

令和 6 年 9 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02130

研究課題名（和文）コレラ菌NADH-ユビキノン酸化還元酵素を標的とする抗菌剤創製基盤の確立

研究課題名（英文）Construct of the platform for developing antibiotics targeting Vibrio cholerae NADH-ubiquinone oxidoreductase

研究代表者

三芳 秀人（Miyoshi, Hideto）

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：20190829

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：Na⁺輸送性NADH-ユビキノン酸化還元酵素（以下、NQRと略す）は、コレラ菌など一部の病原性細菌のエネルギー代謝に必須の呼吸鎖酵素であり、抗菌剤の創薬標的として期待されている。天然物コロルミシンAは、NQRに対して極めて高い選択性を発揮する強力な阻害剤であり、抗菌剤開発に向けたシーズ化合物になり得る。本研究では、コロルミシンAの分子プローブ化を基軸にした有機化学的手法と、クライオ電子顕微鏡（cryo-EM）による構造生物学的手法を駆使して、コレラ菌NQRを標的とする抗菌剤創製に向けた研究基盤の確立を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原性細菌に由来する食中毒が時々報道されるものの、コレラ菌による大規模な感染症はもはや日本では深刻な感染症ではなくなった。しかし、世界に目を向けると発展途上国では地域的流行が散発しており、依然として人命に関わる深刻な感染症である。そのため、NQRを標的分子とする優れた殺菌剤の開発に向けた研究基盤の構築は極めて重要な課題である。また、薬剤耐性菌の出現が深刻な問題となっている現代、NQRのような比較的新しい創薬標的を開拓することの意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：The Na⁺-pumping NADH-ubiquinone oxidoreductase (NQR) is a respiratory enzyme essential for energy-consuming reactions in bacteria. Since NQR is exclusively found in prokaryotes, it is a promising target for highly selective antibiotics. However, the molecular mechanism of inhibition is not well-understood for lack of the atomic structural information about NQR. In the present study, to establish a definite foundation for the investigation of Vibrio cholerae NQR as the druggable target, chemistry-based studies using korormicin A-driven molecular probes and structural works using cryo-electron microscopy were conducted. Here we present cryo-electron microscopy structures of NQR from Vibrio cholerae with or without a bound inhibitor at 2.5- to 3.1-angstrom resolution.

研究分野：生物有機化学

キーワード：呼吸鎖酵素 ユビキノン プロトンポンプ クライオ電子顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

NQR は NADH とユビキノンの酸化還元反応と共役して Na⁺の能動輸送を行なう呼吸鎖酵素である (総分子質量 220 kDa、サブユニット 6 個 (NqrA-F)) [文献 1]。本酵素はコレラ菌 (*Vibrio cholerae*) や緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) など一部の病原性細菌に分布し、細菌のエネルギー代謝を担う基幹酵素である。NQR の反応機構を解明することは、本酵素を標的とする新しい抗菌剤の開発研究に資するところが大きい [文献 2]。2014 年にコレラ菌 NQR (酸化型) の X 線結晶構造が報告されたが [文献 1]、基質キノンや阻害剤が共結晶化されていなかった上、一部の重要構造もモデリングできていなかった。

代表者は、コレラ菌 NQR の強力な阻害剤として天然物コロールミシン A やオーラシンの類縁体を独自に合成し、作用機構研究を行って来た [文献 3-6]。コロールミシンの NQR に対する選択性は極めて高く、哺乳類ミトコンドリアを含む他の呼吸鎖酵素群は全く阻害しない。コレラ菌 NQR に関して、これまでに代表者が得た主な知見は以下の 3 点にまとめられる。

- (1) ユビキノンの“キノン環”の結合部位は NqrA サブユニット (Leu32-Met39) にある。
- (2) 阻害剤 (コロールミシン A とオーラシン) の結合部位は NqrB の N 末端ストレッチ (Trp23-Lys54) にあり、ユビキノンの“側鎖部”と拮抗的に作用する。
- (3) コロールミシン A に顕著な耐性を示す変異酵素 (NqrB-G141A) において、コロールミシン A の結合親和性は野生型酵素と変わっていない (すなわちコロールミシン A は結合できる)。

知見 (1) および (2) は X 線結晶構造 [文献 1] との整合性が問題となる。すなわち、疎水性が高いユビキノンの結合部位が、膜表面からサイトプラズム側に大きく突き出していること。さらに、キノン環が結合する位置とリボフラビン (RBF) との距離が約 40 Å もあり、この間では電子移動は起こり得ない。しかしながら、X 線結晶構造には明らかに“問題”がある上、阻害剤が結合する N 末端ストレッチの先端 37 残基が解かれていない。同様に、NQR の構造情報が不足しているために、(3) の知見に対する疑問「コロールミシンは耐性変異酵素に対して結合するにも関わらず、なぜ電子伝達が阻害されないのか？」に対する明確な回答は得られていない。

