

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780112

研究課題名(和文) シトクロムc カルジオリピン複合体の形成と解離に関する分子機構の化学的解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of the formation and the dissociation of the cytochrome c-cardiolipin complex

研究代表者

安部 真人 (ABE, Masato)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30543425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：カルジオリピン(CL)はミトコンドリア内膜に局在し、シトクロムc(cyt c)との複合体形成によりペルオキシダーゼ活性を誘導することがアポトーシス初動過程の鍵反応であると考えられている。本研究では、CL脂肪酸部に位置特異的に水酸基を導入することで、一連の酸化CLを合成した。これらを用いたペルオキシダーゼ誘導活性を評価した結果、どの酸化CLにおいても強いペルオキシダーゼ誘導活性を示すことがわかった。水酸基の位置や数による影響の違いはみられなかった。

研究成果の概要(英文)：Cardiolipin (CL) is a unique phospholipid in mitochondrial membranes with diverse biological functions. Induction of the peroxidase activity of cyt c by CL binding in the presence of hydrogen peroxide has been thought to be a key event in early apoptosis stage.

We synthesized a series of oxidized CLs in which four acyl chains were oxidized in different patterns. All oxidized CLs elicited strong inducing ability of the peroxidase activity of cyt c. A difference in the oxidized position including the number of OH group did not affect the inducing ability. Our results do not support a currently accepted notion that hydrophobic interaction between the acyl chains of CL and cyt c is critical for the formation of specific CL-cyt c complex and consequent induction of the peroxidase activity.

Moreover, we synthesized some photoreactive CLs. By photoaffinity labeling experiments, the labeled peptide was detected by attaching a biotin to the incorporated ethynyl group by click chemistry.

研究分野：生物生産化学・生物有機化学

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：カルジオリピン シトクロムc ミトコンドリア アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア経路によるアポトーシスでは、呼吸鎖酵素からの活性酸素の発生が誘導され、生じた酸化ストレスが引き金となってシトクロム c (cyt c) がミトコンドリアから細胞質側に漏出する。その後、cyt c によって一連のカスパーゼ反応が活性化されることによりアポトーシスが進行することがわかっている。

Cyt c の漏出は、ミトコンドリア内膜に特異的に分布するリン脂質カルジオリピン (CL) が活性酸素によって過酸化され、これによって cyt c とミトコンドリア内膜表面との結合が弱くなり、最終的に cyt c が細胞質へと流出するというものである。

CL はミトコンドリア内膜に局在するリン脂質であり、2つのリン酸基と3つのグリセロール骨格からなる親水性頭部と、4つの脂肪酸で構成される脂肪酸部をもっている。

Cyt c と CL の会合は、静電的および疎水性相互作用によって支配されていると一般に考えられている。特に、「CL 脂肪酸部は cyt c の疎水的ポケットに結合する」という“lipid-extended”モデルが広く受け入れられている。しかし、なぜ CL の過酸化物 [(CL-OOH)_n] が蓄積すると cyt c とミトコンドリア内膜表面との親和性が低下するのか？という根本的な点は明らかになっていない。

2. 研究の目的

アポトーシス初動反応の素過程に関しては化学的な視点から解決されなければならない重要な課題が残っている。特に、「そもそも“cyt c-CL 複合体”の実態とは何か？そして、CL が過酸化されることの影響はどのようなものか？」という根本的な問題を解き明かす必要がある。この目的を達成するためには、cyt c-CL 複合体の形成を促す CL の化学構造因子を明らかにする必要がある。また、光反応性 CL プローブを用いた光親和性標識実験により、cyt c-CL の結合部位を詳細に同定することが大きな鍵となると期待できる。

3. 研究の方法

CL プローブおよび CL 類縁体の化学合成方法は研究代表者がこれまでに確立した CL 全合成方法を改良して用いる。この方法は、CL 生合成経路を模倣したものであり、CL の各部位を独立に設計して組み上げることが可能になっている。従って、それぞれ必要とする部分構造を別個に調製した上で CL 分子として完成させる収束型合成によって効率的に進めることができる。具体的なルートは次のようなものである。まず、(S)-(+)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-methanol を出発物質としてジアシルグリセロールに誘導する。ここで、ジアシルグリセロールの脂肪酸組成を変更することで幅広い類縁体合成が可

