

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25820398

研究課題名(和文)呼吸鎖複合体の会合と解離によって制御されるミトコンドリア呼吸活性変動の解明

研究課題名(英文) Investigation for the respiratory activity controlled via supercomplex formation

## 研究代表者

和田 直樹 (Wada, Naoki)

金沢大学・自然システム学系・助教

研究者番号：20464050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：界面活性剤としてアルキルイノシンを、膜埋め込み部のモデル分子としてラウリルトリプトファンを合成し、これらが相互作用することを明らかにした。オクチルイノシンとCHAPSの併用によって呼吸鎖の高分子量が抽出されたが、活性染色による超複合体の組成決定は困難であった。パーフルオロアルキルカルボン酸を用いた場合、5個から9個の炭素鎖長をもつものにおいて、ジギトニンに比して膜タンパク質の抽出量が増大することも併せて明らかになった。可溶化法の開発については一定の成果が得られたが、超複合体形成と呼吸活性の制御メカニズムとの関連性については解明には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Few kinds of alkylinosine were synthesized as a new kind of surfactants and lauryltryptophane was also synthesized as a model compound that represents embedded part of a membrane protein. These two molecules were able to interact with each other in aqueous medium. Treatment of yeast mitochondrial membrane with both octylinosine and CHAPS revealed the solubilizing the high molecular weight complexes; however, in-gel activity staining was not successful. Perfluoroalkylcarbonate increased the amount of solubilized membrane protein, though it was difficult to analyze the proteins by using typical electrophoresis techniques. Size-exclusion chromatography indicated the presence of high molecular weight protein complexes.

研究分野：工学

キーワード：アルキルイノシン パーフルオロアルキルカルボン酸 呼吸鎖超複合体

### 1. 研究開始当初の背景

呼吸鎖複合体( )はミトコンドリア内膜で機能し、エネルギー産生において重要な役割を果たしている一方で、副生する活性酸素種は生体の構成成分であるタンパク質やDNAを傷つけることから様々な疾病や老化の原因の一つとして考えられている。呼吸鎖複合体の個々の構造、機能の役割分担、電子伝達機構の理解はかなり進んでいるが、複合体同士の互助関係については十分に考慮されてこなかった。近年、複数の呼吸鎖複合体が会合した超複合体の存在が指摘され、超複合体の形成によって呼吸活性が増大することが示されている。しかし、超複合体の構造および機能の解析は超高分子体であるためにあまり進んでいない。幾つかのモデルが提案されているが、未だ完全な超複合体を単離することはできていないため、詳細な構造・機能解析には至っていない。

### 2. 研究の目的

会合状態の呼吸活性が解離状態よりも高いことから、もしこれら二つの状態を制御するメカニズムやトリガーが存在するならば、それは呼吸活性の新しい制御メカニズムの存在を意味する。本研究では、刺激やストレスがトリガーとなり、会合状態と解離状態という2つの状態がドラスティックに変化しているという仮説を立て、これを証明することを最終的な目標とした。そのために、完全な超複合体を安定に単離・精製し、その活性を評価する技術を確認することを第1目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 膜貫通部と相互作用する界面活性剤を用いた研究

膜貫通部界面に高確率で存在するトリプトファン残基と緩やかに相互作用する界面活性剤としてイノシンの長鎖アルキル化物を、膜埋め込み部のモデル分子としてラウリルトリプトファンを新規に合成した。合成したこれら分子の相互作用を重水中 NMR 分光法にて解析した。

アルキルトリプトファンに既存のノニオン性界面活性剤を併用した場合における、酵母呼吸鎖超複合体の抽出、電気泳動による分画(BN-PAGE)を行った。複合体の活性評価は既存の活性染色法に基づいて行った。

#### (2) フッ素系界面活性剤を用いた研究

フッ化アルキル鎖は対応するアルキル鎖に比較して剛直で分子間力が小さい。それゆえ、疎水鎖がフッ素化された界面活性剤の表面張力は該当するアルキル鎖型と比して小さく、臨界ミセル濃度(CMC)は低い。膜タンパク質の抽出においては、パーフルオロオクタ酸を用いてアクアポリンやカルシウムイオンチャネルなどの会合体の安定的な抽出成功例があることから、フッ素系界面活性

