

平成 30 年 4 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07411

研究課題名(和文) 合成ユビキノンを駆使したミトコンドリアVDACの分子機構解明

研究課題名(英文) Functional analysis of mitochondrial VDAC using synthetic ubiquinone probes

研究代表者

村井 正俊 (MURAI, MASATOSHI)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：80543925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキノンを代表されるキノン類は呼吸鎖電子伝達系における電子伝達担体であるが、最近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「ユビキノンを結合性タンパク質」の存在が幾つか示唆されている。ミトコンドリア外膜に存在する電位依存性アニオンチャンネル(VDAC)は、そうしたユビキノンを結合性タンパク質の候補の一つであるが、両者の相互作用や生理的な意義を明確に実証した例はこれまでになかった。代表者は、ユビキノンをVDACの相互作用を初めて直接的に実証し、ユビキノンのVDACに特異的に結合することで膜透過性亢進が制御されることを示した。

研究成果の概要(英文)：The role of the voltage-dependent anion channel (VDAC) as a key link between the mitochondrial matrix and cytosol has been firmly established; however, its involvement in the regulation of mitochondrial permeability transition (PT) remains highly controversial. In the present study, we investigated whether the ubiquinone molecule directly binds to VDAC in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria by photoaffinity labeling using two photoreactive ubiquinones (PUQ-1 and PUQ-2). We demonstrated that ubiquinone specifically binds to the C-terminal region Phe221-Lys234 of the VDAC, connecting the 15th and 16th α -strand sheets. PUQ-1 and PUQ-2 both significantly suppressed the Ca^{2+} -induced mitochondrial PT (monitored by mitochondrial swelling) at the one digit μM level. The results of the present study provided, for the first time to our knowledge, direct evidence indicating that the ubiquinone molecule specifically binds to VDAC1 through its quinone-head ring.

研究分野：生物有機化学

キーワード：ユビキノンのミトコンドリアVDAC 光親和性標識 ケミカルバイオロジー

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。ミトコンドリア外膜に存在する電位依存性アニオンチャンネル (voltage dependent anion channel; VDAC) は、そうしたユビキノン結合性タンパク質の候補の一つである。VDAC はミトコンドリア-細胞質間での代謝物の輸送に関与するタンパク質であるが、いわゆる膜透過性亢進と呼ばれるシトクロム *c* の細胞質への漏出など、アポトーシスの鍵現象に深く関与することが知られている。ユビキノンが膜透過性亢進の制御に関与することが示唆されていたが、両者の相互作用を明確に実証した例はこれまでにない。

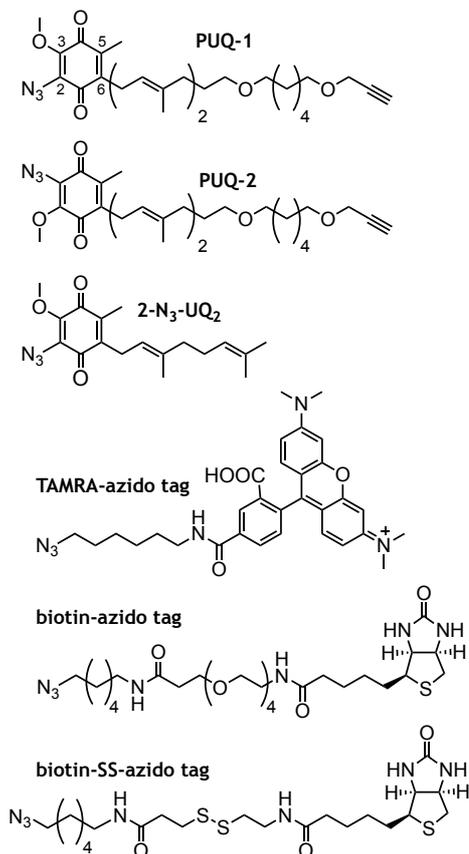


図1. 本研究に用いたユビキノンプローブ (PUQ-1 および PUQ-2) とクリックケミストリーのパートナーとなる検出タグの構造。

2. 研究の目的

本研究では、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) ミトコンドリアを実験材料として、独自に合成した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、VDAC とユ

ビキノンの相互作用を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ユビキノンのキノン環とイソプレン側鎖末端に、アジド基とアルキンをそれぞれ導入したユビキノンプローブを合成した (PUQ-1, PUQ-2, 図1)。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) を利用して蛍光発色団やビオチンなどの任意の検出タグを導入することを意図している。

