

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02064

研究課題名(和文)核共鳴散乱分光を駆使した鉄複核中心と気体分子の化学の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the chemistry of gaseous molecule at iron binuclear center using nuclear resonance spectroscopies

研究代表者

當舎 武彦 (Tosha, Takehiko)

兵庫県立大学・理学研究科・教授

研究者番号：00548993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヘム鉄および非ヘム鉄からなる複核活性中心において、一酸化窒素(NO)の還元反応を触媒する膜結合型NO還元酵素(NOR)の反応機構解明を目指した。還元型NORと光照射によりNOを発生するケージドNOを混合・凍結し、液体窒素温度で紫外光照射を行いケージドNOの低温光解離を促した。その後、温度制御を行うことでNOが試料中を拡散し、反応中間体が捕捉できることを見出した。そして、電子スピン共鳴分光によりNORの最初の反応中間体は、非ヘム鉄にNOが結合した状態であることを明らかにした。また、同手法を放射光を用いた振動分光である核共鳴非弾性散乱(NRVS)測定に適用し、反応中間体の化学種に関する情報を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NORによるNO還元には、鉄へのNOの結合、電子移動、プロトン輸送、化学結合の形成(N-N結合)および開裂(N-O結合)といった、化学反応の基礎が詰め込まれており、その反応機構を理解することは、化学反応の本質の理解に迫るものである。酵素そのものを使って、反応中間体を捕捉・解析した本成果は、近年、主流となっているNORの理論研究やモデル錯体を用いた研究に対して一石を投じるものであり、今後の反応機構の理解に大きく貢献する。また、NORは、病原菌の感染や地球環境とも関連が深いため、その反応機構の理解は、これらの研究分野を含む多くの他分野への影響が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to elucidate the molecular mechanism of nitric oxide reductase (NOR) whose active site is composed of heme and non-heme iron. Reduced NOR was mixed with caged NO, which releases NO upon UV illumination, followed by the illumination under liquid nitrogen temperature to induce the photolysis of caged NO. Subsequent thermal annealing enables NO to diffuse and react with reduced NOR, producing reaction intermediates. The characterization of first reaction intermediate by ESR spectroscopy revealed that the first reaction intermediate can be a non-heme Fe-NO species. The trapped reaction intermediate was also analyzed by synchrotron-based vibrational spectroscopy, nuclear resonance vibrational spectroscopy (NRVS), to get more insights into the chemical structure of the reaction intermediate.

研究分野：生物無機化学

キーワード：金属酵素 一酸化窒素 ヘム 反応中間体 核共鳴非弾性散乱 低温光解離 ケージド化合物

1. 研究開始当初の背景

生体内に存在するタンパク質の 3 割程度を占める金属タンパク質は、種々の生理反応に関わり生物の恒常性維持に寄与している。中でも金属酵素は、生体内の温和な条件下で、試験管内では行うことが困難な化学反応をいとも簡単にやってのける。このような金属酵素の作動原理の本質の理解は生物無機化学分野の長年の夢である。そのためには、金属酵素の触媒反応中に形成される反応中間体の電子構造や原子構造を決定し、その反応性を理解する必要がある。

我々がこれまで研究に取り組んできた膜結合型一酸化窒素還元酵素 (NOR) は、長年の研究にも限らず、その反応機構に決着がついていない。NOR は、ヘム鉄と非ヘム鉄からなる複核活性中心において、二分子の NO を二当量の電子とプロトンを巧妙に利用することで、亜酸化窒素 (N_2O) へと還元・無毒化する (図 1)。この触媒反応には、気体分子の金属への配位、電子移動、プロトン化などの化学反応の基礎が詰めこまれており、金属酵素による化学反応の本質を理解するうえで絶好の対象である。また、NOR は、強力な温室効果ガスである N_2O の主要な発生源であり我々が抱える地球の環境問題とも関連が深い対象である。NOR の反応機構については、いくつかの提案があるものの、いずれも決定打にかけており (Moënne-Loccoz, *Nat. Prod. Rep.* 2007, 24:610、Takeda et al. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2020, 93:825-)、豊富なケミストリーを含む金属と NO の化学的理解のためにも、その詳細な反応機構の解明が望まれている。

