

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月17日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770144

研究課題名（和文） 膜貫通型一酸化窒素還元酵素による亜酸化窒素生成機構の結晶構造学的解析

研究課題名（英文） Structural study on the generation mechanism of nitrous oxide by integral membrane protein nitric oxide reductase

研究代表者

日野 智也 (HINO TOMOYA)

鳥取大学・大学院工学研究科・講師

研究者番号：40373360

研究成果の概要（和文）：

バクテリア由来一酸化窒素還元酵素は、通性嫌気性細菌の嫌気呼吸の一種である硝酸呼吸において、一酸化窒素を亜酸化窒素へ還元する役割を担う膜タンパク質である。本研究では、反応の初期状態に当たる還元状態の結晶構造を決定した。その結果、休止酸化型構造と還元型構造では、ほとんどその構造に変化が起こらないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Bacterial nitric oxide reductase is a membrane integral enzyme that catalyzes the reduction of nitric oxide to nitrous oxide during the nitrate respiration, an anaerobic respiration of facultative anaerobic organisms. In the present study, I determined the crystal structure of nitric oxide reductase from *Pseudomonas aeruginosa* in the fully reduced state and revealed that no obvious structural changes were induced including active site upon reduction of all metal sites.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：金属タンパク質，膜蛋白質

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素還元酵素(NOR)は、多くの土壌バクテリアや病原菌が嫌気条件で行う硝酸呼吸において一酸化窒素を亜酸化窒素に還元する役割を担う呼吸酵素である。バクテリアが行う硝酸呼吸は、大気より土壌に取り込まれた窒素原子を再び大気へと戻す、唯一の生物反応であり、地球規模の物質循環の一つである窒素サイクルを完結させる意味で地球環境維持において非常に重要である。

バクテリア由来NORは膜結合性チトクロムcを含むサブユニット(NorC)と2分子のヘムb及び非ヘム鉄(Fe_B)を含むサブユニット

(NorB)から構成される分子量総計 70kDaのマルチサブユニット補因子複合体である。金属中心は全部で4つあり、そのうちNorBサブユニット中に存在するヘムb1分子(ヘム b_3)と Fe_B により活性中心が構成される。興味深いことに、NorBのアミノ酸配列及び金属活性中心の特徴は、好気呼吸において酸素を還元するチトクロム酸化酵素(COX)と良く似ており、このことからNORとCOXは分子進化的に非常に近縁な関係に有る事が示唆されている。

申請者は緑膿菌由来NORの結晶化に取り組み、NORに特異的に結合するモノクローナル抗体Fabフラグメントを用いることで、従来困難であった良質な結晶を作成することに

成功し、2.7 Å分解能で立体構造を決定するに至った。その結果、NorB サブユニットはCOX と非常に類似した構造を持ち、加えてNorC と NorB サブユニットの境界に存在するカルシウムの存在などから NOR は COX の中でも cbb3 型と非常に良く似た構造的特徴を示したことから、NOR と cbb3 型 COX の類縁関係を立体構造を基盤として確認することができた。さらに、従来より予測されていたように、ペリプラズム空間より活性中心近傍までつながるプロトン輸送経路を予測できるようになった。また、活性中心に存在する非ヘム鉄は、COX の銅イオンとは異なり、3つのヒスチジン残基と1つのグルタミン酸により形成される三角両錐型配位構造を持つことが明らかとなった。

しかしながら、非ヘム鉄とヘム b により形成される活性中心の空間は NOR の基質となる 2 分子の NO 分子が入り込むには狭小であり、結晶構造で明らかにした休止酸化型状態から還元型を含む反応中間状態のいずれかにおいて、2 分子の NO が受け入れられるような活性中心の構造変化が誘起されるのではないかと予測された。

2. 研究の目的

本研究では、反応中間状態において、予測されるような活性中心近傍の構造変化がおこるのかを検証することを目的とし、還元状態および基質アナログ結合状態の結晶構造の決定および、結合した基質アナログを電子密度マップ上で明瞭に検出するために結晶の分解能向上を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 還元型 NOR の結晶構造決定

NOR の還元型構造を解明することを目的として、酸化型結晶の再現性の向上と、還元剤を含む人工母液の検討を行った。また、人工母液への浸漬時間についても検討した。いくつかの条件において浸漬した結晶を Spring-8 BL41XU にて、回折データの収集を行い、既に構造決定した休止酸化型 NOR の構造をもとに分子置換法にて還元型構造を決定した。

