

# 呼吸鎖複合体 I アセンブリー機構と ミトコンドリア病

Understanding mitochondrial complex I assembly in human mitochondrial disorders

Key Word

ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I, ミトコンドリア病, アセンブリーファクター



三牧正和

Masakazu MIMAKI

帝京大学医学部小児科

ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I は、電子伝達系の最初の役割を担う、呼吸鎖のなかで最大の複合体である。哺乳類においては、ミトコンドリア DNA にコードされた 7 種のサブユニットと、37 種にも及ぶ核にコードされたサブユニットから構成され、その分子量は 980 kDa にも及ぶ。機能を発揮する成熟した複合体を形成するには 44 種類ものサブユニットを組み立てるための複雑なプロセス(アセンブリー機構)が必要となる。複合体 I 欠損症はミトコンドリア病の原因としてもっとも多く、遺伝子診断に至っていない例も多いが、近年、アセンブリー機構の破綻を原因とする患者報告があいついでいる。また、これらの患者細胞の解析やプロテオミクスの応用などによりアセンブリー機構に必須の蛋白(アセンブリーファクター)が数多く見出されている。複合体 I のアセンブリープロセスは複雑で解析が困難であるが、その解明がミトコンドリア呼吸鎖異常症の病因診断、そして分子病態に基づいた治療法開発をもたらすことを期待する。

ミトコンドリアにおいてエネルギー(ATP)を合成する機能の中核を担うのが蛋白の集合体である呼吸鎖複合体であり、その異常は、エネルギー産生低下、ひいては細胞機能障害に直結し、ヒトにおいてはさまざまな臓器障害を伴うミトコンドリア病の原因となる。

近年、呼吸鎖異常の原因として、その構成蛋白(サブユニット)の欠損のみならず、呼吸鎖の集合にかかわる因子の異常がつつぎつつ見出されている。

本稿では、ミトコンドリア病患者でもっとも多く異常が見出される呼吸鎖複合体 I に焦点をあて、この巨大複合体の形成過程についてバイオジェネシスにかかわる因子に触れつつ解説する。

## ❖呼吸鎖複合体 I の構造と機能

ミトコンドリア呼吸鎖はミトコンドリア内膜に存在する複合体 I (NADH-CoQ reductase)、複合体 II (succinate-CoQ reductase)、複合体 III

(reduced CoQ-cytochrome *c* reductase)、複合体 IV (cytochrome *c* oxidase)の電子伝達系を構成する 4 つの複合体と複合体 V (ATP synthase)の 5 つからなる。クエン酸回路や脂肪酸の  $\beta$  酸化によって還元された NADH や FADH<sub>2</sub> などの補酵素の還元電位エネルギーを用いて、ミトコンドリア内膜にプロトン濃度勾配を形成し、この電気勾配を用いて複合体 V が ATP を合成する。

複合体 I はこの呼吸鎖における電子伝達の最初の複合体であり、その分子量は約 980 kDa に及び呼吸鎖複合体のなかで最大である。クエン酸回路の電子キャリアである NADH から電子を受け取ってコエンザイム Q (ユビキノン) に渡し、ユビキノンが還元されユビキノールは膜の内部を自由に拡散し、複合体 III に電子伝達を行う。電子を伝達する間に、複合体 I はプロトンポンプ機構によってプロトンをミトコンドリアの内膜内(マトリックス)から外膜と内膜の間(膜間腔)に移動させ、プロトン濃度勾配をつくる。

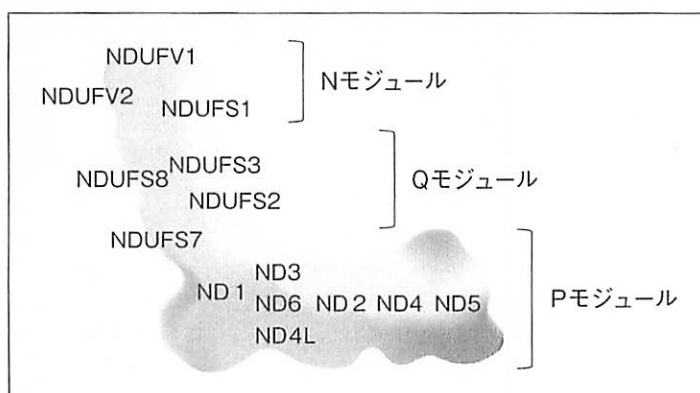


図 1 複合体 I の模式図

3つの機能的モジュール(NADHを還元するNモジュール, 電子をユビキノンに伝達するQモジュール, プロトンポンプ機能を果たすPモジュール)で構成されており, 内膜に埋め込まれた membrane armとマトリックス側に突出する matrix armからなるL字型構造をとる. 14個のコアサブユニットの位置を示す.

