

膜結合型一酸化窒素還元酵素の基質類似体結合型の核共鳴非弾性散乱分光による測定

Measurement of Substrate Analogue-bound Form of Membrane-integrated Nitric Oxide Reductase by Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopy

當舎 武彦^a、依田 芳卓^b
Takehiko Tosha^a and Yoshitaka Yoda^b

^a理化学研究所 SPring-8、^b(公財)高輝度光科学研究センター
^aRIKEN, SPring-8 Center, ^bJASRI

膜結合型一酸化窒素還元酵素 (NOR) は、ヘム鉄と非ヘム鉄からなる複核活性中心をもっており、2分子の一酸化窒素 (NO) を2当量の電子とプロトンを利用して、亜酸化窒素 (N₂O) へと還元する反応を触媒する。本研究では、NORの活性部位構造の詳細を調べるために、核共鳴非弾性散乱 (NRVS) に着目した。活性部位に基質の類似体であるシアン化物イオンを結合させた試料の測定を行い、鉄とシアン化物イオン間の振動モードの帰属を試みた。

キーワード：核共鳴非弾性散乱、金属タンパク質、ヘム鉄、非ヘム鉄

背景と研究目的：

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) などの病原菌は、宿主に感染した際に、バイオフィームと呼ばれる保護膜を形成し、その内部で生育する。バイオフィーム内部は、酸素濃度が非常に低いため、これらの病原菌は、嫌気呼吸の一種である脱窒により生きるためのエネルギーを得ている。脱窒は、硝酸を段階的に還元し、窒素分子を生成する反応である。この過程では、中間生成物として、細胞毒である NO が生成する。緑膿菌は、NO を迅速に無毒化するために、膜結合型一酸化窒素還元酵素 (NOR) を利用している。

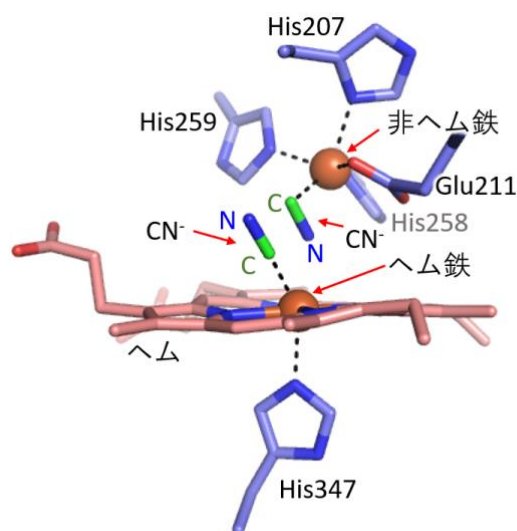


図 1. 基質類似体である CN⁻が結合した NOR の活性部位の構造[2,3]。2つの CN⁻がそれぞれヘム鉄と非ヘム鉄に配位している。

NOR は、ヘム鉄と非ヘム鉄から構成される複核活性中心において、2当量の電子とプロトンを利用して2分子の NO から亜酸化窒素 (N₂O) と水分子を生成する (2NO + 2e⁻ + 2H⁺ → N₂O + H₂O)。この反応には、NO の鉄への配位、鉄から NO への電子供与、NO へのプロトン供与、N-N 結合の形成および N-O 結合の開裂といった興味深いケミストリーが含まれており、それらが巧妙に共役することで NO 還元が行われる。そのため、その分子機構には、多くの研究者が興味をも

っている[1]。我々は、これまでに X 線結晶構造解析を中心に、NOR の反応機構の解明を目指した研究に取り組んでき、その活性部位の構造を明らかにしてきた(図 1) [2,3]。しかし、X 線結晶構造解析からは、NOR の活性中心金属の電子状態に関する情報を得ることは難しく、詳細な反応機構の理解にはいたっていない。

我々は、NOR の触媒反応機構に関する研究を進めるために、活性部位の鉄原子の電子状態や配位構造を検討することが可能な核共鳴非弾性散乱測定 (Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopy: NRVS) [4]に注目し、NRVS 測定のための NOR の調製法を検討してきた[5,6]。NRVS は、 ^{57}Fe のようなメスバウアー活性な核種を含む試料を高濃度 (1 mM 以上) で調製する必要があるため、その手法を確立した。これまでに、基質結合型のモデルとして基質アナログであるシアン化物イオン (CN $^-$) 結合型の NRVS 測定を行い、鉄と CN $^-$ 間の振動モードと思われるシグナルを検出している。本研究では、CN $^-$ 結合型 NOR の活性部位の構造をより詳しく検討するために、CN $^-$ の同位体を利用し、鉄と CN $^-$ 間の振動モードの帰属を試みた。