(2) 分解能向上のための結晶化条件の検討

近年、膜タンパク質の結晶化に用いられる脂質キュービック相法を NOR に適用した。また、バイセルと呼ばれるディスク状の脂質二重層再構成した状態で結晶化を行う手法についても検討を行った。さらに、これまで結晶化に用いてきた抗体 Fab フラグメントを、異なる抗体クローン由来の Fv フラグメントに変更し、NOR-Fv フラグメン

ト複合体として結晶化スクリーニングを行った。

4. 研究成果

従来の NOR-Fab フラグメント複合体の結晶化においては、結晶形成の再現性が低い問題点があった。そこで、マイクロシーディング法を行って見たところ、非常に再現性よく結晶を作成することができるようになった。これにより、還元剤を含む人工母液への浸漬操作が順調に行えるようになった。還元剤については、アスコルビン酸および酸化還元メディエータとして TMPD を用いた場合と、ジチオナイト単独での還元条件において浸漬時間の検討を行った。その結果、アスコルビン酸と TMPD 混合溶液では、時間経過に伴う結晶の色の変化が見られなかったが、ジチオナイト単独での還元では、酸化型を示す濃い赤色から 10 分程度で NOR 還元型の特徴であるピンク色に変化したことから、結晶化条件においてはアスコルビン酸の還元力では不十分であり、ジチオナイトを用いる必要があることがわかった。ジチオナイトを用いて還元した結晶を、液体窒素を用いて凍結し、顕微分光装置を用いて吸収スペクトルを測定したところ、還元型に特徴的なスペクトル変化を観測できたため、結晶中で、NOR は還元状態であることを確認することができた。この結晶を用いて Spring-8 BL41XU にて回折データ測定を行い、2.7 Å分解能で還元型の構造決定を行うことができた。得られた構造の活性中心近傍について図 1 に示した。

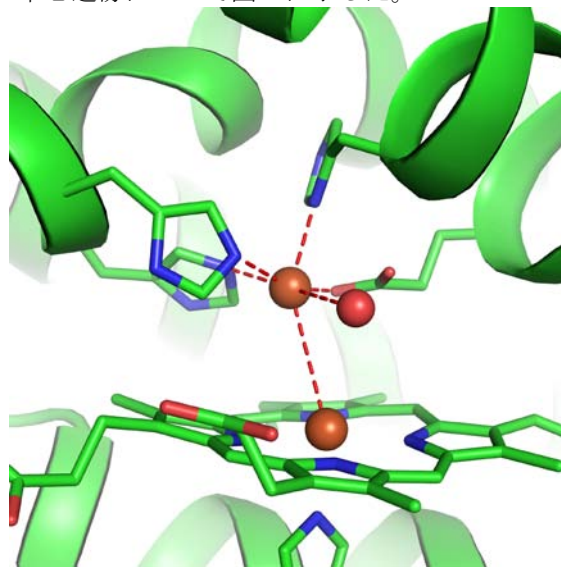


図 1 還元型 NOR の活性中心構造

休止酸化型状態では、非ヘム鉄とヘム b の鉄原子を架橋する酸素原子が観測されたが、今回得られた構造では、その酸素原子が検出されず、その代わりに非ヘム鉄に配位する水分

子と思われる電子密度が鉄に配位する Glu211 の近傍に検出された。このことは、今回の結晶構造は、活性中心の鉄原子は十分に還元された、還元状態であることを示唆する。しかしながら、鉄-鉄原子間の距離は 3.7 Å と酸化状態と同程度であり、予測されたような大きな変化は観測されなかった。

反応中間状態であるリガンド結合状態を詳細に解析するためには、リガンド分子を明瞭に認識できる程度の分解能の回折データが必要となる。これまでの結晶化条件では 2.5~2.6 Å が限界であるため、更なる分解能の向上を目指して、結晶化条件の探索を行った。近年、膜タンパク質の高分解能構造解析に成功している脂質キュービック相法が用いられている。この手法を NOR に適用してみたが、脂質と混合後、速やかに凝集を生じてしまったため、結晶化までには至らなかった。次に、バイセル法による結晶化を試みたところ、いくつかの条件で結晶を形成させることに成功したが、最大で 10 Å 程度の回折点しか観測できなかったため、構造決定までには達していない。しかしながら、さらに条件を検討することで分解能を向上させられる可能性は残されている。また、これまで用いていた抗体を変更し、異なるクローン由来の Fv フラグメントを調製し、その複合体の結晶化を行ったところ、初期スクリーニングにおいていくつかの条件から結晶を得ることに成功した。これらの結晶は、3 Å 程度の回折を示すことから、より高い分解能での構造決定ができる可能性が高まった。