以上のように、NQR の構造情報としては“問題”を含む 2014 年の X 線結晶構造しかなく、この制約が NQR 研究のボトルネックになっていることは明らかであり、さらなる精密構造情報の獲得が必須である。本研究ではクライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) を用いた単粒子解析によって、阻害剤が結合した状態のコレラ菌 NQR (酸化型) の構造を初めて明らかにした。

2. 研究の目的

NQR の反応機構や阻害剤の作用機序を理解するためには、2014 年に報告された X 線結晶構造情報では限界があった。そこで本研究では、クライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) を用いた単粒子解析によって、阻害剤結合型および非結合型の酵素の立体構造解析を試みた。さらに、NQR の機能面に注目すれば、酵素反応における一連の酸化還元反応と Na⁺輸送反応との共役メカニズムはほとんどわかっていない。そこで、「リボフラビン (RBF) を介した電子伝達過程が Na⁺輸送に寄与している」という先行研究での仮説を踏まえ、RBF から電子を受け取る UQ の還元反応と Na⁺輸送活性の相関関係を精査した。このように、構造生物学的手法と有機化学的手法を組み合わせるこ

レラ菌 NQR の構造と機能を徹底的に理解し、本酵素を標的とする抗菌剤の創製に向けた研究基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

コレラ菌での NQR の発現および精製は、既報の方法に従って行った[文献 3]。NQR の精製にあつては、Ni-NTA カラムでの精製後にイオン交換カラムを併用した。NQR の電子伝達活性は、NADH を電子供与体として用い、電子受容体である酸化型ユビキノンの還元を分光学的に測定して評価した[文献 3]。NQR の Na⁺輸送活性は、精製した NQR をアゾレクチンで構成したリボソームに再構成し、Na⁺輸送によって形成される膜電位の変化を膜電位応答性色素 oxonol VI (587-minus-625 nm) を用いて測定した[文献 7]。Cryo-EM を用いた単粒子解析では、NQR 溶液を Vitrobot により急速凍結し、Titan Krios (大阪大学蛋白質研究所) によって撮影を行い、cryoSPARC を用いて画像解析を実施した[文献 8]。

4. 研究成果

(1) Cryo-EM による NQR の精密立体構造の解明

Cryo-EM を用いた単粒子解析によって、阻害剤非結合型に加え、コロールミシン A およびオーラシン D-42 が結合した計 3 種類の酵素の立体構造の解析を試みた。その結果、阻害剤非結合型は 2.7 Å、オーラシン D-42 およびコロールミシン A 結合型はそれぞれ 2.5 および 2.6 Å の高分解能で密度情報が得られた[文献 8]。この密度情報から、98%の配列と全てのコファクターの構造モデルを構築することができた。また、モデル構築の過程で、X 線結晶構造ではリボフラビン (RBF) が NqrB と NqrE に挟まれた領域に帰属されていたのに対し、cryo-EM 構造では NqrB サブユニットの内部に位置するなど、X 線結晶構造から得られていたコファクターの構造情報を修正した。また、NqrF サブユニットの構造を 3 つの state に分離できたことから、NqrF が柔軟に動いていることが示唆された。これを踏まえると、コファクター間の距離の長い 2Fe-2S^{NqrF} から 2Fe-2S^{NqrD/E} の電子移動は、NqrF が柔軟に構造変化することでその距離が短縮されると予想される。

さらに、コロールミシン A およびオーラシン D-42 は N₆ 末領域と膜貫通ヘリックス (TMH) 1、TMH2、TMH3 に囲まれた空間に結合していた[文献 8]。この N₆ 末領域 (G2-L26) は、阻害剤非結合型酵素ではモデル化できなかったことから、かなり柔軟な構造をとっており、阻害剤が結合することで動きが固定されることが強く示唆された。本研究で得られた構造情報は、特異的修飾の結果から以前に予想した N₆ 末領域の構造モデル[文献 6]を完全に裏付けるものであった。さらに、コロールミシン A 結合型構造は、合成コロールミシン類の構造活性相関の結果を合理的に説明するものであった。

(2) Na⁺輸送におけるユビキノ側鎖の重要性

NQR の酵素反応における一連の酸化還元反応と Na⁺輸送反応との共役メカニズムはほとんどわかっていない。そこで、「リボフラビン (RBF) を介した電子伝達過程が Na⁺輸送に寄与している」という先行研究での仮説を踏まえ、RBF から電子を受け取る UQ の還元反応と Na⁺輸送活性の関係に着目した[文献 7]。

