

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02147

研究課題名(和文) コレラ菌NADH-ユビキノン酸化還元酵素の阻害剤抵抗性メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of inhibitor-resistance mechanism of Na<sup>+</sup>-pumping NADH-ubiquinone oxidoreductase from *Vibrio cholerae*

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) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：Na<sup>+</sup>輸送性NADH-ユビキノン酸化還元酵素(Na<sup>+</sup>-NQR)は、コレラ菌など一部の病原性細菌の重要な呼吸鎖酵素であり、抗菌剤の標的分子として期待できる。天然物コロールミシンはNa<sup>+</sup>-NQR選択的な阻害剤であり、NqrBサブユニットのN末端領域に結合する。コロールミシンに対する抵抗性獲得には、NqrB-N末端領域の構造変化が関係することがわかっている。本研究では、Na<sup>+</sup>-NQRの構造変化と抵抗性獲得の関係を解明するため、N末端領域に機能性プローブ分子を導入する方法論を検討した。タンパク質-リガンド親和性に基づくNAS化学修飾法によって、NqrB-Lys22を特異的に化学修飾することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

飲食店などでの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日本ではもはや深刻ではなくなった。しかし、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、Na<sup>+</sup>-NQRを標的分子とする選択的殺菌剤の開発に向けた基盤技術の構築は、極めて重要な研究課題である。また、薬剤耐性菌の出現が深刻な問題となっている現在、Na<sup>+</sup>-NQRのような新しい創薬標的を継続的に研究する意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Na<sup>+</sup>-pumping NADH-ubiquinone oxidoreductase (Na<sup>+</sup>-NQR) is an essential respiratory enzyme of many pathogenic bacteria such as *Vibrio cholerae*, and hence, a promising target of antibiotics. Natural product korormicin is a selective inhibitor of Na<sup>+</sup>-NQR, which binds to the N-terminal region of the Nqr-B subunit. We recently demonstrated that korormicin-resistance of Na<sup>+</sup>-NQR may be closely related to conformational changes of the N-terminal region. To elucidate the relationship between the conformational changes of the N-terminal region and the acquired resistance against korormicin, we investigated the chemical method that enables us to introduce a functional molecule probe to the N-terminal region. Based on protein-ligand affinity-driven NAS chemistry, we succeeded in pinpoint chemical modification of the N-terminal region.

研究分野：生物有機化学

キーワード：呼吸鎖酵素 Na<sup>+</sup>-NQR コレラ菌 抗菌剤 コロールミシン

### 1. 研究開始当初の背景

(1)  $\text{Na}^+$ -NQR は、NADH の酸化とユビキノンの還元という酸化還元反応と共役して  $\text{Na}^+$  の能動輸送を行なう呼吸鎖酵素である (分子質量約 200 kDa、サブユニット数 6 個 (NqrA~F)、文献 1 および図 1)。本酵素はコレラ菌や緑膿菌など一部の病原性細菌に分布し、ATP 合成や鞭毛運動の駆動力となる  $\text{Na}^+$  の電気化学ポテンシャル勾配を形成することから、細胞のエネルギー代謝を担う基幹酵素である。 $\text{Na}^+$ -NQR の反応機構研究の進展は、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]。

(2) 代表者はコレラ菌  $\text{Na}^+$ -NQR の強力な阻害剤として天然物コロールミシンおよびオーラシン D-42 を取得し [図 2]、この 2 化合物について作用機構研究を行って来た [文献 3]。特筆すべきことに、NqrB サブユニットの N-末端領域の根本に相当する箇所にアミノ酸変異を持つ幾つかの変異酵素では、野生型酵素と同様に阻害剤が結合しているにも関わらず、約 1 万倍という顕著な阻害剤抵抗性を示した。この事実は、変異によって NqrB の構造が変化し、阻害剤が結合した状態であっても電子伝達に要求される N-末端領域のコンフォメーション変化を取り得ることを示唆している。コロールミシンはミトコンドリアの呼吸鎖酵素群を全く阻害しないため、選択性に優れた  $\text{Na}^+$ -NQR 阻害剤として貴重な抗菌剤シーズ化合物となることが期待されている [文献 2]。これを踏まえると、コロールミシン抵抗性を含む本酵素のユニークな阻害剤抵抗性メカニズムを明らかにすることは、基礎および応用研究の両面から大きな学術的意義を持つ。上記の知見を踏まえると、抵抗性獲得メカニズムの解明には NqrB サブユニットの N-末端領域のコンフォメーション変化を直接的に観察することが不可欠であると考えた。

