

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26620140

研究課題名(和文) 生体内の亜酸化窒素の産生制御と消去

研究課題名(英文) Regulation of nitrous oxide formation in cell

研究代表者

城 宜嗣 (Yoshitsugu, Shiro)

国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学総合研究センター・主任研究員

研究者番号：70183051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：亜酸化窒素(N₂O)は、温室効果ガスでありオゾン層破壊ガスである。地球上でのN₂O産生の約70%は、脱窒微生物による。地球環境保護の観点から、脱窒微生物によるN₂O産生の分子機構を明らかにし、それを制御する事を目的に研究を行った。X線結晶構造解析、変異体の機能解析、分子動力学シミュレーション研究の結果、微生物内における亜硝酸還元酵素(NO₂⁻→NOを触媒)と一酸化窒素還元酵素(NO→N₂Oを触媒)の複合体形成がN₂O産生に重要である事を見いだした。さらに、N₂O産生阻害剤を4種類見いだした。

研究成果の概要(英文)：Nitrous oxide (N₂O) is not only a green-house gas but also ozone-depleting substance. About 70% of the global emission of N₂O is attributable to the anaerobic respiration of denitrification micro-organisms. We aimed to elucidate and to regulate a molecular mechanism of the N₂O generation by the micro-organisms. On the basis of the X-ray crystallographic analysis, the functional analysis of some mutants and the molecular dynamic simulation, we proposed that the complex of the NO generation enzyme (nitrite reductase) and NO detoxifying enzyme (nitric oxide reductase) in micro-organism cell is a key player for the N₂O generation. We also found four compounds which inhibit the NiR function, and eventually the N₂O formation.

研究分野：生物無機化学

キーワード：一酸化窒素 亜酸化窒素 脱窒菌 嫌気呼吸 温室効果ガス オゾン層破壊物質

1. 研究開始当初の背景

亜酸化窒素 Nitrous Oxide (N_2O)は「笑気」として知られる窒素酸化物 NO_x の一種である。他の NO_x とは異なり、非常に安定で反応性が低い為に、ヒトに対しては無毒であり、地球大気中(対流圏)を広く拡散していく。しかし、温室効果ガスとして二酸化炭素 CO_2 の約310倍の効果がある為、 N_2O は地球環境に悪影響を及ぼす気体分子の一つである。2012年度における地球全体の排出量では、 N_2O (200万トン強)は CO_2 (316億トン)の約1200分の1であるが、その効果の度合いを考慮すると無視できない影響がある。加えて、 N_2O は対流圏をでて成層圏に達すると、宇宙線や紫外線の影響を受けて反応性の高い NO_x に変換され、オゾンと容易に反応し、オゾン層を破壊してしまう。フロン禁止後、 N_2O は最大のオゾン層破壊物質とされている。さらに、 CO_2 には植物の光合成という「炭素固定システム」が地球上に多量に存在しているのに対して、 N_2O にはそのような大規模な自然の「消去システム」が存在せず、わずかに脱窒微生物(後述)が有する亜酸化窒素還元酵素(Nitrous Oxide Reductase: N_2OR)が N_2 に変換できるのみである。産業廃棄物としての N_2O は CO_2 同様、人間の技術革新により減少させる事は可能かもしれない。しかし、窒素肥料や動物の糞便などに含まれる様々な窒素化合物から、土壌や海中に存在する微生物発生させる N_2O が全排出量の約7割を占める点は問題である。窒素肥料の使用増加により、 N_2O は CO_2 同様に年々増加しており、21世紀の地球環境保全の観点から看過できない問題となっている。

脱窒微生物が N_2O 産生の主役である。脱窒微生物は硝酸塩(NO_3^-)を逐次的に還元して窒素分子(N_2)に変換し($NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$)、地球上の窒素サイクルの中で重要な役割を果たしている。この中で、亜硝酸還元酵素(Nitrite Reductase: NiR)と一酸化窒素還元酵素(Nitric Oxide Reductase: NOR)が N_2O 産生に重要な役割を果たしている。通常、脱窒微生物体内においては、脱窒プロセスにより NOR によって産生された N_2O は N_2OR によって消去されるはずである。しかし、微生物の中には N_2OR を持たない種もあり、また、 N_2O は気体分子であるので、温泉や火山などの嫌気性の脱窒微生物の生存環境では、 N_2OR に消去される前に N_2O は大気中に拡散する割合も多い。これらが、地球上での大きな N_2O の発生源となっている。ちなみに、我々は2010年に、膜結合性 NOR の結晶構造を世界で初めて報告していた。

