

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月 1日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780116

研究課題名（和文） プローブ分子の創製を基盤とするユビキノンの細胞内動態解明

研究課題名（英文） Probing the intercellular traffic mechanism of ubiquinone using synthetic molecular probes

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）：ユビキノン(UQ)の主な役割は、呼吸鎖酵素系において電子伝達担体として働くことであるが、近年の研究ではUQを活性因子として一定の生理活性を発揮するミトコンドリア膜タンパク質の存在が近年示唆されている。報告者は、UQプローブを用いた独自の実験系を確立し、ミトコンドリアユビキノン結合性タンパク質 Coq10 がUQに対して高い親和性を示すことを明らかにした。

また、これと平行してミトコンドリアNADH-ユビキノン酸化還元酵素（複合体-I）におけるユビキノン/阻害剤結合部位結合部位の解析を行った。ウシ心筋ミトコンドリア粒子を実験材料として、種々の阻害剤プローブ分子による光親和性標識実験を行った結果、フェンピロキシメートの結合部位は、ユビキノンへの電子ドナーである鉄硫黄クラスターN2近傍に位置する“PSST”と“49 kDa”と呼ばれるサブユニットの境界領域に存在することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Ubiquinone (UQ) is an essential electron carrier of the mitochondrial respiratory system. However, recent studies suggest the existence of the mitochondrial proteins, which use UQ as an important cofactor. We revealed mitochondrial ubiquinone-binding protein Coq10 accommodates UQ using synthetic UQ-probes.

We also carried out photoaffinity labeling studies of mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) using photolabile complex I inhibitors. We revealed that inhibitor/quinone-binding pocket formed at the interface of the PSST, 49 kDa, and ND1 subunits. These results strongly support our idea that this region exclusively accommodates chemically diverse complex I inhibitors in a manner dependent on their structural properties.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|-----------|-----------|
| 交付決定額 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：生物有機化学

キーワード：ユビキノン、ミトコンドリア、光親和性標識、Click Chemistry、複合体-I

1. 研究開始当初の背景

ユビキノンに代表されるキノン類は、バクテリアから高等生物に至るまでほぼ全ての生物に普遍的に存在する生理活性化化合物であり、真核生物のミトコンドリア内膜やバクテリア細胞膜上に存在する呼吸鎖電子伝達

系における電子伝達担体として機能している。これに加えて最近の研究では、ユビキノンを“活性因子”として持ち、その酸化還元能を利用することで一定の生理活性を発揮しているタンパク質の存在を示唆する報告例が増えている。

例えば、アポトーシスに関与するミトコンドリア膜透過性亢進坑 (permeability transition pore, PTP) は、複数のミトコンドリアタンパク質の複合体であるが、PTP の機能制御にユビキノンが重要な因子として関与することが示唆された。また、ミトコンドリア内膜上にはユビキノン生合成におけるシャペロンとして機能する Coq10 と呼ばれるタンパク質が存在し、Coq10 の存在が電子伝達系の円滑な制御に不可欠であることが示唆された。さらに、ユビキノンは生合成されるミトコンドリアに留まることなく、細胞膜やゴルジ体など細胞全体に広く分布して一定のはたらきをしていることが明らかになってきた。このことを裏付けるように、外来性ユビキノンの取り込みや細胞内輸送に関与するタンパク質の存在を示唆する研究報告が近年になって増加している点は興味深い

2. 研究の目的

ユビキノンを結合することによって一定の生理的機能を果たしているタンパク質や、ユビキノンの細胞内輸送を担うタンパク質など、“キノン結合性タンパク質”を網羅的に同定することは、ユビキノンの生化学的・生理学的研究を格段に進展させるために必須である。そこで本研究では、光親和性標識法に基づき、キノン結合性タンパク質を網羅的に単離・同定可能なユビキノンプローブを創製することを目的とした。

3. 研究の方法

ユビキノンプローブ分子の構造に依っては、タンパク質との親和性が低下し、標識後の精製作業が難しくなるなど、探索の成否を大きく左右する可能性が出てくる。そこで、できる限りバリエーションに富んだプローブ分子を準備する必要がある。

ユビキノンのベンゾキノン骨格と分子末端にそれぞれ、アジド基とアルキンを導入した化合物 1 を合成した。本化合物は光親和性標識実験後に、クリックケミストリー ([3+2]-環化付加反応) を利用してビオチンなどの任意の検出タグを導入することがで

