respiration (denitrification) of bacteria. We succeeded in proposing the molecular mechanism of the NOR reaction on the basis of its molecular structure, in which the N-O bond is cleaved and the N-N bond is formed. The results provided us the new insight into development of a new type of the catalyst, since NOR utilizes two-iron-complex as the active center, instead of rare-metals, which are usually used in the organic synthesis. In addition, our study can contribute to the discussion of the molecular evolution of the respiratory enzymes on the earth, which was evolved from anaerobic (non-oxygen) to aerobic (oxygen) respiration.

研究分野：化学

キーワード：金属酵素 一酸化窒素 一酸化窒素還元酵素 人工触媒 ヘム酵素 脱窒

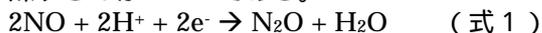
1. 研究開始当初の背景

化学結合の生成と開裂は化学反応の本質であり、それを自由自在に行えるようになることが、新たな機能物質創成の大きな目的の一つである。自然界において、酵素は常温常圧の温和な条件下で、化学結合を開裂・生成できる非常に優秀な触媒である。人工触媒が多くの場合、パラジウム、白金、ルテニウムなどのレアメタルを使用するのに対して、酵素は鉄、銅、亜鉛などの地球上に多量に存在している金属元素を活用している。また酵素反応は、非常に特異性の高いことも大きな特徴である。酵素同様に、「温和な条件」で「副産物を出さない」反応を「安価」に行える触媒が開発できれば、人類の発展に対する科学の大きな貢献となるであろう。この目的達成のための方法として、以下の2点が考えられる。

酵素の機能を詳細に知りその本質を理解できれば、それを人工触媒で達成する。

酵素の持つ反応場を自在に操り、酵素に新たな機能を付与する。

本研究では、酵素としてヘム鉄-非ヘム鉄複核錯体を活性中心に有する一酸化窒素還元酵素 Nitric Oxide Reductase: NOR を材料とした。NOR は嫌気性の微生物の呼吸（酸素を使わない呼吸）の一種である脱窒 denitrification において機能する酵素である。脱窒は、硝酸イオン NO_3^- 、亜硝酸イオン NO_2^- を逐次還元し窒素 N_2 を生成する ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$)、地球上の窒素循環における重要なステップである。この反応の中で、一酸化窒素 NO は NO_2^- の還元により産生される。しかし、 NO は細胞毒性が高いため、速やかか亜酸化窒素 N_2O に変換さら、無毒化されなければならない。この反応を触媒するのが NOR である。



単純な化学反応ではあるが、N-O 結合の開裂と N-N 結合の生成を含む反応であり、上記の目標を達成する上で、最適な材料であった。

2. 研究の目的

本研究では、

一酸化窒素還元酵素 NOR の構造と触媒機能との関連性を、鉄の配位構造、プロトンの供給経路、電子の供給経路などに注目して明らかにする。

NOR の活性中心である複核鉄錯体を人工的に他の金属に入れ替える事により、NOR に新たな機能を付与することを目的とした。

3. 研究の方法

脱窒能を有する緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* から、膜画分を調製し、そこから膜タンパク質 NOR を単離精製した。それを結晶化し、SPRING-8 結晶構造解析ビームラインにおいて X 線回折実験によりデータを収

集、結晶構造解析により構造を決定した。

好熱菌 *Geobacillus stearothermophilus* 由来の NOR に関しても同様に結晶構造を決定した。ここでは詳細は割愛する。

NOR の活性中心への変異導入の目的で、大腸菌あるいは緑膿菌をホストとする NOR 発現系を構築した。

4. 研究成果

(1) 好熱菌由来 NOR の結晶構造 (全体構造)

図1に決定した2種類の NOR の全体構造を示す。12本の膜貫通ヘリックスを有する構造であり、好気呼吸（酸素を使う呼吸）の酵素であるチトクロム酸化酵素 CcO と類似の構造であることを明らかにした。このような構造類似性が明らかになったことにより、嫌気呼吸酵素 (NOR) と好気呼吸酵素 (CcO) が同じ祖先タンパク質から分子進化した事を確定できた。すなわち、NOR の構造機能と、CcO の構造機能を分子レベルで詳細に比較できれば、地球上の生物が、約 30 億年前に光合成により地球に酸素が産生された事をきっかけに、酸素を使わない呼吸から、酸素を使う呼吸へと進化した過程を追う事が可能となったのである。実際、全体構造は類似であるが、Ca の有無、金属の配位子などの詳細は異なっており、詳細は割愛するが、その