2. 研究の目的

N_2O 産生に関わる NiR と NOR の間の基質

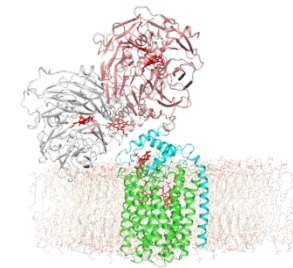
(NO)移動チャンネルに着目することから、生体内 N_2O 産生の機構を明らかにし、その阻害をめざす。

3. 研究の方法

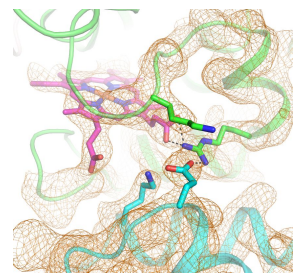
X線結晶構造解析法を用いて、 NiR と NOR の複合体の構造を明らかにした。その構造を基盤にした分子動力学計算により、複合体の安定性と細胞内での NO 移動をシミュレーションした。さらに、緑膿菌をホストとする NOR の発現系を構築し、 NOR が NiR と相互作用する部位の変異体を調製し、 NOR 変異体と NiR との相互作用解析をおこなった。また、理研の化合物バンクを活用し、 N_2O 産生を阻害する薬剤の探索を行った。

4. 研究成果

(1) NiR - NOR 複合体の結晶構造解析：右図に示す構造を明らかにした。両酵素は主にファンデアワールス力で相互作用していたが、その中でGlu119(NOR)とArg71(NiR)の間の静電的な相互作用が見いだされた。



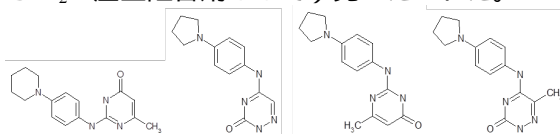
(2) NiR - NOR 複合体の分子動力学シミュレーション：上記の結晶構造を基盤に、生体膜を含んだ系で、分子動力学計算をおこなった。その結果、この複合体は安定に存在でき、結晶構造で明らかになった静電的相互作用に加えて、Lys100(NOR)と NiR のヘムcのプロピオン酸側鎖とが時間異存的な相互作用をする事が明らかとなった。さらに、水溶性酵素である NiR と細胞膜表面との相互作用も、この複合体安定化に大きく寄与している事も明らかにした。同じく分子動力学計算により、 NiR がその活性中心で産生した NO がどのように NOR に移動するかをシミュレートした。その結果、 NO は速やかに細胞膜に移動し NOR の活性中心にエネルギー障壁なく到達する事を示す事ができた。



(3) NiR - NOR 複合体の生理的意義を見いだす為に、緑膿菌をホストとする NOR 変異体の発現系を構築した。 NOR をロックアウトした緑膿菌は、細胞毒性の高い NO を無毒化できず、脱窒条件下(硝酸イオン存在、嫌気条件)では生育しなかった。そこに野生型 NOR をコードしたプラスミドを導入したところ、緑膿菌は生育できるようになった。そこで、 NOR (E119R)と NOR (K100E)の変異体をコードしたプラスミドを NOR ロックアウト緑膿

菌に導入した所、その変異緑膿菌の生育速度は著しく遅くなった。この結果は、NiR と NOR が緑膿菌細胞内で相互作用できなくなり、NiR が産生した NO が NOR により無毒化されることなく細胞内を拡散した結果を解釈した。逆に言えば、NiR-NOR 複合体形成は、NO 除去ならびに N₂O 産生システムとしては必須であると結論した。

(4) 上記の結果を基に、NiR ならびに NOR の阻害剤を探索した。その結果、下図に示した 4 種類の化合物が NiR 阻害剤として(すなわち N₂O 産生阻害剤として)見いだされた。



現在では、これら化合物と NiR との複合体の構造解析を継続中であり、さらに緑膿菌による N₂O 産生阻害度を測定中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 17 件)

E. Terasaka, K. Yamada, P.-H. Wang, K. Hosokawa, R. Yamagiwa, K. Matsumoto, S. Ishii, T. Mori, K. Yagi, H. Sawai, H. Arai, H. Sugimoto, Y. Sugita, Y. Shiro, T. Tosha: "Dynamics of Nitric Oxide Controlled by Protein Complex in Bacterial System" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2017) in press.

