

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19310147

研究課題名(和文)短寿命な気体分子・呼吸酵素複合体の結晶構造から明らかにする呼吸機能の進化

研究課題名(英文) Crystallographic Studies on the Short-lived Respiratory Enzyme-Substrate Complex

研究代表者

永野 真吾 (NAGANO SHINGO)

鳥取大学・工学研究科・教授

研究者番号：60286440

研究成果の概要(和文)：酸素を使わない嫌気呼吸において機能する一酸化窒素還元酵素(NOR)は、酸素を使った好気呼吸の鍵酵素シトクロム酸化酵素(CcO)と進化的な類縁関係が指摘されている膜酵素である。本研究では、NORへ電子を与える物質が異なる二種類の酵素(cNOR, qNOR)の結晶構造を世界に先駆けて決定した。これらの酵素はいずれもCcOと全体構造や金属中心の配置がよく類似しており、構造からも呼吸酵素の進化的類縁関係が示された。シトクロムcから電子を受け取り反応を行うcNORでは、一酸化窒素の還元に使われるプロトンは膜の外側から供給されると考えられる。しかし、キノールから電子を受け取るqNORでは、同様のプロトン供給経路は見出されず、逆に膜の内側から活性部位へと通じたチャンネルが見いだされた。これらの知見は反応に必要なプロトンの供給経路には、呼吸酵素の中で多様性が存在することを示唆している。本研究で決定されたNORの結晶構造は、嫌気呼吸酵素の理論的な解析の重要な基盤となるとともに、呼吸酵素の分子進化や機能変換の仕組みを解き明かすうえで重要な指針を与えるであろう。

研究成果の概要(英文)：Nitric oxide reductase (NOR) is an iron-containing enzyme that catalyzes the reduction of nitric oxide (NO) to generate a major greenhouse gas, nitrous oxide (N<sub>2</sub>O). In this study, we report the crystal structures of cNOR from *Pseudomonas aeruginosa* at 2.7 angstrom resolution and qNOR from *Geobacillus stearothermophilus* at 2.5 angstrom resolution. Although the overall structure of these NORs are closely related to cytochrome oxidase (COX), neither the D- nor K-proton pathway, which connect the COX active center to the intracellular space, was observed. Protons required for the cNOR reaction are probably provided from the extracellular side. On the contrary, qNOR has potential proton channel from the cytoplasmic side to the active center.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	11,400,000	3,420,000	14,820,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：酵素化学、構造生物学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：呼吸、分子進化、ヘム、窒素循環

1. 研究開始当初の背景

| 細胞呼吸は外部から取り込んだグルコース

を段階的に酸化することで、その化学結合のエネルギーを生体エネルギーである ATP に変換する生命に必須の活動である。ヒトを含めた好気性生物の細胞呼吸で中心的役割を果たすのが、ミトコンドリア内膜に存在する呼吸鎖末端酸化酵素であるシトクロム c 酸化酵素 (CcO) である。CcO は酸素分子を水に還元する酸化還元反応に共役してプロトン輸送を行い、ミトコンドリア内膜にプロトン濃度勾配をつくり ATP 合成反応を駆動している。サブユニット構成は種によって異なるが、活性中心(ヘムと銅)を含むコア複合体は3つのサブユニットから成る。結晶構造は吉川・月原らのグループと Mitchel らのグループが 1995 年にそれぞれウシ心筋とバクテリア (*Paracoccus denitrificans*) 由来の酵素で解析に成功している (Tsukihara *et al.*, *Science* 1995; Iwata *et al.*, *Nature*, 1995)。

酸素分子を最終的な電子受容体とする酸素呼吸に対して、ある種の微生物は酸素がない条件において硝酸塩などの無機塩類を電子受容体としてエネルギーを獲得する嫌気呼吸をおこなっている。硝酸呼吸系では硝酸塩が段階的に窒素分子まで還元されて大気中に放出される(脱窒作用)が、これら一連の反応にはそれぞれ別の酵素が働いている。そのなかで一酸化窒素(NO)から亜酸化窒素(N<sub>2</sub>O)へ変換するのが、ヘムと非ヘム鉄を活性中心に持つ一酸化窒素還元酵素(NOR)である。結晶構造は未だ明らかとなっていなかった。