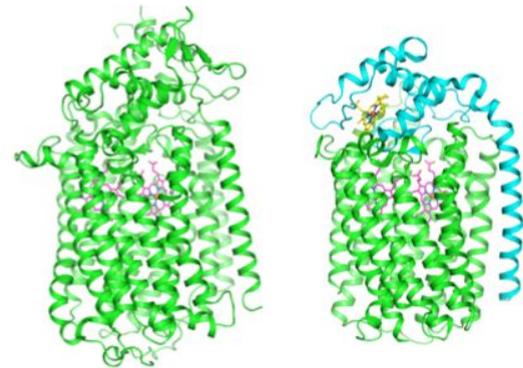


図1: (右) 緑膿菌および (左) 好熱菌由来 NOR の結晶構造

相違が進化と関連しているかもしれない。

両 NOR の構造から、活性中心 (後述) へ触媒プロトンならびに電子 (式1) を輸送する経路を特定することができた。触媒プロトン輸送に関しては、驚くべき事に、同じ酵素活性を有しながら、緑膿菌由来 NOR はペリプラズム側 (図1では酵素の上) から、好熱菌由来 NOR はサイトプラズム側 (図1では酵素の下) からプロトンが活性中心に輸送される経路を明らかにした。この結果は、先に述べた呼吸酵素の分子進化を考える上で非常に重要な情報であり、生体エネルギー分野では国際的に注目された。

(2) 緑膿菌由来 NOR の結晶構造 (活性中心) と反応機構の提案

活性中心の電子状態が、酸化鉄休止型、還

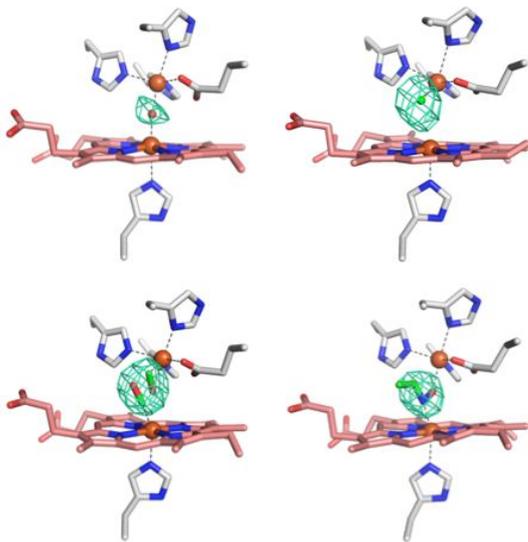


図2：緑膿菌由来 NOR の活性中心の構造。(左上)酸化鉄休止型、(右上)還元鉄型、(左下)還元鉄-酸化炭素結合型、(右下)還元鉄アセトアルドキシム結合型

元鉄型、還元鉄-酸化炭素結合型、還元鉄アセトアルドキシム結合型などの様々な状態の結晶構造を明らかにした(図2)。NORの活性中心は、ヘム鉄と非ヘム鉄の複核錯体で形成されており、ここへNO₂分子が配位する事により反応は開始すると考えられてきた。その配位に仕方には、3種類の構造が提案されてきた(図3)。我々の明らかにした結晶構造からは、trans-機構がもっとも可能な機構であると提案した。一方、我々の構造を基にした量子化学的理論計算では、cis-heme b₃-機構が最もあり得るとしている。そこで、この論争に決着をつけるために、現在、この反応中間体の電子状態、配位構造を直接観測する事が可能な、時分割赤外分光装置の開発を行っている。さらに、将来は、X線自由電子レーザー-SACLA を用いて、時分割結晶構