A. Otomo, H. Ishikawa, M. Mizuno, T. Kimura, M. Kubo, Y. Shiro, S. Aono, Y. Mizutani: "A Study of the Dynamics of Heme Pocket and C-helix in CooA upon CO Dissociation Using Time-resolved Visible and UV Resonance Raman Spectroscopy" *J. Phys. Chem. B* **120**, 7836-7843 (2016)

T. Yamawaki, H. Ishikawa, M. Mizuno, H. Nakamura, Y. Shiro, Y. Mizutani: "Regulatory Implications of Structural Changes in Tyr201 of the Oxygen Sensor Protein FixL" *Biochemistry* **55**, 4027-4035 (2016)

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)

O. Shoji, T. Fujishiro, K. Nishio, Y. Kano, H. Kimoto, S.-C. Chien, H. Onoda, A. Muramatsu, S. Tanaka, A. Hori, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe: "A Substrate-Binding-Site Mimic H₂O₂-Dependent Cytochrome P450 Produced by One-point Mutagenesis and Peroxygenation of Non-native Substrate" *Catalysis Science & Technology* **6**, 5806-5811 (2016)

M. Sakaguchi, T. Kimura, T. Nishida, T. Tosha, Y. Yamaguchi, S. Yanagisawa, G. Ueno, H. Murakami, H. Ago, M. Yamamoto, T. Ogura, Y. Shiro, M. Kubo: "A Nearly On-axis Spectroscopic System for Simultaneously

Measuring UV-visible Absorption and X-ray Diffraction in the SPring-8 Structural Genomics Beamline" *J. Synchro. Rad.* **23**, 334-338 (2016)

T. Tsuge, S. Sato, A. Hiroe, K. Ishizuka, H. Kanazawa, Y. Shiro, T. Hisano: "Contribution of the Distal Pocket Residue to the Acyl-chain-length Substrate Specificity of (R)-specific Enoyl-CoA Hydratases from *Pseudomonas*: Site-directed Mutagenesis, Chimeragenesis, X-ray Crystallographic Analysis, and Homology Modeling" *Appl. Environ. Microbio.* **81**, 8076-8083 (2015)

Z. Cong, O. Shoji, C. Kasai, N. Kawakami, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe: "Activation of Wild-type Cytochrome P450BM3 by the Next Generation of Decoy Molecules: Enhanced Hydroxylation of Gaseous Alkanes and Crystallographic Evidence" *ACS Catalysis* **5**, 150-156 (2015)

R. Makino, E. Obayashi, H. Hori, T. Iizuka, K. Mashima, Y. Shiro, Y. Ishimura: "The Initial O₂ Inserting Step of Tryptophan Dioxygenase Reaction Proposed by a Heme-Modification Study" *Biochemistry* **54**, 3604-3616 (2015)

A. Doi, H. Nakamura, Y. Shiro, H. Sugimoto: "Crystal Structure of Response Regulator ChrA in the Heme-Sensing Two-Component System of *Corynebacterium diphtheriae*" *Acta Cryst. F* **71**, 966-971 (2015)

S. Takahashi, S. Nagano, T. Nogawa, N. Kanoh, M. Uramoto, M. Kawatani, T. Shimizu, T. Miyazawa, Y. Shiro, H. Osada: "Structure-function Analyses of Cytochrome P450revI Involved in Reveromycin A Biosynthesis and Evaluation of the Biological Activity of Its Substrate, Reveromycin T" *J. Biol. Chem.* **289**, 32446-32458 (2014)

K. Takagi, M. Al-Amin, N. Hoshiya, J. Wouters, H. Sugimoto, Y. Shiro, H. Fukuda, S. Shuto, M. Arisawa: "Palladium-Nanoparticle-Catalyzed 1,7-Palladium Migration Involving C-H Activation, Followed by Intramolecular Amination: Regioselective Synthesis of N1-Arylbenzotriazoles and an Evaluation of Their Inhibitory Activity Towards Indoleamine 2,3-Dioxygenase" *J. Org. Chem.* **79**, 6366-6371 (2014)

