

## 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25年6月4日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22310137

研究課題名（和文）気体分子・呼吸酵素複合体の結晶構造が明らかにする嫌気から好気呼吸への進化

研究課題名（英文）Crystal Structure of Substrate-bound Nitric Oxide Reductases

研究代表者

永野 真吾 (NAGANO SHINGO)

鳥取大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：60286440

研究成果の概要（和文）：酸素を使わない呼吸において機能する一酸化窒素還元酵素（NOR）について2種類 NOR の結晶構造を決定した。また、そのうち1種類の構造に基づいて、理論計算および変異体解析を行った。その結果、結晶構造で見出された細胞質側から活性部位へつながるチャンネルを通り、プロトンが供給される可能性が示唆された。これは酸素呼吸の鍵酵素シトクロム酸化酵素におけるプロトン供給・輸送と類似する点があり、呼吸機能の分子進化を考える上で興味深い成果である。

研究成果の概要（英文）：The structures of quinol and cytochrome c-dependent nitric oxide reductases, which catalyze the reduction of NO to produce N<sub>2</sub>O, has been characterized. The structure-based mutagenesis and molecular dynamics simulation studies of qNOR suggest that a water channel from the cytoplasm can serve as a proton transfer pathway for the catalytic reaction. Further structural comparison of qNOR with cNOR and aerobic and microaerobic respiratory oxidases elucidates their evolutionary relationship and possible functional conversions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

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

ほぼ全ての生物にとって呼吸はエネルギー獲得のための必須の生命活動である。好気性生物は、グルコースから取り出した電子をいくつかの代謝経路を経由して最終的に酸素に渡し、ミトコンドリア内で生体エネルギーATPの合成を駆動する好気呼吸を行っている。この好気呼吸で酸素へ電子を渡しATP合成の駆動力と/cなるプロトン輸送をおこなう酵素がシトクロムc酸化酵素な

どの呼吸酵素である。1995年にシトクロムc酸化酵素の構造が報告され、好気呼吸の分子科学は構造に基づいて議論が可能となった。好気呼吸に対し、ある種の細菌は無機塩類に電子を渡し、エネルギーを獲得する嫌気呼吸をおこなうことが知られている。脱窒菌は硝酸塩を段階的に窒素まで還元してエネルギーを獲得する硝酸呼吸をおこなっている。一酸化窒素還元酵素（NOR）はこの一連の反応のなかで一酸化窒素（NO）を亜

酸化窒素 ( $N_2O$ ) へ還元する膜貫通型酵素であるが、結晶構造はこれまで決定されていなかった。この一酸化窒素還元酵素はシトクロムc酸化酵素とアミノ酸配列に類似性があり、重要なアミノ酸残基も両酵素で保存されている。これらのことなどから一酸化窒素還元酵素はシトクロムc酸化酵素の祖先とみなされる酵素であり、好気呼吸は嫌気呼吸から進化したと考えられている。すなわちNORとシトクロム酸化酵素の構造には呼吸機能の進化の履歴が構造として記録されていると期待できる。

## 2. 研究の目的

NORの高分解能結晶構造を決定し、NORがNOを還元し $N_2O$ を生産するメカニズムの解明を目指す。さらにシトクロム酸化酵素との比較などから呼吸酵素の機能を進化させた構造基盤を解明することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

本研究では緑膿菌由来の cNOR および大腸菌に発現させた *Geobacillus stearothermophilus* 由来の qNOR を用いて、結晶化と構造解析を行った。qNORの結晶構造では細胞質側の分子表面から活性部位へつながる親水性のチャンネルが存在していた (図1)。このチャンネルを形成する親水性アミノ酸残基のアラニンスキャニングを行い、変異体の一酸化窒素消費活性を測定した。また、結晶構造を用いて分子動力学計算をおこないチャンネル内部の水分子とチャンネル入り口付近の水分子の動きについてシミュレーションを行った。

## 4. 研究成果

### (1) 変異体解析

一酸化窒素を亜酸化窒素に還元する反応では、2当量のプロトンが消費されるが、その供給経路はこれまで不明であった。qNORの分子内部の親水性チャンネルにはグルタミン酸やリジンなどの残基が多くみられた (図2)。これらをアラニンに置換した変異体の活性を測定したところ、チャンネルの入り口に存在し、E281と塩橋を形成しているK597の変異体の活性はほとんど消失していた。この結果はK597がプロトンの取り込み口となっている可能性を示唆している。さらに、チャンネルの奥深く、活性部位近くの二つのグルタミン酸 (E581, E512) をアラニンに置換した場合も活性が失われていた。これらのグルタミン酸が活性部位の複核中心にプロトンを直接あるいは水分子を介して供給していると考えられる。

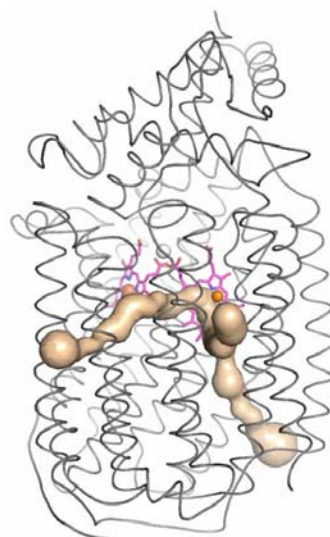


図1. qNORの分子表面から活性部位につながるチャンネル 3本のチャンネルのうち2本は膜貫通領域から伸びているが、1本は細胞質側(下側)からつながっていた。

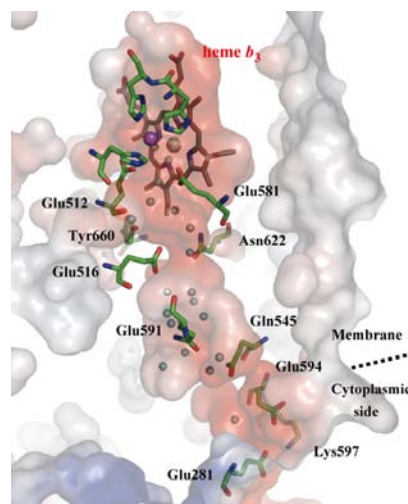


図2. qNORの細胞質側から活性部位につながるチャンネルを構成する親水性アミノ酸

### (2) 分子動力学シミュレーション

分子動力学シミュレーションから親水性チャンネルの入り口付近の水分子は、チャンネル内部の水分子と交換が可能であること、チャンネル内部の水は活性部位近傍まで移動が可能であることが示された。

