

# Mode of action study of inhibitors of energy converting NADH-quinone oxidoreductases

## (エネルギー変換型 NADH-キノン酸化還元酵素の阻害剤に関する作用機構研究)

伊藤 剛

### 【緒言】

ミトコンドリア内膜やバクテリア細胞膜上に存在する NADH-キノン酸化還元酵素は、基質の酸化還元と共役したイオン輸送を行う膜タンパク質複合体であり、呼吸鎖電子伝達系の初発酵素として酸化的リン酸化 (ATP 合成) を担っている。NADH-キノン酸化還元酵素は抗寄生虫薬や殺虫・殺ダニ剤の標的分子として注目されており、これらの酵素に関する反応機構研究の進展は、新しい薬剤の開発研究に資するところが大きい。しかし、現時点では構造生物学的な情報は極めて限られており、反応機構に関しては未解明の点が多い。

本研究では、 $H^+$ を輸送する  $H^+$ -輸送性 NADH-キノン酸化還元酵素 (呼吸鎖複合体-I)、 $Na^+$ を輸送する  $Na^+$ -輸送性 NADH-キノン酸化還元酵素 ( $Na^+$ -NQR) について、合理的にデザイン合成したプローブ分子を駆使した化学修飾 (トシル化学および光親和性標識) によって阻害剤の結合部位を同定し、作用機構を明らかにすることを目指した。

### 1. Mode of action of amilorides as inhibitors of mitochondrial $H^+$ -pumping NADH-quinone oxidoreductase (complex I)

#### (ミトコンドリア $H^+$ -輸送性 NADH-キノン酸化還元酵素 (複合体-I) の阻害剤アミロライド類の作用機構)

呼吸鎖複合体-I は大きな膜タンパク質複合体であり (分子質量約 1 MDa, サブユニット数 45 個)、基質の酸化還元を担う親水性ドメインと、 $H^+$ 輸送を担う膜ドメインから構成される。最終の電子受容体であるキノンは、両ドメインの境界領域に存在する“洞窟様”の狭く長い空間 (quinone-access channel) で反応し、ロテノンやアセトゲニンなどの特異的阻害剤はこの空間に結合すると考えられている。膜ドメインを構成する主要な 3 つのサブユニット (ND2, ND4, ND5) は、進化的には  $Na^+/H^+$ -アンチポーターのホモログであり、 $H^+$ 輸送を担うと考えられている。

EIPA に代表されるアミロライド類は、 $Na^+/H^+$ -アンチポーターの代表的な阻害剤であると同時に、弱いながらも複合体-I を阻害することから、膜ドメインを構成する 3 つのアンチポーター様サブユニットのいずれか (あるいは全て) に結合すると考えられてきた。しかし、これを実証した報告例はこれまでにない。アミロライド類が実際にこれらサブユニットに結合するのであれば、 $H^+$ 輸送メカニズムを調べるための有力なケミカル分子ツールとなることが期待できる。

そこで、タンパク質の位置特異的な化学修飾法の一つである ligand-directed tosyl chemistry (トシル化学) を利用して、ウシ心筋ミトコンドリア複合体-I におけるアミロ

ライドの結合部位の同定を目指した。

複合体-I に対する市販アミロライド類の阻害活性は弱く、1 桁 nM レベルで阻害活性を示すロテノンやアセトゲニンには遥かに及ばない。アミロライドの基本構造であるピラジン環部とグアニジン部に任意の置換基を導入する合成方法を確立し、EIPA に代表される市販アミロライド類と比べて約 50 倍の阻害活性を示す化合物 **5m** を見出した。しかし、トシル化学に利用できるリガンド分子を誘導するには、阻害活性（結合親和性）のさらなる上昇が望まれた。

そこでグアニジン部に着目し、これをアミド型に改変した一連の化合物を合成したところ、内部に 3 級アミンを有する化合物 **AA6** において阻害活性が劇的に上昇することを見出した。最も高い複合体-I 阻害活性を示した化合物 **AA6** をテンプレートとして、アミロライドリガンド **AAT** を合成した。1 次タグとして末端アルキンを採用し、蛍光発色団やビオチンなどの 2 次タグをクリックケミストリーにより導入し、蛍光イメージングやペプチド化学解析を行うことを意図した。

ウシ心筋垂ミトコンドリア粒子 (SMPs) と **AAT** を 24 時間インキュベートし、その後クリックケミストリーにより蛍光タグ (TAMRA-N<sub>3</sub>) を導入した。SDS-PAGE によってタンパク質を分離し、ゲルの蛍光イメージングを行ったところ、約 50 kDa のタンパク質に TAMRA 由来の強い蛍光が観察され、位置特異的な化学修飾 (アルキン化) が起こっていることがわかった。続いて、**AAT** でインキュベートした SMPs に対して、クリックケミストリーによってビオチンタグを導入し、固定化アビジンによってアルキン化されたタンパク質を精製した。このタンパク質をトリプシン消化し、ペプチドマスフィンガープリンティング (MALDI-TOF MS) に供したところ、複合体-I の quinone-access channel を構成する 49 kDa サブユニットであることがわかった。さらに、LC-MS/MS によって **AAT** による修飾部位の解析を進めた結果、**AAT** は channel の最深部を構成する 49 kDa サブユニットの 160 番目のアスパラギン酸 (49 kDa・Asp160) を特異的にアルキン化していることが明らかになった。この結果は、アミロライド類が呼吸鎖複合体-I のアンチポーター様サブユニットに結合するという従来の考えを完全に否定するものである。

## 2. Mode of action of aurachins as inhibitors of Na<sup>+</sup>-pumping NADH-quinone oxidoreductase (Na<sup>+</sup>-NQR) from *Vibrio cholerae*

