

NADH-ユビキノン酸化還元酵素 (呼吸鎖 H⁺ポンプにおける最後の砦)

Scripps 臨床医学研究所生化学部門 矢 木 隆 雄

The NADH-ubiquinone oxidoreductase of the mitochondrial respiratory chain catalyzes proton translocation across the inner membrane coupled to electron transfer. This is the largest enzyme complex in the mitochondrial oxidative phosphorylation system, and is composed of more than 25 unlike polypeptides. This article describes current knowledge of the enzyme and possible approaches to study of its structure and mechanisms of electron transfer and proton translocation.

mitochondria / NADH-ubiquinone oxidoreductase / H⁺ pump and DCCD

ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応を司る5つの酵素複合体〔NADH-ユビキノン酸化還元酵素 (complex I), コハク酸-ユビキノン酸化還元酵素 (complex II), ユビキノール-チトクロム酸化還元酵素 (complex III), チトクロム酸化酵素 (complex IV), ATP合成酵素 (complex V)〕はミトコンドリア内膜に位置し、解糖系・脂肪酸酸化系・クエン酸回路で生じたNADHあるいはコハク酸の酸化によって生みだされた電子を complex I または II からユビキノン, complex III, チトクロム c を経て, complex IV に渡し, 最終的に酸素を水に還元する¹⁾ (図1参照).

この電子伝達の過程で complex I, III, 及びIVは内膜を介して H⁺ をマトリックス側から細胞質側にポンプし, それによって生じた電気化学ポテンシャル差を利用して complex V 上で ADP とリン酸から ATP が形成される. この4つの H⁺ ポンプ酵素複合体のうち, complex III, IV 及び V は complex I に較べると, 研究者の数も多く, その構造と機能の研究は各段に進んでいる. この総説が, 読者の関心を complex I に引きつけるのに一役買うことが出来れば幸いである.

complex I は, 上に述べた様に NADH から電子を受け取り, その電子を呼吸鎖電子伝達系に送り込む電子の入口としての役割と, 電子伝達に伴って H⁺ をポンプする役割を兼ね備えているだけでなく, ヒトミトコンドリアの病気が, complex I の欠陥に起因している⁴⁾ 場合が多いという意味においても非常に重要な酵

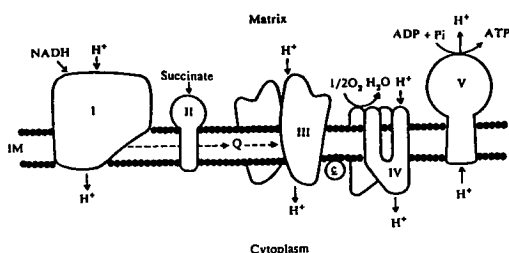


図1. ミトコンドリア酸化的リン酸化反応の模式図
(文献2, 3)から改変)
Q, ユビキノン; c, チトクロム c; IM, ミトコンドリア内膜

素複合体である.

complex I は25種類以上のポリペプチドから構成され, その分子量は現在のところ約280万と考えられており⁵⁾, 酸化的リン酸化反応系最大の酵素複合体である. complex I は補欠分子族として, 非共有結合の FMN と8つの鉄硫黄中心を含んでおり, その内5つの鉄硫黄中心は EPR で観測でき, N1a, N1b, N2, N3, N4と名づけられている¹⁾. これらの鉄硫黄中心の酸化還元電位は N1a が-370mV, N1b, N3, N4が約-250mV, N2が-20mV と報告されている. 化学浸透説に基づくと, 電子伝達に共役した H⁺ 転移には, H⁺ を運搬する補欠分子族が不可欠である. complex I の補欠分子族の中で, FMN とユビキノンはこの条件を満たす化合物である. さらに N1a と N2 の酸化還元電位が pH によって変化することから, これらの鉄硫黄中心も H⁺ の転移に関与している可能性がある. 補欠分子族間における電子伝達の順序が解明されていないので, 鉄硫黄中心間で効く阻害剤の発見が急務である. また, EPR によって観測出来ない鉄硫黄中心の役割

