

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14914

研究課題名(和文) 化学修飾によるミトコンドリア複合体-Iの「光駆動型プロトンポンプ」への変換

研究課題名(英文) Conversion of mitochondrial respiratory complex I to a light-driven proton pump by chemical modification

研究代表者

三芳 秀人 (Miyoshi, Hideto)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：20190829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア複合体-Iのキノン結合ポケットに位置する49 kDa-Asp160に対して、トシル化学法によって種々の1次タグを特異的に導入する化学修飾法を確立した。49 kDa-Asp160に導入した1次タグに対して、光スイッチ分子を含む2次タグをクリックケミストリーで導入させるために、種々の1次タグ/2次タグの組合せにおけるクリックケミストリーを精査した。1次タグとしてシクロプロペン基、2次タグとしてテトラジン基を用いるDiels-Alder環化反応によって、効率的に2次タグを導入できることがわかった。テトラジン基を分子末端に持つアゾベンゼン類の合成を行った。

研究成果の概要(英文)：The results obtained in this work are summarized as follows.

1) This work established the chemical method to introduce a first tag to Asp160 of the 49 kDa subunit, which forms deep inside of the quinone-binding pocket, by a tosyl chemistry technique. 2) To introduce a second tag to the first tag by click chemistry technique, this work investigated reactivities of some pairs of first tag/second tag. 3) It was revealed that a pair of cyclopropene (a first tag) and tetrazine (a second tag) groups is the most efficient pair among the pairs examined. 4) On the basis of the results obtained in 3), this work synthesized azobenzene derivatives, which have a tetrazine in their terminal end.

研究分野：生物有機化学

キーワード：生物制御化学 ミトコンドリア呼吸鎖酵素 複合体-I タンパク質化学修飾

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア呼吸鎖の初発酵素である NADH-キノン酸化還元酵素 (複合体-I) は、ATP 合成の駆動力となるプロトン輸送を担う基幹酵素であり、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注目されている。しかし、本酵素は非常に大きな膜タンパク質複合体であるために、プロトン輸送のメカニズムはほとんど明らかになっていない。

2013 年に Sazanov らによって好熱菌 *Thermus thermophilus* の複合体-I の X 線結晶構造が 3.3 分解能で解かれ、親水性ドメインと膜ドメインからなる特徴的な L 字型構造をとっていることがわかった。親水性ドメインは、酸化還元反応によってプロトン輸送の駆動力を発生させる部位であり、NADH フラビン (FMN) 9 個の Fe-S 錯体 キノンと電子が流れる。膜ドメインはプロトン輸送の作動部位であり、Na⁺/H⁺-アンチポーターのホモログである 3 つのサブユニット (ND2, ND4, ND5) がプロトン輸送を担うものと予想されている。

Sazanov らは X 線結晶構造に基づいて、プロトン輸送のメカニズムを提唱した。すなわち、『キノンの還元反応によってキノン結合ポケット内に構造変化が誘起され、これが駆動力となって膜ドメインに伝搬し、3 つのサブユニット (ND2, ND4, ND5) の構造変化が順次誘導されてプロトンが輸送される』というユニークなモデルである。しかし、このモデルを直接的に支持する実験データは未だ報告されていない。

上記の Sazanov のモデルによれば、キノン結合ポケット内におけるキノンの還元反応が、プロトン輸送のための駆動力を発生させることになる。本研究では、キノン結合ポケット内に光スイッチ分子を組み込むことによって、複合体-I のプロトン輸送活性を光で誘導することを試みる。このような試みは全く斬新であり、プロトン輸送のメカニズム解明に大きく貢献することが期待できる。さらに、複合体-I を光駆動型プロトンポンプに機能変換することが可能になれば、ATP 合成、活性酸素発生、物質輸送など、形成される膜電位の大きさによって支配されるミトコンドリアの種々の機能を遠隔、迅速、そして非破壊的に光制御する新技術の確立にも繋がり、ミトコンドリア研究全般への波及効果は極めて大きいものと期待できる。

2. 研究の目的

代表者は、ligand-directed tosyl chemistry (以後“トシル化学”と呼ぶ) に基づいて、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 (49 kDa・Asp160) をピンポイントでアジド化することができる化学修飾法を初めて確立した (2014 年)。本研究では、キノン結合ポケット内に固定した

