

# 研究終了報告書

## 「化学修飾による“光-駆動型”ミトコンドリア複合体-I の創製」

研究期間: 2021年10月～2024年3月

研究者: 榎谷 貴洋

### 1. 研究のねらい

ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系の初発酵素である NADH-キノン酸化還元酵素(複合体-I) は、基質の酸化還元反応を駆動力とするプロトンポンプであり、ATP 生合成に必要なプロトンの約 50%を輸送している。本申請では、生合理的に設計した光スイッチを複合体-I に導入し、光照射によりミトコンドリアでのエネルギー生産に必須のプロトン輸送を誘導することを目的としている。本研究によって“複合体-I の光制御”が実現できれば、本酵素の作動メカニズムの解明に向けた全く新しい方法論を提示できるだけでなく、有機分子と光によりミトコンドリアや細胞レベルでエネルギーを生産することが可能な新技術の開発に繋がる。

複合体-I のプロトン輸送メカニズムに関しては、『キノンの還元に伴ってキノン結合ポケット内に構造変化が生じ、これが駆動力となって膜ドメインに伝搬してプロトンが輸送される』と考えられている。本研究を行うにあたり、申請者は、“トシル化学”と“Diels-Alder 型 クリックケミストリー”により、キノン結合ポケットの最深部に位置する 49-kDa サブユニットの Asp160 (49-kDa・Asp160) を特異的に化学修飾する方法論を確立している。トシル化学とは、タンパク質の化学修飾法の1つであり、リガンド(標的タンパク質の基質や阻害剤など)が標的タンパク質に対して持つ高い親和性を利用して、リガンド分子内に組み込んだ合成タグを標的タンパク質へ誘導し、求核性アミノ酸残基(本研究では 49-kDa・Asp160)との求核置換反応によって標的タンパク質に固定させる方法である。また、Diels-Alder 型クリックケミストリーとは、反応性の高い歪んだ環状アルケン(本研究ではシクロプロペン)とテトラジンを化合物を、触媒等を用いることなく水中で Diels-Alder 反応により両化合物を瞬時に結合させる方法である。トシル化学でシクロプロペン分子を 49-kDa・Asp160 に導入し、Diels-Alder 型クリックケミストリーにより様々な機能性分子をシクロプロペンに接続することができる。本研究ではこの化学修飾法を応用し、49-kDa・Asp160 に光スイッチ分子を導入することで、光照射によってポケット内に可逆的な構造変化を誘導し、これをプロトン輸送活性に繋げる。すなわち、化学修飾によって複合体-I を“酸化還元反応-駆動型”から“光-駆動型”のプロトンポンプに機能変換することを目指す。光により複合体-I のプロトンポンプを駆動できれば、ミトコンドリアや細胞レベルのエネルギー代謝を光で制御することに道を拓く大きな一歩となる。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

複合体-I を動かす光スイッチ化合物を複数デザインし、合成を行った。合成を達成できた光スイッチの光応答性を調べたところ、光異性化に最適な光波長を見出すことができた。さらに、これらの光スイッチを複合体-I に導入できるか試したところ、導入できることがわかった。一方、光スイッチを導入した複合体-I を用いて光によりプロトン輸送を駆動できるか評価したところ、プロトン輸送は検出されなかった。

本結果を考察するため、光スイッチの異性化が複合体-I に与える影響を、基質であるユビキノンを鋳型として、ジアゾベンゼンを導入した光スイッチキノンをを用いて調べることにした。合成した光スイッチキノンをを用いて複合体-I の基質としての活性を調べたところ、*trans* 体は天然型キノンと同程度の基質活性を有しているのに対し、光異性化を行った *cis* 体は基質とならないことがわかった。すなわち、光スイッチキノンをを用いることで、複合体-I の活性を光で制御できることが示唆された。

## (2) 詳細

### 研究① 複合体-I に対する光スイッチの化学修飾

呼吸鎖複合体-I のプロトン輸送の鍵となるキノン結合ポケット内に光スイッチ分子を導入して、光照射によってポケット内に可逆的な構造変化を誘導し、プロトン輸送活性に繋げることを目指した。キノン結合ポケット内に導入する光スイッチ化合物を複数合成した。それら光スイッチ化合物の光異性化能を評価したところ、430 nm の光を 15 秒間照射することで *cis* 体から *trans* 体への異性化することがわかった。また、540 nm の光を 15 秒間照射するか、10 分間インキュベートすることで *trans* 体から *cis* 体へ戻ることがわかった。

次に、それら光スイッチ化合物の複合体-I への導入実験を行った。先行研究で開発していた技術を用いて、トシル化学法によりシクロプロペン分子を複合体-I の 49-kDa サブユニットの Asp160 に導入しておき、そこへ光スイッチ化合物を Diels-Alder 型クリックケミストリーにより導入を行ったところ、どちらの化合物も導入を確認できた。一方、光スイッチを導入した複合体-I を用いて光によりプロトン輸送を駆動できるか評価したところ、プロトン輸送は検出されなかった。

### 研究② 光スイッチキノンの合成と *cis-trans* 時の活性評価

上記の結果を考察するため、複合体-I の基質であるユビキノンにジアゾベンゼンを導入した光スイッチキノンを新たに合成し、ジアゾベンゼンの異性化が複合体-I に与える影響を調べることにした。合成した光スイッチキノンの光異性化効率を調べたところ、350 nm の光を 5 分間照射することで *cis* 体から *trans* 体への異性化が行われ、450 nm の光を 5 分間照射することで *trans* 体から *cis* 体へ 50% が戻ることがわかった。また、光照射により異性化させた光スイッチキノンをを用いて、複合体-I の基質としての活性を調べたところ、*trans* 体は天然型キノンと同程度の基質活性を有しているのに対し、*cis* 体は基質とならないことがわかった。また、450 nm を照射して *trans* 化を行った光スイッチキノンは基質活性が回復することもわかった。すなわち、光スイッチキノンをを用いることで、複合体-I の活性を光で制御できることが示唆された。

### 3. 今後の展開

ミトコンドリア内膜でキノンやキノールを基質とする酵素は呼吸鎖複合体-I の他にも、複合体-I と同様にエネルギー生産に関わる呼吸鎖複合体-II や呼吸鎖複合体-III、核酸の生合成に関わるジヒドロオロト酸脱水素酵素、生物の生理機能において重要な硫化水素量を調節する硫化水素キノン酸化還元酵素などがある。そのため、本研究②での光スイッチキノンによる複合体-I の活性制御に関する知見は、複合体-I 以外のキノン酸化還元酵素の活性を制御する研究にも繋がる。さらに、ミトコンドリア内膜でのキノンとキノールの割合の変化は、細胞の酸素濃度変化や細胞組織の炎症による細胞内シグナル伝達と密接に関係しており、生物の健康や疾病に繋がる因子である。そのため、光スイッチキノンを利用することでミトコンドリア内膜のキノンとキノールを利用する酵素の活性を制御することによりキノン:キノール比を操作できれば、生物の健康の促進や疾病の治療にも繋がる可能性を秘めている。

### 4. 自己評価

当初の研究目的を達成は様々な要因から困難であったため、現在提唱されている複合体-I の作動原理を再度精査することや、複合体-I に導入する光スイッチの量をさらに増加させる方法を見出すなど、研究方針の練り直しが必要である。一方、本研究により、光スイッチ化合物の合成法を習得し、光により酵素活性を制御できる光スイッチキノンを得ることができた。この化合物の特性を活かし、光スイッチによる酵素活性制御を行うような研究に展開できればと考えている。

### 5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 0件

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0件(特許公開前のは件数にのみ含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

なし