

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02409

研究課題名（和文）回転分子モーターのイオン輸送メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the ion transport mechanism of the rotary molecular motor

研究代表者

村田 武士（Murata, Takeshi）

千葉大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：80415322

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）：腸球菌V-ATPaseは、ATPのエネルギーを利用して回転しながらNa⁺を輸送する膜タンパク質であり、腸球菌の生育に重要な役割を果たしている。我々は、腸球菌V-ATPaseの阻害剤を発見し、多剤耐性腸球菌に対する抗菌薬としての可能性を見出した。本研究では、クライオ電子顕微鏡を用いて、阻害剤が結合した腸球菌V-ATPaseの膜内複合体の詳細な構造を解明した。得られた構造・機能解析情報を統合することにより、本酵素のNa⁺輸送メカニズム、阻害剤によるNa⁺輸送阻害メカニズム、Na⁺輸送とH⁺輸送の分子メカニズムの違いを明らかにした。現在、得られた情報を基に抗菌薬の開発を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸球菌V-ATPaseは、ATPのエネルギーを利用して回転しながらイオンを輸送する膜タンパク質であり、腸球菌の生育に重要な役割を果たしています。我々は、腸球菌V-ATPaseの阻害剤を発見し、多剤耐性腸球菌に対する抗菌薬としての可能性を見出しました。本研究では、阻害剤が結合した腸球菌V-ATPaseの詳細な立体構造を決定しました。そして、V-ATPaseがどのようにイオンを輸送するのか、阻害剤がどのようにV-ATPaseを阻害するのかを明らかにしました。現在、得られた情報を基に抗菌薬の開発を進めています。

研究成果の概要（英文）：Enterococcal V-ATPase is a membrane protein that utilizes energy from ATP to transport Na⁺ while rotating, playing an essential role in the growth of enterococci. We discovered an inhibitor of V-ATPase and identified its potential as an antimicrobial agent against multidrug-resistant enterococci. In this study, we used cryo-electron microscopy to elucidate the detailed structure of the V-ATPase complex bound to the inhibitor. By integrating the obtained structural and functional analysis information, we clarified (i) the Na⁺ transport mechanism of this enzyme, (ii) the mechanism by which the inhibitor blocks Na⁺ transport, and (iii) the molecular differences between Na⁺ and H⁺ transport mechanisms. Currently, we are advancing the development of antimicrobial agents based on the obtained information.

研究分野：構造生物学

キーワード：V-ATPase 分子モーター 構造解析 イオン輸送 分子メカニズム

1. 研究開始当初の背景

V-ATPase は、細菌からヒトまで多くの生体膜中に存在し、ATP のエネルギーを使って H^+ (または Na^+) を運ぶポンプとして機能している。細菌 V-ATPase は菌の生育に重要であるため、その特異的阻害剤が病原菌に対する新しい抗菌薬となることが期待されている。また、ヒト V-ATPase は破骨細胞やがん細胞の細胞膜などに存在し、その酸性環境異常が骨粗鬆症やがん転移の原因の一つであるため、その特異的阻害剤はこれら疾患の新しい治療薬として期待されている。V-ATPase は、親水性の V_1 部分と膜内在性の V_0 部分から構成されている(図1)。 V_1 部分で ATP が加水分解され、そのエネルギーを使って中心軸部分 (D-F-d-c リング) が回転し、これに伴って V_0 部分でイオンが輸送される。

