

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22208

研究課題名(和文)一酸化窒素から酸素分子を産生する金属酵素の同定

研究課題名(英文)Characterization of a metalloenzyme producing oxygen molecule from nitric oxide

研究代表者

當舎 武彦(Tosha, Takehiko)

国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学研究センター・専任研究員

研究者番号：00548993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：メタンの嫌氣的酸化によりエネルギーを得ている細菌(Candidatus Methylomirabilis oxyfera)において、酸素分子の発生を担っていると推測されている一酸化窒素不均化酵素(Nitric Oxide Dismutase: NOD)の組み換え体の大腸菌による発現・精製を試みた。NODを発現させた大腸菌の細胞膜からNODを高純度に精製することができ、アミノ酸配列から推察されるとおりヘムを含むことを示唆する吸収帯を可視領域に観測することができた。しかし、精製試料の機能を調べたところ、明瞭な一酸化窒素不均化活性を観測することはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NODにおいて提案されている一酸化窒素(NO)の不均化反応( $2NO + O_2 + N_2$ )は、これまでに報告例のない生体内反応であり、その反応機構の理解は、生化学分野のみならず錯体化学・触媒化学分野など多くの研究分野において、ブレークスルーをもたらすと期待される。本研究では、NOD特有の機能を解析するまでにはいたらなかったが、NODタンパク質を組み換え体として発現させ精製することができた。本成果を土台として今後の研究が進むことで、NODの構造機能に関する理解が進み、新たなケミストリーが展開されることを期待したい。

研究成果の概要(英文)：On the basis of the proposal that a bacterium, Candidatus Methylomirabilis oxyfera, which obtains energy by anaerobic methane oxidation would have a protein catalyzing dismutation of nitric oxide (NO) by following reaction;  $2NO + O_2 + N_2$ , putative NO dismutase (NOD) was expressed in Escherichia coli and was purified. Purified recombinant NOD showed intense absorption at the visible region, suggesting that NOD contains heme as expected from the fact that the amino acid sequence exhibits significant similarity to nitric oxide reductase (NOR) which has hemes. Although the similarity of the amino acid sequence to NOR, purified NOD showed no NO reduction activity. Proposed NO dismutase activity was not also detected for purified NOD.

研究分野：生物無機化学

キーワード：一酸化窒素 金属酵素 嫌氣的メタン酸化 酸素発生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

メタンは強力な温室効果ガスであり、地球環境への影響が大きな分子である。地球上でのメタン濃度は、メタンを生成するメタン生成古細菌およびメタンを分解するメタン資化性微生物の働きにより変動しうる。メタン資化性微生物には、好気性のものと嫌気性のものが存在するが、嫌気性メタン資化のメカニズムには、未だ不明な点が存在する。嫌気的メタン酸化を行う細菌である *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* の遺伝子解析の結果、本細菌は、図1に示すようなこれまでに例のないメタン代謝の経路をもつことが提案された (Ettwig *et al. Nature*, 2010, 464, 543-)。本細菌には、メタンを代謝する酵素として、酸素分子を利用しメタンからメタノールを生成する膜結合型メタン酸化酵素 (pMMO) のみを有しており、一般的な嫌気的メタン酸化細菌にみられるメチル補酵素 M 還元酵素を持たない。嫌気下で pMMO による触媒反応を進行させるためには、酸素分子を生成する酵素が必要になるが、本細菌は、嫌気下で酸素分子を発生する次の反応： $2\text{ClO}_2^- \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{Cl}^-$  を触媒する

