脱共役剤研究の最近の進歩

篠原康雄^{1),2),3)*}・山本武範^{1),2)}・寺田 弘⁴⁾

- 1) 徳島大学 ゲノム機能研究センター 〒770-8503 徳島県徳島市蔵本町3
- 2) 徳島大学 薬学部 〒770-8505 徳島県徳島市庄町1
- 3) 産業技術総合研究所 単一分子生体ナノ計測研究ラボ 〒761-0395 香川県高松市林町2217
- 4) 東京理科大学 薬学部 〒278-8510 千葉県野田市山崎2641

Recent Progress in Studies on The Uncouplers of Oxidative Phosphorylation

Yasuo Shinohara^{1,2,3)*}, Takenori Yamamoto^{1,2)}, Hiroshi Terada⁴⁾

- 1) Institute for Genome Research, University of Tokushima, Kuramotocho 3, Tokushima 770-8503, Japan
- 2) Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokushima, Shomachi 1, Tokushima 770-8505, Japan
- 3) Single-Molecule Bioanalysis Laboratory, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Hayashicho 2217, Takamatsu 761-0395, Japan
- 4) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, Yamazaki 2641, Noda 278-8510, Japan

The chemical energy of nutrient molecules is converted in to ATP during the process of oxidative phosphorylation in mitochondria. Since the electrochemical potential gradient of H^+ formed across the inner mitochondrial membrane by the oxidation of respiratory substrates is utilized as a driving force for ATP synthesis, the mitochondrial inner membrane is highly impermeable to H^+ . An increase in the permeability of this membrane to H^+ causes inhibition of ATP synthesis, and chemicals that cause such an increase are called uncouplers. Ordinary known uncouplers are hydrophobic weak acids and show their activity by acting as protonophores. On the contrary, in recent studies, a variety of chemicals were found to act as uncouplers, not by acting as a protonophore, but by inducing permeability transition of the inner mitochondrial membrane or by inducing molecular "slippage" of the primary H^+ pump. In this review article, recent progress made from studies on the uncouplers of oxidative phosphorylation is presented and discussed.

Key words : uncoupler / oxidative phosphorylation / permeability transition / molecular slip / mitochondria

はじめに

ミトコンドリアは生体内での主たるエネルギー

変換の場として知られている。ここでは栄養分子の異化反応に伴って生じたNADHなどの還元型分子が酸化されるのに伴ってATPの合成がなされるため、ミトコンドリアにおけるエネルギー変換のプロセスは酸化的リン酸化反応と呼ばれる。基質分子の酸化とATPの合成がどのように「共役」し

*Corresponding Author

Tel : 088-633-9145 Fax : 088-633-9146

E-mail :

Fig. 1 Mechanism of ATP synthesis by mitochondrial oxidative phosphorylation.

ているかという問題については、1978年にノーベル化学賞を受賞したPeter Mitchell博士によって提唱された化学浸透圧説が広く認められている。この説によると、基質分子の酸化に伴って H^+ がミトコンドリア内から外へと膜を介して放出され、このようにして形成された膜を介した H^+ の電気化学ポテンシャル差がATP合成の駆動力として用いられている (Fig. 1)。一般的な条件下ではミトコンドリア内膜の H^+ 透過性は低く、基質の酸化に伴って形成されたミトコンドリア内膜を介した H^+ 勾配は効率よくATP合成の駆動力として用いられている。従って、膜の H^+ 透過性を高めると酸化的リン酸化反応は阻害されるが、このような作用を有する化合物は脱共役剤uncouplerと総称されており、これまで多くの研究がなされてきた¹⁻³⁾。本稿では一般的な脱共役剤について簡単に説明した上で、最近の脱共役剤研究の進展について紹介する。

1. 一般的な脱共役剤

一般的な脱共役剤はすべて疎水性の弱酸であり、Fig. 2に示すように膜中に存在して H^+ のキャ

Fig. 2 Action mechanism of ordinary uncouplers. Ordinary uncouplers are hydrophobic weak acids and show their uncoupling activities by acting as protonophores.

Fig. 3 Chemical structure of SF6847 (3,5-di-*t*-butyl-4-hydroxybenzylidene malononitrile) one of the most commonly used protonophoric uncouplers.