剤の低侵襲性を利用することで、新しい呼吸鎖超複合体の抽出が期待できる。フッ化アルキル鎖長の異なるカルボン酸誘導体を用いて酵母呼吸鎖の抽出を行い、解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 膜貫通部と相互作用する界面活性剤を用いた研究

イノシンはトリプトファンと電荷移動型の相互作用をするため、イノシンを基本骨格として用いた。ペントースを親水部とみなし、ヒポキサンチン部をアルキル化して両親媒化した。汎用されるノニオン性界面活性剤の親水-疎水バランス(HLB値)は、10~15程度(グリフィン法)のものが多いため、これを指標としてアルキル鎖長を決定した。

合成は脱水 DMSO 中、塩基処理したイノシンと臭化アルキルの反応により行った(図1)。反応混合物をカラムクロマトグラフィーにより分離精製後、NMR、MS 分析により構造を決定した。アルキル鎖長の異なる3分子(ブチル(BI)、ヘキシル(HI)、オクチル(OI))を合成した。アルキル鎖長が長くなると単離収率が低下する傾向であった。塩基処理したイノシンは高い求核剤となるが、アルキル鎖長が長いと立体障害によってSN2反応よりもSN1やE1反応を好む傾向が現れる。そのため、副反応の割合が高くなり目的生成物の収率が減少したと考えられる。



Run	n	HLB <sup>a)</sup>	yield (%)
1	3	16	82
2	5	15	42
3	7	14	21

a) calculated by Griffin's method

図1 両親媒性分子の合成

膜埋め込み部のヘリックスは膜を複数回貫通するため、これらを橋渡しするような界面活性剤を用いるとヘリックスからなるバンドルが崩れにくくなる効果が期待される。そこで、ドデシル基を中央にイノシンを両端に有するダンベル型分子を、イノシンに対して半当量のドデシルジブロミドと反応させて合成した(単離収率23%)。

膜埋め込み部のモデル分子としてトリプトファンのアミノ基をラウリル化した(LT)。LT存在下、重水中でオクチルイノシンの<sup>1</sup>H-NMR測定を行ったところ、ヒポキサンチン部(H6, H9)の化学シフト値が、LTの濃度に依存して高磁場側に徐々にシフトした(図2A, B)。併せて、置換されたアルキル鎖の根元付近(H11, H12)も高磁場シフトした(図2B)。特にH9の水素原子のシフト幅が最も大きいことから、インドール部分とヒポキサンチン部分が面と面で向かい合って僅かにずれた位置で相互作用し、近接して存在してい

ることがわかった。このような現象はトリプトファン共存下では観測されず、疎水性相互作用と併せた作用が重要であることがわかった。つまり、疎水性の膜タンパク質埋め込み部にあるトリプトファンには作用するが、親水性の非埋め込み部に存在するトリプトファン残基には作用しないことが期待できる。HI および BI を用いて同様の分析を行ったところ、アルキル鎖長が短くなるに連れて

NMR シフト幅が減少し、相互作用が弱くなることが示された。

OI はその平たい分子形状から球状のミセルを形成せず、高濃度ではヒドロゲル化することがわかった。このことより繊維状の集合体を形成しやすいことが示唆される。そのため、BN-PAGE の結果から OI 単独では超複合体の抽出作用がないことがわかった。既存のノニオン性界面活性剤であるドデシルマルトシド(DDM)および Triton-X100 を併用した場合にも超複合体は抽出されなかった(図 3 A

