

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19870016  
 研究課題名（和文）  
 酵母ミトコンドリア呼吸鎖酵素におけるユビキノン還元反応の分子機構と構造的基盤  
 研究課題名（英文） Analysis of ubiquinone reduction mechanism of mitochondrial single-subunit NADH quinone oxidoreductase.  
 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

研究成果の概要：ミトコンドリアのシングルサブユニット・NADH-キノン酸化還元酵素（ndi1）のキノン結合部位を、類似の構造を持つと予想される酵素の立体構造を元にして部位指定変異体を作製し反応速度論的に解析した。その結果、キノンの結合部位は補欠分子族 FAD の近傍にある NADH 結合部位とほぼ同位置に存在することが明らかとなった。しかし、キノンの反応生成物であるユビキノールが NADH を非競合的に阻害することから、両基質の結合部位は比較的近い位置にあるが、空間的に重複していないことが示された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,370,000	0	1,370,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：呼吸鎖電子伝達系

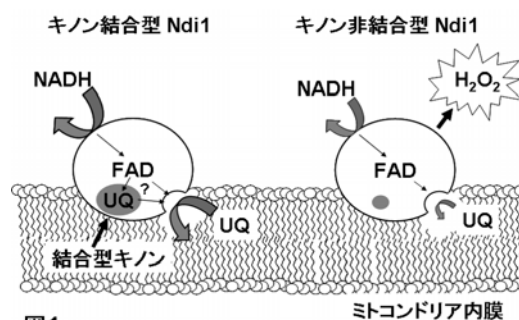
科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ミトコンドリア，酵素，キノン還元反応，フラボプロテイン，電子伝達系

## 1. 研究開始当初の背景

最近、多くの呼吸鎖酵素において基質であるキノンとは異なる酵素結合型キノンが分子内の電子伝達に関与していることが報告されているが、酵母ミトコンドリアのシングルサブユニット・NADH-キノン酸化還元酵素（ndi1）においても結合型キノンが存在することが明らかとなったことから、結合型キノンの生理機能について検討した結果、結合型キノンの酵素からミトコンドリア内膜への電子伝達を顕著に促進し、さらに酵素からの活性酸素の生成を抑えることを発見した（図1）。これらの結果は、結合型キノンが生

理的な条件において酵素活性発現および活性酸素の生成抑制に非常に重要な役割をしていることを示唆するが、その分子機構については十分な解明がなされていない。



## 2. 研究の目的

本研究は酵母ミトコンドリアのシングルサブユニット・NADH-キノン酸化還元酵素 (ndi1) をモデル系として用い、ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系より非生理的な条件下で生じる活性酸素の生成機構を分子のレベルで理解することを目的とした。

そこで、まず生理的な条件下でのキノン還元反応の詳細な分子機構を理解する必要があり、Ndi1 におけるキノン結合部位の同定が不可欠であったため、本研究では部位指定変異法により、キノン結合部位の同定を行った。

## 3. 研究の方法

シングルサブユニット・NADH-キノン酸化還元酵素 (NDH-2) ファミリーに属する酵素における反応速度論的解析から、NDH-2 のキノン結合部位は NADH の結合部位と空間的にどういつであるという報告がある (*J. Biol. Chem.*, **280**, 3138-3142)。そこで、Ndi1 (513 残基) に対して相同性が高く、かつ、プロテイン・データベース (PDB) に登録されている *Drosophila melanogaster* の Thioredoxin reductase および *Pseudomonas putida* の Dihydrolipoamide dehydrogenase の立体構造から、NADH 結合部位付近で NDH-2 ファミリーにおいて相同性の高いアミノ酸残基の変異体を部位指定変異法により調製し、細胞膜から精製した。それらの変異体の基質 (キノンおよび NADH) に対する反応速度論的解析を基に、基質であるキノンの結合に関与するアミノ残基の同定を試みた (図 2 および 3)。

## 4. 研究成果

部位指定変異体の反応速度論的解析の結果、特に Asp383 のカルボキシル基がキノンの結合に関与し、また Lue195 の疎水性側鎖は活性発現に重要であることが予想された。さらに Glu242 変異体はキノン非結合型酵素と同じく基質阻害を示したことから、Glu242 は基質結合部位近辺に存在し分子内電子伝達に関与していることが予想された (表 1)。これら 3 つのアミノ酸残基は ndi1 の FAD の近傍にある NADH 結合部位とほぼ同位置に存在することから、キノンと NADH の結合部位が同じ位置にあることが予想された。しかし、キノンの反応生成物であるユビキノールが NADH を非競合的に阻害し、さらに NADH を競合的に阻害する Reactive blue-2 がユビキノンを非競合的に阻害することから (図 4)、両基質の結合部位が仮に近い位置にあったとしても空間的に重複していないことが示された。また、この結果は、反応速度論的解析から予測される Ndi1 の反応機構 (ピンポン bibi 機構) とも矛盾する。そこで、次に、こ

