

目次

| | |
|---|-----------|
| 第1章 緒言 | 4 |
| 1-1 超高齢社会 | 4 |
| 1-2 老化とは..... | 5 |
| 1-3 コエンザイム Q (CoQ)..... | 5 |
| 1-3-1 CoQ の生理機能..... | 6 |
| 1-3-2 CoQ の合成経路とその阻害薬 4-Nitrobenzoate (4-NB)..... | 9 |
| 1-3-3 加齢や病態における CoQ レベルの変化 | 9 |
| 1-3-4 CoQ 欠損症..... | 12 |
| 1-4 プロサポシン..... | 13 |
| 1-5 ミトコンドリア..... | 14 |
| 1-5-1 ミトコンドリア電子伝達系と酸化的リン酸化による ATP 産生..... | 14 |
| 1-5-2 電子伝達系複合体..... | 16 |
| 1-5-3 ミトコンドリア呼吸鎖超複合体..... | 18 |
| 本研究の目的・意義..... | 19 |
| 第2章 ミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量定量手法の確立 | 20 |
| 2-1 概要 | 20 |
| 2-2 序論..... | 21 |
| 2-3 試薬・実験手法..... | 22 |
| 2-3-1 HepG2 細胞の培養..... | 22 |
| 2-3-2 4-NB 投与実験..... | 22 |
| 2-3-3 CoQ10 投与実験 | 22 |
| 2-3-4 HepG2 細胞からミトコンドリア単離..... | 22 |
| 2-3-5 BN-PAGE..... | 23 |
| 2-3-6 ウェスタングロブリング..... | 23 |
| 2-3-7 ゲル内酵素活性染色法..... | 23 |
| 2-3-8 ヘキササン抽出..... | 23 |
| 2-3-9 CoQ10 および遊離コレステロールの分析..... | 23 |
| 2-4 結果 | 24 |
| 2-4-1 BN-PAGE による呼吸鎖超複体の分離と CoQ10 抽出手法..... | 24 |
| 2-4-2 ミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量の測定 | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 2-4-3 異なる界面活性剤添加による解析 | 28 |
| 2-4-4 4-NB 投与によるミトコンドリア呼吸鎖超複体内 CoQ10 量変動解析 | 30 |
| 2-4-5 CoQ10 投与によるミトコンドリア呼吸鎖超複体内 CoQ10 量変動解析 | 32 |
| 2-5 考察 | 34 |
| 第3章 長期 CoQ10 欠乏モデルを用いたプロサポシンの解析 | 36 |
| 3-1 概要 | 36 |
| 3-2 序論 | 37 |
| 3-3 試薬・実験手法 | 38 |
| 3-3-1 HepG2 細胞の培養 | 38 |
| 3-3-2 4-NB 投与実験 | 38 |
| 3-3-3 ウェスタンブロットイング | 38 |
| 3-3-4 RNA 抽出と定量 PCR (qPCR) | 39 |
| 3-3-5 CoQ10 および遊離コレステロールの分析 | 39 |
| 3-3-6 ガングリオシドの分析 | 39 |
| 3-4 結果 | 40 |
| 3-4-1 CoQ10 細胞レベルに対する 4-NB 処理の影響 | 40 |
| 3-4-2 4-NB 処理した細胞における Psap 細胞レベルの測定 | 42 |
| 3-4-3 4-NB および 4-HB 共存下における Psap レベルの変動解析 | 43 |
| 3-4-3 4-NB 処理した細胞におけるガングリオシドの細胞レベル | 44 |
| 3-4-4 核内転写因子 Y サブユニット β (NF-YB) 4-NB 処理細胞の細胞レベル | 45 |
| 3-5 考察 | 46 |
| 第4章 長期 CoQ10 欠乏モデルにおけるミトコンドリア呼吸鎖超複体中の CoQ10 量の解析 | 48 |
| 4-1 概要 | 48 |
| 4-2 試薬・実験手法 | 48 |
| 4-2-1 HepG2 細胞の培養 | 48 |
| 4-2-2 4-NB 投与実験 | 48 |
| 4-2-3 CoQ10 投与実験 | 48 |
| 4-2-4 HepG2 細胞からミトコンドリア単離 | 48 |
| 4-2-5 BN-PAGE | 49 |
| 4-2-6 ヘキササン抽出 | 49 |
| 4-2-7 CoQ10 および遊離コレステロールの分析 | 49 |

| | |
|---|----|
| 4-3 結果 | 50 |
| 4-3-1 CoQ10 投与によるミトコンドリア呼吸鎖超複合体内の CoQ10 量の解析..... | 50 |
| 4-4 考察 | 52 |
| 第5章 結語..... | 53 |
| 引用文献 | 55 |
| 謝辞..... | 61 |

第1章 緒言

1-1 超高齢社会

日本は世界的に見ても指折りの超高齢社会である。医療の発展に伴い、平均寿命は年々高い水準を更新しており、人生 100 年時代とも言われるようになってきている。しかしながら、高齢社会の増進により、これまでの制度や体制では対応できない問題点が浮上している。具体的には、医療や福祉、社会保障制度、財政の問題などが挙げられる。特に高齢者の健康を支える医療費の逼迫は非常に大きな問題である。また、高齢者の Quality of life(QOL)の低下といった課題も存在する。QOL は『生活の質』と訳され、心身ともに健康的で総合的な活力や満足度という意味が含まれている。では、長寿であることは健康的と言えるのだろうか。QOL とは別に、健康寿命という言葉がある。健康寿命とは、WHO が 2000 年に提唱した概念であり、『日常生活に制限のない期間の平均』と健康日本 21 に定義されている。つまり、日常的かつ継続的な医療・介護に依存し自己心身では生命維持のできない期間は、健康寿命に含まれない。厚生労働省『第 16 回健康日本 21(第二次)推進専門委員会』によると 2019 年度の平均寿命と健康寿命の差は男性で 8.73 年、女性で 12.06 年となっている(Fig. 1)。このような現代社会において、医療費の逼迫、QOL 低下を改善するために、健康寿命の延長が望まれている。

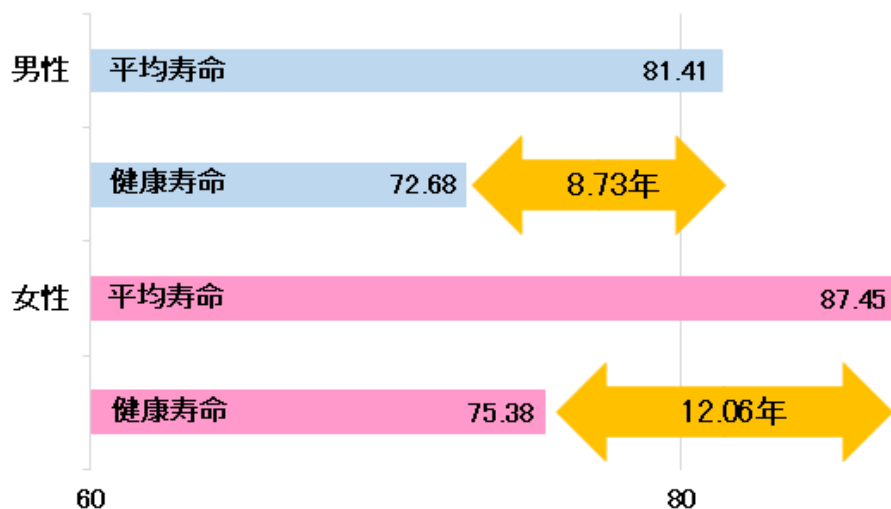


Fig. 1 厚生労働省『第 16 回健康日本 21(第二次)推進専門委員会資料』

1-2 老化とは

ヒトは受精から死ぬまで代謝が行われ変化し続けて行く。この過程の中で、一定の期間を成長と呼び、成熟期以降は老化と呼ばれる。つまり、老化と加齢は定義として異なっている。加齢は生まれてから死ぬまでの過程であり、成長過程も含まれている。

老化とは、加齢に伴って生理機能が低下し、遺伝的要因や、外的要因の刺激に対する抵抗力や適応力が低下することであると考えられる。また、身体的な老化には目に見える老化と目に見えない老化がある。具体的には、目に見える変化は、視力や聴力、味覚、運動能力などの変化である。目に見えない変化は、細胞老化と言われる老化である。ヒト組織における分裂細胞は概ね全て老化している。多くの正常分裂細胞は、分裂回数に上限があり、それ以上には分裂・増殖ができないと考えられている。この分裂限界を寿命と呼んでおり、これを発見した人物にちなみ、『ヘイフリックの限界』と呼ばれている。

1-3 コエンザイム Q (CoQ)

〈発見〉

コエンザイム Q₁₀(CoQ₁₀)は、ミトコンドリア呼吸鎖における電子伝達系での電子授受体として ATP の産生を担うと共に、還元型は脂溶性抗酸化物質としての 2 つの重要な機能を有している。

CoQ₁₀ の発見は、1957 年に米国ウィスコンシン大学酵素学研究所の Crane らにより、ウシ心筋ミトコンドリアの電子伝達能を研究している過程で、酸化還元反応を受け 275 nm (酸化型) に吸収極大波長を持つ、融点 48~49 °C の橙黄色結晶のキノン化合物 Q₂₇₅ が単離された⁽¹⁾。これ以前に英国リバプール大学の Morton らによりウマの消化器やラットの肝臓や腎臓などに存在することを報告しており⁽²⁾、両者の協議の末に Morton は生体内にユビキタスに存在するキノン体であることから、ユビキノンと名付けた⁽³⁾。

CoQ₁₀ の構造は、1958 年に Folkers らによる核磁気共鳴(NMR)を用いた解析や化合物合成によって CoQ₁₀ の構造が決定された⁽⁴⁾(Fig. 2)。

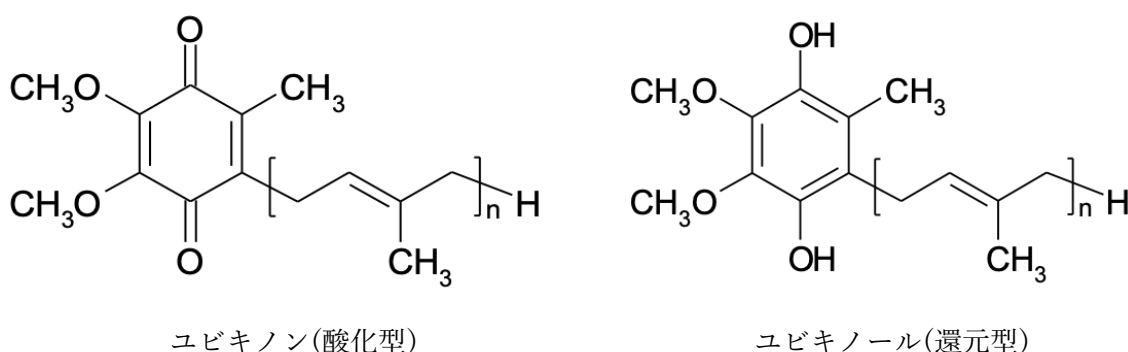


Fig. 2 ユビキノンとユビキノールの構造

イソプレノイド側鎖長は種ごとに異なっており、酵母菌では 6、マウスでは 9、ヒトでは

10, ピーマンは 11 である。これまでに CoQ1 (n=1) から CoQ13 (n=13) の同族体が見出されている。化学構造から分かるように水に不溶な脂溶性化合物である。ユビキノールの酸化電位がイソプレノイド側鎖長に依存することから、側鎖末端が芳香核と何らかの相互作用を持つこと、すなわち生体膜中では二つ折りになった構造をとっているものと推定される。

1-3-1 CoQ の生理機能

〈ATP 産生〉

地球上の原始的生命は嫌気的環境下で発生したと考えられ、地表には還元性物質が多量に存在していた。嫌気性生物のエネルギーは解糖系のみによりグルコース 1 分子当たり 2 分子の ATP が産生される。好気呼吸性生物は光合成過程の結果生じた酸素を利用し解糖系だけでなくトリカルボン酸回路、ミトコンドリア電子伝達系による呼吸鎖を加え 38 分子の ATP を産生することが可能となり効率の良いエネルギー獲得機構を得た。ミトコンドリアは細胞小器官の 1 つで、外膜、内外膜間隙、内膜、およびマトリックスから成る。これらの膜は生体膜と称され電子伝達系は内膜に存在する。Mitchell はミトコンドリア膜に埋め込まれた呼吸酵素複合体が電子伝達に伴ってプロトンを膜の片側から反対側に移送し、それによって生じたプロトン勾配が ATP の合成力となる化学浸透仮説⁽⁵⁾、さらに 1975 年にはプロトン駆動 CoQ サイクル仮説を提唱した⁽⁶⁾。これはミトコンドリアの内膜において、還元基質から H^+ 、 e^- が伝達される間に H^+ は内膜の外側に汲みだされ内膜の内側と外側にプロトン濃度勾配が生じ、この勾配が ATP 合成酵素を駆動する。この時 CoQ は単なる電子の伝達担体にとどまらず、プロトン駆動 CoQ サイクルを形成して積極的にプロトン汲み出しに働くというものである⁽⁷⁾。CoQ は ATP の合成に深く関与している。ミトコンドリアにおける CoQ の存在様式は、膜内を移動の可能なプールとして考える CoQ プール説が唱えられた^(8, 9)。CoQ が電子伝達系の主経路に存在する必要性は、 Ca^{2+} ミトコンドリア粒子を用いたペンタンによる CoQ の除去・再添加時の活性測定実験において明らかにされた⁽¹⁰⁾。さらに、ミトコンドリアから単離した 4 つの巨大蛋白質成分(複合体 I, II, III, IV)と可溶性の小蛋白質成分(シトクロム c)を用いた再構成系の研究により、CoQ がミトコンドリア電子伝達系の必須成分であることが証明された⁽⁶⁾。このことは CoQ が呼吸活性の高い組織に多いことと一致する。CoQ はコハク酸や NADH の添加により速やかに還元され、分子状酸素により酸化される。また、NADH での CoQ の還元はアミタール (複合体 I 阻害剤) により阻害される。還元された CoQ の酸化がアンチマイシン A (複合体 III 阻害剤) や青酸塩 (複合体 IV 阻害剤) で阻害されることなどから、複合体 I、複合体 II の両フラビン蛋白質とシトクロム系をつなぐ位置に存在することが明らかにされた^(11, 12)。CoQ はシトクロム c と共に複合体間をつなぐ可動性の電子伝達因子とみなされている (Fig. 3)。

