

髄膜炎菌の感染増殖に必須の酵素：一酸化窒素還元酵素 ～ 構造、機能とその阻害 ～

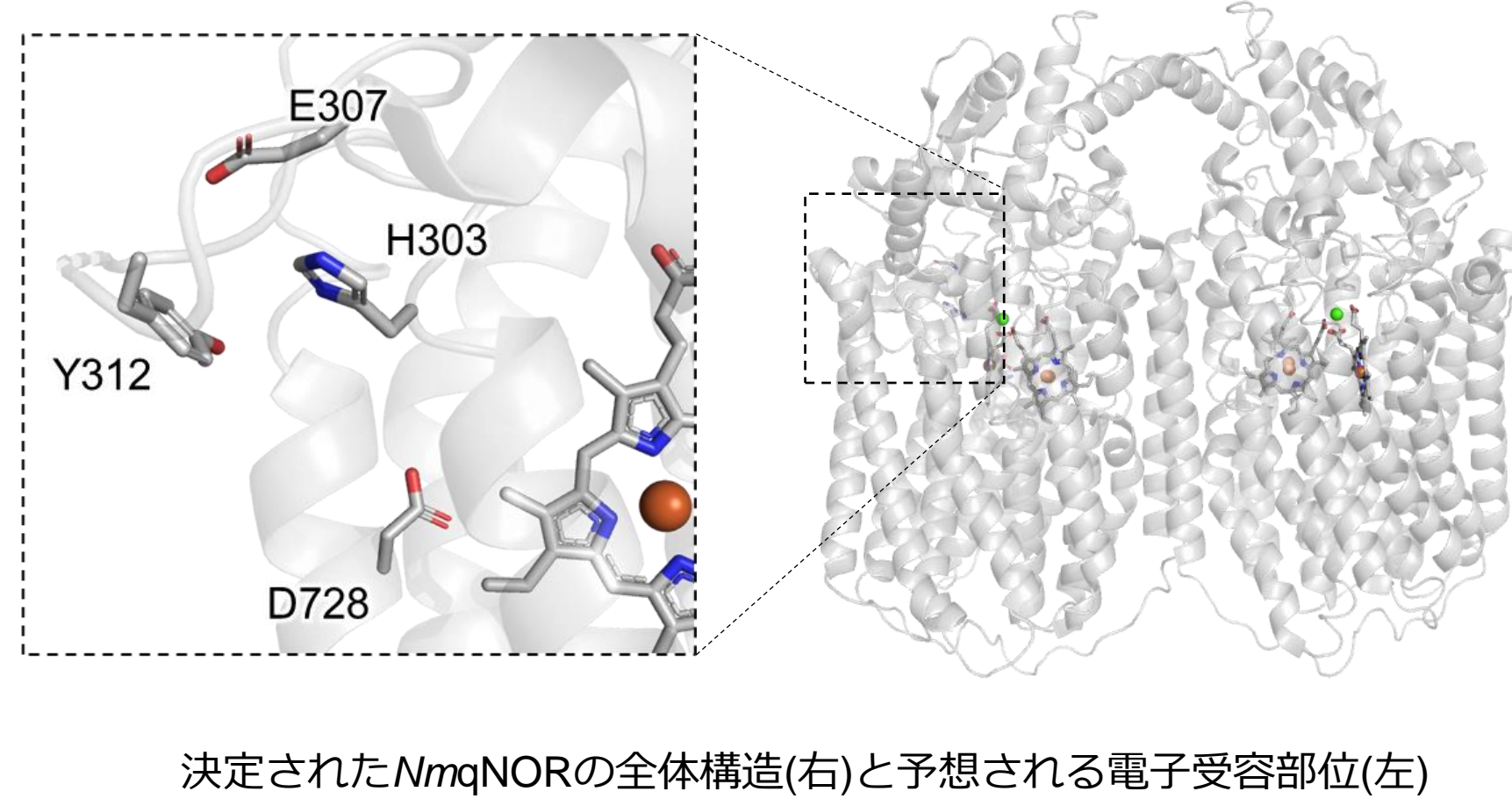
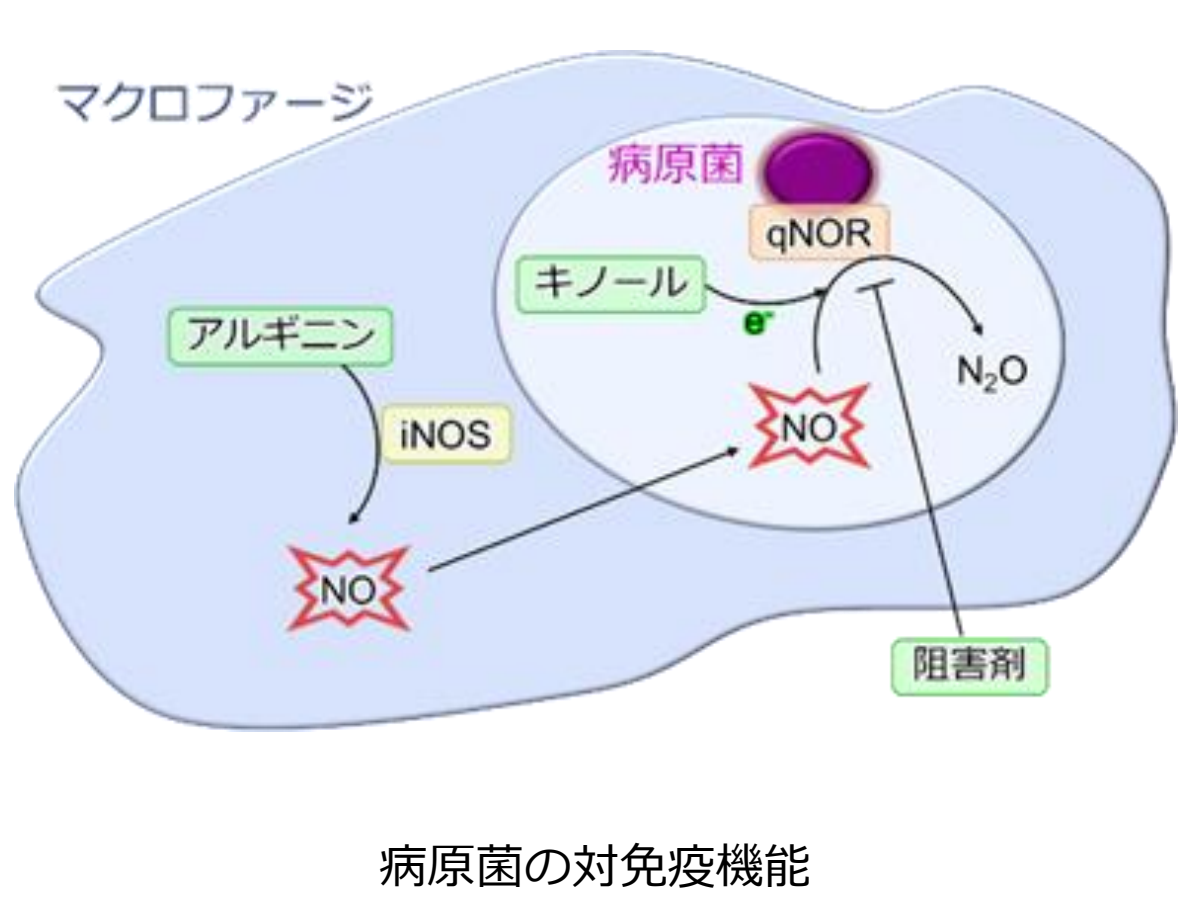
©福本 幸起¹、Chai C. Gopalasingam¹、當舎 武彦²、村本 和優¹、城 宜嗣¹(¹兵大・院理、²理研・放射光)