反応基を“足場”として、アゾベンゼンのような光スイッチ分子をクリックケミストリーによって導入し、光スイッチ分子の *trans* ↔ *cis* 異性を光照射で誘導することによって、キノン結合ポケット内に何らかの可逆的な構造変化を誘起する。もしこのような構造変化が駆動力となって膜ドメインに伝搬しプロトンが輸送されれば、本来、酸化還元反応で駆動される複合体-I を光で駆動したことになる。すなわち、本研究の目的は、「キノン結合ポケットを光スイッチ分子で化学修飾することによって、複合体-I を“光駆動型プロトンポンプ”に機能変換する」ことを目指すものである。

3. 研究の方法

3-1) トシル化学に用いるリガンド分子の合成と 1 次タグの導入

トシル化学に用いるリガンド分子は、複合体-I の強力な阻害剤である天然物アセトゲニンをテンプレートとして設計した (図 1)。

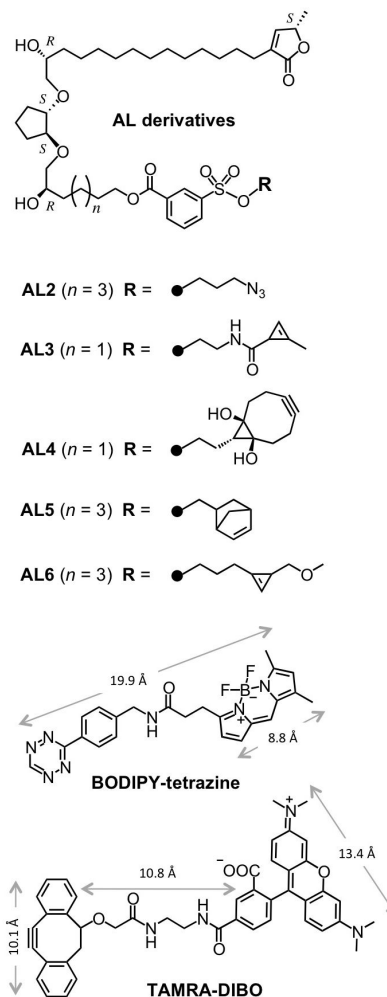


図 1 トシル化学に用いるリガンド分子 (AL2~AL6) の構造を示す。

実験材料としてインタクトな複合体-I を用いるため、ウシ心筋垂ミトコンドリア粒子 (SMPs) を調製した。AL2 をリガンドとして

用いるトシル化学によって、複合体-1 の 49 kDa・Asp160 を特異的にアジド化させる修飾方法は既に確立できている。(*Biochemistry* 53, 7816-7823, 2014)。トシル化学の完了後に生成するスルホン酸体は、中性 pH 領域で酸解離するため、化合物の極性が顕著に増大し、複合体-1 との結合親和性を完全に失うことを確認している。

49 kDa・Asp160 をアジド化させた後、大きな環ひずみを持つシクロアルケン (DIBO) とのクリックケミストリーを経て、光スイッチ分子を導入することを当初計画した。その一連の化学修飾操作の流れを図 2 に模式的に示す。

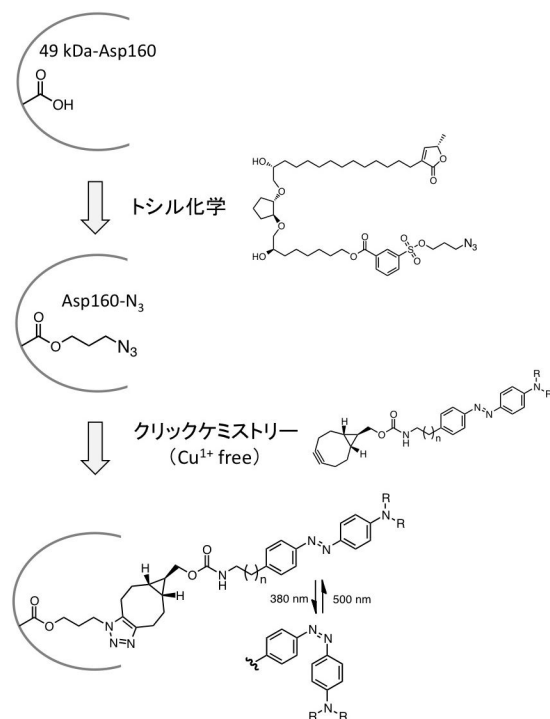


図 2

しかし後述するように、DIBO の反応性が極めて高いために、アジド基と DIBO のクリックケミストリー反応中において、他の SMP タンパク質の求核性アミノ酸残基との間で深刻な副反応を伴うことがわかった。この副反応を回避するべく、アジド基/DIBO の組合せではなく、別の 1 次タグ/2 次タグの組合せによるクリックケミストリーを開拓する必要があった。

