

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 27日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658039

研究課題名（和文） ミトコンドリア呼吸鎖酵素の超感度アッセイを実現する伝導性キノン修飾電極の開発

研究課題名（英文） Development of conductive quinone-modified Au-electrode enabling super-sensitive detection of the activities of mitochondrial respiratory enzymes

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）：極微量のミトコンドリア試料を使って超感度で呼吸鎖酵素の活性を評価できるアッセイ方法論が確立できれば、呼吸鎖酵素阻害剤の開発研究を大幅に効率化できるだけでなく、ヒトの組織など、極めて限られた量のミトコンドリア試料を用いなければならない生体エネルギー研究全般に及ぼす波及効果は大きい。これを実現するために、呼吸鎖酵素活性を反映した“キノンプール”の平衡状態を電極反応に直結させ、電気化学的に解析することを可能にする伝導性キノン修飾金電極を開発することを目的として研究を行った。

研究成果の概要（英文）：Development of an assay system, which enables super-sensitive detection of the activities of respiratory enzymes in mitochondrial membrane, is very useful for the bioenergetic studies of highly limited amount of preparative mitochondria such as human tissues. To this end, we tried to make a conductive quinone-modified Au-electrode, which can detect the enzyme activities by monitoring a change in the redox-state of “quinone pool” of inner mitochondrial membrane.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	0	2,000,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

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：ミトコンドリア、呼吸鎖酵素、ユビキノ、修飾電極

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア呼吸鎖酵素は、ATP 生合成の駆動力となるプロトンポンプ活性を有し、細胞のエネルギー代謝を担っている。呼吸鎖酵素阻害剤は極めて速効性に優れているため、その選択毒性さえ確保されれば、殺虫・殺菌剤や抗寄生虫薬の有望な候補化合物になることが期待されている。

ミトコンドリア呼吸鎖は、NADH-ユビキノ酸化還元酵素（複合体-I）、コハク酸-ユビキノ酸化還元酵素（複合体-II）、ユビキノール-シトクロム c 酸化還元酵素（複合体-III）、およびシトクロム c 酸化酵素（複合体-IV）の4つの膜タンパク質複合体から構成されている。新しい呼吸鎖酵素阻害剤の開発研究では、注目する化合物の作用点がどの

複合体にあるかを明らかにすることが出発点となる。そのために、対象生物の組織からミトコンドリアを単離精製し、複合体ごとに適切な電子供与体と電子受容体を組み合わせて酵素活性を評価しなければならない。ダニ類や寄生虫類のように個体サイズの小さな生物では、ミトコンドリアを調製するだけでも多大な労力を要するため、各複合体の活性を個別に評価するために必要な充分量のミトコンドリアを調製することは容易なことではない。特に、企業における薬剤開発のように、膨大な化合物セットについて呼吸鎖酵素系における作用点や阻害強度を判定するためには、これまでになく格段に効率的なアッセイ方法の確立が強く望まれる。

2. 研究の目的

このような背景を考慮した時、極微量のミトコンドリア試料を使って超感度で呼吸鎖酵素活性を評価できる全く新しいアッセイ方法論が確立できれば、呼吸鎖酵素阻害剤の開発研究を大幅に効率化できるだけでなく、極めて限られた量のミトコンドリア試料しか利用することができないという制約を持った研究課題全般に対しても、大きく貢献できるものと期待される。そこで我々は、従来のように各複合体の酵素活性を生化学的に個別に評価するのではなく、ミトコンドリア内膜脂質相に全複合体の数よりも大過剰に存在するユビキノン（“キノンプール”と呼ばれる）の動的な酸化還元平衡に着目した。すなわち、以下に述べるように、各複合体の活性とキノンプールの酸化還元平衡電位の間には一定の相関関係が認められることに注目し、キノンプールの酸化還元平衡電位が何らかの方法で検出できたならば、どの複合体の活性が低下したかを迅速に決定できると考えた。

