

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22770163

研究課題名（和文） 計算機シミュレーションによる一酸化窒素還元酵素の機能解析

研究課題名（英文） Understanding the functioning of the respiratory enzyme nitric oxide reductase through computer simulations

研究代表者

ピシリアコフ アンドレイ (PISLIAKOV ANDREI)

独立行政法人理化学研究所・杉田理論生物化学研究室・国際特別研究員

研究者番号：70565770

研究成果の概要（和文）：一酸化窒素還元酵素（cNOR と qNOR タイプ）の野生型と変異型について分子動力学シミュレーションを行い、活性中心へのプロトン輸送経路を予測した。本研究成果は、NOR がプロトンを取り込む仕組みに加え、呼吸系酵素の分子進化について新たな知見を与えた。

研究成果の概要（英文）：

We investigated proton pathways in nitric oxide reductases (cNOR and qNOR types), both in wild-type proteins and *in silico* mutants. Results provide insights into proton uptake mechanism of NORs and shed light on molecular evolution of respiratory enzymes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード: membrane proteins, respiratory enzymes, nitric oxide reductase, MD simulation, water dynamics, proton transfer

## 1. 研究開始当初の背景

窒素化合物の還元（脱窒）は、好気性呼吸に代わるものとして主に細菌によって行われる嫌気的な過程である。細胞質の皮膜組織にある一酸化窒素還元酵素（NOR）は、脱窒に含まれる過程のうち最も重要な段階である、

一酸化窒素（NO）の一酸化窒素（ $N_2O$ ）への還元を触媒する。細菌のNORは脱窒の基本的な化学過程と関わっており、大気に放出される $N_2O$ 、温室効果ガス、そしてオゾン層破壊物質の排出源でもある。NORは、ヘム銅酸化酵素ファミリー（HCOs）に属する。HCOsには、プロトンポンプとして働く異なるタイプのチ

トクロームc酸化酵素(タイプA1、A2、B、C)も含まれており、その各々でプロトン輸送/ポンプのメカニズムは異なる。NORとCcOは共通の祖先をもち、それらの進化は密接に関連していると考えられている。未だ議論の余地があるものの、元々はNOの還元に含まれていた酸化酵素が、後に酸素の還元に関わるようになりプロトンポンプ機能を獲得したと考えられる。バクテリアのNORによるNO還元反応のメカニズムについて知られていることは極めて少ない。近年、城らにより世界で初めてNOR(cNOR: *Ps. aeruginosa*、qNOR: *G. stearothermophilus*)のX線結晶構造が解かれた。分子シミュレーションを用いたNO還元メカニズムを分子レベルで明らかにする。

## 2. 研究の目的

本研究は、分子シミュレーションによりNORの構造-機能相関を明らかにし、その機能の理解を深めることを目的とする。

### (1) プロトン輸送経路

触媒サイトへのプロトン輸送はNOR機能で重要な部分を占める。NO還元を行うためには、皮膜内部に埋め込まれている二核中心へプロトンを運ばなければならない。cNORに関する以前の実験は、触媒反応に用いられるプロトンはペリプラズム側(電子と同じ側)より取り込まれること示す。つまり、NO還元反応は非起電性であり、cNORはプロトンポンプとしての機能をもたない。qNORの実験データは得られていない。しかし、アミノ酸配列と補因子の配置の類似性から、qNORもcNORと同様のプロトン輸送を行っていると考えられる。そこで我々は、両NORのプロトン輸送経路を特定することを最初の目標として掲げた。

### (2) 変異体

実験的な変異解析のデータを用いて我々の計算結果の妥当性を検証することができる。まず、実験に対応する変異体のシミュレーションを行い、既存の実験データを説明しなければならない。次に、プロトン輸送経路と残基に関する初歩的な知見を裏付けるNOR変異体を見つけることを目標に掲げた。さらに、既存のプロトン輸送経路をブロックする、あるいは新しい経路をつくる変異体を見つけることを目標とした。これらの予測は今後の変異解析に用いることができる。

### (3) 他のHCOとの比較(進化的側面)

最終目標として、NORとHCOスーパーファミリーに属する他の酵素の比較を掲げた。この比較は、呼吸系酵素のプロトンポンプやプロ

トン輸送経路の発達に関する有用な情報を与えるだけでなく、HCOsの分子進化の理解につながる情報を与える。C-およびA2型HCOsの代表的なメンバーであるcbb3とcaa3酸化酵素に特に注目した。低酸素条件下では、これらの酵素はNORsと同様にNOを $N_2O$ に還元することができる。また系統学的研究は、微好気cbb3酸化酵素がNORsと最も密接な進化的関連にあることを示唆する。

