

令和 6 年 4 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14837

研究課題名（和文）コレラ菌NADH-キノン酸化還元酵素のナトリウム輸送メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of sodium translocation mechanism of Na⁺-pumping NADH-ubiquinone oxidoreductase from *Vibrio cholerae*

研究代表者

榎谷 貴洋（Masuya, Takahiro）

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：80803775

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ナトリウムイオン輸送型NADH-キノン酸化還元酵素（NQR）は、基質の酸化還元と共役してナトリウムイオンの能動輸送を行う膜タンパク質複合体である。基質の酸化還元とナトリウムイオン輸送の共役メカニズムを調べるため、様々な側鎖構造を有するキノンを合成し、活性を評価した。その結果、炭素鎖が3つよりも短い側鎖を有するキノン類では還元は観察されるにも関わらず、ナトリウムイオンが輸送されないことがわかった。この知見は、キノンの側鎖構造が輸送に決定的な役割を担っていることを意味するものであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NQRはコレラ菌（*Vibrio cholerae*）などの多くの病原性細菌の生育に必須であり、機能の類似した哺乳類ミトコンドリアのプロトン輸送型NADH-キノン酸化還元酵素（呼吸鎖複合体-I）とは構造的にも進化的にも異なるため、病原性細菌に対する有望な創薬標的として注目されている。そのため、NQRの作用機構を明らかにすることは、NQRの基礎研究の進展に貢献するだけでなく、新規抗菌剤分子の設計戦略に資するところも大きい。

研究成果の概要（英文）：The sodium pumping NADH-quinone oxidoreductase (NQR) couples electron transfer from NADH to ubiquinone with sodium pumping. To investigate the coupling mechanism of redox reactions and sodium translocation, various quinones with different side chain structures were synthesized, and their activities were evaluated. The results revealed that while reduction was observed with quinones having no side chain or short side chain, sodium ion transport did not occur. This finding suggests that the side chain structure of quinones plays a crucial role in transport mechanisms.

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 コレラ菌 ケミカルバイオロジー Cryo-EM

1. 研究開始当初の背景

Na⁺輸送型 NADH-キノン酸化還元酵素(以下、NQR と略す)は、基質の酸化還元と共役して Na⁺の能動輸送を行う膜タンパク質複合体である。NQR は 6 つのサブユニット(NqrA~F)から構成され、NADH^{NqrF} FAD^{NqrF} 2Fe-2S^{NqrF} Fe^{NqrD} FMN^{NqrC} FMN^{NqrB} リボフラビン(RBF)^{NqrB} キノン(Q)^{NqrA} と電子が流れる。本酵素はコレラ菌(*Vibrio cholerae*)などの多くの病原性細菌の生育に必須であり、哺乳類ミトコンドリアの H⁺輸送型 NADH-キノン酸化還元酵素(呼吸鎖複合体-I)とは構造的にも進化的にも異なるため、病原性細菌に対する有望な創薬標的として注目されている。2014 年にコレラ菌 NQR の X 線結晶構造が報告されたが、基質であるキノンや阻害剤が共結晶化されていなかった。また、コファクター間の距離が異常に長い箇所が 3 カ所あり(29~33 Å)、ターンオーバー中に大きな構造変化を伴うと考えられている。特に、NQR の酸化還元反応に共役した Na⁺輸送では、大きな構造変化を伴うと予想されるが、酵素の構造情報が極めて限定的であるために、共役のメカニズムはブラックボックスである。

2. 研究の目的

応募者の予備実験において、側鎖を持たない ubiquinone-0 (UQ₀) をコレラ菌 NQR の基質とした場合、UQ₀ の還元は観察されるにも関わらず、Na⁺が輸送されない、という予想外の知見を得ていた。この知見は、キノンの側鎖構造が Na⁺輸送に決定的な役割を担っていることを意味するものである。同時に、NQR においては、酸化還元反応と Na⁺輸送が“脱共役”する場合があることを示しており、共役メカニズム解明のための重要な手がかりとなる。そこで本研究では、「キノンの側鎖構造が Na⁺輸送に決定的な役割を担っている」という知見を切り口として、キノン還元と Na⁺輸送の共役メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