能になっている。ジアシルグリセロールには脂肪酸部が2つあるが、これらを区別して合成することができる。続いて、ホスホロアミダイト法によりリン酸基と分子中央のグリセロール部を導入する。ここでも、用いるグリセロール部を種々改変した中間体を別途準備することで類縁体合成が可能になっている。最後に脱保護を行って所望の CL 類縁体の合成を完了する。

この方法を用いて、次の2つの課題を遂行する。

(1) Cyt c-CL 複合体形成の主要な駆動力は静電的相互作用であるが、CL のリン酸頭部と相互作用する cyt c の塩基性アミノ酸残基は未だに明らかになっていない。そこで、CL 極性頭部に光反応性ジアジリン基を有する CL プローブ分子を合成してリポソームに再構成し、光親和性標識法によって CL 頭部が結合するアミノ酸残基をピンポイントで同定する。同様に CL 脂肪酸部についても疎水性相互作用の関与が指摘されていることから、特異的な結合サイトが想定される。そこで、CL 脂肪酸部についてもジアジリン基の導入を行い、疎水性相互作用に由来する特異的な結合サイトを同定する。ジアジリン基の導入方法は、対応するケトンに対するヒドロキシアミン-O-スルホン酸を用いた変換反応を用いる。リポソームの調製は、ジオレオイルホスファチジルコリンと CL プローブをモル比にして 9:1 とした上でエクストルージョン法を用いて行う。標識した cyt c の同定には各種電気泳動法と質量分析法を用いる。

2) Cyt c と CL、あるいは cyt c と CL-(OOH)_n の複合体形成 (結合親和性) については、ヒドロペルオキシ基 (-OOH) に由来する高い親水性による影響が考えられてきた。そこで、CL 脂肪酸部に水酸基 (-OH) を導入すれば cyt c との複合体形成が妨げられるのではないかと考えた。この課題のために、4本の脂肪酸部を選択的かつ位置特異的に酸化した CL-(OH)_n (n = 1~4) を合成する。こうして得られた酸化 CL について cyt c との共存下でのペルオキシダーゼ誘導活性を評価する。

酸化 CL の合成は予め水酸基を導入した酸化脂肪酸を別途合成することで調製する。CL 全合成法に則り、酸化脂肪酸の導入部位をそれぞれ選択することで一連の類縁体を用意する。ペルオキシダーゼ誘導活性は、それぞれの CL を含有したリポソームを用いて cyt c 共存下で過酸化水素水を添加した際の蛍光基質に対する効果を定量する。

4. 研究成果

CL の極性頭部または脂肪酸部にそれぞれ光反応性基ジアジリンを有する2種類の光反応性 CL プローブを合成し、光親和性標識実験を行った。この結果、これらのプローブは cyt c を特異的に標識することが明らかになった。さらに

詳細な結合部位の同定を進めている。

酸化 CL 類縁体を 7 種類合成し、それぞれを用いて cyt c に対するペルオキシダーゼ誘導活性を評価した。その結果、興味深いことにはどの類縁体も非常に高い誘導活性を示した。つまり、導入した水酸基の位置や数によらず、ペルオキシダーゼ誘導活性に対して不利に働くことはなかった。このことから、CL 脂肪酸部による特異的な相互作用は、従来考えられてきたような単純な極性の変化によって説明がつくものではないことが明らかになった。Cyt c-CL 複合体の形成にとって、CL の脂肪酸部には水酸基が導入される程度の極性の増大は許容される結果となったことから、CL が過酸化を受けて cyt c との複合体を解消する過程には、ヒドロペルオキシ基に由来する特有の変化を考える必要がある。

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 6 件)

Nishikawa, K., Fukuda, H., Abe, M., Nakanishi, K., Tazawa, Y., Yamaguchi, C., Hiradate, S., Fujii, Y., Okuda, K., Shindo, M. Design and synthesis of conformationally constrained analogues of cis-cinnamic acid and evaluation of their plant growth inhibitory activity.

