

機関番号：14301
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2009～2010
課題番号：21880024
研究課題名（和文）阻害剤の作用機構研究を基盤とするミトコンドリア複合体-I の動態解明
研究課題名（英文）Exploring the reaction mechanism of mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) using a specific inhibitor as a molecular probe
研究代表者
村井 正俊 (MURAI MASATOSHI)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：80543925

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリア NADH-ユビキノロン酸化還元酵素（複合体-I）は、細胞のエネルギー代謝において重要な役割を担う呼吸鎖酵素であり、45 の異なるサブユニットで構成される膜タンパク質である。本酵素の基礎研究の進展は、パーキンソン病等の複合体-I の機能傷害に起因する疾患のメカニズムの解明や、合成農薬や抗寄生虫薬のターゲットとしての応用が期待される。本研究において代表者らは、特異的阻害剤であるキナゾリンを用いた光親和性標識実験により、膜ドメイン（ND1）と親水性ドメイン（49 kDa）との接触点に阻害剤結合部位が存在し、本領域が両ドメインの相互作用において重要な機能を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) catalyzes the initial reaction of respiratory chain, forming the electrochemical gradient for ATP synthesis. Using a photo-reactive quinazoline analogue, the head researcher revealed a new information about the interfacial region between hydrophilic and hydrophobic domains of complex I that is thought to be important for ubiquinone reduction and energy transduction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,110,000	333,000	1,443,000
平成 22 年度	1,010,000	303,000	1,313,000
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：ミトコンドリア、複合体-I、キナゾリン、ユビキノロン、光親和性標識

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア内膜上に存在する複合体-I は、呼吸鎖酵素系の初発酵素で、ATP 合成や物質輸送の駆動力となるプロトンポンプ活性を有する重要な酵素である。ヒトでは、複合体-I の機能障害による活性酸素の発生が原因となって、パーキンソン病などの神経変性疾患が発症することが知られている。また、複合体-I は抗寄生虫薬や殺虫・殺ダニ剤の新しいターゲット酵素としても注目され

ていることから、本酵素の基礎研究の大幅な進展が期待されている。しかし、哺乳類ミトコンドリアの複合体-I は 45 個の異なるサブユニットから構成される巨大な膜酵素（分子量約 1 MDa）であるために、呼吸鎖酵素中で最も研究の進展が遅れている。

複合体-I は電子伝達を担う親水性ドメイン（サブユニット数 16 個）と、ユビキノロン還元とそれに共役したプロトンポンプ活性を担う膜ドメイン（サブユニット数 29 個）か

ら構成され、独特のL字型構造を取っていることが知られている。酵素活性を nM オーダーで阻害する特異的阻害剤の存在は、本酵素の機能解明のための有力なツールである。我々はこれまでに、複合体-I の特異的阻害剤であるキナゾリン型化合物の光親和性標識プローブ^{[125I]AzQ}を用いて(図1)、ウシ心筋ミトコンドリアに対する光親和性標識実験を実施し、本化合物が親水性ドメインの 49 kDa サブユニットと膜ドメインの ND1 サブユニットの境界領域に結合することを明らかにしてきた

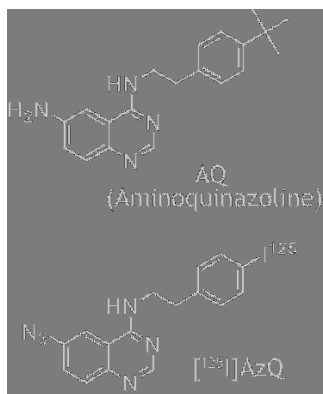


図1. キナゾリン型化合物である AQ と^{[125I]AzQ}の化学構造。

2. 研究の目的

上記の結果は、両ドメインの境界領域が阻害剤やユビキノンの結合部位を構成し、エネルギー共役反応の中核を担うことを強く示唆するものであり、2010年に明らかになった好熱細菌(*Thermus thermophilus*)由来の複合体-I の結晶構造も、改めて我々の実験結果を支持するものであった(図2)。本研究では^{[125I]AzQ}をプローブとして、キナゾリン型化合物の結合部位をさらに詳細に解明し、2つのドメイン間で生じる相互作用や複合体-I のエネルギー変換反応の動的なメカニズムを明らかにすることを目指した。