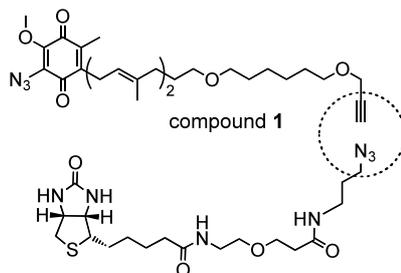


図 1. ユビキノンプローブ (化合物 1) とビオチンタグの構造

きる (図 1)。

4. 研究成果

出芽酵母や分裂酵母を用いた近年の研究で、Coq10 と呼ばれる新規なタンパク質の存在が明らかになった。ミトコンドリア内膜上に局在する Coq10 は、ユビキノン生合成には直接的に関与しないものの、生合成されたユビキノンに“シャペロンの”に作用し、ミトコンドリア内膜中で円滑な電子伝達をサポートしているのではないかと考えられているが、その役割は依然として不明である。これが事実とすれば、ユビキノンはミトコンドリア内膜中を側方拡散するだけ、というこれまでの「キノンプール」モデルが覆されることになる。報告者は、合成ユビキノンプローブを用いた光親和性標識実験を切り口に、ミトコンドリアにおける Coq10 の役割を明らかにすることを試みた。

島根大学・川向誠教授による支援のもと、分裂酵母由来の Coq10 を発現させた大腸菌膜標品を、化合物 1 によって光親和性標識し、クリックケミストリーによってビオチンタグを導入した。ウエスタンブロットやアビジン沈降、および精密質量分析によって標識後の膜標品の解析を進めた結果、化合物 1 は Coq10 に対して特異的に結合していることが明らかになった。本結果は、Coq10 がユビキノンに対して高い親和性を有することを明確に実証するものである。

これと平行して、ミトコンドリア NADH-ユビキノン酸化還元酵素におけるユビキノン/阻害剤結合部位の解析に取り組んだ。複合体-I は、基質の酸化還元反応と共役したプロトン輸送を行うエネルギー変換酵素であり、電子伝達を担う“親水性ドメイン”とプロトン輸送を担う“膜ドメイン”から構成される。

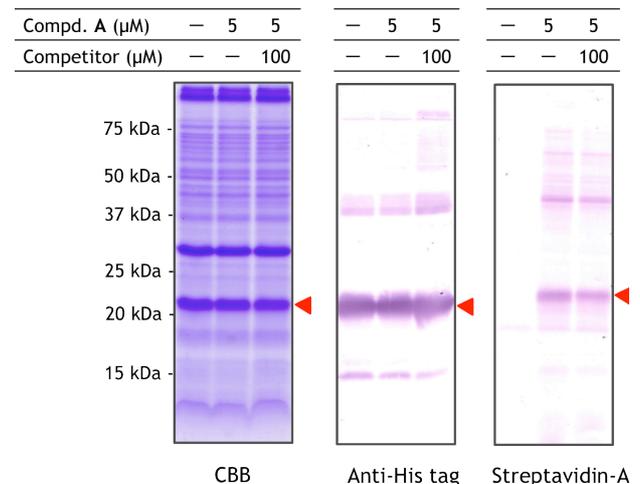


図 2. 組換え Coq10 に対する光親和性標識実験

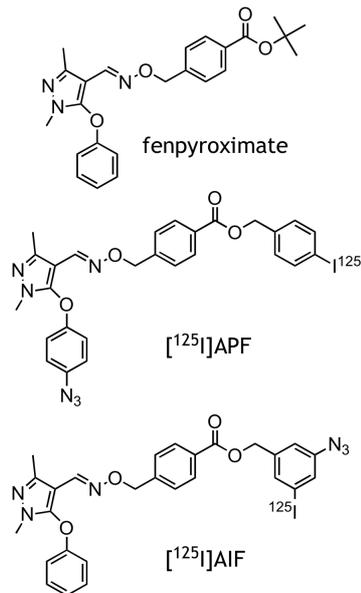


図3. 光反応性フェンピロキシメートの化学構造

複合体-I に対しては様々な阻害剤の存在が知られ、複合体-I に特異的に作用する化合物は、酵素の機能解明を行う上での強力なツールとなる。殺ダニ剤のフェンピロキシメートは、こうした特異的阻害剤の一つである。報告者はフェンピロキシメートを鋳型にした光親和性標識プローブを新たに2種類合成し、ユビキノロン結合部位の詳細な解析を行った。

