

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22278

研究課題名（和文）ミトコンドリア呼吸鎖酵素からの活性酸素発生を遮断する化合物の創製

研究課題名（英文）Production of chemicals that suppress generation of ROS from mitochondrial respiratory chain.

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリアは酸化的リン酸化によってATPを生産するが、酸化的リン酸化に不可避の副産物として活性酸素を発生させ、様々な疾病や老化の亢進に関与する。活性酸素の発生メカニズムとしては、コハク酸の過剰な蓄積に起因するNADH-キノン酸化還元酵素（複合体-I）の逆反応であるキノール酸化の過程で、セミキノラジカル中間体から酸素分子に電子がリークするためと考えられている。S1QEL類をシース化合物とすることによって、「複合体-Iの逆反応のみを阻害して、ミトコンドリアの機能を攪乱することなく、活性酸素発生を根元から断つことのできる化合物」を創製することを本研究の目的とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアに対して特異的に移行する抗酸化剤など、多数の優れた抗酸化剤が開発されて来たが、抗酸化剤は活性酸素発生部位の下流で作用するため、活性酸素発生そのものを根元から断つことはできないという限界がある。複合体-Iは細胞内での活性酸素発生の主要部位であるため、本酵素からの活性酸素発生を制御することは酸化ストレス研究の重要な課題である。複合体-Iからの活性酸素発生を遮断する化合物が創製できれば、ミトコンドリアや細胞の酸化ストレス研究におけるブレークスルーになることが期待できる。また、本研究の成果は老化研究に及ぼす波及効果も期待でき、社会的意義が十分にある。

研究成果の概要（英文）：Mitochondria produce ATP via oxidative phosphorylation using molecular oxygen. This process involves an unavoidable byproduct “reactive oxygen”, which is closely associated with a wide range of age-associated diseases such as diabetes and cancer. Accumulating evidence have led to the consensus that reactive oxygen is produced by electron leak to molecular oxygen from semiquinone radical, which is formed during reverse electron transfer in NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) driven by excess accumulation of succinate in mitochondria. Using Q1QELs as a template, this study aimed at producing small chemicals, which can suppress the generation of reactive oxygen by interfering with reverse electron transfer, but not forward electron transfer, in complex I.

研究分野：生物有機化学

キーワード：ミトコンドリア 活性酸素 ユビキノン complex I

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ミトコンドリアは酸化的リン酸化によって ATP を生産するが、酸化的リン酸化に不可避の副産物として活性酸素を発生させ、様々な疾病や老化の亢進に関与することが知られている。近年の研究から、ミトコンドリアにおける活性酸素の主たる発生メカニズムが明らかになって来た [文献 1, 2]。すなわち、コハク酸の過剰な蓄積に起因する NADH-キノン酸化還元酵素 (複合体-I) の逆反応であるキノール酸化の過程で、セミキノラジカル中間体 (CoQH[•]) から酸素分子に電子がリークするというものである (図 1)。抗酸化剤は活性酸素の軽減のために広く利用されているが、活性酸素発生部位の下流で作用するため、活性酸素の発生そのものを直接的に遮断することはできない。

(2) 2016 年、Buck 研究所と Novartis 研究財団の共同研究チームは、巧みな一連のアッセイ系を用いて、約 64 万個の化合物の探索によって、複合体-I からの活性酸素発生だけを特異的に減少させることで酸化ストレスを抑制する化合物群を報告した (S1QEL 類、図 2) [文献 3]。ここで、S1QEL は “suppressor of site IQ electron leak” の略である。残念ながら、S1QEL 類の有効濃度は μM レベルと高い上、活性酸素発生を抑制するメカニズムは明らかにされなかった。

(3) 代表者は報告された S1QEL 類の幾つかを独自に合成し、ウシ心筋ミトコンドリア複合体-I に対する影響を調べた。その結果、S1QEL 類は複合体-I に対する阻害剤であることがわかったが、酵素の順反応 (キノン還元) に比べて、逆反応 (キノール酸化) に対してより低濃度で阻害を示すユニークな阻害剤であることが判明した。既存の阻害剤は順・逆両反応を同程度で阻害することを踏まえると、これらの予備的知見は、「S1QEL 類は、複合体-I の逆反応をより選択的に阻害することで活性酸素発生を抑制している」ことを強く示唆している (図 1)。