CoQ の分布はミトコンドリアに限らずリソソーム⁽¹³⁾、ゴルジ体^(14, 15)、ミクロソーム⁽¹⁶⁾などの細胞内オルガネラや血漿中にも存在する。ミトコンドリアにおける CoQ の存在や

働きについては広く研究されてきているが、細部に渡っては現在も究明途上にある。CoQは、ミトコンドリア呼吸鎖における電子伝達系での電子授受体としてATPの産生を担うと共に、還元型は脂溶性抗酸化物質としての2つの重要な機能を有している。CoQはATP産生の因子の1つとしてミトコンドリア内膜中に存在している⁽⁶⁾。生物の生命維持には、エネルギー通貨であるATP（アデノシン三リン酸）が必要不可欠である。ATP産生のプロセスであるミトコンドリア電子伝達系は、食物などにより取り込まれたグルコース、脂肪酸、アミノ酸がアセチル CoA となり、クエン酸回路を経てNADHが複合体Iに、コハク酸が複合体IIに、それぞれ電子を伝達することから始まる。

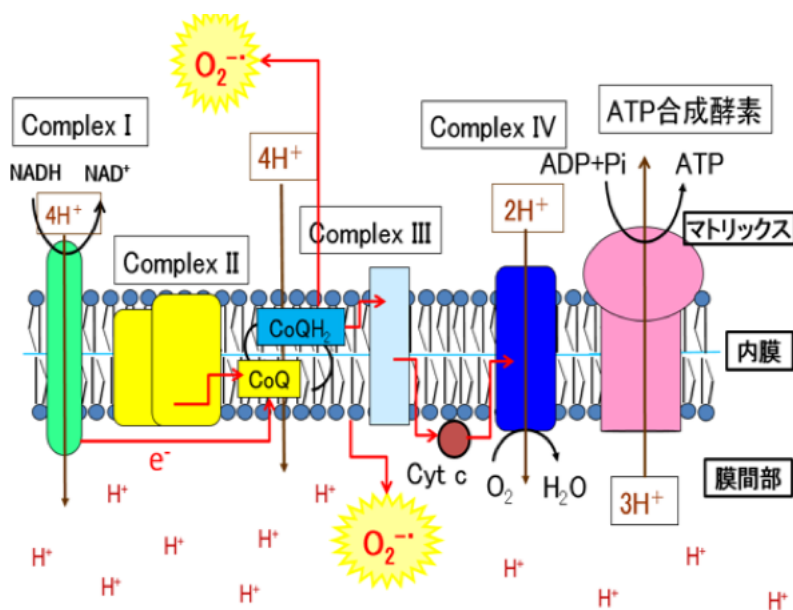


Fig. 3 ミトコンドリア電子伝達系

〈抗酸化作用〉

活性酸素・フリーラジカルは反応性に富み、生体組織の傷害を引き起こす。こうした傷害の蓄積が癌、心筋梗塞、脳卒中、糖尿病、またはシミ、シワやアトピー性皮膚炎を引き起こし、様々な疾患の原因となり老化を進めるとも言われている。フリーラジカルとは不対電子をもつ原子・分子であり、活性酸素種とは大気中の酸素よりも活性な状態にある酸素種のことを言う。これは生命が酸素を利用する過程で発生する。好気性生物は、ミトコンドリアの電子伝達系においてATPを産生してエネルギー源としているが、その際電子の逸脱によってスーパーオキシドが生成し、ペルオキシソームでは脂肪酸のβ酸化の過程において過酸化水素が発生する。細胞が活動する上で必須なエネルギー代謝を行うたびに細胞膜上、あるいはその近辺で活性酸素や脂質の酸化物、過酸化物が生じる。脂質がいったん酸化されて脂質ラジカルに変化すると連鎖的に酸化が進行する。細胞を作っている蛋白質が酸化されて変性すると細胞本来の機能に障害が起こり、ミトコンドリアのDNAなどが活性酸素による

攻撃を受けると間違った遺伝子情報が伝わりその器官や組織に悪影響を与えることになる。しかし活性酸素種は殺菌や解毒作用も有している。好中菌やマクロファージと呼ばれる免疫細胞は自らも活性酸素を作り出し非自己物質を消去する。生きていくために必要な酸素を利用する時発生する酸化ストレスに対する防衛機構を生命は備えているため、通常の状態では酸化ストレスによる傷害が顕在化することはない。しかし、過剰な活性酸素の発生、あるいは防御機構の低下により酸化傷害が顕著に現れることによって様々な疾病にかかる。過剰に発生した活性酸素に対して、それを除去する働きを持ったものを抗酸化物質と呼ぶ。抗酸化物質には体内で合成される酵素系のものや体外から取り入れるビタミン系のものがある。これらの抗酸化物質の中でも活性酸素を除去する働きの主たるものは酵素系の抗酸化物質であり、CoQ やビタミン E, C が存在する。補酵素は酵素の働きを助ける働きをし、酵素が複合蛋白質で熱に弱いのにに対し補酵素は酵素における非蛋白質部分で一般に熱に安定であり両者は結合した状態ではじめて触媒として働く。また、ビタミンは補酵素として酵素系を助けるだけでなく自身も活性酸素を攻撃する抗酸化物質として働く。CoQ はビタミン E と同程度の抗酸化能を持つことが明らかにされている⁽¹⁷⁾。

CoQH₂がフリーラジカルと反応し、脂質の酸化を抑制する抗酸化剤であることは 1966 年に Mellors と Tappel によって報告された⁽¹⁷⁾。これはエタノール中において α -トコフェロール(α -TC)と CoQH₂は同程度の Diphenyl-p-picrylhydrazyl (DPPH) 還元能を持つというものである。不均質系においてもアラキドン酸エマルジョンの酸化に伴う酸素吸収が CoQH₂添加により α -TC と同程度抑制されることを示した。また、Takeshige らによってミトコンドリア電子伝達系における CoQ の酸化還元状態と抗酸化作用との関係が示された。脂質過酸化反応は複合体 I 阻害剤のロテノシンにより促進され、複合体 III 阻害剤のアンチマイシン A により阻害される。また、ロテノン存在下においてもコハク酸存在下では脂質過酸化反応は抑制される。このことは複合体 III 阻害剤のアンチマイシン A、あるいはコハク酸存在下においては CoQ は抗酸化作用をもつ CoQH₂へと還元され、これが亜ミトコンドリア粒子に誘導した脂質過酸化反応を抑制していると考えられる。CoQ10 を抽出した亜ミトコンドリア粒子ではこの現象は起こらない。CoQ は還元型の CoQH₂のみが抗酸化作用を持つことが認められている。低比重リポ蛋白質(LDL)中では、CoQH₂が α -TC よりも効果的な抗酸化物質として働くという。また、CoQ10 投与は血漿 LDL 中の CoQH₂量を増加させるがこの LDL の脂質過酸化抵抗性は高い。外因的に投与された CoQ は生体内の還元酵素である NADPH によって還元され、より抗酸化活性の強い CoQH₂になりその効果を発揮している。近年では肝細胞中の新規酵素 NADPH-CoQ 還元酵素が CoQ10 を還元していると考えられおり、他にもリポアミド脱水素酵素やチオレドキシニン還元酵素も CoQ10 還元能を持つことが報告されている。CoQ の投与効果として、四塩化炭素、クロロホルム、D-ガラクトサミンによる肝細胞障害防御効果や、エンドトキシン投与による脂質過酸化物質抑制効果、さらに肝臓や心臓の虚血・再還流傷害時に起こる脂質過酸化反応抑制効果が報告されている。

1990年にKaganらはCoQH₂同族体間の抗酸化作用の強さを比較・検討し、側鎖が短いほど抗酸化能が上昇することが認められた⁽¹⁸⁾。これはCoQ同族体の膜中での存在位置と動きやすさによるものと推定されている。脂溶性の抗酸化物質であるCoQや α -TCは細胞の生体膜などに、水溶性の抗酸化物質であるビタミンCや尿酸は細胞の外側や細胞質に存在し、産生された活性酸素を消去するように働く。脂質膜中ではCoQH₂とビタミンEは共に脂質ペルオキシラジカルを直接消去する。さらにCoQH₂は、 α -TCが脂質ペルオキシラジカルを消去した結果生じた α -TCラジカルを消去も行い、 α -TCの再生に務めている。 α -TCの能力を最大限に発揮させるためにはCoQ10やビタミンCとの共存が不可欠である。

1-3-2 CoQの合成経路とその阻害薬4-Nitrobenzoate (4-NB)

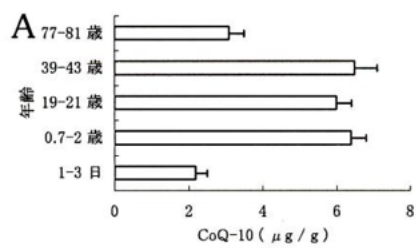
コエンザイムQは我々の体内で生合成されているが、加齢や、アルツハイマー型認知症やパーキンソン病等の様々な疾病によりその生体内濃度が減少することがすでに知られている。コエンザイムQ合成経路の研究は、分裂酵母(*S.pombe*)のCoQ破壊株が取得され、その欠損株を利用してマウスやヒトのCoQ合成酵素遺伝子が単離、解析されてきた。1990年に非発酵性炭素源で生育できない出芽酵母の生育を回復する遺伝子が多数報告され、その中からCOQ1-8の8個の遺伝子が同定された⁽¹⁹⁾。これらの遺伝子がヒトを含む高等動物や植物にも広く保存されており、実際に酵母や大腸菌の相同遺伝子の破壊株で高等生物のCoQ合成酵素遺伝子を発現し、その機能を相補することにより、機能性を有することの証明に利用されてきた。CoQの合成はポリプレニルピロリン酸合成酵素によって生物に固有の長さを持つイソプレノイド鎖が合成され、PHB(p-ヒドロキシ安息香酸):ポリプレニルピロリン酸転移酵素(Coq2)によってキノン骨格に転移された後、キノン骨格に水酸化、メチル化、脱炭酸化などの修飾が行われ、CoQが合成される。このCoQ合成経路の阻害剤の内、4-Nitrobenzoate(4-NB)という阻害剤がある。これは、PHBと似た化学構造の物質であり、Coq2の反応触媒を阻害することが2010年に発表され、確かにCoQの合成量が減少し、さらにPHBを同時に加えることで合成量が上昇することも確認されている⁽²⁰⁾。

1-3-3 加齢や病態におけるCoQレベルの変化

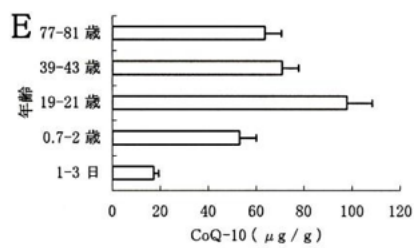
加齢は活性酸素による脂質過酸化物の蓄積によるところが大きい。しかしミトコンドリア電子伝達系やATP産生にCoQは必須であるにも拘らず、加齢と共に多くの細胞中CoQ10濃度は減少する。CoQ10は体内で心臓、腎臓、肝臓、筋肉、脾臓、甲状腺、脳などの組織に多く含まれるが20代を最大として加齢と共にCoQ量は減少し、特に心臓のCoQ量は80代で最大時の半分以下になる⁽²¹⁾(Fig. 4)。皮膚表皮のCoQ量も加齢によって大きく減少する。紫外線による活性酸素の産生も皮膚の老化の大きな引き金になる。しかしCoQが十分にあれば抗酸化作用によって肌の老化が守られ、表皮中の細胞の活性が高まりコラーゲンの新陳代謝が活性になると考えられる。CoQ10配合クリームの使用によって

6 ヶ月でしわの深さが 27%，面積が 26%減少したというドイツの化粧品会社の報告がある。しかし、これらの効果が生体内で CoQH₂に還元された後のものかは不明である。また、CoQ10 の経口摂取により初期パーキンソン病の進行制御作用も報告されている。これはパーキンソン病の原因がミトコンドリア機能に関する遺伝子異常によることと、パーキンソン病患者のミトコンドリア中の CoQ 濃度が正常値より低いことに着眼した患者投与実験により証明されたものである。パーキンソン病初期患者を対象にプラセボ、CoQ 300, 600, 1200 mg/day に 4 群に分けて経過を見たところ、CoQ 血中濃度は摂取量に応じて増加し、1200 mg/day では明らかに症状の進行が抑制された。この時、大量投与による副作用は見られなかった。

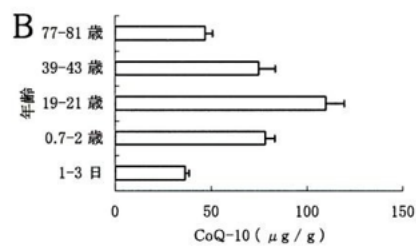
経口的に摂取された CoQ10 が生体で作用を発揮するには血液中の CoQ10 値の上昇が不可欠であり、血液中の CoQ10 は主に血漿リポタンパク質に存在しそのほとんどが還元型である CoQH₂の形で存在する。CoQ10H₂は空気中では不安定で容易により安定な酸化型 CoQ10 に変化する。健康なヒトの血漿中 CoQ10 の還元比率は一定に維持されており、CoQ10 の摂取により血漿 CoQ10 値が上昇しても CoQ10H₂の存在比率は変わらない。血漿中の CoQ10 値を上昇させれば生体内では CoQ10 値が上昇すると考えられている。ヒトをはじめとする哺乳類では、CoQ10 は体内での生合成に加え、健全な生活では食物からも摂取することができるため重篤な CoQ10 欠乏症は報告されていない。しかし、ある種の疾患や体内環境の変化によっては血漿中の総 CoQ10 値やその比率に差が生じる。例えば食物由来の CoQ10 が供給できないような完全静脈栄養施行者や、コレステロール生合成の律速酵素である HMGCoA 還元酵素の阻害剤服用時では血漿の総 CoQ10 値は健常者よりも低値を示す。さらに、インシュリン非依存性の糖尿病、肝硬変、フェニルケトン尿症、 β -タラセミア、パーキンソン症候群、A 群色素性乾皮症の患者も血漿総 CoQ10 値の低下を示す。一方、魚や海洋性哺乳類を主食とする特徴的な食生活を送るエスキモーは日本人などの健常者群よりも高い血漿値を示す。高コレステロール血症では健常者より高く、血漿中 CoQ10 値とコレステロール値とは正の相関を示す。これらは生体内の CoQ10 が、生合成由来の内因性と食事由来の外因性 CoQ10 の両者により充足されていることを示唆する。成人性呼吸窮迫症候群の患者では血漿 CoQH₂含量が健常人と比較して有意に低く、アルツハイマー病患者の脳内は、あらゆる部分で健常人より CoQ10 含量が高いという。生体内の総 CoQ10 値と CoQ10H₂値の比は酸化ストレス評価の指標として利用されている。肝炎、肝硬変、肝癌患者、仮死状態で生まれてきた新生児は、血漿中の総 CoQ10 値に対する CoQ10 値の比が上昇する。酸化ストレスが関与する可能性の高い疾患では酸素ラジカルを補足するために CoQ10H₂が消費され、血漿中に占める CoQ 値が低下したと考えられている。このように、各種疾患と CoQ10 含量との関係が次第に明らかになりつつある。



