

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380064

研究課題名(和文)呼吸鎖酵素複合体-Iの鍵サブユニットND1の機能解明

研究課題名(英文)Study on the function of ND1 subunit, a key subunit of respiratory complex I

研究代表者

三芳 秀人(Miyoshi, Hideto)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20190829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

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-キノン酸化還元酵素)の膜ドメインに位置するND1サブユニットは、本酵素の鍵サブユニットである。ND1サブユニットの機能および構造特性に関する知見を得るために、ND1に特異的に作用する阻害剤プローブを設計・合成し、結合部位を光親和性標識法により同定した。また、アセトゲニンをリガンドとするligand-directed tosyl(LDT)化学法によって、複合体-Iに対して位置特異的に化学修飾(アルキル化)することに成功した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the functional and structural aspects of the ND1 subunit, which is a key subunit of the membrane domain of bovine heart mitochondrial complex I (NADH-quinone oxidoreductase), I synthesized unique inhibitor probes acting to the ND1 and identified their binding sites via photoaffinity labeling experiment. In addition, I succeeded in site-specific chemical labeling (alkynylation) via ligand-directed tosyl (LDT) chemistry using acetogenin as a high affinity ligand against complex I.

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 ミトコンドリア呼吸鎖酵素

## 1. 研究開始当初の背景

NADH-キノン酸化還元酵素(複合体-I)は、ミトコンドリア電子伝達系の初発酵素で、ATP 合成の駆動力となるプロトンポンプ活性を有する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 ATP 合成量の低下や活性酸素の発生が原因となって、パーキンソン病などの神経変性疾患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・殺ダニ剤の有力な標的酵素としても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 は巨大な膜酵素であるために、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構成される。2013 年に好熱菌 *Thermus thermophilus* 複合体-I (総サブユニット数 15 個) の全体構造が分解能 3.4 Å で解かれ、特徴的な L 字型構造を取っていることがわかった。しかし、分解能の限界のため、ユビキノン還元反応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依然として極めて限られているのが現状であり、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研究の進展が急務である。

代表者は、ウシ心筋ミトコンドリア複合体-I の強力な阻害剤である天然アセトゲニンの光反応性プローブを有機合成し、光親和性標識実験を行ってきた。その結果、アセトゲニンは膜ドメインを構成する約 30 個のサブユニットの内、“ND1” と呼ばれる 8 本の TMH を持つサブユニットに特異的に結合することがわかった。そして、 $\gamma$ -ラクトン環部の結合部位は 4 番目あるいは 5 番目の TMH 内に、bis-THF 環部の結合部位は 5 番目と 6 番目の TMH を結ぶマトリックス側ループ領域にあることを明らかにした。さらに、アセトゲニンの結合が人工ユビキノンによって顕著に抑制されたことから、ユビキノン結合部位が ND1 内に存在することを明らかにした。

同じく光親和性標識法によって、キナゾリン型阻害剤が親水性ドメインの“49 kDa” と呼ばれるサブユニットと ND1 を共に架橋する事実を示し、両サブユニットが互いに隣接していることを初めて実証した。

以上のように、膜ドメインの ND1 サブユニットが阻害剤や基質ユビキノンの結合部位を形成する複合体-I のホットスポットであることを明らかにしてきた。遺伝性視神経萎縮症などのミトコンドリア病の原因となるアミノ酸変異が ND1 に多く認められることから、ND1 の機能的な重要性が従来から指摘されていることと矛盾しない。

## 2. 研究の目的

複合体-I の作動メカニズムとしては、親水性ドメインにおける酸化還元反応が駆動力となって膜ドメインの構造変化が誘導され、これに共役してプロトンポンプ活性が発揮されると考えられている。これが事実とすれば、両ドメインの接点に位置する ND1 サブユニットが極めて重要な役割を担っていることは明らかである。

そこで本研究では、鍵サブユニットである ND1 の機能や動的構造変化の特性を明らかにすることを目的とし、以下の 3 つの研究課題に取り組んだ。

(1) キナゾリン型阻害剤が ND1 と 49 kDa サブユニットの境界領域に特異的に結合することが示唆されたが、ND1 上の結合部位の同定には至っていない。そこで、ウシ心筋複合体-I の単離酵素について光親和性標識実験を行い、結合部位を同定する。これによって、両サブユニット間の相互作用を明らかにする。

(2) 「フェンピロキシメートは ND5 サブユニットに結合する」との先行研究があるが (*Biochemistry* 42, 746-754, 2003)、*T. thermophilus* 複合体-I の結晶構造から考えて、この結論は再考されるべきであろう。そこで、新たに光反応性フェンピロキシメート類を合成し、光親和性標識によって結合部位を同定する。