4. 研究成果

1. 出芽酵母ミトコンドリアを用いた光親和性標識実験

出芽酵母からミトコンドリアを単離し、UQ-1 によって光親和性標識を行い、クリックケミストリーによって TAMRA タグを導入したところ、およそ 30 kDa 付近のタンパク質に強い蛍光が観察された (図2)。続いて、光親和性標識されたタンパク質にビオチンタグを導入し、固定化アビジンを用いて標識されたタンパク質を回収し、ペプチドマスマフィンガープリンティングやウエスタンブロットによる解析を行った。その結果、標識されたタンパク質は VDAC であることが明らかになった。また、UQ-1 による VDAC の標識は、過剰量の短鎖ユビキノン存在下で強く (~80%) 抑制されたことから、標識は特異的であると考えられる。

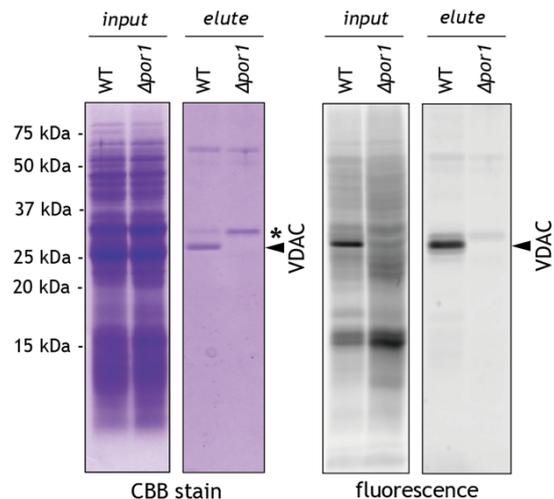


図2. PUQ-1 を用いた光親和性標識実験. 出芽酵母ミトコンドリアを光親和性標識した後 (input)、サンプルの一部をヒドロキシアパタイトからむで精製し、VDAC を含むミトコンドリア膜タンパク質を精製した (elute)。その後、標識されたタンパク質を TAMRA-N₃ と反応させ、標識されたタンパク質を可視化した。対照実験として、VDAC を欠損した出芽酵母 (Δ por1) より単離したミトコンドリアの標識実験の結果を示した。

2. VDAC におけるユビキノン結合部位の同定

VDAC(全 283 残基)における UQ-1 の結合部位を同定するため、V8-protease を用いて標識された VDAC の限定消化を行ったところ(クリーブランドマッピング)、再現性よく 10 kDa 付近の消化断片へ蛍光シグナルが移行した。対応する CBB 染色されたスポットの N 末端シーケンス解析を行ったところ、断片は VDAC の N 末端側に近い領域 (Phe221-Ala283, 6.7 kDa) であることがわかった。さらに、標識された VDAC を LysC で徹底消化したところ、3 kDa 付近のペプチド断片へ蛍光シグナルが移行した。このバンドは Leu212-Lys234 (2.6 kDa) と予測できる。以上の結果を総合すると、VDAC の C 末端付近に位置し、膜間スペース側に面したループ領域を含む Phe221-Lys234 (14 残基) の領域にユビキノン環部の結合部位が存在することがわかった(図 3)。

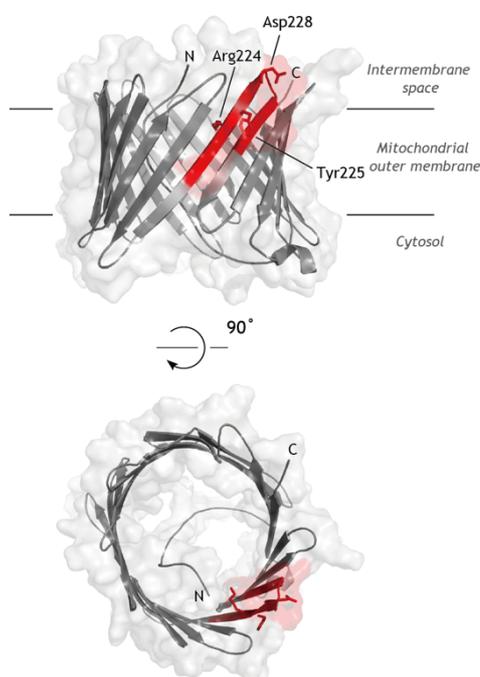


図 3. 出芽酵母 VDAC におけるユビキノン結合部位。出芽酵母 VDAC におけるユビキノン結合部位 (Phe212-Lys234) をヒト VDAC の立体構造 (PDB 2K4T) を用いて表示した。