光反応性基のフェニルアジド基をフェンピロキシメートのトキソフォアであるピラゾール環近傍に導入した [¹²⁵I]APF、および分子末端部に導入した [¹²⁵I]AIF をそれぞれ合成した(図3)。ウシ心筋糸粒体ミトコンドリア粒子を実験材料として、 [¹²⁵I]APF および [¹²⁵I]AIF による光親和性標識実験を行った結果、両化合物は親水性ドメインの構成成分である PSST サブユニットと 49 kDa サブユニットにそれぞれ特異的に結合することがわかった。さらに、プロテアーゼ限定分解による両サブユニットの解析を進めた結果、 [¹²⁵I]APF および [¹²⁵I]AIF の結合部位は、ユビキノロンへの電子ドナーである鉄硫黄クラスターN2 近傍に位置する Ser43-Arg66 (PSST) および Asp160-Arg174(49 kDa)にそれぞれ存在することを明らかにした。

T. thermophilus 複合体-I の対応するサブユニットのシーケンスアラインメントに基づき、 [¹²⁵I]APF と [¹²⁵I]AIF の標識部位を図2に示したが、フェンピロキシメートがピラゾール環部を PSST に、疎水性側鎖を 49 kDa サブユニットに向けるような配向性で両サブユニットの境界に結合することが予想できる。既に明らかにしているキナゾリン系阻害剤

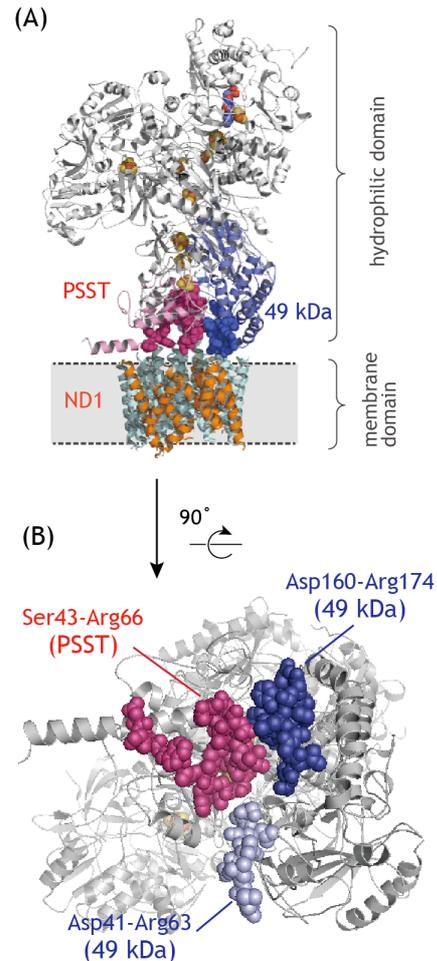


図4. ミトコンドリア複合体-I の阻害剤結合部位の概観

([¹²⁵I]AzQ) の 49 kDa における結合領域 (Asp41-Arg63) を図4に重ねて示した。他の系統の阻害剤であるアセトゲニンは、膜ドメインを構成する ND1 サブユニットの第3ループに特異的に結合することを考慮すると、複合体-I 阻害剤は PSST、49 kDa、ND1 サブユニットで構成される大きな共通のポケット(所謂、ユビキノロン結合ポケット)に結合するが、その結合様式は化合物の構造特性を反映してかなり異なっていることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

① Shiraiishi, Y., Murai, M., Sakiyama, N., Ifuku, K., and Miyoshi, H. (2012) Fenpyroximate Binds to the Interface between PSST and 49 kDa Subunits in Mitochondrial NADH-Ubiquinone Oxidoreductase. *Biochemistry* 51, 1953-1963. (査読有り)

② Casutt, M. S., Nedielkov, R., Wendelspiess,

S., Vossler, S., Gerken, U., Murai, M., Miyoshi, H., Möller, H. M. and Steuber, J. (2011) Localization of ubiquinone-8 in the Na⁺-pumping NADH:quinone oxidoreductase from *Vibrio cholerae*, *J. Biol. Chem.* 286 40075-40082. (査読有り)

③ Nakanishi, S., Abe, M., Yamamoto, S., Murai, M. and Miyoshi, H. (2011) Bis-THF motif of acetogenin binds to the third matrix-side loop of ND1 subunit in mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase, *Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)* 1807, 1170-1176. (査読有り)

④ Murai, M., Mashimo, Y., Hirst, J. and Miyoshi, H. (2011) Exploring interactions between the 49 kDa and ND1 subunits in mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) by photoaffinity labeling, *Biochemistry* 50, 6901-6908. (査読有り)