構造系統的なキノン類縁体を合成して、キノン還元活性と Na⁺輸送活性の相関関係を精査し、Na⁺輸送に要求されるキノン側鎖の構造因子を明らかにする。さらに、Cryo-電子顕微鏡(EM)を用いた単粒子解析により Na⁺-NQR の構造を原子レベルで解明し、Na⁺輸送メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

キノン側鎖の構造と Na⁺輸送活性の関係の精査

キノンの側鎖構造が NQR のキノン還元活性や Na⁺輸送活性に及ぼす影響を調べるため、側鎖長の異なるキノン類縁体を合成した。コレラ菌 NQR を再構成したプロテオリポソームを用い、UQ 類縁体ごとの UQ 還元活性と、Na⁺輸送活性(Na⁺輸送により形成される膜電位)を測定した。その結果、側鎖を持たない UQ₀ と同様、メチル基やエチル基を側鎖として有する UQ_{CH3} や UQ_{C2H5} を基質とした場合、それらは還元されるにも関わらず、Na⁺は全く輸送されないことがわかった(図 1)。一方、それらよりも長い側鎖もしくはプレニル基を有する UQ 類では、側鎖構造に関わらずキノン還元と共役

した Na⁺輸送が観測された。また、タンパク質内での電子伝達に關するコファクターが一部欠損した変異型 NQR では、長鎖 UQ 類と同様に UQ₀ や UQ_{CH₃}、UQ_{C₂H₅} も電子受容活性が無かったため、NQR の途中から電子がリークしていないことも確かめられた。UQ 側鎖が短いものを基質とした場合に NQR からキノンへの電子伝達活性と Na⁺輸送活性が非共役するという事実は、UQ が最終電子受容体として NQR の触媒サイクルをリセットするだけでなく、Na⁺輸送反応に直接的に關与していることを強く示唆している。

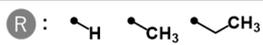
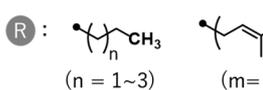
キノン側鎖構造	電子受容活性	Na ⁺ 輸送
 R : H CH_3 CH_2CH_3	ある	ない
 R : $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ $(\text{CH}_2)_m\text{CH}_2\text{CH}_3$ (n = 1~3) (m = 1, 2)	ある	ある

図 1. ユビキノン側鎖の構造と Na⁺輸送の關係。

クライオ電子顕微鏡による Na⁺-NQR の精密立体構造の解明

NQR の反応機構を理解するためには、2014 年に報告された X 線結晶構造では限界があった。そこで、クライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) を用いた単粒子解析による立体構造の解析を行った。その結果、2.7 Å の高分解能で密度情報が得られた (図 2A)。この密度情報から、98%の配列と全てのコファクターの精密構造モデルを構築することができた。また、モデル構築の中で、X 線結晶構造ではリボフラビン(RBF)が NqrB と NqrE に挟まれた領域に歸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複数のコファクターの構造情報を修正した。さらに、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 サブユニットが柔軟に動いていることが示唆された。

さらに、NQR の強力な阻害剤である korormicin A および aurachin D-42 が結合した cryo-EM 構造も取得した。これらの阻害剤は、NqrB サブユニットの N 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 (図 2B)。この領域 (Gly2-Leu26) 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示唆された。

