

研究課題名 一酸化窒素の生体内動態の分子科学



理化学研究所・城生体金属科学研究室・主任研究員

しろ よしつぐ
城 宜嗣

研究課題番号：26220807 研究者番号：70183051

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、膜タンパク質、環境科学、亜酸化窒素

【研究の背景・目的】

一酸化窒素 NO は、高等動物細胞においてはシグナル分子として重要な機能を果たしている。一方、NO はラジカル分子であり、タンパク質や核酸などの生体分子と容易に反応し、細胞損傷を引き起こす。本研究では、「脱窒」をモデル系として、生体中での NO の産生・伝搬・消去の機能メカニズムを、分子・原子のレベルから細胞レベルに渡って解明する事を目的としている。

脱窒は微生物の嫌気呼吸の一種であり、硝酸塩 (NO₃⁻)、亜硝酸塩 (NO₂⁻) を基質として、窒素 (N₂) まで逐次還元するシステムであり、地球上の窒素循環において重要な機能を果たしている。この過程において、亜硝酸還元酵素 NiR は、NO₂⁻ を一電子還元し NO を産生するが (NO₂⁻ + 2H⁺ + e⁻ → NO + H₂O)、この NO は一酸化窒素還元酵素 NOR により速やかに亜酸化窒素 N₂O に還元される (2NO + 2H⁺ + 2e⁻ → N₂O + H₂O)。本研究では、NiR と NOR を研究対象として上記目的を達成する。

【研究の方法】

1. NOR による NO 消去機構の解明：NOR の分子構造を基盤にその触媒反応機構を明らかにする。この解明のポイントは、酵素反応中に現れる短寿命 (1 ミリ秒) な反応中間体である NO 結合型酵素の構造・電子状態である。低温トラップ結晶構造解析法、時分割可視・赤外分光法、時分割結晶構造解析法などを駆使して、この課題に挑戦する。

2. NiR から NOR への NO 伝搬機構の解明：NO 産生酵素 (NiR) と NO 消去酵素 (NOR) との相互作用を明らかにする。精製酵素同士の複合体形成とその間での NO 伝搬の機構を、結晶構造解析を中心とした様々な手法で明らかにする。さらに、蛍光顕微鏡等を用いて、細胞内での複合体形成と NO を拡散させない NO 伝搬機構を証明する。加えて、NiR-NOR 複合体にさら

に電子供与体 (アズリン) を加えた三者複合体の解析から、NO₂⁻ から N₂O への変換の生体内連続

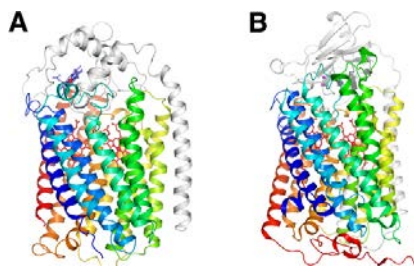


図1 A. 一酸化窒素還元酵素と B. チトクロム酸化酵素の結晶構造

反応場の形成を確認し、さらに薬剤等によるその制御をめざす。

3. 呼吸酵素の実験室分子進化：NOR は好気呼吸酵素チトクロム酸化酵素の分子進化上の祖先と考えられている (図1)。部位特変異により NOR の NO 還元活性を酸素 O₂ 還元活性へと変換する。さらに、酵素反応に利用されるプロトンの伝達経路を制御する。これらにより、嫌気呼吸から好気呼吸への呼吸酵素の分子進化を実験室レベルで再現する事に挑戦する。

【期待される成果と意義】

細胞内での NO 動態を分子・原子のレベルで理解可能となり、細胞内での物質移動・代謝という側面から生物化学の新しい分野が開拓できる。また、呼吸酵素の分子進化、特にプロトンポンプに関する新しい知見が期待できる。NOR は病原菌の生存にも必須である。NO 還元生成物の N₂O は、温室効果ガスでありオゾン層破壊ガスとしても知られており、地球上の N₂O 産生の約 7 割は NOR 反応による。これらのことから、その NOR 反応の分子機構解明と阻害剤検索は、医科学および環境科学分野にも貢献する。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- T. Hino, Y. Matsumoto, S. Nagano, H. Sugimoto, Y. Fukumori, T. Murata, S. Iwata, Y. Shiro: "Structural Basis of Biological N₂O Generation by Bacterial Nitric Oxide Reductase" *Science* **330**, 1666-1670 (2010)
- Y. Matsumoto, T. Toshi, A. V. Pislakov, T. Hino, H. Sugimoto, S. Nagano, Y. Sugita, Y. Shiro: "Crystal Structure of Quinol-Dependent Nitric Oxide Reductase from *Geobacillus Stearothermophilus*" *Nat. Strl. Mol. Biol.* **19**, 238-245 (2012)

【研究期間と研究経費】

平成 26 年度 - 30 年度
150,100 千円

【ホームページ等】

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