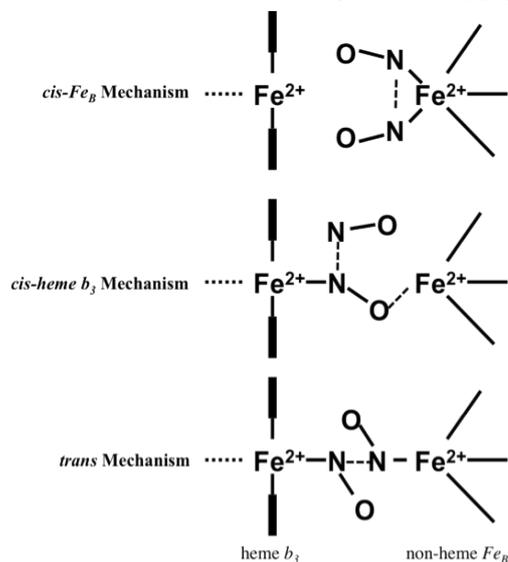


図3：NORの反応中に現れる短寿命反応中間体の推定構造

造解析を行う事も計画している。

(3) NOR 発現系の構築

の目的を達成するためには、酵素の活性中心の構造、特に金属の配位構造を変異させる必要がある。そのためには、微生物を宿主として NOR を発現させる系を構築し、遺伝子レベルでの変異導入、部位特異的変異導入を可能としなければならない。研究開始当初から、通常の方法で、大腸菌を宿主とする NOR 発現系の構築を目指した。しかし、野生型酵素(何の変異も導入されていない酵素)は単離精製できるものの、全く酵素活性を示さなかった。

そこで、東京大学農学部応用微生物学研究室の新井博之先生との共同研究により、緑膿菌を宿主とする NOR 発現系を構築した。新井先生が作成した、ゲノム上の NOR 遺伝子を破壊した緑膿菌に、新たに NOR をコードしたプラスミドを導入することにより、活性な野生型 NOR を精製することに成功した。現在はこの系を用いて、NOR 変異体の作成を開始した。

(4) 脱窒系酵素群による連続反応場の形成

脱窒において、亜硝酸還元酵素 Nitrite Reductase: NiR が NO₂ を還元して NO を產生している。



NOR は、產生された NO を細胞内に拡散させないように、速やかに無毒化している(式1)。実際、NOR 遺伝子を破壊した緑膿菌は全く生存できず、そこに NOR 遺伝子を導入すると、再び生育できた。この結果は、脱窒における NOR の重要性を示すと同時に、水溶性タンパク質である NiR から膜タンパク質である NOR へ、どのような機構で NO が受け渡されているのかが疑問であった。異なる視点で見れば、2つの酵素による NO₂ から N₂O へ直接変換する連続反応場が構築されているように見受けられた。

そこで、Nir と NOR の共結晶を作製し、X

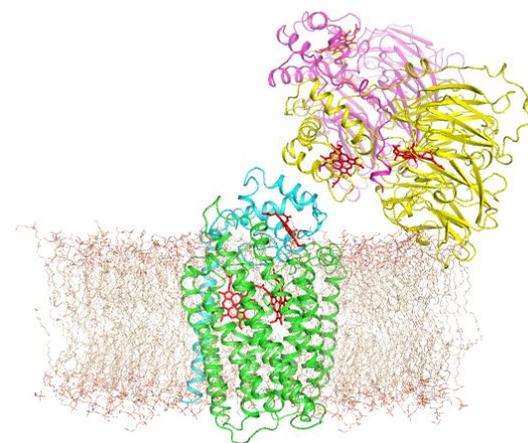


図4：NOR(緑と水色)とNiR(黄色とマゼンダ)の複合体の構造

線結晶構造解析により、両酵素複合体の構造を得る事に成功した(図4)。この構造から得られたNiRとNORの接触界面の変異体を緑膿菌に導入すると、菌の生育は遅くなった。脱窒(嫌気呼吸)系における初めての複合体解析に成功し、生体系における連続反応場構築を直接的に観測する事ができた。

(5) 共同研究

我々は、本新学術研究において、阪大工学部の林研究室との人工金属酵素の構築に関する共同研究と阪大薬学部の有坂研究室とのヘム型二原子酸素添加酵素の阻害剤開発の共同研究においても成果をあげている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

E. Terasaka, N. Okada, N. Sato, Y. Sako, Y. Shiro, T. Toshi: "Characterization of Quinol-Dependent Nitric Oxide Reductase from *Geobacillus Stearothermophilus*:"

Enzymatic Activity and Active Site Structure" Special Issue on *Respiratory Oxidases in Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* **1837**, 1019-1026 (2014) doi: 10.1016/j.bbabi.2014.02.017 査読有り

C. Shirataki, O. Shoji, M. Terada, S. Ozaki, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe: "An *in vivo* Inhibitory Effect on the Heme Uptake of *Pseudomonas aeruginosa* by Its Hemophore (HasAp) Carrying Synthetic Metal Complexes" *Angw. Chem. Int. Ed.* **53**, 2862-2866 (2014) doi: 10.1002/anie.200 査読有り

