

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850081

研究課題名(和文) ユビキノンの鍵因子となるミトコンドリア膜タンパク質の分子機構解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of mitochondrial proteins using ubiquinone as a cofactor

研究代表者

村井 正俊 (Murai, Masatoshi)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80543925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキノンの主な役割は呼吸鎖電子伝達系における基質としてはたらくことであるが、ユビキノンを“活性因子”として一定の生理活性を発揮するタンパク質の存在が近年示唆されている。出芽酵母や分裂酵母で見出されたCoq10はそのようなタンパク質の一つであり、コレステロールなどの疎水性分子の細胞内輸送に関与する、いわゆるSTARTドメインスーパーファミリーに属するタンパク質である。Coq10はミトコンドリアにおける円滑な電子伝達に必須であるが、その機能は不明である。応募者は酵母由来のCoq10を実験材料に光親和性標識実験を行い、Coq10がUQを強く結合することを初めて見出した。

研究成果の概要(英文)：Ubiquinone (UQ) is thought to diffuse freely in the inner mitochondrial membrane to facilitate electron transfer between the respiratory complexes. Recent studies have focused on physiological importance of mitochondrial Coq10, which is a member of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid transfer (START) domain superfamily. To get insights into the role of Coq10, we expressed the recombinant *Schizosaccharomyces pombe* Coq10 in *Escherichia coli* membrane, and carried out photoaffinity labeling study using a synthetic UQ probe. Comprehensive biochemical and proteomic analyses revealed that the UQ probe specifically binds to the N-terminus F39-K45 of the Coq10, which corresponds to the ligand-binding pocket in many proteins containing START domain. Our results provide the first exact evidence indicating that Coq10 accommodates UQ in a similar manner with other START domain proteins do.

研究分野：生物有機化学

キーワード：ユビキノン Coq10 光親和性標識 ミトコンドリア 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幅広く分布する生理活性分子であり、その主な役割は呼吸鎖電子伝達系における基質（電子伝達担体）としてはたらくことである。また、近年の研究では、電子伝達には直接関与しないものの、ユビキノンを“補因子”として持つことで機能する「ユビキノン結合性タンパク質」の存在が幾つか示唆されているが、そうした相互作用を明確に実証した例はこれまでに無い。

2. 研究の目的

出芽酵母や分裂酵母で見出された Coq10 は、そのようなユビキノン結合性タンパク質の一つである。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が、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。我々は、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目的とした。

3. 研究の方法

ユビキノンのベンゾキノン骨格と分子末端にそれぞれ、アジド基と末端アルキンを導入したユビキノンプローブ(UQ-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きる（Figure 1）。

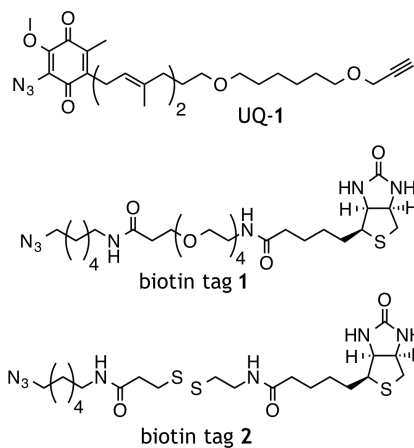


Figure 1. Structures of the UQ analogue and biotin tags used in this study.

4. 研究成果

分裂酵母由来の Coq10 を発現させた大腸菌膜標品を、UQ-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

膜標品の解析をすすめた結果、Coq10 は UQ-1 によるラベル化を受けることが分かった。過剰量の人工キノン存在下で Coq10 のラベル化が強く抑制されることから、特異的かつ高い親和性で結合していると結論付けた。（Figure 2）

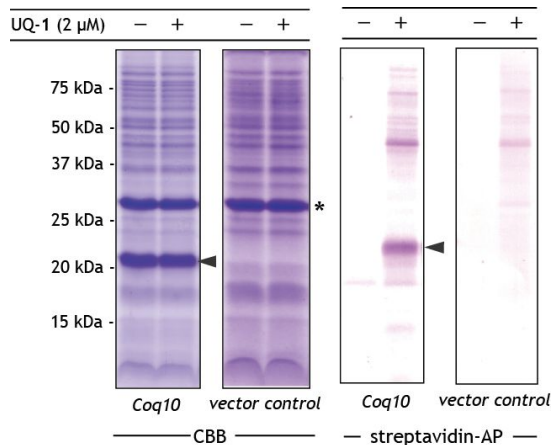


Figure 2. Photoaffinity labeling of *E. coli* membrane preparation expressing *S. pombe* Coq10.