リアー (担体)、すなわちプロトンフォアとして機能することによって、膜を介した H^+ の電気化学ポテンシャル差を消失させていると考えられている¹⁻³⁾。古典的な脱共役剤としては2,4-ジニトロフェノール (DNP) が知られているが、現在脱共役剤として最もよく知られているSF6847 (Fig. 3) は、DNPの活性発現濃度よりもおよそ3桁も低い濃度で脱共役活性を示すことが知られている。一般に脱共役剤の活性はミトコンドリアの酸素消費

Fig. 4 Chemical structure of cyanine dye. Dyes having butyl ($n=4$) and heptyl ($n=7$) alkyl side chains are abbreviated as Tri-S-C₄ (5) and Tri-S-C₇ (5), respectively, and they were found to cause mitochondrial permeability transition.

速度を最大に加速するための最小濃度で評価されるが、DNPが20~50 μ M程度で有効であるのに対しSF6847は20nM程度と極めて低い値を示す。SF6847では、ベンゼン環の4位の水酸基がH⁺の酸解離に関わっており、事実これをメチル化したアナログでは脱共役活性が認められない⁴⁾。

最近のこの分野の研究成果として2つの特記すべき点が挙げられる。まず、これまでSF6847が最も強力な脱共役剤として知られてきたが、三芳らは同程度に強力な化合物フルアジナムfluazinamの開発に成功した⁵⁾。この化合物は10~15 nMでミトコンドリアの酸素消費速度を最大に開放する作用を有する。ただし、安定な化合物ではなく、グルタチオン抱合によって速やかに分解されてしまうという性質を有しているので取り扱いが少し困難である。もう一つの特記すべき事項は、脱共役剤の阻害剤が見出されたことである。一般的には、一度ミトコンドリアに脱共役剤を添加すると、もはやその脱共役活性を阻害することはできない。これに対し、Starkovらは6-ketocholestanolという化合物が低濃度の弱酸性脱共役剤の作用を阻害することを見出し、再共役剤recouplerと命名した⁶⁾。彼らは脱共役剤の活性発現にタンパク質の関与の可能性を考え、この化合物は膜の流動性を変化させ、脱共役剤とタンパク質の相互作用の様式に影響を

与えているためであろうと解釈しているが、実際にどのような変化が膜で起きているのかはまだ十分に解明されていない。

2. 透過性遷移による脱共役

2.1 Ca²⁺やシアニン色素などの疎水性カチオンもミトコンドリア内膜のH⁺透過性を高める

その後の研究によって、疎水性弱酸ではないにもかかわらずミトコンドリア内膜のH⁺透過性を高めていると思われる化合物がいくつか見出されてきた。その最初の例はFig. 4に示すようなシアニン色素である^{7~12)}。シアニン色素は2個の含窒素複素環を奇数個のメチン基(—CH=)で結合し、1個の窒素は第3アミン、もう1個は第4アンモニウム構造を有する色素の総称で、一般には写真の感光材料やコンパクトディスク、最近では太陽電池など、光化学の分野で用いられることが多い化合物である。生物の分野では低濃度でミトコンドリア膜電位のプローブとして用いられるが^{13, 14)}、100 μ M程度という比較的高濃度では、ミトコンドリア膜のH⁺透過性を亢進する作用が認められたのである。奇妙なことに、その作用は無機リン酸依存性を示し、無機リン酸の存在下においてのみH⁺透

Fig. 5 Transmission electron microscopic appearance of control mitochondria (A) and mitochondria under the condition of permeability transition (B).

過性の亢進が観察された。シアニン色素と類似の作用は古くから Ca^{2+} にも認められており¹⁵⁾、 Ca^{2+} がどのようにしてミトコンドリア内膜の H^+ 透過性を亢進しているのかという研究は盛んになされてきたが、その詳細は最近まで明らかでなかった。

2.2 Ca^{2+} はミトコンドリアの透過性遷移を引き起こす

その後 Ca^{2+} のミトコンドリアに対する作用に関する詳細な研究が進められ、 Ca^{2+} はミトコンドリア内膜の H^+ に対する透過性を高めるだけではなく、分子量1,500以下の溶質やイオンに対する透過性を非選択的に高めていることが明らかになり、この状態は「透過性遷移」と呼ばれるようになった^{16~18)}。透過性遷移がどのようにして引き起こされているのかは未だ明らかにされていないが、以下の2点が特記すべき透過性遷移に関する知見である。まず、免疫抑制剤であるシクロスポリンAは Ca^{2+} によって誘起される透過性遷移の特異的阻害剤であるということである^{19, 20)}。シクロスポリンAは Ca^{2+} イオノフォアであるA23187で誘導されるリンパ球の活性化を抑制することが知られていること、またミトコンドリアが細胞内での Ca^{2+} 濃度の恒常性維持のために機能していることから、FournierらはシクロスポリンAのミトコンドリアの機能に対する作用を解析し、これがミトコンドリ