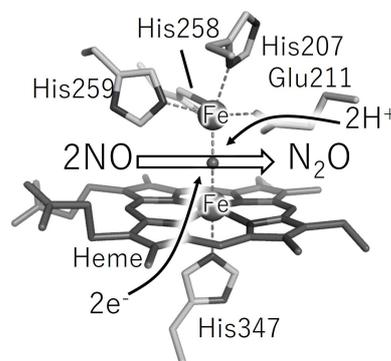


図 1. NOR の活性部位の構造。

2. 研究の目的

本課題では、金属酵素の反応中間体の構造を精密に決定する手法を新たに構築し、NOR による NO 還元反応について、反応中間体の構造を電子・原子レベルで決定することで、その反応機構を明らかにする、ことを目的とする。

3. 研究の方法

我々は、NOR の反応機構を解明するために、光照射により NO が発生するケージド NO を時間分解分光計測に用いるといった独自の系を利用することで、マイクロ秒からミリ秒の時間領域で、二分子の NO が段階的に NOR の活性部位に結合し、二つの中間体を経由して NO 還元が起こるということを報告している (Takeda et al. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2020, 93:825-) (図 2)。本課題では、NOR の反応中間体を捕捉する方法として、上述したケージド化合物を用いた手法を発展させる。具体的には、NOR とケージド NO を混合した試料に液体窒素温度で光照射し、ケージド化合物の光解離 (クライオフォトリシス) を誘起する。その後、試料を昇温 (アニーリング) することで、NO の拡散を促し、NOR の反応を徐々に進行させ、中間体を捕捉する (図 3)。

はじめに、ケージド NO のクライオフォトリシスとアニーリングにより予備的な結果が得られている電子スピン共鳴 (EPR) 分光法を利用し、アニーリング温度や時間、溶液条件を変えて測定を行うことで、それぞれが蓄積する条件を探索し、中間体の生成を制御可能にする。中間体 2 の蓄積が期待されるプロトン輸送が抑制された NOR 変異体も活用し、効率良く反応中間体が捕捉できる条件を探索する。

捕捉した NOR の反応中間体の活性部位の構造解析では、鉄の酸化状態やスピン状態によらず、鉄と配位子間の振動モードを観測することが可能な核共鳴非弾性散乱 (NRVS) を利用する。NRVS 測定では、NOR の鉄を同位体 (^{57}Fe) 置換する必要があるため、 ^{57}Fe 置換した NOR の調製を行う。NOR を得るための緑膿菌の嫌気培養では、 FeCl_3 を唯一の鉄源とする培地を用いるので、 FeCl_3 のかわりに鉄の同位体 (^{57}Fe) を酸に溶解したものを培地に添加することで、 ^{57}Fe 置換

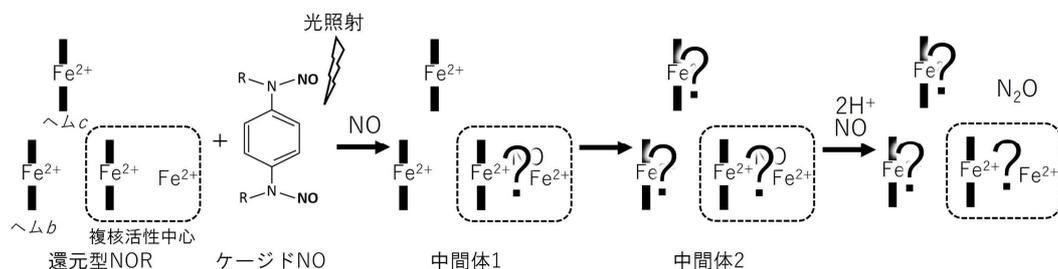


図 2. ケージド NO を用いた時間分解構造解析から提案している NOR の反応機構。

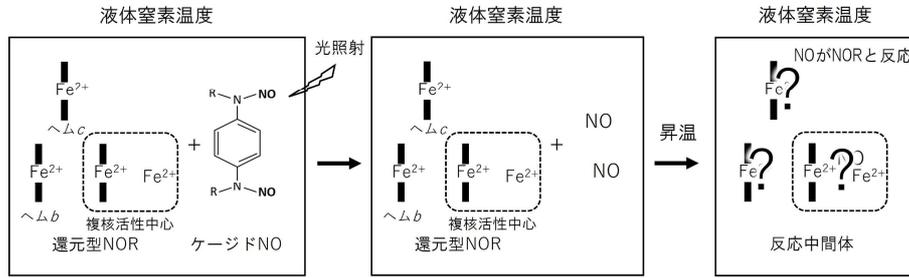


図 3. 本研究で用いるケージド NO の低温光解離（クライオフォトリス）とアニーリングの概要。

された NOR を調製する。同位体置換 NOR が調製できれば、嫌気グローブボックス内で還元し、余剰の還元剤を除去した後、ケージド NO と混合する。試料を NRVS 測