近年, 哺乳類においても複合体 I の構造が徐々に明らかとなっており, 内膜に存在する membrane arm とマトリックス側に突出する matrix arm からなる L 字型構造をとることがわかっている<sup>1)</sup>. matrix arm は NADH と結合して酸化する N モジュールと電子伝達を仲介する Q モジュールからなり, membrane arm はプロトンを膜間腔に汲み出すプロトンポンプの働きをもつ P モジュールで構成される. それぞれのモジュールには種を超えて保存される 14 個の蛋白(コアサブユニット)が存在し, 複合体 I の機能の中核を担っている(図 1). コアサブユニットのうち, ミトコンドリア DNA にコードされている ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6 の 7 つは membrane arm を, 核 DNA にコードされている NDUFV1, NDUFV2, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7, NDUFS8 の 7 つは matrix arm を構成する. 哺乳類の複合体 I はこれら 14 個のコアサブユニットに 30 種の supernumerary subunit とよばれるアクセサリーサブユニットが加わり, 合計 44 の蛋白サブユニットから構成されている. 複合体 I の機能の中核を担うコアサブユニットに対し, これらの“付加的な”アクセサリーサブユニットは, 複合体 I の安定化させたり活性酸素によるダメージから複合体 I を防御したりしているといわれているが, その役割は十分には解明されていない.

### ❖呼吸鎖複合体 I のアセンブリー

哺乳類の複合体 I は多数の蛋白からなり, 分子量が約 1MDa にも及ぶ巨大な蛋白複合体であるがゆえに, その構造やサブユニットの集合, 組立て(assembly: アセンブリー)機構の解析は困難である. さらに, 核とミトコンドリア DNA の二重の遺伝子支配を受けているため, 核にコードされた細胞質で生成された蛋白がミトコンドリア内に輸送され, ミトコンドリア DNA にコードされるサブユニットと共同して複合体 I を形成する過程は非常に複雑で, いまだアセンブリー機構の全容を解明するには至っていない.

しかし, 真菌モデルを用いた研究や, アセンブリー異常を有するミトコンドリア病患者の解析により, 複合体 I のアセンブリー機構は徐々に明らかになってきた. *N. crassa* の解析で, matrix arm を構成するサブユニットの変異によって matrix arm の形成が完全に欠損した際に, membrane arm が蓄積することが明らかにされ, 2 つの arm が別々に形成されていることが示された<sup>2)</sup>. 同様にヒトにおいても, membrane arm を構成する mtDNA にコードされたサブユニットをすべて失っても, matrix arm のアセンブリーが保たれることが示されている<sup>3)</sup>. このころより, 大分子蛋白複合体でもその構造を保ったままの解析が可能な Blue-Native 電気泳動(BN-PAGE)が, 複合体 I の解析に盛んに応用され, membrane arm と