1. 背景・目的

病原菌がヒトの体内に侵入すると免疫系が機能し、病原菌に攻撃をしかける。その第一段階としてマクロファージが病原菌を内部に取り込み、一酸化窒素(NO)合成酵素の働きにより抗菌ガスのNOが産生される。これに対し、病原菌は膜タンパク質であるキノール依存性一酸化窒素還元酵素(qNOR)を用い、生体膜中のキノール分子から供与される電子によりNOを還元・無毒化し、ヒト体内での生存を図る。 $(2NO+2H^++2e^- \rightarrow N_2O+H_2O)$ よって病原菌においてqNORがその働きを失うと、抗菌ガスであるNOを無毒化することができなくなり、病原菌のヒト細胞内における生存率は低下する。このためqNORの構造や機能への理解は、qNORを持つ病原菌に対する抗菌薬開発への可能性を秘めている。

これまでの研究において、X線結晶構造解析およびクライオ電子顕微鏡によって髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)由来qNORの構造が決定された。これによりNO還元反応の活性中心や、活性中心へのプロトン供給経路などが明らかにされた。一方でキノール分子からの電子供与に関わる詳細な分子機構は未だ解明されていない。

本研究では*NmqNOR*の電子伝達機構の解明を目的とし、予想されるキノール結合部位の変異体解析や、電子受容部位に作用するキノールアナログを用いた機能解析、およびキノールアナログが結合したqNORの構造決定を目指す。



