

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	石 川 萌
論文題目	Studies on the structure and function of Na ⁺ -pumping NADH-quinone oxidoreductase from <i>Vibrio cholerae</i> (コレラ菌Na ⁺ 輸送性NADH-キノン酸化還元酵素の構造および機能に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>Na⁺輸送性NADH-キノン酸化還元酵素(Na⁺-NQR)は、基質の酸化還元と共役したNa⁺の能動輸送を行う膜タンパク質複合体であり、6つのサブユニット(NqrA~F)と6つのコファクターから構成される。Na⁺-NQRはコレラ菌など多数の病原性細菌の生存に必須であり、哺乳類ミトコンドリアに存在するH⁺輸送性NADH-キノン酸化還元酵素(呼吸鎖複合体-I)とは進化的にも構造的にも異なるため、病原性細菌に対する選択性に優れた抗菌剤の創薬標的として期待できる。2014年にコレラ菌Na⁺-NQRのX線結晶構造が報告されたが、キノンも阻害剤も共結晶化されておらず、これらリガンド分子の結合部位の同定には至らなかった。また、この結晶構造では、酵素内電子移動を司るFMNなどのコファクター間の距離が異常に長い(29~32Å)箇所が3箇所あり、この状態では電子移動は起こりえない。そのため、酵素反応中に各サブユニットの大きな構造変化が起こり、コファクター間の距離が変化すると予想されているが、未だ実証されていない。本研究では、有機化学的および構造生物学的手法を組み合わせ、コレラ菌Na⁺-NQRの反応機構や阻害剤の作用機序を解明することを目的とした。</p> <p>第1章ではタンパク質の化学修飾法の一つであるligand-directed (LD) 化学を利用し、Na⁺-NQRの強力な阻害剤であるコロールミンAの結合様式を有機化学的に精査した。LD化学とは、リガンド分子が有する高い結合親和性を利用して合成分子を標的タンパク質に誘導し、分子内に組み込んだタグをLysなどのアミノ酸残基に求核置換反応によってピンポイントで導入するものである。コロールミンAを鋳型として、LD化学を行うための<i>N</i>-acyl-<i>N</i>-alkyl sulfonamide基を組み込んだプローブ分子NAS-K1を合成した。NAS-K1はNa⁺-NQRとインキュベートすると、NqrBサブユニットを特異的に修飾した。続いて、各種プロテアーゼによる限定消化後のペプチドマッピングおよびLC-MS/MS解析の結果、NAS-K1は主にNqrBのN末端領域(N_B末領域)の22番目のLys残基を、副次的に54番目のLys残基を化学修飾することがわかった。2014年のX線結晶構造では、N_B末端から37個のアミノ酸残基がモデル化できておらず、両Lys残基の位置関係は不明である。しかし、本研究の結果から、この2残基はN_B末領域の比較的近い空間に位置すると予測した。さらに、コロールミンAに耐性を示す変異型酵素(NqrB-G141A)においてもNAS-K1を用いて同様の化学修飾を実施し、N_B末領域の構造が阻害剤感受性に深く関与することがわかった。</p> <p>第2章では、コレラ菌Na⁺-NQRに関してクライオ電子顕微鏡(cryo-EM)を用いた単粒子解析を行い、精密立体構造の解明を試みた。阻害剤が結合していない酵素に加え、オーラシンD-42とコロールミンAという異なる阻害剤がそれぞれ結合した計3種類の酵</p>			

素の立体構造を2.5~2.9 Å分解能で取得した。オーラシンD-42やコロールミシンAの結合部位は、N_B末領域と膜貫通ヘリックス (TMH) 1、TMH2、TMH3に囲まれたサイトプラズム側膜表面の空間であった。このN_B末領域は、阻害剤が結合していない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構造が固定化されることが示唆された。本章で得られた構造情報は、第1章で予想したN_B末領域の構造モデルを裏付けると同時に、合成コロールミシン類の構造活性相関のプロファイルを合理的に説明した。さらに、2014年のX線結晶構造ではリボフラビンがNqrBとNqrEに挟まれた領域にモデル化されていたのに対し、本研究で得られたcryo-EM構造ではNqrBサブユニットの中央に位置するなど、X線結晶構造から得られていた複数のコファクターに関する構造情報を修正した。

第3章では、Na⁺-NQR内における酸化還元反応とNa⁺輸送反応の共役メカニズムの解明を目指した。「ユビキノン (UQ) の長いイソプレノ側鎖がNa⁺輸送に関与している」とする独自の作業仮説に基づき、側鎖構造の異なる一連の合成UQ類について電子伝達活性とNa⁺輸送の関係を精査した。具体的には、Na⁺-NQRを再構成したプロテオリポソームを調製し、UQ類縁体ごとのUQ還元活性と、その時に誘導されるNa⁺輸送活性（実験的にはNa⁺輸送により形成される膜電位を測定）を比較した。その結果、側鎖を持たないUQ₀や、メチル基やエチル基を側鎖として有するUQ_{CH3}やUQ_{C2H5}は、Na⁺-NQRによって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。一方、イソプレノ側鎖を含め、それらよりも長いアルキル側鎖を有するUQ類では、側鎖構造に関わらずUQ還元と共役したNa⁺輸送活性が観測された。この事実は、UQが最終電子受容体としてNa⁺-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関与していることを強く示唆している。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400~1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500~2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

Na⁺輸送性NADH-キノン酸化還元酵素(Na⁺-NQR)は、コレラ菌など多数の病原性細菌に存在する呼吸鎖酵素で、選択性に優れた抗菌剤の創薬標的として期待されている。本酵素に関する構造生物学的情報は、2014年に報告されたコレラ菌酵素のX線結晶構造だけであり、酵素の作動メカニズムや阻害剤の作用機序については不明な点が多い。本研究では、有機化学的手法と構造生物学的手法を連携してこれらの課題の解決を目指した。本論文で評価できる点は以下の3点である。

1. タンパク質化学修飾の一つであるligand-directed化学の原理に基づき、Na⁺-NQRの特異的阻害剤であるコロールミシンAを鋳型としたプローブ分子を合成開発し、NqrBサブユニットのN末端領域22番目のLys残基をピンポイントで化学修飾する方法論を確立した。
2. クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析により、阻害剤非結合型に加え、オーラシンD-42およびコロールミシンAという阻害剤がそれぞれ結合した計3種類の精密立体構造を明らかにした(2.5~2.9Å分解能)。得られた構造情報は、阻害剤結合部位がNqrBのN末端に存在することを裏付けただけでなく、結合モデルを原子レベルで明らかにした。さらに、2014年のX線結晶構造で帰属された3つのコファクターについて、それらの位置情報を修正した。
3. 側鎖構造の異なる一連の合成ユビキノン類について、電子伝達活性とNa⁺輸送の相関関係を精査した。その結果、ユビキノンの側鎖長が短いと、ユビキノンは還元されてもNa⁺が輸送されない“非共役”現象が起こることを発見し、ユビキノンの側鎖がNa⁺輸送反応に直接的に関与していることを明らかにした。

以上のように、本論文は有機化学的および構造生物学的アプローチによって、Na⁺-NQRの反応機構や阻害剤の作用機序を明らかにした。一連の研究成果は、農薬科学、創薬科学、および生体エネルギー学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和6年1月17日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降(学位授与日から3ヶ月以内)