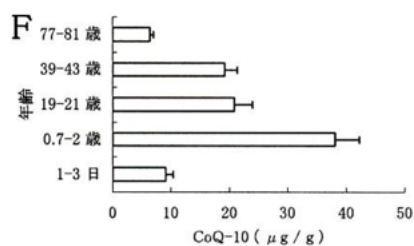
肺



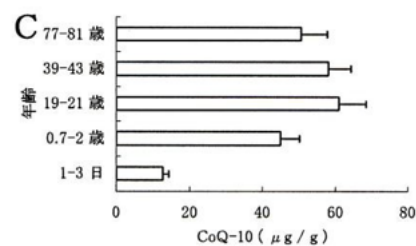
腎臓



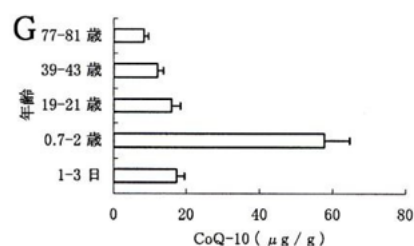
心臓



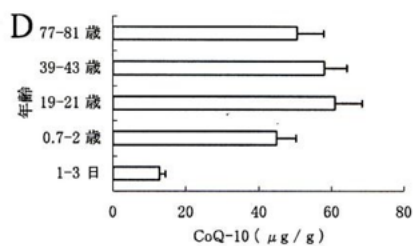
脾臓



脾臓



副腎



肝臓

Fig. 4 加齢に伴う CoQ10 量の変化⁽²¹⁾

1-3-4 CoQ 欠損症

既述したように生命維持にコエンザイム Q は必要不可欠な物質である。しかしながら、加齢や様々な疾病で後天的に減少していくが、CoQ 生合成酵素の遺伝子変異によって CoQ10 を十分に合成できずに CoQ 欠乏症のような症状が現れたり重篤な病気を引き起こすことが近年の研究により明らかにされている。1989 年に Ogasahara らが世界で初めて CoQ 欠損症を報告したが当時は原因遺伝子の特定にまでは至らなかった⁽²²⁾。CoQ 生合成遺伝子の変異が病気とかかわる例として最初に発見されたのは 2006 年の Lopez らによる *PDSS2* 変異の発見である⁽²³⁾。この発見以来、7 種の CoQ 生合成酵素遺伝子変異による症例が報告されており、神経疾患や、運動障害など様々な報告例がある。2013 年には、神経疾患の一種である多系統萎縮症の原因として *COQ2* 遺伝子の変異が関与していることが報告された⁽²⁴⁾この症例では、リンパ球レベルの CoQ10 では大きな低下が見られないが、脳では顕著に低下していることが報告されている。

CoQ 欠損症の中で共通にみられる症状としては、脳筋症、小脳性運動失調症、ステロイド耐性ネフローゼ症候群などがある。脳筋症とは、ミトコンドリア病の一種で CoQ10 の合成量が低いことで脳や筋肉に十分なエネルギーを供給できずに起こる運動異常や脳卒中などの症状を指す。小脳性運動失調症は、言葉のもつれ、めまい、歩行時のふらつきなどの症状である。ネフローゼ症候群とは、多量のタンパク質が尿中に排泄される結果、低タンパク血症とむくみが見られる腎臓病である。*PDSS2* 遺伝子変異患者の症例では、リー症候群を発症した患者がいる。歩行反応がなく、脳の萎縮が認められ、乳児期に発症するミトコンドリア病の 1 種である。5 か月の小児の事例で、筋肉反射が低下し、脳幹部に左右対称性の壊死性病変が認められた。この患者に対し、1 日 50 mg の CoQ10 を投与したところ残念ながら効果は認められず、8 か月で死亡したが、1 日 300 mg 投与した患者では、顕著に症状が回復したという報告例がある。このように、CoQ 欠損症患者に CoQ10 を投与した場合、効果が認められる場合とそうでない場合が両方報告されている⁽²⁵⁾。適切な時期に、必要量をはっきりとしていなかったことがうまく効果が出なかった結果ではないかと考えられている。

1-4 プロサポシン(Psap)

Psap は神経保護作用,あるいは神経再生を促す機能蛋白質であることが示唆され, Psap の重要性はまだ明らかでない部分も多くあるが, 神経系の発達に重要な機能を果たしていることが示唆されている⁽²⁶⁾.

ヒト Psap の存在は, Wenger らにより, 培養ヒト繊維芽細胞の Saposin B と C の生合成における実験から推定された⁽²⁷⁾.

Psap は SaposinA, SaposinB, SaposinC, SaposinD の前駆体蛋白質である. ヒト Psap は, 細胞内では主に 68 kDa, 細胞外では 73 kDa の 2 つの形態で存在し, 524 個のアミノ酸残基からなる. Psap の構造を以下に示す. Psap 上に SaposinA, SaposinB, SaposinC, SaposinD の 4 つの成熟 Saposin ドメインを持つ. Psap では mRNA の情報に基づきリボソームで合成される. 次に小胞体, ゴルジ体間で糖鎖付加を受け, 68 kDa と 73 kDa の Psap が合成される. 68 kDa の Psap はリソソームに送られた後, タンパク質のプロセッシングを受け, SaposinA, B, C, D の 4 つの Saposin 同位体が産生される. 動物組織には成熟体 Saposin の前駆体サポシンの前駆体として, 体液中の分泌蛋白質, 細胞膜の構成成分として 3 つの Psap プールが存在する. Psap は, 脳と精巣で濃度が最も高く, 次いで腎臓, 脾臓, そして肝臓と高い. 上記の組織に加えて骨格筋, 心臓, そして血小板にも Psap が存在していることが明らかにされている⁽²⁸⁾.

当研究室では以前に, ヒト細胞において CoQ10 が少なくともある程度は Saposin B およびその前駆体である Psap と結合することを報告した.⁽²⁹⁾ Psap は非常に保存された多機能糖タンパク質で, Saposin A, B, C および D として知られる 4 つの小さなスフィンゴ脂質活性化タンパク質のリソソーム前駆体である. これら 4 つのサポシンは相同性があり, 6 つの保存されたシステインと 1 つの共通のグリコシル化部位を持つ.⁽³⁰⁾ 成熟 Saposin は, 様々なスフィンゴ脂質やセラミドの代謝に関与するいくつかのリソソーム加水分解酵素を活性化する. HepG2 細胞や Caco-2 細胞で Psap を欠損させると CoQ10 の細胞内濃度が低下することが報告されている^(31,32).

Psap とその由来タンパク質であるサポシン A-D はスフィンゴ脂質の代謝に関与している.⁽³³⁾ Psap はスフィンゴ糖脂質レベルを正常に保つために重要である^(30,34). スフィンゴ糖脂質は細胞間シグナル⁽³⁵⁾, 接着⁽³⁶⁾, 増殖⁽³⁷⁾, 分化に関与する⁽³⁸⁾. 従ってスフィンゴ糖脂質レベルを正常に保つことが重要であると考えられる.

1-5 ミトコンドリア

ミトコンドリアは、真核細胞中に存在する細胞小器官の1つである。

ミトコンドリアは外膜と内膜の二重膜構造となっており、膜上には様々なタンパク質を有している。ミトコンドリアは多くの重要な細胞代謝に関与しており、その中でも電子伝達系でのエネルギー産生が最も重要である。

1-5-1 ミトコンドリア電子伝達系と酸化的リン酸化による ATP 産生

解糖系やクエン酸回路で生じた NADH や FADH₂の水素はミトコンドリアで最終的に酸素と結合して H₂O になる。この時生じる莫大なエネルギーを利用して ATP を生成するのが電子伝達系と酸化的リン酸化である。電子伝達系は呼吸鎖とも呼ばれており、ミトコンドリアの内膜に存在している。電子伝達系は電子 (e⁻) に対する親和性を上昇させる手段としてミトコンドリア内膜に並んだ一連の電子キャリアであり、還元型補酵素(NADH,FADH₂)からの電子を移動させる。この過程で、自由エネルギーが放出され、エネルギーは酸化的リン酸化という過程により ATP 生成に使われる。

電子伝達系は以下の成分で構成されている。

- 1) いくつかのタンパク質と補欠分子族からなる 4 つの複合体 I-IV
- 2) ミトコンドリア内膜を自由に移動できる CoQ
- 3) 内膜外側でリン脂質のカルジオリピンに緩く結合しているが、自由に動けるシトクロム c (Cyt c)。

複合体タンパク質は貫通型の膜タンパク質であり、通常は、膜の決まった位置に存在していると言われている。還元型補酵素 (NADH, FADH₂) から放出される電子はエネルギーを持っており、内膜上の電子伝達系を移動する間に自由エネルギーを放出する。電子伝達系のキャリアは酸化還元電位が増加する順に並んでおり、電子は酸化還元電位が低いところから高いところに流れ、エネルギーを消失する。電子伝達系には 3 カ所の大きな自由エネルギーの放出部位が存在する (複合体 I, III, IV)。放出されたエネルギーを利用してプロトン (水素イオン: H⁺) がミトコンドリアマトリックスから膜間腔 (ミトコンドリアの内膜と外膜の間) に汲み出される (すなわち、電子伝達系は電子キャリアとプロトンポンプの 2 つの役割を担っている)。膜間腔はプロトンが貯まってくることプラス (+) に帯電し、反対にマトリックスはマイナス (-) に帯電するので電位差が生じる。また、膜間腔の pH は酸性に傾き、マトリックスの pH はアルカリ性に傾く。これをプロトン濃度勾配と呼び、電位差やプロトン濃度勾配という電気化学的な不均衡が内膜をはさんで生じることで、ある種の緊張状態が生まれる (プロトン駆動力)。この緊張状態を均一状態にするために、プロトンが内膜に存在する ATP 合成酵素 (ATP シンターゼ: 複合体 V と呼ばれることもある) のチャネル部分を通して、膜間腔からマトリックスに流出する。ATP 合成酵素は酵素の中をプロトンが通る勢いを利用してアデノシン二リン酸 (ADP) とリン酸から ATP を合成する。電子伝達系の酸化 (還元) 反応によって生じたエネルギーを利用して、

ADP とリン酸から ATP が合成されるので、この過程を酸化リン酸化という。すなわち、電子伝達に共役した ATP 生成である。この仕組みは、よくダムに貯められた水の水圧の勾配を利用して発電機を回し電気を作る水力発電に例えられる。

では、どれ位の ATP が産生されるのであろうか。電子伝達系で酸素原子 1 個 ($1/2 \text{O}_2$) を還元するには 2 個の電子 (電子 1 対) が必要で、大きな自由エネルギー放出部位である複合体 I, III, IV を通過する電子 1 対ごとに、複合体 I では 4 個、複合体 III では 4 個、複合体 IV では 2 個のプロトンが膜間腔へ輸送される。すなわち、NADH からは、これらの複合体を伝って電子 1 対が酸素に渡る間に全部で 10 個のプロトンが内膜を横断する。FADH₂ からは、複合体 I を通らないので全部で 6 個のプロトンが内膜を横断する。ATP 合成酵素が 1 分子の ATP を生成する反応には約 3 個のプロトンが膜間腔からマトリックスへの流入が必要で、さらに、内膜を横切ってリン酸、ADP、ATP を輸送するためにもう 1 個のプロトンの流入が必要である。従って、1 分子の NADH からは 2.5 分子 ($10/4 = 2.5$) の ATP が生成され、1 分子の FADH₂ からは 1.5 分子 ($6/4 = 1.5$) の ATP が生成される。最も重要な燃料分子であるグルコース 1 分子が好気呼吸で完全酸化された場合に得られる ATP は 30 または 32 分子である。そのうち酸化リン酸化で得られる ATP は 26 または 28 分子と好気呼吸で得られる総エネルギーの約 87% を占めており、このシステムが生命活動にとっていかに大切かが分かる。ちなみに嫌気呼吸で得られる ATP はグルコース 1 分子当たり 2 分子であり、好気呼吸は嫌気呼吸の実に 15~16 倍の ATP を産生できる。CoQ はタンパク質に結合していない電子キャリアで、脂質であるためミトコンドリア内膜の疎水性内部に溶け込んで自由に動き回ることができ、2 個の電子と 2 個のプロトンの受け渡しを行う。具体的には、複合体 I により NADH から、複合体 II により FADH₂ からそれぞれ 2 個の電子を受け取る。2 個の電子と 2 個のプロトンを受け取り還元型になった還元型 CoQ (CoQH₂) は複合体 III に電子を渡し、酸化型の CoQ に戻る。すなわち、CoQ はミトコンドリア内膜内において複合体 I あるいは複合体 II と複合体 III の間を行き来する (自由拡散モデル) として一般的に認められているが、後述する呼吸鎖超複合体という概念もある。複合体 III では 4 個のプロトンがマトリックスから膜間腔へ汲み出されるが、この汲み出しは Q サイクルというメカニズムで行われ、CoQ が重要な役割を果たしている。電子伝達系のもう一つの可動性構成成分である Cyt c はヘム鉄タンパク質であり、補欠分子としてヘムを持ち、1 個の電子の受け渡しをする。Cyt c は CoQH₂ から複合体 III が受け取った 2 個の電子を 1 個ずつ 2 回に分けて渡され、その電子を 1 個ずつ複合体 IV に渡し、酸素原子 ($1/2 \text{O}_2$) を H₂O に還元する。しかし、実際には酸素は酸素分子 (O_2) として存在しているため、 O_2 を完全に還元して 2H₂O にするためには電子伝達系に入る初めの NADH あるいは FADH₂ が 2 分子必要となる。