定用セルに導入し、液体窒素で凍結する。この際には、同位体 (^{15}N) ラベルされたケージド NO を用いた試料も調整する。

準備した試料に、液体窒素中で紫外光を照射し、ケージド NO からの NO の光解離を促す。NRVS セル用にホルダを開発し、クライオスタットを用いて、先に決定した NOR の反応中間体の捕捉条件に基づいてアニーリングを行い、反応中間体を捕捉する。SPRING-8 の BL19LXU にて、NRVS 測定を行い、ケージド NO の同位体を用いた場合との比較から、Fe と NO 間の伸縮振動について帰属を行い、反応中間体の構造を議論する。

4. 研究成果

ESR 分光を用いて、ケージド NO のクライオフォトリスとアニーリングによる反応中間体の捕捉条件の検討を行った。低温下でのケージド NO の光解離に関しては、1 時間程度紫外光を照射すれば十分な光解離が起こることがわかった。アニーリング実験では、160 K への昇温で、 g 値が ~ 4 を示すシグナルが得られた (図 4)。このシグナルは、これまでの非ヘム鉄酵素やモデル錯体の研究との比較から、NOR の活性部において、還元状態の非ヘム鉄に NO が配位した化学種が形成していることを示唆している。過去の時間分解赤外分光計測において、第一反応中間体は、非ヘム鉄に NO が結合した状態であることが示唆されており、160 K への昇温で第一反応中間体が形成したものと考えられる。この第一反応中間体の形成は、160-180 K への昇温で、その蓄積が最大になることが示された。そして、190 K まで昇温すると第一中間体に由来するシグナルが減衰することがわかった。更に昇温を続けると 260 K 付近でヘムの酸化がみられ、NO 還元反応が完了したことが示された (図 4) (Takeda et al. *J. Phys. Chem. B*, 2023, 127:846-)。このように、ESR 分光では、第二中間体由来すると考えられる明確なシグナルを観測することはできなかった。第二中間体により蓄積すると考えられているプロトン輸送を抑制した NOR 変異体を用いた場合も、結果は野生型と同様であり、第二中間体のシグナルを観測することができなかった。これらの結果は、第二中間体は ESR 分光においてシグナルを示さない化学種の可能性を示唆している。

反応中間体の化学構造を決定するために、本研究では、放射光を利用した振動分光である NRVS を用いる。はじめに、NRVS 測定に必要な試料の濃度や体積、積算時間などを決定するために、同位体 (^{57}Fe) 置換した NOR の還元型に

