

(論文内容の要旨)

ミトコンドリア呼吸鎖酵素系の初発酵素として機能する NADH-ユビキノン酸化還元酵素 (複合体-I) は、呼吸鎖のプロトンポンプ活性の約半分を担うエネルギー代謝にとって重要な酵素である。ヒトでは、複合体-I の機能障害による活性酸素の発生や ATP 生成量の低下が原因となって、パーキンソン病などの種々の神経変性疾患が発症することがわかってきた。また、農業科学分野では殺虫・殺ダニ剤の新しいターゲット酵素としても近年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。しかし、哺乳類ミトコンドリアの複合体-I は 45 個の異なるサブユニットから構成される巨大な膜酵素 (約 1 MDa) であるため、呼吸鎖酵素の中で最も研究の進展が遅れている酵素である。特に、ユビキノン還元やプロトンポンプ活性という本酵素の中核機能を担っている膜ドメインについての知見は極めて限られている。

このような背景から、複合体-I 研究を格段に発展させるためには、膜ドメインについての機能解明の進展が急務である。複合体-I の特異的阻害剤の作用部位は、膜ドメインの機能を担っている反応場 (ホットスポット) であると考えられていることから、本論文は、2 種類の阻害剤を鋳型として光親和性標識プローブを合成し、ウシ心筋ミトコンドリア複合体-I における阻害剤の結合部位をアミノ酸残基レベルで明らかにしたものである。その成果は以下のように要約される。

1) バンレイシ科植物に由来するアセトゲニン類は、ウシ心筋ミトコンドリア複合体-I の最も強力な阻害剤である。アセトゲニン類の γ -ラクトン環は活性発現に必須の構造ユニットであるが、この部分を光反応性基であるフェニルジアジリン環に置換した光親和性標識プローブ [^{125}I]TDA [(trifluoromethyl)phenyldiaziriny] acetogenin を合成し、詳細な光親和性標識実験を行った。その結果、[^{125}I]TDA は膜ドメインの構成成分である疎水性に富んだ ND1 サブユニット (分子量 35 kDa の 7 回膜貫通タンパク質) に特異的に結合することを明らかにした。種々のプロテアーゼを用いた限定ペプチド消化とペプチドマッピングを行い、4~5 番目の膜貫通ヘリックスを構成する 49 残基のペプチド断片 (Val144-Glu192) の中に標識部位が存在することがわかった。

また、 $[^{125}\text{I}]$ TDA による ND1 サブユニットの架橋反応は、他の種々の複合体-I 阻害剤によって濃度依存的に抑制されたことから、ND1 サブユニットは、複数の阻害剤が共有している大きな阻害剤結合ポケットを構成するサブユニットの 1 つであることを明らかにした。

2) キナゾリン系阻害剤は、哺乳類の複合体-Iだけでなく、酵母や線虫の酵素に対しても強力な阻害活性を示す化合物であり、複合体-Iの研究領域で広く認知されている阻害剤である。酵素との架橋反応の特異性を確保するため、キナゾリン骨格上に光反応性のアジド基を有する光親和性標識プローブ $[^{125}\text{I}]\text{AzQ}$ [6-azido-4-(4-iodophenetylamino)quinazoline] を合成し、光親和性標識実験に供した。その結果、 $[^{125}\text{I}]\text{AzQ}$ は複合体-Iの親水性ドメインの 49 kDaサブユニットと膜ドメインのND1 サブユニットをおよそ 4:1 の比率で特異的に標識することがわかり、キナゾリン系阻害剤は両サブユニットの境界領域に作用していることが明らかになった。また、 $[^{125}\text{I}]\text{AzQ}$ による架橋反応も、種々の複合体-I阻害剤によって濃度依存的に抑制されたことから、ND1 サブユニットに加え、49 kDaサブユニットも阻害剤結合ポケットを構成するサブユニットの 1 つであることがわかった。

さらに、 $[^{125}\text{I}]\text{AzQ}$ の主たる標識部位である49 kDaサブユニットについて、各種プロテアーゼを用いて限定ペプチド消化とペプチドマッピングを行うと同時にタンパク質化学的解析を進めた結果、Asp41-Arg63の23残基の配列中に $[^{125}\text{I}]\text{AzQ}$ の標識部位が存在することを明らかにした。この領域は、好熱細菌 (*Thermus thermophilus*) 複合体-Iの親水性ドメインの結晶構造から予想されているユビキノンの結合ポケットを構成する領域と重なり、酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 複合体-Iにおいて位置特異的変異によって明らかになっているユビキノン還元に関わる重要なアミノ酸残基群を包含する領域ともよく対応した。このことから、阻害剤結合部位はユビキノン還元部位と重なるか、あるいは近傍に位置していることが強く示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

巨大な膜酵素である NADH-ユビキノン酸化還元酵素（複合体-I）の機能や構造を解明するために、特異的阻害剤に関する作用機構研究は有力な手段である。本論文は、有機化学的アプローチである光親和性標識法によって、2種類の代表的な複合体-I 阻害剤の結合部位をアミノ酸残基レベルで明らかにすると同時に、本酵素の親水性ドメインと膜ドメインの境界領域に、化学構造的に多様な阻害剤の共通の結合ポケットが存在することを明らかにしたものである。本論文で評価すべき点は、以下の3点に要約できる。

1) アセトゲニンの光反応性プローブ [^{125}I]TDA を設計・合成し、光親和性標識実験に供した結果、[^{125}I]TDA の結合サブユニットは複合体-I の膜ドメインを構成する ND1 サブユニットであることを明らかにした。詳細なペプチド限定分解とその解析に基づき、[^{125}I]TDA の標識部位は4～5番目の膜貫通ヘリックスを構成する49残基(Val144-Glu192)の配列の中に存在することを明らかにした。

2) キナゾリン系阻害剤の光反応性プローブ [^{125}I]AzQ を設計・合成し、光親和性標識実験を行った。その結果、親水性ドメインを構成する49 kDa サブユニットと膜ドメインを構成する ND1 サブユニットの2つが、それぞれ約4 : 1の比率で標識されることがわかった。主な標識部位である49 kDa サブユニットについてペプチド限定分解とペプチドマップ解析を行ったところ、23残基(Asp41-Arg63)からなる配列の中に標識部位が存在することが明らかになった。この領域は、酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 複合体-I において、ユビキノン還元反応に重要な役割を果たすアミノ酸残基を含む領域とよく対応していた。

3) 上記2種類の阻害剤プローブは、活性発現に必須の構造ユニットにそれぞれ光分解性基を有することから、酵素との架橋反応においては極めて高い特異性を発揮する。このような高い特異性を有するプローブ分子を用いた光親和性標識の拮抗試験から、化学的に多様な複合体-I 阻害剤は、49 kDa および ND1 サブユニットを構成成分として含む大きな阻害剤結合ポケットを共有していることが強く示唆された。また、49 kDa サブユニット（親水性ドメイン）と ND1 サブユニット（膜ドメイン）が互いに隣接していること

が明らかになり、従って阻害剤結合ポケ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ることが示された。またこの阻害剤結合領域は、分子生物学および構造生物学的研究から示唆されているユビキノン結合部位とも空間的に近接していることがわかった。

以上のように本論文は、優れた合成分子プローブを活用した光親和性標識法によって、ミトコンドリア NADH-ユビキノン酸化還元酵素（複合体-I）の機能に深く関わる阻害剤結合ドメインをアミノ酸残基レベルで初めて明らかにしたものである。この成果は、有機化学、生化学および創薬化学の進展に資するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 21 年 2 月 10 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。