考察

膜透過性亢進や脱共役タンパク質など、エネルギー代謝機能を調整するミトコンドリア膜タンパク質がユビキノンと親和性を持つ可能性は以前から報告されてきたが、明確に実証した報告例はなかった。

VDAC を欠損した酵母では、呼吸鎖酵素の発現量やユビキノンの含量には変動がないにも関わらず、呼吸活性や ATP 合成能が著しく低下する。このことから、VDAC が代謝物の輸送のみならず、エネルギー代謝の幅広い場面に寄与していると考えられる。

ユビキノンと VDAC の直接的相互作用を実証した本研究結果は、ミトコンドリアの機能制

御における VDAC の役割を考察する上での重要な手掛かりとなる。そこで、出芽酵母ミトコンドリアの膜透過性亢進に着目し、本現象におけるユビキノンの影響について精査した。その結果、PUQ-1 は Ca^{2+} で誘導される膜透過性亢進を低濃度で抑制した(図 4)。一連の実験結果は、ユビキノンと VDAC の相互作用を初めて直接的に実証したものであり、ユビキノンが VDAC に特異的に結合することで膜透過性亢進が制御されることを示唆するものである。

以上の成果は、アメリカ化学会 Biochemistry 誌に掲載され、“Highlighted Article” に選ばれた。(発表論文 3)

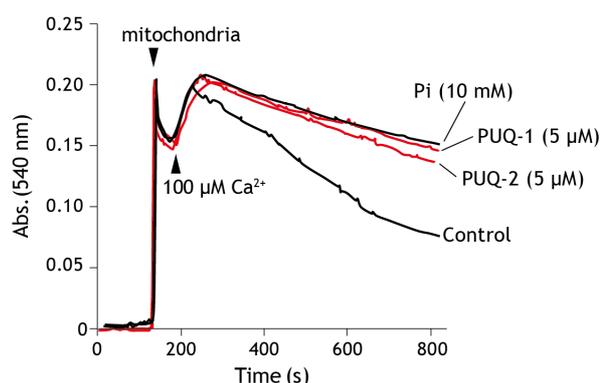


図 4. 出芽酵母 VDAC における Ca^{2+} 誘導型膜透過性亢進。ユビキノンプローブは μM オーダーの濃度で Ca^{2+} 誘導型の膜透過性亢進を抑制した。これは、膜透過性亢進を阻害することが知られているリン酸 (Pi) と同等の効果であった。

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 10 件)

1. Masuya, T., Murai, M., Ito, T., Aburaya, S., Aoki, W. and Miyoshi, H. (2017) Pinpoint chemical modification of the quinone-access channel of mitochondrial complex I via a two-step conjugation reaction, *Biochemistry* 56, 4279-4287.
2. Ito, T., Murai, M., Ninokura, S., Kitazumi, Y., Mezic, K. G., Cress, B. F., Koffas, M. A. G., Morgan, J. E., Barquera, B. and Miyoshi, H. (2017) Identification of the binding sites for ubiquinone and inhibitors in the Na^+ -pumping NADH-ubiquinone oxidoreductase of *Vibrio cholerae* by photoaffinity labeling, *J. Biol. Chem.* 292, 7727-7742 (selected as an “Editors’ pick”).
3. Murai, M., Okuda, A., Yamamoto, T., Shinohara, Y. and Miyoshi, H. (2017) Synthetic ubiquinones specifically bind to mitochondrial voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) in *Saccharomyces*

cerevisiae mitochondria, *Biochemistry* 56, 570-581 (selected as a "Highlighted article").

4. 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.
5. Masuya, T., Okuda, K., Murai, M. and Miyoshi, H. (2016) Characterization of the reaction of decoupling ubiquinone with bovine mitochondrial respiratory complex I, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80, 1464-1469.
6. Murai, M. and Miyoshi, H. (2016) Current topics on inhibitors of respiratory complex I, *Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)* 1857, 884-891. (Review article)
7. 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 from proton translocation, *Biochemistry* 55, 470-481.
8. 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.
9. 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 (selected as a "Highlighted article").
10. 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.