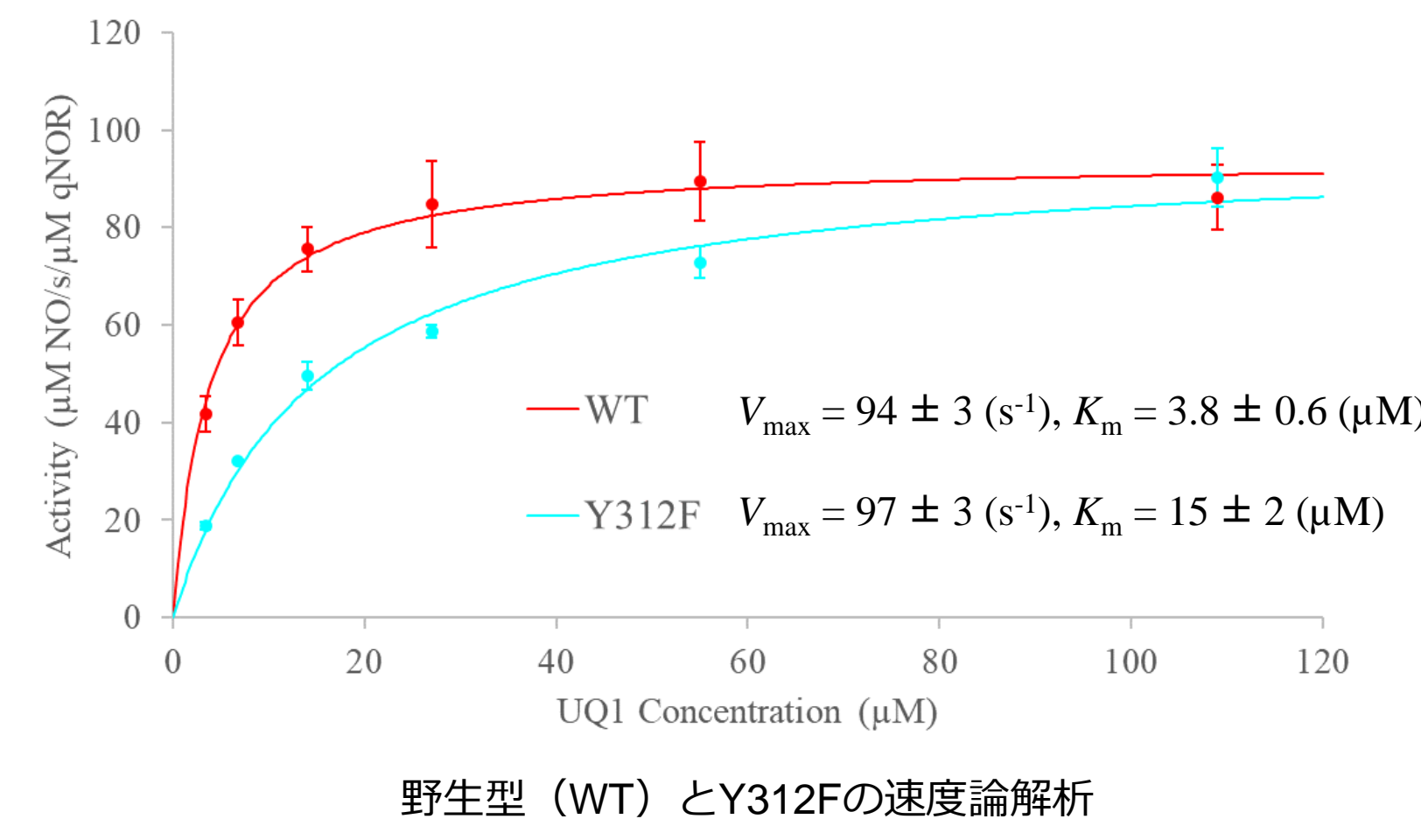
5. 変異体解析

<i>NmqNOR</i>	電子供与体	活性値 ($\mu\text{M}/\text{s}^{-1}/\mu\text{M}$)	活性比 (%)
野生型	UQ1	100 ± 0.33	100
H303A	UQ1	0.3 ± 0.4	0.33
E307A	UQ1	12 ± 1	12
Y312F	UQ1	81 ± 4	81
D728A	UQ1	0.2 ± 0.1	0.24

• H303, E307, Y312, D728は膜貫通領域にある荷電性/親水性アミノ酸残基で、電子供与体であるキノールが結合すると予想される。生物種間での保存性が高い。