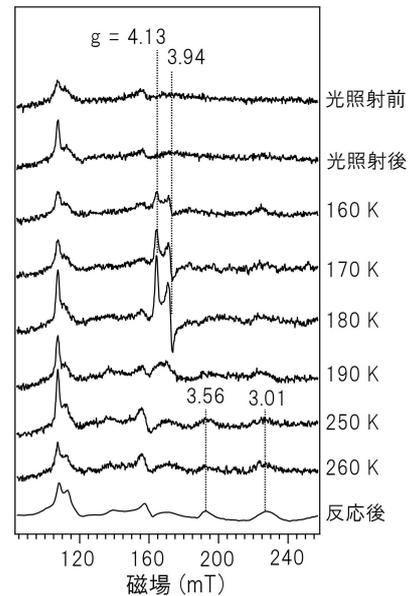


図 4. ケージド NO のクライオフォトリスおよびアニーリングにより捕捉した反応中間体の ESR 分光測定結果。

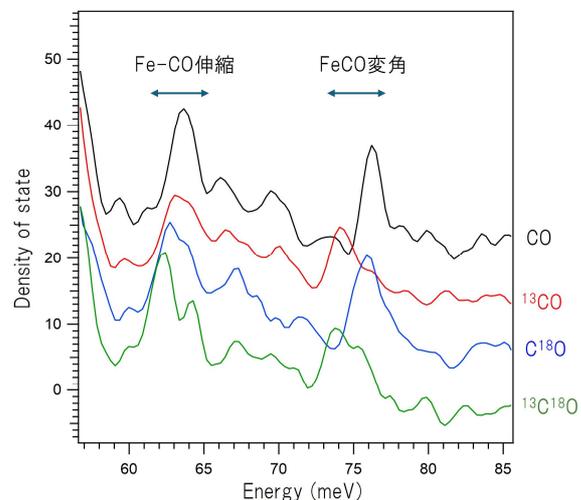


図 5. NOR の還元 CO 型の NRVS スペクトル。

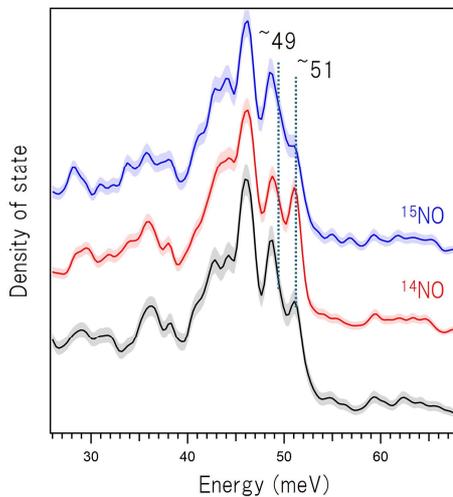


図6. ケージドNOのクライオフォトリスとアニーリングにより捕捉したNOR反応中間体のNRVSスペクトル。

射し、専用に設計したクライオスタット用ホルダを用いて 170 K への昇温を行った。ESR 測定に結果に基づけば、本状態は反応中間体 1 の状態であるといえる。この試料について、SPring-8 の BL19LXU において、NRVS 測定を行った。その結果、光照射を行った際に増大するシグナルが観測できており(図6)鉄とNO間の振動モードが観測できていると推察された。同位体(^{15}N)ラベルされたケージドNOを用い際に、本シグナルの低エネルギー側へのシフトが観測されており、51 meV 付近に観測されたシグナルを反応中間体 1 における Fe-NO 伸縮振動と帰属した。

CO を結合させ、Fe-CO 伸縮や変角振動に由来するシグナル強度を観測した。数百マイクロ M の試料を 50 マイクロ L 程度使うことで、およそ 1 日間の測定を行うことで、図5に示すような Fe-CO 伸縮および変角振動に帰属されるシグナルが観測され、同様の条件で反応中間体に由来するシグナルも観測できるのではないかと推察された。また、得られた振動数の値は、共鳴ラマン分光から明らかにされている値 (Terasaka et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, 1837:1019-) と類似しており、同位体(^{57}Fe)置換した NOR が問題なく調製できていることも確認できた。

NOR の反応中間体についても NRVS による活性部位の構造の検討に取り組んだ。同位体(^{57}Fe)置換した NOR の還元型を調製し、嫌気グローブボックス内で還元し、ケージドNOと混合した試料を NRVS セルに導入し凍結した。通常、NRVS セルのカバーには、X線の吸収が少ないカプトンフィルムを用いるが、紫外光照射が必要な本実験では、紫外光を透過し、X線の吸収が少ないビニルアルコール・エチレン共重合体のフィルムを利用した。凍結した試料に液体窒素中で紫外光を照