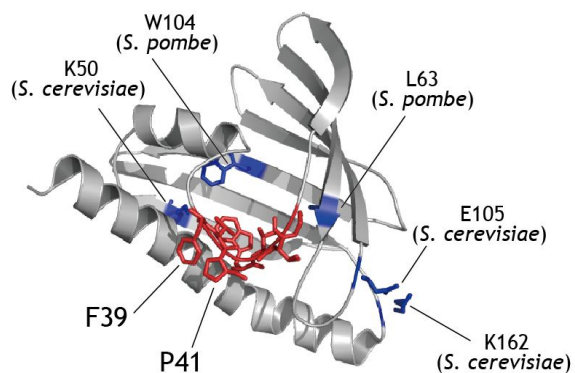


Figure 3. UQ-binding site in Coq10.

続いて、Coq10 におけるユビキノン結合部位を明らかにする目的で、UQ-1 でラベル化された Coq10 のプロテアーゼ限定分解を行った。リジルエンドペプチターゼ、エンドプロテアーゼ Asp-N、エンドプロテアーゼ Arg-C、臭化シアンによる断片化により、ユビキノン結合部位が N 末端側に近い Phe39-Lys45 の領域に存在することが明らかになった。

本領域の保存されたアミノ酸をアラニン置換した Coq10 変異体 (F39A, P41A) を作成し、化合物 1 による光親和性標識実験を行ったところ、野生型 Coq10 と比較して標識量は有意に減少した。この結果は、Coq10 におけるユビキノンの結合部位が、上記の領域 (F39-K45) に存在するという光親和性標識実験の傍証と言える。

Coq10 におけるユビキノン結合部位を、*Caulobacter crescentus* 由来の Coq10 ホモログである CC1736 の立体構造に当てはめたものを Figure 3 に示した。Coq10 はコレステロールなどの疎水性分子の細胞内輸送に関与

する *Steroidogenic acute regulatory protein (STAR)-related lipid transfer (START)* ドメインスーパーファミリーの一員である。STARTタンパク質は2本の α -ヘリックスと β -シートで構成された "Hydrophobic tunnel" と呼ばれる特徴的な立体構造を共通に持つことが知られている。今回明らかにしたユビキノン結合部位は Hydrophobic tunnel の一部 (α -ヘリックス側の空間の一部) を構成し、Coq10 が他の START ドメインタンパク質と同様の仕組みで、ユビキノンを取り込んでいるものと考えられる。

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(複合体-I)における、ユビキノン結合部位結合ポケットの位置特異的な化学修飾を試みた。本研究は、複合体-Iの鍵サブユニットに様々な機能性タグを導入し、複合体-Iの構造変化を解析することを将来的な目標に据えたテーマである。複合体-Iの特異的阻害剤であるアセトゲニンを鋳型としたリガンド(AL)分子を合成し、Ligand-directed tosylate chemistry (トシル化学)を利用して、ウシ心筋複合体-Iの位置特異的に化学修飾することを試みた。その結果、ユビキノン結合ポケットの最深部を構成する 49 kDa サブユニットの 160 番目の Asp160 が、特異的に化学修飾されることが分かった (Figure 4)。

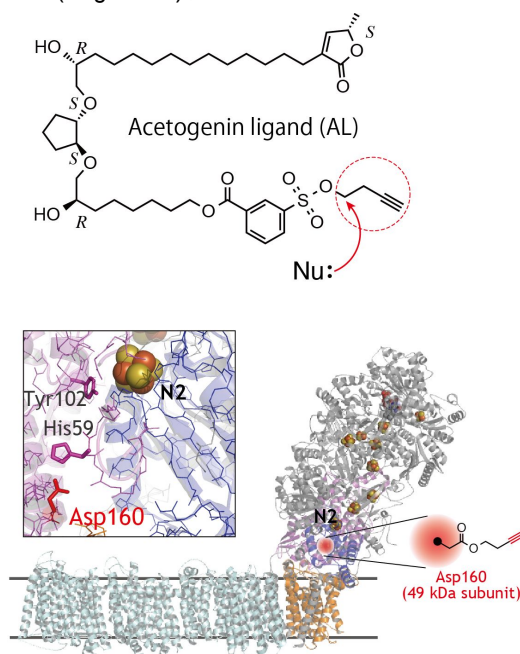


Figure 4. Site specific chemical modification of mitochondrial complex I.