• それぞれのアミノ酸残基変異体を作製・精製し、電子供与体としてUbiquinol-1を用いて活性を測定した。

• 活性測定の結果、E307Aでは活性が大きく低下し、H303AとD728Aでは活性が失われ、Y312Fでは活性が保たれた。



• 野生型とY312Fに対して、Ubiquinol-1の濃度を変えて活性を測定した。

• 活性値に対してミカエリス・メンテン式で表される曲線をフィッティングし、最大反応速度(V_{max})とミカエリス定数(K_m)を算出した。

• Y312Fでは野生型より K_m 値が増大した。

2. 発現・精製

(変異体作製)、形質転換

↓大腸菌 C43(DE3)

前培養

↓ 2xYT培地 + 0.1mg/mL Ampicillin, 16時間

本培養

↓ LB培地 + 0.1mg/mL Ampicillin + 0.5mM IPTG, 5時間

細胞膜調製

↓ 細胞破碎、超遠心

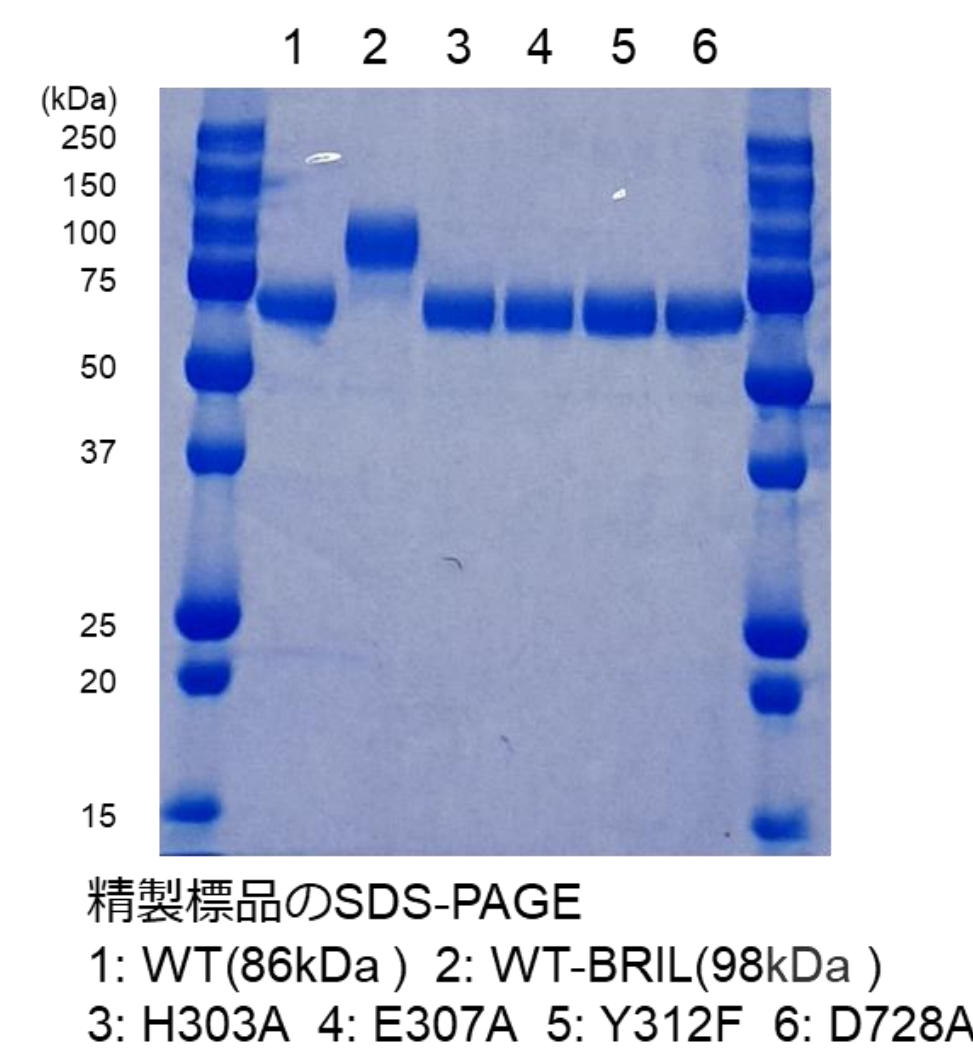
膜可溶化

↓ 界面活性剤(1% DDM)