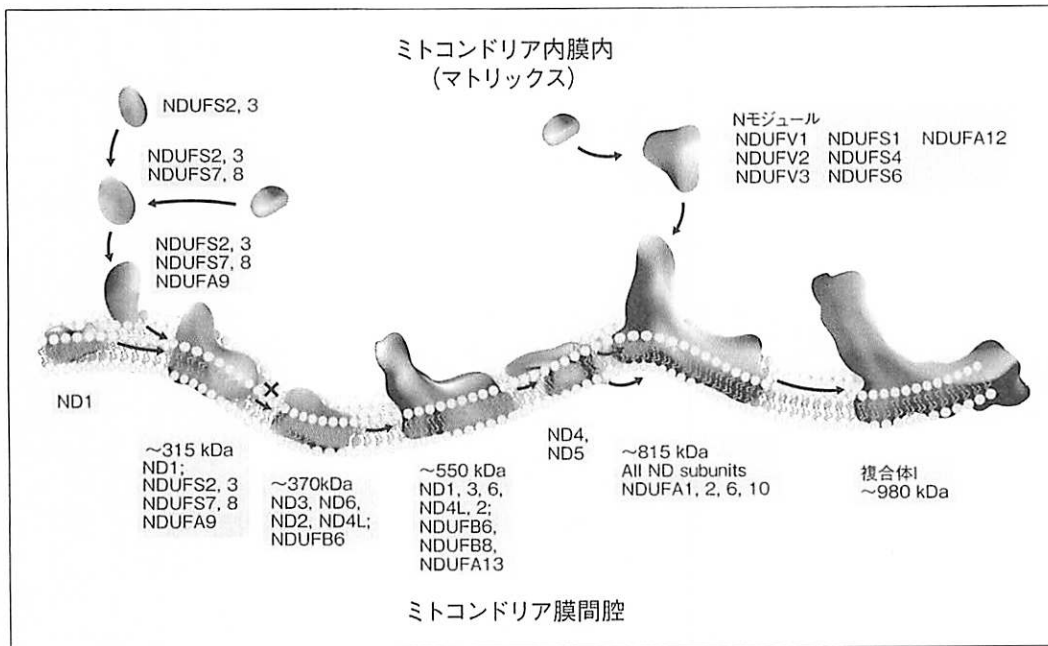


図2 ミトコンドリア呼吸鎖複合体Iのアセンブリー過程のモデル(文献<sup>7)</sup>より引用)  
 左から右へアセンブリーが進む過程で複合体が成熟し、約980 kDaの巨大な複合体Iを形成していく。図中の蛋白名は複合体Iのサブユニットの一部を示しており、ND1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6はミトコンドリアDNAがコードする蛋白である。

アセンブリーの早期段階では、親水性のコアサブユニット(NDUFS2とNDUFS3)がサブコンプレックスを形成し、続いてコアサブユニットのNDUFS7, NDUFS8, supernumerary subunitのNDUFA9などと集合する。さらに、ミトコンドリアDNAにコードされたND1を含むmembrane armの一部と合わせり約315 kDa程度のサブコンプレックスを形成する。一方、内膜には、ND3, ND6, ND2, ND4Lなどからなる複合体も形成されており、両者が一緒になり約550 kDaの中間複合体が形成され、これにND4やND5などが加わることでさらに成熟した約815 kDaの複合体がつくられる。一方で親水性のNモジュールがNDUFV1, NDUFV2, NDUFS1などからつくられ、最終段階に結合して成熟した複合体Iが完成すると考えられている。

matrix armが別々に形成された後に、両者が集合して成熟した複合体Iをつくるというアセンブリー過程がしだいに明らかとなった<sup>4,5)</sup>。

近年は、哺乳類を含む複合体Iの構造の解明や、質量分析をはじめとした蛋白解析法の進歩によりアセンブリー過程がつつぎとアップデートされている。最近提唱されているアセンブリーモデルの早期段階では、親水性のコアサブユニット(NDUFS2とNDUFS3)が小さな複合体(サブコンプレックス)を形成し、続いてNDUFS7, NDUFS8などと集合してQモジュールがつけられると考えられている。そしてミトコンドリアDNAにコードされたND1を含む疎水性蛋白からなるmembrane armの一部と合わせり約315 kDa程度のサブコンプレックスを形成する。一方、ミトコンドリアDNAにコードされたND2, ND3, ND6などがmembrane armのもうひとつのサブコンプレックスを形成し、両者が集合して約550

kDaのさらに大きなサブコンプレックスが形成される。membrane armは最後にND4とND5などが加わることでさらに成熟し、約815 kDaの複合体がつけられる。一方で親水性のNモジュールがNDUFV1, NDUFV2, NDUFS1などからつくられ、最終段階で両者が集合して約980 kDaの機能を有する成熟した複合体Iが完成すると考えられている(図2)。さらに、最近の研究では約815 kDaの複合体の段階で複合体IIIと複合体IVが集合した後に複合体Iが完成し、複合体I, IIIとIVによって構成されるスーパーコンプレックスが形成され、生理的な機能を発揮することがわかってきた<sup>6)</sup>。