1-5-2 電子伝達系複合体

複合体 I (Complex I) ⁽³⁹⁾

複合体 I (NADH-CoQ オキシドレダクターゼまたは NADH デヒドロゲナーゼ複合体) は L 字型をした電子伝達系の中では一番大きく、また極めて複雑な酵素であり、NADH から CoQ への 2 電子伝達を触媒する。まず NADH がフラビンモノヌクレオチド (FMN) を FMNH₂ に還元する。FMNH₂ は 2 個の電子を一つずつ次の酸化剤である鉄—硫黄 (Fe-S) クラスターに渡し、最終的に電子は CoQ に渡される。従って、FMN は NADH が関与するデヒドロゲナーゼの 2 電子転移反応を、これ以降の電子伝達系の 1 電子転移反応に切り替える変換器の役割を果たす。電子の輸送は、ミトコンドリアのマトリックスから内膜を貫通して膜間腔へと移動するプロトンの動きと連動している。最終的に 4 個のプロトンが膜間腔に移動する。プロトンが内膜を通過する機構はまだ正確には明らかにされていないが、原核細胞の複合体 I の構造解析によると、電子伝達に連動して内膜内に存在する複合体 I の疎水性ドメインの構造変化が起こり、同部をプロトンが通過できるようになることが推察されている。

複合体 II (Complex II) ⁽³⁹⁾

複合体 II (コハク酸-CoQ オキシドレダクターゼまたはコハク酸デヒドロゲナーゼ複合体) は、クエン酸回路の酵素であるコハク酸デヒドロゲナーゼと Fe-S タンパク質からできている。全体の形はキノコに似ており、コハク酸をフマル酸に酸化する過程で、2 個の電子と 2 個のプロトンが FAD に渡され、FADH₂ になる。FADH₂ は Fe-S 中心を介して電子を CoQ に伝える。複合体 II が触媒する反応で解放される自由エネルギーは小さいため内膜を介してプロトンを汲みだすことができず、この複合体はミトコンドリア内膜を介したプロトン濃度勾配の形成に直接は貢献しない。複合体 II だけでなくその他のミトコンドリアのフラビントタンパク質も CoQ に電子を伝える。フラビントタンパク質であるグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼは内膜の膜間腔側に存在し、電子を直接 CoQ に伝達する。

グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼは、細胞質の NADH から電子伝達系への還元等量のシャトリングに重要な役割を果たす (グリセロール-リン酸シャトルで、細胞質の NADH の還元等量はミトコンドリアでは FADH₂ のそれに変えられる。このシャトルを利用した場合、好気呼吸ではグルコース 1 分子から 30 分子の ATP が生成する。細胞質の NADH をミトコンドリアでも NADH として移動させるリンゴ酸—アスパラギン酸シャトルを利用した場合はグルコース 1 分子から 32 分子の ATP が産生される)。同じくフラビントタンパク質であるアシル-CoA デヒドロゲナーゼは脂肪酸の β 酸化の第一段階を触媒し、脂肪酸アシル-CoA から FAD へ電子を伝達する。それから、Electron Transferring Flavoprotein (ETF)、ETF-CoQ オキシドレダクターゼを経て CoQ に電子は渡される。

複合体 III (Complex III) ⁽³⁹⁾

複合体 III (CoQH₂-Cyt c オキシドレダクターゼまたはシトクロム bc₁ 複合体) は、CoQH₂ から Cyt c へ電子を伝える。複合体 III は 2 つの b 型シトクロム (Cyt b_L, Cyt b_H)、1 つの Cyt c₁ および 1 つの Fe-S 中心を含むことからシトクロム bc₁ 複合体と呼ばれる。CoQ は上述したように、内膜内において複合体 I あるいは複合体 II と複合体 III の間を行き来する。複合体 III では、Q サイクルにより、2 分子の CoQH₂ が酸化され、1 分子の CoQH₂ が生じる。この間に膜の外側に出ている複合体 III の先端部に結合する Cyt c の 2 分子が還元され、4 分子のプロトンが膜間腔に放出される。従って、複合体 III は電子伝達系のハブとして働き、複合体 I と複合体 II から複合体 IV への電子の橋渡しをする。

複合体 IV (Complex IV) ⁽³⁹⁾

複合体 IV (シトクロム c オキシダーゼ) は複合体 III を介して CoQH₂ から Cyt c へ渡された電子を電子の最終受容体である酸素に渡す。O₂ は 4 電子還元されて H₂O になる。前述したように CoQH₂ の 1 分子から Cyt c へは 2 個の電子が伝えられるので (Cyt c は 1 電子伝達体なので 2 分子必要)、O₂ を 2H₂O にするためには CoQH₂ の 2 分子から 4 個の電子が Cyt c に伝達されなければならない。Cyt c の電子を O₂ に渡す複合体 IV は膜貫通型のタンパク質複合体で、Cyt a、a₃ のヘム鉄原子に加えて、さらに 2 つの銅原子を含む。1 つ目の銅原子 Cu_A は Cyt a の鉄原子から少しだけ離れて存在している。Cyt a₃ の鉄原子は Cu_B と呼ばれるもう一つの銅原子と密接に結合しており、これらが O₂ を還元する活性部位である。1 分子の NADH から 2 個の電子が酸素に伝わり、さらにもう 1 分子の NADH から 2 個の電子が伝わり、O₂ は 2H₂O になる。マトリックスから取り込まれる 4 個のプロトンはシトクロム c オキシダーゼによって O₂ が H₂O に完全に還元されるときに消費される。このプロトンを substrate protons と呼ぶ。一方、別の 4 個のプロトンは内膜を通過して移動する。このプロトンを pumped protons と呼ぶ。上述したように NADH あるいは FADH₂ の 2 分子を消費して 4 個のプロトンが膜間腔に移動する。すなわち 1 分子当たりでは 2 個のプロトンしか移動しないことに注意しなければならない。

1-5-3 ミトコンドリア呼吸鎖超複合体

前項では教科書に記載されているレベルの知識を概説したが、電子伝達系の自由拡散モデル以外に、呼吸鎖超複合体 (Supercomplex あるいはレスピラソーム) という概念が提唱されている。これはミトコンドリア内膜複合体が従来は独立して存在し機能しているとされていたのに対して、いくつかの複合体が内膜内で互いに結合して超複合体という集合体を作り機能するというものである。呼吸鎖超複合体に含まれる複合体はプロトンポンプ機能を持つ3つの複合体 (I, III, IV) であり、現在の研究結果では複合体IIが含まれる可能性は極めて低い⁽⁴⁰⁾。NADH から酸素への電子伝達に必要な還元酵素を全て含む呼吸鎖超複合体 (複合体 I と IVは単量体で複合体 III は 2 量体: $I_1 + III_2 + IV_1$) がウシの心筋ミトコンドリアから分離されている⁽⁴¹⁾。他には酵母のミトコンドリアから呼吸鎖超複合体 ($III_2 + IV_1$, $III_2 + IV_2$)⁽⁴²⁾が、また植物のミトコンドリアから $I_1 + III_2$ の呼吸鎖超複合体が分離されている⁽⁴³⁾。これらの呼吸鎖超複合体構造が電子伝達にとって有利に働くのか、あるいは機能的な役割ではなく単に複合体の構造的安定性のために必要なものなのかが問題になっている。呼吸鎖超複合体を形成することによって基質チャネリング (substrate channelling) という機能が獲得される可能性が示唆されている⁽⁴⁰⁾。基質チャネリングは連続する反応を触媒する 2 酵素の活性部位間を反応中間体が直接移動するもので、電子伝達系においては、連結した 2 つの複合体間を電子が直接的に移動することを意味し、より効果的に電子伝達が行われるものと考えられる。従って、CoQ や Cyt c などの電子伝達系の可動性構成要素は、2 つの連結する複合体 (CoQ の場合は複合体 I と複合体 III, Cyt c の場合は複合体 III と複合体 IV) の接合部分に埋め込まれていると考えられている。ウシの心筋ミトコンドリアから単離、精製した超複合体 ($I_1 + III_2 + IV_1$) にはリン脂質が結合しており、特にカルジオリピンが多く存在すること、また Cyt c が結合していること、そして少なくとも $CoQH_2$ が 1 分子存在することが報告されている⁽⁴¹⁾。ミトコンドリア内膜のカルジオリピン量が減少すると呼吸鎖超複合体の形成、安定性や機能に大きな影響が出ることも示唆されている⁽⁴⁴⁾。呼吸鎖超複合体で複合体 I と結合した複合体 III は専ら NADH の酸化を行い、遊離の CoQ (いわゆる CoQ プールに存在し自由に動き回れる) を介して複合体 II からの電子を受け取ることが想定されている⁽⁴⁰⁾。呼吸鎖超複合体 ($I + III + IV$, $I + III$) は複合体 I による活性酸素 (ROS) の過剰産生を抑制する役割を果たしていることが示されている⁽⁴⁰⁾⁽⁴⁴⁾。呼吸鎖超複合体は複合体 I の安定性に必要で、それにより ROS 産生が抑制される。

SCAF1 (Super Complex Assembly Factor 1) というタンパク質が複合体 III と複合体 IV の安定した相互作用に必要であることが報告されている⁽⁴⁵⁾。また、飢餓状態によりエネルギー燃料分子がグルコースから脂肪酸に変わった場合、複合体 I を含む呼吸鎖超複合体のレベルが減少することが示されている⁽⁴⁵⁾。これは、脂肪酸の酸化で生じる $FADH_2$ からの電子を受け取りやすくするために遊離の複合体 III を多くする生体反応と考えられ、利用できる燃料分子の変化に適応するためにミトコンドリア呼吸鎖超複合体が変化することが明らかにされた。

1-6 本研究の目的・意義

ミトコンドリア電子伝達系タンパク質群は、呼吸鎖超複合体を形成しており、内部に CoQ10 やシトクロム C が含まれている。つまり、呼吸鎖超複合体に含まれる CoQ10 が電子伝達を担う CoQ10 であると考えられる。

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、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の 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、これらのデータもミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の 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、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。Psap 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 量低下状態がプロサポシン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、まずミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量の測定手法を確立した。次に細胞内 CoQ10 量変動時の呼吸鎖超複体内の 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。

第2章 ミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量定量手法の確立

2-1 概要

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、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体中に 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、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の 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、これらのデータもミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量の変動については不明である。本章では、まずミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量の測定手法を確立した。次に細胞内 CoQ10 量変動時の呼吸鎖超複体内の CoQ10 量がどのように変動するのかを解析した。

2-2 序論

Schägger らが開発したブルーネイティブ電気泳動法は、およそ 2000kDa の呼吸鎖超複合体の分離、可視化、同定を可能にした⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾。当初は界面活性剤による可溶化産物であるという批判的な議論がされてきたが、その後の研究により、哺乳類の呼吸鎖複合体には 1 単位の複合体 I, 2 単位の複合体 III, 1 単位の複合体 IV が含まれていることが示され⁽⁴⁹⁾、Rieger らは CoxVIIIa を用いた GFP による画像化に成功した⁽⁵⁰⁾。呼吸鎖超複合体発見後、その機能的役割や、意義が証明されている。機能的な利点として基質チャネリング^(51,52)や ROS 生成の予防や呼吸活性の安定性^{(53) (54)}などが証明されている。電子伝達系の補因子である CoQ10 やシトクロム C も呼吸鎖超複合体に含まれていることが報告されている⁽⁵⁵⁾。

CoQ10 はミトコンドリアの電子伝達鎖の重要な構成要素であり⁽¹⁾、その還元体であるユビキノールは最も重要な脂溶性抗酸化物質の一つである⁽⁵⁶⁾。加齢や様々な疾病で生体内濃度が減少する^(21,57)。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、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の 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⁽⁵⁸⁾。しかしながら、これらのデータもミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量の変動については不明である。

そこで本研究では、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量測定手法の確立を行い、人為的に細胞内 CoQ10 量に変動した際の呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量を解析した。

2-3 試薬・実験手法

2-3-1 HepG2 細胞の培養

HepG2 細胞は, 10 %ウシ胎児血清 (HyClone, Thermo Scientific, MA, USA) , 100 units/ml penicillin, 100 μ g/mL streptomycin を添加した Dulbecco's MEM (Sigma, St. Louis, MO, USA)で 37°C , 5 %CO₂ と 95 %空気の加湿環境下で培養した.

2-3-2 4-NB 投与実験

4-NB (Wako, Japan) は DMSO に溶解して使用した. 1, 3, 5 mM の 4-NB で処理し, 72 時間投与した. 細胞を回収して CoQ10 量の定量もしくは, ミトコンドリアの単離を行った. 単離したミトコンドリア中の CoQ10 量も定量した. 対照細胞は, 対応する濃度の DMSO とともに培養した. 4-NB 処理細胞と対照細胞は, 同じ処理時間で培養した. これらの期間において, DMSO 処理した対照細胞では, 肥大などの形態的な変化が見られなかったことに留意されたい.

2-3-3 CoQ10 投与実験

水溶性 CoQ10 を培養液中に溶解して投与した. 1, 10 μ M の CoQ10 で処理し 72 時間投与した. 細胞中もしくは, ミトコンドリア中の CoQ10 量の定量を行った. さらに界面活性剤で可溶化したミトコンドリアサンプルをブルーネイティブ電気泳動し, 分画したゲル中の CoQ10 量も定量した.

2-3-4 HepG2 細胞からミトコンドリア単離

ミトコンドリアの単離は Wallace の方法によって行った⁽⁵⁹⁾. 簡単に言えば, 細胞を単離バッファー (210 mM マンニトール, 70 mM スクロース, 0.1 mM EDTA, 0.5%BSA (脂肪酸フリー), 5 mM HEPES, pH 7.2) 中に回収した. 次に, この懸濁液をガラスホモジナイザーで破碎し, 1,000×g で 10 分間遠心分離した. 上清を回収し, 8,500×g, 4°C で 15 分間遠心分離し, ペレットをミトコンドリア画分とした.

また, Rebeca の方法によってミトコンドリア膜可溶化物を得た⁽⁵⁵⁾. すなわち, HepG2 細胞から得たミトコンドリアペレットを適量の PBS に懸濁し, 界面活性剤を加えて膜タンパク質を可溶化し, 氷上で 5 分間インキュベートした. 20,000×g で 30 分間遠心分離後, 上清を回収し, 1M 6-アミオヘキサン酸中の 5% Serva Blue G 色素を等量加えた. ミトコンドリアの可溶化には以下の界面活性剤を用いた: 14g/g protein Dodecilmaltoside (DDM), 6 g/g protein ジギトニン (DIG) .