Aからの Ca^{2+} 放出を阻害することを明らかにした。その阻害活性発現のメカニズムに関してはまだ詳細は明らかにされていないが、最も強力な免疫抑制剤であるFK-506には透過性遷移の抑制活性は認められないことから²¹⁾、透過性遷移の抑制がシクロスポリンAの免疫抑制活性の本質を反映しているとは考えにくい。またもう1つの特記すべき事項として、透過性遷移の誘導に伴ってミトコンドリアの内膜構造が消失することが挙げられる^{22~25)}。すなわち、動物の組織や培養細胞から単離された通常のミトコンドリアは内膜が特徴的なクリステ構造を示すのに対し、透過性遷移を起こした状態のミトコンドリアではこのような膜構造が消失し、リポソームの電顕像のような構造を示す (Fig. 5)。このような劇的な変化が内膜の透過性遷移の亢進を反映していることは広く受け入れられているが、膜が実際にどのような状態変化を起こしているのかはまだ明らかにされていない。

2.3 シアニン色素も透過性遷移を誘起する

我々のその後の研究によって、実はシアニン色素も Ca^{2+} と同様にミトコンドリアの透過性遷移を誘導し、脱共役活性を示していることが明らかになった²⁵⁾。ただし Ca^{2+} の場合には、無機リン酸が存在しない条件下では全く作用が見られず、無機リン酸存在下で観察される透過性遷移がCsAによって完全に阻害されるのに対し、シアニン色素の場合には無機リン酸非存在下においても膜の H^+ 透過性を若干高めること、また誘起される透過性遷移は部分的なCsA感受性を示すなど、 Ca^{2+} の作用とは少し異なったものであることが明らかになった²⁶⁾。シアニン色素がどのようにして透過性遷移を引き起こすのか、またその作用が Ca^{2+} とは少し異なっているのはなぜかという問題は依然明らかにされていない。この問題の解明の目的でも、異なる構造のシアニン色素についてもどのような作用が観察されるのか研究していくことが重要であろう。また、シアニン色素以外にも透過性遷移の誘導を引き起こす化合物がいくつか見出されており、これらの作用のキャラクターゼーションも重

Fig. 6 Proposed mechanism for molecular slippage of the primary H^+ pump. The redox pump may have a certain value for the ratio of H^+/e^- (left). When the pump undergoes molecular slippage (right), this ratio may decrease; and, hence, e^- consumption required for maintenance of the electrochemical gradient of H^+ will be increased.

要である^{27~31)}。

2.4 透過性遷移の生理的役割

上述のように、透過性遷移はミトコンドリア内膜の溶質やイオンに対する透過性を顕著に変化させる。このため、単に H^+ の透過性を制御することによって酸化リン酸化反応を制御しているだけではなく、より大きな分子の透過性を制御するところにその生理的意義があるように思われる。事実、ミトコンドリア内膜やマトリックスのタンパク質がミトコンドリア内に移入するプロセスに関わっている可能性も提唱されているが³²⁾、まだその真偽のほどは定かではない。

一方で、最近の研究によってミトコンドリアから細胞質に漏出したシトクロムcがカスパーゼを活性化して細胞のアポトーシスを誘導すること、ならびにミトコンドリアが透過性遷移を起こすと膜間スペースに存在するシトクロムcが細胞質へと放出されることが発見され、透過性遷移の生理的役割は細胞死の制御であると考えられるようになってきた^{33~35)}。このような理由から、透過性遷移が起きればシトクロムcは必ず放出され、アポトーシスの誘導が起きると解釈されがちである。しかし最近の我々の研究によって、透過性遷移が起きていない条件下でもミトコンドリアからのシ

トクロムcの放出は起こりえるし³⁶⁾、逆に透過性遷移が起きている条件下においてもシトクロムcの放出が起きていないという状態もあり得ることが明らかになった³⁷⁾。事実、透過性遷移はミトコンドリア内膜で起きている状態の変化であり、内膜と外膜の間に存在するシトクロムcがミトコンドリアから放出されるプロセスが透過性遷移とリンクしている必然性はない。どのようにしてミトコンドリアからシトクロムcが放出されるのかという問題の解明には、更なる研究が必要である。

