

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20380068

研究課題名 (和文) 阻害剤分子プローブの創製に基づくミトコンドリア複合体-I の膜ドメイン機能の解明

研究課題名 (英文) Exploring the function of membrane domain of mitochondrial complex-I on the basis of synthesis of inhibitor probes

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

研究成果の概要 (和文)：ウシ心筋ミトコンドリア複合体-I (NADH-ユビキノン酸化還元酵素) の強力な阻害剤であるキナゾリンおよび Δ lac-アセトゲニンの結合部位を光親和性標識法で明らかにするために、光反応性プローブをそれぞれ合成した ($[^{125}\text{I}]\text{AzQ}$ および $[^{125}\text{I}]\text{DAA}$)。 $[^{125}\text{I}]\text{AzQ}$ は、49 kDa サブユニットと ND1 サブユニットの境界に結合することがわかった。 $[^{125}\text{I}]\text{DAA}$ は ND1 サブユニットのマトリックス側に位置する第3ループ領域に結合することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：To identify the binding site of quinazoline and Δ lac-acetogenin in bovine heart mitochondrial complex-I (NADH-quinone oxidoreductase), we synthesized photoreactive probes $[^{125}\text{I}]\text{AzQ}$ and $[^{125}\text{I}]\text{DAA}$, respectively. We revealed that $[^{125}\text{I}]\text{AzQ}$ binds at the interface of the 49 kDa and ND1 subunits. On the other hand, careful examination of the fragmentation patterns of the ND1 subunit cross-linked by $[^{125}\text{I}]\text{DAA}$ strongly suggested that the cross-linked residues are located at two different sites in the third matrix-side loop connecting the 5th and 6th transmembrane helices.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：細胞機能調節物質、ミトコンドリア、複合体-I、光親和性標識

1. 研究開始当初の背景

NADH-ユビキノン酸化還元酵素 (以後、複合体-I と呼ぶ) はミトコンドリア呼吸鎖系の初発酵素で、ATP 合成や物質輸送の駆動力となるプロトンポンプ活性を有するエネルギー代謝にとって極めて重要な酵素である。ヒトでは、複合体-I の機能障害による活性酸素の発生や ATP 生成量の低下が原因となって、パーキンソン病などの神経変性疾患や種々のミトコンドリア病が発症することがわか

ってきた。また、農業科学分野では殺虫・殺ダニ剤の新しいターゲット酵素としても近年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、哺乳類ミトコンドリアの複合体-I は 45 個の異なるサブユニットから構成される巨大な膜酵素 (980 kDa) であるために、安定に単離・保存することが未だに容易でなく、呼吸鎖酵素の中で最も研究の進展が遅れている酵素である。複合体-I は親水性ドメイ

ンと膜ドメインからなるL字型構造を取っていることが電子線解析からわかっていたが、昨年、好熱菌複合体-Iの親水性ドメイン単独の結晶構造が解かれ、NADHから電子を受容する1個のフラビン(FMN)とこれに続く9個の鉄-イオウ錯体の位置がそれぞれ明らかになった。

しかし、ユビキノンを還元とこれに共役したプロトンポンプ活性という酵素の中核機能を担っている膜ドメインについての知見は極めて限られている。例えば、「ユビキノン反応部位や阻害剤結合部位がどこに何個あるのか」という基本的なことさえわかっていない。また、活性酸素の発生源としては3つのラジカル中間体[FMN/鉄-イオウ錯体(特に、N₂錯体)/ユビキノンラジカル]が候補として挙げられているが、未だに明確な結論は得られていない。このように、複合体-I研究を格段に発展させるためには、膜ドメインについての機能解明の進展が急務であった。

2. 研究の目的

強力な阻害剤の作用部位は、膜ドメインの中核機能を担っている反応場(ホットスポット)であると考えられることから、独自に合成開発した天然型アセトゲニンおよびユニークな2系統の阻害剤プローブの結合部位をアミノ酸残基レベルで明らかにすることによって作用機構研究をさらに進展させ、膜ドメインの機能とこれを担う酵素の構造的基盤を解明することを本研究の目的とした。