2-3-5 BN-PAGE

ブルーネイティブ電気泳動は既報⁽⁴⁶⁾に従い、若干の修正を加えて行なった。簡単に言えば、界面活性剤で可溶化したミトコンドリアサンプルを2~15%グラジエントゲルに30 μ g アプライし、電気泳動して呼吸鎖超複合体を分離した。電気泳動後、ゲルの半分を複合体の検出に使用した。もう一方は、ゲルを3mm 毎もしくは、well を除いた3mm~27mm と27~60mm に分画してヘキサソ抽出を行なった。

2-3-6 ウェスタンブロットティング

ウェスタンブロットティング解析は、既報⁽⁴⁶⁾に従い、若干の修正を加えて行なった。簡単に言えば、ミトコンドリアサンプルをブルーネイティブ電気泳動したゲルを変性緩衝液(192 mM Glycine, 25 mM Tris-HCl, 5 mM メルカプトエタノール, 4%(w/v) SDS)に30分間浸した後、転写緩衝液(192 mM Glycine, 25 mM Tris-HCl, 15%(v/v)メタノール)に5分間浸してゲルを平衡化した。平衡化後、タンパク質をPVDF膜に転写した。PVDF膜はマウス抗各複合体 IgG と共に室温で1時間インキュベートした。タンパク質は西洋わさびペルオキシダーゼ標識二次抗体 (Bio-Rad Japan, Tokyo, Japan) を用いて室温で1時間検出した。EzWestBlue (#AE-1490; ATTO, Tokyo, Japan) を用いてタンパク質バンドを室温で5分間可視化し、GNU Image Manipulation Program 2.8 によって画像化した。

2-3-7 ゲル内酵素活性染色法

各複合体の検出は既報⁽⁴⁶⁾に従って行なった。複合体検出溶液(複合体 I : 0.1 mg/mL NADH, 2.5 mg/mL Nitro blue tetrazolium, 5 mM Tris-HCl, 複合体 III : 2.0 mg/mL 3,3'-Diaminobenzidine, 50 mM リン酸緩衝液, 複合体 IV : 5 mM シトクロム C, 2.0 mg/mL 3,3'-Diaminobenzidine, 50 mM リン酸緩衝液)にゲルを浸して一晩発色させた。

2-3-8 ヘキサソ抽出

3mm もしくは、上下に分画されたゲルを PBS : Methanol : Hexane=1 : 5 : 10(v/v/v)溶液内でビーズクラッシュ(3200 r/min)した。ゲル粉碎後、遠心分離(4 °C, 3000 \times g, 5 min)によりヘキサソ層を分離して回収した。回収したヘキサソを窒素ガスで揮発させ、100 μ L のイソプロピルアルコール(IPA)を懸濁し CoQ10 分析サンプルとした。

2-3-9 CoQ10 および遊離コレステロールの分析

CoQ10 と遊離コレステロール(FC)の細胞内濃度は、若干の修正を加えて HPLC で測定した。^(60, 61) 2本の分離カラム (Ascentis® C8, 5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm i.d. and Supelcosil™ LC-18, 3 μ m, 5 cm \times 4.6 mm i.d.; Supelco Japan, Tokyo, Japan) と還元カラム (RC-10, 15 mm \times 4 mm i.d.; IRICA, Kyoto, Japan) を使用した。移動相は 50 mM NaClO₄ in methanol/IPA (85/15, v/v)とし、0.8 mL/min の流速で供給した。カラムは 25 °C に保たれた。

2-4 結果

2-4-1 BN-PAGE による呼吸鎖超複合体の分離と CoQ10 抽出手法

HepG2 細胞から抽出したミトコンドリアサンプルは、界面活性剤により可溶化した。可溶化したミトコンドリアサンプルは、Fig. 5A に示すように BN-PAGE によりミトコンドリア呼吸鎖超複合体を分離した。分離後、ゲルを半分に取り出し一方はミトコンドリア呼吸鎖超複合体の検出に用いた。もう一方は、ゲルを 3 mm 毎に取り出しヘキサンにより CoQ10 を抽出した。抽出した CoQ10 は HPLC-ECD を用いて解析した。まず、ゲルの半分を使用してミトコンドリア呼吸鎖複合体 I, III, IV を In-gel assay を用いて検出した(Fig. 5B)。複合体 I と IV を電気泳動度 1.0 cm に検出した。この結果から、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体が電気泳動度 1.0 cm 付近に検出されることが示唆された。また、ゲルの下部の発色は、複合体 I の活性を阻害するロテノン共存下でも発色することから、複合体 I 以外のタンパク質によるものであることが報告されている⁽⁵⁵⁾。呼吸鎖超複合体の確認を行うために、ウェスタンブロットによる解析も行った(Fig. 5C)。解析の結果より、複合体 I, III, IV が電気泳動度 1.0 cm 付近に検出されることがわかった。したがって、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体が電気泳動度 1.0 cm 付近に検出されることが示唆された。

Fig. 5D には、ゲル分画中の CoQ10 量を測定する手法のフローを示した。具体的には、3 mm 毎に分画したゲルからヘキサンを用いて CoQ10 を抽出し、HPLC-ECD にて測定を行った。もう一方のゲルを 3 mm のスライスに取り出し、各スライスに含まれる CoQ10 をヘキサンで抽出した。得られた試料を HPLC-ECD システムで測定し、Fig. 5D に特徴的なクロマトグラムを示したが、これは上から 12-15 mm のゲル画分のヘキサン抽出物を HPLC-ECD で分析した結果である。

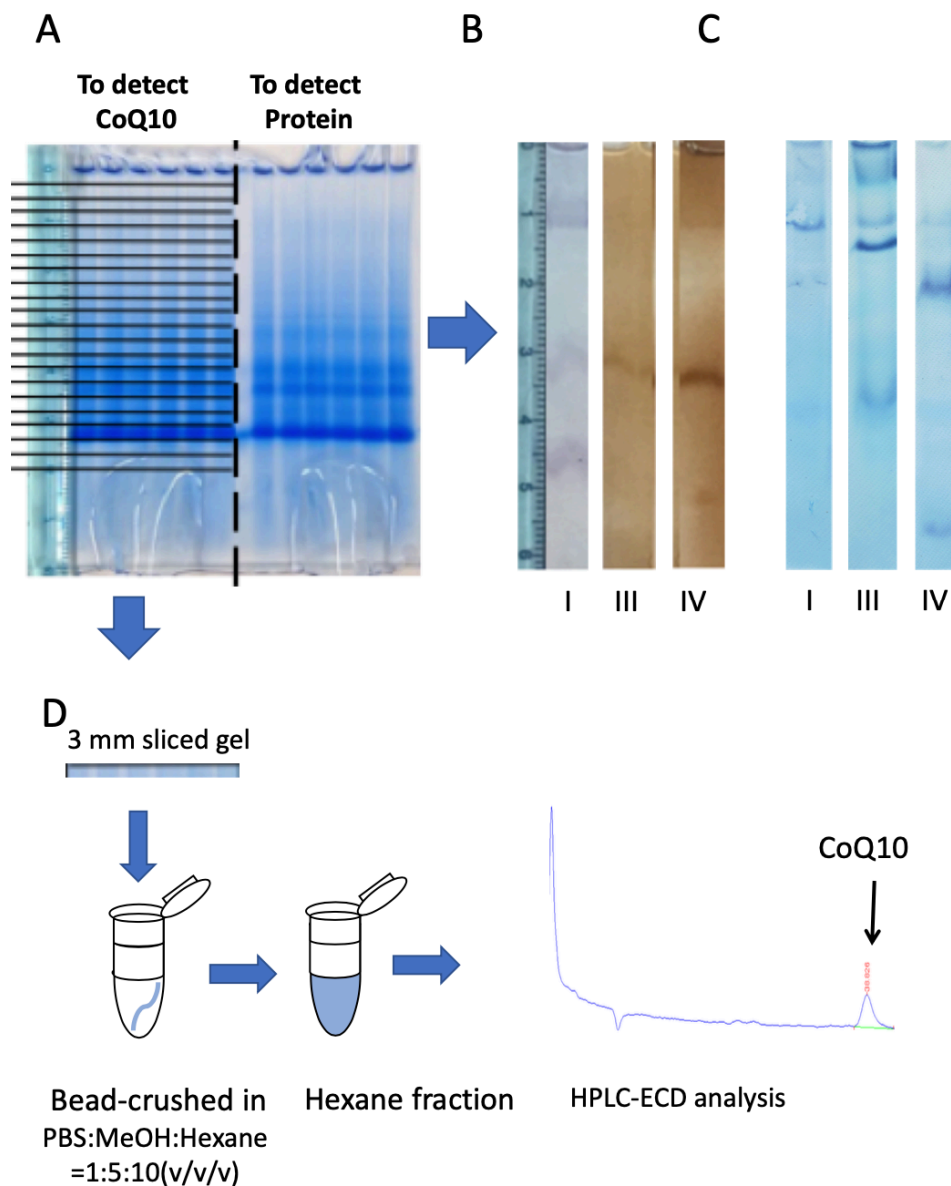


Fig. 5 BN-PAGE workflow: ミトコンドリアタンパク質と CoQ10 の検出

- (A) BN-PAGEのワークフロー. 電気泳動後, ゲルを2分割し, 一方はタンパク質検出用, もう一方は CoQ10 定量用に使用した.
- (B) In-gel activity assay による各複合体の検出
- (C) ウェスタンブロットによる各複合体の検出
- (D) ゲルからの CoQ10 抽出方法と HPLC-ECD 分析結果の一例のクロマトグラムのイメージ図

2-4-2 ミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量の測定

2-4-1 に示した手法を用いてゲル画分の CoQ10 含量を分析し、その結果をプロットした。その結果を Fig. 6B に示す。Fig. 6A には、参考のため、泳動後のゲルを並べて示した。well (0-3mm 画分の電気泳動移動度) において、CoQ10 が検出された。また、分析したすべてのゲル画分で CoQ10 を確認することができた。この Fig. 6B に示すように、CoQ10 は電気泳動移動度 0.9-1.8 cm 付近と、電気泳動移動度 3.0-5.4 cm 付近に 2 つのピークが確認された。最初のピーク (Upper peak) は、ピーク的位置が若干ずれているものの、ミトコンドリア SC 内の CoQ10 量を表していると思われる。以下、電気泳動移動度が 3~27mm のゲル中の CoQ10 量を "Upper peak" と定義した。複数の実験を行い、"Upper peak" の CoQ10 量の合計を算出した。その結果を Fig. 6C に示す。複数の実験の結果、タンパク質 1mg あたり約 15 pmol の CoQ10 がミトコンドリア SC で検出されたことが示された。また、Lower peak (下の電気泳動画分) の CoQ10 量も分析した。Lower peak の CoQ10 量は、実験によって大きく異なることがわかった。

上記の実験により、CoQ10 は "Upper peak" と "Lower peak" の両方で検出されることがわかった。そこで、電気泳動直後のゲルを 3mm 間隔に細かく切断せず、"Upper gel" と "Lower gel" のみに分割して CoQ10 量を測定できるかどうかを検討した。Fig. 6 D, E に示すように、切断したゲルが水平になるように切断した場合と、切断したゲルが垂直になるように切断した場合 CoQ10 の抽出量を比較した結果、どちらのゲルの切断でもほぼ同じ量の CoQ10 が含まれていることが確認された。

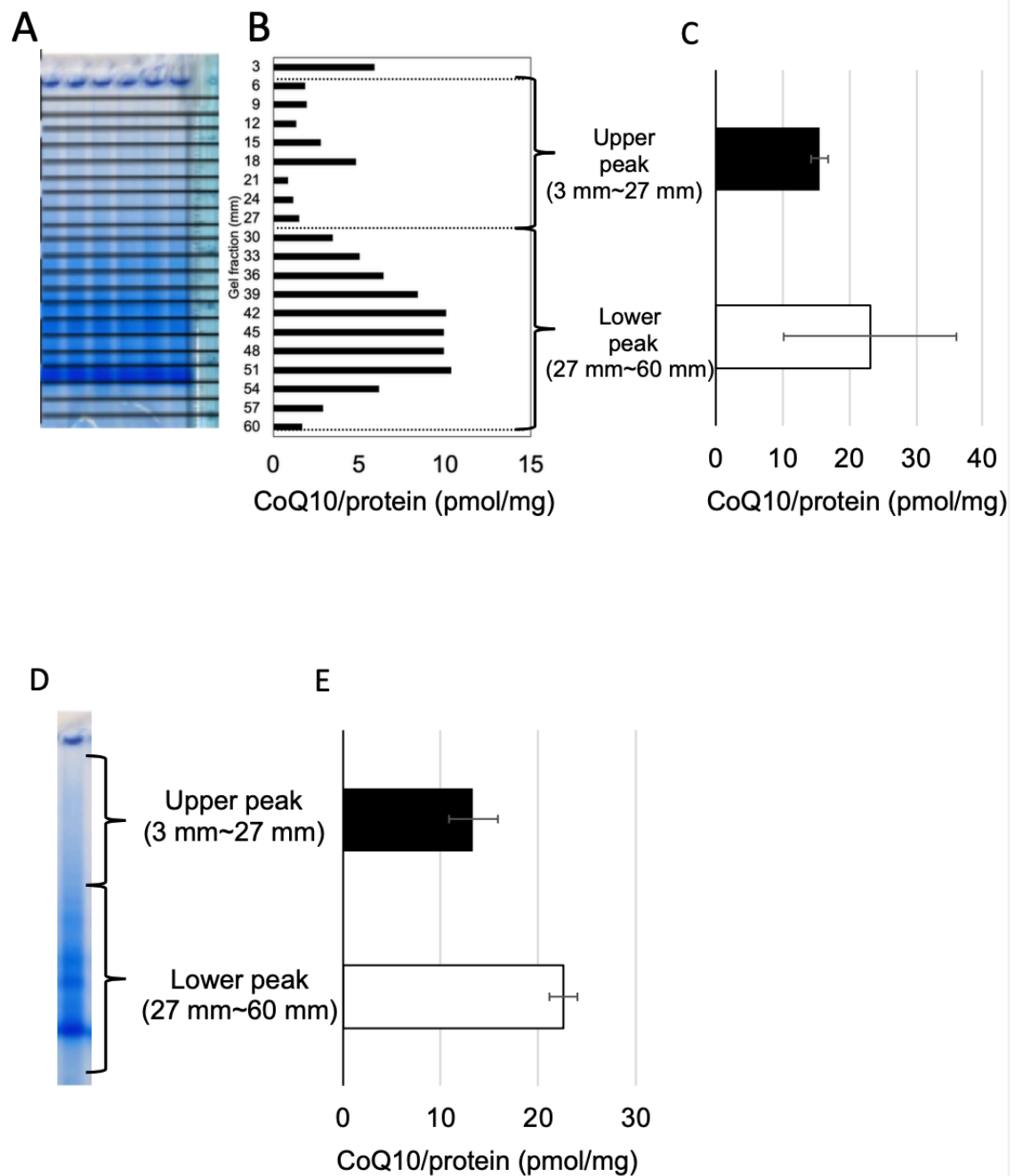


Fig. 6 ブルーネイティブゲル電気泳動測定後のゲルからの CoQ10 抽出結果

(A) 3mm に分画されたゲルのイメージ図

(B) ゲル画分中の CoQ10 量

(C) Upper peak および Lower peak の合計値 データは平均値±SD(n=3)で表した.