3. デカップラーと分子スリップ

3.1 デカップラー

脱共役剤についてもう1つの種類を考えなければならぬ。1で述べたように、「一般的な」脱共役剤は H^+ の電気化学ポテンシャル差を消失させる。このような常識を覆し、 H^+ の電気化学ポテンシャル差を顕著に消失させない奇異な脱共役剤が見出されたのである。このような活性は、ハロタンやクロロホルムのような全身麻酔剤³⁸⁾、プリパカインのような局所麻酔剤^{39~41)}、および脂肪酸^{42, 43)}などの化合物に認められ、このクラスの脱共役剤は従来のアンカップラー-uncouplerと区別するためにデカップラー-decouplerと称することが提案され

た⁴⁴⁾。デカップラーの作用はわずかな実験条件の違いに大きく依存するため、アンカップラーとの区別が困難であり、しばしば相反する結果が報告される^{42, 44)}。

3.2 分子スリップ

では、デカップラーはどうして H^+ の電気化学ポテンシャル差を消失させることなく酸化的リン酸化反応を脱共役させることができるのだろうか。2つの可能性が提唱されている。1つは我々が測定可能な H^+ の電気化学ポテンシャル差はバルクのものであるが、実際には輸送される H^+ はバルクの H^+ と密な平衡関係に無く、膜近傍に局在化しているという考え方であり、デカップラーは前者には影響を与えないが後者に影響を与えているという考え方である⁴⁴⁾。もう1つは分子スリップという考え方で、デカップラーは電子伝達系のタンパク質が基質の酸化に伴って輸送する H^+ と反応に関与する電子の比(H^+/e^- 比)を低下させ、見かけ上膜の H^+ 透過性を高めているという考え方である(Fig. 6)⁴⁵⁾。我々はブピバカインがシトクロム酸化酵素のスリップを引き起こしているという事実をつきとめることに成功したが⁴⁶⁾、このような現象が生理的条件下でも起き得ることかどうかはまだ明らかにされていない。

おわりに

脱共役剤はこれまで、疎水性弱酸で H^+ 担体として機能することによってその活性を発現しているとされてきたが、最近の研究によって単に H^+ 担体として作用する分子だけでなく、膜の状態変化を引き起こすことによって見かけ上、脱共役を引き起こす化合物も少なからずあることが明らかになってきた。これらによって引き起こされるミトコンドリアの透過性遷移や H^+ ポンプのスリップなどの現象は、いずれもこれまであまり知られていなかった生体の機能制御に密接に関連したものであり、これらの研究は単に脱共役剤の研究にとどまらず広く生体の機能発現機構や疾病の発症機構の理解につながる研究である。本文中でも述べたと

おり、未解決の重要な問題が数多く残されており、研究の一層の発展が望まれる

文 献

- 1) Terada H : *Biochim. Biophys. Acta*, **639** 225-242 (1981)
- 2) Skulachev VP : *Biochim. Biophys. Acta*, **1363** 100-124 (1998)
- 3) Shinohara Y, Terada H : "Membrane Structure in Disease and Drug Therapy", Zimmer GD, ed. Marcel Dekker, New York, pp.107-126 (2000)
- 4) Terada H, Fukui Y, Shinohara Y, Ju-ichi M : *Biochim. Biophys. Acta*, **933** 193-199 (1988)
- 5) Guo Z, Miyoshi H, Komyoji T, Haga T, Fujita T : *Biochim. Biophys. Acta*, **1056** 89-92 (1991)
- 6) Starkov AA, Dedukhova VI, Skulachev VP : *FEBS Lett.*, **355** 305-308 (1994)
- 7) Terada H : "Cation Flux across Biomembranes", Mukohara Y, Packer L eds., Academic Press, New York, pp.365-370 (1979)
- 8) Terada H, Nagamune H, Osaki Y, Yoshikawa K : *Biochim. Biophys. Acta*, **646** 488-490 (1981)
- 9) Terada H, Nagamune H : *Biochim. Biophys. Acta*, **723** 7-15 (1983)
- 10) Terada H, Nagamune H, Morikawa N, Ichikawa T : *Cell Struct. Funct.*, **8** 161-170 (1983)
- 11) Terada H, Nagamune H, Morikawa N, Ikuno M : *Biochim. Biophys. Acta*, **807** 168-176 (1985)
- 12) Takeguchi N, Saitoh T, Morii M, Yoshikawa K, Terada H : *J. Biol. Chem.*, **260** 9158-9161 (1985)
- 13) Rottenberg H : *Methods Enzymol.*, **55** 547-569 (1979)
- 14) Waggoner AS : *Methods Enzymol.*, **55** 689-695 (1979)
- 15) Nicholls DG, Akerman K : *Biochim Biophys Acta*, **683** 57-88 (1982)
- 16) Gunter TE, Pfeiffer DR : *Am. J. Physiol.*, **258** C755-C786 (1990)
- 17) Zoratti M, Szabo I : *Biochim. Biophys. Acta*, **1241** 139-176 (1995)
- 18) Bernardi P : *Physiol. Rev.*, **79** 1127-1155 (1999)
- 19) Fournier N, Ducet G, Crevat A : *J. Bioenerg. Biomembr.*, **19** 297-303 (1987)
- 20) Broekemeier KM, Dempsey ME, Pfeiffer DR : *J. Biol. Chem.*, **264** 7826-7830 (1989)
- 21) Friberg H, Ferrand-Drake M, Bengtsson F, Halestrap AP, Wieloch T : *J. Neuroscience*, **18** 5151-5159 (1998)
- 22) Beatrice MC, Stiers DL, Pfeiffer DR : *J. Biol. Chem.*, **257** 7161-7171 (1982)

