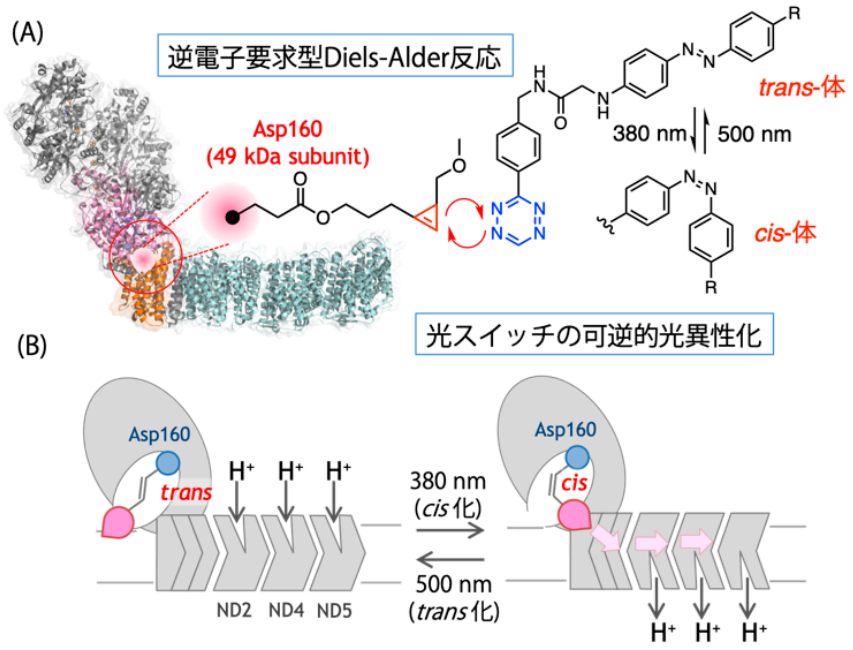
123　化学修飾で実現する「光駆動型」呼吸鎖複合体 - Ⅰの創成	村井　正俊

【目的】ミトコンドリア NADH-ユビキノン酸化還元酵素（呼吸鎖複合体-I）は、呼吸基質の酸化還元を駆動力とするプロトンポンプであり、エネルギー代謝（ATP 合成）に必須のプロトン電気化学的ポテンシャルを形成する。本研究では、ウシ心筋ミトコンドリアを生物材料として、光スイッチ分子を複合体-I のキノン結合ポケットに導入し、光照射によってプロトン輸送活性を誘導し、複合体-I を“酸化還元駆動型”から“光駆動型”のプロトンポンプに機能変換することを目指した。複合体-I を光駆動型プロトンポンプに機能変換することができれば、本酵素の作動メカニズムの解明に向けた全く新しい方法論を提示できるだけでなく、ミトコンドリアや細胞レベルのエネルギー代謝を光で制御することが可能な新技術の開発に繋がり、生化学分野におけるその意義と将来的な波及効果は極めて大きい。

【方法】複合体-I のプロトン輸送のメカニズムについては、『キノンの還元反応によってキノン結合ポケット内に構造変化が生じ、これが駆動力となって膜ドメインに伝搬してプロトンが輸送される』と考えられており（下図 B）、キノン結合ポケット最深部に位置する 49 kDa サブユニットの Asp160（49 kDa・Asp160）の動きが、膜ドメインでのプロトン輸送のトリガーとなる構造変化に重要な寄与をしている。我々は、複合体-I 阻害剤をモチーフとした合成リガンド分子を活用して、49 kDa・Asp160 にピンポイントでアゾベンゼンのような光スイッチ分子を導入することで、キノン結合ポケットの構造変化を光照射で可逆的に発生させ、プロトン輸送活性を誘導することを目指した。

【結果】“トシル化学法”と呼ばれるタンパク質化学修飾法を利用して、キノン結合ポケットを構成する 49 kDa・Asp160 に対してピンポイントでシクロプロペン化し、これを足場としてテトラジンを有する 2 次タグ分子を導入する方法論を確立した。現在、図に示した光スイッチ部分の合成を行なっている段階であり、残念ながら、研究期間内に合成を完了させられなかったが、1 日も早く光スイッチによる複合体-I の光制御を実現したい。