実験：

^{57}Fe を含む合成培地で生育させた緑膿菌から NOR を精製することで、NOR の活性部位に存在する鉄が ^{57}Fe に置換されたものを調製した。試料の精製は、既報に従った[2,3]。精製した試料は、紫外可視吸収測定から、活性部位にヘムが取り込まれていることを確認した。調製した試料の NO 還元活性を調べ、活性のある酵素が精製できていることを確認した。精製標品は、50 mM HEPES buffer pH 7.0、0.05% (w/v) ドデシルマルトシド (DDM) に溶解させた。NRVS スペクトルの測定には、タンパク質としては高濃度 (1 mM 以上) の試料を必要とするので、精製試料を遠心濃縮により限界まで濃縮したものを準備した。

還元 CN $^-$ 結合型試料の調製は、既報に従った[6]。酸化型の試料をゴム栓のできるバイアル瓶に入れた後、真空ポンプにより窒素雰囲気にした。ジチオナイトの粉を別のバイアル瓶に入れて、こちらも真空ポンプにより窒素雰囲気にした。ガスタイトシリンジを用いて窒素雰囲気にした NOR 試料をとり、ジチオナイトの粉が含まれたバイアル瓶に移した。試料が還元されたことを示す茶色から赤色への変化を確認した。還元型の試料にガスタイトシリンジを用いて KCN 溶液を最終濃度が 10 mM 以上になるように加えた。K ^{13}CN および K ^{15}CN を用いて、還元 CN $^-$ 結合型の試料を調製した。

それぞれの試料は、ガスタイトシリンジにより NRVS 測定用のセルに導入し、素早く液体窒素で凍結した。凍結した試料は、BL09XU にて、クライオスタット中のセルホルダーに設置した。NRVS 測定は、BL09XU においてタンパク質の NRVS 測定を行う際の標準的な装置配置で行った。Si975-Si975 の高分解能モノクロメータによって 0.8 meV に分光した X 線をクライオスタット中において液体 He 温度に保った凍結試料に照射し、APD 検出器で核の準位を経た時間遅れの成分だけをカウントした。入射 X 線のエネルギーを -20 ~ 80 meV の範囲で走査し、NRVS スペクトルを測定した。100 回程度の積算を行い、NRVS スペクトルを得た。本測定条件では、一回のエネルギー走査に約 45 分の時間がかかり、一つの NRVS スペクトルを得るには、2 ~ 3 日程度の測定時間を要した。

結果および考察：

図 2 に CN $^-$ 同位体を用いた際の還元 CN $^-$ 結合型 NOR および比較のために、これまでの測定で得ている還元 CN $^-$ 結合型 NOR[6]の NRVS スペクトルを示す。これまでの振動分光法を用いた研究から、20 ~ 50 meV のエネルギー領域に観測されているシグナルは、鉄とヒスチジンやポルフィリン環ピロール由来の窒素原子間の振動モードに由来すると推定される。同位体非置換の CN $^-$ を用いた場合に観測される 65 meV あたりのシグナルは、鉄と CN $^-$ 間の結合 (Fe-CN) に関する振動モードであると考えられる[6]。

Fe-CN に関する振動モードの帰属を行うために、 ^{13}C および ^{15}N の同位体 CN $^-$ を用いた場合の NRVS スペクトルと比較した。もし、観測されているシグナルが FeCN の振動を含むモードであった場合、それらのシグナルは、 ^{13}C および ^{15}N の同位体 CN $^-$ を用いることで、シフトを示すはずである。過去の結果から、Fe-CN 伸縮振動に由来するシグナルは、 ^{13}CN 、 ^{15}CN と Fe の配位子の分子量の増加に伴い、低エネルギー側にシフトすることが知られている[7]。一方で、FeCN の変角振動の場合は、Fe に直接配位する C を同位体にしたときのみ、低エネルギー側へのシフトがみられる[7]。図 2 に同位体非置換の CN $^-$ および同位体 CN $^-$ を用いた際の NRVS スペクトルを示す。

