ミトコンドリア呼吸鎖複合体-I の機能解明を目指した生物有機化学的研究

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻　村　井　正　俊

はじめに

呼吸鎖複合体-I（NADH-ユビキノン酸化還元酵素）は，ミトコンドリア内膜やバクテリア細胞膜上に存在する電子伝達系の初発酵素であり，基質の酸化還元反応と共役してプロトンの能動輸送を行う膜タンパク質複合体である．複合体-I は，基質の酸化還元を担う“親水性ドメイン”と，プロトン輸送を担う“膜ドメイン”の２つのドメインから構成される（図1）．哺乳類のミトコンドリア複合体-I の場合，総サブユニット数が 45 個の超分子複合体であり，総分子質量は約 1000 kDa にも達する．ヒトでは複合体-I の機能不全によって発生した活性酸素が原因となって，パーキンソン病などのさまざまな神経変性疾患が発症することが知られている．また複合体-I は，抗寄生虫薬や殺虫・殺ダニ剤の創薬標的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．

筆者は，独自のアイデアに基づいて設計・合成した種々のプローブ分子を用いて，複合体-I の阻害剤結合部位をアミノ酸残基レベルで明らかにした．また，ユビキノン結合ポケットの内部をピンポイントで化学修飾する方法論を確立した．一連の研究成果は，以下に要約される．

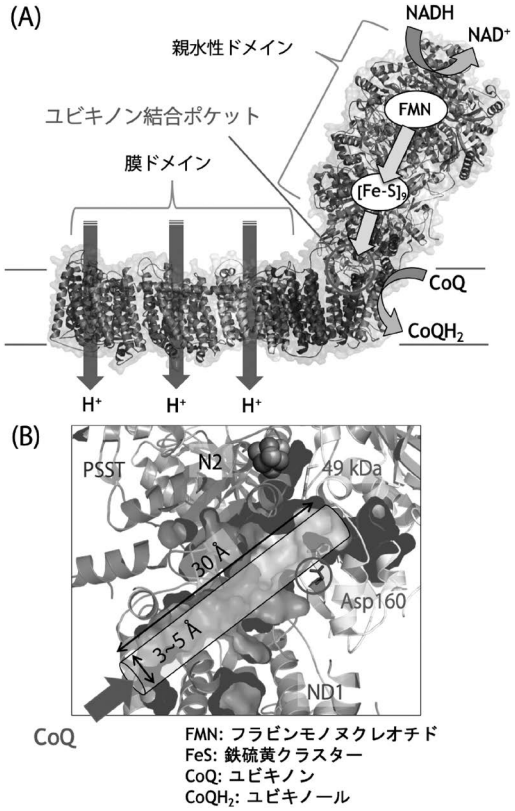

図1.　（A）好熱細菌複合体-I の X 線結晶構造．（B）好熱細菌複合体-I のユビキノン結合チャンネル付近の拡大図．

1.　光親和性標識法による阻害剤の結合部位の同定

複合体-I 研究の歴史において，日本人研究者（農芸化学者）によって発見されたロテノン類やピエリシジン類は代表的な阻害剤として世界的に利用されてきた．これらの特異的阻害剤は，基質であるユビキノンの結合ポケットに結合することで酵素機能を阻害することが予想され，阻害剤の結合部位は複合