## 3. 研究の方法

(1) 静電力計算によりプロトン化状態を決定

2) MDシミュレーションによる水のダイナミクスとプロトン輸送経路の特定

プロトンを運ぶ上で、プロトンドナーとアクセプターの距離や配向は重要である。タンパク質の長距離プロトン輸送には、特異的なプロトン輸送経路が必要である。輸送経路には、プロトン結合サイトとなるイオン性アミノ酸残基や水分子が含まれる。脂質と溶媒を露に考慮した膜タンパク質のMDシミュレーションは、タンパク質内の水分子の位置やダイナミクス、水和状態について分子レベルでの情報を与える。我々は、cNORとqNORのX線結晶構造を用いて、これらの酵素のMDシミュレーションを行った。我々は水のダイナミクスに焦点を絞り、活性サイトへのプロトン輸送で経路となりうる水チャンネルと水素結合ネットワークを特定することを目的とした。シミュレーションに用いた系の大きさは大凡120,000-140,000原子である。

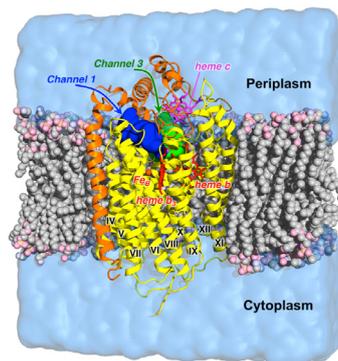


Fig.1: All-atom MD simulation system in cNOR.

(3) EVB法を用いたプロトン移動過程の計算

MDシミュレーションはプロトン輸送に重要な構造情報を与えるものの、結合の形成・切断を取り扱うことが出来ないために、プロトン移動反応そのものを説明することはできない。

そこで我々は経験的原子価結合法(EVB)を用いてプロトン移動過程の詳細を検討した。

この方法では、プロトン移動に関わる原子価結合状態に基づき構築した有効ハミルトニアンを用いてプロトン移動過程を記述することが出来る。

#### 4. 研究成果

##### (1) cNOR: ペリプラズムからのプロトン輸送経路

我々は、細胞膜/溶媒環境を露に考慮した cNOR の長時間全原子 MD シミュレーションを行った (300 ナノ秒)。タンパク質内の水の分布とダイナミクス、及び水素結合ネットワークを特定し、NOR 機能に重要なプロトンチャネルの詳細を原子レベルで明らかにした。シミュレーションの結果は、ペリプラズム側から 2 つのプロトン輸送経路が存在するのに対して細胞質側からの経路は存在しないことを示す。この結果は、cNOR がプロトンポンプとしては機能していないという実験結果と一致する。ペリプラズム側からの 2 つの経路は、チャネル内水分子の連続的な分布、動的な水素結合ネットワークの形成、チャネルに含まれるアミノ酸残基の特性によって支えられている。今回得られた経路の一つは、X 線構造中には見られない。この経路は結晶中の構造ではブロックされているが、局所的なアミノ酸残基の再配向により水チャネルを形成することがわかった。活性中心近くで重要な働きをするプロトン輸送について幾つかのメカニズムを提案した。

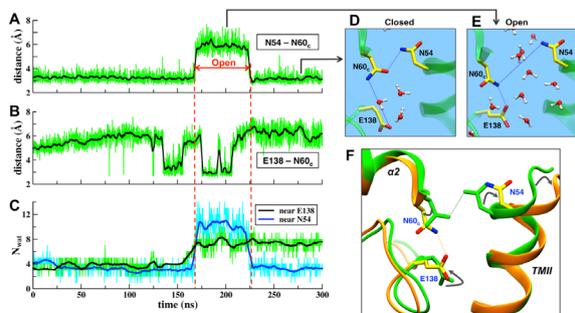


Fig.2: Gating of the periplasmic channel in cNOR.

##### (2) qNOR: 細胞質からのプロトン輸送経路

qNOR の X 線構造と MD シミュレーションの結果は、ともに細胞質側からのプロトン輸送経路が存在することを支持する。その経路は、aa3 酸化酵素の K 経路と空間的に一致する。MD シミュレーションの結果から、チャネルで水分子が連続的に分布しており安定な水素結合ネットワークを形成していることがわかった。この結果は qNOR が起電性であるこ

とを意味する。

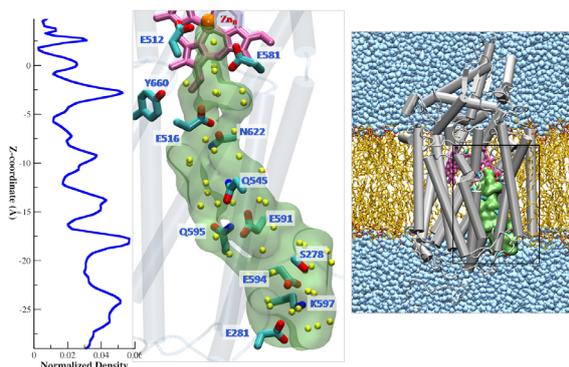


Fig.3: Cytoplasmic channel in cNOR occupies a position equivalent to K-pathway in oxidases.