我々は、動的平衡にあるキノンプールの酸化還元平衡電位の変化を検出する方法として伝導性ユビキノン修飾金電極の開発を考えた。

すなわち、本研究では酸化還元電位測定マーカーとしてのユビキノンを伝導性分子ワイヤーに取り付けた新規な修飾金電極を合成・開発し、これにミトコンドリア内膜試料を直結させることによって、定常状態（動的平衡）にあるキノンプールの酸化還元電位の変化を超感度にポテンシオメトリ的に検出する方法を提示し、それを広範な生体エネルギー研究に展開することを目的として研究を行った。本研究で目指す修飾金電極の概

念図を図1に示した。

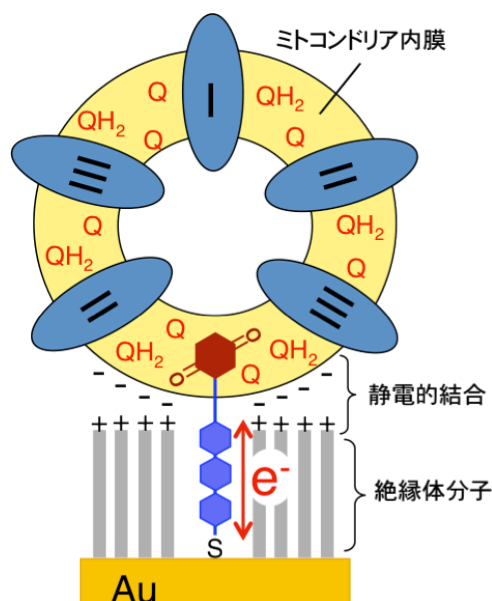


図1. ユビキノン伝導性分子ワイヤーで修飾した金電極、およびキノンプールの酸化還元電位のポテンシオメトリ的検出の概念図。図中の I、II、III は、それぞれ呼吸鎖酵素複合体-I、複合体-II、複合体-III を意味する。また、Q と QH₂ は、それぞれ酸化型キノンおよび還元型キノールを現す。

3. 研究の方法

金電極表面に自己集積単分子膜を形成させるための伝導性ユビキノンワイヤー分子として化合物 A をデザインした。化合物 A の合成方法の概略を図2に示した。

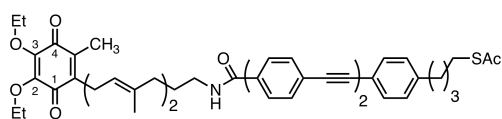
合成過程は大きく分けて、キノン側鎖の合成（合成方法1）、キノン環への側鎖の導入（合成方法2）、電子リレーユニットとして機能させるフェニルエチニルユニットの合成（合成方法3）からなる。フェニルエチニルユニットの末端には SAc (S-OC-CH₃) 基を導入し、自己集積単分子膜を構成させることにした。最後に化合物 C と D を縮合アミド化し、化合物 A を得た。

呼吸鎖酵素活性を評価するに当たり、ミトコンドリア標品としてウシ心筋ミトコンドリアおよびイエバエ飛翔筋ミトコンドリアを定法に従って調製した。ミトコンドリアは外膜と内膜から構成されているが、内膜を電極に直結させるため、常法の超音波処理法によって、内膜のみから形成される小胞（垂ミトコンドリア粒子）を調製した。垂ミトコンドリア粒子は、いわば純粋なミトコンドリア

内膜標品であると考えて差し支えない。

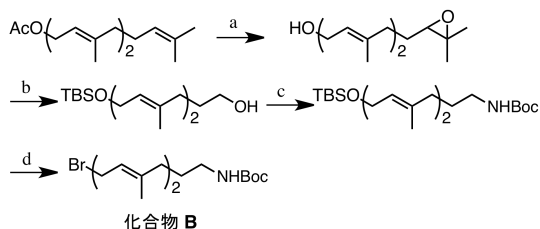
4. 研究成果

伝導性ユビキノンワイヤー分子(化合物 A)の合成は、大きく分けて3つの部分構造に分割して進めた(図2)。合成方法1のイソプレン側鎖部分の合成は、これまでに三芳らが開発してきたユビキノン合成の方法に従って実施し(*Biochemistry* 49, 2973-2980, 2010)、良好な収率で合成することができた。電子移動の効率を考慮し、イソプレン単位は2個に固定した。