NADH-Ubiquinone Oxidoreductase

Takao YAGI

Division of Biochemistry, Research Institute of Scripps Clinic

も明らかでない。

complex I をカオトロープ処理することによって3つのフラクションに分けることが出来る^{1,6)}。それらはフラビン蛋白質分画 (FP), 鉄硫黄蛋白質分画 (IP), そして疎水性蛋白質分画 (HP) である。FP は3種類のポリペプチドからなる水溶性の分画で, FMN と N1b と N3 を含み, それ自身ジアホラーゼ活性を示す。NAD のフォトアフィニティアナログを用いた研究から, この分画の最も大きい $Mr=51k$ のポリペプチドに NADH の結合部位が存在することが分った。IP は6~7種類のポリペプチドから構成されている水溶性の分画で N1a と N4 を含んでいるらしい。HP は15種類以上のポリペプチドがあり, その名の通り疎水性の分画で N2 とリン脂質が含まれている。現在のところ, これらの3つの分画から complex I の再構成に成功した報告はない。最近, *Neurospora crassa* から単離した complex I の結晶の電子線回折から, この酵素の大まかな立体構造が報告された⁷⁾。それによると, complex I は膜外に大きな部分が存在し, 膜中に埋もれている部分は全体の $\frac{1}{3}$ である。さらに, IP と FP のポリペプチドの抗体を用いた研究によると, IP, FP ともそのエピトープは膜の表面に露出しているらしい⁷⁾。

complex I の電子伝達そして H^+ ポンプのメカニズムを明らかにする為の手段として, 酵素活性に必須なアミノ酸残基とその残基が存在するポリペプチドを同定し, 各々のポリペプチドの役割を知ることが考えられる。N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCCD) は疎水的環境にある H^+ チャンネルに必須のカルボキシル基を特異的に修飾する有効な試薬として知られている (DCCD の効果については, 少し古い Azzi らの総説⁸⁾を読むことをお勧めする)。例えば, DCCD は ATP 合成酵素の H^+ チャンネルをブロックし, ATP 合成・水解両反応を阻害する。一方, complex III と IV の場合, DCCD は電子伝達活性に影響を及ぼすことなく H^+ 転移のみを阻害する, いわゆる decoupling と呼ばれる効果をひきおこす⁸⁾。著者は, この H^+ ポンプに有効な試薬, DCCD の complex I に及ぼす効果を調べた⁹⁾。DCCD は H^+ ポンプと共役した NADH-ユビキノン酸化還元反応を阻害するが, H^+ ポンプを含まないジアホラーゼ活性を阻害しなかった。DCCD が修飾するポリペプチドは他の complex の場合と同様に疎水性分画に存在し, ミトコンドリアの DNA でコードされている内の1つのポリペプチドであった¹⁰⁾。哺乳動物の場合, 約70種類のポリペプチドが酸化リン酸化の酵素複合体を構成している。その

内13種類のポリペプチドがミトコンドリア DNA 由来である¹⁰⁾ (7, complex I ; 1, complex III ; 3, complex IV ; 2, complex V)。残りのポリペプチドは核 DNA によってコードされ細胞質で生合成され, ミトコンドリアに送り込まれてくる。complex III 及び IV における DCCD の標的は各々, チトクロム b ¹²⁾ とサブユニット III⁸⁾で, いずれもミトコンドリアの DNA によってコードされているポリペプチドである。従って, 電子伝達系においては, DCCD によってブロックされる H^+ チャンネルを構成するポリペプチドは, すべてミトコンドリアの DNA によってコードされていることになる。これは単なる偶然の一致であろうか? ひょっとすると, ここに H^+ 転移のメカニズムを解く鍵が潜んでいるかもしれない。

DCCD の complex I への阻害様式は上に述べた complex III 及び IV における decoupling 効果とは異なっており, 電子伝達活性と H^+ の転移を並行して阻害する (図2参照)。

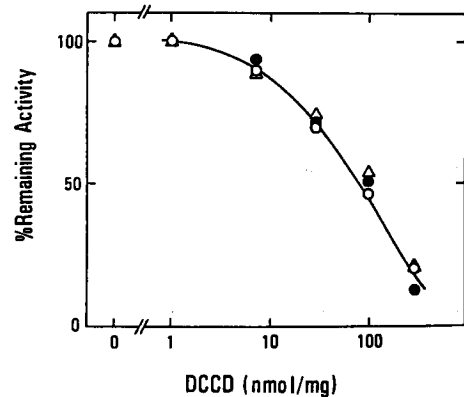


図2. NADH-ユビキノ1酸化還元活性とそれに共役した H^+ 転移に及ぼす DCCD の効果

○, NADH-ユビキノ1酸化還元活性;
△, それに共役した H^+ 転移。

この様式は ATP 合成酵素に及ぼす DCCD の効果と似ている。DCCD は complex I の H^+ チャンネルを阻害し, その結果, 電子伝達活性を阻害するのであろう。これらの知見を総合して complex I における H^+ 転移のメカニズムを想像したのが図3である。