chlorite dismutase を保有しない。つまり、この嫌気的メタン酸化細菌には、酸素分子の産生を触媒する新奇な酵素が存在すると考えられる。そこで、提案されたのが、一酸化窒素 (NO) から酸素分子と窒素分子を産生する反応 ( $2\text{NO} \rightarrow \text{O}_2 + \text{N}_2$ ) を触媒する NO 不均化酵素 (NOD) である。NOD は、NO の分解を行うキノール依存型 NO 還元酵素 (qNOR) と相動性を示すため、NO が基質なりうると考えられるが、活性部位を構成するアミノ酸残基を比較すると、NOD と qNOR では、いくつか異なるアミノ酸残基がみられ (図2) それぞれが異なる反応を触媒することが予測された。また、本細菌は、亜硝酸から NO を生成する亜硝酸還元酵素をもっており、菌体内で NO が合成されうることから、NOD が提案されている。NOD で提案されている化学反応は、高温では起こりうることが提案されているが 100 以下の条件での報告例はなく、生体内でも例のない化学反応である。そのため、NOD が本当に提案されているような NO から酸素分子を発生する反応を触媒するかも定かではない。NOD の研究が進み、NO からの酸素発生機構が明らかになれば、生命化学分野だけでなく、錯体化学や触媒化学でのブレークスルーになることが期待される。

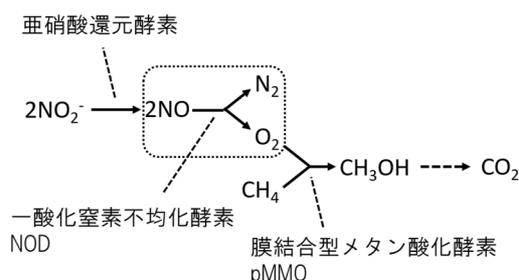


図1. 嫌気性メタン酸化細菌 (*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*) において提案された新奇なメタン酸化経路。

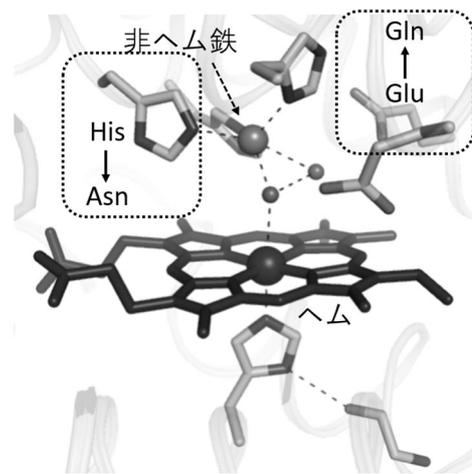


図2. アミノ酸配列から推定される NOD の活性部位。相同性の高い qNOR の構造を示しており、NOD で変異がみられるアミノ酸残基を示している。

### 2. 研究の目的

嫌気的メタン酸化細菌 *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* において提案された NOD がどのような性質をもつタンパク質なのか明らかにすることを目的とする。特に、NO の不均化反応を触媒するのか、という点について解明することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) NOD の機能解析

データベースにある NOD の遺伝子配列に基づき、依頼合成により NOD の大腸菌による発現ベクターを設計・入手した。種々の大腸菌、培養条件にて NOD の発現を試みた。NOD を発現させた大腸菌から膜画分を単離した。NOD を発現させた膜画分について、NO 電極を使い NOD 活性ならびに NO 還元活性の検討を行った。

次にいくつかの界面活性剤を用いて膜画分から NOD の可溶化を試みた。可溶化した NOD について、各種クロマトグラフィーによる精製を試みた。精製試料を用いて、NO 電極による機能評価を行った。

## (2) qNOR を用いた NOD モデルの作製

NOD と qNOR のアミノ酸配列の比較から、NOD では、qNOR で高度に保存されているアミノ酸残基が別の残基に置換されていることがわかっている。図2に示したとおり、置換されているアミノ酸残基には、活性部位を構成するものが含まれる。本課題では、既到大腸菌を用いた発現系の構築に成功している髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) 由来 qNOR (Gonska *et al. Sci. Rep.* 2018, 8:3637) を鋳型として利用し、NOD の活性部位を模倣した qNOR 変異体を設計した。qNOR 変異体を大腸菌を用いて発現させ、膜画分を単離した。変異体の機能解析を NO 電極を用いて行った。