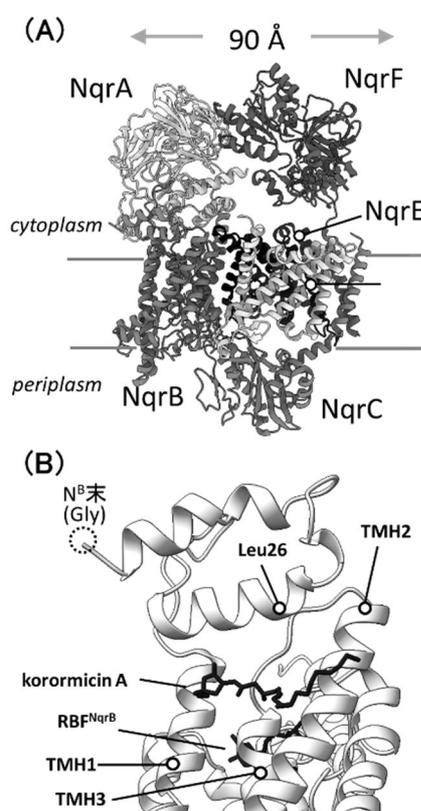


図 2. (A) NQR の cryo-EM 構造。
(B) korormicin A の結合様式。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ikunishi Ryo, Otani Ryohei, Masuya Takahiro, Shinzawa-Itoh Kyoko, Shiba Tomoo, Murai Masatoshi, Miyoshi Hideto	4. 巻 299
2. 論文標題 Respiratory complex I in mitochondrial membrane catalyzes oversized ubiquinones	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 105001 ~ 105001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.105001	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 -
1. 著者名 Tsuji Atsuhito, Masuya Takahiro, Arichi Norihito, Inuki Shinsuke, Murai Masatoshi, Miyoshi Hideto, Ohno Hiroaki	4. 巻 14
2. 論文標題 Discovery of Bis-sulfonamides as Novel Inhibitors of Mitochondrial NADH-Quinone Oxidoreductase (Complex I)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 211 ~ 216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.2c00504	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 -
1. 著者名 Kishikawa Jun-ichi, Ishikawa Moe, Masuya Takahiro, Murai Masatoshi, Kitazumi Yuki, Butler Nicole L., Kato Takayuki, Barquera Blanca, Miyoshi Hideto	4. 巻 13
2. 論文標題 Cryo-EM structures of Na ⁺ -pumping NADH-ubiquinone oxidoreductase from <i>Vibrio cholerae</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 Uno Shinpei, Masuya Takahiro, Zdorevskiy Oleksii, Ikunishi Ryo, Shinzawa-Itoh Kyoko, Lasham Jonathan, Sharma Vivek, Murai Masatoshi, Miyoshi Hideto	4. 巻 298
2. 論文標題 Diverse reaction behaviors of artificial ubiquinones in mitochondrial respiratory complex I	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102075 ~ 102075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102075	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 Ishikawa Moe, Masuya Takahiro, Kuroda Seina, Uno Shinpei, Butler Nicole L., Foreman Sara, Murai Masatoshi, Barquera Blanca, Miyoshi Hideto	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 cholerae</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics	6. 最初と最後の頁 148547 ~ 148547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabbio.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

1. 著者名 Unten Yufu, Murai Masatoshi, Koshitaka Tomoki, Kitao Kotaro, Shirai Osamu, Masuya Takahiro, Miyoshi Hideto	4. 巻 1863
2. 論文標題 Comprehensive understanding of multiple actions of anticancer drug tamoxifen in isolated mitochondria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics	6. 最初と最後の頁 148520 ~ 148520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabbio.2021.148520	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 -

