

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010年度～2011年度

課題番号：22780103

研究課題名（和文） カルジオリピンの合成に基づくシトクロム c—カルジオリピン複合体形成の分子機構解明

研究課題名（英文） Synthesis of Cardiolipin Analogs and Characterization of Their Effects on Induction of the Peroxidase Activity of Cytochrome *c*

研究代表者

安部 真人 (ABE MASATO)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：30543425

研究成果の概要（和文）：カルジオリピン（CL）はミトコンドリア内膜に局在するリン脂質であり、シトクロム *c* (cyt *c*) との複合体形成によりアポトーシス初動過程に関与すると考えられている。本研究では、cyt *c*-CL 複合体の形成に由来するペルオキシダーゼ活性に着目し、CL 類縁体の系統的な化学合成を行い、それらの比較検討を行った。その結果、①従来重要とされてきた脂肪酸部の不飽和結合は必須ではない、②ペルオキシダーゼ誘導は CL の cyt *c* に対する親和性で決まる、ということを示した。

研究成果の概要（英文）：Cardiolipin (CL) is a major phospholipid found in mammalian mitochondria with a multitude of biological functions. Activation of the peroxidase activity of cytochrome *c* (cyt *c*) by CL and hydrogen peroxide in mitochondria has been suggested to be a key event in early apoptosis stage. We have developed the concise procedure for the synthesis of CL. With numerous CLs in hand, we examined the structural factors of CL required for the formation and the induction of peroxidase activity of cyt *c*-CL complex in liposomal system. The activation efficiencies of CLs are well correlated with the binding affinities to cyt *c*. Our results revealed that at low CL content, the saturated acyl chain of CL is favorable for the activation of peroxidase activity of CL-bound cyt *c* and the proposed critical role of double bond in the acyl chains is not a general feature of the cyt *c*-CL interaction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物生産化学・生物有機化学

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：カルジオリピン、シトクロム *c*、アポトーシス、ペルオキシダーゼ、ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物では、さまざまな原因で修復

不能となったり、必要なくなった細胞が絶妙にプログラムされた細胞死（アポトーシス）によって除去される。一般にアポトーシスは、内部経路（ミトコンドリア経路）と外部経路（細胞死受容体経路）の二つに大きく分けられる。前者では、DNA 損傷が遺伝子調節タンパク p53などを介してミトコンドリアへシグナル伝達され、呼吸鎖酵素からの活性酸素の発生を誘導する。ここで生じた酸化ストレスが引き金となってシトクロム c（以後 cyt c）がミトコンドリアから細胞質側に流出し、その後、流出した cyt cによって一連のカパーゼ反応が活性化されることによりアポトーシスが進行することがわかっている。

酸化ストレスによる cyt cの流出においては CL と cyt cの複合体の形成、および複合体形成後のペルオキシダーゼ活性の誘導が鍵反応であると考えられている。これまでの研究では、使われてきた CL 類が市販物に限られていた。このために、CL 類の化学構造のバリエーションが極めて乏しいことが、克服すべき課題となっていた。

2. 研究の目的

アポトーシスの初動反応では、ミトコンドリアに局在するシトクロム c (cyt c) とカルジオリピン (CL) との特異的な複合体形成が鍵反応になって、cyt c にペルオキシダーゼ活性が誘導されると考えられているが、それらの分子機構は不明である。本研究では、1) 構造系統的な幅広い CL 類縁体を有機合成し、CL-cyt c 複合体の形成、および cyt c のペルオキシダーゼ活性の誘導に要求される CL 分子の化学構造因子を明らかにし、その知見に基づいて、2) cyt c のペルオキシダーゼ活性を自在に制御することが可能な低分子化合物の開発に結びつく基礎的知見を収集することを目的とする。

3. 研究の方法

CL-cyt c 複合体の形成および cyt c のペルオキシダーゼ活性の誘導を支配する CL の化学構造因子を明らかにするために、構造系統的にデザインした CL ライブラリを合成構築する。合成化合物について、cyt c に構造変化（アンフォールディング）を誘導する効果と、cyt c のペルオキシダーゼ活性を誘導する効果をそれぞれ評価し、両効果を支配する CL の化学構造因子を独立に明らかにする。

4. 研究成果

CL ライブラリは脂肪酸部と極性頭部のそれぞれについて改変した一連の類縁体 10 種類を合成した。これらを用いたりポソームによる CL-cyt c 複合体形成によるペルオキシダーゼ活性の誘導効果を比較した。驚くべきことに、全ての脂肪酸がステアリン酸で構成

された CL に最も高いペルオキシダーゼ誘導が観察された。それ以外の類縁体はほぼ同程度のペルオキシダーゼ誘導が見られたことから、脂肪酸部および極性頭部には cyt c による厳密な構造認識が行われていないことが示唆された。これらのペルオキシダーゼ誘導は、反応液の塩濃度を上昇させることで失われたことから、CL-cyt c 複合体形成には、極性頭部の負電荷の効果が大きいことが明らかになった。さらに、リポソーム共沈の形成により cyt c との親和性を評価したところ、ペルオキシダーゼ誘導の効果との間に良い相関が見られた。このことから、cyt c のペルオキシダーゼ誘導は CL との親和性によって決定されていることが明らかになった。

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 4 件）

①Abe, M., Niibayashi, R., Koubori, S., Moriyama, I., and Miyoshi, H. Molecular mechanisms for induction of peroxidase activity of cytochrome c-cardiolipin complex, *Biochemistry*, 2011, 50, 8383-8391.

