

論文の内容の要旨

論文題目 回虫成虫ミトコンドリア複合体 I のロドキノン還元部位の解析

氏名 山下 哲生

多くの寄生性蠕虫は、嫌気的環境である哺乳類などの宿主体内に適応するため、嫌気的なエネルギー代謝系を保有しており、この嫌気的なエネルギー代謝系は寄生性線虫、回虫 *Ascaris suum* において最も詳細に解析されている。宿主小腸内の酸素分圧環境で成育する回虫成虫は、NADH-フマル酸還元系という複合体 I と複合体 II から構成される、酸素を利用しない呼吸鎖によりエネルギー代謝を行っている（図 1）。この嫌気的呼吸鎖において、NADH の電子は複合体 I を介して、低電位ベンゾキノンであるロドキノン（RQ）に渡され、次いで、複合体 II を介して最終電子受容体のフマル酸へと伝達される。我々哺乳類の好氣的呼吸鎖電子伝達系とは、電子伝達の方向性、基質特異性の異なる回虫成虫の呼吸鎖は、抗蠕虫薬開発における標的として有効であると考えられている。なかでも呼吸鎖酵素複合体 I、複合体 II において、ユビキノン（UQ）とは構造の異なる、RQ の認識に関わる部位（RQ 還元部位）は宿主との差異を利用した薬剤標的的部位として有効であると考えられる。実際、私の所属する研究グループは、回虫を含む蠕虫類の嫌気的呼吸鎖複合体 I を低濃度で阻害し、UQ を電子受容体とする哺乳類の好氣的呼吸鎖の酵素は阻害しない化合物ナフレジンを見い出している。このナフレジンは *in vivo* においても寄生性線虫の卵の産生を抑えるという抗寄生虫作用を示す（Omura *et al.* 2001）。これらの結果は、複合体 I が化学療法剤の標的酵素として有用であることを示すとともに、ナフレジンが回虫複合体 I のキノン還元部位を特異的に阻害することから、複合体 I のキノン還元部位の構造に、種間における相違が存在することを示唆している。

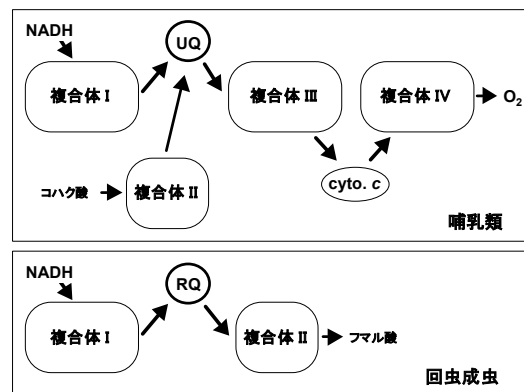


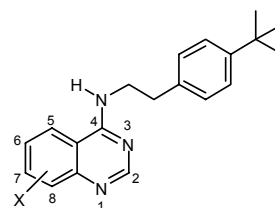
図1 哺乳類ならびに回虫成虫の電子伝達系

そこで本研究では、このような寄生虫類に特有な RQ を基質にする呼吸鎖複合体 I のキノ還元部位についての知見を得ることを目的として、複合体 I に特異的な阻害剤を用いて様々な解析を行った。

【結果と考察】

1. 複合体 I の酵素活性測定

複合体 I の NADH-キノ還元活性の測定は、一般的に好気条件で行うが、回虫成虫ミトコンドリアを試料として用いた場合、同じ条件下ではミトコンドリアと NADH を反応溶液中に添加しただけで、外来性キノ非依存的な NADH の強い酸化が観察された。これは、還元型 RQ と酸素との反応性が高いために、内在性 RQ_o が、酵素と酸素の間で電子の授受を行っているためだと考えられる。そこで、内在性キノによる NADH の酸化を防ぐため、グルコースオキシダーゼとカタラーゼによる嫌気アッセイ法を導入した。この測定法により、人工キノ添加前の NADH の酸化は全く観察されなくなり、正確な NADH-キノ還元活性を測定することが可能になった。



compound 1	X = H	compound 6	7-N ₃
compound 2	6-NH ₂	compound 7	8-OH
compound 3	6-N ₃	compound 8	8-OCH ₃
compound 4	6-NHCO(CH=CH ₂)	compound 9	8-OCH ₂ CH ₃
compound 5	7-NH ₂	compound 10	8-OCH(CH ₃) ₂