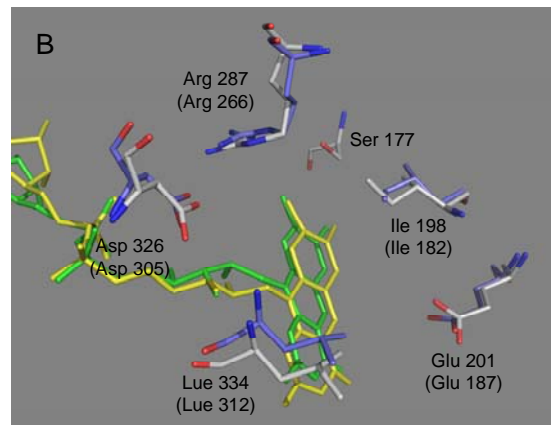
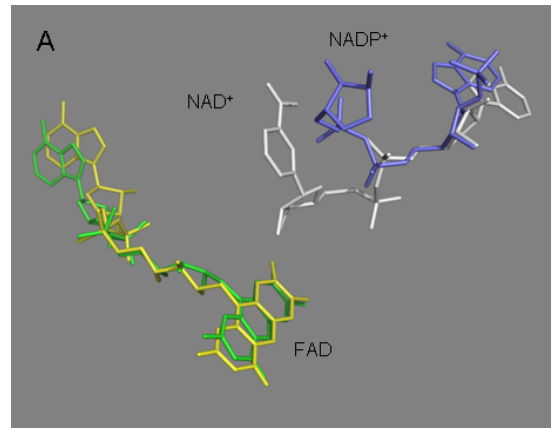


図 2-A Thioredoxin reductase (*Drosophila melanogaster*) および Dihydrolipoamide dehydrogenase (*Pseudomonas putida*) の基質結合部位、黄色・青: Thioredoxin reductase、緑・白: Dihydrolipoamide dehydrogenase、図 2-B NADH/NADPH 結合部位付近のアミノ酸残基、() 内: Dihydrolipoamide dehydrogenase

92-94		177		198 201	
ScNDI1	SYFLPT <b>PL</b> LLPSAFV	GITSDDL-----FSLDRPDKTL-----	VVGAGVIGL	ECAG----	
Ec	HSHL <b>PK</b> LLHEVAT		LAPKALPQH----	LVVVGGVIGL	LE-----
Av	MTHL <b>PK</b> LLHEVAA				239 242 246
Td	NHHVLT <b>PL</b> LQITTT				
	***				
DmTR		287	326	334	
PpLipD	ADRVLVAVGR--RFRTK	YDVLWAIGRKG--LVD	NVANIYAVGDIY-GKP-----	ELTPVAVLAGRL	
ScNDI1	YGTLIWA <b>TG</b> NKARPVIT	341	383	392	
Ec	ADLMVWAAGIKAPDFLK		--PDIYAIGDCASCPRP--	EGGFVPPRAQAHQMATC	
Av	ADLMVWAAGVRAPDFLK		--DDIFAIGDCASCQPQGTDRPVP	PPRAQAHQQASL	
Td	TGLVWVSTGVGSPSLTK		PIPDVYAIGDCATNESN----	PLPTLAVASRQGVY	
	**		***	**	

図 3 アライメント

の反応機構は Ndi1 の酸化還元状態の違いによる構造変化が引き起こしているのではないかと考え、補欠分子族である FAD の酸化還元状態の違いによる構造変化を、Ndi1 をプロテアーゼ処理し、SDS-PAGE により解析した。その結果、FAD の酸化還元状態の違いによ

