

ミトコンドリアは、生体内の主なエネルギーである ATP 産生において最も重要な細胞小器官である。ミトコンドリアは多くの真核細胞が有する細胞小器官の1つで、外膜と内膜の二重膜構造をしている。ミトコンドリア内膜に存在する電子伝達系において酸化リン酸化により ATP を産生している。

ミトコンドリア電子伝達系タンパク質群は、独立して存在するのではなく呼吸鎖超複合体(SC)を形成していることが報告されている。電子伝達系に含まれる必須因子としてコエンザイム Q10 (CoQ10)が存在しており、SC 中に CoQ10 が含まれていることも報告されている。CoQ10 はミトコンドリア内膜にのみ局在するのではなく、核膜、形質膜など、生体内にユビキタスに存在している脂溶性物質であり、その還元型は抗酸化物質としても重要である。加齢に伴い組織中の CoQ10 量が低下することが報告されている。しかしながら、これらのデータは細胞レベルや細胞小器官レベルトータルの CoQ10 量を解析したデータであり、SC 中の CoQ10 量の変動については不明である。加齢に伴い生体内濃度が低下する CoQ10 は食事やサプリメントでの摂取が推奨されている。ラットに静脈投与した CoQ10 が細胞小器官に取り込まれ、ミトコンドリアに取り込まれることが報告されている。しかしながら、これらのデータも SC 中の CoQ10 量の変動については不明である。

生体内における CoQ10 の輸送機序も不明な点が多く残されている。脂溶性である CoQ10 の細胞内外への輸送には可溶化する結合タンパク質が必須である。そこで注目されているのが、プロサポシン(Psap)である。Psap は既に CoQ10 結合タンパク質として見出されている。Psap は saposin A, B, C, D の前駆体タンパク質であり、saposin B も CoQ10 結合能を有することが見出されている。プロサポシン発現量を低下させた細胞株では、細胞内及びミトコンドリア内 CoQ10 量が低下することが報告されている。しかしながら、加齢による長期の CoQ10 量低下状態が Psap の合成量にどのように影響するかは不明である。

そこで本論文では、まず SC 中の CoQ10 量の測定手法を確立した。次に細胞内 CoQ10 量変動時の SC 内の CoQ10 量がどのように変動するのかを解析した。また、長期間 CoQ10 量を低下させることにより Psap タンパク質量の挙動の解析を通じて、ミトコンドリア電子伝達系への CoQ10 量輸送機序の解明を試みた。本論文は 5 章からなる。第 1 章では以上の研究背景を述べた。2 章以下の内容については以下に示す。

まず、SC 中の CoQ10 量の定量手法の確立した。脂質代謝が活発である肝臓由来の細胞株である HepG2 細胞からミトコンドリアを単離した。単離したミトコンドリアはジギトニンを添加して可溶化し電気泳動サンプルとした。電気泳動はブルーネイティブ電気泳動法を用いて呼吸鎖タンパク質群を分離した。ブルーネイティブ電気泳動は、負の電荷を持つクマシーブリリアントブルーをタンパク質の表面に付加して電気泳動することでタンパク質の立体構造を破壊することなく酵素活性を保持したまま複合体タンパク質を分離する手法であり、膜タンパク質複合体の研究に広く利用されている。電気泳動したゲルは、半分に切り分け片方を複合体タンパク質の検出に用いた。他方は CoQ10 測定用に使用した。呼吸鎖複合体の検出には、ウェスタンブロッティングもしくはゲル内酵素活性染色法を用いて検出した。複合体 I, III, IV が電気泳動度 10 mm 付近に検出されたことから、SC が検出されたと考えられる。CoQ10 測定用に 3 mm 毎に分画したゲルから CoQ10 のピークが確認された。SC が検出された泳動度付近に CoQ10 のピークが検出されたことから、SC に含まれている CoQ10 であると示唆された。次に異なる界面活性剤 DDM を用いて同様の実験を行ったところ、ジギトニン処理サンプルで確認された SC および、CoQ10 のピークは得られなかった。このことから、得られた CoQ10 のピークは SC 中の CoQ10 量を反映していると考えられる。また、ジギトニンと CoQ10 を混合した溶液を電気泳動するとゲル内には CoQ10 は保持されなかった。これらの結果より、ゲル内から抽出された CoQ10 はミトコンドリアタンパク質に由来するものであると考えられる。次に CoQ10 合成阻害剤投与による細胞内 CoQ10 量低下時の SC 内 CoQ10 量について検討した。合成阻害剤には 4-Nitrobenzoate (4-NB) を使用した。