図2 キナゾリン系阻害剤の構造

そこで、内在性キノによる NADH の酸化を防ぐため、グルコースオキシダーゼとカタラーゼによる嫌気アッセイ法を導入した。この測定法により、人工キノ添加前の NADH の酸化は全く観察されなくなり、正確な NADH-キノ還元活性を測定することが可能になった。

2. キナゾリン系阻害剤の回虫複合体 I に対する構造活性相関

本研究では、阻害剤として回虫複合体 I を低濃度で選択的に阻害するナフレジンではなく、ウシ心筋複合体 I を低濃度で阻害することが報告されているキナゾリン系阻害剤を用いた。キナゾリン系阻害剤はナフレジンに比べ化学的に安定で、誘導体の合成が容易なためである。また、将来的に回虫複合体 I のキノ還元部位の詳細な知見を得る方法の一つとして、蛍光物質であるキナゾリン系阻害剤をキノ還元部位の標識物質として用い、阻害剤結合ペプチドを同定することを考えている。そこで、本研究では以下に挙げるキナゾリン誘導体を合成し、その阻害を検討した。まず、ペプチドとの共有結合

Compound	IC ₅₀ (nM)	
	NADH-UQ ₂ (50 μM)	NADH-RQ ₂ (50 μM)
1	1.3	3.8
2	0.8	1.8
3	100	150
4	130	480
5	72	300
6	520	440
7	470	500
8	1.3	1.2
9	140	250
10	600	430

表1 回虫複合体 I に対するキナゾリン系阻害剤の作用

が形成可能なキナゾリン系阻害剤の誘導体として、置換基に光親和性修飾基（アジド基；化合物 3、6）とアクリルアミド基（化合物 4）を導入した（図 1-3）。蛍光をもつ阻害剤は酵素へ結合すると、その蛍光が減少することから、この性質を利用した他の阻害剤との競合試験により、回虫複合体 I の阻害剤作用部位の解析が可能である。しかし、無置換体のキナゾリンの蛍光は競合試験に用いるには強度が不十分であったため、メトキシ基やアミノ基をキナゾリン系阻害剤に導入することで蛍光強度を改善した（化合物 8 および化合物 2、5）。さらに、キナゾリン系阻害剤の、これらの置換基を導入した付近の複合体 I への構造活性相関を詳しく調べるため、8 位に、ヒドロキシ基、エトキシ基、プロポキシ基を導入した（化合物 7、9、10）。阻害剤の合成は京都大学大学院農学系研究科、三芳

秀人博士によって行われた。

このような目的で合成された 10 種類のキナゾリン系阻害剤の複合体 I に対する阻害活性の評価は、それぞれ、 UQ_2 と RQ_2 を人工電子受容体として用い、酵素活性を 50% 阻害する阻害剤の濃度 (IC_{50}) を比較することにより行った (表 1)。無置換体キナゾリン (化合物 1) は、これまで回虫複合体 I を最も低濃度で阻害することが知られていたナフレジンよりも、それぞれの NADH- UQ_2 キノン酸化還元活性を 1 桁程度低濃度 (NADH- UQ_2 および NADH- RQ_2 酸化還元活性に対し、 IC_{50} はそれぞれ 1.3 nM と 3.8 nM) で阻害することが示された (表 1)。さらに、回虫ミトコンドリアにおいて、他の 9 種類の阻害剤についての阻害効果を調べたところ、NADH- UQ_2 および RQ_2 酸化還元活性と阻害剤の構造活性相関の比較から、阻害における両者の傾向は類似していることが示された。また、6-amino 基 (化合物 2) および 8-methoxy 基 (化合物 8) は無置換体キナゾリンと同程度の強い阻害効果を示したが、残りの 7 種類の誘導体は著しく阻害効果が低くなることが明らかとなった。これらの結果は、酵素が阻害剤の構造を厳密に認識していることを意味しており、キナゾリン系阻害剤が、キノン類と酵素間の特異的相互作用を調べるための、すぐれたプローブになることを示している。さらに化合物 6、8、10 では RQ_2 を基質にした時の IC_{50} の方が小さくなっており、 UQ_2 と RQ_2 を基質とした場合で阻害の傾向は完全には一致していないことから、やはり酵素のそれぞれの電子受容体に対する構造認識は同一ではないと考えられる。