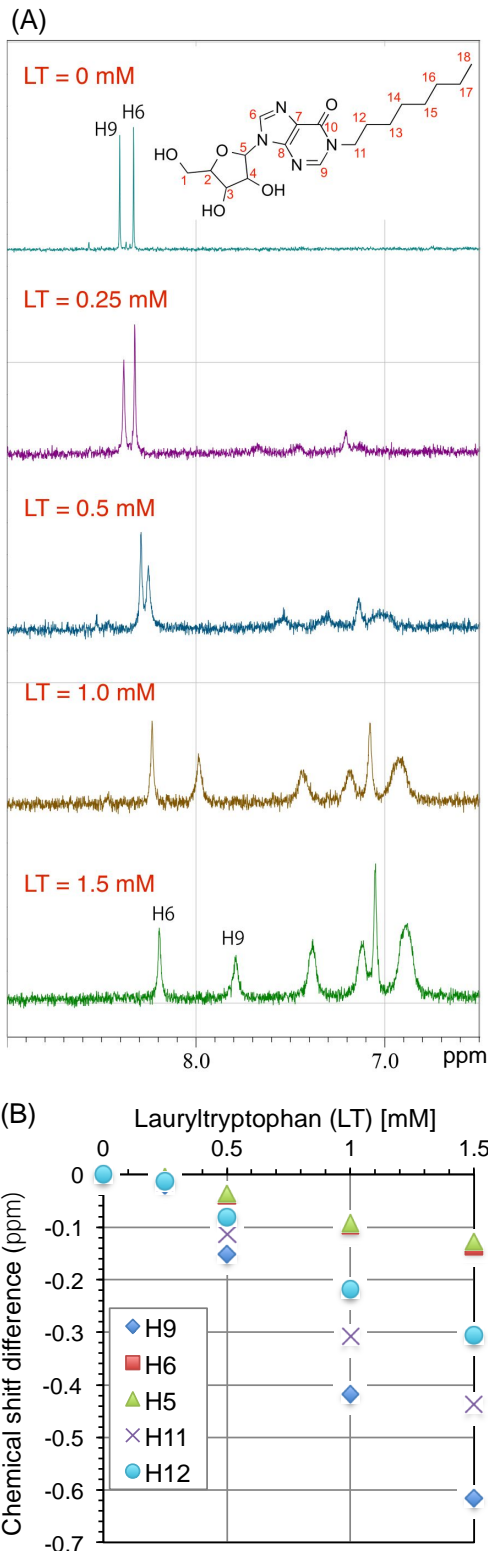


図2 OI と LT 共存時の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトラ ( $\text{D}_2\text{O}$ )

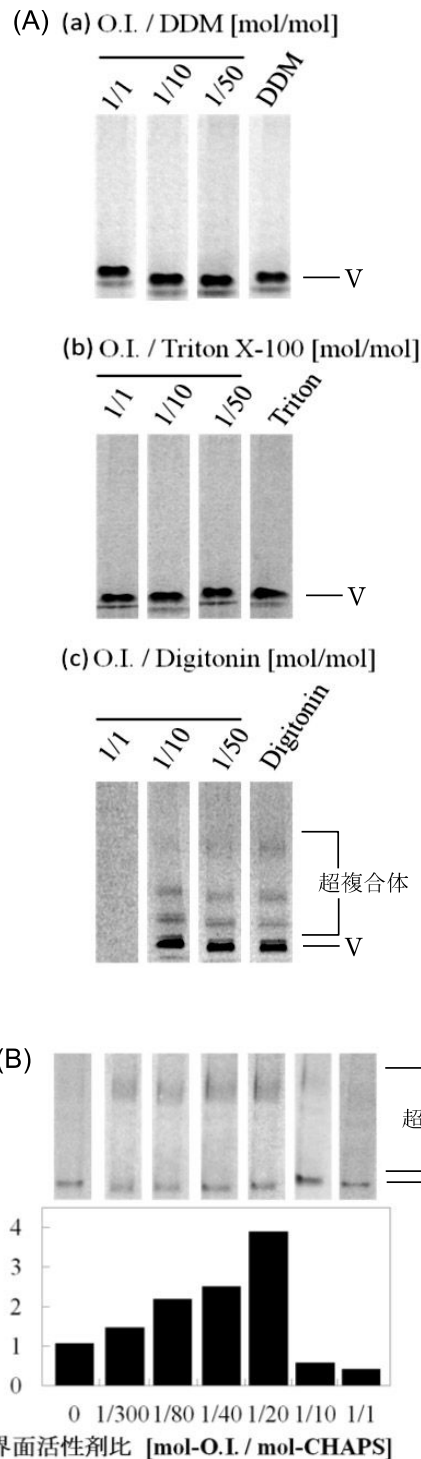


図3 OI と既存の界面活性剤の組み合わせによる膜タンパク質の抽出 (BN-PAGE)