## (3) qNOR の構造解析

NOD 型 qNOR 変異体の将来的な構造解析を見据えて、低温電子顕微鏡 (CryoEM) 法を用いた野生型 qNOR の構造解析に取り組んだ。CryoEM での構造解析を容易にするために、*N. meningitidis* 由来 qNOR にアポトクロム  $b_{562}$  (BRIL) を C 末端に融合させ分子量を増加させたものを用いた。BRIL 融合 qNOR は、既に確立している手法に従い精製した (Gonska *et al. Sci. Rep.* 2018, 8:3637)。種々の濃度条件や凍結条件を検討し、CryoEM 測定用試料を調製した。K2 Summit 検出器を搭載した 300 kV の Titan Krios 電子顕微鏡を用いて電顕像の測定を行った。構造解析には、RELION を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) NOD の機能解析

大腸菌 C41 を用いることで NOD が発現した膜画分が得られることがわかった (NOD の発現に関しては、以下で述べるが、可溶化後、Ni-NYA カラムを用いた粗精製により確認した)。大腸菌の膜画分には、NO を分解する酵素が存在しないので、NOD を発現させた膜画分に NO を添加し、NO の分解が起こるか調べることで NOD 活性がみられるか検討したが、明確な NO の消費を観測することはできなかった。また、NOD は、qNOR と相同性を示すので、膜画分の NO 還元活性についても検討したが、こちらも明瞭な NO 還元活性は検出されなかった。

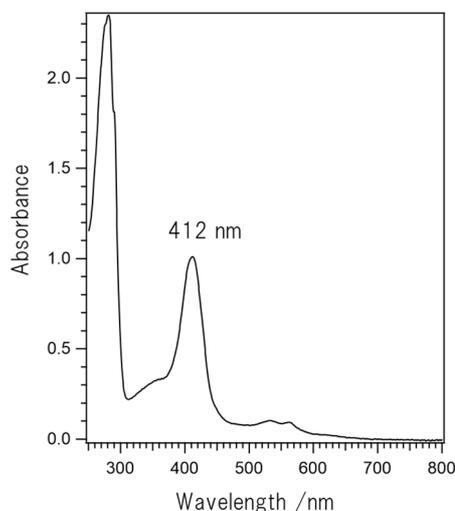


図3. 精製された NOD の紫外可視吸収スペクトル。

膜画分で NOD 活性がみられなかった原因として、NOD の発現量が少なく酵素活性が検出されなかった可能性が考えられるので、NOD の精製を試みた。界面活性剤、ドデシルマルトシドを用いて膜画分から NOD を可溶化し、His-tag を利用した精製を試みた。NOD は、qNOR と相動性を示すので、qNOR 同様、分子内に二分子のヘムを含むものと考えられるが、His-tag を用いた精製において、ヘムの結合を示す赤色の成分を得ることができた。得られた赤色の画分をゲルろ過により更なる精製を行い NOD の精製試料とした。精製した NOD の紫外可視吸収スペクトルを測定したところ、図3に示すように、ヘムタンパク質に特徴的な鋭い吸収帯 (Soret 帯) を確認することができた。そこで、精製試料に NO を加え、NOD 活性を調べたが、NO のはっきりとした消費を観測することはできなかった。この結果から、組み換え体として得た NOD が天然の状態とは、異なっており、NOD 活性を示さない可能性や、提案された NOD 活性自体に誤りがある可能性などが考えられ、更なる研究が必要であることが示唆された。

## (2) qNOR を用いた NOD モデルの作製

アミノ酸配列の比較に基づき (図2)、*N. meningitidis* 由来 qNOR の活性部位に存在するグルタミン酸をグルタミン、ヒスチジンをアスパラギンに変異させた二重変異体を作製した。qNOR 変異体を大腸菌で発現させ、膜画分を調製した。得られた膜画分に NO を添加し、NOD 活性による NO の消費がみられるか調べたが、顕著な NO の消費を観測することはできなかった。また、野生型 qNOR を発現させた膜画分において、NO 還元活性が観測できる条件を用いて、qNOR 変異体の NO 還元活性も調べたが、本活性は、ほとんどみられなかった。NOD を発現させた膜画分においても NO 還元活性がみられなかったことと合わせて考えると、NOD には、NO 還元活性はなく、少なくとも qNOR とは異なる活性もつ酵素タンパク質であることが推察される。