研究代表者らは病原性腸球菌の類縁菌 (*Enterococcus hirae*) に存在する V-ATPase が H^+ でなく Na^+ を細胞外に排出することで菌の恒常性が維持されることを明らかにした (JBC 1996ab, 1997)。本酵素の V_1 部分に関しては、X 線結晶構造解析 (図2) や1分子回転計測、高速 AFM 観察、計算機解析の結果を統合することにより、 V_1 部分の詳細な回転分子メカニズムモデルを提案するに至っている (PNAS, 2011; Nature, 2013; Nat. Commun., 2016; JBC, 2013, 2014; Sci. Adv., 2019)。一方、膜内在性 V_0 部分に関しては、 Na^+ の結合部位である膜内 c リングの結晶構造を解明し (図3)、生化学的・生物物理学的解析の結果を統合することにより、 Na^+ の結合解離の分子メカニズムを明らかにした (JBC, 2000, 2001, 2003; Science, 2005, 2011; PNAS, 2008, 2011)。さらに、病原性腸球菌 (バンコマイシン耐性菌: VRE) の生育を阻害する新規抗菌剤を創出し、 V_0 部分に結合することにより抗菌作用を示すことを明らかにした (PCT/JP2020/1047)。しかし、 Na^+ 輸送路を持つ a サブユニットの詳細構造が不明のため、 V_0 部分での詳細な Na^+ 輸送メカニズムは未解明であった。

近年、クライオ電子顕微鏡単粒子解析技術が進展し、V-ATPase に関しても全複合体構造が報告されている (Science, 2019, 2020)。しかし、

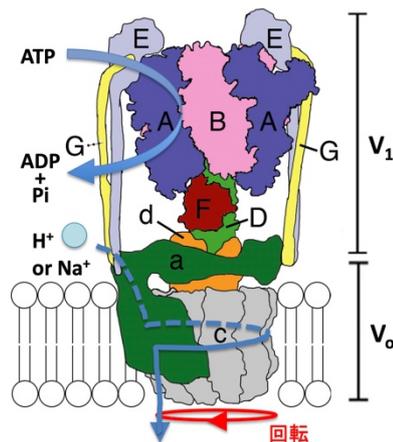


図1. V-ATPaseの構造モデル

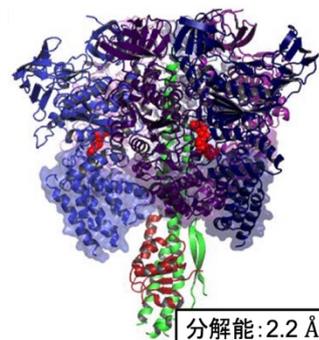


図2. V_1 部分の結晶構造

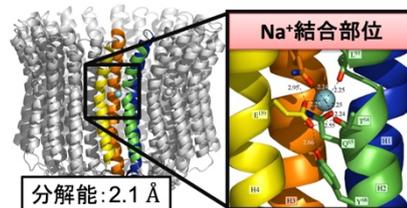


図3. cリングの結晶構造



図4. V-ATPase全複合体のクライオ電顕構造

これらの V-ATPase はすべて H⁺輸送性であるため、基質である H⁺を同定することが難しく、H⁺輸送経路や詳細な分子メカニズムは未だ不明である。一方、輸送する基質が Na⁺であれば、輸送するための Na⁺を検出することが容易となり、イオン輸送メカニズムを解明するために大変有利である。研究代表者らはすでにクライオ電顕解析技術を習得し、抗菌剤存在下で Na⁺輸送性 V-ATPase 全複合体に関して 4.1 Å 分解能の密度マップを得ることに最近成功した(未発表:図 4)。さらに V_o部分のみに絞って解析することにより 3.4 Å 分解能まで向上し、a サブユニットと c リングの境界面に抗菌剤と考えられる密度が見つかった(未発表:図 5)。現在モデル構築を進めている。

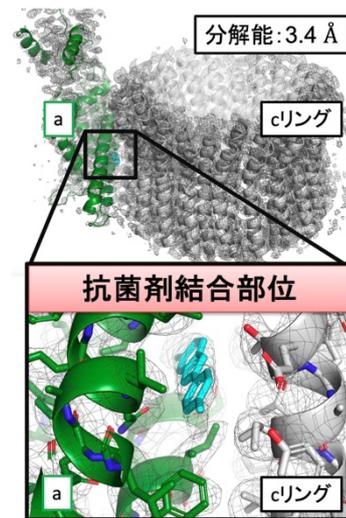


図5. 抗菌剤結合V_o部分のクライオ電顕構造

2. 研究の目的

本研究では、得られた密度マップから腸球菌 V-ATPase の立体構造を決定する。そして、得られた構造情報から Na⁺輸送や抗菌剤結合に重要と考えられる残基の変異体を作製し、それらの構造・機能解析を行う。得られた解析情報を統合することにより、①本酵素の Na⁺輸送メカニズム、②抗菌剤による Na⁺輸送阻害メカニズム、③Na⁺輸送と H⁺輸送の分子メカニズムの違いを解明する。

3. 研究の方法

本研究では上記した①—③の解明を目的に、以下の研究を遂行する。

- < 1 > **腸球菌 V-ATPase の構造解析**—クライオ電顕構造解析を継続し、V-ATPase の立体構造を決定する。最新のクライオ電子顕微鏡を利用することにより、さらなる高分解能化を図る。
- < 2 > **腸球菌 V-ATPase 変異体の機能解析と構造解析**—Na⁺輸送や抗菌剤結合に関与するアミノ酸残基の変異体を作製し、生化学的性質やイオン輸送活性を明らかにする。
- < 3 > **イオン輸送メカニズムの解明**—得られたすべての構造・機能情報を統合することにより、①本酵素の詳細な Na⁺輸送メカニズム、②抗菌剤による阻害メカニズム、③Na⁺輸送と H⁺輸送の分子メカニズムの違いについて明らかにする。

4. 研究成果

< 1 > 腸球菌 V-ATPase の構造解析

加速電圧 300 kV の Titan Krios を用いて抗菌剤存在下で腸球菌 V-ATPase のクライオ電顕単粒子解析を行なった。V_o部分にマスクをかけて解析することにより、抗菌剤が結合した V_o部分の立体構造を分解能

2.8Åで決定することに成功した。また、溶媒マスクをかけて多様なクラス分けを検討し、各クラスで精密化を行うことにより、5つのV-ATPase全複合体構造に分離することに成功した。構造モデリングと精密化を行い、抗菌剤が結合したV_o部分の立体構造を分解能2.2Åで決定することに成功した。抗菌剤はV-ATPaseの膜内cリングとaサブユニットの境界面に結合し、Na⁺輸送に重要と考えられるa-N615とc-T140に水素結合していた(図6)。抗菌剤の結合によりNa⁺輸送及び回転が阻害され、結果として腸球菌のアルカリ環境下での生育が阻害されることが示唆された。さらに、得られた構造を用いてMDシミュレーションを行い、aサブユニットに存在する細胞外へと続くNa⁺輸送路を明らかにした。

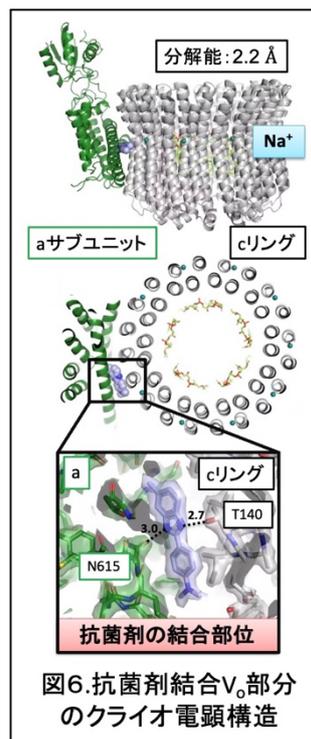


図6.抗菌剤結合V_o部分のクライオ電顕構造

<2> 腸球菌 V-ATPase 変異体の機能解析と構造解析

得られた立体構造情報から、細胞内側のNa⁺輸送路を形成し、Na⁺輸送に重要と予想された残基の変異体(aD567A, aE634A)を作製した。これらの変異体は大腸菌を用いて大量発現し、各種カラムを用いて精製した。これらの変異体について1分子回転実験を行ったところ、ATP添加に依存した回転速度は低下していた(aD567Aは47%、aE634Aは16%に低下)。以上の結果から、細胞内側のNa⁺輸送路を決定した。

<3> イオン輸送メカニズムの解明

得られたすべての構造・機能情報を統合することにより、①本酵素の詳細なNa⁺輸送メカニズム、②抗菌剤による阻害メカニズム、③Na⁺輸送とH⁺輸送の分子メカニズムの違いについて以下に提案する。