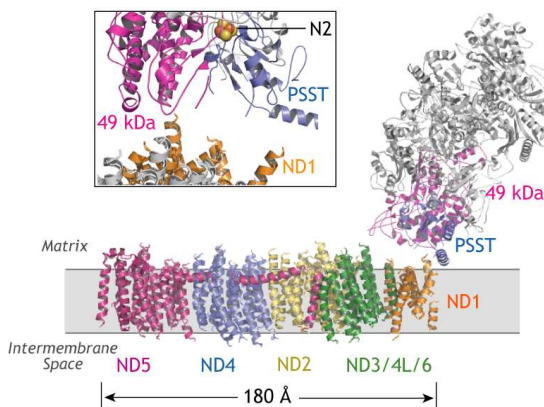


図2. 好熱細菌複合体-I の結晶構造 (PDB: 3M9S)

とサブユニットの配置(サブユニットの名称はウシ心筋複合体-Iのものを利用した)。

3. 研究の方法

ミトコンドリア複合体-Iは45のサブユニットで構成される超分子複合体であり、阻害剤結合部位をサブユニット以下のレベルで明らかにするためには、単離精製された酵素を出発材料とすることが好ましい。研究開始段階では、キナゾリン型化合物に対しても高い感受性を示す好気性酵母、*Yarrowia lipolytica*由来の複合体-Iを用いて光親和性標識実験を行った。しかしながら、^{[125I]AzQ}は本酵素の49 kDaとND1サブユニットを特異的に標識したものの、それ以上の解析に十分な放射能標識には至らなかった。

そこで、実験材料をウシ心筋由来の精製複合体-Iに変更して、^{[125I]AzQ}による光親和性標識実験を行った。ウシ心筋複合体-Iは、英国MRCミトコンドリア生物学部門、Judy Hirst博士より供与して頂いたサンプルである。本精製酵素は、ホスファチジルコリン(PC)やホスファチジルエタノールアミン(PE)、カルジオリピン(CL)などのリン脂質の存在下、キナゾリン型化合物に対して高い感受性を示し、^{[125I]AzQ}は49 kDaおよびND1サブユニットを4:1の比率で特異的に標識した(図3)。本結果は比較的親水性の高い領域である阻害剤結合部位の構造的な安定化に、リン脂質が大きく寄与していることを示すものである。

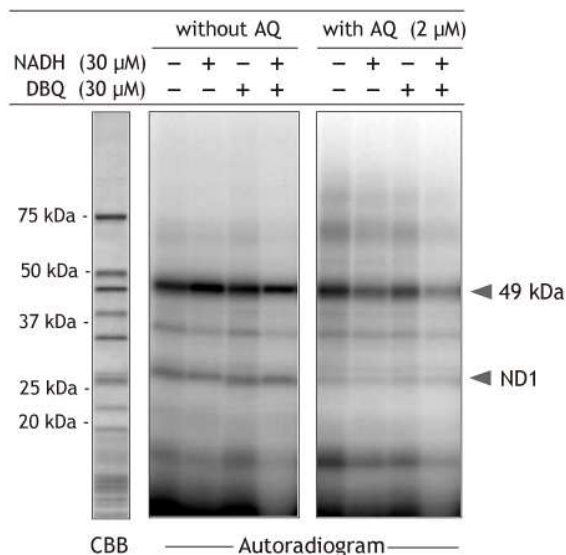


図3. ウシ心筋複合体-Iに対する光親和性標識実験. 0.4 mg/mLのasolectin(混合リン脂質)存在下、6 nMの^{[125I]AzQ}により複合体-I(0.15 mg/mL)を標識しSDS-PAGEに供した。リン脂質の存在に加えて、基質であるNADHとDBQ(decylbenzoquinone)によるターンオーバーが、2つのサブユニットへの特異的標識に必須であった。

2つのサブユニットが同時に光親和性標識を受けたということは、互いに隣接する2つのサブユニットが相互作用しながら阻害剤の結合部位を構成していることを意味する。そこで、49 kDa と ND1 サブユニットについてプロテアーゼ限定分解を実施し、 $[^{125}\text{I}]\text{AzQ}$ の結合部位の解析を行った。まず、親水性の49 kDa サブユニットについて、V8-protease による in gel 部分消化 (Cleveland mapping) を行ったところ、放射活性は Thr25 から始まる 13.7 kDa の断片へ移行した。さらに各種プロテアーゼを作用させたあとのペプチド断片の放射活性の移行パターンを解析したところ、N 末端付近の Asp41-Arg63 の 23 残基の配列が $[^{125}\text{I}]\text{AzQ}$ の架橋断片として強く示唆された

