

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840036

研究課題名(和文)ミトコンドリア呼吸鎖酵素NDH-2における活性酸素の生成抑制機構と構造的基盤

研究課題名(英文)The structural insight into ROS suppression mechanism of type II NADH dehydrogenase (NDH-2)

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアで機能するType II NADH脱水素元酵素(NDH-2)は活性酸素をほとんど生成しないが、NDH-2の反応機構を含め活性酸素の生成を抑制する機構は十分に解明されていない。そこで、活性酸素の生成量を増加させるThr239変異体と野生型酵素の生化学的比較を行い反応機構と活性酸素生成との関係を調べた。反応速度論的解析、分光学的解析および物理化学的解析により、酵素反応過程で生じるNDH-2の補欠分子族FADのセミキノン型と基質NADHとの間の電荷移動錯体の形成が活性酸素生成抑制に重要であることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the radical oxygen-suppression mechanism of mitochondrial type-II NADH dehydrogenase (NDH-2), we investigated biochemical properties of NDH-2 and its Thr239 mutant which have relatively high non-physiological NADH oxidase activity compared with wild type enzyme. By the kinetics, spectrographic and physicochemical analysis, it was strongly suggested that the formation of the charge-transfer complex between FAD-semiquinone, which is generated in the enzyme reaction process, and substrate NADH is responsible for the suppression of radical oxygen.

研究分野：生化学 生理学

キーワード：活性酸素 反応機構 フラボプロテイン 基質結合部位 NADH脱水素酵素 ミトコンドリア 電子伝達系

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアにおける NADH 酸化系呼吸鎖の初発酸化酵素には、哺乳類に一般的に存在する呼吸鎖複合体 I の他に、植物、原虫、カビ類に存在する Type II NADH 脱水素酵素 (NDH-2) の 2 種類があり、いずれも NADH からミトコンドリア内膜に存在するユビキノンの電子伝達を触媒している。複合体 I は 46 の異なるサブユニットからなり分子量約 1MDa の巨大な酵素である。また、プロトンポンプの機構を備えミトコンドリアにおけるエネルギー生成に重要な役割を果たしているが、呼吸鎖電子伝達系の主たる活性酸素の生成源でもある。呼吸鎖酵素の機能障害によって非生理的に生じる活性酸素は生命機能に重大な悪影響を及ぼし、老化やミトコンドリア病の主要な原因の一つであると考えられているが、特に活性酸素の生成を伴うとされる複合体 I の機能障害は孤発性のパーキンソン病や視神経萎縮を引き起こすレーベル病といったミトコンドリア病において多数報告されている (*Biochim. Biophys. Acta (bioenergetics)*, 2006, 1757, 708-714; *Rejuvenation Res.*, 2006, 9, 191-197)。しかし、複合体 I は非常に複雑なタンパク質複合体であるため、活性酸素の生成機構に関して詳細な結果が得られていない。

一方、NDH-2 は構造が単純でプロトンポンプの機構を有していないが、ほとんど活性酸素を生成しないと考えられている。興味深いことに、酵母ミトコンドリアに存在する NDH-2 (Ndi1) を神経細胞様に分化するラットの細胞株 (PC-12) で発現させると、複合体 I の特異的阻害剤でパーキンソン病様の症状を引き起こす神経毒 (ロテノンや MPP⁺) の存在下において、複合体 I からの活性酸素の生成が抑制されることが明らかとなっている (*J. Biol. Chem.*, 2007, 282, 24146-24156; *FEBS Lett.*, 2006, 580, 6105-6108)。さらに、ウイルスベクターを用いて Ndi1 を遺伝子導入したマウスおよびラットは、神経毒の存在下においてもパーキンソン病様の症状を呈さないことから (*Parkinsons Dis.*, 2011, 438370; *Rejuvenation Res.* 2009, 12, 259-267; *PLoS One.* 2008, 3, e1433)。パーキンソン病を含め複合体 I の機能障害に由来するミトコンドリア病の遺伝子治療に Ndi1 が利用できるのではないかと期待されている。このように、NDH-2 は複合体 I の機能障害を相補し複合体 I からの活性酸素の生成を抑制するが、NDH-2 自体の反応機構および活性酸素の生成を抑制する機構は十分に解析されてこなかった。