1961年に Hatefi ら¹³⁾によって初めてウシミトコンドリアから単離してから四半世紀以上経過しているにもかかわらず, その構造が非常に複雑な為, complex I の研究は他の酸化リン酸化の酵素複合体にくらべると余り進展していない。何故, complex I は,

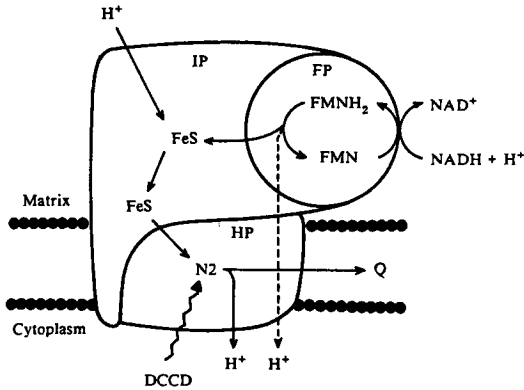


図3. complex I の電子伝達と H^+ ポンプのメカニズムの想像図。FeS は鉄硫黄中心。FP, IP, HP は本文参照。

上に述べたような複雑な構造をもっているのか？枯草菌などの H^+ ポンプ機能をもたない NADH-ユビキノン酸化還元反応は一種類のポリペプチドからなる酵素によって司られている。また、 H^+ ポンプの機能だけ考えるならバクテリオロドプシンの様に $MW=26k$ のポリペプチドだけでも十分であろう。この疑問に対する答は現在のところみつからない。例えば、クエン酸回路のいくつかの脱水素酵素が complex I と結合している報告¹⁴⁾があるが、これが事実だとすると、これらの脱水素酵素が結合する場として働いているポリペプチドがあり、これが構造を複雑にしているのかもしれない。

一般に、バクテリアの酸化的リン酸化系はミトコンドリアのそれよりも簡単な構造をとっている¹⁾。例えば、ミトコンドリアの ATP 合成酵素は12種類以上のポリペプチドから構成されているが、バクテリアのそれは8種類のポリペプチドからなる。また、ミトコンドリアの complex III は9～10種類、バクテリアのそれは3～4種類のポリペプチドで構成されている。complex IV に関しても、同じ傾向があり、ミトコンドリアでは10～11種類もあるのに、バクテリアでは3種類のポリペプチドしかない。それでは complex I の場合はどうであろうか？土壌菌 *Paracoccus denitrificans* の呼吸鎖は、このバクテリアがミトコンドリアの祖先であると考えている研究者もいる程、ミトコンドリアの呼吸鎖とよく似た電子伝達担体をもっている¹⁵⁾。著者が *Paracoccus* から単離した complex I は10種類のポリペプチドから構成されており、非共有結合の FMN と非ヘム鉄と酸不安定性硫黄を含んでいる¹⁶⁾

また、好熱菌 (*Thermus thermophilus* HB-8) もその呼吸鎖はミトコンドリアのそれと似ている¹⁷⁾。しかしながら、HB-8 膜の complex I は H^+ ポンプ機能をもつにもかかわらず、ウシや *Paracoccus* より少ない鉄硫黄中心で構成されていることが EPR によって示されている¹⁸⁾。この菌膜から単離した complex I も10種類のポリペプチドから構成されており、非共有結合の FMN と非ヘム鉄、酸不安定性硫黄を含んでいる¹⁹⁾。将来これらのバクテリアからの標品が complex I の電子伝達及びそれに共役した H^+ ポンプのメカニズムを研究する上で強力な武器になると考えられる。また、何故、バクテリアの系がミトコンドリアのそれと較べて簡単なのか進化を考える上で興味深い問題である。

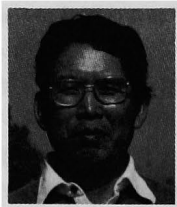
終りに、いろいろな御協力を載しました阪大教養高木雅行先生と Scripps 臨床医学研究所 松野-矢木明美、Youssef Hatefi 両博士に感謝します。