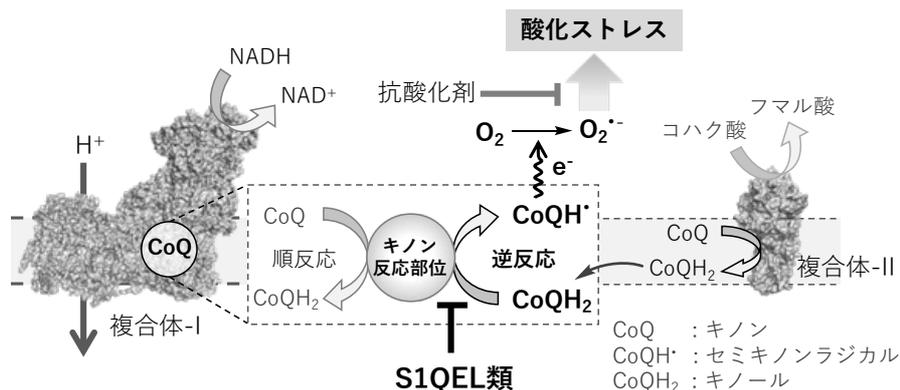


図 1. 複合体-I の逆反応 (ユビキノール酸化) によって活性酸素が発生するメカニズムを模式的に示す。複合体-I の逆反応は、複合体-II が過剰に蓄積されたコハク酸を酸化することによって、ユビキノール/ユビキノン比が上昇することによって引き起こされる。

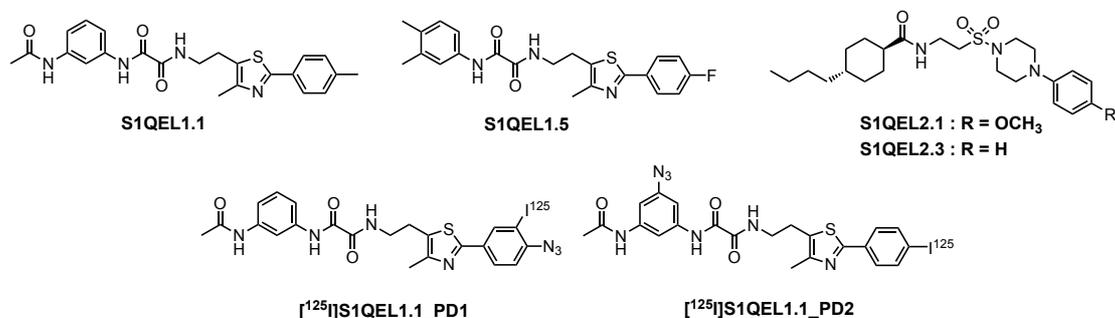


図 2. 代表的な S1QEL 類の構造 (上段) と合成した光反応性類縁体 (下段) の構造を示す。

2. 研究の目的

本研究では、S1QEL 類をシーズ化合物とすることによって、「複合体-I の逆反応（キノール酸化）のみを阻害して、ミトコンドリアのエネルギー代謝を攪乱することなく、S0 発生を根元から断つことのできる化合物」を創製することを目的とした。これを達成するために、具体的には次の2つの課題を遂行した。

課題1. S1QEL 類の結合部位の同定に基づく活性酸素発生を抑制するメカニズムの解明

課題2. 逆反応のみを特異的に阻害する化合物の創製

3. 研究の方法

(1) Brant ら [文献3] が発見した S1QEL 類の名から S1QEL1.1 を選び、これを鋳型として光親和性標識に用いる光反応性類縁体^[125I]S1QEL1.1-PD1 および^[125I]S1QEL1.1-PD2 を合成した (図X)。ウシ心筋からミトコンドリアを単離して亜ミトコンドリア粒子を調製し、光親和性標識を実施した。標識部位の同定は、限定消化酵素によるペプチドマッピングによって行った。

(2) Brant らの S1QEL2.1 を親化合物（テンプレート）とし、この化合物の阻害効果における異方性（逆反応阻害 vs 順反応阻害）よりも大きな異方性を示す化合物を期待して（逆反応をより顕著に阻害する化合物）、系統的な構造改変を行った。

4. 研究成果

<課題1に関して>

^[125I]S1QEL1.1-PD1 および^[125I]S1QEL1.1-PD2 を用いた光親和性標識実験の結果、両化合物は ND1 サブユニットに特異的に結合することがわかった。標識部位をペプチドマッピングした結果、膜貫通ヘリックス5番と6番を結ぶ第3ループよりも下に結合することがわかった [文献4]。Cryo-EM の構造を参照すると、この領域は直接的にはキノン結合ポケットを構成していないと考えられる。また、拮抗試験の結果から、両化合物ともに既知の複合体-I とは結合部位を異にすることがわかった [文献4]。これらの結果から、S1QEL 類は既知阻害剤とは異なる作用機構で複合体-I を阻害することが明らかになった。すなわち、キノン結合ポケットに作用してキノンの反応を直接的に阻害するのではなく、キノン結合ポケットの下方に結合してポケットに構造変化を誘導すると言う間接的な効果であることがわかった。この間接的な効果により、S1QEL 類による阻害の異方性が説明可能であろう。