同位体非置換の CN⁻を用いた際にみられた 65 meV あたりのシグナルが同位体の ¹³CN⁻を用いた場合に、低エネルギー側にシフトしているようにもみられたが、本研究で得られた同位体 CN⁻を用いた際の NRVS スペクトルは、S/N 比が低く、65 meV にみられたシグナルが同位体シフトを示すという明確な結果は得られなかった。また、その他のシグナルについても、明確な同位体シフトを示すものを検出できなかった。CN⁻の同位体を用いた際に NRVS スペクトルの質が低下した原因は不明であるが、試料調製の CN⁻を添加時に、試料濃度が薄まってしまい、シグナル強度の低下を招いたと推察できる。

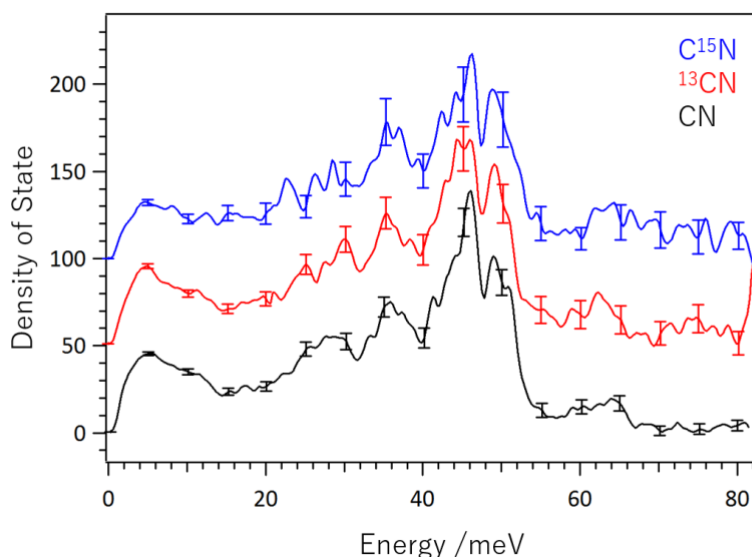


図 2. 還元 CN⁻ 結合同型 NOR の NRVS スペクトル。同位体非置換の CN⁻、¹³C および ¹⁵N の同位体 CN⁻を用いた場合のスペクトルを示している。各エネルギーでの平均値に加えて、5 meV ごとに S/N 比を示すための標準偏差を示している。同位体非置換の CN⁻を用いた場合と比較して、同位体 CN⁻を用いた場合の S/N 比が低くなっている。測定は、BL09XU で行った。

今後の課題：

本研究では、これまでに測定した還元 CN⁻結合同型の試料でみられたシグナルの帰属を行うために ¹³C および ¹⁵N の同位体 CN⁻を用いて NRVS 測定を行った。しかし、同位体を用いて測定した NRVS スペクトルの S/N 比が低く、シグナルの帰属までにはいたらなかった。Fe-CN 伸縮振動や FeCN 変角振動の振動数を決定することができれば、構造情報と合わせた理論計算により、FeCN 部分の電子状態を議論することが可能となる。このような情報は、NOR 活性部位の鉄に NO が結合した際の分子構造ならびに電子状態に関する知見を与えるものであり、NOR による NO 還元反応の分子機構の解明につながることを推察できる。

今回の実験では、実験当時に構造解析が完了していたシアン結合同型をターゲットとしたが、試料調製の難しさもあり、議論可能なデータを得ることができなかった。今後は、ガス状の基質類似体である一酸化炭素 (CO) を用いることで、試料の濃度低下などを引き起こすことなく、NRVS 測定ができ、鉄-CO 伸縮振動のデータに基づいた構造に関する議論が進むものと期待できる。

参考文献：

- [1] P. Moënne-Loccoz, *Nat. Prod. Rep.*, **24**, 610 (2007)
- [2] T. Hino, *et al.*, *Science*, **330**, 1666 (2010)
- [3] N. Sato, *et al.*, *Proteins*, **82**, 1258 (2014)
- [4] R. W. Scheidt, *J. Inorg. Biochem.* **99**, 60 (2005)
- [5] T. Tosha *et al.*, *SPRING-8/SACLA 利用研究成果集*, **6**, 153 (2018)
- [6] T. Tosha and Y. Yoda, *SPRING-8/SACLA 利用研究成果集*, **6**, 159 (2018)
- [7] J. Al-Mustafa *et al.*, *J. Biol. Chem.* **270**, 10449 (1995)

©JASRI

(Received: March 30, 2018; Early edition: June 22, 2018;
Accepted: July 3, 2018; Published: August 16, 2018)