[学会発表] 計25件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Masuya, T., Nishida, M., Murai, M., and Miyoshi, H.
2. 発表標題 Photoaffinity labeling reveals the flexible conformations of acetogenin in the ubiquinone reaction cavity of mitochondrial respiratory complex I
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Murai, M., Mizutani, M., Kuroda, S., Oku, M., Aoki, W., Masuya, T., and Miyoshi, H.
2. 発表標題 Comprehensive screening of the proteins involved in the trafficking of coenzyme Q in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> using synthetic ubiquinone probes
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 3. Ishikawa, M., Kishikawa, J., Masuya, T., Murai, M., Kitazumi, Y., Butler, N. L., Kato, T., Barquera, B., and Miyoshi, H.
2. 発表標題 Cryo-EM Structures of the Na ⁺ -Pumping NADH-ubiquinone Oxidoreductase from <i>Vibrio cholerae</i>
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡辺 大賀、榎谷 貴洋、村井 正俊、三芳 秀人
2. 発表標題 ミトコンドリア膜透過性遷移を阻害するイソオキサゾール類の作用機構研究
3. 学会等名 日本農薬学会第49回大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 榎谷貴洋、村井正俊、三芳秀人
2. 発表標題 ミトコンドリア呼吸鎖複合体-I に対するロテノンの作用機構
3. 学会等名 日本農薬学会第49回大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 宮地 咲野、田中 比奈子、石川 萌、Blanca Barquera、榎谷 貴洋、村井 正俊、三芳 秀人
2. 発表標題 コレラ菌Na ⁺ 輸送型NADH-キノン酸化還元酵素の特異的化学修飾と動態観測
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 水谷 みらい、黒田 聖奈、奥 公秀、榎谷 貴洋、村井 正俊、三芳 秀人
2. 発表標題 合成ユビキノンプローブを用いた出芽酵母のユビキノン取り込みに関するタンパク質の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 渡辺 大賀、榎谷 貴洋、村井 正俊、三芳 秀人
2. 発表標題 ミトコンドリア膜透過性亢進を阻害するイソオキサゾール類の作用機構研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大谷 燎平、志村 優介、榎谷 貴洋、村井 正俊、三芳 秀人
2. 発表標題 リン脂質-キナゾリン・ハイブリッド阻害剤を用いた呼吸鎖複合体-Iのキノン反応ポケットの解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 石川 萌、岸川 淳一、榎谷 貴洋、村井 正俊、加藤 貴之、Blanca Barquera、三芳 秀人
2. 発表標題 コレラ菌Na ⁺ 輸送性NADH-キノン酸化還元酵素に対する阻害剤の作用機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 榎谷 貴洋、生西 凌、大谷 燎平、村井 正俊、三芳 秀人
2. 発表標題 人工キノン類を用いた呼吸鎖複合体-Iのキノン結合ポケットに関する研究
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会第49回討論会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 石川 萌、岸川 淳一、榎谷 貴洋、村井 正俊、加藤 貴之、Blanca Barquera、三芳 秀人
2. 発表標題 コレラ菌Na ⁺ 輸送性NADH-キノン酸化還元酵素に関する阻害剤作用機構の解明
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会第49回討論会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 宮地 咲野、田中 比奈子、石川 萌、榎谷 貴洋、村井 正俊、Blanca Barquera、三芳 秀人
2. 発表標題 コレラ菌Na ⁺ 輸送型NADH-キノン酸化還元酵素の動態観測
3. 学会等名 第37回農薬デザイン研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大谷燎平、生西凌、榎谷貴洋、村井正俊、志波智生、三芳秀人
2. 発表標題 人工キノン類を用いた呼吸鎖複合体-Iのキノン反応ポケットに関する研究
3. 学会等名 第37回農薬デザイン研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西田 美咲、榎谷 貴洋、村井 正俊、三芳 秀人
2. 発表標題 ミトコンドリア呼吸鎖複合体-Iを阻害するアセトゲニンの結合部位の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023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によるコレラ菌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2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 生西 凌、大谷 燎平、榎谷 貴洋、村井 正俊、三芳 秀人
2. 発表標題 人工キノン類を用いた呼吸鎖複合体-Iのキノン結合ポケットに関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 越高 知生、富澤 康平、榎谷 貴洋、村井 正俊、三芳 秀人
2. 発表標題 ミトコンドリア呼吸鎖複合体-Iにおける脱共役ユビキノンの作用機構
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
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 日本農薬学会第48回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西田 美咲、榎谷 貴洋、村井 正俊、三芳 秀人
2. 発表標題 ミトコンドリア呼吸鎖複合体-I を阻害するアセトゲニンの結合部位の同定
3. 学会等名 日本農薬学会第48回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 榎谷 貴洋、宇野 晋平、越高 知生、生西 凌、富澤 康平、大谷 燎平、奥田 健司、村井 正俊、三芳 秀人
2. 発表標題 人工キノン類を用いたミトコンドリア呼吸鎖複合体-Iのユビキノン反応部位の特性解明
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会第48回討論会
4. 発表年 2022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 日本生体エネルギー研究会第48回討論会
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 コレラ菌Na ⁺ 輸送性NADH-キノン酸化還元酵素に対する阻害剤の作用機構
3. 学会等名 第37回農薬デザイン研究会
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 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 榎谷 貴洋、石川 萌、田中 比奈子、岸川 淳一、Blanca Barquera、北隅 優希、村井 正俊、三芳 秀人
2. 発表標題 コレラ菌Na ⁺ 輸送型NADH-キノン酸化還元酵素の阻害剤コロルミシンの作用機序
3. 学会等名 第64回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

所属研究室ホームページ
<http://www.biofunc-chem.kais.kyoto-u.ac.jp>
 Researchmap
https://researchmap.jp/t_masuya/?lang=japanese
 Google Scholar
<https://scholar.google.co.jp/citations?user=AyNAzrUAAAAJ&hl=ja>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------