DOI: dx.doi.org/10.1021/bi2010202

査読有

②Nakanishi, S., Abe, M., Yamamoto, S., Murai, M., and Miyoshi, H. Bis-THF motif of acetogenin binds to the third matrix-side loop of ND1 subunit in mitochondrial NADH-ubiquinone Oxidoreductase, *Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)*, 2011, 1807, 1170-1176.

DOI:

dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.05.012

査読有

③Yamamoto, S., Abe, M., Nakanishi, S., Murai, M., and Miyoshi, H. Synthesis and characterization of photoaffinity probe of acetogenin, a strong inhibitor of mitochondrial complex I, *Tetrahedron Lett.* 2011, 52, 3090-3093.

DOI: 10.1016/j.tetlet.2011.03.149.

査読有

④Abe, M., Kitsuda, S., Ohyama, S., Koubori, S., Murai, M., and Miyoshi, H. Concise procedure for the synthesis of cardiolipins having different fatty acid combinations, *Tetrahedron Lett.* 2010, 51, 2071-2073.

〔学会発表〕(計 16 件)

- ① 新林良太、安部真人、三芳秀人 シトクロム c-カルジオリピン複合体のペルオキシダーゼ活性発現の分子機構, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 2012 年 3 月 25 日, 京都女子大学
- ② 中西佐予、安部真人、村井正俊、三芳秀人 ミトコンドリア複合体-I におけるアセトゲニン結合部位の同定, 2012 年 3 月 24 日, 京都女子大学
- ③ 安部真人、中西佐予、山本修平、三芳秀人 光反応性アセトゲニンの合成と作用機構研究, 日本農薬学会第 37 回大会, 2012 年 3 月 16 日, 岡山大学
- ④ 新林良太、安部真人、三芳秀人 シトクロム c-カルジオリピン複合体のペルオキシダーゼ活性発現の分子機構, 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
- ⑤ 安部真人、新林良太、幸掘伸哉、森山郁子、三芳秀人 Molecular Mechanisms for Induction of Peroxidase Activity of Cytochrome c-Cardiolipin Complex, 第 84 回日本生化学会, 2011 年 9 月 22 日, 京都国際会館
- ⑥ 中西一成、安部真人、新藤充 強いアレロパシー活性を示すシス桂皮酸の構造活性相関研究, 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月 29 日, 静岡県立大学 (大会中止、要旨集にて発表)
- ⑦ 新林良太、幸掘伸哉、森山郁子、安部真人、村井正俊、三芳秀人 カルジオリピン類の合成によるシトクロム c との分子間相互作用の解析, 日本農芸化学会 2011 年度大会, 2011 年 3 月 27 日, 京都女子大学 (大会中止、要旨集にて発表)
- ⑧ 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 (大会中止、要旨集にて発表)
- ⑨ 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 (大

会中止、要旨集にて発表)

- ⑩ 中西佐予、安部真人、山本修平、村井正俊、三芳秀人 ミトコンドリア複合体-I におけるアセトゲニンの結合部位の同定, 日本農芸化学会 2011 年度大会, 2011 年 3 月 27 日, 京都女子大学 (大会中止、要旨集にて発表)
 - ⑪ 安部真人、中西佐予、山本修平、村井正俊、三芳秀人 光反応性アセトゲニンの合成と作用機構研究, 日本農芸化学会第 36 回大会, 2011 年 3 月 18 日, 玉川大学 (大会中止、要旨集にて発表)
 - ⑫ 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), 日本農芸化学会第 36 回大会, 2011 年 3 月 18 日, 玉川大学 (大会中止、要旨集にて発表)
 - ⑬ 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), 日本農芸化学会第 36 回大会, 2011/3/18, 玉川大学 (大会中止、要旨集にて発表)
 - ⑭ 安部真人、新林良太、幸掘伸哉、三芳秀人 カルジオリピンの合成に基づくシトクロム c-カルジオリピン複合体形成の分子機構解明, 日本生体エネルギー研究会, 2010 年 11 月 19 日, 大阪大学
 - ⑮ 中西佐予、山本修平、安部真人、村井正俊、三芳秀人 光反応性アセトゲニンの合成と作用機構研究, 日本農芸化学会関西支部会, 2010 年 10 月 3 日, 近畿大学農学部
 - ⑯ 真壁秀文、服部恭尚、大麻真由、嶋本康広、今野博行、安部真人、三芳秀人 モノテトラヒドロフラン型バンレイシ科アセトゲニンの系統的な合成とテトラヒドロピラン環を有するアセトゲニンの合成研究, 2010 年 9 月 25 日, 静岡県コンベンションアーツセンター
- 〔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
安部 真人 (ABE MASATO)
京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：30543425

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
該当なし