H. Tsujino, T. Yamashita, A. Nose, K. Kukino, H. Sawai, Y. Shiro, T. Uno: "Disulfide Bonds Regulate Binding of Exogenous Ligand to Human Cytochrome c" *J. Inorg. Biochem.* **135**, 20-27 (2014)

E. Terasaka, N. Okada, N. Sato, Y. Sako, Y. Shiro, T. Tosha: "Characterization of Quinol-Dependent Nitric Oxide Reductase from *Geobacillus Stearothermophilus*: Enzymatic Activity and Active Site Structure" Special Issue on *Respiratory Oxidases in Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* **1837**, 1019-1026 (2014)

C. Shirataki, O. Shoji, M. Terada, S. Ozaki, H. Sugimoto, Y. Shiro, Y. Watanabe: "An *in vivo* Inhibitory Effect on the Heme Uptake of *Pseudomonas aeruginosa* by Its Hemophore (HasA) Carrying Synthetic Metal Complexes" *Angw. Chem. Int. Ed.* **53**, 2862-2866 (2014)

N. Sato, S. Ishii, H. Sugimoto, T. Hino, Y. Fukumori, Y. Sako, Y. Shiro, T. Tosha: "Structures of Reduced and Ligand-Bound Nitric Oxide Reductase Provide Insights into Functional Differences in Respiratory Enzymes" *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* **82**, 1258-1271 (2014)

Y. Okamoto, A. Onoda, H. Sugimoto, Y. Takano, S. Hirota, D. Kurtz, Y. Shiro, T. Hayashi: "H₂O₂-dependent Substrate Oxidation by an Engineered Diiron Active Site in a Bacterial Hemerythrin" *Chem. Comm.* **2014**, 50, 3421-3423

〔学会発表〕(計 10 件)

Y. Shiro: "NO Dynamics in Biology: Its Generation and Decomposition" Royal Society Meeting Inorganic Chemistry, Osaka, Oct. 26 (2016)

Y. Shiro: "Molecular Mechanism of NO Reduction by Bacterial Nitric Oxide Reductases" *ICCP9*, Nanjing, China, July 3-8 (2016)

Y. Shiro: "Molecular Mechanism of NO Reduction by Bacterial Nitric Oxide Reductases" *229th ECS Meeting*, San Diego, USA, May 29 – June 3 (2016)

Y. Shiro: "Molecular Mechanism of NO Reduction by Bacterial Nitric Oxide Reductases" *PACIFICHEM2015 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies*, Honolulu, USA, Dec. 15-20 (2015)

Y. Shiro: "Proton Transfer in Bacterial Nitric Oxide Reductases Coupled with NO Reduction" *PACIFICHEM2015 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies*, Honolulu, USA, Dec. 15-20 (2015)

Y. Shiro: "Dynamics of Nitric Oxide in Bacterial Cellular System" "*Cell Biology of Metals*" *Gordon Research Conference*, West Dover, VT, USA, July. 26-31 (2015)

Y. Shiro: "Molecular Mechanism of NO Decomposition by Nitric Oxide Reductases" *ICBIC17 17th International Conference of Biological Inorganic Chemistry*, Beijing, China, July 20-24 (2015)

Y. Shiro: "Generation, Channeling and Decomposition of NO in Bacterial System" "*Metals in Biology*" *Gordon Research Conference*, Ventura, USA, Jan. 25-30 (2015)

Y. Shiro: "Generation, Propagation and Decomposition of Nitric Oxide in Bacterial Denitrification" *18th European Bioenergetics Conference (EBEC 2014)*, Lisbon, Portugal, July 12-17 (2014) **Plenary Lecture**

Y. Shiro: "Bacterial Nitrite Reductase and Nitric Oxide Reductase; NO Generation, Channeling and Decomposition" *Eighth International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines*, Istanbul, Turkey, June 22-27 (2014)

〔図書〕(計 2 件)

藤井 浩、城 宜嗣: "鉄タンパク質・酵素の構造と機能" 「鉄の事典」朝倉書店 pp. 259-272 (2014)

T. Tosha, 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

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

城 宜嗣 (SHIRO Yoshitsugu)

国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学総合研究センター・主任研究員

研究者番号: 70183051