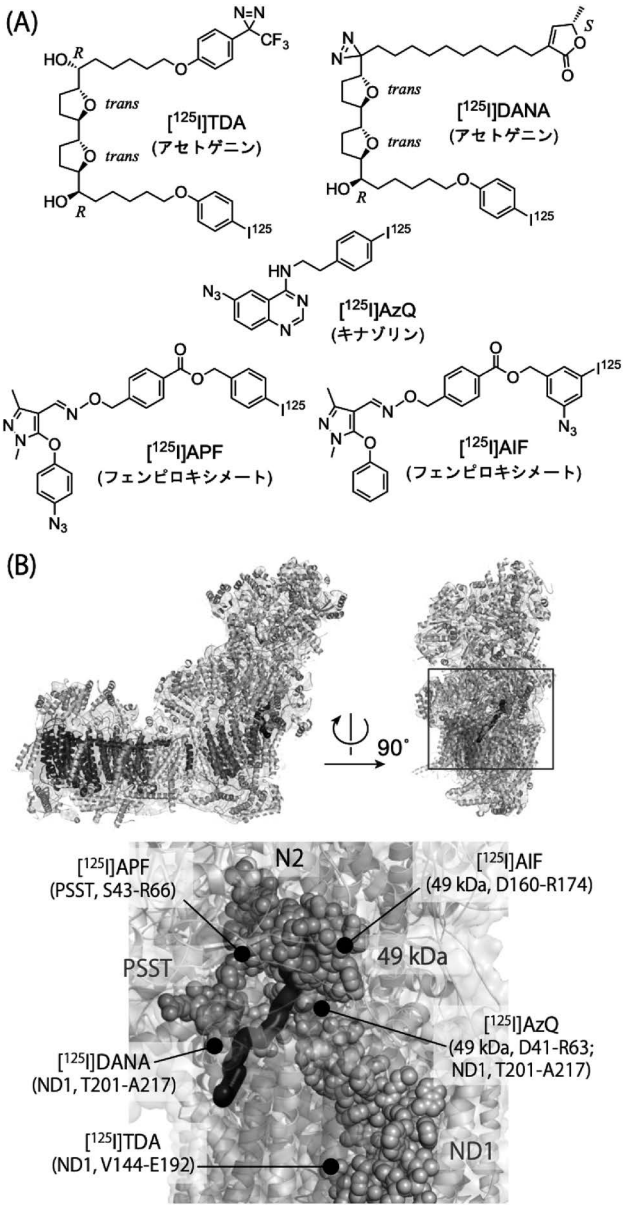

図2.　（A）光親和性標識実験に用いた光反応性プローブ分子の構造．（B）ウシ心筋複合体-I におけるユビキノン結合チャンネル付近の拡大図．ユビキノン結合チャンネルの空間を黒色で示し，阻害剤結合部位を space-fill モデルで示した．

体-I のホットスポットであると考えられていた．しかし，筆者が研究を開始した段階では，「複合体-I の阻害剤結合部位はどこに，いくつ存在するのか？」という問いに対する統一的な見解は確立していなかった．

筆者は，複合体-I に対する種々の阻害剤の結合部位を同定することを目的に，フェンピロキシメート，キナゾリン，アセトゲニンという 3 つの阻害剤をテンプレートとした光反応性プローブ分子を合成し（図2A），ウシ心筋ミトコンドリア複合体-I を実験材料として光親和性標識実験を行った．その結果，フェンピロキシメートは 49 kDa と PSST サブユニットの境界領域に，キナゾリンは 49 kDa と ND1 サブユニットの境界領域に，アセトゲニンは ND1 サブユニットに結合することをアミノ酸残基レベルで明らかにした（図2B）．また，これら 3 つのサブユニットは，複合体-I の親水性ドメインと膜ドメインの境界領域に位置することを提案した．

光親和性標識の結果は，複合体-I 阻害剤がこれら 3 つのサブユニットで構成される共通の空間に結合し，その結合様式は化合物の構造特性を反映して少しずつ異なることを意味している．以上の研究成果は，「複合体-I の阻害剤結合部位は，親水性ドメインと膜ドメインの境界領域に 1ヶ所だけ存在する」ことを初めて実証したものである．

2. ユビキノン結合ポケットのピンポイント化学修飾法の確立

2013年，Sazanov らによって好熱細菌（*Thermus thermophiles*）由来の複合体-I の X 線結晶構造が 3.4 Å の解像度で解かれ，特徴的な L 字型構造をとっていることがわかった（図1A）．筆者が予想した通り，阻害剤が結合する 3 つのサブユニットは，親水性ドメインと膜ドメインの境界領域に位置していた．その後，クライオ電顕解析によるウシ心筋ミトコンドリア複合体-I の構造も報告され，ユビキノン結合ポケットは狭く長い“チャンネル様”の構造をとっていると提案された（図1B および 2B）．また，化学的に多様な阻害剤は，全てこの“ユビキノン結合チャンネル”に収容されると予想された．しかし，ユビキノンや阻害剤が結合した状態での構造は未だに解かれておらず，このモデルを支持する直接的な証拠は得られていない．