(コレラ菌 Na<sup>+</sup>-輸送性 NADH-キノン酸化還元酵素 (Na<sup>+</sup>-NQR) の阻害剤オーラシン類の作用機構)

コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) や緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) など一部の病原性細菌では、H<sup>+</sup>ではなく Na<sup>+</sup>の電気化学的ポテンシャル勾配が酸化的リン酸化や鞭毛運動の駆動力となっており、Na<sup>+</sup>-NQR が Na<sup>+</sup>の能動輸送を担っている。Na<sup>+</sup>-NQR は 100 種類以上の病原性

細菌に分布することが明らかになっているが、呼吸鎖複合体-I とは進化的にも構造的にも全く異なるため、 $\text{Na}^+$ -NQR のメカニズム研究の進展は、本酵素を標的とする選択性に優れた抗菌剤の開発研究に資するところが大きい。

2014 年にコレラ菌由来の  $\text{Na}^+$ -NQR (分子質量約 200 kDa, サブユニット数 6 個 (NqrA~F)) の X 線結晶構造が報告されたが、メカニズム解明の鍵となるキノン結合部位の同定には至らなかった。従来、 $\text{Na}^+$ -NQR の阻害剤としては、HQNO などの市販オーラシン類が使われてきたが、その阻害活性は  $\mu\text{M}$  オーダーとさほど強くなかった。そこで、強力な阻害活性を發揮するオーラシン類を発掘し、光親和性標識法によって阻害剤の結合部位を明らかにすることを目的とした。

コレラ菌から単離・精製された  $\text{Na}^+$ -NQR を用いて、三芳研究室が保有するオーラシン類ライブラリーについてスクリーニングを進め、HQNO の約 1000 倍強力なオーラシン D-42 (AD-42) を見出した。AD-42 をテンプレートとして、キノロン環上あるいは側鎖末端に光反応性基 (アジド基) を導入した光反応性オーラシン  $[^{125}\text{I}]\text{PAD-1}$  および  $[^{125}\text{I}]\text{PAD-2}$  をそれぞれ合成し、特に  $[^{125}\text{I}]\text{PAD-2}$  は強力な阻害活性を保持することを確認した。

コレラ菌  $\text{Na}^+$ -NQR に対して光親和性標識実験を行い、 $[^{125}\text{I}]\text{PAD-1}$  あるいは  $[^{125}\text{I}]\text{PAD-2}$  で標識された  $\text{Na}^+$ -NQR を SDS-PAGE で解析したところ、両化合物とも NqrB サブユニットを特異的に標識することがわかった。また、電子供与体である NADH 存在下では、NqrB に対する標識が顕著に抑制されたが、電子受容体であるキノン存在下では全く影響を受けなかった。続いて、 $[^{125}\text{I}]\text{PAD-1}$  あるいは  $[^{125}\text{I}]\text{PAD-2}$  で標識した NqrB サブユニットを単離し、プロテアーゼによる徹底消化を行った。その結果、 $[^{125}\text{I}]\text{PAD-1}$  および  $[^{125}\text{I}]\text{PAD-2}$  は、NqrB の N 末端領域の Arg43-Lys54 と Trp23-Gly89 をそれぞれ特異的に標識することがわかった。X 線結晶構造に基づく、この領域はユビキノンの結合部位と予想される “solvent-accessible cavity” と呼ばれる空間の一部を構成しているが、阻害剤は必ずしもキノンと拮抗的に作用するものではないことがわかった。

$[^{125}\text{I}]\text{PAD-1}$  および  $[^{125}\text{I}]\text{PAD-2}$  を用いた光親和性標識実験において、一定の実験条件下では、競合する阻害剤が存在することによってむしろ標識率が顕著に上昇するという一見不思議な現象が認められた。この現象を合理的に説明するために、酵素に対して阻害剤が 2 分子まで結合するという仮定に基づいた平衡論モデルを提案した。

## 【総括】

### 1. Mode of action of amilorides as inhibitors of mitochondrial $\text{H}^+$ -pumping NADH-quinone oxidoreductase (complex I)

(ミトコンドリア  $\text{H}^+$ -輸送性 NADH-キノン酸化還元酵素 (複合体-I) の阻害剤アミロライド類の作用機構)

- 1) 高い阻害活性を示すアミド型アミロライドを見出し、トシル化学に利用できるアミロライドリガンド **AAT** を合成した。
- 2) ウシ心筋 SMPs を用いたトシル化学により、**AAT** が quinone-access channel 内の 49 kDa・Asp160 を特異的に修飾することがわかった。
- 3) アミロライド類は膜ドメイン (ND2, ND4, ND5 サブユニット) ではなく、quinone-access channel に結合することを初めて明らかにした。

## 2. Mode of action of aurachins as inhibitors of Na<sup>+</sup>-pumping NADH-quinone oxidoreductase (Na<sup>+</sup>-NQR) from *Vibrio cholerae*

(コレラ菌 Na<sup>+</sup>-輸送性 NADH-キノン酸化還元酵素 (Na<sup>+</sup>-NQR) の阻害剤オーラシン類の作用機構)

- 1) 高い阻害活性を示すオーラシン AD-42 を見出し、光親和性標識に用いる [<sup>125</sup>I]PAD-1 と [<sup>125</sup>I]PAD-2 を合成した。
- 2) [<sup>125</sup>I]PAD-1 と [<sup>125</sup>I]PAD-2 がコレラ菌 Na<sup>+</sup>-NQR の Arg43-Lys54 と Trp23-Gly89 にそれぞれ結合することを明らかにした。
- 3) Na<sup>+</sup>-NQR におけるオーラシン類の作用機構モデルを提案した。