(D) Upper gel および Lower gel に分画されたゲルのイメージ図

(E) Upper gel および Lower gel 中の CoQ10 量 データは平均値±SD(n=3)で表した.

2-4-3 ミトコンドリア呼吸鎖超複合体のゲル内酵素活性測定と CoQ10 量に対する界面活性剤の影響

Fig. 6 の "Upper peak" または "Upper gel" の CoQ10 含有量がミトコンドリア呼吸鎖超複合体から得られたものかどうかを確認するために、界面活性剤の影響を検討した。ジギトニン(DIG)は、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体の構造を破壊しないと考えられているため、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体を検出するために使用される界面活性剤である。一方で、DDM を使用した場合には、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体を破壊することが報告されている。ミトコンドリアを DIG または DDM で処理した場合の各ゲル画分中の CoQ10 量を解析した。Fig. 7A に示すように、DIG 処理したミトコンドリアサンプルを用いた Blue Native ゲル電気泳動では、電気泳動移動度 1.0 cm で複合体 I のバンドが検出された。CoQ10 は、Fig. 7B と同様に電気泳動移動度 0.6-1.8cm に検出された。この実験結果から得られた Upper peak の CoQ10 量も、Fig. 6B および Fig. 6C に示した実験結果と同様に、約 15pmol であった。Fig. 7D-F は、DDM で処理したミトコンドリアで得られた結果である。電気泳動度 1.0cm 付近ではバンドが見られず(Fig. 7D)、電気泳動度 1.0cm 付近の CoQ10 量は DIG で処理されたサンプルで観察されたピークよりはるかに小さい (Fig. 7E, F) 。これらの結果は、"Upper peak" で観察される CoQ10 がミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の CoQ10 を判定料的に反映していると考えられる。さらに、ミトコンドリアタンパク質を含まない CoQ10 + DIG が Upper peak および Lower peak に CoQ10 のピークを示すかどうかを明らかにするために、CoQ10 と DIG 溶液のみを電気泳動した。Fig. 7G, H に示すように、CoQ10 はわずかしこ検出されなかった。これらの結果から、"Upper peak" の CoQ10 含量は、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の CoQ10 含量であることが示唆された。

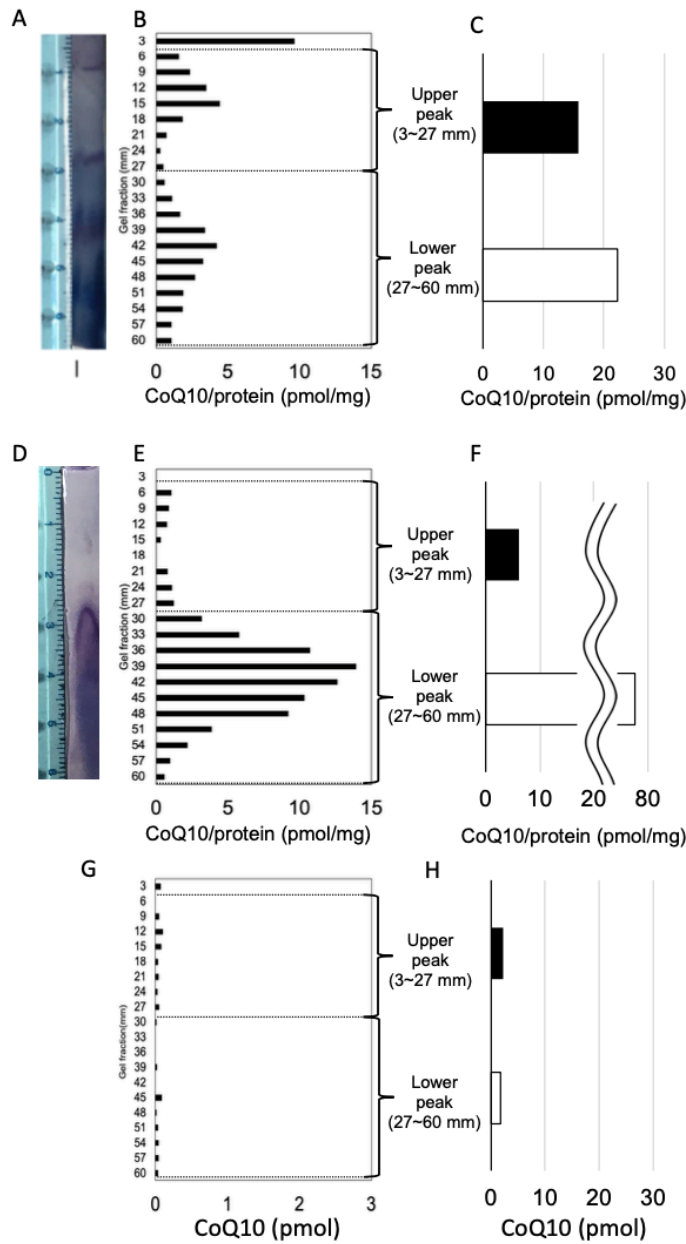


Fig. 7 界面活性剤の影響と再現性の確認

- (A) ジギトニン処理ミトコンドリアサンプルの複合体 I の検出
- (B) ジギトニン処理ミトコンドリアサンプルのゲル画分中の CoQ10 量
- (C) Upper peak および Lower peak の合計値
- (D) DDM 処理ミトコンドリアサンプルの複合体 I の検出
- (E) DDM 処理ミトコンドリアサンプルのゲル画分中の CoQ10 量
- (F) Upper peak および Lower peak の合計値
- (G) ジギトニン処理 CoQ 溶液のゲル画分中の CoQ10 量
- (H) Upper peak および Lower peak の合計値

2-4-4 4-NB 投与によるミトコンドリア呼吸鎖超複体内 CoQ10 量変動解析

CoQ10 量が低下した細胞中の呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量を解析するために、HepG2 細胞に 4-NB を投与した。Fig. 8A-B に示すように、1, 3, 5 mM 4-NB を投与した HepG2 細胞内、および単離したミトコンドリア内の CoQ10 量は濃度依存的に低下した。

Fig. 8C に非投与細胞および、5 mM 4-NB 投与細胞中の呼吸鎖超複体の解析結果を示した。非投与細胞に比べて、4-NB 投与細胞から単離したミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量が低下していることがわかる。Fig. 8D-E には Fig. 6C と同様の方法で、4-NB 投与による呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量を解析した結果を示した。興味深いことに、細胞レベル、ミトコンドリアレベルでは濃度依存的に低下した CoQ10 量は、呼吸鎖超複合体中では、各濃度で概ね同様の値となった。細胞内 CoQ10 量の低下率と呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量の低下率を比較すると大幅に後者が低下していることがわかる。これは、ジギトニン処理による外膜除去の影響であると考えられる。つまり、細胞内 CoQ10 レベル低下時にはミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量が鋭敏に低下することが示唆された。

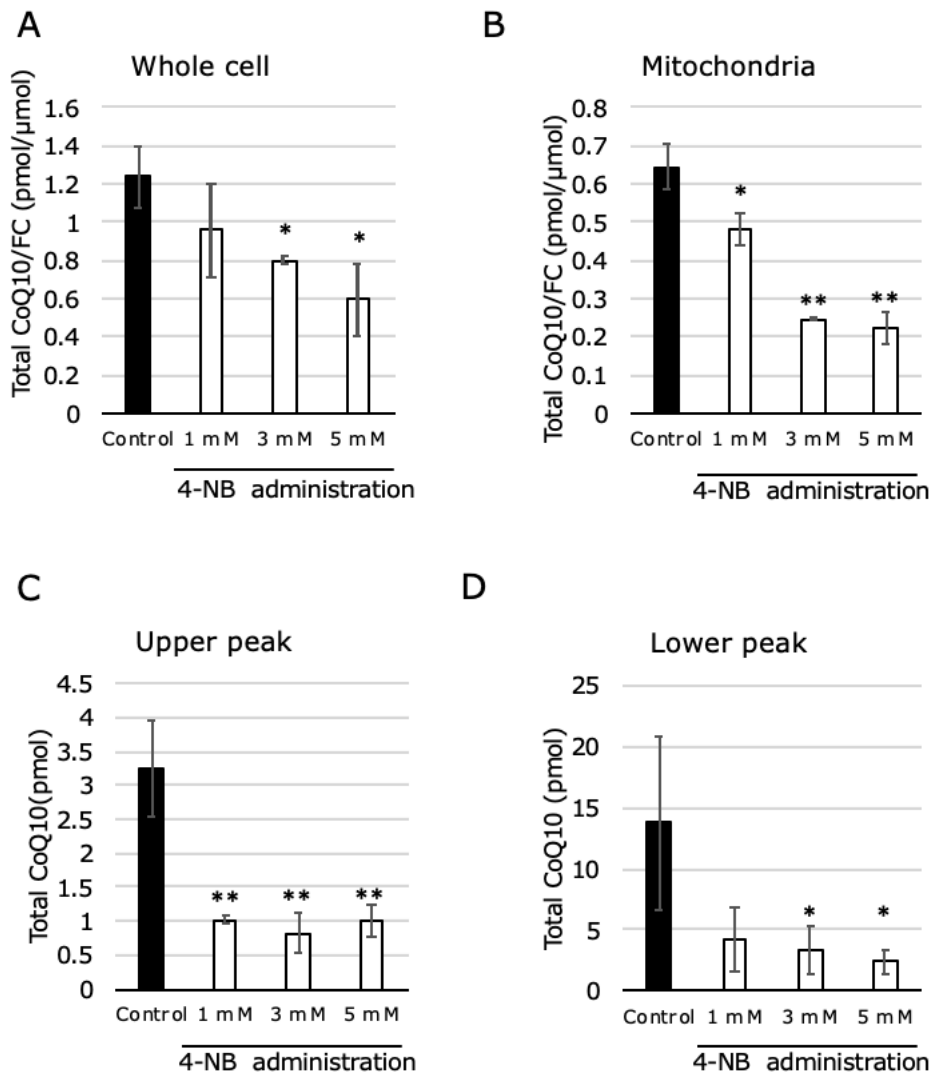


Fig. 8 4-NB 投与によるミトコンドリア呼吸鎖超複体内 CoQ10 量変動解析

- (A) 4-NB 処理による細胞中の CoQ10 量(黒棒：Control, 白棒：4-NB 処理)
 (B) 4-NB 処理によるミトコンドリア中の CoQ10 量(黒棒：Control, 白棒：4-NB 処理)
 (C) 4-NB 処理によるミトコンドリア呼吸鎖超複体内の CoQ10 量(黒棒：Control, 白棒：4-NB 処理)
 (D) 4-NB 処理によるミトコンドリア呼吸鎖超複体以外の CoQ10 量(黒棒：Control, 白棒：4-NB 処理)

データは平均値±SD(n=3)で表した. 統計解析は, 一元配置分散分析により行った. *p < 0.05, **p < 0.01 vs.コントロール.

2-4-5 CoQ10 投与によるミトコンドリア呼吸鎖超複体内 CoQ10 量変動解析

外因性の CoQ10 はミトコンドリア呼吸鎖超複体に取り込まれるかの検討を行った。CoQ10 の投与には水溶化 CoQ10 を培養培地中に溶解して投与した。Fig. 9A-B には HepG2 細胞内、および単離したミトコンドリア内の CoQ10 量は濃度依存的に増加した。しかしながら、これらの結果は、細胞膜中および、ミトコンドリア膜中に付着している水溶化 CoQ10 を反映していることは否定できない。次に、Fig. 9C-D に非投与細胞および、CoQ10 投与細胞中の呼吸鎖超複体の解析結果を示した。非投与細胞に比べて、CoQ10 投与細胞から単離したミトコンドリア呼吸鎖超複体中の CoQ10 レベルが増加していることがわかる。しかしながらこれらの結果も、呼吸鎖タンパク質に付着している CoQ10 であることは否定できない。