そこで、環ひずみを持つシクロアルケン類 (1 次タグ) とテトラジン (2 次タグ) の組合せによる Diels-Alder cycloaddition によって 2 次タグを導入することを計画し、図 1 に示したりガンド分子 AL3~AL6 を合成した。合成方法の詳細は発表論文に記載した (*Biochemistry* 56, 4279-4287, 2017)。テトラジンとしては BODIPY-tetrazine を用い、Diels-Alder cycloaddition が進行したことを蛍光検出できるようにした。

3-2) 光スイッチ分子の設計

当初計画した光スイッチ分子の構造を図 3 に示す。光スイッチとしては最も汎用されているアゾベンゼンを採用し、光照射で $trans \rightleftharpoons cis$ 異性化させる。アゾベンゼン類の最近の研究成果から、パラ位に電子供与性の 3 級アミンが存在すれば、 $cis \rightleftharpoons trans$ 異性化が迅速化されるとの報告があるため、ベンゼン環末端に 3 級アミンを導入する。将来的な光スイッチ分子の構造最適化に備えて、可変部 n およびアミンのアルキル基 (R) を幅広く改変することを視野に入れて設計した。

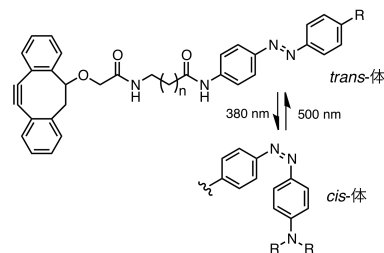
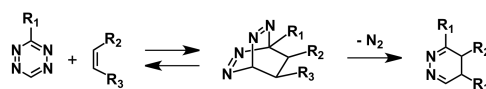


図 3

4. 研究成果

SMPs を実験材料に用い、AL3~AL6 によるトシル化学を実施し、複合体-1 の 49 kDa・Asp160 に 1 次タグであるシクロアルケン (あるいはシクロアルキン) を導入することを試みた。導入されたかどうかを、BODIPY-tetrazine を 2 次タグとする Diels-Alder cycloaddition によって検証した。1 次タグとして導入した各シクロアルケン (AL2~AL6) と BODIPY-tetrazine との Diels-Alder cycloaddition の反応機構および生成物を図 4 にまとめた。これらの反応は、有機溶媒および水中では問題なく進行することを予め確認した。

(A)



(B)

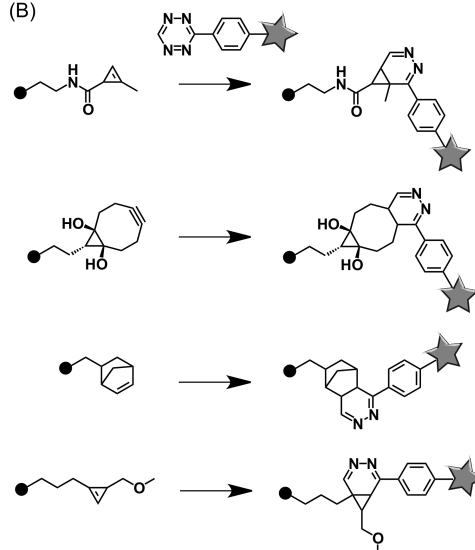


図 4

SMPs に対してトシル化学とそれに続く Diels-Alder cycloaddition を組合せて実施し、SMP タンパク質を可溶化した後、SDS-PAGE に供した (図 5)。AL6 を用いた場合のみ、49 kDa サブユニットに BODIPY の顕著な蛍光が認められ、49 kDa・Asp160 がシクロプロペン化されていることがわかった。この蛍光強度は、処理する AL6 の濃度に依存することを確認した (図 6)。図 5 に示した結果から明らかなように、BODIPY-tetrazine は 49 kDa サブユニット以外のミトコンドリアタンパク質にはほとんど結合しないことがわかった。この反応特異性は TAMRA-DIBO よりも顕著に優れており、テトラジンを 2 次タグの反応性基として用いることのメリットが浮き彫りになった。