2. 研究の目的

我々はこれまでの生化学的解析から、酵母ミトコンドリア電子伝達系で機能する NDH-2 の反応機構が「NADH およびユビキノンが酵素と同時に結合する独特な機構」であり、この機構自体が活性酸素の生成抑制に寄

与している可能性を示唆してきた (*J. Biol. Chem.*, 2011, 286, 9287-9297)。さらに構造生物学的解析により酵母 NDH-2 の結晶構造を明らかにしたが (*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2012, 109, 15247-15252) 上記の酵素反応における「酵素および両基質 (NADH およびユビキノン) との三者複合体」の結晶構造は明らかとなっていない。そこで本研究では三者複合体の構造解析を進めると同時に、酵素反応時 (動的状態) における基質結合部位や、酵素-基質複合体における分子内電子伝達を詳細に解析することで酵素反応の全貌を明らかにし、呼吸鎖酵素が本来有している活性酸素の生成を抑制する分子機構と構造的基盤を解明することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、酵母ミトコンドリア内膜のマトリックス側に局在している NDH-2 (Ndi1) を大腸菌で組み換えタンパク質として発現させ、アフィニティクロマトグラフィーにより精製したものをを用いた。

(1) NDH-2 の活性酸素の生成抑制機構の解析は、主に NDH-2 と基質 NADH との相互作用に注目して解析を行った。具体的には野生型酵素に比べ活性酸素の生成量が顕著に多い T239A 変異体を用い、基質や酸素に対する親和性、酸化還元滴定による FAD の酸化還元電位などを野生型酵素と比較し、Thr239 の反応機構における役割および活性酸素の生成抑制機構を検討した。

(2) 酵母 NDH-2 の結晶構造は我々が発表したものを含めて 2 つ報告されているが、両結晶構造中における基質ユビキノンの結合位置が異なっている (*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2012, 109, 15247-15252; *Nature*, 2012, 491, 478-82)。詳細な反応機構を明らかにするためには正確な基質結合部位の同定が必要なことから、明らかとなっていないユビキノン結合部位の同定を構造生物学的手法により試みた。NDH-2 のユビキノンに対する親和性は比較的低いことから、NDH-2 とユビキノンとの直接の共結晶構造解析を行うのではなく、ユビキノン結合部位の特異的阻害剤を検索し、NDH-2 との共結晶構造解析を行った。

4. 研究成果

(1) NDH-2 の活性酸素の生成抑制機構

我々はこれまで酵母 NDH-2 において多くの部位指定変異体を作成してきた。その中で Thr239 の変異体 (T239A) はユビキノン非存在下における NADH から酸素への非生理的な電子伝達活性 (NADH オキシダーゼ活性) が野生型酵素に比べ顕著に高い (活性酸素の生成量が多い)。Ndi1 の Thr239 は FAD の近傍に位置しており、NDH-2 ファミリーにおける保存性が非常に高く反応機構に関与する可能性が高かったことから本研究では、

T239A 変異体と野生型酵素の生化学的特徴の比較を行い反応機構と活性酸素生成との関係を調べた。

まず T239A 変異体および野生型酵素の反応速度論的解析を行ったところ、変異体は野生型酵素に比べ NADH だけでなく NADPH に対する基質親和性が低下していたが、活性酸素の生成能を表す NAD(P)H オキシダーゼ活性は NADPH で低下するのに対し、NADH では顕著な増加を示した。また、NAD(P)H-ユビキノン酸化還元活性測定時における活性酸素の生成活性を野生株と比較したところ、変異体では NADH/NADPH とともに活性酸素の生成量は増加したが、基質が NADH の場合の増加率は NADPH の場合の 2 倍以上であった。そこで、NADH を基質にした際の酸素に対する親和性を野生型と T239A 変異体と比較したところ、野生型はシグモイド曲線を示し通常の酸素濃度の領域において酸素に対する反応性が低かったのに対し、変異体では通常のカイロシス-メンテンタイプの曲線を示し同濃度領域における反応性が高いことが示された(図 1)。以上の結果から、NDH-2 は Thr239 を介して NADH 特異的に安定した酵素-NADH 複合体を形成し、還元型 FAD から酸素への非生理的な電子の流れを抑制していることが予想された。