複合体-I の化学修飾（A）と光操作（B）の模式図



123. 化学修飾で実現する「光駆動型」呼吸鎖複合体-I の創成

村井　正俊

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

Key words：ミトコンドリア，呼吸鎖複合体-I，位置特異的化学修飾，光スイッチ

緒　言

ミトコンドリア NADH-ユビキノン酸化還元酵素（呼吸鎖複合体-I）は、呼吸基質の酸化還元を駆動力とするプロトンポンプであり、エネルギー代謝の基幹酵素として、酸化的リン酸化（ATP 合成）に必須のプロトン電気化学的ポテンシャルを形成する。複合体-I のプロトン輸送のメカニズムについては、『キノンの還元反応によってキノン結合ポケット内に構造変化が生じ、これが駆動力となって膜ドメインに伝搬してプロトンが輸送される』と考えられており（図 1B、キノン結合ポケット最深部に位置する 49 kDa サブユニットの Asp160（49 kDa・Asp160）の動きが、膜ドメインでのプロトン輸送のトリガーとなる構造変化に重要な寄与をしている［1〜3］。我々は、複合体-I 阻害剤をモチーフとした合成プローブ分子を活用して、49 kDa・Asp160 にピンポイントでプローブ分子を導入する化学修飾法の研究を進めてきた。

もし、キノン結合ポケットにアゾベンゼンのような光スイッチ分子を導入できれば、キノン結合ポケットの構造変化を光照射で可逆的に発生させ、光照射によってプロトン輸送活性を誘導することが可能になる。本研究では、ウシ心筋ミトコンドリアを生物材料として、光スイッチ分子を複合体-I の“鍵領域”であるキノン結合ポケットに導入し、光照射によってプロトン輸送活性を誘導し、複合体-I を“酸化還元駆動型”から“光駆動型”のプロトンポンプに機能変換することを将来的な目標に据え、複合体-I の 49 kDa-Asp160 に対する特異的化学修飾法の確立を目指した。さらに、「複合体-I の光操作」の背景となるキノン結合ポケットの構造特性を解明することを目指した。

具体的には、“トシル化学法”と呼ばれるタンパク質化学修飾法を利用して、キノン結合ポケットを構成する 49 kDa・Asp160 に対してピンポイントでシクロプロペン化し、これを足場としてテトラジンを有する 2 次タグ分子を導入する方法論を確立した。また、光反応性アミロライドを用いた光親和性標識実験によって、キノン結合ポケットの概観を明らかにし、当該領域が極めて柔軟性に富んだものであることが判明した。

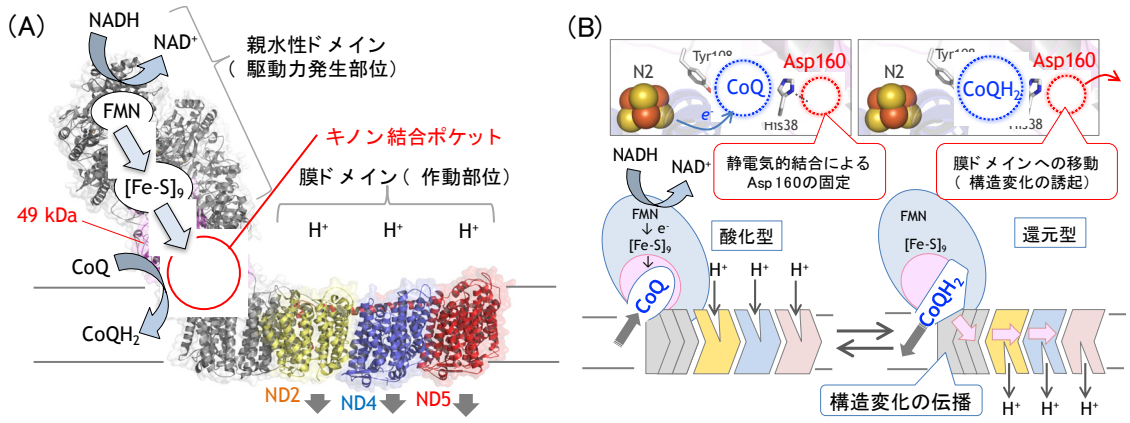


図 1. 好熱細菌（*T.thermophilus*）複合体-I の X 線結晶構造（A）と反応機構モデル（B）
キノンの還元によって鍵アミノ酸残基である 49 kDa・Asp160 が膜ドメイン側に反転し、これをトリガーとしてプロトン輸送が起こる。