表1 Ndi1 野生型と変異体のキノンに対する親和性および最大活性

	UQ <sub>1</sub>		
	K <sub>m</sub> (μM)	V <sub>max</sub> (μmol/min/mg)	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub>
Wild type	21.0	1120	53.4
P92A	22.4	10.9	0.487
L93A	48.3	151	3.13
L94A	10.8	0.0494	0.00457
L195A	51.6	0.761	0.0147
L195V	54.6	1250	22.9
L195I	42.6	1350	31.7
K196A	15.8	266	16.8
K196Q	20.0	482	24.1
T239A	13.0	225	17.3
E242A	4.64	90.0	19.4
E242Q	3.23	42.3	13.1
E242D	162	1930	11.9
E246Q	13.9	425	30.6
T339A	23.1	668	28.9
N341A	26.7	714	26.7
D383A	115	0.417	0.00363
D383N	63.3	0.0920	0.00145
D383E	31.6	52.4	1.66
D383Q	155	2.50	0.0161
T392A	18.9	242	12.8

ては、構造変化を起こさないが、酵素に NADH が結合している状態でのみ構造変化を引き起こすことが示された (図 5)。さらに、結合型キノンは、Ndi1 に NADH が結合している状態では酵素から解離しないことから構造変化が起こっていると予想される。

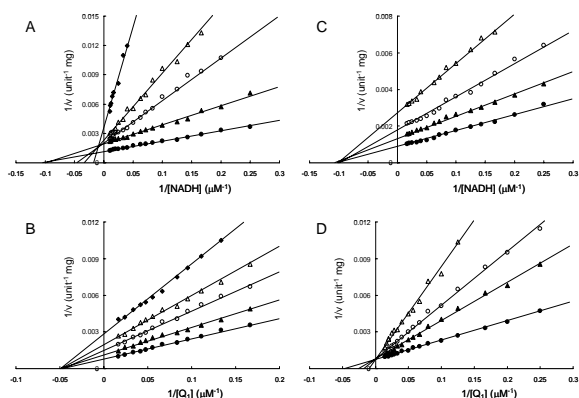


図4 Reactive blue-2 による NADH に対する阻害様式(A)および UQ<sub>1</sub> に対する阻害様式(B)、ユビキノールによる NADH に対する阻害様式(C)および UQ<sub>1</sub> に対する阻害様式(D)

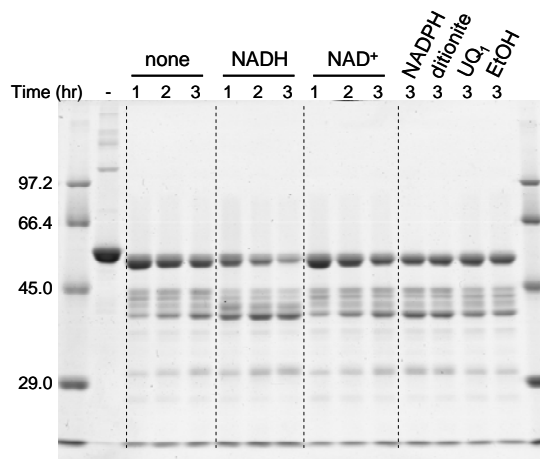


図5 様々な基質を加えた後にプロテアーゼで切断した Ndi1 の SDS-PAGE、NADPH、ジチオナイトで還元しても切断パターンに変化は無い。Time: プロテアーゼ処理の時間

結合型キノンに関しては、ピンポンbibi機構において、第一基質である NADH が酵素に結合する前にキノンが結合することはないため、単独で酵素に結合しているキノンは基質であるキノンではなく、FAD と同じく補欠分子族様の機能をしていると考えてきたが、今回の結果より、結合型キノンといわれるキノンは実は第一基質として酵素に結合し、その後 NADH が酵素に結合した ternary complex を形成することで NADH から FAD を介してキノンへスムーズに電子伝達を行っているのではないかと予想された。

## 5. 主な発表論文

[学会発表] (計 2 件)

- ① 山下哲生、楊宇、小木曾 (中丸) 映子、三芳秀人、矢木 (松野) 明美、矢木隆雄、小坂博昭、酵母シングルサブユニット・NADH-キノン酸化還元酵素 (Ndi1) のキノン還元部位の解析、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、2007 年 12 月 13 日、横浜
- ② 山下哲生、楊宇、小木曾 (中丸) 映子、三芳秀人、矢木 (松野) 明美、矢木隆雄、小坂博昭、酵母シングルサブユニット・NADH-キノン酸化還元酵素 (Ndi1) のキノン還元部位の解析、日本生体エネルギー研究会 第 33 回討論会、2007 年 11 月 16 日、山口

6. 研究組織  
(1) 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