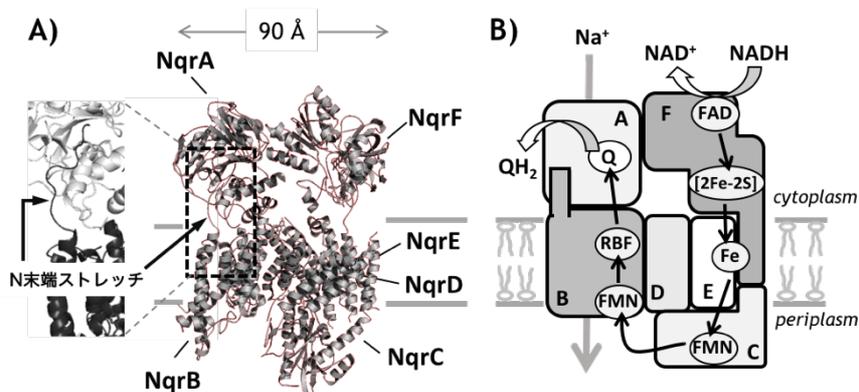


図 1. コレラ菌  $\text{Na}^+$ -NQR の X 線結晶構造 (A) とコファクターの位置 (B) を示す。

### 2. 研究の目的

NqrB サブユニットの N-末端領域のコンフォメーション変化を 1 分子観察で捉えることを将来的な目標に見据え、その実験的な足がかりを作るために、N-末端領域の求核性アミノ酸残基を特異的に化学修飾することを目的とした。すなわち、蛍光プローブやナノビーズを N-末端領域にクリックケミストリーで固定させるために、アルキンまたはアジド基を「タンパク質-リガンド 親和性」に基づく化学修飾法によって導入することを試みた。コレラ菌  $\text{Na}^+$ -NQR の強力な阻害剤であるコロールミシンやオーラシン D-42 を鋳型としたリガンド分子を合成し、tosyl 化学法および *N*-acyl-*N*-alkyl sulfonamide chemistry (NAS 化学法) を検討することとした。

### 3. 研究の方法

(1) オーラシン D-42 を鋳型として tosyl 化学法に供することができるリガンド分子 tAD1 を合成した (図 2)。また、コロールミシンを鋳型として NAS 化学法に供することができるリガンド分子 NAS-K1 および NAS-K2 を合成した (図 2)。tAD1、NAS-K1 および NAS-K2 は強い阻害活性 (結合親和性) を維持していることを確認した。

(2) コレラ菌から単離精製した野生型  $\text{Na}^+$ -NQR およびコロールミシン抵抗性  $\text{Na}^+$ -NQR (NqrB-G141A) に対して、合成したリガンド分子を用いて tosyl 化学法 [文献 4] および NAS 化学法 [文献 5] を実施した。NAS 化学では、リシン残基が特異的に求核剤となることがわかっている (図 3、文献 5)。化学修飾後、検出用の蛍光プローブ (TAMRA) をクリックケミストリーで結合させた。化学修飾されたアミノ酸残基の同定は、限定消化酵素によるペプチドマッピングと精密質量分析を組み合わせて行った [文献 3, 6]。