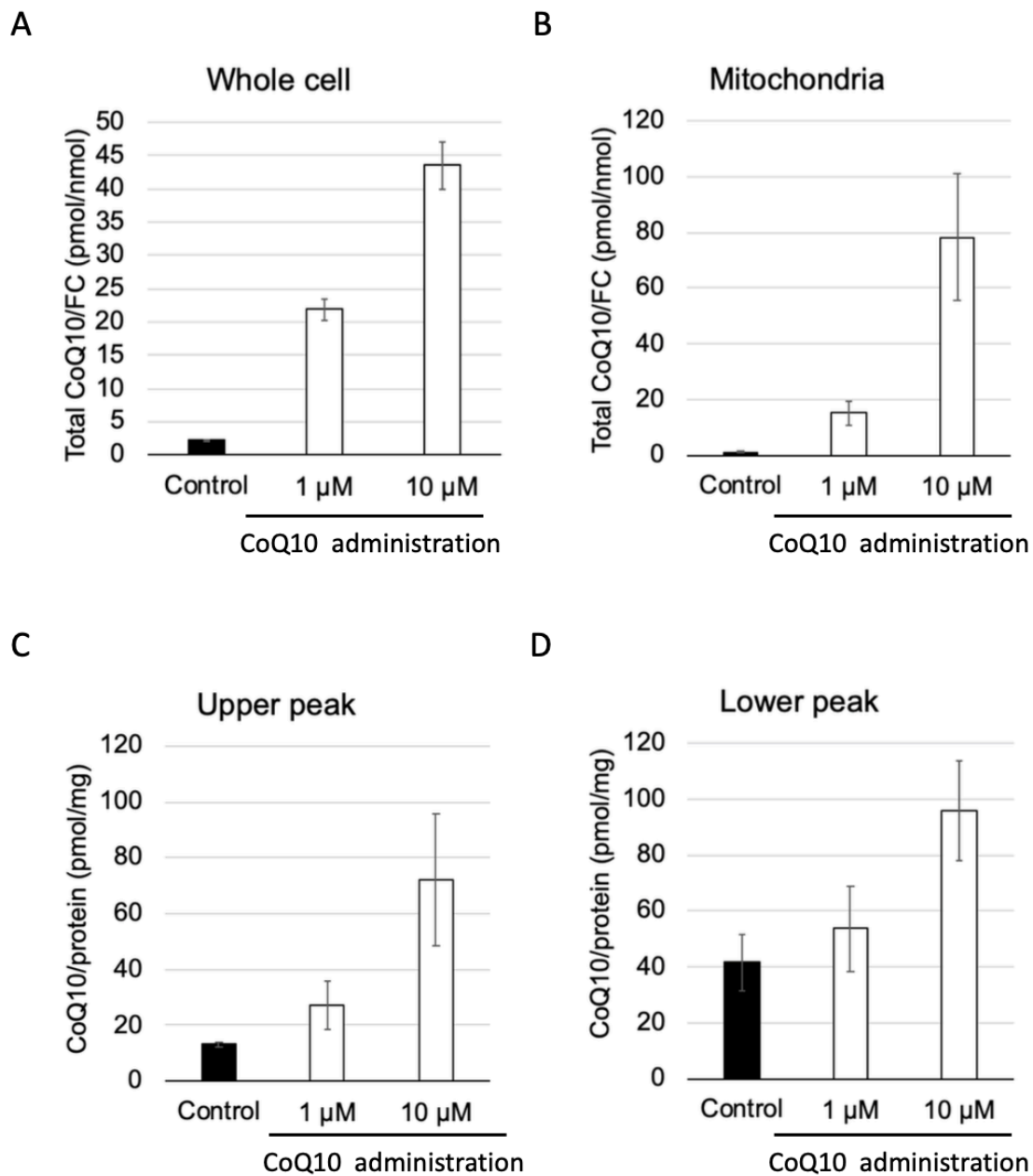


Fig. 9 CoQ10 投与によるミトコンドリア呼吸鎖超複体内 CoQ10 量変動解析

- (A) CoQ10 処理による細胞中の CoQ10 量(黒棒：Control, 白棒：CoQ10 処理)
 (B) CoQ10 処理によるミトコンドリア中の CoQ10 量(黒棒：Control, 白棒：CoQ10 処理)
 (C) CoQ10 処理によるミトコンドリア呼吸鎖超複体中の CoQ10 量(黒棒：Control, 白棒：CoQ10 処理)
 (D) CoQ10 処理によるミトコンドリア呼吸鎖超複体以外の CoQ10 量(黒棒：Control, 白棒：CoQ10 処理)

データは平均値±SD(n=3)で表した。

2-5 考察

本研究では、ミトコンドリアタンパク質を BN-PAGE で分離した。複合体 I, 複合体 III, 複合体 IV の検出には、ウェスタンブロット法および Ingel assay を用いた。ウェスタンブロットティングでは、複合体 I, III, IV のバンドは電気泳動移動度 1.0 cm 付近に認められた。Ingel assay でも、複合体 I と複合体 IV のバンドは 1.0cm 付近に見られた。BN-PAGE でタンパク質を分離した後、ゲルから抽出された CoQ10 の量を測定した。その結果、CoQ10 はゲルの上部 (Upper peak) と下部 (Lower peak) の 2 つのピークを有していることがわかった。上部のピークについては、以下の 2 点が認められる。

- (1) ジギトニン処理したサンプルには存在するが、呼吸鎖超複合体を破壊することが知られている DDM 処理したサンプルには存在しない。
- (2) ミトコンドリアタンパク質を含まないジギトニン+CoQ10 の電気泳動では CoQ10 ピークは観察されない。

これらの結果から、Upper peak で検出される CoQ10 は呼吸鎖超複合体に関連するピークであると考えられる。しかし、呼吸鎖超複体のゲル分析で確認されたバンドの位置と、CoQ10 のピークが観測されるゲル画分の位置は完全に一致していないことに注意する必要がある。CoQ10 の位置は、電気泳動移動度が大きいところで観測される。電気泳動中に CoQ10 が呼吸鎖超複体タンパク質と分離し、タンパク質よりも速く移動している可能性がある。この可能性については、さらに検討する必要がある。呼吸鎖超複体が検出された部分に含まれる CoQ10 の総量は約 15 pmol/mg のミトコンドリアタンパク質であることがわかった。Upper peak, すなわち呼吸鎖超複体に含まれる CoQ10 の量は、上述したものとほぼ同じであった。

また、電気泳動移動度が 2.7 cm から 6.0 cm にも CoQ10 のピークが検出された。これは DDM 処理したミトコンドリアサンプルでも確認されたが、ミトコンドリアタンパク質を含まない CoQ10 や界面活性剤のみのサンプルでは確認されなかった。このピークもミトコンドリアタンパク質に関連した CoQ10 のピークであると考えられるが、具体的にどのタンパク質が関与しているかは不明である。

4-NB で CoQ10 合成を阻害すると、Upper peak, Lower peak とも減少した。その減少の程度は、細胞画分やミトコンドリア画分よりも「Upper peak」で顕著であった。このことから、CoQ10 合成が阻害されると、まず呼吸鎖超複体中の CoQ10 が優先的に減少することが示唆された。呼吸鎖超複体中の CoQ10 が減少しても、細胞そのものは生存可能である。しかしながら、増殖速度が遅くなるなどの影響がある⁽⁶²⁾。呼吸鎖超複体内の CoQ10 が減少したときの細胞の代謝動態について、さらなる検討が期待される。

CoQ10 は栄養補助食品として注目されている。経口投与された CoQ10 は、(1) 血中への取り込み⁽⁶³⁾(2) 組織への取り込み⁽⁶⁴⁾ (3) ミトコンドリアへの取り込み⁽⁷⁾が知られているが、摂取した CoQ10 が呼吸鎖超複体に取り込まれるかについてはこれまで不明であった。今回、CoQ10 を細胞培地に投与したところ、呼吸鎖超複体内の CoQ10 が増加することが

確認された。このことは、細胞に投与された CoQ10 が呼吸鎖超複合体に取り込まれることを示唆している。

第3章 長期 CoQ10 欠乏モデルを用いたプロサポシンの解析

3-1 概要

スフィンゴ糖脂質は、細胞間のシグナル伝達、接着、増殖、分化に関与している。サポシン A, B, C, D は、スフィンゴ糖脂質の加水分解に必要な補酵素である。サポシン A~D は、共通の前駆体タンパク質である Psap に直列に存在する。したがって、スフィンゴ糖脂質の量はプロサポシンの細胞内レベルに依存する。当研究室では以前、Psap とサポシン B がヒトの細胞内で CoQ10 と結合することを報告した。CoQ10 はミトコンドリアの電子伝達系に必須の脂質であり、その還元型は重要な抗酸化物質である。CoQ10 は、加齢や様々な疾患によって減少する。従って、長期間の CoQ10 欠乏に対する細胞応答を理解することは興味深い。本章では、CoQ10 合成阻害剤である 4-NB を用いて、長期の CoQ10 欠乏細胞モデルを確立した。HepG2 細胞では、4-NB により CoQ10 の濃度が低下した。また、4-nitrobenzoate の投与により、Psap のタンパク質と mRNA のレベルが減少した。CoQ10 と Psap の細胞レベルは、CoQ10 合成の基質である 4-ヒドロキシベンゾキノンで処理することにより回復し、4-NB の影響を打ち消すことが示された。さらに、4-NB 処理した細胞では、ガングリオシドレベルが変化していた。これらの結果は、長期の CoQ10 欠乏が細胞の Psap レベルを低下させ、スフィンゴ糖脂質の代謝に影響していることを示唆している。

3-2 序論

CoQ10 はミトコンドリアの電子伝達鎖の重要な構成要素であり⁽¹⁾，その還元体であるユビキノールは最も重要な脂溶性抗酸化物質の一つである⁽⁵⁶⁾。CoQ10 細胞レベルは老化とともに低下する⁽²¹⁾。さらに，パーキンソン病などいくつかの疾患が CoQ10 レベルの低下と関連している^(57, 65)。興味深いのは，これらの疾患と老化は数年かけて進行することである。CoQ10 の生理的関連性を解明するためには，長期的な CoQ10 欠乏後の細胞応答を理解する必要がある。

CoQ10 は生体内でアセチル CoA から合成される。アセチル-CoA を出発点とし，メバロン酸経路を構成する一連の反応により，コレステロール前駆体のファルネシル-PP，CoQ10，ドリコル，イソプレニル化タンパク質が生成される⁽⁶⁶⁾。キノン部分はチロシンから派生する。チロシンから生成したヒドロキシ安息香酸は，Coq2 酵素によって側鎖に結合される。この反応は競合阻害剤である 4-NB によって阻害される^(20, 67)。4-NB を投与すると細胞の CoQ10 レベルが低下することが知られている^(20, 67)。

当研究室では以前に，ヒト細胞において CoQ10 が少なくともある程度はサポシン B およびその前駆体であるプロサポシン (Psap) と結合することを報告した⁽²⁹⁾。Psap は非常に保存された多機能糖タンパク質で，サポシン A, B, C および D として知られる 4 つの小さなスフィンゴ脂質活性化タンパク質のリソソーム前駆体である。これら 4 つのサポシンは相同性があり，6 つの保存されたシステインと 1 つの共通のグリコシル化部位を持つ⁽³⁰⁾。成熟サポシンは，様々なスフィンゴ脂質やセラミドの代謝に関与するいくつかのリソソーム加水分解酵素を活性化する。HepG2 細胞や Caco-2 細胞で Psap を欠損させると CoQ10 の細胞内濃度が低下することが報告されている^(31, 32)。

Psap とその由来タンパク質であるサポシン A-D はスフィンゴ脂質の代謝に関与している⁽³³⁾。Psap はスフィンゴ糖脂質レベルを正常に保つために重要である^(30, 34)。スフィンゴ糖脂質は細胞間シグナル⁽³⁵⁾，接着⁽³⁶⁾，増殖⁽³⁷⁾，分化に関与する⁽³⁸⁾。従ってスフィンゴ糖脂質レベルを正常に保つことが重要であると考えられる。

本章では，長期的に CoQ10 が欠乏した細胞における CoQ10 結合タンパク質 Psap のレベルを解析した。CoQ10 は，コレステロールとともにアセチル-CoA から合成される脂質である。肝臓は体内の脂質代謝を司る重要な臓器である。肝細胞癌の細胞株である HepG2 細胞を使用した。4-NB で処理した HepG2 細胞モデルを作製した。4-NB を用いた先行研究^(20, 67)では，4-NB は通常 3 日から 1 週間投与された。本研究では，慢性的な CoQ10 欠乏状態における Psap レベルを明らかにするために，1 ヶ月以上 4-NB 処理した細胞モデルを作成し，この細胞モデルを長期 CoQ 欠乏細胞モデルと呼ぶことにした。その結果，長期的な CoQ10 欠乏は Psap レベルの低下を誘発し，細胞内の脂質代謝を調節していることを明らかにした。

3-3 試薬・実験手法

3-3-1 HepG2 細胞の培養

HepG2 細胞は, 10 %牛胎児血清 (HyClone, Thermo Scientific, MA, USA) , 100 units/ml penicillin, 100 μ g/mL streptomycin を添加した Dulbecco's MEM (Sigma, St. Louis, MO, USA)で 37°C , 5 %CO₂ と 95 %空気の加湿環境下で培養した.

3-3-2 4-NB 投与実験

4-NB (Wako, Japan) は DMSO に溶解して使用した. 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mM の 4-NB で処理し, 96 時間かけて CoQ10 欠損細胞の生成に最適な濃度を決定し, 24 時間ごとに細胞を回収して CoQ10 量の定量を行った. 以降の実験では, 4-NB 処理した細胞は 5 mM 4-NB を含む培養液にて培養を行なった. 対照細胞は, 対応する濃度の DMSO とともに培養した. 4-NB 処理細胞と対照細胞は, 同じ処理時間で培養した. これらの期間において, DMSO 処理した対照細胞では, 肥大などの形態的な変化が見られなかったことに留意されたい.

5 mM 4-NB の効果が化合物の副作用ではなく, CoQ10 の欠乏によって媒介されることを示すために, 細胞を 5 mM 4-NB および 25 μ M 4-ヒドロキシ安息香酸 (4-HB, Wako) で共処理するか, または通常の培地で培養した.

3-3-3 ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティング解析は, 若干の修正を加えて, 以前に報告されたように行った.⁽³²⁾ HepG2 細胞の各ディッシュを溶解バッファー (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 % nonidet P-40 (Nacalai Tesque, Tokyo, Japan), 0.1 mM EDTA, 1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド, 1 μ g/mL ロイペプチン, ペプスタチン A, 1 μ g/mL N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone, および 1 μ g/mL N-tosyl-L-lysyl chloromethyl ketone) を添加し, 氷上で 1 時間静置したのち, サンプルを回収して 15000 \times g で 10 分間遠心分離をした. 上清中のタンパク質濃度を Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, IL, USA)で測定した. 同じタンパク質量 (10 μ g) を各ウェルにロードした. サンプルは, 7.5 % または 10 %の SDS/ポリアクリルアミドゲルを通した電気泳動によって分離した. 電気泳動後, タンパク質を PVDF 膜に転写した. PVDF 膜はマウス抗 SapB IgG (以前に作成したモノクローナル抗体)⁽²⁹⁾または, マウス抗アクロレイン IgG (日油株式会社, 東京, 日本) と共に室温で 1 時間インキュベートした. タンパク質は西洋わさびペルオキシダーゼ標識二次抗体 (Bio-Rad Japan, Tokyo, Japan) を用いて室温で 1 時間検出した. EzWestBlue (#AE-1490; ATTO, Tokyo, Japan) を用いてタンパク質バンドを室温で 5 分間可視化し, GNU Image Manipulation Program 2.8 によって画像化した. 画像化されたタンパク質バンドは, ImageJ ソフトウェアで解析した.