具体的には、以下の3つの研究課題を遂行することを計画した。

(1)天然型アセトゲニンの光親和性標識プローブ[¹²⁵I]TDAがND1サブユニットに結合することを受けて、[¹²⁵I]TDAで架橋したND1のタンパク質化学的解析をさらに進展させることによって、結合部位をアミノ酸残基レベルで明らかにする。これとは別に、Δlac-アセトゲニンとキナゾリン型阻害剤の光親和性標識プローブ([¹²⁵I]DAAおよび[¹²⁵I]AzQ)を新たに設計・合成し、両者の結合サブユニットをそれぞれ明らかにした後、プローブ分子で架橋されるアミノ酸残基を同定する。

(2)上記で同定されたウシ心筋複合体-Iの阻害剤結合領域に相当する大腸菌酵素の領域に、アミノ酸変異を集中的に導入した一連の変異酵素を作製し、これを用いて各阻害剤に対する感受性の変動を精査することによって、阻害剤の結合に関与するアミノ酸残基を総合的に明らかにする[海外共同研究者・矢木隆夫(米国 Scripps 研究所・教授)との共同研究]。

(3)天然アセトゲニンとΔlac-アセトゲニンでは活性酸素の発存量が顕著に異なることに着目し、EPR(電子常磁性共鳴)スペク

トルによってFMN/N₂錯体/ユビキノンラジカルの3つのラジカル中間体の電子環境に及ぼす影響を両化合物の間で比較する。このEPR情報と上記の結合部位に関する構造情報とを統合することによって活性酸素の発生源を同定する。

3. 研究の方法

(1)光親和性標識実験の方法について概略を箇条書きする。

①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を光親和性プローブ存在下でUV照射し、複合体-Iに結合させた。このミトコンドリア内膜標品をBN-PAGE(5-15%ゲル)に供して複合体-Iのバンドを単離した。

②得られた複合体-IをSDS-PAGEに供して光親和性プローブで架橋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。期待される全てのペプチド断片の分子量を予測した。

③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、ゲルのオートラジオグラフィ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た消化パターンとの比較から、断片の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末端シーケンスを実施した。

④非放射性プローブを用いてスケールアップした条件下で同様の実験を行い、同定した架橋ペプチドを質量分析が繰り返し実施できる量まで精製・蓄積した。得られた架橋ペプチドについて精密質量分析(MALDI-TOF-MS、LC-MS/MS)を行い、プローブ分子の結合に関わるアミノ酸残基の同定を試みた。

(2)目的2の大腸菌変異酵素の作成は、海外共同研究者の矢木研究室で行われた実験であるため、ここでは記述することを省略する。実験の詳細は、*JBC* 284, 9814-9823, 2009に報告されている。

(3)ウシ心筋ミトコンドリアからの複合体-Iの精製がうまくいかなかったため、目的3で記載したEPR測定には至らなかった。

4. 研究成果

[¹²⁵I]TDAで標識したND1サブユニットを限定消化し、ペプチドマッピングによって結合部位の同定を試みた。その結果、[¹²⁵I]TDAは

4番目か5番目の膜貫通ヘリックス (Val144-Glu192) に結合することが明らかになった。両ヘリックスの中間に位置する Glu170 で切断できなかったため、いずれの膜貫通ヘリックスかは同定できなかった。

キナゾリン型阻害剤の光反応性プローブ $[^{125}\text{I}]\text{AzQ}$ を合成し (図 1)、光親和性標識を実施した。 $[^{125}\text{I}]\text{AzQ}$ は、親水性ドメインの 49 kDa サブユニットと膜ドメインの ND1 サブユニットを 4:1 の比率で標識した。このことから、両サブユニットの境界に結合していることが強く示唆された。標識された 49 kDa サブユニットに対して限定ペプチド消化と、エドマン分解による N 末シーケンスを行ってペプチドマッピングしたところ、 $[^{125}\text{I}]\text{AzQ}$ は Asp41-Arg63 の領域に結合することが明らかになった。サブユニット以下のレベルで阻害剤結合部位を明らかにしたのは本研究が初めてである。

