

氏 名	い ち まる なお や 一 丸 直 哉
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1677 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Synthesis and Mode of Action Studies on Δ lac-Acetogenins, a Novel Type of Inhibitors of Bovine Heart Mitochondrial Complex I (ウシ心筋ミトコンドリア複合体-Iの新規阻害剤 Δ lac-アセトゲニン類の合成と作用機構研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 西 岡 孝 明 教 授 宮 川 恒 教 授 西 田 律 夫

論 文 内 容 の 要 旨

NADH-ユビキノ酸化還元酵素（複合体-I）はミトコンドリアやバクテリアの呼吸鎖電子伝達系の初発酵素で、ATP 生合成や物質輸送の駆動力となるプロトンポンプ活性を有する細胞の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 の機能障害と種々の神経変性疾患との因果関係が指摘され、また農業科学分野では殺虫・殺ダニ剤の重要なターゲット酵素として注目されていることから、本酵素の基礎研究における進展が期待されている。複合体-I では特異的な阻害剤が幾つか知られているが、阻害剤の作用部位はキノンの酸化還元反応やプロトンポンプ活性という酵素の中核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ため、阻害剤の詳細な作用機構研究は酵素機能を解明するうえで重要である。本論文は、ウシ心筋ミトコンドリア複合体-I の強力な阻害剤であるバンレイシ科植物の二次代謝産物アセトゲニン類から誘導した Δ lac-アセトゲニン類と、アセトゲニン類が共通構造として持つテトラヒドロフラン（THF）骨格をピペラジン骨格へ改変した誘導体の有機合成と詳細な作用機構研究を通して、複合体-I における阻害剤結合部位についての知見を得たものであり、その主な内容は以下の通りである。

1. 次の4つの実験事実から、 Δ lac-アセトゲニン類は天然型アセトゲニン類を含む既存の複合体-I 阻害剤とは作用機構の異なる全く新規な阻害剤であると結論付けた。i) Δ lac-アセトゲニン類では、bis-THF 骨格から mono-THF 骨格に改変すると阻害活性が顕著に低下するなど、構造活性相関のプロファイルが天然型アセトゲニン類と大きく異なっていた。ii) 複合体-I 阻害に関する速度論的解析を行ったところ、 Δ lac-アセトゲニン類と天然型アセトゲニン類との間に阻害活性の加減性は認められなかった。iii) 天然型アセトゲニン類を含む既知の阻害剤で複合体-I を阻害すると、酵素中のラジカル中間体の不安定化に起因して活性酸素が大量に発生するが、 Δ lac-アセトゲニン類による阻害では活性酸素の発生量が既知の阻害剤の約1/10と極端に少なかった。iv) Δ lac-アセトゲニン類は、ND1サブユニットに結合することがわかっている天然型アセトゲニンの光親和性標識プローブと拮抗しなかった。

2. Δ lac-アセトゲニン類の bis-THF 環部に存在する6つのキラル中心の立体化学が阻害活性に与える影響を調べるため、5種類のジアステレオマーを立体選択的に合成した結果、この部分の立体化学が阻害活性に有意な影響を与えることが明らかになった。ここで、最も強力な阻害活性を示した化合物は、6つのキラル中心の立体化学が全て *R* 配置である異性体であった。

3. Δ lac-アセトゲニン類の bis-THF 環部との構造的類似性に着目してピペラジン骨格を有する誘導体を合成し、阻害活性を精査した。その結果、i) Δ lac-アセトゲニン類と著しく異なる構造活性相関のプロファイルを示し、ii) 複合体-I が触媒する逆反応に対する阻害活性が顕著に低下し、阻害作用に顕著な異方性が認められるなど、元の Δ lac-アセトゲニン類と作用機構が異なることが強く示唆された。

4. 上記ピペラジン誘導体の光親和性標識プローブ ($[^{125}\text{I}]\text{AFP}$) を合成して結合部位の同定を試みた結果、複合体-I

を構成する45個の異なるサブユニットのうち49 kDaとTYKYの2つのサブユニットが結合部位であることをトリプシン消化ペプチドの精密質量分析によって明らかにした。他の複合体-I 阻害剤に関する光親和性標識実験の結果を総合すると、阻害剤結合部位は複数のサブユニットから構成され、異なる阻害剤は必ずしも結合部位を共有しているわけではないことが強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

NADH-ユビキノン酸化還元酵素（複合体-I）の特異的阻害剤に関する研究は、本酵素の機能や構造を解明するための有効な手段である。本論文は、2系統の阻害剤の有機合成研究と作用機構研究を通して、これらの阻害剤が全く新規な作用特性を持つ阻害剤であることを示すとともに、光親和性標識実験を通して阻害剤結合部位の構造的な特性を明らかにしたものであり、成果として評価すべき点は以下のとおりである。

1. 一連の Δ lac-アセトゲニン類の構造活性相関研究、複合体-I 阻害に関する速度論的解析、複合体-I 阻害に起因する活性酸素発生量の比較、および天然型アセトゲニンの光親和性標識プローブとの拮抗試験の結果を総合して、 Δ lac-アセトゲニン類は天然型アセトゲニン類を含む既知の複合体-I 阻害剤とは作用機構の異なる全く新規な阻害剤であることを明らかにした。

2. Δ lac-アセトゲニン類の立体選択的なジアステレオマー合成を通して、 Δ lac-アセトゲニン類の唯一のトキソフォアである bis-THF 環部の立体化学が、複合体-I の阻害活性発現に有意な影響を与えることを明らかにした。天然型アセトゲニン類においては、bis-THF 環部の立体化学が阻害活性に影響を与えなかったことから、ここでも Δ lac-アセトゲニン類と天然型アセトゲニン類との差異が明確になった。

3. Δ lac-アセトゲニン類の中から更にユニークな阻害剤を探索するために、bis-THF 環をピペラジン骨格に改変した誘導体を合成しその作用機構を精査したところ、元の Δ lac-アセトゲニン類や既知の阻害剤では観察されなかった新規な作用特性を示すことを見出した。

4. ピペラジン誘導体の光親和性標識プローブ ($[^{125}\text{I}]\text{AFP}$) を合成し標識実験を行った結果、複合体-I を構成する45個の異なるサブユニットのうち2つのサブユニット (49 kDa と TYKY) が特異的に標識されることを見出した。 $[^{125}\text{I}]\text{AFP}$ と異なる阻害剤との競合試験の結果や、先行する他の光親和性標識実験の結果を総合して、複合体-I における阻害剤結合部位は複数のサブユニットから構成される大きなドメインを形成していると結論した。また、異なるサブユニットに結合することがわかっている阻害剤の間で認められる見かけ上の拮抗現象は、過剰の拮抗剤が結合することによって酵素の構造変化が誘導され、その結果として当該プローブ分子の親和性が低下するためであることを示した。

以上のように本論文は、ミトコンドリア複合体-I を強力に阻害する Δ lac-アセトゲニン類およびそのピペラジン誘導体の精密有機合成と詳細な作用機構研究を通して、酵素の中核機能を担う阻害剤結合部位に関する重要な知見を得たものであり、有機合成化学、生物有機化学、生化学に寄与するところが多い。

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20年2月12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。