以上(1)、(2)の結果より、qNORではこれまでに提唱されていた細胞外側からではなく、細胞質側からプロトンが供給される可能性が示された。これは好気呼吸酵素 CcOのプロトンが供給・輸送される方向と同じであることから呼吸酵素の分子進化を議論するうえで興味深い結果である。

また、NORが生産する $N_2O$ は二酸化炭素の300倍もの温室効果を示し、農業・畜産業などの廃棄物からNORによって多く発生することが知られている。さらに、ある種の病

原菌は宿主が発生する抗菌ガスNOを、NORを用いることで無毒化して生存を可能にしていることから、NORの阻害剤をデザインできれば新たな抗菌薬の開発が期待できる。以上のように本研究は呼吸にかかわる酵素が機能する仕組みを解明する基礎科学にとどまらず、地球環境や医学など、社会的にも大きな影響を与える重要な成果である。

#### 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8件)

- ① Matsumoto, Y., Tosha, T., Pisliakov, A. V., Hino, T., Sugimoto, H., \*Nagano, S., Sugita, Y., and \*Shiro, Y. (2012) Crystal structure of quinol-dependent nitric oxide reductase from *Geobacillus stearothermophilus*, **Nature Struct. Mol. Biol.** 19, 238-245. 査読有  
doi:10.1038/nsmb.2213
- ② \*Nagano, S. (他5名、6番目) (2012) "Coupling Reaction of Indolepyruvic Acid by StaD and Its Product: Implications for Biosynthesis of Indolocarbazole and Violacein" **ChemBioChem** 13, 2495-2500. 査読有  
doi: 10.1002/cbic.201200535
- ③ Hino, T., Nagano, S., Sugimoto, H., Tosha, T., and \*Shiro, Y. (2012) Molecular structure and function of bacterial nitric oxide reductase, **Biochim. Biophys. Acta** 1817, 680-687. 査読有  
doi: 10.1016/j.bbabi.2011.09.021
- ④ Nagano, S., (他4名、4番目) (2012) Structural basis for nitrous oxide generation by bacterial nitric oxide reductases, **Philos. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci.** 367, 1195-1203. 査読有  
doi: 10.1098/rstb.2011.03.10
- ⑤ \*Nagano, S. (他4名、4番目) (2011) Characterization and Functional Modification of StaC and RebC, Which Are Involved in the Pyrrole Oxidation of Indolocarbazole Biosynthesis, **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 75, 2184-2193. 査読有  
doi: 10.1271/bbb.110474
- ⑥ Nagano, S. (他5名、3番目) (2011) Crystal Structure of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent Cytochrome

P450(SP $\alpha$ ) with Its Bound Fatty Acid Substrate INSIGHT INTO THE REGIOSELECTIVE HYDROXYLATION OF FATTY ACIDS AT THE  $\alpha$  POSITION, **J. Biol. Chem.** 286, 29941-29950. 査読有  
doi: 10.1074/jbc.M111.245225

- ⑦ Hino, T., Matsumoto, Y., Nagano, S., Shiro, Y. (他4名、3番目) (2010) Structural Basis of Biological N<sub>2</sub>O Generation by Bacterial Nitric Oxide Reductase, **Science** 330, 1666-1670. 査読有  
doi: 10.1126/science.1195591
- ⑧ Nagano, S. (他6名、3番目) (2010) Understanding substrate misrecognition of hydrogen peroxide dependent cytochrome P450 from *Bacillus subtilis*, **J. Biol. Inorg. Chem.** 15, 1331-1339. 査読有  
doi: 10.1007/s00775-010-0692-4

[学会発表] (計7件)

- ① 招待講演 2013年3月25日 立命館大学びわこ草津キャンパス 日本化学会春季年会特別企画：分子活性化：生命化学から有機合成化学へのメッセージ「天然物生合成系に見いだされる有機合成化学のロジック」永野真吾
- ② 招待講演 2012年12月3日 九州大学箱崎キャンパス 50<sup>th</sup> Anniversary Symposium for Cytochrome P450 in Fukuoka "Structural and Functional Diversity of P450" Nagano, S.
- ③ 招待講演 2010年12月10日神戸ポートアイランド 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
- ④ 招待講演 2010年10月7日 大阪 蛋白質研究所セミナー 「インドロカルバザール生合成酵素の構造と機能」永野真吾
- ⑤ 招待講演 2010年10月1日 東京 中性子生命物質構造解析研究会 「一酸化窒素還元酵素のプロトン移動」永野真吾
- ⑥ 招待講演 2010年6月16日-18日 札幌 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

- ⑦ 招待講演 2010年6月15日 札幌 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

[図書] (計1件)

- ① 著書 Handbook of Porphyrin Science,  
Kadish, K., Smith, K., Guillard, R. Eds.  
Vol. V, Chapter 3. World Scientific,  
“NO Chemistry by Heme Enzymes”  
\*Shiro, Y. and Nagano, S.

[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・大学院工学研究科・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：