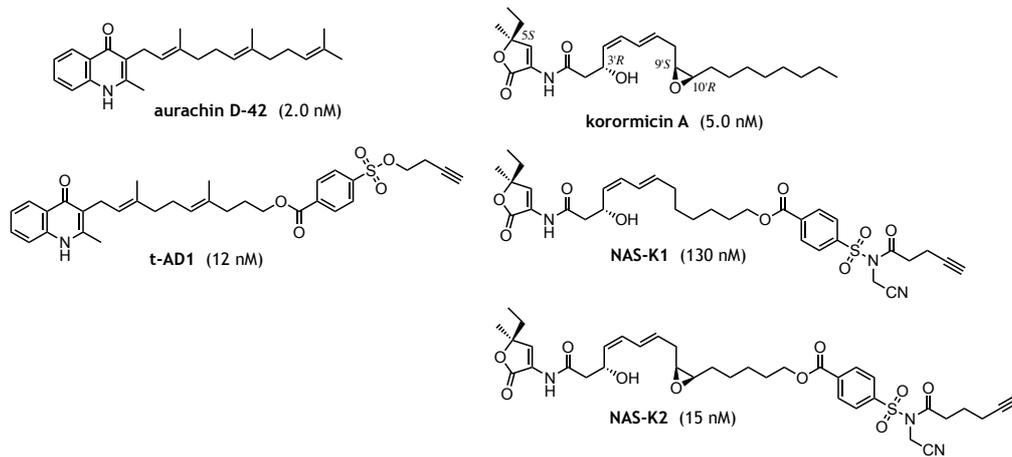


図 2. 本研究に用いた試験化合物の構造を示す (括弧内に IC<sub>50</sub> 値を記載した)。

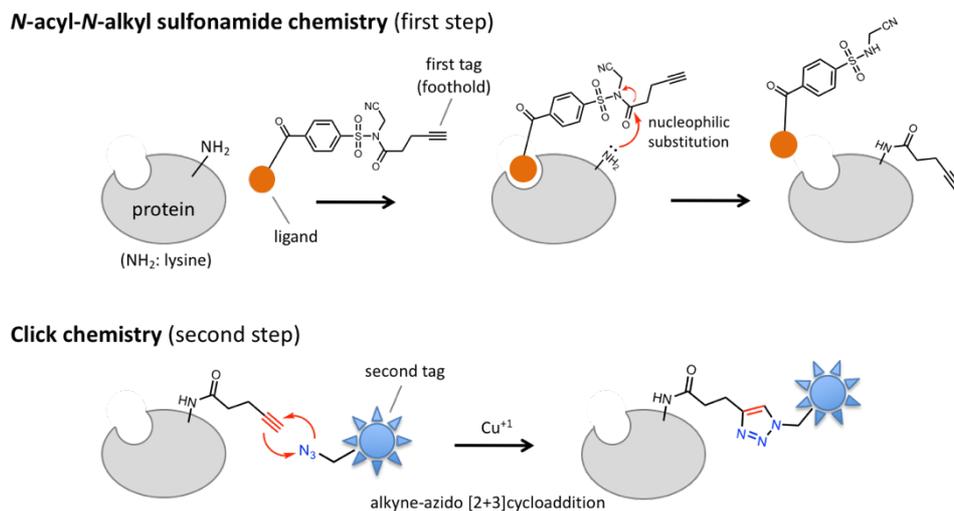


図 3. NAS 化学法によってリシン残基に一次タグを導入し、続くクリックケミストリーで二次タグ (検出基など) を導入する。

#### 4. 研究成果

(1) Na<sup>+</sup>-NQR と t-AD1 を室温で 6 時間以上インキュベーションして tosyl 化学を実施したところ、SDS-PAGE 上で Na<sup>+</sup>-NQR の顕著な凝集が認められた。tosyl 化学の進行は遅いため長いインキュベーション時間が必要であるが、この結果は単離酵素が長いインキュベーションに耐えないことを示している。この予想外の結果を受け、tosyl 化学以外の「タンパク質-リガンド 親和性」化学修飾法を検討し、より短時間で反応が完結する NAS 化学法に切り替えることにした。

(2) Na<sup>+</sup>-NQR と NAS-K1 あるいは NAS-K2 を室温でインキュベーションして NAS 化学を実施したところ、約 10 分で修飾反応は完結することがわかった。化学修飾されたことを示す SDS-PAGE 上の TAMRA の蛍光は、NAS-K1 および NAS-K2 とともに主に NqrB サブユニットに認められた。また、オーラシン D-42 やコロールミシンを過剰に共存させておくと、NqrB に対する化学修飾はほぼ完全に抑制された。インキュベーション時間を 10 分よりも長くすると NqrB の修飾率が若干上昇するが、他のサブユニットへの修飾が無視できなくなった。

(3) ペプチドマッピングの結果、化学修飾されたリシン残基はサイトプラズム側に突き出した N-末端領域にあることがわかった。この N-末端領域の約 2/3 (NqrB-Met1~Pro37) は、2014 年の X 線結晶構造ではモデル化されていない領域である。修飾されたリシン残基候補としては、NqrB-Lys4、-Lys5、-Lys19、-Lys22、-Lys42、-Lys54 が考えられる。さらに同定を進めた結果、主に NqrB-Lys22、わずかに NqrB-Lys54 が化学修飾されていることがわかった [文献 6]。これを確認するため、NqrB-K22A 変異体を作成して NAS 化学を実施したところ、修飾率が顕著に低下し、この結論を裏付ける結果となった [文献 6]。疎水性の高い NAS-K1 や NAS-K2 が、NqrB-Lys22 と