<課題2に関して>

S1QEL2.1 が持つ特徴的な構造ユニットの内、重要と思われるユニットを改変した化合物の構造を図3に示した。構造改変によって複合体-I の逆反応あるいは順反応に対する阻害活性は大きく変化した。しかし、両阻害効果が“同調的”に変化したため、結果として、阻害効果における異方性（逆反応阻害 vs 順反応阻害）はあまり変化しなかった。このために、S1QEL2.1 を凌駕する化合物を見出すことはできなかった。

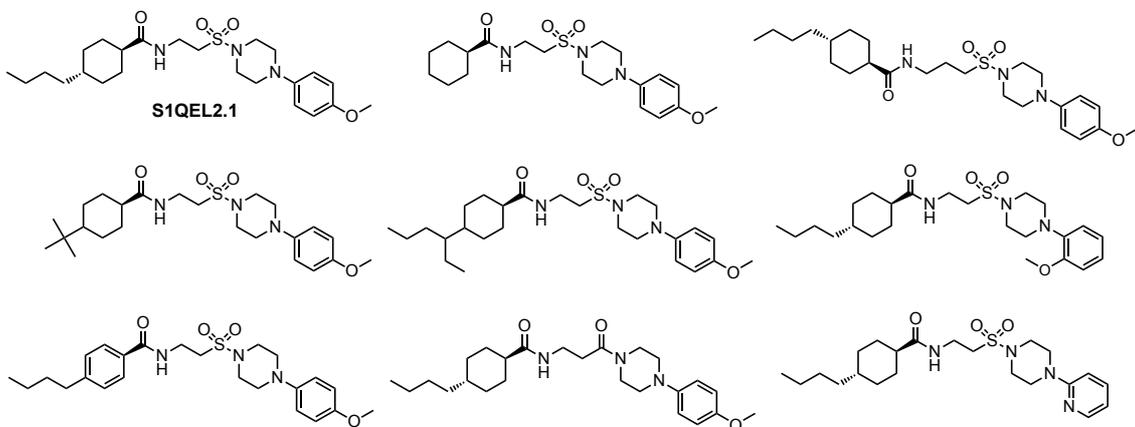


図3. 合成した S1QEL2.1 類縁体の構造を示す（次ページに続く）。

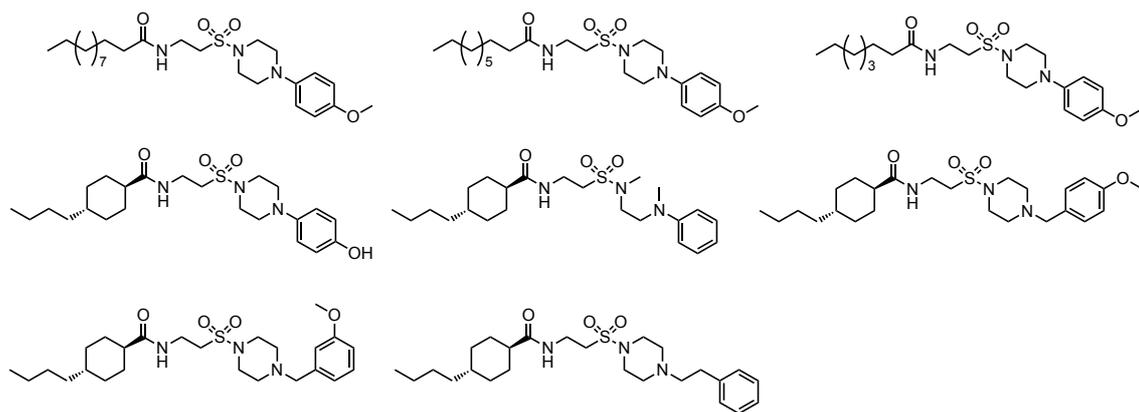


図3. (前ページからの続き)

<引用文献>

- 1) Chouchani et al. (2014) *Nature* 515, 431-435.
- 2) Wong et al. (2017) *J. Biol. Chem.* 292, 16804-16809.
- 3) Brand et al. (2016) *Cell Metab.* 24, 582-592.
- 4) Banba et al. (2019) *J. Biol. Chem.* 294, 6550-6561.

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Atsushi Banba, Atsuhito Tsuji, Hironori Kimura, Masatoshi Murai, and Hideto Miyoshi	4. 巻 294
2. 論文標題 Defining the mechanism of action of S1QELs, specific suppressors of superoxide production from the quinone reaction site in mitochondrial complex I	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem	6. 最初と最後の頁 6550-6561
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.007687	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 馬場敦志、辻諄人、村井正俊、三芳秀人
2. 発表標題 28. ミトコンドリア呼吸鎖複合体-Iからの活性酸素発生を抑制する化合物群（S1QEL類）の作用機構研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場敦志、辻諄人、木村洋則、村井正俊、三芳秀人
2. 発表標題 呼吸鎖複合体-Iからの活性酸素を抑制する化合物群（S1QEL類）の作用機構研究
3. 学会等名 日本農薬学会第44回大会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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