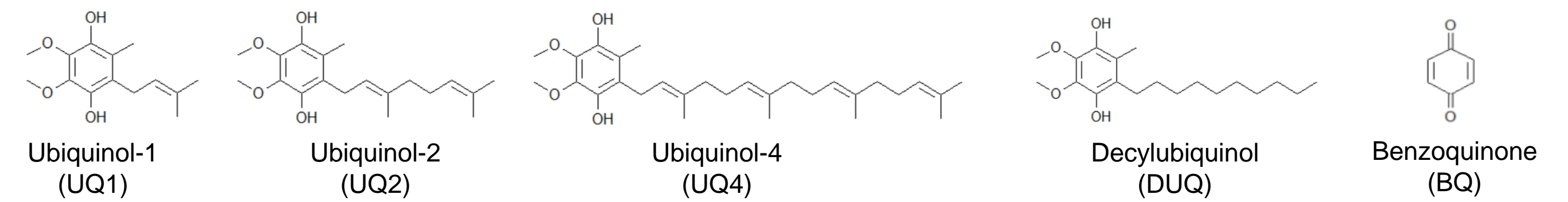
アフィニティー精製

↓ 10 × His - ニッケルカラム、200mM Imidazole

ゲル濾過クロマトグラフィー



6. 機能解析



電子供与体	活性値 ($\mu\text{M}/\text{s}^{-1}/\mu\text{M}$)
UQ1	75 ± 3
UQ2	85 ± 5
UQ4	2 ± 4
DUQ	14 ± 0.5
BQ	活性なし