① 本酵素の詳細なNa⁺輸送メカニズムと②抗菌剤による阻害メカニズム

本研究で得られた結果とこれまでの知見を統合することで、V-ATPaseのNa⁺輸送メカニズムと抗菌剤(V-161)による阻害メカニズムを以下に提案する(図7参照)：

1. 本研究で得られた初期状態構造(図7a)では、Na⁺結合部位(II)の「蓋」として機能するc-E139がa-R573およびa-R629と塩橋を形成していた。この段階で、Na⁺はすでに解離している。Na⁺結合部位(II)は、正に帯電した残基によって囲まれ阻害されており、Na⁺が結合または解離できない不活性状態にある。
2. ATPによって駆動されるcリングの時計回りの回転が静電相互作用を破壊し、Na⁺結合部位(II)がNa⁺に対する高親和性状態に戻る(図7b)。Na⁺は、a-D567やa-E634などの残基によって形成される負電荷の空洞を通過して細胞質側から結合部位に侵入する。
3. cリングの時計回りの回転により、別のNa⁺結合部位(III)がa-R573、H626、およびR629によって形成される正電荷領域に近づく(図7c)。負に帯電したc-E139と塩橋を形成し、Na⁺結合部位が開く。Na⁺の結合親和性が低下し、結合したNa⁺がa-T619、S622、D384、およびS431などの残基によって形成される負電荷の空洞を通過してペリプラズム側に放出される。
4. ATPによってさらに駆動される回転により、cリングは初期状態に戻る(図7d)。
5. 抗菌剤V-161はcリングとaサブユニットの間に入り込み、c-T140およびa-N615と水素結合を形成し、ペリプラズム側のNa⁺経路を遮断する。その結果、cリングの回転が停

止し、Na⁺輸送が阻害される（図7d）。

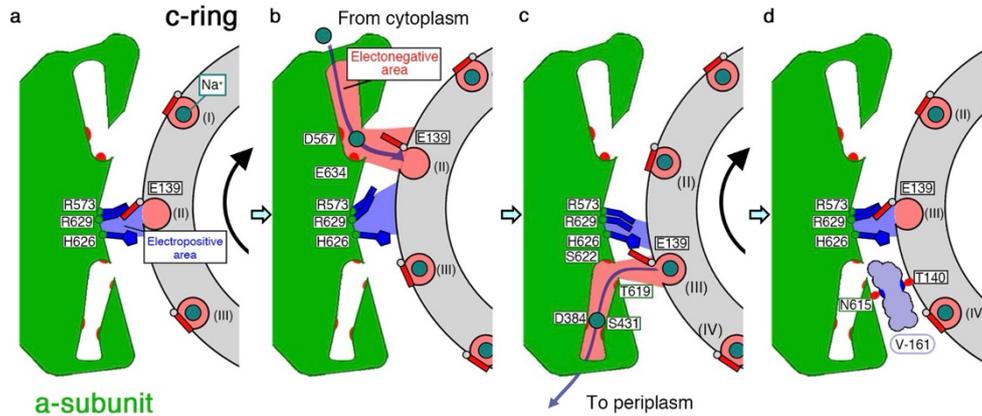


図7. V-ATPaseのNa⁺輸送メカニズムと抗菌剤(V-161)による阻害メカニズム

② Na⁺輸送と H⁺輸送の分子メカニズムの違い

Na⁺輸送路の形成に重要である a サブユニットの残基 (D567、E634、T619、D384、S431) は H⁺輸送性 V-ATPase では保存されていないため、Na⁺輸送路と H⁺輸送路の構造は大きく異なっていた。一方で、Na⁺結合部位の「蓋」として機能する c-E139 および塩橋を形成している a-R573、a-R629 は H⁺輸送性 V-ATPase で保存されていた。このことから、イオンの結合解離のメカニズムは両者で共通していることが示唆された。また、抗菌薬 V-161 が水素結合している残基 (c-T140、a-N615) は H⁺輸送性 V-ATPase では保存されていなかった。H⁺輸送性 V-ATPase はヒトを含む多くの生命体が保有しているが、Na⁺輸送性 V-ATPase は細菌類 (特に病原菌) しか保有していない。このことから V-161 は病原菌の生育のみを阻害する抗菌薬になり得る可能性が示唆された。