方　法

1.　ウシ心筋複合体-I の特異的化学修飾法の確立

我々はこれまでに、タンパク質化学修飾法の一つである“トシル化学法”［4］に着目し、阻害剤アセトゲニンをモチーフとしたリガンド分子（AL2、図 2）を合成している。阻害剤アセトゲニンをモチーフとしたリガンド分子に 1 次タグとなる末端アジドを特異的に導入し（49 kDa-Asp160-N_3）、これを反応の足場として、歪んだ環状アルキンを持つ蛍光基（TAMRA-DIBO、図 1）を 2 次タグとして導入することに成功した。しかし、TAMRA-DIBO を 2 次タグとして導入する場合、49 kDa-Asp160-N_3 以外の複数のアミノ酸残基が TAMRA-DIBO と反応する副反応が起こることが問題であった［5］。そこで、化学修飾における特異性の向上を目指して、新たな 1 次および 2 次タグの検討を行った。

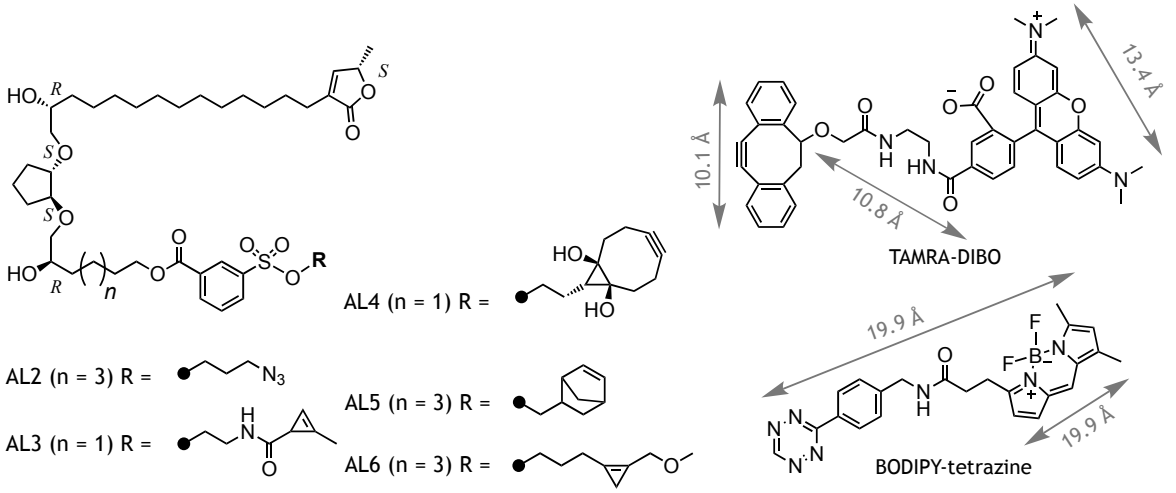


図 2. アセトゲニンリガンド（AL2～AL6）と 2 次タグ（TAMRA-DIBO および BODIPY-tetrazine）の構造

2. 複合体-I のキノン結合ポケットの構造特性の解明

複合体-I の X 線結晶構造［2］および cryo-EM 構造［3］を参照すると、キノン結合ポケットは、複合体-I の親水性ドメインと膜ドメインの境界領域にあり、入口の内径が約 3～5 Å、奥行きが約 30 Åの狭く長い“チャンネル様”の構造をとり、化学的に多様な阻害剤は、全てこの“キノン結合チャンネル”に収容されると予想されている。ところが、上記の TAMRA-DIBO の反応は、チャネルの内径よりもはるかに嵩高い分子が、キノン結合チャンネル最深部に収容されることを意味している［5］。そこで我々は、複合体-I 阻害剤であるアミロライドを鋳型とした光反応性プローブ分子（[^{125}I]PRA3～[^{125}I]PRA6、図 3）を合成し、これを化学ツールとして用いることで、構造生物学から提唱されている“チャンネルモデル”を検証した。