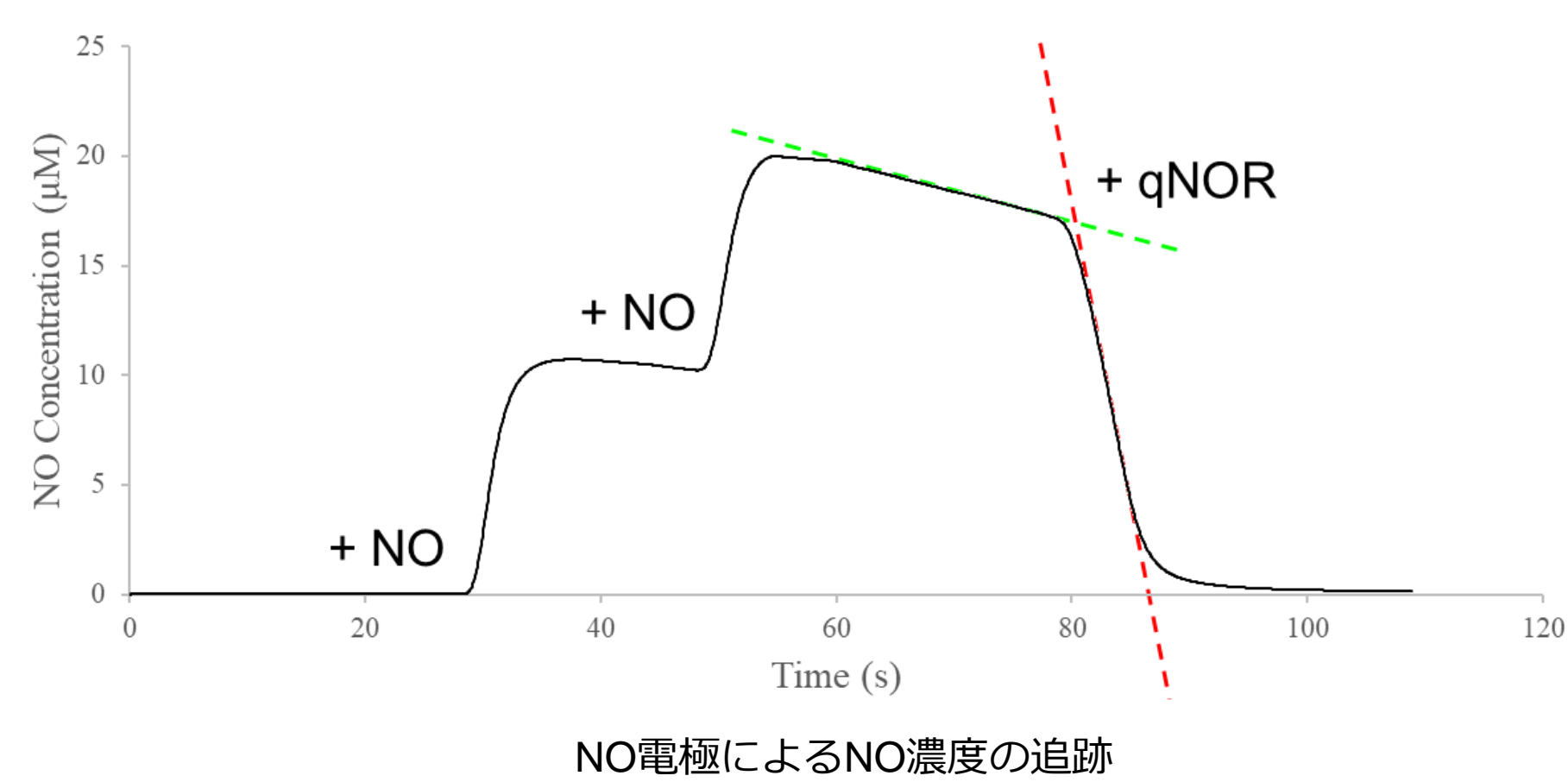
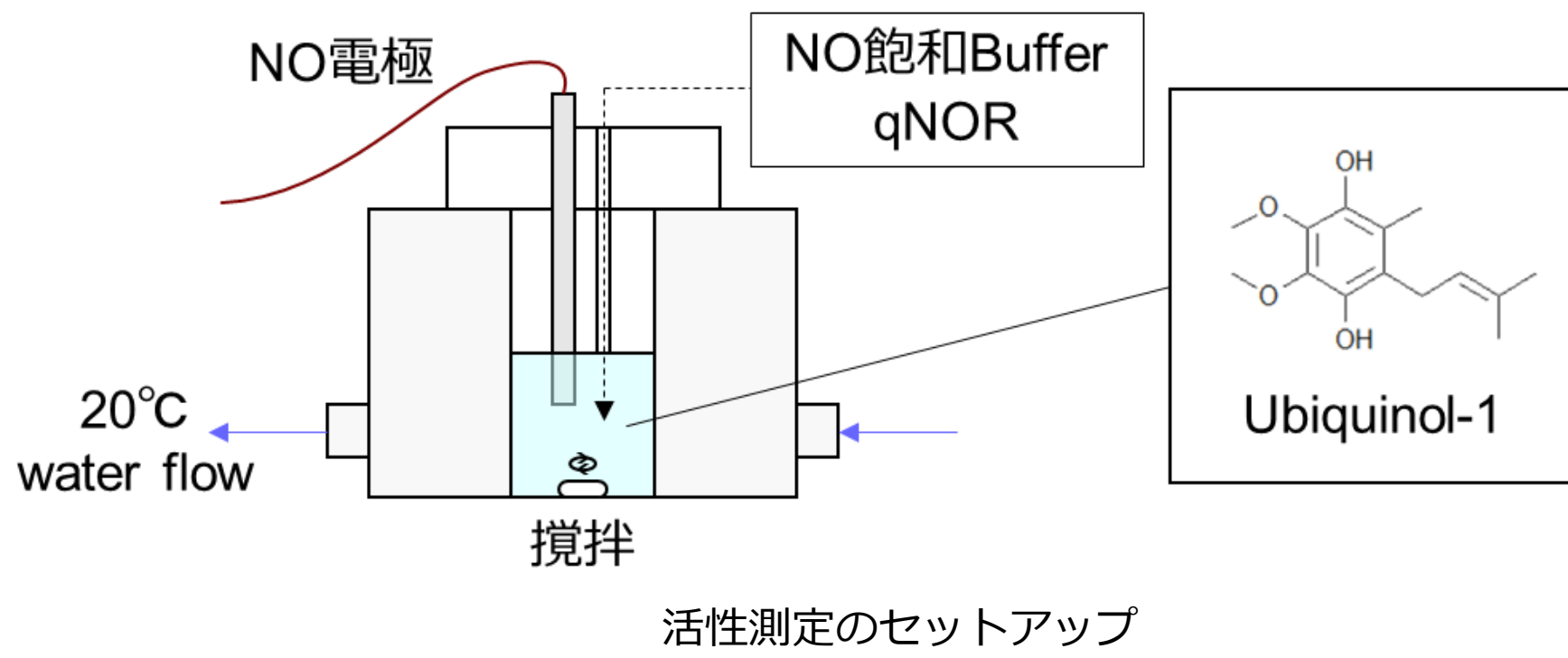
• 側鎖の長さや構造の違う5種類のキノールアナログを電子供与体として活性測定を行った。

