

Studies on the action mechanism of epoxy-cyclohexenedione-type compounds,
a new class of inhibitors of the mitochondrial ADP/ATP carrier

(ミトコンドリア ADP/ATP 輸送体の新規阻害剤エポキシシクロヘキセンジオン類の
作用機構研究)

青山 綾希

【緒言】

ミトコンドリア ADP/ATP 輸送体(AAC)は、ミトコンドリア内膜上で ADP と ATP の交換輸送を行う分子質量約 30 kDa の膜輸送体であり、マトリックス側で生産された ATP を細胞質へ供給する役割を担っている。AAC は細胞のエネルギー代謝の要となる膜輸送体であるため、AAC の特異的阻害剤に関する研究は、エネルギー代謝を制御する新規な薬剤の開発研究に資するところが大きい。しかし、これまでに多数の特異的阻害剤が見出され、殺虫・殺菌剤などの標的分子としての地位が確立されているミトコンドリア呼吸鎖電子伝達酵素とは対照的に、AAC に特異的に作用する阻害剤として報告されているのはカルボキシアトラクトシド類(CATR)とボンクレキン酸類 (BKA) の 2 種類だけである。また、AAC に関する構造生物学的な情報は限られており、創薬標的としての知見はおろか、AAC の構造変化や機能に関する基礎的な知見も不足しているのが現状である。本研究では、AAC を標的とする新規な特異的阻害剤を探索し、その作用機構研究を通じて AAC の構造と機能に関する新たな知見を得ることを目指した。

1. Discovery of epoxy-cyclohexenedione-type compounds (ECHDs) as inhibitors of bovine mitochondrial ADP/ATP carrier (AAC)

(ミトコンドリア ADP/ATP 輸送体の新規阻害剤エポキシシクロヘキセンジオン類の発見)

AAC に代表されるミトコンドリア膜輸送体とは対照的に、ロテノン (複合体-I) やアンチマイシン (複合体-III) などのミトコンドリア呼吸鎖酵素阻害剤は、基礎研究のツールとして呼吸鎖酵素の構造と機能の解明に大きく寄与してきた。同様に、新規の AAC 阻害剤を見出しその作用機序を解明することは、AAC の構造と機能の解明に寄与する可能性が高い。したがって、本章では既知の AAC の阻害剤と異なる分子骨格を有する新規阻害剤を探索し、クリックケミストリーによるタグ分子の AAC への導入を指向した誘導体を合成し、その作用機序を解明することを試みた。

ウシ心筋ミトコンドリアから調製した亜ミトコンドリア粒子 (submitochondrial particles, SMPs) による [¹⁴C]ADP の取込みを指標として、所属研究室が保有する化合物ライブラリーから AAC に対する新規阻害剤の探索を行った。その結果、既知の AAC 阻害剤である BKA 類や CATR 類と分子骨格の異なる **AMM-59** のようなエポキシシクロヘキセンジオン類 (ECHD 類) が [¹⁴C]ADP の取り込みを阻害することを見出した。

有機金属試薬である phenylarsine oxide (PAO) は、AAC 表面上のシステイン残基 (SH 基) と安定な複合体を形成するため、PAO を固定化したアガロースレジンを用いることで、可溶化したウシ心筋 SMPs から AAC を捕捉できることが知られている。この PAO レジンによる AAC の特異的な捕捉が、**AMM-59** によって顕著に阻害されたことから、ECHD 類による $[^{14}\text{C}]$ ADP の取り込み阻害は、ECHD 類と AAC との直接的な相互作用に起因することが強く示唆された。

ECHD 類はエポキシ基と α , β -不飽和カルボニル基の 2 箇所の求電子性反応点を持つため、AAC の阻害には求核性アミノ酸残基との共有結合形成が関わっている可能性がある。この作業仮説を検証するため、アルキル側鎖にクリックケミストリーの足場となる末端アルキンを持つ ECHD 誘導体 (**AMM-120**) を合成した。ウシ心筋 SMPs を **AMM-120** 存在下でインキュベートし、蛍光発色団を有する 2 次タグ (TAMRA- N_3) をクリックケミストリーにより導入したところ、AAC の分子質量に相当する約 30 kDa のタンパク質に単一の蛍光バンドが観察され、その蛍光強度は濃度依存的に上昇した。

続いて、過剰量の **AMM-59** 存在下で SMPs の化学修飾を行った。本実験は、高濃度の **AMM-59** 存在下で AAC に対する化学修飾が消失することを期待しての拮抗試験であったが、興味深いことに、AAC の顕著な凝集が観察された (詳細は 2 章に記載)。

ECHD 類が AAC を特異的に化学修飾するという結果を受け、AAC における ECHD 類の修飾部位をアミノ酸残基レベルで同定することを試みた。哺乳類 AAC では、マトリックス側に露出した 3 つのシステイン (Cys57, Cys160, Cys257) が広く保存されている。近年、ミトコンドリアタンパク質のシステイン残基は内在的な化学修飾の標的となることが報告されているため、「AAC 表面上のシステイン残基が ECHD 類による化学修飾の標的ではないか」と予想し、種々のシステイン修飾剤やペプチド化学分析を駆使して修飾部位の同定を進めた。