NQR の最終電子受容体である UQ の側鎖構造が異なる一連の類縁体を合成し、電子伝達活性と

Na⁺輸送活性の相関関係を精査した。その結果、側鎖の炭素鎖長が3より長いUQ類は電子受容活性と共役したNa⁺輸送活性が認められた。しかし、炭素鎖長が2以下のUQ類は電子受容体となるものの、Na⁺輸送活性が全く認められなかった。すなわち、UQ還元とNa⁺輸送が“非共役”する現象を見出した。この事実は従来考えられてきたように、UQが最終電子受容体としてはたらいでNQRの触媒サイクルをリセットするだけでなく、Na⁺輸送に直接的に関与していることを強く示唆している。今後は、UQの反応部位を特定し、Na⁺輸送における共役機構の解明に繋げたい。

(3) 参考文献

- 1) Steuber et al. (2014) *Nature* 516, 62-67.
- 2) Dibrov et al. (2017) *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 653-671.
- 3) Ito et al. (2017) *J. Biol. Chem.* 292, 7727-7742.
- 4) Maynard et al. (2019) *J. Bacteriol.* 201, e00718-18.
- 5) Masuya et al. (2020) *J. Biol. Chem.* 295, 12739-12754.
- 6) Ishikawa et al. (2021) *Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)* 1862, 148432.
- 7) Ishikawa et al. (2022) *Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)* 1863, 148547.
- 8) Kishikawa et al. (2022) *Nat. Commun.* 13, 4082.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Junichi Kishikawa, Moe Ishikawa, Takahiro Masuya, Masatoshi Murai, Yuki Kitazumi, Nicole Butler, Takayuki Kato, Blanca Barquera, and Hideto Miyoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Cryo-EM structures of Na ⁺ -pumping NADH-ubiquinone oxidoreductase from <i>Vibrio cholera</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4082
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-31718-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Moe Ishikawa, Takahiro Masuya, Seina Kuroda, Shinpei Uno, Nicole Butler, Sara Foreman, Masatoshi Murai, Blanca Barquera, and Hideto Miyoshi	4. 巻 1863
2. 論文標題 The side chain of ubiquinone plays a critical role in Na ⁺ translocation by the NADH-ubiquinone oxidoreductase (Na ⁺ -NQR) from <i>Vibrio cholera</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)	6. 最初と最後の頁 148547
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbabi.2022.148547	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石川 萌, 岸川 淳一, 榎谷 貴洋, 村井 正俊, 北隅 優希, Nicole L. Butler, 加藤 貴之, Blanca Barquera, 三芳 秀人
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡を用いたコレラ菌Na ⁺ 輸送性NADH-ユビキノン酸化還元酵素の構造解明
3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度京都大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石川 萌, 榎谷 貴洋, 村井 正俊, Nicole L. Butler, Blanca Barquera, 三芳 秀人
2. 発表標題 コレラ菌Na ⁺ 輸送性NADH-ユビキノン酸化還元酵素におけるユビキノン側鎖の結合部位の同定
3. 学会等名 日本農薬学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石川 萌, 榎谷 貴洋, 村井 正俊, Nicole L. Butler, Blanca Barquera, 三芳 秀人
2. 発表標題 コレラ菌Na ⁺ 輸送性NADH-ユビキノン酸化還元酵素におけるユビキノン側鎖の結合部位の同定
3. 学会等名 生体エネルギー研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川 萌, 岸川 淳一, 榎谷 貴洋, 村井 正俊, 北隅 優希, Nicole L. Butler, 加藤 貴之, Blanca Barquera, 三芳 秀人
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡を用いたコレラ菌Na ⁺ 輸送性NADH-ユビキノン酸化還元酵素の構造解明
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川萌、榎谷貴洋、黒田聖奈、宇野晋平、志波智生、稲岡健ダニエル、村井正俊、Blanca Barquera、三芳秀人
2. 発表標題 コレラ菌NADH-ユビキノン酸化還元酵素のNa ⁺ 輸送におけるユビキノン側鎖の重要性
3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度京都大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>コレラ菌の生存に必須である呼吸鎖酵素の構造を解明 病原性細菌に対する新しい抗菌剤の開発研究へ貢献 https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2022-07-27</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	岸川 淳一 (Kishikawa Junichi) (80599241)	大阪大学・蛋白質研究所・助教 (14401)	2023年7月～現在 京都工芸繊維大学(准教授)

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	レンセラー工科大学		