[学会発表] (計 31 件)

1. コレラ菌 Na⁺輸送型 NADH-キノン酸化還元酵素における阻害剤結合部位の同定, 伊藤剛, 村井正俊, ニノ倉聡, 北隅優希, Blanca Barquera, 三芳秀人, 日本農芸化学会 2018 年度大会 2018 年 3 月 17 日
2. ミトコンドリア ADP/ATP 輸送体を阻害するエポキシシクロヘキセンジオン類の作用機構研究, 青山綾希, 村井正俊, 一丸直哉, 三芳秀人, 日本農芸化学会 2018 年度大会 2018 年 3 月 17 日
3. 呼吸鎖複合体-I におけるアミロライド類

の結合部位の同定, 木村洋則, 村井正俊, 三芳秀人, 日本農芸化学会 2018 年度大会 2018 年 3 月 17 日

4. 出芽酵母ミトコンドリアの VDAC を阻害するペンテンジオール類縁体の作用機構研究, 運天優歩, 村井正俊, 一丸直哉, 山本武範, 篠原康雄, 三芳秀人, 日本農芸化学会 2018 年度大会 2018 年 3 月 17 日
5. 呼吸鎖複合体-I のキノン結合ポケットのピンポイント化学修飾, 村井正俊, 榎谷貴洋, 三芳秀人, 日本生体エネルギー研究会 第 43 回討論会 2017 年 12 月 21 日
6. コレラ菌 Na⁺輸送性 NADH-キノン酸化還元酵素の阻害剤結合部位の同定, 伊藤剛, ニノ倉聡, 村井正俊, 北隅優希, Blanca Barquera, 三芳秀人, 日本生体エネルギー研究会 第 43 回討論会 2017 年 12 月 21 日
7. コレラ菌 Na⁺輸送型 NADH-キノン酸化還元酵素における阻害剤結合部位の同定, 伊藤剛, 村井正俊, Barquera B, 三芳秀人, 日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017 年度合同大阪大会 2017 年 9 月 22 日
8. ミトコンドリア呼吸鎖複合体-I のユビキノンの結合ポケットの位置特異的的化学修飾, 榎谷貴洋, 村井正俊, 三芳秀人, 日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017 年度合同大会 2017 年 9 月 22 日
9. ミトコンドリア ADP/ATP 輸送体を阻害するエポキシシクロヘキセンジオン類の作用機構研究, 青山綾希, 村井正俊, 三芳秀人, 日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017 年度合同大会 2017 年 9 月 22 日
10. Characterization of the ubiquinone-binding pocket of respiratory complex I through chemical modifications, Masatoshi Murai, The 2017 Gordon Research Conference on Bioenergetics 2017 年 6 月 7 日 (招待講演)
11. 合成ユビキノンは出芽酵母ミトコンドリア電位依存性アニオンチャンネル (VDAC) に特異的に結合する, 村井正俊, 奥田絢香, 山本武範, 篠原康雄, 三芳秀人, 日本農芸化学会 2017 年度大会 2017 年 3 月 20 日
12. コレラ菌 NADH-キノン酸化還元酵素の特異的阻害剤コロルミシンの単離と全合成, 伊藤剛, 戸崎龍彦, 村井正俊, Barquera B, 三芳秀人, 日本農芸化学会 2017 年度大会 2017 年 3 月 20 日
13. ミトコンドリア呼吸鎖複合体-I の位置特異的的化学修飾, 榎谷貴洋, 村井正俊, 三芳