システイン修飾剤である *N*-エチルマレイミド (NEM) でウシ心筋 AAC を処理すると、短時間のインキュベートでは Cys57 のみ、長時間のインキュベートでは 3 つのシステイン全てが修飾を受けることがわかっている。AAC 表面上の 3 つのシステイン残基のうち、Cys57 を選択的に修飾した AAC サンプルに対して **AMM-120** を処理したところ、**AMM-120** による化学修飾が顕著に抑制された。

一方、ウシ心筋 SMPs をクロスリンク試薬である銅(II)-*o*-フェナントロリン ($\text{Cu}(\text{OP})_2$) で処理すると、AAC 単量体の Cys57 同士が分子間ジスルフィド結合によって繋がった二量体を形成することが報告されている。**AMM-59** 存在下では、濃度依存的に二量体の形成量が減少し、興味深いことに、さらに高濃度条件下では未修飾のシステイン残基 2 つによるジスルフィド結合を介した三量体形成が観察された。この結果は、Cys57 が ECHD 類による化学修飾を受けたことで、Cys57 を介した AAC の二量体形成が抑制されたことを示唆している。

上記のシステイン修飾試薬による実験結果を裏付けるため、**AMM-120** により蛍光発色団を導入した AAC を単離し、CNBr あるいは Lys-C による限定消化を行った。これらの処理によって新たに生成した蛍光ペプチドの Tricine-SDS-PAGE のパターンは、**AMM-120** による化

学修飾が Cys57 に入った場合に期待されるパターンを示した。以上の結果から、Cys57 が ECHD 類による主たる修飾部位であると結論した。

2. Mechanism of aggregation of AAC induced by ECHDs

(ECHD 類により誘導される AAC の凝集機構)

ECHD 類は低濃度において AAC の Cys57 を特異的に化学修飾することによりヌクレオチド輸送を阻害するが、高濃度においては AAC の特異的な凝集を誘導することが 1 章において明らかになった。Cu(OP)₂ は AAC のシステイン残基同士の S-S 結合を介して多量化を誘導することが報告されているものの、BKA 類や CATR 類といった既知の AAC 阻害剤においてはそのような凝集誘導効果は認められておらず、極めてユニークな現象である。1 章と同様に、SMPs を用いた様々な条件下において SDS-PAGE による解析を行い、ECHD 類による AAC 凝集誘導のメカニズムを解明することを試みた。

AAC 表面上に存在する 3 つのシステイン残基に着目し、それら全てを NEM によって修飾したところ、ECHD 類による AAC の凝集誘導は完全に抑制された。一方、Cys57 のみを NEM 修飾した場合は、依然として凝集誘導が観察されたことから、残り 2 つのシステイン残基 (Cys160 と Cys257) が ECHD 類と共有結合を形成し、これが AAC 凝集反応の“トリガー”となることが示唆された。また、還元条件下あるいはラジカル消去剤の存在下においても同様の凝集現象が誘導されたことから、この凝集は多くのタンパク質で観察される凝集の原因である S-S 結合やラジカル重合といったメカニズムで誘導されるものではないことがわかった。

ECHD 類と同じく求電子性反応基を持つ高度不飽和脂肪酸の過酸化分解物である 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) は、AAC と共有結合を形成することが知られている。4-HNE のウシ心筋 AAC に対する効果を ECHD 類と比較したところ、4-HNE もシステイン残基を選択的に修飾することがわかったが、高濃度の 4-HNE を作用させても AAC の凝集誘導はおろか、AAC による [¹⁴C]ADP 輸送活性の阻害効果も観察されなかった。従って、AAC のシステイン残基の化学修飾によるヌクレオチド輸送の阻害や凝集誘導効果は、求電子性の疎水性分子に共通して見られる現象ではなく、ECHD 類に特徴的な現象であることが明らかになった。

【総括】

1. Discovery of epoxycyclohexenedione-type compounds (ECHDs) as inhibitors of bovine mitochondrial ADP/ATP carrier (AAC)

(ミトコンドリア ADP/ATP 輸送体の新規阻害剤エポキシシクロヘキセンジオン類の発見)

- i. ウシ心筋垂ミトコンドリア粒子 (SMPs) による [¹⁴C]ADP 取り込みを指標とする評価系を用いて、ミトコンドリア AAC の基質輸送活性を阻害するエポキシシクロヘキセンジオン (ECHD) 類を見出した。

- ii. アルキル側鎖に末端アルキンを持つ ECHD 誘導體 (AMM-120) を合成し、ECHD 類がウシ心筋ミトコンドリア AAC のマトリックス側表面に露出した Cys57 に共有結合することによって、 $[^{14}\text{C}]$ ADP 取り込みを阻害することを明らかにした

2. Mechanism of aggregation of AAC induced by ECHDs

(ECHD 類により誘導される AAC の凝集機構)

- i. 高濃度の ECHD 類が AAC の複数のシステイン残基に共有結合することによって、AAC の特異的な凝集を誘導することを見出した。これは、ECHD 類が Cys57 以外のシステイン残基と共有結合を形成することが“トリガー”となる現象であることがわかった。
- ii. 高濃度の ECHD 類によって誘導される AAC の凝集は、4-hydroxy-2-nonenal のような、同じく AAC に作用する求電子性の疎水性分子に共通して見られる現象ではなく、ECHD 類に特徴的な現象であることがわかった。