

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07005

研究課題名(和文) 阻害剤作用機構研究を基盤とした呼吸鎖酵素NDH-2の反応機構の解析

研究課題名(英文) Study on the reaction mechanism of type II NADH dehydrogenase by structural and biochemical analyses of the enzyme-inhibitor interaction.

研究代表者

山下 哲生 (Yamashita, Tetsuo)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：80444727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Type II NADH脱水素酵素(NDH-2)はマラリアや結核菌などの病原体に対する新規治療薬の標的分子として注目されている。選択性の高い著効性阻害剤を開発するためには、NDH-2の反応機構とその構造的基盤を理解した上で、タンパク質と阻害剤の相互作用を分子レベルで調べる必要があり、基質であるNADHおよびユビキノンの結合部位を同定する必要がある。酵母NDH-2(Ndi1)はユビキノンの共結晶構造が既に得られているが、生理的な結合部位は同定されていなかった。本研究では酵母Ndi1を研究材料とし、阻害剤を用いた構造生物学的解析および生化学的解析によってユビキノンの生理的な結合部位を決定した。

研究成果の概要(英文)：Type II NADH dehydrogenase (NDH-2) has emerged as a potential therapeutic target for drugs targeting human pathogenic bacteria and parasites, because mammals have only proton-pumping NADH dehydrogenase (complex I) but not NDH-2. In order to develop highly selective effectiveness inhibitors, it is necessary to understand the reaction mechanism of NDH-2 and its structural basis and investigate the interaction between protein and inhibitor at the level of a molecule. Furthermore, the binding sites of the substrates, NADH and ubiquinone, have to be identified. A crystal structure of yeast NDH-2 (Ndi1) in complex with ubiquinone has already been revealed, but there has been controversy regarding the physiological ubiquinone binding site. In the present study, the inherent ubiquinone-binding site of yeast Ndi1 was identified by structures binding novel competitive- and mixed-type inhibitors, and biochemical analysis.

研究分野：生化学

キーワード：NADH dehydrogenase ユビキノン結合部位 X線結晶構造解析 共結晶 阻害剤

1. 研究開始当初の背景

NADH 酸化系呼吸鎖で機能する初発酵素 NADH-ユビキノン酸化還元酵素には、呼吸鎖複合体 I と NDH-2 の 2 種類が存在する。両酵素はともに NADH からユビキノンへの電子伝達を触媒しているが、サブユニット構成、補欠分子族、プロトンポンプの有無といった構造および機能に大きな差異がある。

NDH-2 は植物、原虫、細菌など多くの生物種に存在しているが、その中には年間 2 億人以上が罹患し死亡者数が 200 万人を超えるマラリア原虫 (WHO: *World Malaria Report 2011*) や、結核菌などが含まれる (*Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2004, 68, 603-616)。NDH-2 はプロトンポンプの機能がないためエネルギー産生に直接関与しないが、細胞内 NADH の再酸化に重要であり NDH-2 を欠損したマラリア原虫や結核菌は増殖抑制や致死性を示す (*J. Biol. Chem.*, 2011, 286, 32661-32671、*Microbiol.*, 2002, 148, 2975-2986)。一方、これら病原体の宿主となる哺乳類には NDH-2 が存在しないことから、NDH-2 に対する特異的阻害剤はマラリア原虫や結核菌に対する選択性が高い新規治療薬になると考えられる (*Infect. Disord. Drug Targets*, 2007, 7, 169-181)。現在、NDH-2 を分子標的とした阻害剤の探索が精力的に行われており、オーラシン誘導体がマラリア原虫を含む多くの生物種の NDH-2 を低濃度で阻害すると報告されている (*J. Med. Chem.*, 2012, 55, 1831-1843、業績 8)。しかし、オーラシン誘導体は哺乳類に存在する呼吸鎖複合体 III の強力な阻害剤でもあるため ($IC_{50} = 43 \text{ nM}$)、NDH-2 に対する選択性の高い阻害剤の開発が望まれる。

2. 研究の目的

選択性の高い著効性阻害剤を開発するためには、NDH-2 の反応機構とその構造的基盤を理解した上で、タンパク質と阻害剤の相互作用を分子レベルで調べる必要がある。現在、立体構造解析や阻害剤相互作用の解析を主流とした NDH-2 の反応機構の解明が試みられているが、基質であるユビキノンの生理的な結合部位を含めて反応機構の詳細は明らかになっていない。本研究では、NDH-2 のユビキノン結合に対する阻害剤を用いた構造生物学的および生化学的解析により正確なユビキノン結合部位を同定し、補欠分子族 FAD からの電子伝達経路を明らかにすることで NDH-2 におけるユビキノン還元反応の分子機構と構造的基盤を理解することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では結晶構造が既に明らかとなっている出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の NDH-2 (Ndi1) を研究対象としてユビキノン還元部位を標的とした阻害剤のライブラ