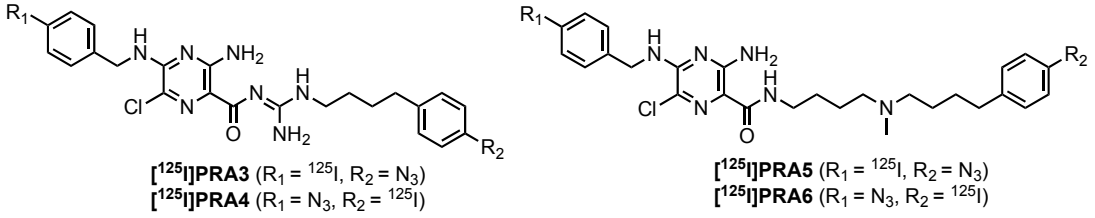


図 3. 光反応性アミロライド（[^{125}I]PRA3、[^{125}I]PRA4、[^{125}I]PRA5 および[^{125}I]PRA6）の構造

結　果

1.　ウシ心筋複合体-I の特異的化学修飾法の確立

環歪みを持つアルケンは触媒等を用いることなくテトラジンと水中で反応することが知られている（逆電子要求型 Diels–Alder 反応）。そこで、複合体-I に導入する 1 次タグとして環歪みを持つアルケン（あるいはアルキン）に着目し、4 種類のリガンド分子 AL3～AL6（図 2）を新たに合成し、ウシ心筋ミトコンドリアに対する反応性を精査した。

ウシ心筋亜ミトコンドリア粒子（SMP）と AL 類を 37℃で 24 時間インキュベートすることで 1 次タグを導入し、蛍光基 BODIPY をもつテトラジン（BODIPY-tetrazine、図 2）を 2 次タグとして反応させた（図 4）。SDS-PAGE によりタンパク質を分離して BODPY 由来の蛍光を観察したところ、AL6 を用いた場合のみ 49 kDa・Asp160 の化学修飾に由来する蛍光が観察され、一切の副反応は見られなかった［6］。