##### (3) cNOR vs qNOR

我々の計算結果から、cNOR と qNOR の間に活性部位を含め高い構造類似性があるにも関わらず、プロトンを取り込むメカニズムが著しく異なることがわかった。

cNOR はペリプラズム側から、qNOR は細胞質側からプロトンを取り込む。cNOR (qNOR) のプロトン輸送経路付近の構造を qNOR (cNOR) の対応領域の構造と比較することで、NOR のプロトン輸送経路形成について新たな知見を得ることが出来る

##### (4) 変異の研究

cNOR 変異体の実験結果は、MD シミュレーションにより特定されたペリプラズム側の二つのプロトン輸送経路に対して、変異の著しい影響を受けることを示唆する。プロトン輸送経路における個々の残基の関与を検証するために、変異体の MD シミュレーションを行った。解析の結果は、プロトン輸送経路について我々が得てきた結果を裏付けるものであり、チャネルの入口、またはゲート領域にある特定の残基が重要であることを示す。さらに我々は、既存チャネルの阻害や新規チャネルの形成を選択的に行うことができ、酵素の新たな機能設計への可能性を見いだした。例えば、cNOR の変異体 (I244Q/F290E) のシミュレーションは、qNOR のチャネルに対応する領域に細胞質からの新しい水チャネルが形成されることを示唆する。分子進化過程をコンピュータ上“再構築”した例と言える。我々の理論予測は変異体の実験により直接的に検証される。

##### (5) cbb3 と caa3 酸化酵素の比較

実際の水分分布とプロトン輸送経路を対比す

る為に、我々は cbb3 と caa3 酸化酵素のシミュレーションも行った。cbb3 酸化酵素との比較では、幾つかの共通した構造的特徴を明らかにした。つまり、両者の Ca<sup>2+</sup> 結合部位の位置とプロトン輸送メカニズムは高い類似性を示す。K-経路は q NOR の細胞質チャネルと同等であり、機能性のペリプラズムキャビティは c NOR の一つの経路と同等であることがわかった。これらの結果は、NOR と C タイプ酸化酵素が進化の過程で深く関わっていることを示すと同時に、両酵素間の機能の変換関係を良く説明する。Cbb3 酸化酵素のチャネル 1 の損失は、恐らく、細胞質側のプロトン輸送経路を確立するまでの分子進化と深く関わっている。一方、プロトンポンプに対しては、低効率のチャネル 3 がプロトン排出経路として用いられてきた。これとは対照的に、caa3 酸化酵素では、K-チャネルを除き、まったく異なるプロトン輸送経路が存在する。A1/A2-types と NORs/C-types が早期に分離するとした系統発生的な予測と一致する。

我々の研究は、HCO スーパーファミリーに属する呼吸系酵素のプロトン輸送経路がどのように形成され、最終的にプロトンポンプ機能を獲得したかについて、一つの可能な道筋を示したと言える。これらの結果が、NOR メカニズムの解明に向けた今後の実験及び計算の基礎として役立つ事を願っている。

## 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 2 件)

① J. A. Lyons, D. Aragão, O. Slattery, A. V. Pisliakov, T. Soulimane, and M. Caffrey, Structural insights into electron transfer in caa3-type cytochrome oxidase. *Nature* (in press). [peer-reviewed]

② Y. Matsumoto, T. Tosha, A. V. Pisliakov, T. Hino, H. Sugimoto, S. Nagano, Y. Sugita, and Y. Shiro, Crystal structure of quinol-dependent nitric oxide reductase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Nature Structural and Molecular Biology*, Vol. 19, pp. 238-245 (2012). [peer-reviewed]

[学会発表] (計 4 件)

① A. V. Pisliakov, Computational studies of nitric oxide reductases, Biophysical

Society Annual Meeting, 2012/02/25, San Diego, CA, USA. (poster)

② A. V. Pisliakov, Mechanism of proton of proton uptake in nitric oxide reductases, Gordon Conference “Protons and Membrane Reactions”, 2012/02/20, Ventura, CA, USA. (poster)

③ A. V. Pisliakov, Computer simulations of proton transfer in cytochrome c oxidase and nitric oxide reductase, 8th European Biophysics Congress, 2011/08/25, Budapest, Hungary. (oral)

④ A. V. Pisliakov, Water dynamics and proton transfer in cNOR, Cold Spring Harbor Conference “Membrane Proteins: Structure and Function”, 2011/05/17, Suzhou, China. (oral)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

Best Poster Award at 2012 RIKEN SPDR and FPR Research Results Session, 2012/01/14, Wako-shi.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

ピシリアコフ アンドレイ (PISLIAKOV ANDREI)

独立行政法人理化学研究所・杉田理論生物化学研究室・国際特別研究員

研究者番号：70565770