(3) タンパク質に対して部位特異的に合成分子を置換させる方法として ligand-directed tosyl (LDT) chemistry が注目されている。阻害剤の高い結合特異性を利用する LDT chemistry の原理に基づき、ND1 の構造変化を分光学的にリアルタイムで検出するための機能性を備えたプローブ基を ND1 選択的に置換(固定)させるための方法論を確立する。

## 3. 研究の方法

### (1) 化合物の合成

キナゾリンおよびフェンピロキシメートを鋳型として、光反応性の類縁体を合成した [キナゾリン: [<sup>125</sup>I]AzQ (図 1)、フェンピロキシメート: [<sup>125</sup>I]APF と [<sup>125</sup>I]AIF (図 2)]、フェンピロキシメートについては、分子左のトキソフォア一部と分子右の側鎖部にそれぞれ光分解性基を導入した。これらの化合物を、光親和性標識に供した。また、アセトゲニンの高い結合親和性に着目し、側鎖部にアルキル化したトシル構造を導入したアセトゲニンリガンドを設計・合成した(図 3)。

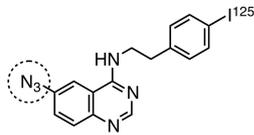


図1 キナゾリン<sup>[125I]</sup>AzQの構造。

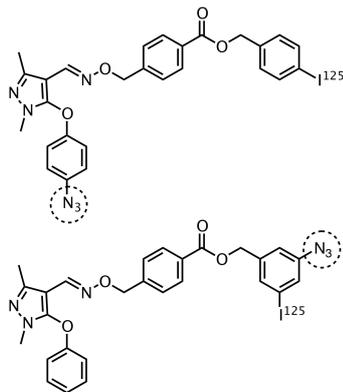


図2 フェンピロキシメート<sup>[125I]</sup>APF(上)と<sup>[125I]</sup>AIF(下)の構造。

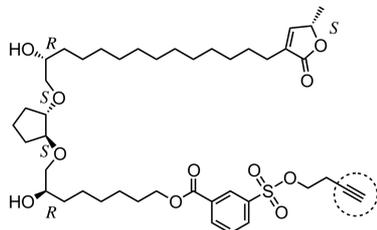


図3 アセトゲニンリガンドの構造。

(2) 光親和性標識実験の方法について概略を箇条書きする。

ウシ心臓の筋肉組織から調製した垂ミトコンドリア粒子(SMP)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。アセトゲニンリガンドを用いたLDT chemistryでは、化合物とSMPを35で1日インキュベートし、置換反応を完結させた。置換した末端アルキンに対してclick chemistryで蛍光TAMRAを結合させた。

光親和性標識、または、LDT chemistry処理した複合体-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。

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ー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。

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。

#### 4. 研究成果

(1) <sup>[125I]</sup>AzQはnMレベルの強力な阻害活性を維持することを確認した。光親和性標識実験の結果、<sup>[125I]</sup>AzQは49 kDaサブユニット(Asp41-Arg63)とND1サブユニット(Asp199-Lys262、マトリックス側第3ループ内)を同時に標識することがわかり、両領域の接触する境界に結合していることが強く示唆された。このことは、*Thermus thermophilus* 複合体-Iの結晶構造と照らし合わせても、納得のいくものである(*Nature* 494, 443-448, 2013)。

(2) <sup>[125I]</sup>APF、<sup>[125I]</sup>AIFともに、nMレベルの強力な阻害活性を維持することを確認した。<sup>[125I]</sup>APFはPSSTサブユニットのSer43-Arg66、<sup>[125I]</sup>AIFは49 kDaサブユニットのAsp160-Arg174の領域にそれぞれ結合することがわかった。このことから、フェンピロキシメートはヘテロ環部をPSSTに、疎水性側鎖部を49 kDaにそれぞれ配向して結合することが明らかになった(図4)。

2003年に「フェンピロキシメートは、膜ドメイン末端に位置するND5サブユニットに結合する」と結論付ける論文が報告されたが(*Biochemistry* 42, 746-754, 2003)これは間違いであることが明らかになった。