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 9 件)

(1) Pisliakov A. V., Hino T., Shiro Y., Sugita Y. (2012) Molecular dynamics simulations reveal proton transfer pathways in cytochrome c-dependent nitric oxide reductase. *PLoS Comput.*, **8(8)**:e1002674. 査読有り

(2) Hino T., Arakawa H., Iwanari H., Yurugi-Kobayashi T., Ikeda-Suno C., Nakada-Nakura Y., Kusano-Arai O., Weyand S., Shimamura T., Nomura N., Cameron A. D., Kobayashi T., Hamakubo T., Iwata S., Murata T. (2012) G-protein coupled receptor inactivation by an allosteric inverse-agonist antibody. *Nature*, **482**, 237-240. 査読有り

(3) Matsumoto Y., Tosha T., Pisliakov A. V., Hino T., Sugimoto H., Nagano S., Sugita

Y., Shiro Y. (2012) Crystal Structure of Quinol-dependent Nitric Oxide Reductase from *Geobacillus Stearothermophilus*. *Nature Struct. Mol. Biol.*, **19**, 238-245. 査読有り

(4) Hino T., Nagano S., Sugimoto H., Tosha T., Shiro Y. (2012) Molecular Structure and Function of Bacterial Nitric Oxide Reductase. *Biochem. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1817**, 680-687. 査読有り

(5) Shiro Y., Sugimoto H., Tosha T., Nagano S., Hino T. (2012) *Philos. Trans. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **367**, 1195-1203. 査読有り

(6) 日野智也、岩田想、村田武士：アロステリックな逆作動薬としての活性をもつ機能性抗体による G タンパク質共役型受容体の不活性化の分子機構、4560、(2012)、新着論文レビュー、査読無し

(7) 日野智也、岩田想、村田武士：抗体と膜タンパク質の共結晶構造、第 5 章-3、(2012)、新機能抗体開発ハンドブック、査読無し

(8) 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、52、p186-189、(2012)、生物物理、査読有り

(9) 日野智也、岩田想、村田武士：機能性抗体による創薬標的 G タンパク質共役型受容体の不活性化の分子機構、30、p186-189、(2012)、実験医学、査読無し

[学会発表] (計 4 件)

① 日野智也：膜タンパク質結晶化促進ツールとしての抗体利用、日本生物工学会西日本支部シンポジウム、2012 年 1 月 21 日、鳥取

② 日野智也：緑膿菌由来膜タンパク質一酸化窒素還元酵素の抗体を用いた結晶化と構造解析、日本生化学会 第 84 回年会、2011 年 9 月 24 日、京都

③ 日野智也：一酸化窒素還元酵素の立体構造から探る呼吸酵素の分子進化、日本生物物理学会 第 49 回年会、2011 年 9 月 16 日、姫路

④ 日野智也：緑膿菌由来一酸化窒素還元酵素の結晶構造解析、日本蛋白質科学会 第 11 回年会、2011 年 6 月 8 日、大阪

[産業財産権]

○出願状況（計 1 件）

名称：アゴニストの親和性を亢進する抗ヒト
アデノシン A2a 受容体モノクローナル抗体
発明者：小笠原諭、日野智也、島村達郎（他
5 名）
権利者：独立行政法人科学技術振興機構
種類：特許
番号：特願 2012-49812
出願年月日：平成 24 年 3 月 6 日
国内外の別：国内

○取得状況（計 1 件）

名称：芳香族スルホン酸化合物を用いた新規
Clear Native 電気泳動法
発明者：日野智也、村田武士
権利者：独立行政法人科学技術振興機構
種類：特許
番号：特許第 5213967 号
取得年月日：平成 25 年 3 月 8 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bio.tottori-u.ac.jp/~bioeng/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日野 智也 (HINO TOMOYA)

鳥取大学・大学院工学研究科・講師

研究者番号：4 0 3 7 3 3 6 0