

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成29年度研究進捗評価用〕

平成26年度採択分
平成29年3月10日現在

一酸化窒素の生体内動態の分子科学

Molecular Science of NO Dynamics in Biological System

課題番号：26220807

城 宜嗣 (Yoshitsugu Shiro)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授



研究の概要

微生物の嫌気呼吸である脱窒の酵素である亜硝酸還元酵素と一酸化窒素還元酵素を研究対象にし、時分割結晶構造解析と時分割赤外分光解析法を用いて、これら酵素の構造ダイナミクスを明らかにし、それを基盤に生体内での一酸化窒素 NO の産生・移動と消去（生体内動態）のメカニズムを分子・原子・電子レベルで明らかにする。

研究分野：生体関連化学、生物無機化学

キーワード：一酸化窒素、酵素反応、呼吸酵素、分子進化、環境科学、亜酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素 NO は、反応性に富むラジカル分子であり、強い細胞毒性を示す。生体中にはこの NO を積極的に産生する系が2つ存在する。一つは哺乳動物の一酸化窒素合成酵素であり、産生された NO はシグナル分子としていくつかの重要な生理作用に関与している。他の一つは、嫌気性微生物の呼吸の一種である脱窒において、亜硝酸イオン NO_2^- から亜硝酸還元酵素 NiR により産生され、一酸化窒素還元酵素 NOR がその NO を無毒化している。生体に対して「功罪」両面の作用を及ぼす気体分子 NO の特異な性質を、生体はどのようにコントロールしているのであろうか？この素朴な疑問に答えはなかった。

2. 研究の目的

本研究では、脱窒微生物の NiR と NOR を研究対象とし、上記の謎に答える為に、生体内での NO の産生・移動と消去（生体内動態）のメカニズムを明らかにする事を目的とした。具体的には、「NOR 酵素反応の分子機構の確立」と「生体内の NO 動態の解明と制御」をめざした。加えて、NOR が呼吸酵素の分子進化における祖先型酵素であることに注目し、変異導入により NO 還元から O_2 還元への機能変換をめざした。

3. 研究の方法

通常の X 線結晶構造解析に加えて、時分割結晶構造解析と時分割赤外分光測定により、標的酵素の機能時における構造・電子状態の変化を明らかにする。それらの結果を、生化学・分子生物学的手法による機能解析の結果ならびに理論計算の結果と合わせて、上記目的を達成する。

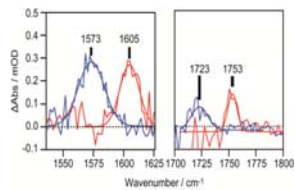
学・分子生物学的手法による機能解析の結果ならびに理論計算の結果と合わせて、上記目的を達成する。

4. これまでの成果

1. cNOR 発現系の構築／変異体の調製
緑膿菌を宿主とする cNOR 発現系を構築し、FeB を含む、活性を持った野生型 (WT) 酵素の発現精製に成功した。この発現系を用いて、すべての NOR に保存されている5つの Glu、触媒反応に必須のプロトンの輸送経路のアミノ酸残基（特に、溶媒の水からのプロトンの入り口にあたる Glu57）、活性中心の入り口に存在する Val206 に注目して、それらの変異体を調製し、酵素活性ならびに様々な物理化学的手法でその性質を調べている。この WT および E57A 変異 cNOR の結晶を、従来の抗体法より高分解能構造が得られる可能性のある LCP (Lipidic Cubic Phase) 法により得た。また、この発現系は、酵素活性が低い cNOR 変異体遺伝子を導入した緑膿菌が、嫌気条件下では増殖できないことを利用した、簡便な変異酵素活性スクリーニングできる系であった。

2. 短寿命反応中間体の構造・電子状態の解析
還元型 cNOR が NO と反応した時にミリ秒程度の寿命の反応中間体は、その構造ならびに電子状態が、cNOR による NO 還元反応を理解する上で非常に重要である。時間分解赤外分光 (TR-IR) 装置を開発し、その反応中間体の N-O 伸縮振動を測定した。1753 cm^{-1} (へ