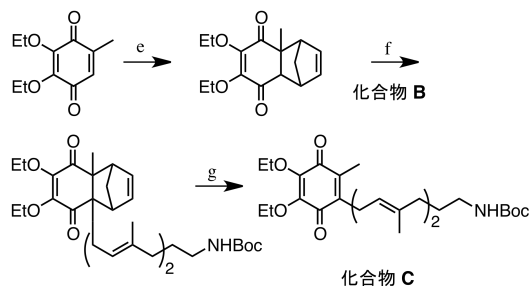
化合物 A

合成方法 1



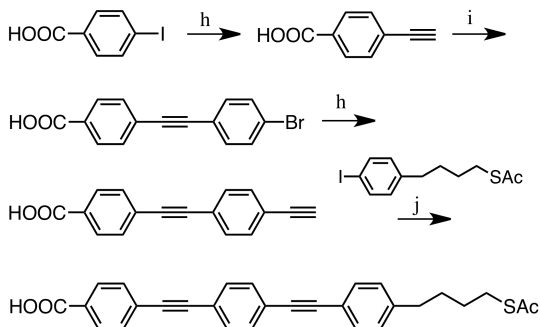
化合物 B

合成方法 2



化合物 C

合成方法 3



化合物 D

図2. Reagents and conditions: (a) i) NBS, THF/H₂O, 0 °C to rt, 1 h, 66%; ii) K₂CO₃, MeOH; (b) i) NaIO₄, H₅IO₆, THF/H₂O (2/1, v/v), 0 °C to rt, 1 h, 87%; ii) TBSCl, imidazole, dry DMF, rt, 5 h, 79%; iii) NaBH₄, MeOH, 0 °C to rt, 30 min, 85%; (c) i) Et₃N, MsCl, THF, 0 °C, 30 min, 97%; ii) NaN₃, dry DMF, 3 h, 85%; iii) (Boc)₂O, Lindlar, MeOH, 9 h, 88%; (d) i) TBAF, THF; ii) CBr₄, PPh₃, CH₂Cl₂, 9 h, 65% (2 steps); (e) cyclopentadiene, rt, 6 h, 93%; (f) *t*-BuOK, DMF/THF (3/2, v/v), -40 to 0 °C, 1 h, 65%; (g) toluene, reflux, 2 h, 87%; (h) TBS-acetylene, Pd(Ph₃P)₂Cl₂, CuI, THF, rt, 6 h, 60%; (i) 1-bromo-4-iodobenzene, Pd(Ph₃P)₂Cl₂, CuI, THF, rt, 6 h, 50%; (j) Pd(Ph₃P)₂Cl₂, CuI, THF, rt, 6 h, 32%.

一方、電子移動に直接的に関わるフェニルエチニルユニットの合成では(合成方法3)、当初 SH 基を末端に有する基質を用いて j ステップの反応を試みたが、S-S 結合形成によると思われる酸化副反応のため、低収率に止まった。

そこで、SH 基の代わりにアセチル保護した SAc 基を用いたところ、一定の収率の改善はなされたものの、依然として 20-30%に止まり、大幅な改善には至らなかった。修飾電極の作製を優先することから、これ以上の合成条件の検討は行わなかった。

伝導性ユビキノンワイヤー分子(化合物 A)の合成を完了したことから、これを用いて Au 電極表面に自己組織化単分子膜を定法に従って形成させた。サイクリックボルタンメトリーによって、自己組織化単分子膜に構成したキノン頭部の酸化還元反応を検出することができた。電極との電子授受の効率は、イソプレン側鎖の長さによって大きく影響を受けることが予想される。本来ならば、イソプレン側鎖部をできる限り長くして、キノン頭部とミトコンドリア内膜との接触(装填)を十分に保証したいところであるが、この相反する2つの因子の調整が今後の課題であると考えられる。

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)

[学会発表] (計1件)

日本農芸化学会・平成24年度大会、平成24年3月25日(京都女子大学) 工藤佐和子、村井正俊、矢崎一史、三芳秀人: ユビキノン

プローブの創製と出芽酵母におけるユビキ
ノン結合性タンパク質のスクリーニング

[その他]

ホームページ等

[http://www.biofunc-chem.kais.kyoto-u.ac
.jp/](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

加納健司 (KANO KENJI)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：10152828

(3) 連携研究者

()

研究者番号：