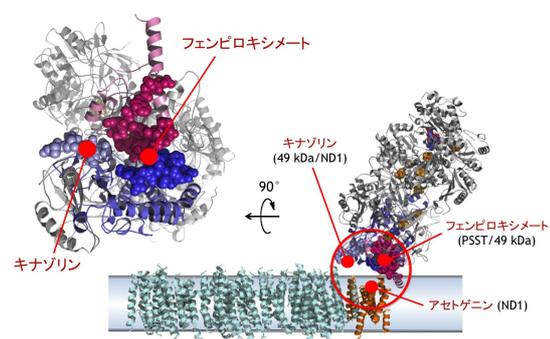


図4 ウシ心筋ミトコンドリア複合体-Iで明らかになったフェンピロキシメートおよびキナゾリンの結合部位を*Thermus thermophilus* 複合体-Iの結晶構造に当ては

めたモデル。

(3) アセトゲニンリガンドのトシル基に取り付けた末端アルキンは、49 kDa サブユニットに特異的に取り込まれることが明らかになった。詳細なペプチド化学分析の結果、修飾されたアミノ酸残基は Asp160 であった。LDT chemistry の反応収率は約 50% と算出でき、光親和性標識よりも格段に高いことがわかった。

しかし、末端アルキンが Asp160 に求核置換することによって酵素活性は完全に失活することが判明した。この失活は、Asp160 がキノン結合ポケットを構成する空間に位置する重要な残基であるためと予想できた。

## 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6件)

Masuya, T., Murai, M., Ifuku, K., Morisaka, H., and Miyoshi, H. (2014) Site-specific chemical labeling of mitochondrial respiratory complex I through ligand-directed tosylate chemistry, *Biochemistry* 53, 2307-2317. (査読有り)

Kojima, N., Abe, M., Suga, Y., Ohtsuki, K., Tanaka, T., Iwasaki, H., Yamashita, M., and Miyoshi, H. (2013) Critical role of a methyl group on the  $\gamma$ -lactone ring of annonaceous acetogenins in the potent inhibition of mitochondrial complex I, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 1217-1219. (査読有り)

Shiraishi, Y., Murai, M., Sakiyama, N., Ifuku, K., and Miyoshi, H. (2012) Fenpyroximate binds to the interface between PSST and 49 kDa subunits in mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase, *Biochemistry* 51, 1953-1963. (査読有り)

Yamamoto, S., Abe, M., Nakanishi, S., Murai, M., and Miyoshi, H. (2011) Synthesis and characterization of photoaffinity probe of acetogenin, a strong inhibitor of mitochondrial complex I, *Tetrahedron Lett.* 52, 3090-3093. (査読有り)

Murai, M., Mashimo, Y., Hirst, J., and Miyoshi, H. (2011) Exploring interactions between the 49 kDa and ND1 subunits in mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) by photoaffinity labeling, *Biochemistry* 50, 6901-6908. (査読有り)

Nakanishi, S., Abe, M., Yamamoto, S., Murai, M., and Miyoshi, H. (2011) Bis-THF motif of acetogenin binds to the third matrix-side loop of ND1 subunit in mitochondrial

NADH-ubiquinone oxidoreductase. *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 1170-1176. (査読有り)

[学会発表](計7件)

日本農薬学会・平成 26 年度大会、平成 26 年 3 月 14 日(京都大学農学部) 榎谷貴洋、村井正俊、三芳秀人: ミトコンドリア複合体-I の位置特異的的化学修飾

日本農芸化学会・平成 26 年度大会、平成 26 年 3 月 29 日(明治大学生田キャンパス) 榎谷貴洋、村井正俊、三芳秀人: ミトコンドリア NADH-ユビキノン酸化還元酵素(複合体-I) の部位特異的的化学修飾

日本農芸化学会・平成 25 年度大会、平成 25 年 3 月 26 日(東北大学川内北キャンパス) 村井正俊、白石悠助、崎山直人、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

日本農芸化学会・平成 25 年度大会、平成 25 年 3 月 26 日(東北大学川内北キャンパス) 浅野周、村井正俊、三芳秀人: ミトコンドリア複合体-I に作用するキナゾリン型阻害剤の結合部位の同定

日本農芸化学会・平成 25 年度大会、平成 25 年 3 月 26 日(東北大学川内北キャンパス) 土生沙綾子、村上園美、村井正俊、三芳秀人: 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縁体の合成と作用機構

日本生体エネルギー研究会・平成 25 年度討論会、平成 25 年 12 月 19 日(静岡県コンベンションアーツセンター・グランシップ) 村井正俊、松延広平、川向誠、三芳秀人: 合成ユビキノンプローブを用いたミトコンドリアタンパク質 Coq10 の解析

日本農芸化学会・平成 24 年度大会、平成 24 年 3 月 24 日(京都女子大学) 中西佐子、安部真人、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結合部位の同定

[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

### (3) 連携研究者

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