#### ❖呼吸鎖複合体Iのアセンブリーファクター

この複雑なアセンブリー過程には複合体Iを構成するサブユニット以外に重要な因子が関与していることが明らかとなってきている。これらは一

表 1 複合体 I のアセンブリーファクター

アセンブリーファクター	アセンブリープロセスにおいて機能が想定されるモジュール	報告されたおもなミトコンドリア病型	文献番号
ACAD9	Pモジュール中間部 (ND2 を含むモジュール)	脳筋症, 心筋症	15)
ATP5SL	Pモジュール遠位部 (ND5 を含むモジュール)	ヒトでの疾患報告なし	18)
DMAC1	Pモジュール遠位部 (ND5 を含むモジュール)	ヒトでの疾患報告なし	18)
ECSIT	Pモジュール中間部 (ND2 を含むモジュール)	ヒトでの疾患報告なし	15)
FOXRED1	Pモジュール遠位部 (ND5 を含むモジュール)	Leigh 脳症	17)
NDUFAF1 (CIA30)	Pモジュール中間部 (ND2 を含むモジュール)	脳筋症, 心筋症	15)
NDUFAF2 (NDUFA12L, B17.2L)	Nモジュールと Pモジュールの結合	脳筋症, Leigh 脳症	19)
NDUFAF3 (C3orf60)	Qモジュール, Qモジュールと Pモジュールの結合	新生児/乳児ミトコンドリア病	8)
NDUFAF4 (C6orf66)	Qモジュール, Qモジュールと Pモジュールの結合	新生児/乳児ミトコンドリア病	9)
NDUFAF5 (C20orf7)	Pモジュール近位部 (ND1 を含むモジュール)	新生児/乳児ミトコンドリア病, Leigh 脳症	11)
NDUFAF6 (C8orf 38)	Pモジュール近位部 (ND1 を含むモジュール)	Leigh 脳症	12)
NDUFAF7 (homolog of MIDA)	Pモジュール近位部 (ND1 を含むモジュール)	ヒトでの疾患報告なし	14)
NUBPL (Ind1)	Nモジュール, Qモジュール	脳筋症 (白質変性症)	10)
TIMMDC1 (C3orf 1)	Pモジュール近位部 (ND1 を含むモジュール)	ヒトでの疾患報告なし	13)
TMEM126B	Pモジュール中間部 (ND2 モジュール)	ミトコンドリア筋症	16)

時的にサブコンプレックスに結合することはあっても、最終産物である複合体 I には存在せず、サブユニットとは区別してアセンブリーファクターとよばれている。ヒトにおいては現在までに10個以上のアセンブリーファクターの存在が明らかとなっており、その多くでミトコンドリア病の遺伝子異常が見出されている<sup>7)</sup>(表 1)。すべてが核遺伝子にコードされており、細胞質でつくられてからミトコンドリア内に輸送され、サブコンプレックスの安定化や、サブコンプレックスどうしの集合に関与するシャペロン機能などを有すると考えられている。前述のように複合体 I は、モジュールごとに形成され、それらが集合して成熟するが、このアセンブリー過程に沿って現在までに同定されている 15 個のアセンブリーファクターを紹介する。

### 1. Qモジュールのアセンブリー

matrix arm の近位部を形成する Qモジュールは、コアサブユニットの NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7, NDUFS8 に加え、アクセサリサブユニットの NDUFA5, NDUFA6, NDUFA9, NDUFA1 と NDUFA7 からなるが、最初に NDUFS2, NDUFS3 と NDUFA5 が集合し、つぎの段階で NDUFS7 と NDUFS8 が加わると考えられている。

その際アセンブリーファクターである NDUFAF3 (NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex assembly factor 3) と NDUFAF4 が作用して、Qモジュールの安定化や Qモジュールと Pモジュールの結合にかかわっていると考えられている<sup>8,9)</sup>。また、やはりアセンブリーファクターのひとつとされる NUBPL (Iron-sulfur protein required for NADH dehydrogenase : Ind1) は複合体 I の鉄硫黄クラスターの取込みに関与していると考えられており、鉄硫黄クラスターをもつ Qモジュール内のコアサブユニット NDUFS7 と NDUFS8 の集合や機能に関与している可能性がある<sup>10)</sup>。