続いて膜ドメインの構成成分である ND1 についてもプロテアーゼ限定分解を行った。ミトコンドリア DNA にコードされた ND1 サブユニットは 8 回膜貫通タンパク質であり、マトリックス側に 3 つの大きなループ領域を持ち、これらが親水性ドメインと何らかの相互作用をしていると考えられている。リジレンドペプチターゼ (Lys-C) とエンドプロテアーゼ Asp-N を用いた限定分解の結果、 $[^{125}\text{I}]\text{AzQ}$ はマトリックス側の第 3 ループ領域をカバーする Asp199-Lys262 に特異的に結合することが強く示唆され、本領域が親水性ドメインの構成成分の 49 kDa と接触し、阻害剤の結合部位を構成していると考えられる。

4. 研究成果

本研究では、キナゾリン型阻害剤の光親和性プローブ $[^{125}\text{I}]\text{AzQ}$ が親水性ドメインの 49 kDa サブユニットと膜ドメインの ND1 サブユニットの境界領域に結合し、49 kDa サブユニットは N 末端付近に、ND1 サブユニットはマトリックス第 3 ループ領域に架橋部位が存在することを明らかにした。複合体-I の反応においては「親水性ドメイン」と「膜ドメイン」の間での相互作用が機能的に重要な役割を果たしていると考えられてきたが、本研究は阻害剤プローブを用いて複合体-I のエネルギー変換において重要な役割を担う 2 つのサブユニットの接触領域を初めて明らかにしたものである。本研究成果は現在、論文投稿の準備中である (図 4)。

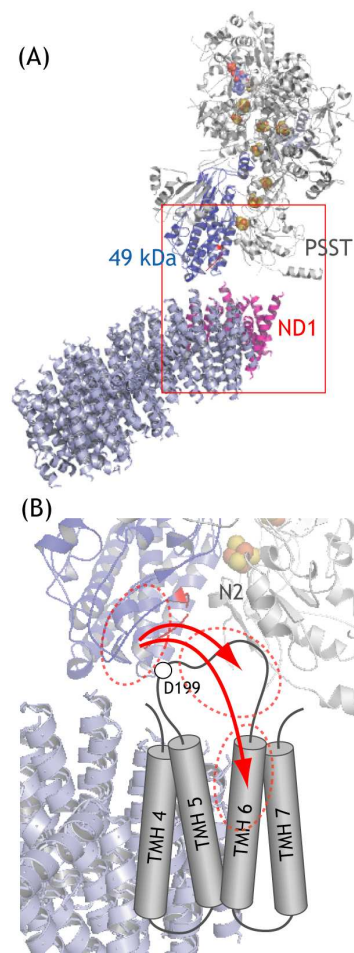


図 4. $[^{125}\text{I}]\text{AzQ}$ 結合部位のモデル図. (A) *T. thermophilus* の結晶構造 (PDB entry: 3M9S) 中の 49 kDa サブユニットと ND1 サブユニットをそれぞれ青色とマゼンダで示した. (B) $[^{125}\text{I}]\text{AzQ}$ 結合部位付近の拡大図. 親水性ドメインの 49 kDa サブユニットにおける $[^{125}\text{I}]\text{AzQ}$ 結合部位に対応する配列 (Met26-Gly31, Gly39-Arg42) を赤色で示した. 一方、膜ドメインの ND1 サブユニットでは、赤色の点線で囲まれた領域 (マトリックス第 3 ループ領域、あるいは第 6 番目の膜貫通ヘリックスのマトリックス近傍) が 49 kDa サブユニットとの接触領域である.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Kakutani, N., Murai, M., Sakiyama, N., and Miyoshi, H. (2010) Exploring the Binding Site of $\Delta\text{Iac-Acetogenin}$ in Bovine Heart Mitochondrial NADH-Ubiquinone Oxidoreductase. *Biochemistry* 49, 4794-4803. (査読あり)

② Murai, M., Yamashita, T., Senoh, M., Mashimo, Y., Kataoka, M., Kosaka, H., Matsuno-Yagi, A., Yagi, T., and Miyoshi, H. (2010) Characterization of the ubiquinone binding site in alterative NADH-quinone

oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* by photoaffinity labeling, *Biochemistry* 49, 2973-2980. (査読あり)