## (3) qNOR の構造解析

BRIL を融合させた qNOR の精製を行ったところ、野生型 qNOR 同様単量体と二量体の平衡がみられた。それぞれについて NO 還元活性を調べたところ、二量体の方が高い酵素活性を示したので、二量体の試料を回収し、CryoEM 用の試料とした。CryoEM による構造解析の結果、図4に示すように、3.1 Å 分解能で二量体 qNOR の構造を決定することができた (Jamali *et al. IUCrJ*

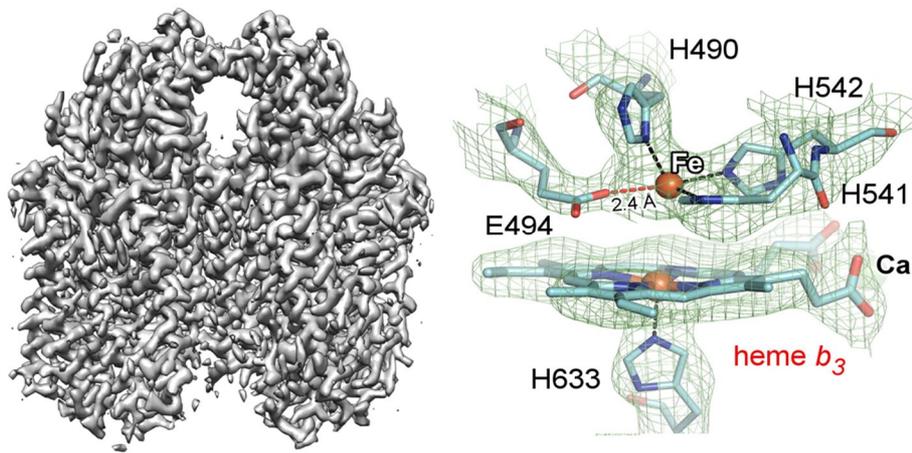


図 4. CryoEM より明らかとなった *N. meningitidis* 由来 qNOR の全体構造 (左) と活性部位の構造 (右)。

2020, 7, 404- )。CryoEM により得られた構造では、活性部位を構成するアミノ酸残基の側鎖も明瞭にかんすることができ (図 4)、非ヘム鉄に対して三つのヒスチジン残基に加え、グルタミン酸が配位していることが確認できた。また、不活性型ではあるものの好熱菌由来 qNOR の結晶構造から提案されていた細胞質側から活性部位へとつながる水チャネル (Matsumoto *et al.* *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012, 19, 238-) が観測されており、*N. meningitidis* 由来 qNOR において酵素反応に必要なプロトン輸送経路として機能することが示唆された。このように、本課題では、CryoEM を用いた qNOR の構造解析に成功しており、今後の研究が進み、NOD 活性をもつ qNOR の作製や活性をもつ NOD が調製できた際には、迅速にその構造を決定する道筋を切り拓くことができたと言える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Gopalasingam Chai C., Johnson Rachel M., Chiduzza George N., Tosha Takehiko, Yamamoto Masaki, Shiro Yoshitsugu, Antonyuk Svetlana V., Muench Stephen P., Hasnain S. Samar	4. 巻 5
2. 論文標題 Dimeric structures of quinol-dependent nitric oxide reductases (qNORs) revealed by cryo-electron microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaax1803(1~11)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aax1803	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 Shisaka Yuma, Iwai Yusuke, Yamada Shiho, Uehara Hiromu, Tosha Takehiko, Sugimoto Hiroshi, Shiro Yoshitsugu, Stanfield Joshua K., Ogawa Kazuya, Watanabe Yoshihito, Shoji Osami	4. 巻 14
2. 論文標題 Hijacking the Heme Acquisition System of Pseudomonas aeruginosa for the Delivery of Phthalocyanine as an Antimicrobial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1637 ~ 1642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.9b00373	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 Suga Michihiro, Shimada Atsuhiko, Akita Fusamichi, Shen Jian-Ren, Tosha Takehiko, Sugimoto Hiroshi	4. 巻 1864
2. 論文標題 Time-resolved studies of metalloproteins using X-ray free electron laser radiation at SACLA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129466 ~ 129466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.129466	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 TOSHA Takehiko, KUBO Minoru	4. 巻 59
2. 論文標題 Visualization of Enzymatic Reactions Using SACLA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 205 ~ 207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.59.205	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 Takeda Hanae, Kimura Tetsunari, Nomura Takashi, Horitani Masaki, Yokota Azusa, Matsubayashi Akiko, Ishii Shoko, Shiro Yoshitsugu, Kubo Minoru, Toshi Takehiko	4. 巻 93