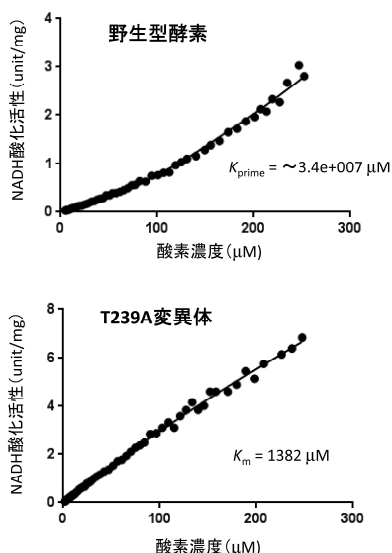


図1 酸素濃度に対する NADH オキシダーゼ活性

野生型酵素は NADH の添加によりユビキノン存在下もしくは酸素存在下で長波長側(750 nm 付近)に特徴的な吸収スペクトルを持つ電荷移動錯体(Charge-transfer complex: CT 錯体)を形成する(*J. Biol. Chem.*, 2011, 286, 9287-9297)。この CT 錯体形成は NADH 特異的であり、NADPH やジチオナイトで単純に FAD を還元するだけでは形成されないが、T239A 変異体は NADH を添加しても CT 錯体形成は示さなかった(図 2)。この結果を反応速度論的解析の結果と合わせて考えると、安定した酵素-NADH 複合体(CT 錯体)の形成が活性酸素の生成抑制に非常に重要であることが強く示唆される。つ

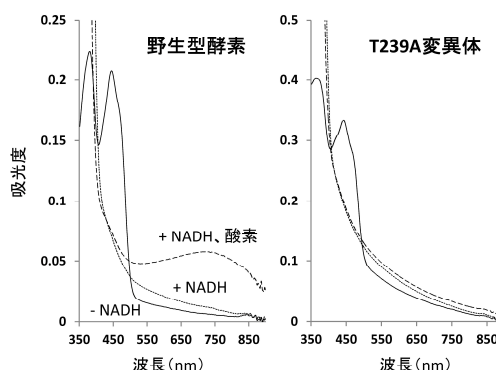


図2 野生型酵素とT239A変異体のスペクトル解析

まり、T239A 変異体において NADH オキシダーゼ活性が顕著に増加したのは、野生株酵素が NADH に比べ親和性の低い NADPH と CT 錯体を形成できず NADPH オキシダーゼ活性が高いことと同様に、Thr239 の変異によって NADH に対する親和性が低下し安定な CT 錯体が形成できなくなったためであり、一方もともと CT 錯体を形成しない NADPH は変異により親和性がさらに低下したことで活性酸素の生成量も低下したと考えられる。

ユビキノンもしくは酸素存在下で NDH-2 が CT 錯体を形成するのは、NADH によって還元されたフラビンがユビキノン(もしくは酸素)により 1 電子引き抜きぬかれ 1 電子還元型のフラビンセミキノン形成し、そこにさらに親和性の高い NADH が結合するためと考えられてきたが(*J. Biol. Chem.*, 2011, 286, 9287-9297) 実際に FAD の酸化還元電位を測定したところ、野生型ではフラビンセミキノン型が安定に存在することが示された。一方、T239A 変異体のフラビンセミキノン型は野生型に比べ安定性が低くなっていた(図 3)。以上の結果から、NDH-2 の反応機構および活性酸素生成抑制機構を考えると生理的条件下においては我々が以前より提唱してきた「酵素および両基質(NADH