### 2. Pモジュールのアセンブリー

一方の membrane arm の主要部分については、ミトコンドリア DNA にコードされているコアサブユニットである ND1 を含むモジュールと、ND2 を含むモジュールが別々に形成された後に、両者が集合すると考えられている。

#### ① Pモジュール近位部

Pモジュールの近位部には ND1 が位置しているが(図 1)、他にアクセサリサブユニットの NDUFA8, NDUFA3, NDUFA13 や NDUFA1 が集合して“ND1モジュール”がつくられ、前述の

ように形成された matrix arm の Q モジュールはこのモジュールと結合して約 315 kDa のサブアセンブリーを形成する段階で内膜とつながると考えられている(図 2)。次世代シーケンサーなどによる遺伝子解析によって発見された変異をもつ患者細胞の検討により、NDUFAF5 と NDUFAF6 が ND1 の生成や安定化にかかわる因子として報告されている<sup>11,12)</sup>。さらに、最近のプロテオーム解析技術を応用し、コアサブユニットやアセンブリーファクターとの相互作用を解析することにより内膜に存在する蛋白の TIMMDC1 が ND1 モジュールの集合や安定化に必須の因子として見出されている<sup>13)</sup>。また、Q モジュールを構成する NDUFS2 と結合すると思われる NDUFAF7 は、ND1 と同じサブコンプレックスに存在し、ND1 モジュールの安定化にも関与していると考えられている<sup>14)</sup>。

### ② P モジュール中間部

P モジュールの中間部には ND2 が位置しているが、このコアサブユニットを含む部分“ND2 モジュール”はアセンブリーの初期段階では ND1 モジュールとは別々に形成されていることが以前から知られていた。ND2 モジュールは、ミトコンドリア DNA にコードされる ND3, ND6 や ND4L と、おそらくは NDUFC1 や NDUFC2 といったアクセサリサブユニットと約 370 kDa の集合体を形成するが(図 2)、この際複数のアセンブリーファクター、すなわち NDUFAF1, ECSIT (Evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathway), ACAD9 (Acyl-CoA dehydrogenase family member 9) と TMEM126B が結合して作用することがわかってきた<sup>15,16)</sup>。これら 4 つの蛋白はたがいに結合して mitochondrial complex I assembly complex (MCIA コンプレックス) を形成し、ND2 モジュールの安定化に寄与し、さらに TIMMDC1 などと協働して ND1 モジュールとの集合に関与していると考えられる。

### ③ P モジュール遠位部

P モジュールの遠位部は、ミトコンドリア DNA にコードされた ND4 と ND5 に、NDUFB1~11 と NDUFAB1 から構成され、複合体 I の membrane arm の集合の最終段階で付加されると考えられて

いる。このプロセスで働いていると思われる因子としては、FOXRED1 が報告されていたが<sup>17)</sup>、最近になってあらたなアセンブリーファクターとして DMAC1 と ATP5SL が報告された<sup>18)</sup>。CRISPR/Cas-9 などのゲノム編集技術を用いてさまざまなサブユニットをノックダウンし、アセンブリープロセスに異常をきたした細胞を定量プロテオミクスにより比較することにより、これらの 2 つの因子が ND5 と FOXRED1 と相互作用をもち、P モジュール遠位部が集合して membrane arm を形成する過程に寄与していることが示された。

### 3. N モジュールのアセンブリー

matrix arm のもっとも遠位部を構成する N モジュールは、NDUFV1, NDUFV2, NDUFS1, NDUFA2, NDUFS4 と、おそらく NDUFV3 からなり、NDUFS6 と NDUFA12 は Q モジュールに面して位置していると考えられている。このモジュールは鉄硫黄クラスターをもつので、Q モジュール同様 NUBPL がアセンブリーファクターとして機能していると思われる。形成された N モジュールは複合体 I の最終段階で NDUFAF2 の作用のもと約 815 kDa の中間複合体に付加されて成熟した複合体 I が完成し機能を発揮する<sup>19)</sup>。