③ Sekiguchi, K., Murai, M., and Miyoshi, H. (2009) Exploring the binding site of acetogenin in the ND1 subunit of bovine mitochondrial complex I *Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)* 1787, 1106-1111. (査読あり)

[学会発表] (計 13 件)

① 土生沙綾子、横山実、村井正俊、安部真人、三芳秀人、光親和性ユビキノンプローブの合成と標的タンパク質の解析、日本農芸化学会2011年度大会、2011年3月27日、京都女子大学 (東日本大震災により中止)

② 村井正俊、崎山直人、白石悠祐、安部真人、三芳秀人、ミトコンドリア複合体-Iに作用する光反応性フェンピロキシメートの結合部位の同定、日本農芸化学会2011年度大会、2011年3月27日、京都女子大学 (東日本大震災により中止)

③ 村井正俊、崎山直人、白石悠祐、安部真人、三芳秀人、ミトコンドリア複合体-Iに作用する光反応性フェンピロキシメートの結合部位の同定 (I)、日本農薬学会第36回大会、2011年3月18日、玉川大学 (東日本大震災により中止)

④ 崎山直人、村井正俊、白石悠祐、安部真人、三芳秀人、ミトコンドリア複合体-Iに作用する光反応性フェンピロキシメートの結合部位の同定 (II)、日本農薬学会第36回大会、2011年3月18日、玉川大学 (東日本大震災により中止)

⑤ 横山実、土生沙綾子、村井正俊、安部真人、三芳秀人、機能性ユビキノンプローブの合成とユビキノン結合性タンパク質の探索、日本農芸化学会関西支部例会、2011年2月5日、京都大学

⑥ 村井正俊、角谷信至、崎山直人、安部真人、三芳秀人、ミトコンドリア複合体-I阻害剤 Δ lac-アセトゲニンの結合部位の解明、第36回日本生体エネルギー研究会、2010年11月19日、大阪大学

⑦ 真下佑子、村井正俊、山下哲生、三芳秀人、酵母の非プロトン輸送性NADH-ユビキノン酸化還元酵素 (Ndi1) のユビキノン結合部位の解明、第36回日本生体エネルギー研究会、2010年11月19日、大阪大学

⑧ Murai, M., Kakutani, N., Sakiyama, N., and Miyoshi, H. Characterization of the binding site of Δ lac-acetogenin in bovine mitochondrial complex I by photoaffinity labeling, 16th European Bioenergetics Conference (EBEC 2010), July 17, 2010, Warsaw University (Poland)

⑨ 村井正俊、角谷信至、崎山直人、三芳秀人、ミトコンドリア複合体-I阻害剤 Δ lac-アセトゲニンの結合部位の同定、日本農薬学会第35回大会、2010年5月29日、北海道大学

⑩ 村井正俊、角谷信至、三芳秀人、ミトコンドリア複合体-I 阻害剤 Δ lac-アセトゲニンの結合部位の同定、日本農芸化学会 2010年度大会、2010年3月28日、東京大学

⑪ 角谷信至、村井正俊、三芳秀人、ミトコンドリア複合体-I 阻害剤 Δ lac-アセトゲニンの結合部位の同定、日本農芸化学会関西支部例会、2010年2月6日、京都大学

⑫ 村井正俊、三芳秀人、光親和性標識法によるキナゾリン型阻害剤のミトコンドリア複合体-I における結合部位の解明、第24回農薬デザイン研究会、2009年11月24日、メルパルク京都 (京都市)

⑬ Murai, M., and Miyoshi, H. Exploring inhibitor binding site in mitochondrial complex I by photoaffinity labeling, 1st China-Japan-Korea Workshops on Pesticide Science (第1回日中韓農薬科学ワークショップ)、2009年10月30日、華東理工科大学 (中国、上海)

[図書] (計 1 件)

① 村井正俊、三芳秀人、呼吸鎖酵素最後の秘境-複合体-I (NADH-ユビキノン酸化還元酵素) の構造と機能、*化学* 66, 72-73, 2011 (化学同人).

[その他]

ホームページ等

<http://www.biofunc-chem.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村井正俊 (MURAI MASATOSHI)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：80543925

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：