

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292060

研究課題名(和文)呼吸鎖複合体-Iの1分子計測を実現する特異的化学修飾法の確立

研究課題名(英文)Site-specific modification of respiratory complex I for single molecule analysis

研究代表者

三芳 秀人(Miyoshi, Hideto)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20190829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：呼吸鎖NADH-キノン酸化還元酵素(以後、複合体-I)のX線結晶構造に基づいて、ピストン運動モデルが2013年に提案された。この酵素の動きを1分子計測によって検証することを見据え、動きを検出するプローブ分子を、複合体-Iに対して位置特異的に化学修飾することにより、1分子計測を可能にする技術的基盤を開拓することを目指した。トシル化学法によって、ウシ心筋ミトコンドリア複合体-Iのキノン結合ポケットを構成する49 kDaサブユニットのAsp160を特異的にアジド化する方法論を確立した。さらに、このアジド基を足場として、いろいろな2次タグをクリックケミストリーで導入できることを示した。

研究成果の概要(英文)：The so-called "Piston Movement Model" has been proposed in 2013, which assumes that the membrane domain of respiratory complex I (NADH-quinone oxidoreductase) undergoes large structural changes to pump protons across membrane. To verify this model by single-molecule analyses using functional molecular probes that can detect rotation or flick, we aimed to establish the methodology that enables the specific chemical modify of the enzyme. I succeeded in the specific modification (azidation) of Asp160 in 49 kDa subunit (Asp160-(CH₂)₃-N₃), which is located in the quinone binding pocket of complex I, via ligand-directed tosyl (LDT) chemistry. I demonstrated that this azido group is able to serve as a "footing" for subsequent diverse chemical modifications via the so-called click chemistry.

研究分野：生物有機化学

キーワード：生物制御化学 呼吸鎖複合体-I 化学修飾 ユビキノン

1. 研究開始当初の背景

複合体-I はミトコンドリアやバクテリアの呼吸鎖系の初発酵素で、ATP 合成の駆動力となるプロトン輸送を担う重要な酵素である。ヒトでは、複合体-I の機能障害による ATP 合成量の低下や、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わかってきた。また医農薬分野では、抗寄生虫薬や殺虫・殺ダニ剤の有望な標的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、複合体-I は非常に複雑で大きな膜酵素であるために（例えば、ヒトのミトコンドリア複合体-I は 45 個の異なるサブユニットから構成される）、呼吸鎖酵素の中で最も研究の進展が遅れている。

2013 年に Sazanov らによって、好熱細菌 *Thermus thermophilus* の酸化型複合体-I (サブユニット数 16 個) の全体構造が分解能 3.3 Å で初めて解かれ、特徴的な L 字型構造をとっていることがわかった。本酵素は親水性ドメインと膜ドメインから構成され、前者には NADH から電子を受容する 1 個のフラビン (FMN) と 9 個の Fe-S 錯体が直鎖状に配列し、キノン (Q) に電子を与える。膜ドメインはプロトン輸送を担うが、cofactor は存在しない。

特筆すべき点として、Nqo12 サブユニットの C 末端部の非常に長い HL ヘリックスが、Nqo12~14 サブユニットを束ねるように膜を横切って配置していることがわかった。この構造的特徴、および Nqo12~14 が Na⁺/H⁺ アンチポーターのホモログである事実と合わせ、Sazanov らはプロトン輸送機構としてピストン運動モデルを提案した。すなわち、『親水性ドメインで起こる酸化還元反応によって、両ドメインの境界領域に構造変化が誘起され、これが駆動力となって、HL ヘリックスによって束ねられた 3 個の膜サブユニット (Nqo12~14) が運動して構造変化することにより 3 個のプロトンが輸送される。』という極めてユニークなモデルである。しかし、これを支持する直接的な証拠は今のところ何も得られていない。

膜輸送体の作動機構は一般に開閉機構と回転機構に大別されてきたが、ピストン運動モデルが事実とすれば、従来の範疇に収まらない極めてユニークな作動原理である。ピストン運動を検証するために、F₀F₁-ATPase などの分子モーター研究で威力を発揮してきた種々の 1 分子計測法は強力な手法になると期待できるが、世界的に見ても未だ誰も着手できていない。そこで、機能性プローブ分子を創製・活用する有機化学的アプローチによって、複合体-I の動きを直接捉える 1 分子計測の実現に向けた技術的基盤を開拓することの意義は極めて大きい。

2. 研究の目的

代表者は複合体-I が本当にピストン運動

しているのかどうかを、1 分子計測で直視して検証することを将来的な目標に見据え、1 分子計測の実現にとって鍵となる回転やゆらぎを検出する機能性プローブ分子を独自に合成し、クリックケミストリーによって複合体-I に対して位置特異的に導入することを計画した。