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6件)

1. Murai, M., Murakami, S., Ito, T. and Miyoshi, H. (2015) Amilorides bind to the quinone binding pocket of bovine mitochondrial complex I, *Biochemistry*, in press.
2. Murai, M., Habu, S., Murakami, S., Ito, T. and Miyoshi, H. (2015) Production of new amilorides as potent inhibitors of mitochondrial respiratory complex I, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* in press.
3. Masuya, T., Murai, M., Morisaka, H. and Miyoshi, H. (2014) Pinpoint chemical modification of Asp160 in the 49 kDa subunit of bovine mitochondrial complex I via a combination of ligand-directed tosyl chemistry and click chemistry, *Biochemistry* 53 7816-7823.
4. Murai, M., Miyoshi H (2014) Chemical modifications of respiratory complex I for structural and functional studies, *J. Bioener. Biomembr.* 46 313-321.
5. Murai, M., Matsunobu, K., Kudo, S., Ifuku, K., Kawamukai, M. and Miyoshi, H. (2014) Identification of the Binding Site of the quinone-head group in mitochondrial Coq10 by photoaffinity labeling, *Biochemistry* 53 3995-4003.
6. Masuya, T., Murai, M., Ifuku, K., Morisaka, H. and Miyoshi, H. (2014) Site-specific chemical labeling of mitochondrial respiratory complex I through ligand-directed tosylate chemistry, *Biochemistry* 53 2307-2317.

[学会発表](計16件)

1. 榎谷貴洋、村井正俊、森坂裕信、三芳秀人、ミトコンドリア複合体-Iのピンポイント化学修飾、日本農芸化学会2015年度大会、2015年3月27日、岡山大学、岡山市
2. 伊藤剛、村井正俊、森坂裕信、三芳秀人、アミロライド類縁体のミトコンドリア複合体-Iにおける結合部位の同定、日本農芸化学会2015年度大会、2015年3月27日、岡山大学、岡山市
3. ニノ倉聡、村井正俊、Barquera, B., 三芳秀人、コレラ菌ナトリウム輸送型 NADH-ユビキノン酸化還元酵素(Na^+ -NQR)におけるユビキノン結合部位の同定、日本農芸化学会2015年度大会、2015年3月27日、岡山大学、岡山市
4. 奥田絢香、村井正俊、三芳秀人、出芽酵母ミトコンドリアVDACにおけるユビキノン結合部位の同定、日本農芸化学会2015年度大会、2015年3月27日、岡山大学、岡山市
5. 榎谷貴洋、村井正俊、森坂裕信、三芳秀人、ミトコンドリア複合体-Iのピンポイント

- 化学修飾、日本農薬学会 第 40 回大会、2015 年 3 月 20 日、玉川大学、東京都町田市
6. 村井正俊、村上園実、伊藤剛、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の作用機構研究、日本農薬学会 第 40 回大会、2015 年 3 月 20 日、玉川大学、東京都町田市
 7. 榎谷貴洋、村井正俊、森坂裕信、三芳秀人、ミトコンドリア複合体-I のピンポイント化学修飾、日本生体エネルギー研究会 第 40 回討論会、2014 年 12 月 13 日、愛媛大学、愛媛県松山市
 8. Murai, M., Masuya, T., Morisaka, H., Ifuku, K. and Miyoshi, H., Site-Specific Chemical Modification of Mitochondrial NADH-Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) Through Ligand-Directed Tosylate Chemistry, 18th European Bioenergetics Conference (EBEC2014), July 22, 2014, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal.
 9. 松延広平、村井正俊、川向誠、三芳秀人、ユビキノン結合性タンパク質 Coq10 におけるキノン結合部位の同定、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 29 日、明治大学、川崎市
 10. 榎谷貴洋、村井正俊、三芳秀人、ミトコンドリア NADH-ユビキノン酸化還元酵素(複合体-I) の部位特異的修飾、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 29 日、明治大学、川崎市
 11. 浅野周、村井正俊、三芳秀人、キナゾリンのミトコンドリア ADP/ATP 輸送体における結合部位の同定、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 29 日、明治大学、川崎市
 12. 榎谷貴洋、村井正俊、三芳秀人、ミトコンドリア複合体-I の位置特異的修飾、日本農薬学会 第 39 回大会、2014 年 3 月 14 日、京都大学、京都市
 13. 村上園実、伊藤剛、土生沙綾子、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の解明、日本農薬学会 第 39 回大会 2014 年 3 月 14 日、京都大学、京都市
 14. 村井正俊、松延広平、川向誠、三芳秀人、合成ユビキノンプローブを用いたミトコンドリアタンパク質 Coq10 の解析、日本生体エネルギー研究会 第 39 回討論会、2013 年 12 月 19 日、グランシップ、静岡市
 15. 村井正俊、松延広平、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 年度合同広島大会、2013 年 9 月 6 日、県立広島大学、広島市
 16. Murai, M., Matsunobu, K., Kudo, S.,

Kawamukai, M. and Miyoshi, H. Characterization of the mitochondrial ubiquinone-binding protein Coq10 using a synthetic ubiquinone probe, Gordon Research Conference on Bioenergetics July 26, 2013, Proctor Academy, NH, USA.

〔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

川向 誠 (KAWAMUKAI MAKOTO)
島根大学・大学生物資源科学部・教授
研究者番号：70186138