N. Sato, S. Ishii, H. Sugimoto, T. Hino, Y. Fukumori, Y. Sako, Y. Shiro, T. Toshi: "Structures of Reduced and Ligand-Bound Nitric Oxide Reductase Provide Insights into Functional Differences in Respiratory Enzymes" *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* **82**, 1258-1271 (2014) doi: 10.1002/prot.24492 査読有り

A. Onoda, Y. Okamoto, H. Sugimoto, Y. Takano, S. Hirota, D. Kurtz, Y. Shiro, T. Hayashi: "Crystal Structure, Exogenous Ligand Binding and Redox Properties of an Engineered Diiron Active Site in a Bacterial Hemerythrin" *Inorg. Chem.* **52**, 13014-13020 (2013) doi: 10.1021/ic401632x 査読有り

A. V. Pislakov, T. Hino, Y. Shiro, Y. Sugita: "Molecular Dynamic Simulations Reveal Proton Transfer Pathways in Cytochrome C-Dependent Nitric Oxide Reductase" *POLS Comp. Biol.* **8**, e1002674 (2012) doi: 10.1371/journal.pcbi.1002674 査読有り

R. Makino, S. Yazawa, H. Hori, Y. Shiro: "Interactions of Soluble Guanylate Cyclase with a P-Site Inhibitor: Effects of Gaseous Heme Ligands, Azide, and Allosteric Activators on the Binding of 2'-Deoxy-3'-GMP" *Biochemistry* **51**, 9277-9289 (2012) doi:

dx.doi.org/10.1021/bi3004044 査読有り

Y. Matsumoto, T. Toshi, 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.* **19**, 238-245 (2012) doi: 10.1038/nsmb.2213 査読有り

T. Fujishiro, O. Shoji, S. Nagano, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe: "Crystal Structure of H₂O₂-dependent Cytochrome P450_{SPα} with Its Bound Fatty Acid Substrate: Insight into the Regioselective Hydroxylation of Fatty Acids at the a Position" *J. Biol. Chem.* **286**, 29941-29950 (2011) doi: 10.1016/j.ijms.2010.08.029 査読有り

R. Makino, S.-Y. Park, E. Obayashi, T. Iizuka, H. Hori, Y. Shiro: "Oxygen Binding and Redox Properties of the Heme in Soluble Guanylate Cyclase: Implications for the Mechanism of Ligand Discrimination" *J. Biol. Chem.* **286**, 15678-15687 (2011) doi:

10.1074/jbc.M110.177576 査読有り

T. Hino, Y. Matsumoto, S. Nagano, H. Sugimoto, Y. Fukumori, T. Murata, S. Iwata, Y. Shiro: "Structural Basis of Biological N₂O Generation by Bacterial Nitric Oxide Reductase" *Science* **330**, 1666-1670 (2010) doi:10.1126/science.1195591 査読有り

[学会発表](計 14 件)

Shiro, Y.: "Generation, Channeling and Decomposition of NO in Bacterial System" "Metals in Biology" *Gordon Research Conference*, Ventura, USA, Jan. 25-30 (2015)

Shiro, Y.: "Generation, Propagation and Decomposition of Nitric Oxide in Bacterial Denitrification" *18th European Bioenergetics Conference (EBEC 2014)*, Lisbon, Portugal, July 12-17 (2014) **Plenary Lecture**

Shiro, Y.: "Bacterial Nitrite Reductase and Nitric Oxide Reductase; NO Generation, Channeling and Decomposition" *Eighth International Conference on Porphyrins and Phtalocyanines*, Istanbul, Turkey, June 22-27 (2014)

Shiro, Y.: "Functional Characterization of Some Hemoproteins Based in Their Molecular Structures" *Symposium on "Modern Trends in Inorganic Chemistry"*, Roorkee, India, Dec. 13-16 (2013) **Plenary**

Lecture

Shiro, Y.: "Fungal and Bacterial Nitric Oxide Reductases: Structures and Functions" *18th International Conference on Cytochrome P450; Biochemistry, Biophysics and Structure*, Seattle, USA, June 18-22 (2013)

Shiro, Y.: "Functional Characterization of Some Hemoproteins Based on Their Molecular Structures" *The First International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2012)*, Tokyo, Nov. 28-30 (2012)

Shiro, Y.: "Functional Characterization of Some Hemoproteins Based on Their Molecular Structures" *The 6th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC6)*, Hong Kong, Nov. 5-8 (2012)