1, 3, 5 mM 4-NB を投与し 72 時間培養した細胞からミトコンドリアを単離し, SC 中の CoQ10 量を解析した. 細胞レベル, ミトコンドリアレベルでは濃度依存的に CoQ10 量が低下した. 興味深いことに SC 中の CoQ10 量は, 全ての濃度で同程度の低下となった. 次に投与した CoQ10 が SC に取り込まれるかを検討した. 水溶性 CoQ10 を細胞培養メディアに投与し, 細胞中, ミトコンドリア画分, SC 中の CoQ10 量を解析した. 細胞やミトコンドリアで, 投与した水溶性 CoQ10 の濃度依存的に CoQ10 量が増加した. SC でも, 濃度依存的な CoQ10 量の増加が認められた. これらの結果より, 本手法により SC 中の CoQ10 量の測定手法が確立できたと考えられる. (第 2 章)

Psap は saposin A, B, C, D の前駆体タンパク質である. Saposin A~D は, 共通の前駆体タンパク質である Psap に直列に存在しており, スフィンゴ糖脂質の加水分解に必要な補酵素である. したがって, スフィンゴ糖脂質の量は Psap の細胞内レベルに依存する. CoQ10 は, 加齢や様々な疾患によって減少するため長期間の CoQ10 欠乏状態における細胞応答を理解することは興味深い. 長期間 CoQ10 欠乏細胞株の作製には第 2 章で用いた CoQ10 合成阻害剤 4-NB を用いた. 3 日, 6 ヶ月, 12 ヶ月の 4-NB 投与により細胞内 CoQ10 量が同程度に低下した. 還元型 CoQ10 は重要な抗酸化物質であることから, 長期の CoQ10 量低下は, 細胞に酸化ストレス負荷が起きると予想される. そこで, 酸化ストレスレベルを評価するため, アクロレイン負荷タンパク質のレベルを測定した. 15 ヶ月間 4-NB で処理した細胞では, 高分子量のアクロレイン結合タンパク質量の増加が確認された. また, 酸化ストレスの指標となっている酸化型 CoQ10 の割合 (%CoQ) は, 4-NB 処理 3 日後および 6 ヶ月後に %CoQ10 が増加した. 次に, 細胞内 Psap レベルの評価を行ったところ, 遺伝子レベル, タンパク質レベル共に長期間 CoQ10 量低下細胞株において低下が見られた. 一過性 (CoQ10 低下 3 日目) では, Psap レベルの低下は見られなかったことから, 長期の CoQ10 レベルの低下によるものであると示唆された. そこで, これらの結果が 4-NB の毒性によるものである可能性を否定するために, 本来の合成基質である 4-Hydroxybenzoate (4-HB) の共存下における変動解析を行った. また, 同時に 4-NB を含まない通常の培養培地に切り替えて培養を行い合計 4 群の比較を行った. 細胞内 CoQ10 レベルは, 4-NB・4-HB 共存下及び, 通常培地の培養により, 有意に回復した. またこれらの細胞中の Psap レベルも有意な回復が確認された. これらの結果により, 長期 CoQ10 低下細胞株中の Psap レベルの低下は, 4-NB の毒性ではなく, CoQ10 レベルの低下によるものであると考えられる. Psap は, スフィンゴ糖脂質を代謝する補因子である saposin A-D の前駆体である. そこで, 4-NB 処理した細胞におけるスフィンゴ糖脂質の一種である ganglioside の細胞内レベルを薄層クロマトグラフィー (TLC) で解析した. ganglioside の一種である GM3 をマーカーとした場合, GM3 と同じ位置に染色されたバンドを確認した. このバンドの強度は, 4-NB 処理した細胞抽出物では減少していた. 次に細胞内 Psap レベルを制御する因子である核内転写因子 Y サブユニット β (NF-YB) の解析を行った. NF-YB-1 は Psap の遺伝子発現を制御することが報告されている. 長期 CoQ10 低下細胞株中の NF-YB の mRNA 発現量を解析したところ, 予想に反して NF-YB 遺伝子レベルは低下した. 従って, 4-NB を介した Psap mRNA の減少には, NF-YB は関与していない可能性が高い. これらの結果より, 長期の CoQ10 の欠乏は細胞内 Psap レベルが低下した. 4-NB で 3 日間処理した細胞では, CoQ10 量は減少したが, Psap 量には変化がなかった. しかしながら, 4-NB 処理 3 ヶ月後には Psap 量は減少し, 4-NB 処理数ヶ月後にも低いままであった. これらの結果は, CoQ10 が減少した直後ではなく, 慢性的に低値を維持している場合に Psap 量が減少することを示唆している. また, CoQ10 合成の基質となる 4-HB を投与すると Psap の減少が抑制されたことから, 後者は 4-NB 投与による単なる毒性作用ではなく, CoQ10 レベルの低下によるものであることが示唆された. (第 3 章)