現在、図 6 に示したテトラジンを持つ光スイッチ化合物の合成を進めている。構造中の R 部分については、アルキル鎖や芳香環等、多様な構造を導入する予定である。

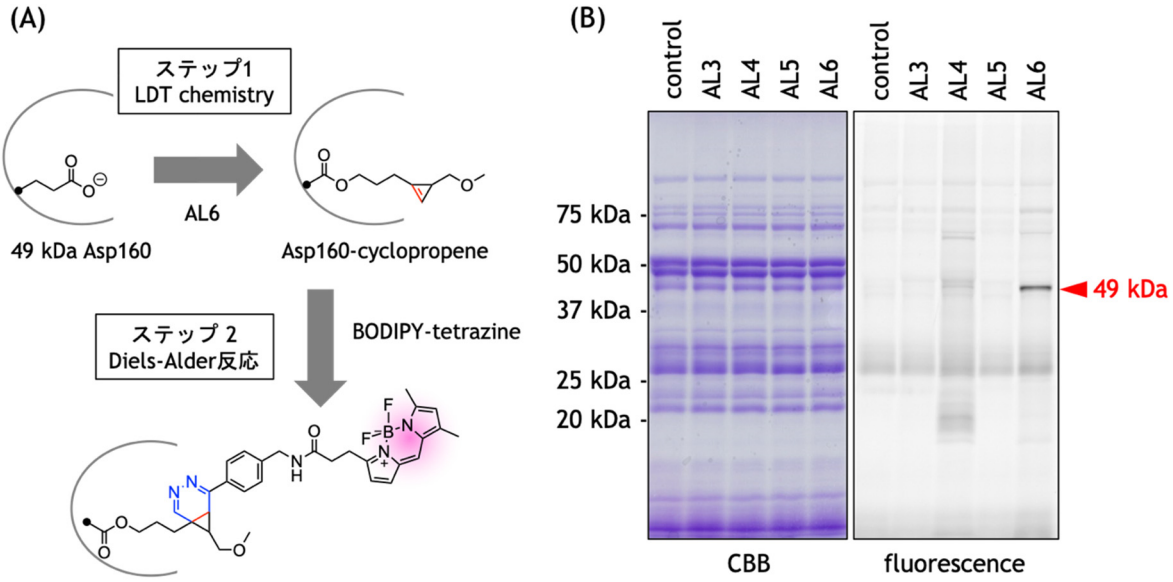


図 4.　ウシ心筋複合体-I の 49 kDa・Asp160 の特異的化学修飾の模式図（A）と二段階での化学修飾後のウシ心筋 SMP の SDS-PAGE（B）

AL6 で処理したサンプルのみ、49 kDa サブユニットに BODIPY-tetrazine 由来の蛍光バンドが観察された。すなわち、AL6 で処理された複合体-I のみ、特異的な化学修飾が達成できることを意味している。

なお、ゲル写真は、［6］Figure 3 で用いたものと同一である。

2.　複合体-I のキノン結合ポケットの構造特性の解明

^{125}I 標識した光反応性アミロライド類を新たに 4 種類合成し（[^{125}I]PRA3～[^{125}I]PRA6、図 3）、結合部位を同定したところ、チャンネルを構成する 49 kDa、PSST および ND1 サブユニットに加え、チャンネルを構成していないはずの 39 kDa サブユニットにも結合することがわかった（図 5）。また、アミロライド類による標識は、複数の他のタイプの阻害剤によって顕著に抑制を受けた。以上の光親和性標識の結果も、提案されているチャンネルモデルとは必ずしも一致しない。こうした実験結果は、「構造的に多様な阻害剤は、全て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モデルでは説明できない。これまでに報告された結晶構造や cryo-EM 構造は、酵素のターンオーバー過程において実際に存在するスナップショットではないかもしれない可能性が出てきた。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でき、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［7］。

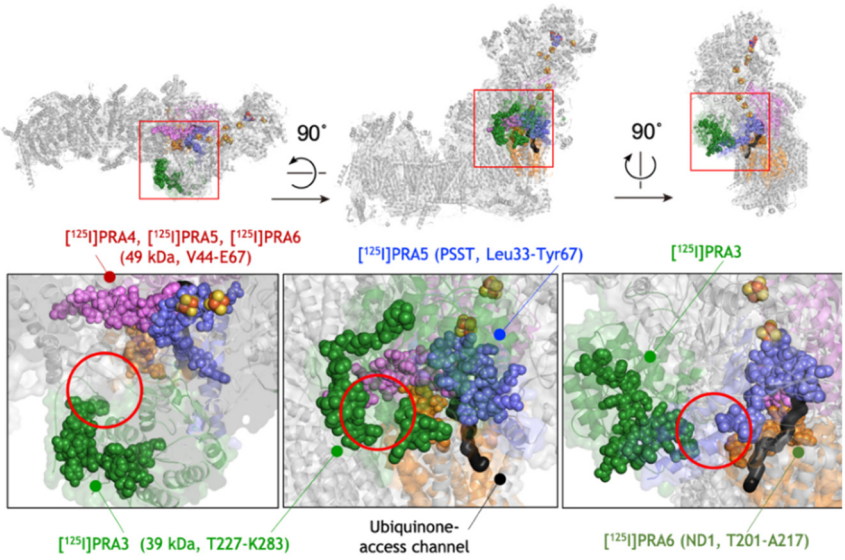


図 5. ウシ心筋複合体-I におけるアミロライド類の結合部位

4 種類の光反応性アミロライドで標識された領域を Space-fill モデルで示した。これら 4 領域の境界に相当する領域（赤色円で囲んだ領域）に、キノン結合ポケットの入り口があるものと予想される。

考　察

以上の結果から、AL6をトシル化学リガンドとして用いることで、ウシ心筋複合体-Iの49 kDa・Asp160をシクロプロペン化し、続いてテトラジンを有する光スイッチ（アゾベンゼン）を逆電子要請型Diels–Alder反応で導入するという二段階反応が、光スイッチを導入するための、現実的な戦略であると結論づけた。特にテトラジンは、ミトコンドリアタンパク質との非特異的な反応がほとんどないため、複合体-Iの化学修飾には極めて有用である。さらに、光反応性アミロライドを用いた光親和性標識実験によって、キノン結合ポケットが極めて柔軟性に富んでいることが判明した。こうした柔軟性が、酸化還元駆動型のプロトンポンプである複合体-Iの機能の鍵となっていることが容易に予想され、「光照射によって当該領域の構造変化を誘導する」という本研究の最終目標も決して非現実的なものではない。最終的な実験の完成イメージを模式図として図6に示した。現在、テトラジンを持つ光スイッチ化合物の合成を進めている。