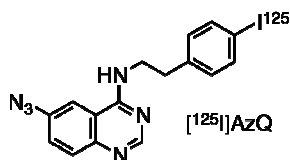


図 1. $[^{125}\text{I}]\text{AzQ}$ の構造。

Δlac -アセトゲニンとは三芳の研究室で合成開発された複合体-I 阻害剤であり、従来の阻害剤では見られないユニークな特性を有する。この特異な阻害剤の詳細な作用機構研究は、複合体-I 研究を進める推進力になることが期待されるため、光親和性標識を実施し、結合部位を明らかにしようとした。

Δlac -アセトゲニンの bis-THF 環部分に光反応性のジアジリン環を導入した $[^{125}\text{I}]\text{DAA}$ を合成した (図 2)。光親和性標識の結果、 $[^{125}\text{I}]\text{DAA}$ は膜ドメインを構成する ND1 サブユニットに特異的に結合することがわかった。標識された ND1 サブユニットに対して限定ペプチド消化を行ってペプチドマッピングしたところ、bis-THF 環部は 5 番目と 6 番目の膜貫通ヘリックスを結ぶマトリックス側ループの site-B に結合していることを明らかにした (図 3)。また、天然型アセトゲニンの bis-THF 環部は、site-A に結合することがわかった。

海外共同研究者の矢木グループでは、大腸菌複合体-I の ND1 および ND5 サブユニットに部位特異的変異を導入することに成功した (*JBC* 284, 9814-9823, 2009)。今後、ND1 変異酵素に関して、上記阻害剤の感受性や標識パターンが野生型酵素と比べてどのように変化するかを調べ、阻害剤の結合様式について更に詳細な情報を得ていきたい。

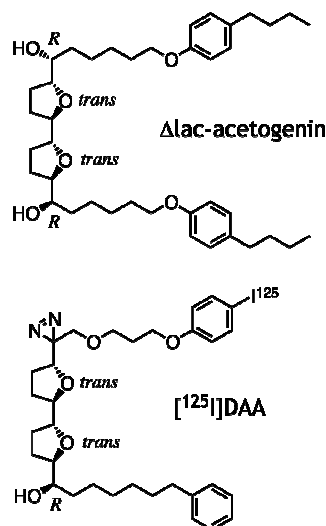


図 2. Δlac -アセトゲニンと $[^{125}\text{I}]\text{DAA}$ の構造。

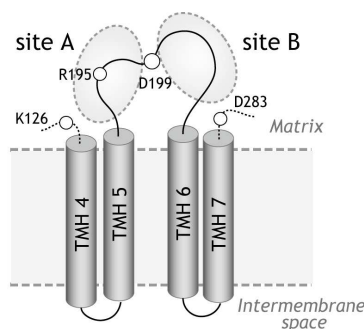


図 3. ND1 サブユニットにおける $[^{125}\text{I}]\text{DAA}$ の THF 環部の結合部位を示す。図の上方に親水性ドメインが位置する。

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 13 件)

- ① Kakutani, N., Murai, M., Sakiyama, N., and Miyoshi, H. (2010) Exploring the binding site of Δlac -acetogenin in bovine heart mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase, *Biochemistry* 49, 4794-4803. (査読あり)
- ② Murai, M., Yamashita, T., Senoh, M., Mashimo, Y., Kataoka, M., Kosaka, H., Matsuno-Yagi, A., Yagi, T. and Miyoshi, H. (2010) Characterization of the ubiquinone binding site in alternative NADH-quinone oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* by photoaffinity labeling, *Biochemistry* 49,