リーから NDH-2 に対して強い阻害活性をもつ化合物を探索しユビキノンに対する阻害様式を決定する。得られた阻害剤と NDH-2 との共結晶を作製し、結晶構造解析によってタンパク質と阻害剤との相互作用を分子レベルで明らかにする。この際、構造中における阻害剤の結合位置とユビキノンに対する阻害様式から競合的にユビキノンの結合を阻害する部位を予想し、部位指定変異体を用いた反応速度論的解析によってユビキノンに対する親和性に影響を与えるかを調べる。

4. 研究成果

東京大学 (現・長崎大学熱帯医学研究所) の北潔教授が保有している呼吸鎖酵素のキノンに対する阻害剤ライブラリー (約 300 種) を用いて、酵母 Ndi1 の NADH-UQ₁ 酸化還元活性を低濃度 ($IC_{50} > 1 \text{ } \mu\text{M}$) で阻害する化合物の探索を行い、見出された化合物のユビキノンに対する阻害様式を反応速度論的解析によって決定した。その結果、NDH-2 の初めての競合阻害剤としてスティグマテルイン ($IC_{50} = 107 \text{ nM}$) が得られた。また、混合型阻害剤として、オーラシン誘導体である ACO-12 ($IC_{50} = 115 \text{ nM}$) に加え、炭素骨格が既知の NDH-2 阻害剤と大きく異なるミキソチアゾール ($IC_{50} = 308 \text{ nM}$) が得られた (図 1)。

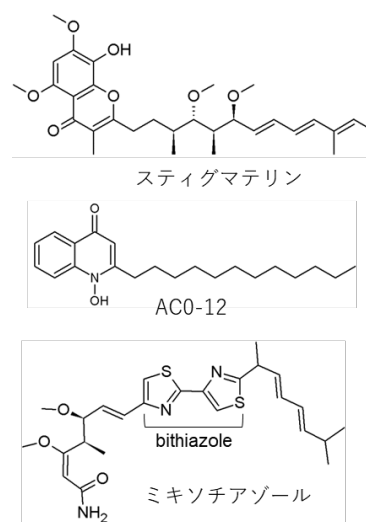
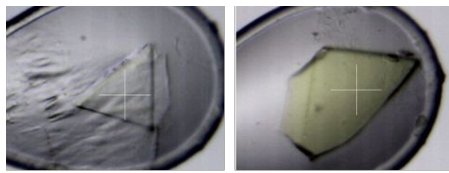


図1 Ndi1阻害剤の構造

蒸気拡散法によりこれら 3 種類の化合物と Ndi1 の共結晶が得られた (図 2)。得られた共結晶は大型放射光施設 SPring-8 および Photon Factory において X 線の回折データ測定を行い Ndi1-スティグマテルイン、Ndi1-ACO-12、Ndi1-ミキソチアゾールの構造をそれぞれ $1.85 \text{ } \text{Å}$ 、 $3.4 \text{ } \text{Å}$ 、 $3.2 \text{ } \text{Å}$ の分解能で決定した。



Ndi1-スティグマテリン Ndi1-ACO-12

図2 Ndi1と阻害剤の共結晶

競合阻害剤であるスティグマテリンは Ndi1 の異なる2つの部位への結合が認められた (図 3A, B: STG-1 および STG-2)。STG-1 はタンパク質中心に位置する補欠分子族 FAD のイソアロキサジン環近傍へ続く α -ヘリックス 15 および β -シート 19-21 によって形成される空間に位置している。STG-1 の電子密度はさらにスティグマテリンの2つの結合様式を示した (STG-1a および STG-1b)。混合型阻害剤であるミキソチアゾールおよび ACO-12 も同じ空間に結合が認められた (図 3C)。いずれの化合物も芳香族環が FAD のイソアロキサジン環近傍に位置している。一方、STG-2 は AD から 20 Å 以上離れた Ndi1 のタンパク質表面に結合する。