Phytochemistry, 2013, 96, 223-234.

DOI:

dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.10.01

査読有

Nishikawa, K., Fukuda, H., Abe, M., Nakanishi, K., Taniguchi, T., Nomura, T., Yamaguchi, C., Hiradate, S., Fujii, Y., Okuda, K., Shindo, M.

Substituent effects of cis-cinnamic acid analogues as plant growth inhibitors.

Phytochemistry, 2013, 96, 132-147.

DOI:

dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.08.013

査読有

Taira, Y., Okegawa, Y., Sugimoto, K., Abe, M., Miyoshi, H., Shikanai, T.

Antimycin A-like molecules inhibit cyclic electron transport around photosystem I in ruptured chloroplasts.

FEBS, Open Bio. 2013, 7, 52-57.

DOI: dx.doi.org/10.1016/j.fob.2013.09.007

査読有

Kojima, N., Abe, M., Suga, Y., Ohtsuki, K.,

Tanaka, T., Iwasaki, H., Yamashita, M., Miyoshi, H.

Critical role of a methyl group on the gamma-lactone ring of annonaceous acetogenin in the potent inhibition of mitochondrial complex I

Bioorg. Med. Chem. Lett.

2013, 23, 1217-1219.

DOI:

dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.01.018

査読有

Okuda, K., Hasui, K., Abe, M., Matsumoto, K., Shindo, M.

Molecular design, synthesis, and evaluation of novel potent apoptosis inhibitors inspired from bongkrelic acid. Chem. Res. Toxic.

2012, 25, 2253-2260.

DOI: dx.doi.org/10.1021/tx300315h

査読有

Abe, M., Nishikawa, K., Fukuda, H., Nakanishi, K., Tazawa, Y., Taniguchi, T., Park, K., Hiradate, S., Fujii, Y., Okuda, K., Shindo, M.

Key structural features of cis-cinnamic acid as an allelochemical. Phytochemistry, 2012, 84, 56-67.

DOI:

dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.08.01

[学会発表] (計 8 件)

三木裕子、安部真人、三芳秀人 シトクロム c-カルジオリピン複合体のペルオキシダーゼ活性誘導の分子機構、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014/3/29 明治大学

小坂亜弓、田邊有貴恵、安部真人、三芳秀人 リン脂質カルジオリピンのシトクロム c に対する結合部位の同定、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014/3/29 明治大学

小坂亜弓、田邊有貴恵、安部真人、三芳秀人 リン脂質カルジオリピンのシトクロム c への結合部位の同定、日本農薬学会第 39 会大会、2014/3/14 京都大学

三木裕子、安部真人、三芳秀人 カルジオリピン-シトクロム c 複合体のペルオキシダーゼ誘導の分子機構、日本農芸化学会第 39 会大会、2014/3/14 京都大学

Abe, M., Kosaka, A., Nakano, M., Miyoshi, H.

Synthesis and characterization of photoaffinity probes of cardiolipin as a key player of the induction of peroxidase activity of cytochrome c

Gordon Research Conferences
2013/6/25, New Hampshire, USA.

安部真人、中野正晶、小坂亜弓、三芳秀人
カルジオリピン-シトクロム c 複合体形成の
分子機構解明
日本農芸化学会 2013 年度大会
2013/3/26 東北大学

安部真人、中野正晶、三芳秀人
シトクロム c-カルジオリピン複合体形成による
ペルオキシダーゼ活性誘導の分子機構
第 85 会日本生化学会大会
2012/12/14, マリンメッセ福岡

Abe, M., Nakano, M., Miyoshi, H.
Structural factors of cardiolipin required for
induction of peroxidase activity of
cytochrome c-cardiolipin complex
17th European Bioenergetics Conference
2012, 2012/9/17 freiburg.

〔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

安部 真人 (ABE MASATO)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：30543425

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし