

# Studies on the reaction mechanism of ubiquinone in respiratory complex I

(呼吸鎖複合体-Iにおけるユビキノン反応機構に関する研究)

宇野 晋平

## 【緒言】

NADH-ユビキノン酸化還元酵素(呼吸鎖複合体-I)はミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系の初発酵素であり、基質の酸化還元と共役してプロトンを送る酸化リン酸化(ATP 合成)に於ける基幹酵素である。ヒトでは、複合体-I の機能障害がATP 生成量の低下や活性酸素の発生を誘発し、様々な神経変性疾患の原因となることがわかっている。医農薬分野では、抗寄生虫薬や殺虫・殺ダニ剤の有望な標的酵素として注目されており、本酵素の基礎研究の大幅な進展が期待されている。しかし、複合体-I は非常に複雑で巨大な膜タンパク質複合体であるため(例えば、ヒトでは異なる 45 のサブユニットから構成され、総分子質量は約 980 kDa に達する)、呼吸鎖酵素の中で最も研究の進展が遅れている。本研究では、独自にデザイン合成したユビキノン(UQ)類を駆使することで、複合体-I におけるユビキノンの反応機構の解明を目指した。

## 1. Exploring the quinone/inhibitor-binding pocket in mitochondrial respiratory complex I by chemical biology approaches

(ケミカルバイオロジー手法を用いたキノ/阻害剤結合ポケットの構造特性の解明)

2016 年に解かれた単粒子 cryo-EM 構造によると、複合体-I は電子伝達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から構成される特徴的な L 字型構造をとることがわかった。また、UQ が還元されるキノ結合ポケットは、入口内径が約 5 Å、奥行きが約 30 Å の細長い“洞窟様”の構造をとることが示唆された。そのため、UQ は小さな入口から侵入して最深部に到達した後に、鉄硫黄クラスター(N2)から電子を受け取り、後退りして洞窟から出ていくという反応モデルが提唱された。しかし、このモデルは実験的に証明されたわけではない。

このモデルを検証すべく、UQ の側鎖末端に洞窟の内径よりも嵩高いブロックを導入した UQ 類(SF-UQ 類)およびポスファチジルコリンと UQ をハイブリットさせた UQ 類(PC-UQ 類)を合成した。これらのキノ類は“洞窟モデル”を前提とした場合に、立体障害によって最深部に到達できず反応し得ないと予想される。ウシ心筋亜ミトコンドリア粒子(submitochondrial particles, SMPs)を用いて複合体-I における活性を評価したところ、SF-UQ 類および PC-UQ 類は天然 UQ のアナログである UQ<sub>2</sub>よりも低活性ではあるものの、複合体-I の電子受容体となり得ることがわかった。この結果は、“洞窟モデル”では説明できず、「キノ結合ポケットはダイナミックに構造変化することで、多様なリガンド分子を柔軟に収容できる」ことを強く示唆するものである。

## 2. Oversized ubiquinones as molecular probes for structural dynamics of the ubiquinone reaction site in mitochondrial respiratory complex I

(嵩高いユビキノン分子を駆使した呼吸鎖複合体-I のキノ結合ポケットの構造特性の解明)

キノ結合ポケットに侵入できないような嵩高い UQ 類の構造展開によって、高活性を有するキノ類の獲得を目指した。その結果、約 13 Å のブロックを持つ新たな oversized ubiquinone 類(OS-UQ 類)を見出した。キノ環とブロックの間のスペーサー長を変化させた OS-UQ1~OS-UQ5 を合成して SMPs を用いて複合体-I における電子伝達活性を評価したところ、OS-UQ2 は UQ<sub>2</sub>と同程度の活性を有することがわかった。

興味深いことに、最もスペーサー長の短い OS-UQ1 では、他の UQ 類と比較して電子伝達当たりのプロトン輸送活性が有意に低下することが明らかになった。これらの結果は、キノン結合ポケットが多様なリガンド分子を収容できるという前述の考えを支持すると同時に、スペーサーが短い場合にはブロックによる立体障害のために、プロトン輸送の引き金となるキノン結合ポケットの構造変化が誘導できないことが示唆された。

OS-UQ 類は側鎖が長くなるにつれて疎水性が上昇し水溶解性が減少する。その結果、SMPs を用いた実験系では長い側鎖を持つ UQ 類は SMP 膜内に分配せず、活性を測定することができない。そこで、UQ 類とリン脂質から調製した UQ 含有リポソームに対して、ウシ心筋ミトコンドリアから単離精製した複合体-I と、アフリカトリパノソーマ由来のキノール酸化酵素 (TAO) を同時に再構成したプロテオリポソームを作成することで、疎水性の高い UQ 類のアッセイ系を構築した。このアッセイ系では、複合体-I によって還元された UQ は TAO によって再酸化されるため、リポソーム膜内の UQ 濃度を一定に保つことができる。本アッセイ系を用いて疎水性の高い OS-UQ6~OS-UQ8 の活性を評価したところ、SMPs での実験結果とは対照的に、洞窟の奥行き(約 30 Å)よりも長いイソプレン側鎖を持つ OS-UQ8 のみが複合体-I の電子受容体となることがわかった。この結果は洞窟モデルを支持するものである。このような SMPs と単離複合体-I における相反する結果は、ミトコンドリア内膜に埋まっている native 複合体-I と、単離複合体-I の間には何かしらの構造的な差異がある可能性を示唆している。

### 3. Dynamic structural properties of the ubiquinone reaction cavity of mitochondrial respiratory complex I

(呼吸鎖複合体-I のユビキノン反応部位におけるダイナミックな構造特性の解明)

光反応性基であるジアジリンとヨウ素を *meta* あるいは *para* 置換した 2 系統の光反応性 UQ 類 (photoreactive ubiquinone, pUQ 類) を合成した。ここで、*meta* 体に比べて *para* 体は約 1 Å だけ高い。SMPs を用いて複合体-I における pUQ 類の電子伝達活性を評価したところ、*meta* 体および *para* 体は同程度の活性を示した。一方、単離複合体-I における電子伝達活性を評価すると、*meta* 体に対して *para* 体の活性が顕著に低下することがわかった。

4 種類の pUQ 類に関して、ヨウ素を放射性同位元素  $^{125}\text{I}$  に置換して光親和性標識実験を行ったところ、キノン結合ポケットを構成するサブユニットの 1 つである ND1 に強く結合することがわかった。SMPs (native 複合体-I) と単離複合体-I のそれぞれにおいて、標識された ND1 サブユニットを分離して消化酵素切断に供したところ、両者の間で結合部位にわずかな違いがあることがわかった。これらの結果は、ミトコンドリア内膜に埋まっている native 複合体-I と単離複合体-I の間にはキノン結合ポケットの構造的な差異があることを強く示唆している。

一方で、ND1 サブユニット内における pUQ 類の結合部位を比較したところ、*meta* 体と *para* 体で大きく異なっていることが明らかになった。さらに、キノン結合ポケット近傍に結合するがそれぞれ異なる結合部位を持つ複数の複合体-I 阻害剤と pUQ 類の拮抗試験を行ったところ、側鎖構造を反映して異なる拮抗パターンを示すことが明らかになった。これらの結果から、pUQ 類は側鎖構造に依存して異なる侵入経路を経て N2 クラスタに接近することが示唆された。

## 【総括】

### 1. Exploring the quinone/inhibitor-binding pocket in mitochondrial respiratory complex I by chemical biology approaches

(ケミカルバイオロジー手法を用いたキノン/阻害剤結合ポケットの構造特性の解明)

- i. 構造生物学から提唱される“洞窟モデル”では反応し得ないUQ類(SF-UQ類およびPC-UQ類)を合成し、SMPsを用いて複合体-Iの電子伝達活性を評価したところ、良好な電子受容体となることがわかった。

### 2. Oversized ubiquinones as molecular probes for structural dynamics of the ubiquinone reaction site in mitochondrial respiratory complex I

(嵩高いユビキノンを駆使した呼吸鎖複合体-Iのキノン結合ポケットの構造特性の解明)

- i. UQ<sub>2</sub>と同程度の活性を示す嵩高いユビキノン類(OS-UQ類)を見出だした。OS-UQ類のスペーサーが短い場合には、ブロックによる立体障害のために、プロトン輸送に要求されるキノン結合ポケットの構造変化を誘導できないことがわかった。
- ii. 単離複合体-Iを用いたプロテオリポソーム系においてOS-UQ類の電子伝達活性を評価したところ、洞窟モデルを支持する実験結果を得た。SMPsを用いた実験結果と相反するこの結果から、native複合体-Iと単離複合体-Iではキノン結合ポケットの構造に何らかの差異がある可能性が示唆された。

### 3. Dynamic structural properties of the ubiquinone reaction cavity of mitochondrial respiratory complex I

(呼吸鎖複合体-Iのユビキノン反応部位におけるダイナミックな構造特性の解明)

- i. ジアジリンおよびヨウ素が異なる置換パターンで置換されている2系統の光反応性ユビキノン類(pUQ類)を合成した。<sup>125</sup>I-pUQ類を用いた光親和性標識実験の結果も、native複合体-Iと単離複合体-Iの間でキノン結合ポケットの構造に差異があることを強く示唆した。
- ii. pUQ類は側鎖構造に依存して異なる侵入経路を通過してN2クラスターに接近することが強く示唆された。