Lys54 に同時に接触できるという事実から、モデル化されていない N-末端領域はサイトプラズム側に突き出した構造を取っていると考えるよりも、折れ曲がって膜側に配向している可能性が示唆された (図 4 の右側モデル)。結晶構造モデルではリボフラビンとユビキノン結合部位が直線距離で約 40 Å も離れていて電子移動が起こりえないが、このモデルによると両者の距離が縮まることが予想できる。

(4) 次にコロールミシン耐性変異酵素 (NqrB-G141A) を用いて NAS 化学を実施したところ、NqrB-Lys22 の修飾率が下がり、NqrB-Lys54 の修飾率が顕著に増大し、リガンド分子と酵素との相互作用が変化することがわかった。この結果は、NqrB-Gly141 の変異によって、この残基から空間的にかなり離れている N-末端領域の構造変化が誘導されたことを示唆しており、(3) で予想した N-末端領域のコンフォメーションを支持する。ここで、コロールミシンの結合部位とユビキノン環部の結合部位は直接的にオーバーラップしないことがわかっている [文献 6]。これらの知見を総合的に考慮してコロールミシン耐性のメカニズムを考察すると、NqrB-G141A 変異による N-末端領域の構造変化によって、コロールミシンが結合しているにも関わらず、ユビキノンがリボフラビンに接近して電子を受容することができるようになったものと予想される。

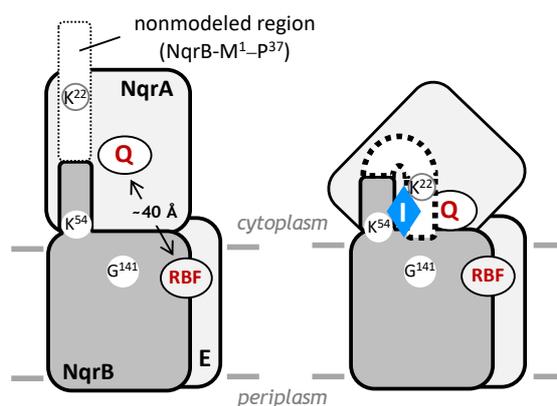


図 4. 結晶構造でモデル化されていない NqrB サブユニットの N-末端領域 (NqrB-Met1 ~Pro37) の予想されるコンフォメーションを模式的に示す。

#### <引用文献>

- 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) Tsuji et al. (2009) *Nat. Chem. Biol.* 5, 341-343.
- 5) Tamura et al. (2017) *Nat. Commun.* 9, 1870.
- 6) Masuya et al. (2020) *J. Biol. Chem.* 295, 12739-12754.
- 7) Ishikawa et al. (2021) *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* (in press)  
(DOI:10.1016/j.bbabi.2021.148432)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Moe Ishikawa, Takahiro Masuya, Hinako Tanaka, Wataru Aoki, Noam Hantman, Nicole L. Butler, Masatoshi Murai, Blanca Barquera, Hideto Miyoshi	4. 巻 未定
2. 論文標題 Specific chemical modification explores dynamic structure of the NqrB subunit in Na <sup>+</sup> -pumping NADH-ubiquinone oxidoreductase from <i>Vibrio cholerae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbabi.2021.148432	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2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、榎谷貴洋、田中比奈子、村井正俊、Blanca Barquera、三芳秀人
2. 発表標題 コレラ菌Na <sup>+</sup> 輸送型NADH-キノン酸化還元酵素のNqrBサブユニットの位置特異的の化学修飾法
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川萌、榎谷貴洋、田中比奈子、村井正俊、Blanca Barquera、三芳秀人
2. 発表標題 コレラ菌Na <sup>+</sup> 輸送型NADH-キノン酸化還元酵素のNqrBサブユニットの位置特異的の化学修飾法の確立
3. 学会等名 日本農薬学会第46回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	村井 正俊  (Murai Masatoshi)		

6. 研究組織（つづき）

	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	古池 晶  (Furuike Sho)		

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