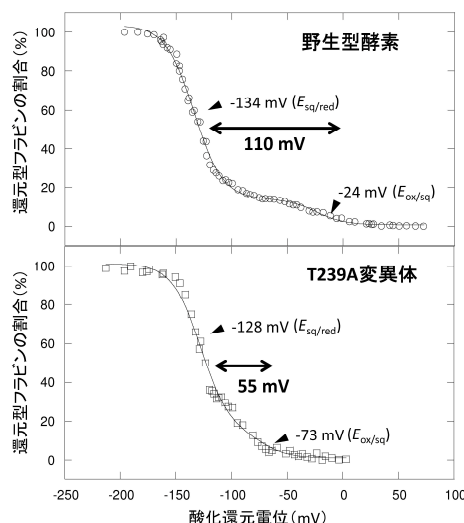


図3 野生型酵素とT239A変異体の酸化還元滴定

および酵素結合型ユビキノン)との3者複合体」を介して、酵素結合型ユビキノンの1電子還元が起こる。その後、基質ユビキノンが酵素に結合するまでの間、速やかにフラビンセミキノンとNADHの間でCT錯体が形成され、フラビンセミキノンから酸素に電子が渡るのを抑制していると予想される。

(2) ユビキノン結合部位の同定

これまでに得られているNDH-2の構造生物学的知見から、2つの異なるユビキノン結合部位が示された。しかし、いずれの構造解析に用いられた結晶の分解能は高いが、ユビキノンに相当する電子密度はともに不明瞭である。結晶構造中のユビキノンの電子密度が低いのは、「酵素とミトコンドリア内膜が結合する領域」から「FAD」まで伸びる「ユビキノンが入り込むポケット」が浅く、精製酵素では長い疎水性側鎖を持つユビキノンが強固に結合することが出来ないためと考えられる。つまり精製酵素を用いた阻害剤のスクリーニング系においてユビキノンに比べ酵素への親和性が十分に高い阻害剤を見つければ、疎水的側鎖を持つ阻害剤であっても酵素に強固に結合する可能性が高く、共結晶構造解析によって結合位置だけでなくタンパク質との詳細な相互作用を解明できると予想される。

何十万種類にも及ぶ化合物ライブラリーの中からNDH-2のユビキノン結合部位に対する阻害剤を探索するには、長い期間と大きな労力が必要になる。そこで本研究では、ユビキノン結合部位に対する阻害剤(他の呼吸鎖酵素のユビキノン結合部位に対して既に強い阻害活性を持つと分かっている化合物およびその誘導体)に絞りスクリーニングを行った。その結果、既知の阻害剤であるオーラシン誘導体とは全く構造の異なるいくつかの化合物を見出し、反応速度論的解析によりこれら化合物のユビキノンに対する阻害様式を決定するとともに、NDH-2との共結晶化を行った(未発表のため化合物名は伏せる)。1つの化合物についてはすでに共結晶を得ており(図4)、今後の構造解析により構造中における阻害剤の結合位置が明らかになればユビキノンに対する阻害様式から本来のユビキノン結合部位が同定できると期待される。

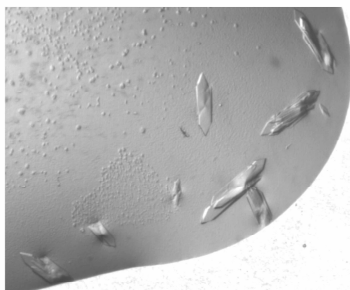


図4 NDH-2と阻害剤の共結晶

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 件)

〔学会発表〕(計2件)

山下 哲生、大腸菌発現系を用いた Apoptosis-inducing factor (AIF)と生体膜との相互作用の解析、日本生体エネルギー研究会 第40回討論会、2014年12月12日、愛媛大学(愛媛)

山下 哲生、Apoptosis-inducing factor 依存的細胞死の制御機構の解析、第55回日本生化学会 中国・四国支部例会、2014年6月7日、愛媛大学(愛媛)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：