

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：22770136

研究課題名（和文） 膜結合型NO還元酵素の触媒反応機構：酸素還元との比較

研究課題名（英文） Mechanism of catalytic nitric oxide reduction by membrane-bound nitric oxide reductase: comparison with oxygen reduction reaction

研究代表者

當舎 武彦 (TOSHA TAKEHIKO)

独立行政法人理化学研究所・城生体金属科学研究室・研究員

研究者番号：00548993

研究成果の概要（和文）：嫌気呼吸に関わる膜結合型一酸化窒素還元酵素（NOR）の還元型および、酸化シアン結合型の立体構造を決定した。共鳴ラマン測定から、基質であるNOが大きく折れ曲がった様式で、NOR活性部位のヘムに結合することを明らかにした。また、NORの触媒反応に必要なプロトンの輸送経路を分子動力学計算により調べ、経路を決定している構造的因子に関する知見を得た。これら一連の成果は、NORの反応機構の理解はもちろん、NORから好気呼吸酵素への機能変換の仕組みを理解するうえで、重要な情報であるといえる。

研究成果の概要（英文）：Structures of reduced and CN-bound oxidized nitric oxide reductase (NOR), which is involved in anaerobic respiration chain, were determined by X-ray crystallography. Resonance Raman measurement indicated that the substrate, NO, bound to the active site heme in a bent conformation. The proton transfer mechanism was also examined by molecular dynamics simulation, suggesting the structural factor(s) controlling the catalytic proton transfer in NOR. These findings help us understanding the molecular mechanism of the NO reduction reaction in NOR and the functional conversion from NOR to aerobic respiration enzyme during the molecular evolution.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物無機化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：一酸化窒素、金属酵素、結晶構造解析、生体分子分光、膜タンパク質、プロトンポンプ、ヘム

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素還元酵素（NOR）は、硝酸から窒素分子への変換を行う脱窒細菌の細胞膜

上に存在する金属酵素である。NORは、活性部位にヘム鉄と非ヘム鉄からなる複核中心をもつ酵素で、2つの電子と2つのプロトン

を利用し、2分子の一酸化窒素 (NO) を還元し、亜酸化窒素 (N₂O) を生成する (2NO + 2H⁺ + 2e⁻ → N₂O + H₂O)。この反応には、N-N 結合の形成や、N-O 結合の開裂という基礎化学的に重要な過程を含んでいる。また、たいへん興味深いことに、アミノ酸配列の相同性から、NOR は、酸素分子を利用した好気呼吸の根幹を担っているシトクロム酸化酵素 (COX) と類似の構造をしており、NOR は、COX の祖先タンパク質であると考えられている。実際に、COX の活性部位は、NOR とよく似ており、NOR の非ヘム鉄が銅原子に置き換わった構造をしている。しかし、COX は NOR と異なり、酸素の 4 電子還元 (O₂ + 4H⁺ + 4e⁻ → 2H₂O) を触媒する。加えて、COX は触媒反応と共役して、プロトンを生体膜の内側から外側へと能動輸送するポンプ機能を持ち、この結果形成されるプロトン濃度勾配が ATP 合成酵素の駆動力となる。この COX がもつ呼吸の本質ともいえるプロトンポンプ機能は、NOR にはみられない。このように、呼吸酵素は、NOR から COX への分子進化の過程において、NO から O₂ へと基質選択性を変えるとともに、プロトンポンプ機能を獲得したと考えることができる。

COX の立体構造は、1990 年代半ばに解明され、構造・機能についての理解が進んだものの、NOR の立体構造は長年明らかでなかったため、分子進化に伴う NOR から COX への機能変換の仕組みは、未解明なままであった。しかし、ごく最近、シトクロム c からの電子を利用する cNOR および、キノールからの電子を利用する qNOR の立体構造が当研究室で明らかとなったことで、呼吸酵素の分子進化や、NO 還元反応の分子機構に関する仮説をたてることが可能となった。

2. 研究の目的

NOR の立体構造が明らかになったことで、呼吸酵素の分子進化、即ち NOR から COX への機能変換の仕組みに関する構造基盤が得られた。本研究では、NOR と COX の間での機能変換に関して理解を深めるために、構造情報に基づき NOR の触媒反応機構を調べることで、NOR と COX の機能の相違がどのような因子によって決定されているのかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

酸化型での結晶構造が得られている二種類の NOR (cNOR と qNOR) について、触媒反応中にみられる還元型、および基質類似体結合型の X 線結晶構造解析から、NOR による NO 還元反応機構の解明を目指した。また、分光測定 (主に振動分光法) から NOR の活性部位について、電子・原子レベルでの構造情報の得ることに着手した。更に、フロー・フラッ

シュと分光測定を組み合わせた測定から、NOR の触媒反応に必要なとされるプロトンの輸送機構の解明を目指した (ストックホルム大学 Pia Ädelroth 博士との共同研究)。プロトン輸送機構に関しては、研究協力者である Andrei Pisliakov 博士の協力のもと、分子動力学計算を行い、理論と実験の両側面から、その詳細を検討した。得られた知見を構造・機能に関する研究の先行する COX と比較することで、呼吸酵素の分子進化の戦略に関する理解を深めた。

4. 研究成果

本課題から得られた主な成果として、(1) 還元型および配位子結合型 NOR の X 線結晶構造解析、(2) NOR の活性部位の分光解析、(3) プロトン輸送機構の検討、に関して以下で説明する。

(1) 「還元型およびシアン結合型 NOR の X 線結晶構造解析」 NO 還元反応の分子機構の理解を進めるために、NOR の触媒サイクル中にみられる還元型 NOR と基質類似体であり阻害剤として働くシアン化物イオン結合型 NOR の構造解析に挑戦した。cNOR と qNOR について還元型やシアン結合型結晶の調製を試みたところ、いずれの試料においても、酸化型で結晶化させたものを還元剤もしくは、シアン化物イオンが存在する溶液に浸すことで、再現よく目的の結晶が得られるようになった。大型放射光施設 SPring-8 にて、本課題で得られた結晶の X 線回折実験を行ったところ、2.5 Å 程度の分解能で反射データを収集できた。精密化の結果、qNOR では、活性部位の電子密度が不明瞭で、還元型およびシアン結合型の構造決定にいたらなかったものの、cNOR の還元型と酸化シアン結合型の構造を明らかにすることができた。図 1 に示すように、酸化型では、酸素原子がヘム鉄と非ヘム鉄を架橋しているが、鉄原子が還元されることで、酸素架橋が解離し、水分子が非ヘム鉄に配位した構造になることがわかった。酸化シアン結合型では、シアン化物イオンは、Fe-C-N の角度が約 120 度と大きく折れ曲がった様式で、ヘム鉄に配位していた。このように、還元型も酸化シアン結合型も、酸化型と比較して、活性部位に構造変化を観測することができたが、その他のタンパク質部分やヘム鉄、非ヘム鉄に配位しているアミノ酸残基については、顕著な構造変化は認められなかった。

これら cNOR について得られた構造情報は、既に報告のある COX とは、その特徴が異なる。COX は触媒反応 (酸素分子の 4 電子還元) と共役したプロトンポンプ機能を持っており、この COX の機能と対応して、活性中心金属の還元や配位子の結合に伴う構造変化がタンパク質全体で観測される。一方、cNOR では、

このようなタンパク質全体にも及ぶ構造変化はみられなかった。これは、cNORがプロトンポンプ機能を持たないことと対応する。つまり、呼吸酵素は、プロトンポンプ機能の獲得のために、活性中心での構造変化をタンパク質全体に伝える機構を手に入れたと推察できる。

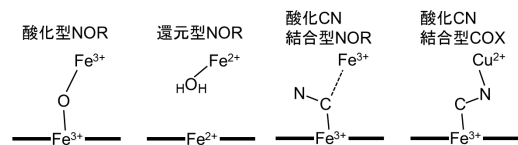


図1. NORおよびCOXの活性部位構造の模式図。本課題で、還元型および酸化CN結合型NORの構造を決定した。

また、シアン化物イオンの配位様式もcNORとCOXで異なっていた。cNORではシアン配位子は、ヘム鉄にC原子で配位し、N原子は非ヘム鉄や周辺アミノ酸とは相互作用していなかった(図1)。これとは、対照的に、COXにおいて、シアン配位子は、ヘム鉄と非ヘム金属(銅原子)を架橋するように結合する(図1)。このような活性部位における2原子分子の結合様式の違いは、NORとCOXの触媒反応の違いを反映しているものと考えられる。現在、より詳しい情報を得るために、還元型cNORにシアン化物イオンが結合した状態の構造解析に取り組んでいる。

(2)「分光測定によるNORの活性部位の構造解析」 X線結晶構造解析によるタンパク質全体構造の決定と並行して、活性部位の詳細な構造解析を分光法を用いて行った。活性部位に存在するヘムの電子状態や配位構造を鋭敏に反映することのできる共鳴ラマン分光測定によりcNORとqNORの活性部位の環境を調べた。ヘムの環境を反映するプローブとしてCO結合型NORのFe-CおよびC-O伸縮振動数を調べたところ、cNORおよびqNORでの値は、ミオグロビンなどの一般的なヘムタンパク質にみられる範囲に観測された。過去の測定から、COXの場合、ヘム近傍に存在する銅原子の影響で、Fe-CとC-O伸縮振動数は、ミオグロビンなどとは、異なる領域に観測されることが報告されている。このことから、NORでは、ヘム近傍に存在する非ヘム鉄がCO配位子と相互作用しない構造をとっていることが推察された。

qNORについては、酸化型に基質であるNOが結合した状態についても分光測定を行うことができた。その結果、NOは、ヘム面に対して大きく折れ曲がった配向で結合することが示唆された。また、変異体を用いた実験から、ヘムに配位したNOは、NORの活性部位に存在し、触媒活性に必須であるとされている2つのグルタミン酸と水素結合を形成して

いることを提案できた(図2)。本結果は、NOからN₂Oが形成される過程で必須となるN-O結合開裂の分子機構の理解を深めるものである。

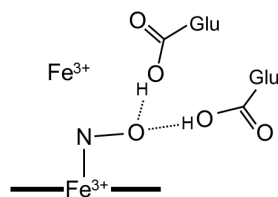


図2. 共鳴ラマン測定の結果から推定される基質結合型qNORの活性部位の構造。2つのグルタミン酸残基がヘムに結合したNOに水素結合している。

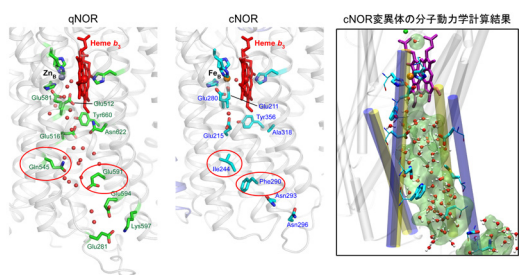
(3)「プロトン輸送機構の解明を目指して」 NORの活性部位は、膜結合領域にあり、膜の内側もしくは、外側からのプロトン供給がNO還元反応に必要となる。また、NORでのプロトン輸送機構を理解することは、NORからCOXへの分子進化の過程で、COXがどのようにしてプロトンポンプ機能を持つに至ったのか知る手がかりとなる。最近、明らかとなったcNORとqNORの立体構造から、両者でプロトン輸送経路が異なることが示唆された。つまり、cNORは、膜の外側からのプロトン供給経路がみられたが、qNORには、対応するプロトン輸送経路が確認されなかった。その代わりに、膜の内側から活性部位とつながる親水性の水チャンネルが観測され、これがプロトン輸送経路として機能することが予想された。これまで、NORにおけるプロトン輸送の研究は、cNORに関してのみ行われてきており、cNORは、その立体構造が示すように膜の外側からのプロトンを利用し、NO還元を行うことが示されている。しかし、qNORのプロトン輸送に関する研究はこれまで皆無であり、構造から予測される膜の内側からのプロトン輸送という新発見を他の手法により証明しなければならない。

実験的にqNORのプロトン輸送機構を調べるために、ストックホルム大学のÅdelroth博士らが開発した方法をもとにして実験を行った(Ådelroth博士との共同研究)。プロトン輸送の活性測定では、人工脂質二重膜であるリポソームに再構成したNORを用い、pH指示薬により、プロトン濃度変化を観測する。NORの基質であるNOは、溶液に溶かすとpH変化を誘起し、解析が困難になるので、NOの代わりに酸素分子を用いて実験を行った。まず、qNORの酸素還元活性を調べたところ、活性は低いものの、電子供与体存在下で、酸素消費が観測された。次に、フロー・フラッシュ法を用いて、シングルターンオーバー条件下での酸素還元を調べたところ、酸素還元に伴

うヘムの酸化がミリ秒の時間領域でみられることがわかった。更に、pH 指示薬を用いた測定から、この qNOR のヘムの酸化が pH 変化の時間スケールと一致することが明らかとなった。つまり、qNOR では、ミリ秒の時間スケールで酸素の還元に伴う pH 変化が観測可能であることが示された。現在、qNOR のプロトン輸送機構を理解するために、リポソームに再構成した試料を用いての実験に取り組んでいるところである。

また、共同研究として理論科学的アプローチからプロトン輸送機構の解明を試みている (Pisliakov 博士との共同研究)。分子動力学計算の結果、qNOR にみられた膜の内側からの水チャネルは、プロトン輸送経路として機能しうることを支持する結果であった。qNOR の水チャネルと cNOR の対応する部位の構造を比べると、qNOR では親水的で側鎖体積の小さなアミノ酸残基が、cNOR では疎水的でかさだかいアミノ酸残基に置き換わっていた (図 3)。そのせいで、cNOR では、膜の内側からの水チャネルが立体的にふさがれてしまっているような構造になっている。そこで、cNOR において水チャネルが形成されない原因となっていると考えられるアミノ酸残基をコンピューターシミュレーションで qNOR 型に変異させ、分子動力学計算を行ったところ、cNOR 変異体において、膜内側から活性部位へと水分子の流入がみられ、プロトン輸送経路として機能することが示唆された (図 3)。qNOR の水チャネルは、COX のプロトンポンプ経路の一部とよく対応していることから、プロトンポンプの原型ではなかろうかと推測している。本研究で、cNOR のアミノ酸残基を 2 個置換するだけで、膜の内側からの水チャネルが形成されたことは、NOR がどのようにしてプロトンポンプ機能を獲得したのか、大きな手がかりとなるものである。現在は、実際にタンパク質で変異体を作成し、プロトン輸送機能がどのように変化するのか調べているところである。

図 3. qNOR にみられた水チャネル。cNOR では対応する部位にチャネルはない。qNOR と cNOR の構造比較に基づき、コンピューター上で作成した cNOR 変異体。分子動力学計算の結果、cNOR 変異体において水チャネルが観測された。



(4) 「まとめ」 以上、本課題から NOR の構造上の特徴が明らかとなり、先行研究のある COX との比較が可能となった。本成果は、呼吸酵素が NOR (嫌気呼吸酵素) から COX (好気呼吸酵素) へと進化する過程で、どのようにして基質選択性を変換し、プロトンポンプ機能をもつようになったのか理解するための基盤となると期待できる。

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 5 件)

① L. Salomonsson, J. Reimann, T. Tosha, N. Krause, N. Gonska, Y. Shiro and P. Ådelroth “Proton Transfer in the Quinol-dependent Nitric Oxide Reductase from *Geobacillus Stearothermophilus* during Reduction of Oxygen” *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, 印刷中 (査読有)