- 23) Petronilli V, Cola C, Massari S, Colonna R, Bernardi P : *J. Biol. Chem.*, **268** 21939-21945 (1993)
- 24) Jung DW, Bradshaw PC, Pfeiffer DR : *J. Biol. Chem.*, **272** 21104-21112 (1997)
- 25) Shinohara Y, Bandou S, Kora S, Kitamura S, Inazumi S, Terada H : *FEBS Lett.*, **428** 89-92 (1988)
- 26) Yamashita K, Ichikawa T, Yamamoto T, Kataoka M, Nakagawa Y, Terada H, Shinohara Y : *J. Health Sci.* in press
- 27) Shinohara Y, Terada H : *Biochim. Biophys. Acta*, **890** 387-391 (1987)
- 28) Koike H, Shinohara Y, Terada H : *Biochim. Biophys. Acta*, **1060** 75-81 (1991)
- 29) Almofti MR, Ichikawa T, Yamashita K, Terada H, Shinohara Y : *J. Biochem.*, **134** 43-49 (2003)
- 30) Pfeiffer DR, Gudiz TI, Novgorodov SA, Erdahl WL : *J. Biol. Chem.*, **270** 4923-4932 (1995)
- 31) Sultan A, Sokolove PM : *Arch. Biochem. Biophys.*, **386** 37-51 (2001)
- 32) Sokolove PM, Kinnally KW : *Arch. Biochem. Biophys.*, **336** 69-76 (1996)
- 33) Crompton M : *Biochem. J.*, **341** 233-249 (1999)
- 34) Kroemer G, Reed JC : *Nat. Med.*, **6** 513-519 (2000)
- 35) Bernardi P, Petronilli V, Di Lisa F, Forte M : *Trends. Biochem. Sci.*, **26** 112-117 (2001)
- 36) Shinohara Y, Almofti MR, Yamamoto T, Ishida T, Kita F, Kanzaki H, Ohnishi M, Yamashita K, Shimizu S, Terada H : *Eur. J. Biochem.*, **269** 5224-5230 (2002)
- 37) Yamamoto T. *et al.* : manuscript in preparation
- 38) Rottenberg H : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80** 3313-3317 (1983)
- 39) Terada H, Shima O, Yoshida K, Shinohara Y : *J. Biol. Chem.*, **265** 7837-7842 (1990)
- 40) Sun X, Garlid KD : *J. Biol. Chem.*, **267** 19147-19154 (1992)
- 41) Schönfeld P, Sztark F, Slimani M, Dabadie P, Mazat JP : *FEBS Lett.*, **304** 273-276 (1992)
- 42) Luvisetto S, Buso M, Pietrobon D, Azzone GF : *J. Bioenerg. Biomembr.*, **22** 635-643 (1990)
- 43) Shinohara Y, Unami A, Teshima M, Nishida H, van Dam K, Terada H : *Biochim. Biophys. Acta*, **1228** 229-234 (1995)
- 44) Rottenberg H : *Biochim. Biophys. Acta*, **1018** 1-17 (1990)
- 45) Murphy MP : *Biochim. Biophys. Acta*, **977** 123-141 (1989)
- 46) van Dam K, Shinohara Y, Unami A, Yoshida K, Terada H : *FEBS Lett.*, **277** 131-133 (1990)

(受付 2003年9月1日 掲載決定 9月25日)