- 2973-2980. (査読あり)
- ③ Sekiguchi, K., Murai, M. and Miyoshi, H. (2009) Exploring the binding site of acetogenin in the ND1 subunit of bovine mitochondrial complex I, *Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)* 1787, 1106-1111. (査読あり)
- ④ Murai, M., Sekiguchi, K., Nishioka, T. and Miyoshi, H. (2009) Characterization of the inhibitor binding site in mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase by photoaffinity labeling using a quinazoline-type inhibitor, *Biochemistry* 48, 688-698. (査読あり)
- ⑤ Ichimaru, N., Murai, M., Kakutani, N., Kako, J., Ishihara, A., Nakagawa, Y., Nishioka, T., Yagi, T. and Miyoshi, H. (2008) Synthesis and characterization of new piperazine-type inhibitors for mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I), *Biochemistry* 47, 10816-10826. (査読あり)
- ⑥ Abe, M., Kubo, A., Yamamoto, S., Hatoh, Y., Murai, M., Hattori, Y., Makabe, H., Nishioka, T., and Miyoshi, H. (2008) Dynamic function of the spacer region of acetogenins in the inhibition of bovine mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I), *Biochemistry* 47, 6260-6266. (査読あり)

[学会発表] (計 11 件)

- ① 日本農芸化学会・平成 23 年度大会、平成 23 年 3 月 27 日 (京都女子大学)、村井正俊、崎山直人、白石、祐輔、安部真人、三芳秀人：ミトコンドリア複合体-I に作用する光反応性フェンピロキシメートの結合部位の同定
- ② 日本農芸化学会・平成 23 年度大会、平成 23 年 3 月 27 日 (京都女子大学)、中西佐予、安部真人、山本修平、村井正俊、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
- ③ 日本農薬学会・平成 23 年度大会、平成 23 年 3 月 17 日 (玉川大学)、村井正俊、崎山直人、白石、祐輔、安部真人、三芳秀人：ミトコンドリア複合体-I に作用する光反応性フェンピロキシメートの結合部位の同定(1)
- ④ 日本農薬学会・平成 23 年度大会、平成 23 年 3 月 17 日 (玉川大学)、崎山直人、村井正俊、白石、祐輔、安部真人、三芳秀人：ミトコンドリア複合体-I に作用する光反応性フェンピロキシメートの結合部位の同定(2)
- ⑤ 生体エネルギー研究会・平成 22 年討論会、平成 22 年 11 月 19 日 (大阪大学銀杏会館)、村井正俊、角谷信至、崎山直人、三芳秀人：ミトコンドリア複合体-I 阻害剤 Δ lac-アセトゲニンの結合部位の解明

- ⑥ 日本農薬学会・平成 22 年度大会、平成 22 年 5 月 29 日 (北海道大学学術交流会館)、村井正俊、角谷信至、崎山直人、三芳秀人：ミトコンドリア複合体-I 阻害剤 Δ lac-アセトゲニンの結合部位の同定
- ⑦ 日本農薬学会・平成 21 年度大会、平成 21 年 3 月 18 日 (東京大学弥生講堂)、村井正俊、関口孝治、三芳秀人：ミトコンドリア複合体-I に作用するアセトゲニンの結合部位の解析
- ⑧ 日本農薬学会・平成 21 年度大会、平成 21 年 3 月 18 日 (東京大学弥生講堂)、関口孝治、村井正俊、三芳秀人：光親和性標識法によるミトコンドリア複合体-I 阻害剤キナゾリンの結合部位の解析
- ⑨ 生体エネルギー研究会・平成 20 年討論会、平成 20 年 11 月 6 日 (東京医科歯科大学 5 号館講堂)、村井正俊、関口孝治、三芳秀人：光親和性標識法によるキナゾリン型阻害剤のミトコンドリア複合体-I における結合部位の解明

[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

(2) 研究分担者

()
 研究者番号：

(3) 連携研究者

()
 研究者番号：