2. 論文標題 Timing of NO Binding and Protonation in the Catalytic Reaction of Bacterial Nitric Oxide Reductase as Established by Time-Resolved Spectroscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 825 ~ 833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20200038	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 Jamali M. Arif M., Gopalasingam Chai C., Johnson Rachel M., Toshi Takehiko, Muramoto Kazumasa, Muench Stephen P., Antonyuk Svetlana V., Shiro Yoshitsugu, Hasnain Samar S.	4. 巻 7
2. 論文標題 The active form of quinol-dependent nitric oxide reductase from Neisseria meningitidis is a dimer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IUCrJ	6. 最初と最後の頁 404 ~ 415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2052252520003656	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 Toshi Takehiko, Yamagiwa Raika, Sawai Hitomi, Shiro Yoshitsugu	4. 巻 50
2. 論文標題 NO Dynamics in Microbial Denitrification System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 280 ~ 288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.200629	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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Takehiko Toshi
2. 発表標題 Elucidation of NO reduction mechanism in soluble NO reductase by time-resolved crystallography with photosensitive caged compound
3. 学会等名 32nd European Crystallographic Meeting (ECM32) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Tosha, T. Nomura, H. Takeda, T. Kimura, H. Sugimoto, M. Kubo and Y. Shiro
2. 発表標題 Mechanism of P450nor-Catalyzed NO Reduction Proved by Time-Resolved Spectroscopic and Crystallographic Analyses
3. 学会等名 19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 當舎武彦、山際来佳、倉橋拓也、新井博之、杉本宏、城宜嗣
2. 発表標題 Functional roles of conserved residues near the active site of nitric oxide reductase based on the structural analysis
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田英恵、木村哲就、野村高志、當舎武彦、城宜嗣、久保稔
2. 発表標題 NO-binding and protonation process in the catalytic reaction of the bacterial Nitric oxide reductase as established by time-resolved spectroscopy
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Takeda, T. Kimura, T. Nomura, T. Tosha, Y. Shiro, M. Kubo
2. 発表標題 NO-binding and Protonation Process in the Catalytic Reaction of Heme/non-heme Iron Nitric Oxide Reductase Proved by Time-Resolved Spectroscopic System
3. 学会等名 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry(ISABIC) (国際学会)
4. 発表年 2019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時間分解構造解析による酵素反応の可視化
3. 学会等名 日本薬学会第141回年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 當舎武彦
2. 発表標題 マイクロ秒時間領域で形成される一酸化窒素還元酵素反応中間体の分光解析
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 當舎武彦
2. 発表標題 構造生物学におけるXFELと放射光の相補的利用～金属酵素の反応機構解明を目指して～
3. 学会等名 放射光ユーザーのためのSACLAの利活用に関するワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 當舎武彦
2. 発表標題 時間分解結晶構造解析および分光解析が明らかにする金属酵素による一酸化窒素分解機構
3. 学会等名 第2回量子線科学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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	University of Liverpool	University of Leeds	