## 2. 研究の目的

結晶構造を基盤として蛋白質の機能発現機構を原子レベルで明らかにするためには安定な休止状態のみならず、機能を発揮する瞬間である短寿命な反応中間体について構造解析を行うことが不可欠である。呼吸酵素は気体分子と複合体をつくり、代謝反応を進め呼吸酵素としての機能を発現しているが、気体分子・呼吸酵素複合体の寿命は極めて短く(1 ミリ秒以下)、結晶構造を得ることは困難である。申請者はこれまでにヘムを含み酸素分子を利用して基質の水酸化反応をおこなう P450 の短寿命な酸素複合体の結晶構造解析を行い、従前の反応機構に重要な修正を迫る知見を得てきた (Nagano and Poulos, *JBC* 2005; Nagano *et al.*, *JBC* 2005)。さらに、高圧ガスにより気体分子を凍結蛋白質結晶へ浸透させる装置(次頁図 2. クライオガスサイター)を開発し、これを用いて短寿命な気体分子・蛋白質複合体を結晶状態で調製するこれまでにない手法を開発した(特許出願番号 2006-208427)。既にこの手法を用いて室温での半減期が約 3 秒と短寿命な脂肪酸水酸化酵素 P450BSβ・酸素複合体を凍結結晶状

態で調製することに成功している。そこで本課題ではこの手法を CcO、NOR に適用し、短寿命な気体分子・呼吸酵素複合体の結晶構造から呼吸機能の進化を分子、原子レベルで解明することを計画した。

## 3. 研究の方法

本研究では、短寿命な気体分子-呼吸酵素複合体を調製するために、まず NOR 単独での結晶構造解析に取り組んだ。qNOR は酵素単独で結晶化を進めたが、cNOR では、酵素単独での結晶では高分解能を得ることが大変困難であったため、モノクローナル抗体との複合体で結晶化を行った。回折データの測定は SPring-8 の理研ビームライン BL44B3, BL26B1 および構造生物学共用ビームライン BL41XU にて行った。

## 4. 研究成果

qNOR とその電子供与体キノールのアナログ HQNO 複合体の結晶構造をそれぞれ 2.5・2.7-Å 分解能で決定した。また、2.5Å 分解能で cNOR とモノクローナル抗体の複合体の構造も決定することができた。これらの酵素はいずれも CcO と全体構造や金属中心の配置がよく類似しており、構造からも呼吸酵素の進化的類縁関係が示された。

これらの結晶構造は、NOR の反応に必要なプロトンや電子の供給経路についても重要な知見を与えた。qNOR では、キノールから電子が供給されるが、キノールのアナログ HQNOR は、heme b から約 4 Å 離れた、膜に接触する分子表面に結合していた。つまり、qNOR ではキノールから heme b に電子が移動し、最終的に活性部位である副核中心に供給されることを示している。cNOR の場合、電子は heme c → heme b → 活性部位と電子が流れていく CcO と類似の経路を通ると推定される。

cNOR において反応で消費されるプロトンは、膜の外側から活性部位に向かうチャンネルによって供給されると考えられる。これは従来の生化学的、電気化学的実験データと一致している。しかし、キノールから電子を受け取る qNOR では、同様のプロトン供給経路は見出されず、逆に膜の内側から活性部位へと通じた明瞭なチャンネルが見いだされた。これらの知見は反応に必要なプロトンの供給経路には、呼吸酵素の中で多様性が存在することを示唆している。今後、プロトンの供給に関して生化学的、電気化学的実験を進め、プロトン供給経路に関する検証が必要である。さらに、一酸化窒素や分子状酸素との複合体の結晶構造解析も進めていく。

## 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 8 件)

1. Hino, T., Matsumoto, Y., Nagano, S., Sugimoto, H., Fukumori, Y., Murata, T., Iwata, S., \*Shiro, Y. "Structural Basis of Biological N<sub>2</sub>O Generation by Bacterial Nitric Oxide Reductase" *Science* 2011, 330, 1666-1670 査読あり
2. Shoji, O., Fujishiro, T., Nagano, S., Tanaka, S., Hirose, T., Shiro, Y., and \*Watanabe, Y. "Understanding substrate misrecognition of hydrogen peroxide dependent cytochrome P450 from *Bacillus subtilis*" *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2010, 15, 2010, 1331-1339. 査読あり
3. Wang, Y., Chen, H., Makino, M., Shiro, Y., \*Nagano, S., Asamizu, S., \*Onaka, H., and \*Sason, S. (2009) Theoretical and Experimental Studies of the Conversion of Chromopyrrolic Acid to an Antitumor Derivative by Cytochrome P450 StaP: The Biological Role of Water Molecules, *J. Am. Chem. Soc.* 131, 6748-6762. 査読あり
4. Wang, Y., Hirao, H., Chen, H., Onaka, H., Nagano, S., and \*Shaik, S. (2008) Electron transfer activation of chromopyrrolic acid by cytochrome P450 En route to the formation of an antitumor indolocarbazole derivative: Theory supports experiment, *J. Am. Chem. Soc.* 130, 7170-7171. 査読あり
5. Koshiyama, T., Yokoi, N., \*Ueno, T., Kanamaru, S., Nagano, S., Shiro, Y., Arisaka, F., and \*Watanabe, Y. (2008) Molecular design of heteroprotein