• Ubiquinol-2での活性はUbiquinol-1と同等であった。

• Decylubiquinolでの活性はUbiquinol-1よりも低かった。

• Ubiquinol-4とBenzoquinoneでは活性がほとんど見られなかった。

3. 活性測定

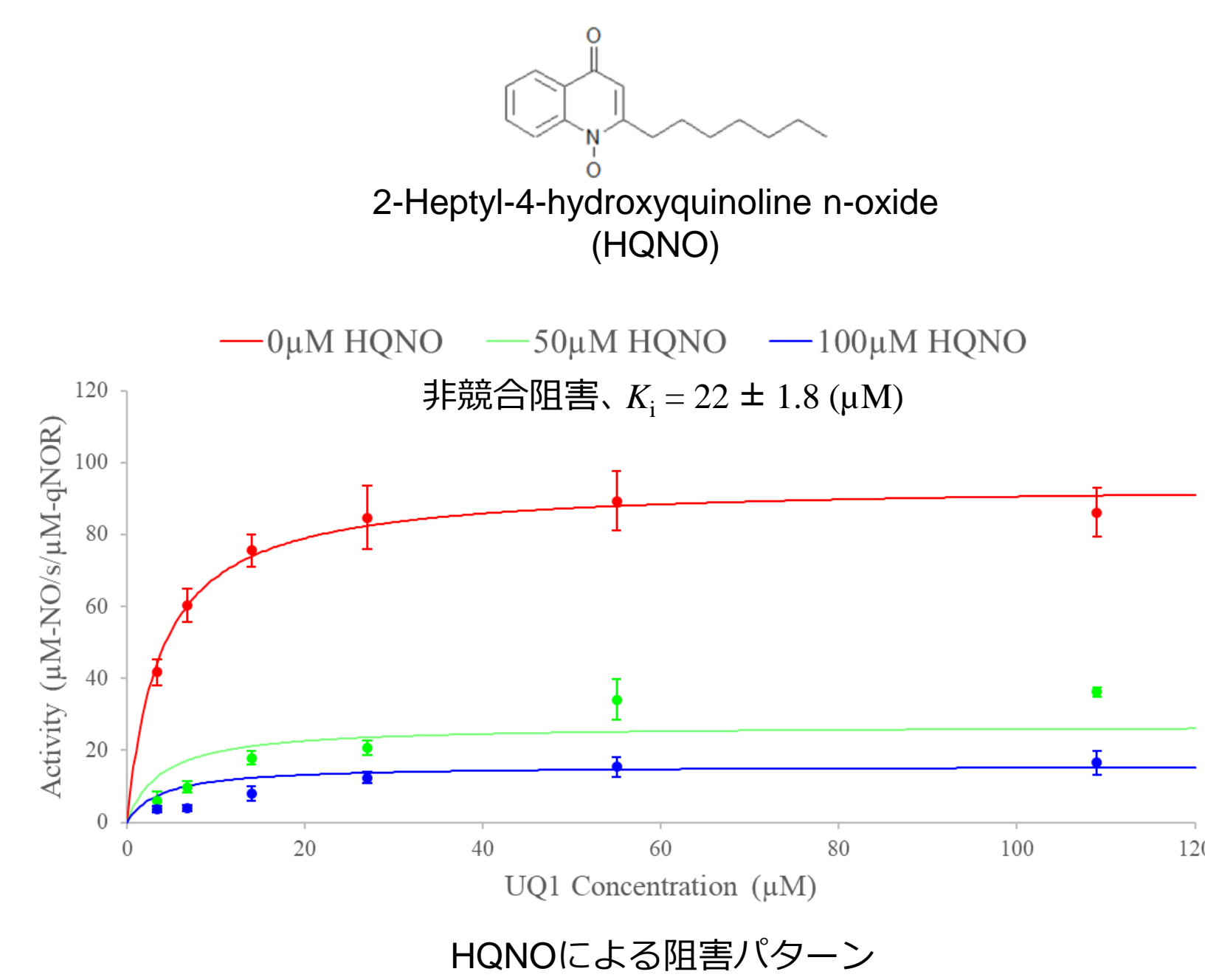


• 精製されたqNORの活性の測定は、20°Cに保ったガラスセル内で行った。

• セル内に電子供与体(Ubiquinol-1)、NO飽和Buffer、qNORを順に加えた。

• qNORによるNO還元の様子を、電流値から換算したNO濃度の減少から追跡した。

• 1 μM のqNORが1秒間に消費したNO量($\mu\text{M}\cdot\text{NO}/\text{s}/\mu\text{M}\cdot\text{qNOR}$)を活性値として算出した。