(a), (b))。また、ジギトニン(DG)併用時では、0I濃度を上昇させると超複合体および複合体が共に抽出・分画されなくなった(図3 A(c))。このことより、0Iとノニオン性界面活性剤を併用した場合、予想に反して膜タンパク質会合体の抽出・分離が阻害される、あるいは会合体が解離することが示された。一方で、スルホベタイン型界面活性剤であるCHAPSを併用した場合には、これまでにない高分子量体が抽出されることがBN-PAGEの結果より示された(図3 B)。しかし、この高分子量体は活性染色では陰性であったことから、どのような組成であるのかは解明できなかった。また、0I濃度を上昇させると、ジギトニン併用時と同様に高分子量体が解離することがわかった。これらの結果より、界面活性剤との組み合わせ次第ではあるが、一定の濃度範囲において0Iには膜タンパク質会合体の抽出作用を改良する効果のあることが示された。一方で、イノシンのアルキル鎖長を短くした場合には、新規バンドは検出されなかった。イノシンとトリプトファンの相互作用はアルキル鎖長が短くなると減弱されることと矛盾しない結果であることから、CHAPS併用時の0Iの抽出改善効果は膜タンパク質埋め込み部ヘイノシン部が作用した結果であることが示唆された。

## (2) フッ素系界面活性剤を用いた研究

可溶化法を多面的に検証するため、膜タンパク質会合体の抽出で近年複数報告のあるパーフルオロアルキルカルボン酸を用いて検討を行った。炭素数8のPFOでミトコンドリア膜を処理した場合、オルトフタルアルデヒド法によるタンパク質の比色定量の結果、確かに膜タンパク質が抽出されることがわかったが、一般的なBN-PAGEおよびPFO-PAGEでは全くバンドが観察されなかった。分子サイズの非常に大きな会合体が抽出されたとの仮説から、アガロースゲル電気泳動による分画を試みたが、バンドは観察されるものの分離度が悪く、分画には成功しなかった。上記の結果より、電気泳動法による分析を断念し、HPLCを用いたゲルろ過カラム(TSKgel G3000SWxL, TSKgel G4000SWxL)による分析を試みた。

HPLC分析の結果、フッ化アルキル鎖長5から9の界面活性剤において、ジギトニンに比して高分子量膜タンパク質の抽出量が増大することがわかった(図4(a))。ヘム由来の吸収波長(410 nm)でのクロマトグラムにおいても同様にピーク強度が増大したことから、呼吸鎖に関連するタンパク質が超複合体として抽出された可能性が示された(図4(b))。活性染色には陰性であったため、構成成分の組成については未確定である。臨界ミセル濃度近傍では、C7鎖が最も多くの膜タンパク質を抽出したが、ジギトニンなどの従来型ノニオン性界面活性剤とは異なり、抽出量の濃度依存性が乏しいことも明らかとなった。

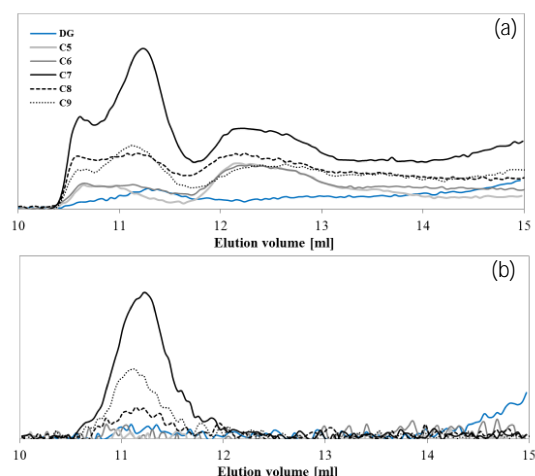


図4 パーフルオロアルキルカルボン酸による可溶化膜タンパク質のゲルろ過HPLCクロマトグラム  
検出波長: (a) 280 nm, (b) 410 nm

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

榊原香奈、和田直樹、松郷誠一、“各種フッ素系界面活性剤による酵母呼吸鎖複合体の抽出効率の向上”, 2015/11/27, 金沢大学, 平成27年度日本化学会北陸地区講演会と研究発表会

和田直樹、榊原香奈、松郷誠一、“膜貫通性タンパク質抽出のための新規電荷移動型界面活性剤の分子設計”, 2013/11/22, 石川ハイテク交流センター, 平成25年度日本化学会北陸地区講演会と研究発表会

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

和田 直樹 (Naoki WADA)

金沢大学、理工研究域自然システム学系、助教

研究者番号: 20464050