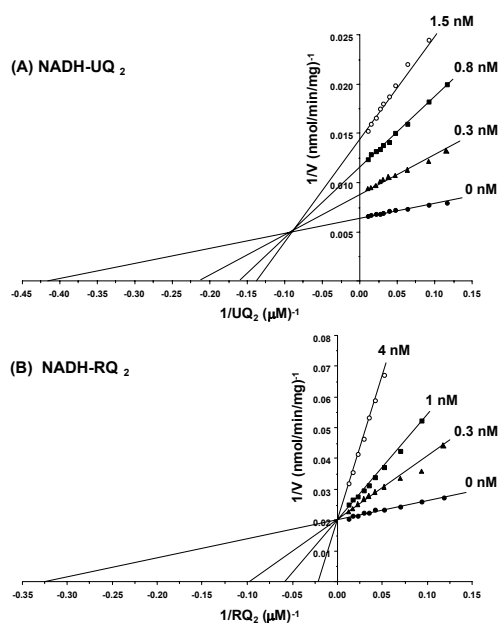


図3 無置換体キナゾリンによる回虫複合体 I の阻害 (pH 7.2)

3. 回虫複合体 I のキノン還元部位の解析

酵素の UQ_2 と RQ_2 に対する構造認識の相違を明らかにする目的で、NADH- UQ_2 と NADH- RQ_2 還元活性のキナゾリン系阻害剤による阻害様式を比較した。その結果、キナゾリン系阻害剤は UQ_2 に対して混合阻害するが、 RQ_2 に対しては完全に拮抗阻害することが示された (図 3)。この結果は、酵素と UQ_2 および RQ_2 の結合様式が一部異なっていることを示唆している。そこで、複合体 I のキノン還元部位の特徴を、さらに詳しく調べるために、NADH- UQ_2 と NADH- RQ_2 還元活性の至適 pH を測定した (図 4)。NADH- RQ_2 還元活性の至適 pH (7.6) は、複合体 I と II から構成される NADH-フマル酸還元活性と同じであったが、NADH- UQ_2 還元活性は pH 6.4 と 7.2 という 2 つの異なる至適 pH を示した。これらの結果は、酵素と UQ_2 および RQ_2 の結

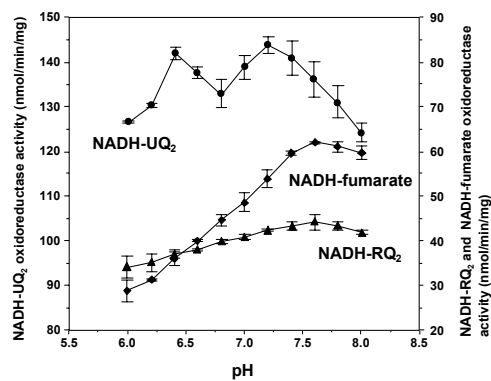


図4 回虫複合体 I の至適 pH

合様式が異なっているだけでなく、酵素と UQ_2 との電子の授受を含んだ反応機構が pH に依存して変化することを示唆している。実際、NADH- UQ_2 還元活性のキナゾリン系阻害剤による阻害様式の pH 依存性を調べたところ、pH により混合阻害としてのパターンは変化しないが、pH 上昇により非拮抗阻害に近づくことが示された (図 5)。一方、NADH- RQ_2 還元活性のキナゾリン系阻害剤による阻害様式は pH 変化による影響は受けなかった。これらの結果から、回虫複合体 I の RQ 還元部位に関して、至適 pH 7.4 で、阻害剤に対して拮抗的に阻害される還元部位が 1 つあり、 UQ 還元部位に関しては、至適 pH 7.2 で、阻害剤に対してより非拮抗的に阻害される還元部位と、至適 pH 6.4 で、阻害剤に対してより拮抗的に阻害される還元部位があると推測される。