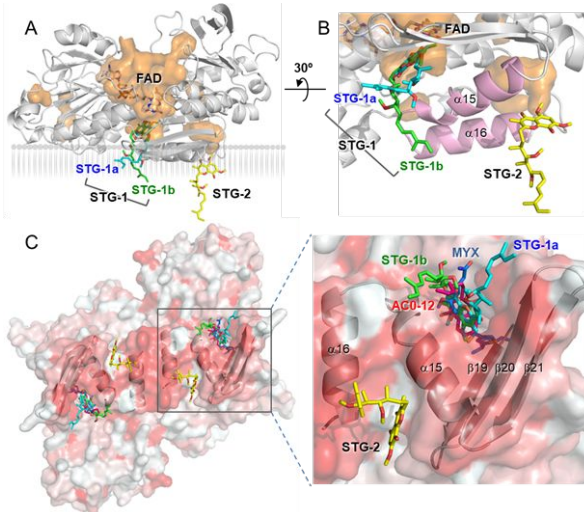


図3 Ndi1と阻害剤の共結晶構造における阻害剤結合部位

STG-2 の結合部位は混合型阻害剤の結合部位と大きく異なっており、すでに明らかとなっている Ndi1-ユビキノン共結晶におけるユビキノン結合部位とは大きく異なっている (図 4A)。加えて STG-2 が結合する α -ヘリックス 15 と 16 によって形成される蛋白質表面の谷間には、精製や結晶化の際に使用する化合物 Triton X-100 や hexaethylene glycol などが結合する (図 4B)。そのため、STG-2

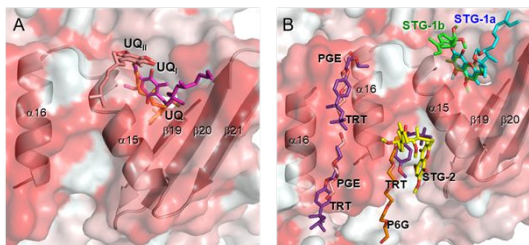


図4 Ndi1におけるユビキノン結合部位とのスティグマテリン結合部位

の芳香族環と水素結合を形成するアミノ酸残基 R479 に変異を導入し、ユビキノンに対する親和性を反応速度論的に解析した。その結果、変異を導入した Ndi1 の最大活性は大きく低下したが、ユビキノンに対する親和性に影響は見られなかった。これらの結果は、STG-2 はスティグマテリンの競合的阻害のための構造的基盤になっていないことを示唆する。(最大活性の低下は正電荷を有する R479 が膜との相互作用に重要であるため、変異の導入が Ndi1 の構造安定性に大きく影響を及ぼしたためと推測される。)

次に FAD 近傍に結合する ACO-12 および ミキソチアゾールと STG-1 の結合様式を比較したところ、STG-1a の脂肪酸側鎖のみが混合型阻害剤と異なる空間に結合していた (図 5A)。この STG-1a の配置は Feng らが報告した Ndi1-ユビキノン共結晶中におけるユビキノン (UQ_i) の配置と同じであった (図 5B)。

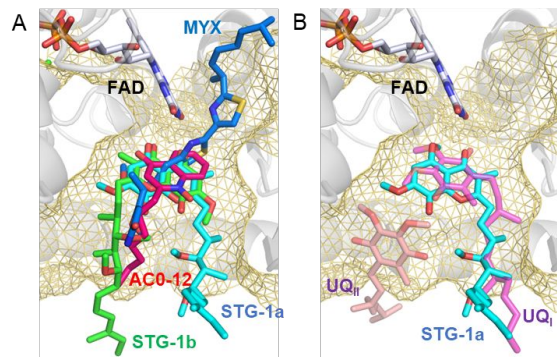


図5 FAD近傍における阻害剤結合部位の比較

次に、STG-1 と相互作用するアミノ酸残基を以下の3つに分類し、変異体を作成して反応速度論的に解析した。

1. STG-1a の脂肪酸側鎖と相互作用するアミノ酸: L444, I459
2. STG-1a および STG-1b の芳香族環と相互作用するアミノ酸: W63, P92, A393, G394, H397, L447, Y482, M485, Leu487
3. STG-1b の脂肪酸側鎖と相互作用するアミノ酸: S484

その結果、STG-1a の脂肪酸側鎖と相互作用するアミノ酸の変異体 L444D, I459A, I459W においてユビキノンに対する親和性の低下が認められた。また、STG-1a および STG-1b の芳香族環と相互作用するアミノ酸の変異体 W63F, A393G, Q394G, H397A, M485E において親和性の低下が認められた。一方、STG-1b の脂肪酸側鎖と相互作用するアミノ酸の変異 (S484F および S484I) は親和性に影響を与えなかった (表 1)。

表1 野生型および変異体 Ndi1 の UQ₁ に対する反応速度論的パラメーター

Interacting structure		K _m (μ M)	V _{max} (μ mol/min/mg)
Wild type	-	22.7 \pm 1.0	1060 \pm 6.1
L444D		37.6 \pm 3.9	447 \pm 6.8
L444N	aliphatic	23.9 \pm 2.0	1333 \pm 14
I459A	tail of	40.2 \pm 4.1	2.90 \pm 0.0042
I459N	STG-1a	30.3 \pm 2.0	11.1 \pm 0.096
I459W		75.6 \pm 12	58.0 \pm 1.5
W63F		53.1 \pm 6.4	1450 \pm 27
P92A		25.6 \pm 2.2	11.3 \pm 0.4
A393G		32.5 \pm 1.9	882 \pm 7.6
Q394G	aromatic	30.8 \pm 3.4	452 \pm 8.1
Q394A	head of	24.5 \pm 1.7	391 \pm 3.3
H397A	STG-1a	35.0 \pm 2.7	463 \pm 17
L447N	and	17.9 \pm 1.8	140 \pm 7.1
Y482F	STG-1b	23.3 \pm 2.0	1090 \pm 45
M485A		18.6 \pm 1.1	292 \pm 9.9
M485E		63.5 \pm 7.8	1190 \pm 96
L487A		16.4 \pm 2.2	424 \pm 29
S484F	aliphatic	24.5 \pm 3.9	1160 \pm 120
S484I	tail of	25.0 \pm 1.7	1010 \pm 33
	STG-1b		

以上の結果より、STG-1a 部位におけるステイグマテルインの脂肪族側鎖の位置は、Ndi1 の競合的阻害のための構造的基礎を提供すること、さらに、ユビキノンの生理的な結合部位は STG-1a 部位と重複することが明らかとなった。ユビキノン結合部位は、FAD のイソアロキサジン環を挟んで NADH 結合部位の反対側に位置する(図6)。この基質結合部位の配置は以前、我々が Ndi1 の生化学的解析によって示唆した3者複合体(Ndi1-NADH-ユビキノン)を介して進行する反応機構を支持する。

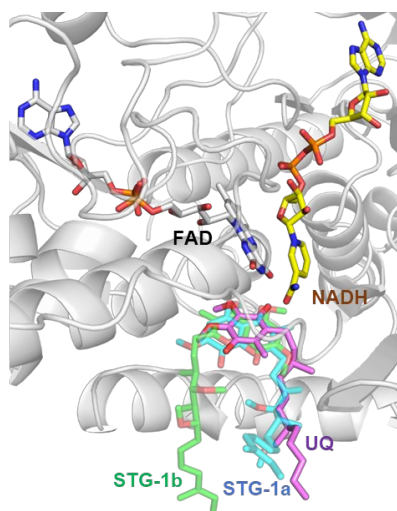


図6 Ndi1における基質NADHおよびユビキノン(UQ)の結合位置

本研究によって Ndi1 の反応機構とその構造的基礎が明らかとなったことで、今後、NDH-2 のユビキノン結合部位を標的とした、より選択性の高い著効性化合物を立体構造情報に基づいて分子設計することが可能になると考える。

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 1 件)

Yamashita T., Inaoka D.K., Shiba T., Ohashi T., Iwata S., Yagi T., Kosaka H., Miyoshi H., Harada S., Kita K., Hirano K.

Ubiquinone binding site of yeast NADH dehydrogenase revealed by structures binding novel competitive- and mixed-type inhibitors. Scientific Reports 査読有, 8巻, 1号, 2427

DOI: 10.1038/s41598-018-20775-6

[学会発表](計 1 件)

山下哲生、稲岡健ダニエル、志波智生、三芳秀人、原田繁春、北潔、平野勝也

競合および混合阻害剤との共結晶構造解析により明らかとなった酵母由来 Type II NADH 脱水素酵素のユビキノン結合部位

日本農芸化学会中四国支部第 51 回講演会、2018 年 6 月、山口大学

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

トップ > 研究紹介 > 呼吸鎖酵素 NDH-2 の反応機構の解明

<http://www.med.kagawa-u.ac.jp/~cardiovascular-physiol/custom72.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 哲生 (TAMASHITA, Tetsuo)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：80444727

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

北 潔 (KITA, Kiyoshi)

長崎大学・熱帯医学・グローバルヘルス研究科・教授

研究者番号：90134444

原田 繁春 (HARADA, Shigeharu)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授

研究者番号：80156504

志波 智生 (SHIBA, Tomoo)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授

研究者番号：80401206

稲岡 健ダニエル (Inaoka, Daniel K)

長崎大学・熱帯医学・グローバルヘルス研究科・助教

研究者番号：10623803

(4) 研究協力者

()