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nakamura Hiro, Hisano Tamao, Rahman Md. Mahfuzur, Tosha Takehiko, Shirouzu Mikako, Shiro Yoshitsugu	4. 巻 119
2. 論文標題 Structural basis for heme detoxification by an ATP-binding cassette-type efflux pump in gram-positive pathogenic bacteria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2123385119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Rose Samuel L., Baba Seiki, Okumura Hideo, Antonyuk Svetlana V., Sasaki Daisuke, Hedison Tobias M., Shanmugam Muralidharan, Heyes Derren J., Scrutton Nigel S., Kumasaka Takashi, Tosha Takehiko, Eady Robert R., Yamamoto Masaki, Hasnain S. Samar	4. 巻 119
2. 論文標題 Single crystal spectroscopy and multiple structures from one crystal (MSOX) define catalysis in copper nitrite reductases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2205664119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Nishida, Yanagisawa, Morita, Shigematsu, Shinzawa-Itoh, Yuki, Ogasawara, Shimuta, Iwamoto, Nakabayashi, Matsumura, Kato, Gopalasingam, Nagao, Qaqorh, Takahashi, Yamazaki, Kamiya, Harada, Mizuno, Takahashi, Akeda, Ohnishi, Ishii, Kumasaka, Murata, Muramoto, Tosha T., Shiro, Honma, Shigeta, Kubo, Takashima, Shintani	4. 巻 13
2. 論文標題 Identifying antibiotics based on structural differences in the conserved allostery from mitochondrial heme-copper oxidases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-34771-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takeda Hanae, Shimba Kanji, Horitani Masaki, Kimura Tetsunari, Nomura Takashi, Kubo Minoru, Shiro Yoshitsugu, Tosha Takehiko	4. 巻 127
2. 論文標題 Trapping of a Mononitrosyl Nonheme Intermediate of Nitric Oxide Reductase by Cryo-Photolysis of Caged Nitric Oxide	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 846 ~ 854
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jpcc.2c05852	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumura Hirotoshi, Faponle Abayomi S., Hagedoorn Peter-Leon, Tosha Takehiko, de Visser Sam P., Moenne-Loccoz Pierre	4. 巻 231
2. 論文標題 Mechanism of substrate inhibition in cytochrome-c dependent NO reductases from denitrifying bacteria (cNORs)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Inorganic Biochemistry	6. 最初と最後の頁 111781 ~ 111781
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jinorgbio.2022.111781	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nomura T., Kimura T., Kanematsu Y., Yamada D., Yamashita K., Hirata K., Ueno G., Murakami H., Hisano T., Yamagiwa R., Takeda H., Gopalasingam C., Kousaka R., Yanagisawa S., Shoji O., Kumasaka T., Yamamoto M., Takano Y., Sugimoto H., Tosha T., Kubo M., Shiro Y.	4. 巻 118
2. 論文標題 Short-lived intermediate in N2O generation by P450 NO reductase captured by time-resolved IR spectroscopy and XFEL crystallography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2101481118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kwon H., Basran J., Pathak C., Hussain M., Freeman S. L., Fielding A. J., Bailey A. J., Stefanou N., Sparkes H. A., Tosha T., Yamashita K., Hirata K., Murakami H., Ueno G., Ago H., Tono K., Yamamoto M., Sawai H., Shiro Y., Sugimoto H., Raven E. L., Moody P. C. E.	4. 巻 60
2. 論文標題 XFEL Crystal Structures of Peroxidase Compound II	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 14578 ~ 14585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202103010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nishinaga Megumi, Sugimoto Hiroshi, Nishitani Yudai, Nagai Seina, Nagatoishi Satoru, Muraki Norifumi, Tosha Takehiko, Tsumoto Kouhei, Aono Shigetoshi, Shiro Yoshitsugu, Sawai Hitomi	4. 巻 4
2. 論文標題 Heme controls the structural rearrangement of its sensor protein mediating the hemolytic bacterial survival	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-01987-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 9件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Takehiko Tosha
2. 発表標題 NO reduction chemistry at heme/non-heme binuclear active center proved by methods using photo-sensitive caged NO
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takehiko Tosha
2. 発表標題 Mechanism of biological nitric oxide reduction proved by time-resolved structural analysis
3. 学会等名 REDOX WEEK IN SENDAI 2022, 4th International conference on persulfide and sulfur metabolism in biology and medicine (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 T. Tosha, H. Takeda, Y. Shiro, M. Kubo
2. 発表標題 Elucidation of Mechanisms for Catalytic Reaction of Nitric Oxide Reductases by Time-resolved Techniques
3. 学会等名 International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP)-12 (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tosha T., Takeda H., Shiro Y., Kubo M.
2. 発表標題 Time-resolved techniques provide mechanism for nitric oxide reduction by nitric oxide reductase
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 當舎武彦
2. 発表標題 光解離性ケージド基質を利用した一酸化窒素還元酵素の反応機構の解明
3. 学会等名 第94回日本生化学大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 城 宜嗣、澤井仁美、當舎武彦	4. 発行年 2021年
2. 出版社 NTS出版	5. 総ページ数 13
3. 書名 第4章、第2節 生体鉄の分子科学と細胞生物学、“生命金属ダイナミクス 生体内における金属の挙動と制御”	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>反応途中の酵素を観る新手法の開発 https://www.riken.jp/press/2023/20230111_2/index.html</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	堀谷 正樹 (Horitani Masaki) (80532134)	佐賀大学・農学部・准教授 (17201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	Diamond Light Source	University of Liverpool	University of Essex	他3機関
英国	University of Liverpool	University of Essex	Diamond Light Source	他2機関