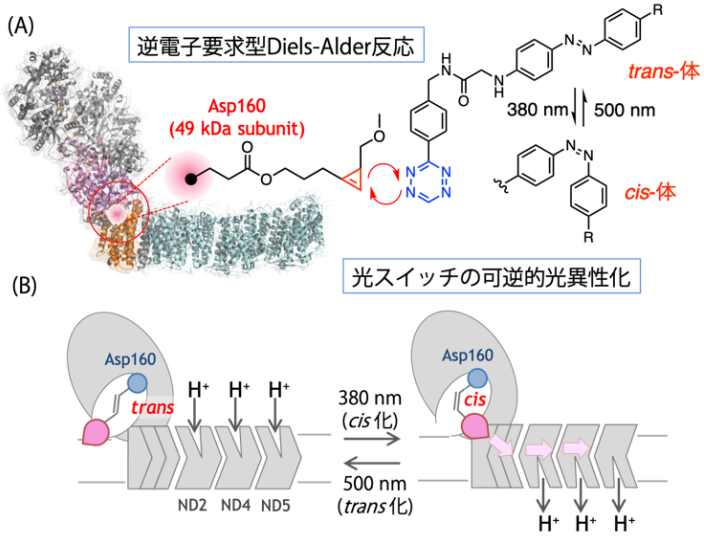


図6. 複合体-Iの光操作の模式図

（A）光スイッチの位置特異的導入（B）光スイッチの可逆的光異性化。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学大学院農学研究科生物機能制御化学研究室の三芳秀人教授、桝谷貴洋特定助教である。

文　献

1) Hirst J. Mitochondrial complex I, Annu. Rev. Biochem. 2013; 82: 551-75. Epub 2013 Mar 18. PMID: 23527692, DOI: 10.1146/annurev-biochem-070511-103700

2) Baradaran R, Berrisford J M, Minhas G S, Sazanov LA. Crystal structure of the entire respiratory complex I. Nature. 2013 Feb 28;494(7438):443-8. Epub 2013 Feb 17. PMID: 23417064 DOI: 10.1038/nature11871.

3) Zhu J, Vinothkumar K R, Hirst J. Structure of mammalian respiratory complex I. Nature. 2016 Aug 18;536(7616):354-358. Epub 2016 Aug 10. PMID: 27509854 DOI: 10.1038/nature19095.

4) Tsukiji S, Miyagawa M, Takaoka Y, Tamura T, Hamachi I. Ligand-directed tosyl chemistry for protein labeling in vivo. Nat Chem Biol. 2009 May;5(5):341-3. Epub 2009 Mar 29. PMID: 19330012 DOI: 10.1038/nchembio.157

5) Masuya T, Murai M, Morisaka H, Miyoshi H. Pinpoint chemical modification of Asp160 in the 49 kDa subunit of bovine mitochondrial complex I via a combination of ligand-directed tosyl chemistry and click chemistry. Biochemistry. 2014 Dec 16;53(49):7816-23. Epub 2014 Dec 2. PMID: 25419630 DOI: 10.1021/bi501342w.

6) Masuya T, Murai M, Ito T, Aburaya S, Aoki W, Miyoshi H. Pinpoint Chemical Modification of the Quinone-Access Channel of Mitochondrial Complex I via a Two-Step Conjugation Reaction. Biochemistry. 2017 Aug 15;56(32):4279-4287. Epub 2017 Jul 31. PMID: 28707880 DOI: 10.1021/acs.biochem.7b00612

7) Uno S, Kimura H, Murai M, Miyoshi H. Exploring the quinone/inhibitor-binding pocket in mitochondrial respiratory complex I by chemical biology approaches. J Biol Chem. 2019 Jan 11;294(2):679-696. Epub 2018 Nov 13. PMID: 30425100 DOI: 10.1074/jbc.RA118.006056.