### ◇おわりに

複合体 I のアセンブリー機構はサブユニットが徐々に大きくなる単純な過程ではなく、モジュールごとにサブユニットが集合してサブアセンブリーを形成し、それらが集合して成熟した巨大な複合体を組み立てる複雑なプロセスである。種を超えて保存されているコアサブユニットに加え、これほどまでに多くのアクセサリサブユニットが、さまざまなアセンブリーファクターの助けを借りて組み込まれる理由はよくわかっていないが、生物の進化を考えるうえでたいへん興味深い。

一方、ミトコンドリア病患者のおよそ 4 割がいまだ遺伝子診断に至っていないといわれているが、なかでもミトコンドリア呼吸鎖複合体 I 欠損はミトコンドリア病患者の病因としてもっとも多く、遺伝学的診断に至っていない症例も多い。そのため、この巨大な複合体のアセンブリー機構の理解は基礎研究のみならず臨床上も非常に重要で

ある。構造解析やプロテオミクスの進歩と、次世代シーケンサーをはじめとした最新の遺伝子解析技術を用いた患者解析は、複合体 I のアセンブリー機構の理解に大きな進歩をもたらした。そして多くのアセンブリーファクターが見出されてミトコンドリア病の原因遺伝子として同定されてきたが(表 1)、それぞれの遺伝子異常がどのような臨床病型をもたらすかははっきりせず、表現型と遺伝子異常の関連の解明にはさらなる症例の蓄積が必要である。また、あいついで発見されているアセンブリーファクターの作用機序もほとんどわかっておらず、アセンブリー機構の全容解明にはまだ時間を要する。しかし近年、蛋白どうしの相互作用の解析技術は長足の進歩を遂げており、さらなる未知のアセンブリーファクターの発見や複合体 I の構造の解明がなされると思われる。アセンブリープロセスの解明が患者の病因診断と病態解析につながり、さらには分子病態に基づいた治療法開発をもたらすことを期待したい。

\* \* \*

- 1) Zhu, J. et al. : *Nature*, **536** : 534-538, 2016.
- 2) Tuschen, G. et al. : *J. Mol. Biol.*, **213** : 845-857, 1990.
- 3) Bourges, I. et al. : *Biochem. J.*, **383** : 491-499, 2004.
- 4) Vogel, R. O. et al. : *Biochim. Biophys. Acta.*, **1767** : 1215-1227, 2007.
- 5) Mckenzie, M and Ryan, M. T. : *IUBMB Life*, **62** : 497-502, 2010.
- 6) Moreno-Lastres, D. et al. : *Cell Metab.*, **15** : 324-335, 2012.
- 7) Mimaki, M. et al. : *Biocim Biophys. Acta.*, **1817** : 851-862, 2012.
- 8) Saada, A. et al. : *Am. J. Hum. Genet.*, **84** : 718-727, 2009.
- 9) Saada, A. et al. : *Am. J. Hum. Genet.*, **82** : 32-38, 2008.
- 10) Scheftel, A. D. Et al. : *Mol. Cell. Biol.*, **29** : 6059-6073, 2009.
- 11) Sugiana, C. et al. : *Am. J. Hum. Genet.*, **83** : 468-478, 2008.
- 12) Mckenzie, M. et al. : *J. Mol. Biol.*, **414** : 413-426, 2011.
- 13) Andrews, B. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110** : 18934-18939, 2013.
- 14) Zurita Rendon, L. et al. : *Hum. Mol. Genet.*, **23** : 5159-5170, 2014.
- 15) Nouws, J. et al. : *Cell Metab.*, **12** : 283-294, 2010.
- 16) Heide, H. et al. : *Cell Metab.*, **16** : 538-549, 2012.
- 17) Formosa, L. E. et al. : *Hum. Mol. Genet.*, **24** : 2952-2965, 2015.
- 18) Stroud, D. A. et al. : *Nature*, **538** : 123-126, 2016.
- 19) Ogilvie, I. et al. : *J. Clin. Invest.*, **115** : 2784-2792, 2005.