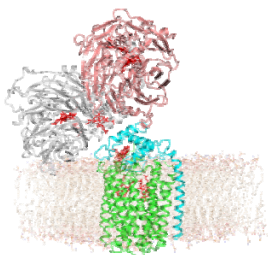
μ Fe²⁺-NO) と 1605cm⁻¹ (非へム Fe²⁺-NO) に 2 本に N-O 伸縮振動が観測された。この結果を基盤に、量子化学計算により、cNOR 反応中間体の電子状態を解析中である。一方、脱窒カビ NOR の微結晶を作製し、SACLA の X 線自由電子レーザーを活用した時分割結晶構造解析 (TR-SFX:



Time-resolved Serial Femtosecond X-ray Crystallography) 法による NO 還元酵素反応時における短寿命反応中間体の結晶構造解析にも成功している (詳細は省略)。この経験を活かして、今後は、TR-SFX 法を cNOR の反応中間体の構造解析にも適用していく予定である。

3. cNOR/NiR 複合体の構造機能解析

脱窒では、亜硝酸還元酵素 (NiR) が亜硝酸塩 (NO₂⁻) から NO を産生している。この NiR と cNOR の複合体の結晶構造を解く事に成功した。この構造を基盤にした分子動力学計算による複合体の動的構造と、産生された NO の細胞内での動態の解析、さらに相互作用部位の変異体の機能解析から、水溶性酵素である NiR により産生された NO が細胞内を拡散することなく NOR に受け渡されるのに必須の複合体形成であると結論した。



4. 病原菌の宿主体内での生存戦略

多くの病原菌は、感染先 (宿主) の赤血球へヘモグロビンからへムを奪取し、そこから得る鉄を用いて増殖する。これに対して宿主の白マクロファージは抗菌作用を示す NO を産生して病原菌は殺菌する。病原菌はキノール依存型の NOR (qNOR) を有しており、これにより NO を無毒化して対抗している。その機能メカニズムの解明は、抗菌剤の開発だけでなく、呼吸酵素の分子進化解明にも重要である。*Neisseria meningitidis* (髄膜炎菌) と *Achromobacter xylosoxidans* (日和見感染菌) の qNOR の結晶が得られている。また、これらの qNOR は膜を介したプロトン濃度勾配をつくる能力のある事を確認した。また、今後のさらなる研究展開を視野に入れて、病原菌のへム取込みおよびへム排出ポンプの結晶構造解析にも成功している。両ポンプ共に、抗菌薬のターゲットである。

5. 今後の計画

TR-IR 法および TR-SFX 法による cNOR の短寿命反応中間体の時分割測定をさらに進め、構造・電子状態の経時変化と、プロトンを提供できない変異体 (例えば E57A) の測定結果などを得て、cNOR による NO 還元の反応機構を原子・電子レベルで可視化する。クライオ電顕や X 線小角散乱法により、脱窒関連酵素群の超分子複合体の構造解析に挑戦する。また、髄膜炎菌 qNOR の構造機能解析を進め、その情報を抗菌薬開発や呼吸酵素の分子進化の議論に供する。さらに、今後の研究展開を視野に入れ、病原菌の鉄獲得システムの構造ダイナミクスの基礎研究を開始する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

Y. Naoe, N. Nakamura, A. Doi, H. Nakamura, Y. Shiro, H. Sugimoto: "Crystal Structure of Bacterial Heme Importer Complex in Inward-facing Conformation" *Nature Commun.* **7**, 13411 (2016)

T. Tasha, Y. Shiro: "Structure and Function of Nitric Oxide Reductases" Chapter 6 of RSC Metallobiology Series No. 9, Metalloenzymes in Denitrification: Applications and Environmental Impacts, Eds by I. Moura, J. G. Moura, S. R. Pauleta and L. B. Maia, The Royal Society of Chemistry, 2016, pp.114-140

ホームページ等

<http://www.riken.jp/biometal/index.htm>