また、AL6 による 49 kDa・Asp160 へのシクロプロペン基の導入は、キノン結合ポケットに結合する阻害剤 (bullatacin, fenpyroximate, rotenone, delta-lac-acetogenin) を過剰に共存させることで完全に抑制されることがわかった (図 7)。

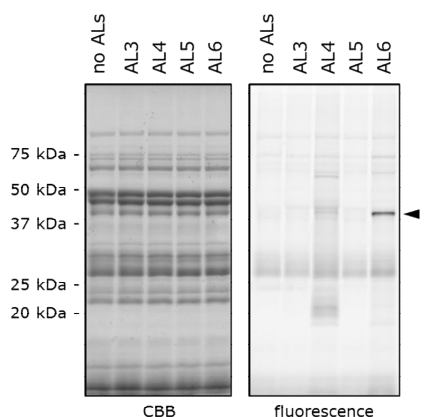


図 5 トシル化学に続いて BODIPY-tetrazine との Diels-Alder cycloaddition に供した SMPs を、SDS-PAGE で解析した。左は CBB 染色、右は BODIPY の蛍光で検出した。ALs の濃度は 5 μ M に統一した。矢印は 49 kDa サブユニットを示す。

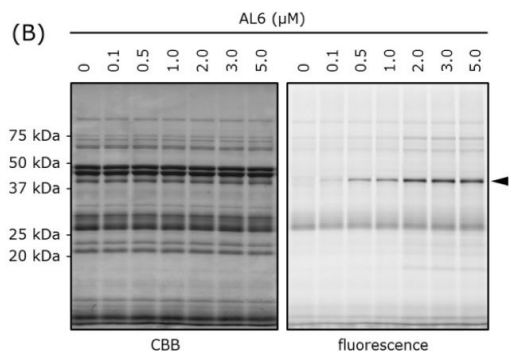


図 6 図 5 と同条件下で AL6 の濃度のみを変化させた。

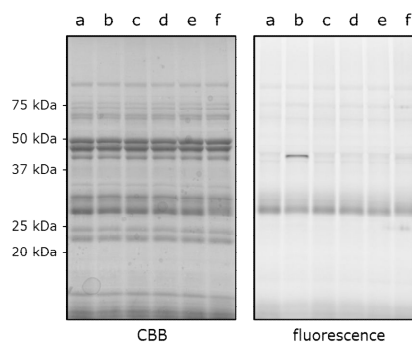


図 7 AL6 を用いたトシル化学/Diels-Alder cycloaddition に対する種々の阻害剤の影響を示す。a: AL6 なし, b: AL6 のみ (1.0 μ M), c: AL6 + bullatacin (10 μ M), d: AL6 + fenpyroximate (10 μ M), e: AL6 + rotenone (10 μ M), f: AL6 + delta-lac-acetogenin (10 μ M)。

以上の結果から、AL6 をトシル化学リガンドとして用い、複合体-I の 49 kDa・Asp160 をトシル化学によってまずシクロプロペン化し、続いてテトラジンを部分構造として有する光スイッチ分子を Diels-Alder cycloaddition によって導入するという 2 段階反応が、キノン結合ポケットに光スイッチを導入する現実的な戦略であることがわかった。また、テトラジンユニットはミトコンドリアタンパク質の求核性アミノ酸残基とほとんど反応しないことがわかり、今後の複合体-I の化学修飾研究を進める上で有意義な知見が得られた。

現在、図 3 に示した化合物の左端 DIBO 部分をテトラジン構造に改変した光スイッチ分子を合成している段階である。残念ながら、研究期間内に完成させることはできなかったが、合成完了の目処は立っている。

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)

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. (査読有) DOI: 10.1021/acs.biochem.7b00612

〔学会発表〕(計 1 件)

日本農芸化学会・平成 29 年度大会、平成 29 年 3 月 20 日 (京都女子大学) 榎谷貴洋、村井正俊、三芳秀人: 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

〔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・農学研究科・教授
研究者番号： 20190829

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

村井正俊 (MURAI Masatoshi)
京都大学・農学研究科・助教
研究者番号： 80543925

(4) 研究協力者

該当なし