これらの成果をまとめた論文が *Nature Structural & Molecular Biology* に採択される見込みである (エディターから「Principally accepted」であると連絡を受け、現在論文の記載フォーマットを修正中)。

K. Suzuki, *T. Murata (22 人中 22 番目) Na⁺-V-ATPase inhibitor curbs VRE growth and unveils Na⁺ pathway structure, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, Principally accepted

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Shekhar Mrinal, Gupta Chitrak, Suzuki Kano, Chan Chun Kit, Murata Takeshi, Singharoy Abhishek	4. 巻 8
2. 論文標題 Revealing a Hidden Intermediate of Rotatory Catalysis with X-ray Crystallography and Molecular Simulations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Central Science	6. 最初と最後の頁 915 ~ 925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscentsci.1c01599	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

1. 著者名 Burton-Smith Raymond N., Song Chihong, Ueno Hiroshi, Murata Takeshi, Iino Ryota, Murata Kazuyoshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Six states of Enterococcus hirae V-type ATPase reveals non-uniform rotor rotation during turnover	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 755
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-05110-8	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

1. 著者名 Yasuda Satoshi, Hayashi Tomohiko, Murata Takeshi, Kinoshita Masahiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Physical pictures of rotation mechanisms of F1- and V1-ATPases: Leading roles of translational, configurational entropy of water	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 1159603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmolb.2023.1159603	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 阿部 晶平、清水 康輝、金沢 達志、宮城 侑弥、清木 一生、森山 克彦、宮田 茂、村田 武士
2. 発表標題 腸球菌V-ATPase阻害剤はウェルシュ菌の増殖をpH依存的に阻害する
3. 学会等名 第26回腸内細菌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Raymond N. Burton-Smith, Jun Tsunoda, Chihong Song, Hiroshi Ueno, Takeshi Murata, Ryota Iino, Kazuyoshi Murata
2. 発表標題 The Off-Axis Rotor of <i>Enterococcus hirae</i> V-type ATPase by Volta Phase Contrast and Conventional Phase Cryo-EM
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大友 章裕、飯田 龍也、上野 博史、村田 武士、飯野 亮太
2. 発表標題 Single-molecule analysis and engineering of rotary V-ATPase
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部晶平、清水康輝、金沢達志、清木一生、森山克彦、村田武士
2. 発表標題 腸球菌V-ATPase阻害剤はウェルシュ菌の増殖を阻害する
3. 学会等名 第95回日本細菌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satoshi Yasuda, Tomohiko Hayashi, Takeshi Murata and Masahiro Kinoshita
2. 発表標題 Physical pictures of rotation mechanisms of F1- and V1-ATPases: Leading roles of translational, configurational entropy of water
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takeshi Murata
2. 発表標題 Discovery of a novel inhibitor for Na ⁺ -transporting V-ATPase enables suppression of VRE colonization in mice and reveals high-resolution structure of the Na ⁺ transport pathway
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Bioenergetics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takeshi Murata
2. 発表標題 Na ⁺ -Transporting V-ATPase Inhibitor Suppresses VRE Growth in Mice and Unveils Na ⁺ Pathway Structure
3. 学会等名 21th IPR Retreat (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗菌組成物及び医薬並びに抗菌方法	発明者 村田武士、阿部晶平、鈴木花野、後藤義幸	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2024/914	出願年 2024年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

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
研究協力者	飯野 亮太 (Iino Ryota) (70403003)	分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・教授	1分子回転計測実験
研究協力者	千田 俊哉 (Senda Toshiya) (30272868)	高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・教授	クライオ電子顕微鏡解析

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	Arizona State University	University of Illinois		
英国	Medical Research Council	Imperial College London		
フランス	University de Lorraine			