文 献

- 1) Hatefi, Y. (1985) *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 1015-1069.
- 2) Capaldi, R. A. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, **694**, 291-306.
- 3) Leonard, K., Haiker, H., Weiss, H. (1987) *J. Mol. Biol.*, **194**, 277-286.
- 4) Moreadith, R. W., Cleeter, M. W. J., Ragan, C. I., Batshaw, M. L., Lehninger, A. L. (1987) *J. Clin. Invest.* **79**, 463-467.
- 5) Doonijewaard, G., DeBruin, G. J. M. Van Dijk, P. J., Slater, E. C. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, **501**, 458-569.
- 6) Hatefi, Y., Ragan, C. I., Galante, Y. M. (1985) *The Enzymes of Biological Membranes* (Martonosi, A. N., ed.) **4**, 1-70, Plenum Press Co, New York.
- 7) Han, A., Yagi, T., Hatefi, Y. 投稿準備中
- 8) Azzi, A., Casey, R. P., Nalecz, M. J. (1984) *Biochim. Biophys. Acta*, **768**, 209-226.
- 9) Yagi, T. (1987) *Biochemistry*, **26**, 2822-2828.
- 10) Chomyn, A., Mariottini, P., Cleeter, M. W. J., Ragan, C. I., Matsuno-Yagi, A., Hatefi, Y., Doolittle, R. F., Attardi, G. (1985) *Nature*, **314**, 592-597.
- 11) Yagi, T., Chomyn, A., Attardi, G., Hatefi, Y. 投稿準備中
- 12) Beattie, D. S., Clejan, L., Bosch, C. G. (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 10526-10532.
- 13) Hatefi, Y., Haavik, S. G., Griffiths, D. E. (1961) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **4**, 441-446.
- 14) Sumegi, B., Srere, P. A. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 15040-15040.
- 15) John, P., Whatley, F. R. (1975) *Nature*, **254**, 495-

498.
 16) Yagi, T. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* **250**, 302-311.
 17) Fee, J. A., Kuila, D., Mather, M. W., Yoshida, M. (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, **853**, 153-185.
 18) Ohnishi, T., Meinhardt, S. W., Yagi, T., Oshima, T. (1987) *Advances in Membrane Biochemistry and Bioenergetics* (Kim, C. et al. eds) Plenum Press, New York, 印刷中
 19) Yagi, T., Hon-nami, K., Ohnishi, T. *Biochemistry*. 印刷中.

やぎ たかお



昭和42年大阪大学理学部生物学科卒業，同年から同教室教務員，52年理学博士修得，55年 Hatefi 博士の研究室に Post Doc. として渡米，58年主任研究員となり現在に至る。趣味はアメリカンフットボール・野球の観戦，ソフトロックを聴くこと。

連絡先 BCR-7, Scripps Clinic and Research Foundation,
La Jolla, CA 92037, U. S. A.

☎ (619) 455-8094

次 号 予 定 内 容

(Vol.28 No.3 / 通巻157号)

総 説	実験室内進化による蛋白質間相互作用の解析の試み.....	正木 春彦
	分子系統学とヒトの起源.....	長谷川政美
	急速凍結法による筋小胞体の動態分析.....	月田承一郎
	RNA の構造変化による ColE1 DNA 複製開始の調節.....	升方 久夫
	ATP の反応性は何によって決定されているか.....	篠原 康雄 寺田 弘
解 説	蛋白質の二次元 NMR	伊倉 光彦
	精子運動開始機構解明のこれ迄とこれから.....	森沢 正昭
トピック	蛋白質生産菌 <i>Bacillus brevis</i> 細胞表層構造と 異種蛋白質の分泌生産	塚越 規弘 鶴高 重三
	脊椎動物の視細胞，嗅細胞における 環状ヌクレチドによるイオンチャンネルの直接開閉..... —蛋白質のリン酸化を介さない環状ヌクレチドの生理機能—	篠沢 隆雄 松坂 浩 鈴木 教世
実験技術	神経活動に伴う微小な熱産生の測定.....	中江 俊夫
談 話 室	第9回国際生物物理学会.....	本多 元 今栄 康雄
研究室紹介	スタンフォード大学医学部 Spudich 研究室.....	豊島 陽子