筆者は，複合体-I のターンオーバー過程の構造変化を直視することを将来的な目標に見据え，ユビキノン結合ポケットを様々な機能性分子で位置特異的かつ非破壊的に化学修飾する方法論の確立を試みた．タンパク質化学修飾法の 1 つである Ligand-Directed Tosyl Chemistry（トシル化学）に着目し，複合体-I を特異的に修飾するトシル化学リガンド分子を合成した（AL2 および AL6, 図3）．ウシ心筋ミトコンドリアをリガンド分子（AL2 および AL6）とインキュベートしたところ，ユビキノン結合ポケットを構成する 49 kDa サブユニットの 160 番目のアスパラギン酸（49 kDa Asp160）だけが，1 次タグであるアジド基（AL2）あるいはシクロプロペン基（AL6）によって修飾されることがわかった（図1B）．さらに，導入した 1 次タグは，続くクリックケミストリーや逆電子要求型 Diels-Alder 反応の足場として機能し，TAMRA-DIBO や BODIPY-tetrazine などの 2 次タグとそれぞれ反応した（図3）．

X 線結晶構造やクライオ電顕でモデル化された複合体-I の立体構造を参照すると，ユビキノン結合チャンネルは入口の内径が約3〜5 Å，奥行きが約30 Å の狭く長い空間になっており（図1B および 2B），チャンネルの内径よりもはるかに嵩高い

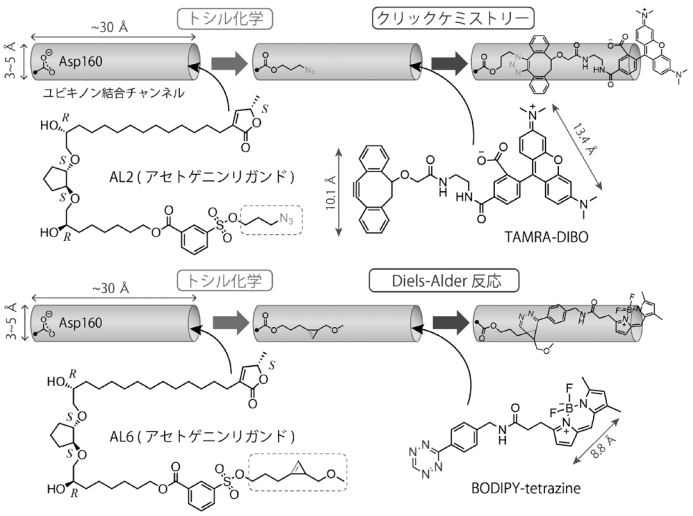

図3. ユビキノン結合ポケット内のピンポイント化学修飾．リガンド分子（AL2 および AL6）を用いて 49 kDa Asp160 に 1 次タグを導入し（トシル化学），これを反応の足場として，嵩高い TAMRA-DIBO や BODIPY-tetrazine をクリックケミストリーや Diels-Alder 反応によって導入した．ユビキノン結合チャンネルは図1B および 2B を模式的に示した．

TAMRA-DIBO や BODIPY-tetrazine が 49 kDa Asp160 に接近することは不可能なはずである（図3）．筆者の研究成果は，「化学的に多様な阻害剤は，全てユビキノン結合チャンネルに収容される」とする構造生物学側からの考えでは説明できない．むしろ，提案されているチャンネルモデルとは対照的に，「ユビキノンや阻害剤の結合ポケットはダイナミックに構造変化し，多様なリガンド分子を柔軟に収容できる」と考えた方が合理的である．

おわりに

筆者は阻害剤プローブ分子を駆使した生物有機化学的研究によって，ミトコンドリア複合体-I の機能に深く関わるユビキノンおよび阻害剤の結合部位を同定し，その構造特性を明らかにしてきた．今後は複合体-I にとどまらず，酸化的リン酸化（ATP 合成）を制御するユニークな低分子化合物を“化学ツール”として用いることで，エネルギー代謝に関わる様々なタンパク質の構造と機能を明らかにしたい．「化学と生物」の両輪で基礎研究を進めることで，農芸化学分野の発展に貢献したいと思う．

謝　辞　本研究は京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻生物機能制御化学分野で行われたものです．本研究を行う機会を与えていただき，学生時時代から現在に至るまで，温かいご指導を賜りました京都大学農学研究科・三芳秀人教授に心から御礼申し上げます．また，大学院在籍当時には，西岡孝明教授（現 京都大学名誉教授），石原亨博士（現 鳥取大学教授）から多くのご指導・ご助言を頂きました．本研究の成果は，生物機能制御化学分野の修了生ならびに在学生との共同研究の上に成り立つものであり，一緒に研究を行った全ての方々に心から感謝申し上げます．最後になりましたが，本奨励賞にご推薦いただきました日本農芸化学会関西支部長・京都大学農学研究科・河田照雄教授，ならびにご支援を賜りました関西支部の先生方に深く御礼申し上げます．