- 秀人, 日本農芸化学会 2017 年度大会
2017 年 3 月 20 日
14. トシル化学によるミトコンドリア複合体-I のユビキノロン結合部位の特異的メチル化, 榎谷貴洋, 稲岡宏幸, 村井正俊, 三芳秀人, 日本農薬学会第 42 回大会 2017 年 3 月 8 日
 15. 合成ユビキノロンは出芽酵母ミトコンドリア電位依存性アニオンチャンネル (VDAC) に特異的に結合する, 村井正俊, 奥田絢香, 山本武範, 篠原康雄, 三芳秀人, 日本農薬学会第 42 回大会 2017 年 3 月 8 日
 16. コレラ菌 NADH-キノロン酸化還元酵素の阻害剤コロルミシンの単離と全合成研究, 伊藤剛, 戸崎龍彦, 村井正俊, Blanca Barquera, 三芳秀人, 日本農薬学会第 42 回大会 2017 年 3 月 8 日
 17. ミトコンドリア呼吸鎖複合体-I における合成ユビキノロン QT の還元はプロトン輸送と共役しない, 村井正俊, 奥田健司, 榎谷貴洋, 三芳秀人, 日本生体エネルギー研究会第 42 回討論会 2016 年 12 月 19 日
 18. ミトコンドリア呼吸鎖複合体-I の位置特異的的化学修飾, 榎谷貴洋, 村井正俊, 稲岡宏幸, 三芳秀人, 日本生体エネルギー研究会第 42 回討論会 2016 年 12 月 19 日
 19. Identification of the binding site of amilorides in mitochondrial respiratory complex I, Ito T, Murai M and Miyoshi H, 18th European Bioenergetics Conference (EBEC2016) 2016 年 7 月 2 日
 20. Synthetic ubiquinones specifically bind to mitochondrial voltage-dependent anion channel of *Saccharomyces cerevisiae*, Murai M, Okuda A, Yamamoto T, Shinohara Y and Miyoshi H, 18th European Bioenergetics Conference (EBEC2016) 2016 年 7 月 2 日
 21. Site-specific chemical modifications of the quinone binding cavity of bovine heart mitochondrial complex I, Masuya T, Murai M, Inaoka H and Miyoshi H, 18th European Bioenergetics Conference (EBEC2016) 2016 年 7 月 2 日
 22. ミトコンドリア複合体-I による合成ユビキノロン QT の還元はプロトン輸送と共役しない, 奥田健司, 村井正俊, 油屋駿介, 青木航, 三芳秀人, 日本農芸化学会 2016 年度大会 2016 年 3 月 29 日
 23. トシル化学によるミトコンドリア複合体-I のユビキノロン結合部位の特異的メチル化, 稲岡宏幸, 村井正俊, 榎谷貴洋, 油屋駿介, 青木航, 三芳秀人, 日本農芸化学会 2016 年度大会 2016 年 3 月 29 日
 24. 出芽酵母ミトコンドリア VDAC はユビキノロンと特異的に結合する, 奥田絢香, 村井正俊, 山本武範, 篠原康雄, 三芳秀人, 日本農芸化学会 2016 年度大会 2016 年 3 月 29 日
 25. 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, 伊藤剛, 村井正俊, 村上園実, 森坂裕信, 三芳秀人, 日本農薬学会第 41 回大会 2016 年 3 月 19 日
 26. ミトコンドリア複合体-I による合成ユビキノロン QT の還元はプロトン輸送と共役しない, 榎谷貴洋, 奥田健司, 村井正俊, 三芳秀人, 日本農薬学会第 41 回大会 2016 年 3 月 19 日
 27. ミトコンドリア呼吸鎖活性を制御するユビキノロン結合性タンパク質 Coq10 の機能, 村井正俊, 三芳秀人, 日本農薬学会第 41 回大会 (シンポジウム) 2016 年 3 月 18 日
 28. SAR を基盤にミトコンドリア複合体-I の作用機構を考える, 三芳秀人, 村井正俊, 日本農薬学会第 41 回大会 (シンポジウム) 2016 年 3 月 18 日
 29. アミロライド類のミトコンドリア複合体-I における結合部位の同定, 伊藤剛, 村井正俊, 村上園実, 森坂裕信, 三芳秀人, 第 30 回農薬デザイン研究会 2015 年 11 月 12 日
 30. ミトコンドリア複合体-I のピンポイント化学修飾, 榎谷貴洋, 村井正俊, 森坂裕信, 三芳秀人, 第 30 回農薬デザイン研究会 2015 年 11 月 12 日
 31. Amilorides bind to the quinone binding pocket of bovine mitochondrial complex I, Murai M, Miyoshi H, Gordon Research Conference on Bioenergetics 2015 年 6 月 21 日
- [図書] (計 1 件)
Mezic, K., Murai, M., Miyoshi, H. and Barquera, B. “The Na⁺-translocating NADH-ubiquinone oxidoreductase (Na⁺-NQR)” in Wikström, M. (Eds.), Mechanisms of primary energy transduction in biology, Royal Society of Chemistry, UK 2017, pp. 140-156.
- [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

■所属研究室 HP

<http://www.biofunc-chem.kais.kyoto-u.ac.jp>

■Google Scholar

<https://scholar.google.co.jp/citations?user=I66ybkoAAAAJ&hl=ja>

■Researchmap

<https://researchmap.jp/read0145924/>

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

山本 武範 (YAMAMOTO TAKENORI)

徳島大学・先端酵素学研究所・講師

研究者番号：80457325

(4)研究協力者

無し