⑤ Yamamoto, S., Abe, M., Nakanishi, S., Murai, M. and Miyoshi, H. (2011) Synthesis and characterization of photoaffinity probe of acetogenin, a strong inhibitor of mitochondrial complex I, *Tetrahedron Lett.* 52, 3090-3093. (査読有り)

⑥ Yang, Y., Yamashita, T., Nakamaru-Ogiso, E., Hashimoto, T., Murai, M., Igarashi, J., Miyoshi, H., Mori, N., Matsuno-Yagi, A., Yagi, T. and Kosaka, H. (2011) Reaction mechanism of single subunit NADH-ubiquinone oxidoreductase (Ndi1) from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for a ternary complex mechanism, *J. Biol. Chem.* 286, 9287-9297. (査読有り)

【学会発表】(計 14 件)

① 松延広平, 村井正俊, 工藤佐和子, 川向誠, 三芳秀人, 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 Coq10 の解析, 日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 26 日、東北大学

② 土生沙綾子, 村上園実, 村井正俊, 三芳秀人, ミトコンドリア複合体-I 阻害剤としてのアミロライド類縁体の合成と作用機構, 日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 26 日、東北大学

③ 浅野周, 村井正俊, 三芳秀人, ミトコンドリア複合体-I に作用するキナゾリン型阻害剤の結合部位の同定, 日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 26 日、東北大学

④ 村井正俊, 白石悠祐, 崎山直人, 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 2013 年度大会、2013 年 3 月 26 日、東北大学

⑤ 村井正俊, 真下佑子, 三芳秀人, キナゾリン型阻害剤を用いたミトコンドリア NADH-ユビキノン酸化還元酵素(複合体-I)のドメイン間相互作用の解明, 日本農薬学会 第 38 回大会、2013 年 3 月 15 日、筑波大学

⑥ 村井正俊, 白石悠祐, 崎山直人, 三芳秀人, ミトコンドリア複合体-I の阻害剤結合部位の同定, 日本生体エネルギー研究会 第 38 回討論会、2012 年 12 月 23 日、岡山大学

⑦ Masatoshi Murai, Yusuke Shiraishi, Naoto Sakiyama, and Hideto Miyoshi, Characterization of the inhibitor-binding site in mitochondrial NADH-Ubiquinone oxidoreductase (Complex I) using fenpyroximate analogues, 17th European Bioenergetics Conference (EBEC2012), September 17, 2012, Universität Freiburg, Germany.

⑧ 工藤佐和子, 村井正俊, 矢崎一史, 三芳秀人, ユビキノンプローブの創製と出芽酵母におけるユビキノン結合性タンパク質のスクリーニング, 日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 25 日、京都女子大学

⑨ 白石悠祐, 村井正俊, 崎山直人, 三芳秀人, ミトコンドリア複合体-I の阻害剤結合部位の同定 (1) : フェンピロキシメートの結合部位, 日本農薬学会 第 37 回大会 2012 年 3 月 16 日、岡山大学

⑩ 村井正俊, 白石悠祐, 崎山直人, 三芳秀人, ミトコンドリア複合体-I の阻害剤結合部位の同定 (2) : 結合部位の概観, 日本農薬学会 第 37 回大会 2012 年 3 月 16 日、岡山大学

⑪ 白石悠祐, 村井正俊, 崎山直人, 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, 日本生体エネルギー研究会 第 37 回討論会、2011 年 12 月 21 日、京都産業大学

⑫ 村井正俊, 真下佑子, 三芳秀人, キナゾリン型阻害剤を用いたミトコンドリア NADH-ユビキノン酸化還元酵素(複合体-I)のドメイン間相互作用の解明, 日本生体エネルギー研究会 第 37 回討論会、2011 年 12 月 21 日、京都産業大学

⑬ 村井正俊, 真下佑子, 三芳秀人, 光親和

性標識法によるミトコンドリア複合体-I の
ドメイン間相互作用の解明、農薬デザイン研
究会 2011年11月10日、メルパルク京都

⑭ 土生沙綾子、村井正俊、横山実、三芳秀
人、機能性ユビキノンプローブの合成と結合
タンパク質の同定、2011年度日本農芸化学会
関西・中部支部合同大会、2011年10月2日、
京都大学

〔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

無し

(3) 連携研究者

三芳 秀人 (MIYOSHI HIDETO)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：20190829