assemblies providing a bionanocup as a chemical reactor, *Small* 4, 50-54. 査読あり

6. Hirano, S., Asamizu, S., \*Onaka, H., Shiro, Y., and \*Nagano, S. (2008) Crystal structure of VioE, a key player in the construction of the molecular skeleton of violacein, *J. Biol. Chem.* 283, 6459-6466. 査読あり
7. Makino, M., Sugimoto, H., Shiro, Y., Asamizu, S., \*Onaka, H., \*Nagano, S. "Crystal structures and catalytic mechanism of cytochrome P450 StaP that produces the indolocarbazole skeleton" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007, 104, 11591-11596. 査読あり
8. Shoji, O., Fujishiro, T., Nakajima, H., Kim, M., Nagano, S., Shiro, Y., \*Watanabe, Y. "Hydrogen peroxide dependent monooxygenations by tricking the substrate recognition of cytochrome P450(BSβ)" *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 3656-3659. 査読あり

[学会発表] (計 8 件)

1. 招待講演 2010年12月 BMB2010ワークショップ P450および抱合酵素の新たな機能とその応用技術における最近の展開 「抗がん剤インドロカルバザールの基本骨格を構築するP450 StaPの結晶構造解析と反応機構」 永野真吾
2. 招待講演 2010年6月 第10回日本蛋白質科学会ワークショップ 金属蛋白質の新展開：生体金属のセンシング、輸送と利用 「嫌気呼吸系の一酸化窒素還元酵素の構造と分子進化」 永野真吾
3. 招待講演 2010年6月 日本生化学会北海道支部講演会 「シトクロムP450

の多彩な機能発現の仕組みを構造から理解する」永野真吾

4. 招待講演 2009年10月 第47回日本生物物理学会 徳島 若手研究者による生体金属分子分光学の新展開「短寿命な気体分子・金属酵素複合体の分子科学の展開を目指して」永野真吾
5. 招待講演 2009年7月 14<sup>th</sup> International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC14), Nagoya, Japan “Structure and Mechanism of Enzymes Involved in Indolocarbazole Biosynthesis” Nagano, S.
6. 招待講演 2009年6月 16<sup>th</sup> International Conference on Cytochrome P450. Okinawa, Japan. “Structure and Chemistry of Enzymes Involved in Indolocarbazole Biosynthesis” Nagano, S.
7. 招待講演 2009年3月 日本化学会第89春季年会 若手研究者が語る次世代生物無機化学 「インドロカルバゾール生合成酵素群の構造と化学」永野真吾 招待講演 2008年7月 9<sup>th</sup> International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology. Nice, France “Structure and Catalytic Mechanism of P450StaP, a Key Enzyme in Indolocarbazole Biosynthesis” Nagano, S.
8. 招待講演 2007年7月 第10回P450研究会 富山 インドロカルバゾールの骨格構造を作るシトクロムP450 StaPの結晶構造と反応機構: 抗がん剤とペルオキシダーゼの意外な接点 永野真吾

[図書] (計 件)

1. 著書 Handbook of Porphyrin Science, Kadish, K., Smith, K., Guilard, R. *Eds.* 2010, Vol. V, Chapter 25. pp. 123-163.

World Scientific, “NO Chemistry by Heme Enzymes” \*Shiro, Y. and Nagano, S.

2. 著書 P450の分子生物学 第二版 「P450の分子構造：X線結晶構造解析を中心に」 講談社サイエンティフィク 永野真吾、杉本 宏、城 宜嗣 2009, pp35-45, pp281-283

[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

永野真吾 (NAGANO SHINGO)

鳥取大学・工学研究科・教授

研究者番号：60286440

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：