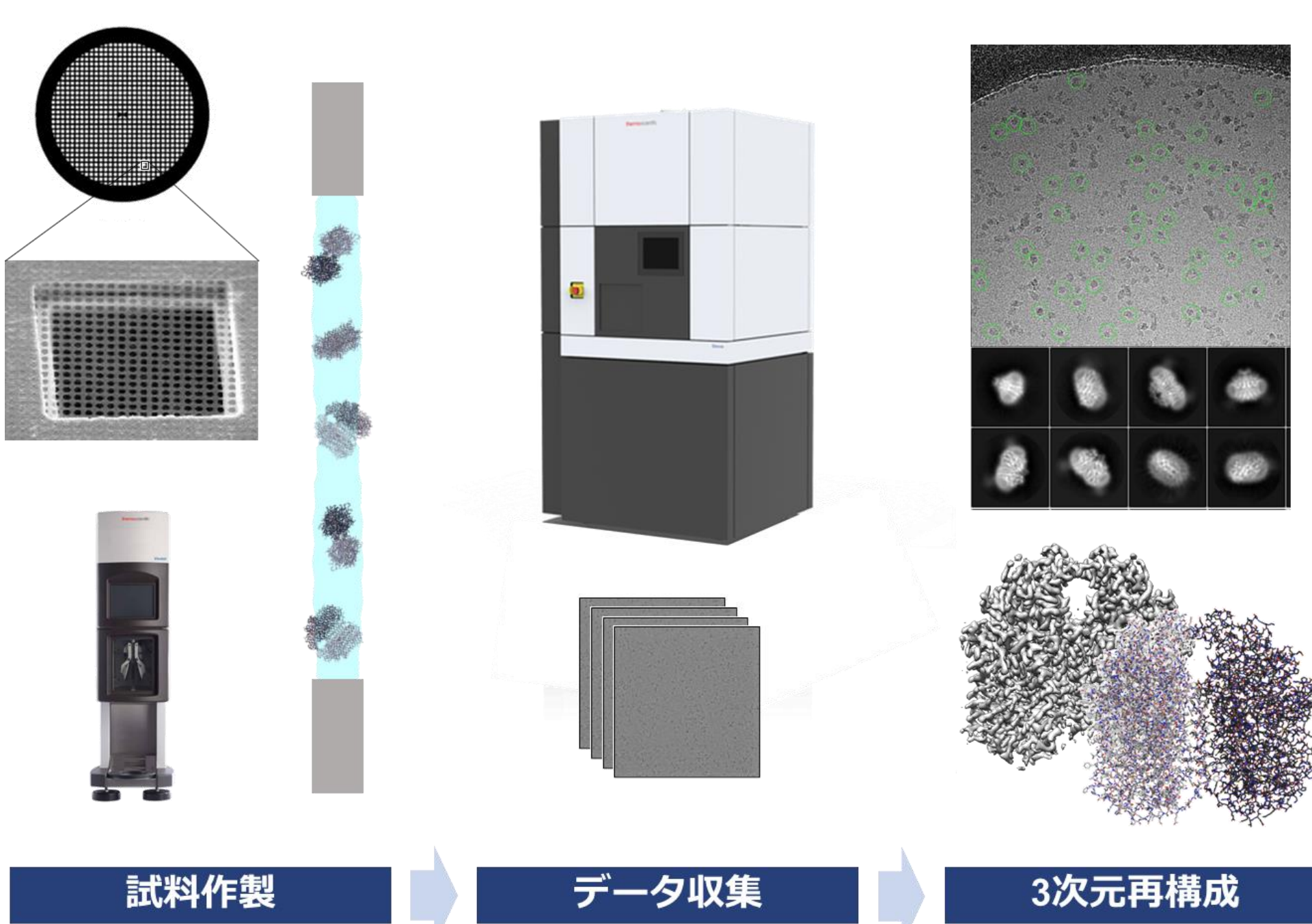


• 測定セル内にUbiquinol-1と共にキノールアナログであるHQNOを加え、Ubiquinol-1の濃度を変えて活性を測定した。

• 活性値に対してミカエリス・メンテン式で表される曲線をフィッティングした。

• HQNOはUbiquinol-1と非競合的に活性を阻害し、阻害定数(K_i)の値は K_m 値の6倍程度であった。

4. 構造解析



• 精製qNOR溶液を直径1.2 μm の穴の空いたカーボン膜に乗せ、余分な溶液をろ紙で吸い取り、薄膜状にして瞬間凍結した。

• 凍結試料をクライオ透過型電子顕微鏡を用いて撮影、データ収集した。

• 様々な方向を向いたqNORの単粒子画像を画像処理ソフトウェアにより分類、平均化し、2.81 Å分解能の3Dモデルに再構成した。

7. 要約、今後の計画

• クライオ電子顕微鏡による単粒子画像解析により、キノールが結合していない状態の*NmqNOR*の密度マップを2.81 Å分解能で得た。

• 変異体解析から、His303, Asp728がキノールからの電子供与に必須であること、Glu307も電子伝達に関与することが示唆される。

• 速度論的解析から、Y312がキノールとqNORとの親和性に関与することが示唆される。

• Ubiquinol-1, Ubiquinol-2, Decylubiquinolは電子供与体として機能する。

• HQNOがUbiquinol-1に対する非競合阻害剤として作用する。

• 今後は、Ubiquinol-2, Decylubiquinol存在下での*NmqNOR*のクライオ電子顕微鏡単粒子構造解析を進めていく予定である。