Plenary Lecture

Shiro, Y.: "Structural Basis for NO Reduction by Bacterial Nitric Oxide Reductases" *17th European Bioenergetics Conference 2012 (EBEC 2012)*, Freiburg, Germany, Sept. 15-20 (2012)

Shiro, Y.: "Molecular Structures and Mechanism of Bacterial Nitric Oxide Reductase" *15th International Conference of Biological Inorganic Chemistry*, Vancouver, Canada, August 7-12 (2011) **Keynote Lecture**

Lecture

Shiro, Y.: "Molecular Structures and Mechanism of Bacterial Nitric Oxide Reductase" *Seventh International Conference on Porphyrins and Phtalocyanines*, Jeju, Korea, July 1-6 (2012)

Shiro, Y.: "Molecular Structures and Mechanism of Bacterial Nitric Oxide Reductase" *Mini-symposium on "Proton Transport across Biological Membranes" of the Royal Swedish Academy of Sciences*, Stockholm, Sweden, June 14 (2011)

Shiro, Y.: "Structural Basis for Nitrous Oxide Generation by Bacterial Nitric Oxide Reductases" *Royal Society Theo Murphy Meeting*, Buckinghamshire, UK, May 23-24 (2011)

Shiro, Y., Nakamura, H., Ito, Y., Sugimoto, H.: "Two-Component Regulatory System: Cellular Signal Transduction Systems Sensing Exogenous Stimuli" *2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies*, Honolulu, USA, Dec. (2010).

Shiro, Y., Hino, T., Matsumoto, Y., Nagano, S., Sugimoto, H., Tosha, T.: "Nitric Oxide Reductases: Chemistry of N-O bond Cleavage and N-N Bond Formation" *Sixth International Conference on Porphyrins and Phtalocyanines*, New Mexico, USA, July 4-9 (2010)

[図書] (計 10 件)

H. Sugimoto, O. Takikawa, Y. Shiro:

"Tryptophan Catabolism by Heme Dioxygenases" in *Handbook of Porphyrin Science* (K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard, Eds.) Vol. 5, Chapter 24, pp.71-122 (2010)

Y. Shiro, S. Nagano: "NO Chemistry by Heme-Enzyme" in *Handbook of Porphyrin Science* (K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard, Eds.) Vol. 5, Chapter 25, pp.123-163 (2010)

日野智也、城 宜嗣: "一酸化窒素還元酵素 NOR —呼吸酵素の分子進化と温室効果ガスの産生メカニズム—" *化学*, Vol 66, pp.30-35 (2011)

Y. Shiro, H. Sugimoto, T. Tosha, S. Nagano, T. Hino: "Structural Basis for Nitrous Oxide Generation by Bacterial Nitric Oxide Reductases" the Proceedings of the Royal Society Meeting 'Nitrous oxide, the forgotten greenhouse gas', *Philosophical Transactions B, The Royal Society* **367**, 1195-1203 (2012)

日野智也、當舎武彦、城 宜嗣: 「一酸化窒素還元酵素の結晶構造から見えてきた呼吸酵素の機能変換」 *生物物理*, Vol 52, pp. 186-189 (2012)

H. Sugimoto, Y. Shiro: "Diversity and Substrate Specificity in the Structures of Steroidogenic Cytochrome P450 Enzymes" *Biol. Pharm. Bull.* **35**, 818-823 (2012)

T. Tosha, Y. Shiro: "Crystal Structures of Nitric Oxide Reductases Provide Key Insights into Functional Conversion of Respiratory Enzymes" *IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) Life* **65**, 217-226 (2013)

日野智也、松本悠史、當舎武彦、杉本 宏、永野真吾、城 宜嗣: 「一酸化窒素還元酵素の結晶構造と呼吸酵素の分子進化」 *化学と生物*, 10月号 (2013)

澤井仁美、城 宜嗣: 「サイトグロビンの分子構造」 *細胞*, Vol 45, pp.9-12 (2013)

藤井 浩、城 宜嗣: "鉄タンパク質・酵素の構造と機能" *鉄の事典* 朝倉書店 (2014)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

特になし

取得状況 (計 0 件)

特になし

[その他]

ホームページ等

<http://www.riken.jp/biometal/index.htm>

<http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/regulation/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

城 宜嗣 (SHIRO, Yoshitsugu)

理化学研究所・主任研究員

研究者番号：70183051