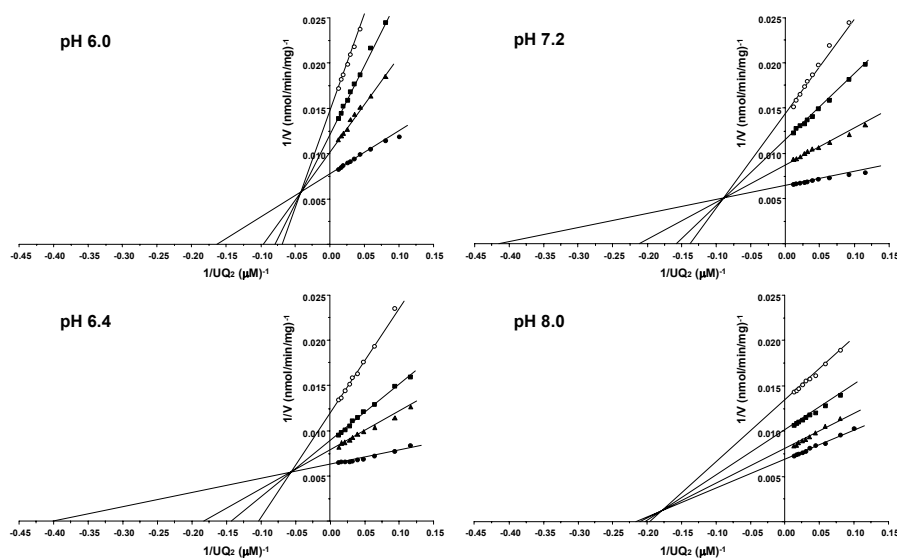


図5 pH 変化による無置換体キナゾリンによる NADH- UQ_2 還元活性に対する阻害様式の変化

【まとめと展望】

本研究では、回虫複合体 I のキノン還元部位の構造特性について阻害剤を用いて詳細に検討した。キナゾリン系阻害剤による複合体 I の UQ と RQ 還元活性に対する阻害様式が異なることから、本酵素の UQ と RQ に対する認識は同一ではないことが示された。さらに、至適 pH および阻害様式の pH 依存性を調べることで、本酵素のキノン還元部位には、1 つの RQ 還元部位と、2 つの異なる至適 pH を示す UQ 還元部位があるということが示唆された。この複合体 I のキノン還元部位のモデルを図 6 に

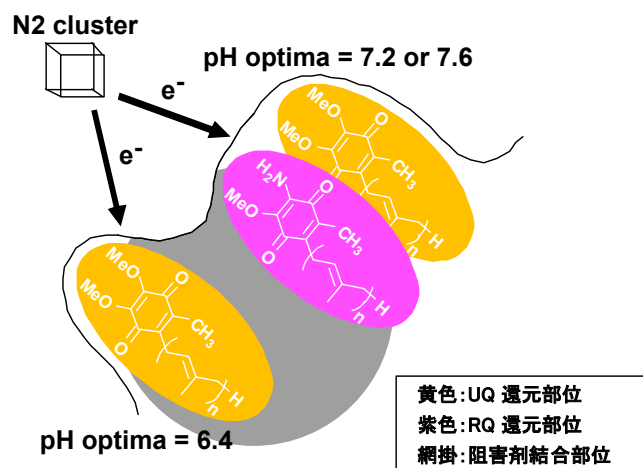


図 6 回虫成虫複合体 I のキノン還元部位のモデル

示す。今後、このような寄生虫類に特有なエネルギー代謝系の構成酵素の阻害剤との構造

活性相関を解析することにより、新規選択的阻害剤の設計が可能になるものと期待される。さらに、バクテリアや哺乳動物を含め複合体 I の反応機構（分子内電子移動や、酸化還元共役プロトンポンプ機構）は未だ解明されていないことから、今回得られた回虫複合体 I のキノン還元部位に関する知見は、複合体 I のキノン還元部位の数、またその分子認識の特異性について、有用な知見をもたらすことができるものと期待される。

【参考文献】

Yamashita, T. et al. *Biochim. Biophys. Acta* (in press)

Omura, S. et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 60-62.

Ino, T. et al. (2003) *Biochim. Biophys. Acta* **1605**, 15-20