そのために、まず機能性プローブ分子を固定する“足場 (1 次タグ)”を酵素内に位置特異的に作り出す必要がある。そこで、複合体-I の強力な阻害剤であるアセトゲニンやアミロライドをリガンド分子として利用し、ligand-directed tosyl chemistry (トシル化学法) によって 1 次タグを位置特異的に導入することを目的とした。さらに、導入した 1 次タグに対して、機能性プローブ分子 (2 次タグ) をクリックケミストリーによって導入するための条件検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 化合物の合成

複合体-I の阻害剤であるアセトゲニンおよびアミロライドを鋳型として、トシル化学に用いるリガンド分子 AL2、AL6 および AAT をそれぞれ合成した (図 1)。2 次タグとして、TAMRA-DIBO および BODIPY-tetrazine を用いた (図 1)。

(2) トシル化学法および 1 次タグが結合した複合体-I 中のアミノ酸残基の同定方法について箇条書きする。

ウシ心臓の筋肉組織から調製した亜ミトコンドリア粒子 (SMP) をリガンド分子と 35 分で 1 日インキュベーションし、トシル化学を完結させた。複合体-I に置換したアジド基の位置を同定するために、SMP を可溶化した後、click chemistry で蛍光 TAMRA-DIBO を結合させた。

複合体-I を SDS-PAGE に供して TAMRA-DIBO で標識されたサブユニットを分離し、これをゲルから電気的に溶出させた。溶出したサンプルを濃縮し、種々のプロテアーゼによる限定消化を行なった。切断箇所が予想される全てのペプチド断片の分子量を予測した。

ペプチダーゼ処理したサンプルを tricine SDS-PAGE で電気泳動した後、ゲルの蛍光から消化されたペプチド断片のおおまかな分子量を調べた。実際に得られたペプチド断片と予想される消化パターンとの比較から、ペプチド断片の N 末シーケンスを決定した。幾つかの断片について、エドマン分解により N 末シーケンスを実施した。また、幾つかのペプチド断片について精密質量分析 (MALDI TOF-MS、LC-MS) を行い、TAMRA-DIBO が結合しているアミノ酸残基の同定を行った。

(2) トシル化学後に 2 次タグを導入する方法について箇条書きする。

トシル化学を完結させた SMP 懸濁液に残る未反応のリガンド分子を BSA に吸着させた後、

超遠心で SMP を回収した。

この SMP と TAMRA-DIBO を 35 で 1 日インキュベーションし、strain-promoted クリックケミストリーを完結した。同様に、SMP と BODIPY-tetrazine をインキュベーションして Diels-Alder 環化付加を完結した。

SMP から BN-PAGE で精製した複合体-I を SDS-PAGE に供し、2 次タグと反応したサブユニットを同定した。

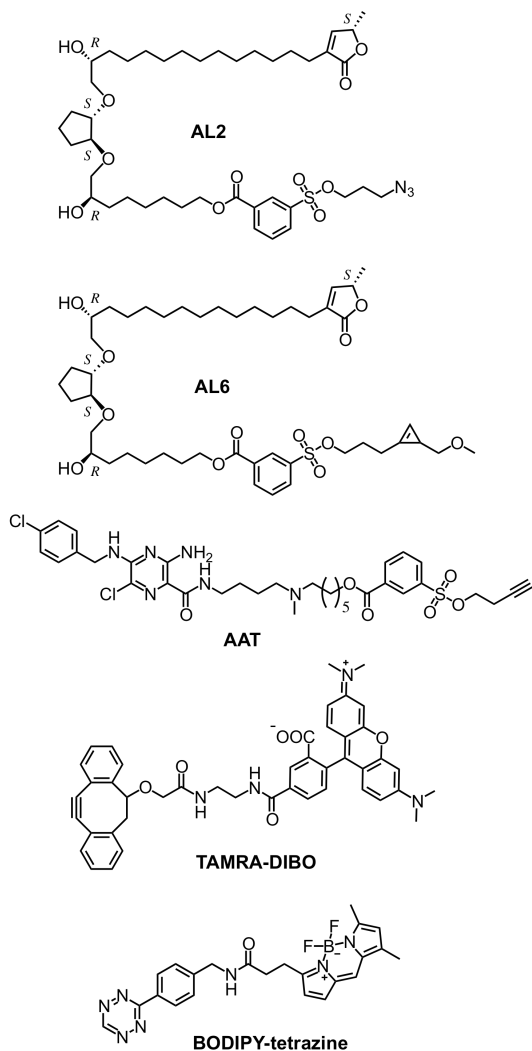


図 1 . 本研究に用いた化合物の構造を示す。

4 . 研究成果

ウシ心筋 SMP と AL2 とのトシル化学によって、複合体-I のみを特異的にアジド化できることがわかった。一連のペプチド化学分析によって、アジド化された部位はキノン結合ポケットを構成する 49 kDa サブユニットの Asp160 (49 kD Asp160) であることを明らかにした。アジド化の反応収率は約 30%であった (図 2)。

キノン結合ポケット内に固定したこのアジド基 (Asp160-(CH₂)₃-N₃) を足場として、2 次タグをクリックケミストリー ([3+2] 環化付加反応) によって導入する方法を検討した。

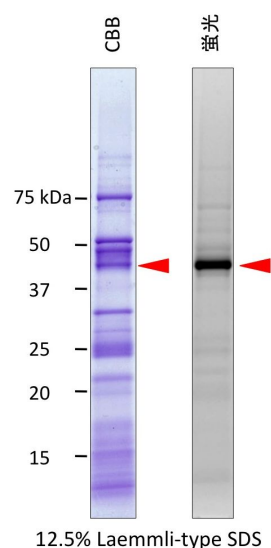


図 2 . AL2 を用いてトシル化学を行った後、SMP から複合体-I を精製し、これを可溶化してクリックケミストリーによって TAMRA-DIBO を結合させた。49 kDa サブユニット (三角印) のみに蛍光が認められた。左レーン、複合体-I の各サブユニットを CBB 染色したもの。

複合体-I を SMP から可溶化することなくインタクトな状態で反応させるため、strain-promoted クリックケミストリーを利用することとした。Asp160-(CH₂)₃-N₃ と環歪みを持つ蛍光分子 TAMRA-DIBO との反応性を調べた結果、両者は SMP 中で直接的に反応することがわかった。TAMRA-DIBO の構造を考慮すると、分子中のシクロオクチンと Asp160-(CH₂)₃-N₃ が直接的に接触するためには、TAMRA-DIBO 分子全体がキノン結合ポケット内に進入しなければならない。しかし、TAMRA-DIBO は結晶構造 (Baradaran et al. *Nature* 2013、図 3 参照) から予想されるキノン結合ポケットの直径よりもかなり高い分子であり、ポケット内への進入は不可能であるはずである。本結果は、実際のキノン結合ポケットは、結晶構造で示されたよりも大きく開かれた構造を取っていることを強く示唆している。

SMP を実験材料に用いた Asp160-(CH₂)₃-N₃ と TAMRA-DIBO との strain-promoted クリックケミストリーでは、その反応収率が低いことに加え (おそらく数%レベル) TAMRA-DIBO と他のミトコンドリアタンパク質の求核性アミノ酸残基が反応するという深刻な副反応が避けられなかった。これは、大きな環歪みを持つ TAMRA-DIBO の反応性が高いためと考えられた。そこで、アジド基に代わってシクロプロペンユニット、TAMRA-DIBO に代わってテトラジンを部分構造として持つ BODIPY-tetrazine を用いて Diels-Alder 環化付加反応を試みることとした。このために、トシル化学プローブとして、AL2 に代わって

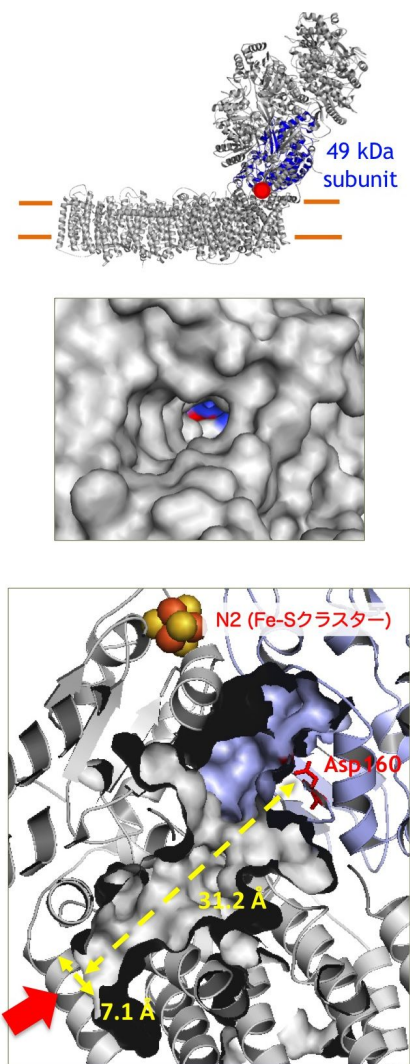


図3 .[上段] *T. thermophilus* 複合体-I の結晶構造。赤丸はキノン結合ポケットの入口の位置を示す。49 kDa サブユニットを青色で示す。[中段] キノン結合ポケットの入口からポケット内を見た図を示す。49 kDa Asp160 を赤色で示す。[下段] キノン結合ポケットの断面図を示す。49 kDa Asp160 (赤) はポケットの最深部に位置する。

シクロプロペンを持つ AL6 を合成した(図1)。

AL6 を用いたトシル化学によって、SMP 中のインタクトな複合体-I の 49 kDa Asp160 にシクロプロペンユニットを固定した後 (Asp160-(CH₂)₃-cyclopropene)、BODIPY-tetrazine を作用させたとこ、Diels-Alder 環化付加によって両者が直接的に反応することを確認した。この時の反応収率は、Asp160-(CH₂)₃-N₃ と TAMRA-DIBO の反応を上回り、他のタンパク質との副反応は無視できるほど軽微なものであった。この結果から、AL6 を用いたトシル化学と、それに続くテトラジン構造を持つ 2 次タグとの Diels-Alder 環化付加を連用する 2 ステップ反応で、いろいろ

な 2 次タグを導入することができる可能性が示された。

上述の通り、49 kDa Asp160 に 1 次タグを導入するためにトシル化学法を採用してきたが、同法に用いるプローブ分子のバリエーションを検討するため、アセトゲニンに代わってアミロライドを鋳型にしたリガンド分子 AAT を合成した(図1)。AAT を用いて SMP に対してトシル化学を行った結果、AAT を用いた場合でも、49 kDa Asp160 がピンポイントで化学修飾(アルキル化)されることがわかった。この結果から、リガンド分子の構造に関わらず、49 kDa Asp160 は強い求核性を発揮することが明らかになった。溶液中(水中)におけるカルボキシ基の求核性はそもそも極めて低いことを考慮すると、49 kDa Asp160 の強い求核性には、キノン結合ポケット内の何らかの局所的な環境要因が働いていることが強く示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

Murai, M., Inaoka, H., Masuya, T., Aburaya, S., Aoki, W., and Miyoshi, H. (2016) Specific methylation of Asp160 (49 kDa subunit) located inside the quinone binding cavity of bovine mitochondrial complex I, *Biochemistry* 55, 3189-3197. (査読有) DOI: 10.1201/acs.biochem.6b00190

Okuda, K., Murai, M., Aburaya, S., Aoki, W., and Miyoshi, H. (2016) Reduction of synthetic ubiquinone QT catalyzed by bovine mitochondrial complex I is decoupled with proton translocation, *Biochemistry* 55, 470-481. (査読有) DOI: 10.1201/acs.biochem.5b01090

Murai, M., Murakami, S., Ito, T., and Miyoshi, H. (2015) Amilorides bind to the quinone binding pocket of bovine mitochondrial complex I, *Biochemistry* 54, 2739-2746. (査読有) DOI: 10.1201/acs.biochem.5b00187

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.* 79, 1061-1066. (査読有) DOI: 10.11080/09168451.2015.1010479

Ito, T., Murai, M., Morisaka, H., and Miyoshi, H. (2015) Identification of the binding position of amilorides in the quinone binding pocket of mitochondrial complex I, *Biochemistry* 54, 3677-3686. (査読有) DOI: 10.1201/acs.biochem.5b00385

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. (査読有) DOI: 10.1201/bi500205x

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(査読有)DOI: 10.1201/bi501342w

〔学会発表〕(計8件)

日本農芸化学会・平成 27 年度大会、平成 27 年 3 月 26 日(岡山大学) 平野桂太郎、安部真人、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・平成 27 年度大会、平成 27 年 3 月 26 日(岡山大学) 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・平成 27 年度大会、平成 27 年 3 月 26 日(岡山大学) 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・平成 28 年度大会、平成 28 年 3 月 28 日(札幌コンベンションセンター) 稲岡宏幸、村井正俊、榎谷貴洋、油屋駿介、青木航、三芳秀人：トシル化学によるミトコンドリア複合体-I のユビキノ結合部位の特異的メチル化

日本農芸化学会・平成 28 年度大会、平成 28 年 3 月 28 日(札幌コンベンションセンター) 奥田健司、村井正俊、油屋駿介、青木航、三芳秀人：ミトコンドリア複合体-I による合成ユビキノ QT の還元はプロトン輸送と共役しない

日本農薬学会・平成 28 年度大会、平成 28 年 3 月 19 日(島根大学) 榎谷貴洋、奥田健司、村井正俊、三芳秀人：ミトコンドリア複合体-I による合成ユビキノ QT の還元はプロトン輸送と共役しない

日本農薬学会・平成 28 年度大会、平成 28 年 3 月 19 日(島根大学) 伊藤剛、村井正俊、村上園美、森坂裕信、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・平成 29 年度大会、平成 29 年 3 月 7 日(愛媛大学) 榎谷貴洋、稲岡宏幸、村井正俊、三芳秀人：トシル化学によるミトコンドリア複合体-I のユビキノ結合部位の特異的メチル化

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔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

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

(3)連携研究者

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

古池 晶(FURUIKE Shou)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：60392875

藤原敬宏(FUJIWARA Takahiro)
京都大学・物質細胞統合システム拠点・講師
研究者番号：80423060