第 3 章での解析において, 長期 CoQ10 低下細胞株では, CoQ10 結合タンパク質 Psap の発

現量が低下したことを見いだした。そこで、次に、長期 CoQ10 低下細胞株への CoQ10 投与により、呼吸鎖超複合体中に取り込まれる CoQ10 量について解析した。4-NB 非投与群と比較して、取り込み量が低値に定量された。これらのことから、Psap レベルの低下により、外因性の CoQ10 の取り込み能が低下していることが示唆された。(第 4 章)

第 5 章では、以上の研究結果を総括した。

CoQ10 はミトコンドリア電子伝達系の必須因子であり、還元型は重要な抗酸化物質としても機能している。加齢や、様々な疾病により生体内濃度が低下することから食事やサプリメントでの摂取が推奨されている。示した以上の結果より、SC 中の CoQ10 量測定手法を確立した。確立した手法を用いて解析したところ、CoQ10 合成酵素阻害剤を添加することにより、SC 中の CoQ10 量も低下することをみとめた。また外因性 CoQ10 が SC に取り込まれていることが示唆された。長期の細胞内 CoQ10 量の低下はその輸送タンパク質である Psap レベルを低下させ、その後細胞内 CoQ10 量を正常のレベルに回復すると Psap レベルも回復することが明らかとなった。これらの結果は、SC の生化学的理解を深めると共に、外因性の CoQ10 の取り込みの作用機序を解明することに寄与すると考えられる。

A group of mitochondrial electron-transfer system proteins form the respiratory chain supercomplex (SC), which has also been reported to contain CoQ10 inside. It has been reported that the amount of CoQ10 in tissues decreases with age. Dietary and supplemental intake of CoQ10 is recommended. Exogenous CoQ10 has been reported to be taken up by cell organelles and incorporated into mitochondria. However, data showing increases or decreases in CoQ10 in vivo have not been analysed at the SC level.

The transport mechanism of CoQ10 in vivo is also unclear: Prosaposin (Psap) has been found as a CoQ10-binding protein. It is not known how the long-term decline in CoQ10 levels due to ageing affects the level of Psap.

In this paper, we first established a method for measuring CoQ10 levels in SCs. Mitochondria isolated from HepG2 cells were used as electrophoresis samples. The electrophoresed gel was cut in half and one half was used to detect complex proteins. The other half was used for CoQ10 measurement: a CoQ10 peak was detected around the mobility at which SC was detected, suggesting that it was CoQ10 contained in SC. Next, we analyzed the amount of CoQ10 in SCs under conditions of increased or decreased intracellular CoQ10 levels by administration of a CoQ10 synthesis inhibitor (4-Nitrobenzoate: 4-NB) and exogenous CoQ10, and observed an increase or decrease in the amount of CoQ10 in the SCs. Next, a long-term CoQ10-depleted cell line was generated and Psap levels were analyzed. When the intracellular Psap levels were assessed, both the gene and protein levels decreased in the long-term (from 3 months onwards) CoQ10-lowering cell lines. Next, we analyzed the amount of CoQ10 taken up in SCs by CoQ10 treatment of long-term CoQ10-depleted cell lines: compared to the 4-NB non-treated group, the amount taken up was quantified to be lower. These results suggest that the reduced Psap level results in a reduced uptake of exogenous CoQ10.

These results may contribute to a better understanding of the biochemistry of SC and the mechanism of action of exogenous CoQ10 uptake.