② 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” *生物物理*, 2012, 印刷中 (査読無)

③ 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*” *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012, **19**, 238-245 (査読有)

④ Y. Shiro, H. Sugimoto, T. Tosha, S. Nagano and T. Hino “Structural Basis for Nitrous Oxide Generation by Bacterial Nitric Oxide Reductases” *Phil. Trans. Royal Soc. B* 2012, **367**, 1195-1203 (査読無)

⑤ T. Hino, S. Nagano, H. Sugimoto, T. Tosha and Y. Shiro “Molecular Structure and Function of Bacterial Nitric Oxide Reductase” *Biochim. Biophys. Acta* 2012, **1817**, 680-687 (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

① 佐藤希美, 當舎武彦, 日野智也, 杉本宏, 左子芳彦, 城宜嗣 “緑膿菌由来シアン化型一酸化窒素還元酵素の X 線結晶構造解析” (口頭: 佐藤希美が発表) 平成 23 年度日本結晶学会 札幌 2011 年 11 月 24 日-25 日

② N. Okada, T. Tosha, and Y. Shiro “Spectroscopic characterization of the

ferrous-NO form as a model of active species using Zn-substituted bacterial nitric oxide reductase” (口頭: N. Okada が発表) 第 49 回日本生物物理学会年会 兵庫 2011 年 9 月 16 日-18 日

③ **T. Tosha**, Y. Matsumoto, S. Nagano, and Y. Shiro “Functional Role of Ca Ion in Nitric Oxide Reductase from *Geobacillus Stearothermophilus*” (口頭) 15th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, Vancouver, Canada 2011 年 8 月 7 日-12 日

④ **當舎武彦** “金属蛋白質における構造機能相関: 蛋白質ならではの機能制御機構” (招待講演) 錯体化学若手の会夏の学校 2011 羽咋 2011 年 7 月 31 日-8 月 2 日

⑤ **T. Tosha** “Structural basis for molecular evolution in respiratory enzymes: from NO reductase to O₂ reductase” (口頭) Mini Symposium on Energy Conversion in Bacteria, Stockholm, Sweden 2011 年 6 月 16 日

⑥ **T. Tosha**, Y. Matsumoto, S. Nagano, and Y. Shiro “Quinol and Ca Binding Sites in Bacterial Nitric Oxide Reductase” (ポスター) Pacificchem 2010, Hawaii, USA 2010 年 12 月 15 日-20 日

⑦ **T. Tosha**, A. Kohara, Y. Shiro “Construction of E. coli overexpression system for membrane-bound bacterial nitric oxide reductase” (ポスター) 第 48 回日本生物物理学会年会 東北大学 2010 年 9 月 20 日-22 日

⑧ **當舎武彦**, 松本悠史, 永野真吾, 城宜嗣 “膜結合型一酸化窒素還元酵素におけるカルシウム結合部位の同定とその機能的役割” (ポスター) 第 10 回日本蛋白質科学会年会 札幌 2010 年 6 月 16 日-18 日

[その他]

① 新着レビュー (発表論文 37) 松本悠史, **當舎武彦**, 城 宜嗣 “キノール依存型一酸化窒素還元酵素の結晶構造からみた呼吸酵素の分子進化”

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/4335#more-4335>

② 理化学研究所プレスリリース “プロトンの通り道から呼吸酵素の起源にせまる-立体構造比較から呼吸酵素の分子進化を推測可能に-”

<http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2012/120123/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

當舎 武彦 (TOSHA TAKEHIKO)

独立行政法人理化学研究所・城生体金属科学研究室・研究員

研究者番号: 00548993

(2) 研究協力者

Andrei Pisliakov

独立行政法人理化学研究所・杉田理論生物化学研究室・基礎科学特別研究員

研究者番号: 70565770

Pia Ädelroth

ストックホルム大学・Department of Biochemistry & Biophysics・准教授

研究者番号: 該当なし