3-3-4 RNA 抽出と定量 PCR (qPCR)

HepG2 細胞における mRNA の発現レベルは、以前に報告されたように逆転写 PCR によって決定した。⁽⁶⁰⁾ 簡単に言えば、細胞を 6 ウェルプレートに播種し (7.5×10^5 cells/well), TRizol 試薬 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を使用して total RNA を抽出した. RNA の品質と濃度は, Ultrospec 2100 pro (Biochrom, Cambridge, UK)を用いて評価した. QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Venlo, The Netherlands)を用いて逆転写を行い, cDNA を合成した. qPCR により, 以下の遺伝子の発現量を測定した. *Psap*, 核転写因子 Y サブユニット β (*NF-YB*), β -アクチン (*ACTB*). プライマーの配列を表 1 に示す. QuantStudio[®] 5 (Thermo Fisher Scientific) を用いて qPCR を行った (95 °C 15 分, 95 °C 15 秒, 72 °C 30 秒の 40 サイクル, 60 °C 30 秒の最終伸長段階). 遺伝子発現の変化は, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法で算出した.⁽⁶⁸⁾

表 1 qPCR で使用したプライマー配列

| | | |
|--------------|---------|------------------------------|
| <i>NF-YB</i> | Forward | 5'-GGTGCCATCAAGAGAAACGG-3' |
| | Reverse | 5'-GACTGCTCCACCAATTCCT-3' |
| <i>Psap</i> | Forward | 5'-CTTCCGAAACCGAACATGTCTG-3' |
| | Reverse | 5'-GGATCTTATTGGACTCCAGCTG-3' |
| <i>ACTB</i> | Forward | 5'-ATTGCCGACAGGATGCAGAA-3' |
| | Reverse | 5'-GCTGATCCACATCTGCTGGAA-3' |

3-3-5 CoQ10 および遊離コレステロールの分析

CoQ10 と遊離コレステロール(FC)の細胞内濃度は、以前に報告された方法に若干の修正を加えて HPLC で測定した。^(60, 61) 2 本の分離カラム (Ascentis[®] C8, 5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm i.d. and Supelcosil[™] LC-18, 3 μ m, 5 cm \times 4.6 mm i.d.; Supelco Japan, Tokyo, Japan) と還元カラム (RC-10, 15 mm \times 4 mm i.d.; IRICA, Kyoto, Japan) を使用した. 移動相は 50 mM NaClO₄ in methanol/IPA (85/15, v/v)とし, 0.8 mL/min の流速で供給した. カラムは 25 °Cに保たれた.

3-3-6 ガングリオシドの分析

ガングリオシドは既報に従って単離し, 薄層クロマトグラフィー(TLC)で分析した. TLC 溶媒系は CHCl₃/MeOH/ CaCl₂(0.02 %) (11 /9/2, (v/v/v)) であった. サンプルは純粋なガングリオシド GM3 標準品 (株式会社船越, 東京, 日本) と同様のプレート上で分離された. ガングリオシドのバンドはレゾルシノール・チオ硫酸着色試薬を噴霧し, 100 °Cで 30 分間加温して検出した.

3-4 結果

3-4-1 CoQ10 細胞レベルに対する 4-NB 処理の影響

Fig. 10A に示すように、細胞内 CoQ10 レベルは、4-NB 投与により用量依存的に減少した。我々の以前の研究では、CoQ と同様に IPA に抽出されると考えらえる遊離コレステロールの量で CoQ 値を補正した。なお、遊離コレステロールも CoQ と同様にメバロチン酸経路でアセチル CoA から生成される。Fig. 10B は、各培養皿のウェルで測定された遊離コレステロール量を示す。この図に示すように、10 mM の 4-NB を投与すると、各ウェル内の CoQ レベルだけでなく、遊離コレステロールレベルも低下することが確認された。この結果は、10 mM 4-NB 投与により細胞増殖が著しく阻害されたことを示唆している。そこで、以下の実験では 5 mM の 4-NB を用いた。4-NB を 3 日間から最長 16 ヶ月間投与した。CoQ10 の細胞レベルは、4-NB 投与 3 日後にコントロールと比較して有意に減少した。また、4-NB 投与 6 ヶ月後および 12 ヶ月後にもこのレベルは低かった (Fig. 10C)。

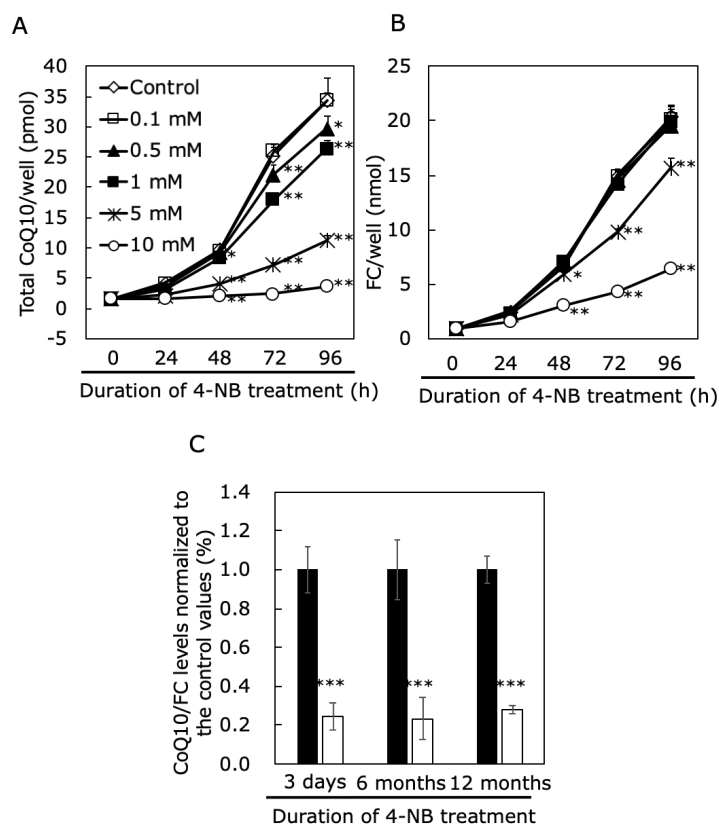


Fig. 10 HepG2 細胞を 4-NB で処理した場合としない場合の CoQ10 レベル。

(A) 様々な濃度の 4-NB で 96 時間処理した場合の CoQ10 レベルの測定

(B) 様々な濃度の 4-NB で 96 時間処理した場合の FC レベルの測定

(C) 5 mM 4-NB 存在下 (白棒) または非存在下 (黒棒) で、総 CoQ10 レベルを FC レベルで補正した。データは平均値 \pm SD で表した。統計解析は一元配置分散分析 (A) および t-test (B) を介して行った。統計解析は Student's t-test により行った。

細胞の酸化ストレスに対する 4-NB の影響を調べるために、アクロレイン結合タンパク質の細胞内レベルを測定した (Fig. 11A) . 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の量が増加していることがわかる. これらのタンパク質の種類を特定することはできていない. Fig. 11B は、4-NB 処理 3 日後および 6 ヶ月後の酸化型 CoQ10 の割合 (%CoQ10) である. この値は、酸化ストレスの指標となるもので、以下のように算出される. $[\text{酸化型 CoQ10}] / [\text{酸化型 CoQ10} + \text{還元型 CoQ10}] \times 100$ で算出される. この図に示すように、4-NB 処理 3 日後および 6 ヶ月後に %CoQ10 が増加した.

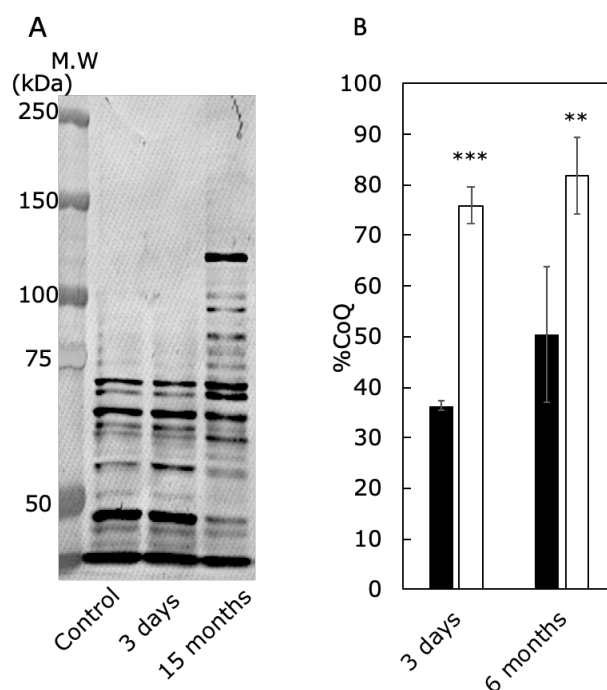


Fig. 11 4-NB 処理による細胞の酸化還元バランスへの影響

(A) アクロレイン結合タンパク質のアクロレインは、ウェスタンブロットによりコントロールおよび 4-NB 処理細胞で検出された.

(B) コントロール (黒棒) および 4-NB 処理細胞 (白棒) における %CoQ10 値. CoQ10 の酸化還元バランスは、全 CoQ10 中の酸化型 CoQ10 含有量 (%CoQ10) を指標として評価した: $[\text{酸化型 CoQ10}] / [\text{酸化型 CoQ10} + \text{還元型 CoQ10}] \times 100$.

データは平均値 \pm SD (n=3) で表した, 統計解析は Student's t-test を用いて行った.

p < 0.01, *p < 0.001 vs. コントロール.

3-4-2 4-NB 処理した細胞における Psap 細胞レベルの測定

CoQ10 は少なくとも部分的に Psap およびその由来タンパク質である saposin B と結合していることを我々は以前に報告した。⁽²⁹⁾ そこで、4-NB によって CoQ10 が欠乏した細胞における Psap mRNA レベルを解析した。Fig. 12A に示すように、4-NB で7ヶ月間処理した細胞では、Psap mRNA レベルが減少していることが確認された。また、Psap のタンパク質量も解析した。Fig. 12B に示すように、4-NB 処理3日後では、Psap タンパク質レベルに有意な変化はなかった。しかし、Psap レベルは4-NB 処理の3ヶ月後に減少し、その減少は4-NB で16ヶ月まで処理した細胞で持続した。Psap は3ヶ月間4-NB 処理すると減少し、その減少は16ヶ月間4-NB 処理した細胞で持続した (Fig. 12C) 。

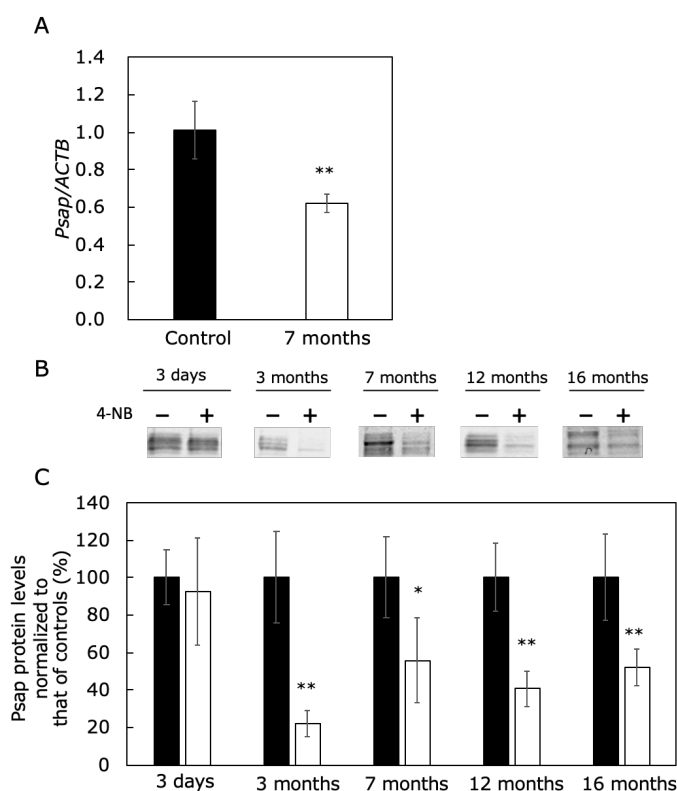


Fig. 12 Psap mRNA とタンパク質レベルに対する 4-NB 処置の効果

(A) コントロール細胞および4-NB で7ヶ月間処理した細胞における ACTB mRNA で正規化した Psap mRNA レベル

(B) コントロールおよび4-NB で3日間, 3, 7, 12, および16ヶ月間処理した細胞における Psap タンパク質のウェスタンブロット

(C) ImageJ を用いた Psap タンパク質レベルの定量化

黒棒：コントロール細胞, 白棒：4-NB 処理細胞. データは平均値±SD(n=3)で表した.

統計解析は Student's t-test を用いて行った.

*p < 0.05, **p < 0.01, vs. コントロール.

3-4-3 4-NB および 4-HB 共存下における Psap レベルの変動解析

Fig. 13A は, 4-NB および 4-HB 存在下での CoQ10 細胞レベルである. 4-HB は CoQ10 産生に使用される基質である. 4-HB の投与は, 4-NB による CoQ10 不足を解消することが報告されている.⁽⁶⁷⁾ Fig. 13A に示すように, 4-NB を 7 ヶ月間投与すると CoQ10 細胞レベルが低下した. この減少は, 4-HB と 4-NB を 3 日間共投与することにより, 対照細胞株と同程度の CoQ10 量となり, 防止された. Fig. 13A レーン 4 は, 4-NB で 7 ヶ月間処理した後, 通常の培地 (4-NB なし) に 3 日間移した細胞における CoQ10 レベルを示したものである. これらの細胞にも, 対照細胞のものと同程度の CoQ10 量が含まれていた. Fig. 13B, C に示すように, Psap タンパク質レベルは, 4-NB 処理した細胞では減少したが, 4-HB と共処理した細胞や 4-NB なしで 3 日間培養した細胞では, コントロールと同程度のレベルであった. これらの結果は, Psap タンパク質レベルの減少は, 4-NB の細胞毒性によるものではなく, むしろ 4-NB によって誘導される CoQ10 レベルの低下によるものであることを示唆している.

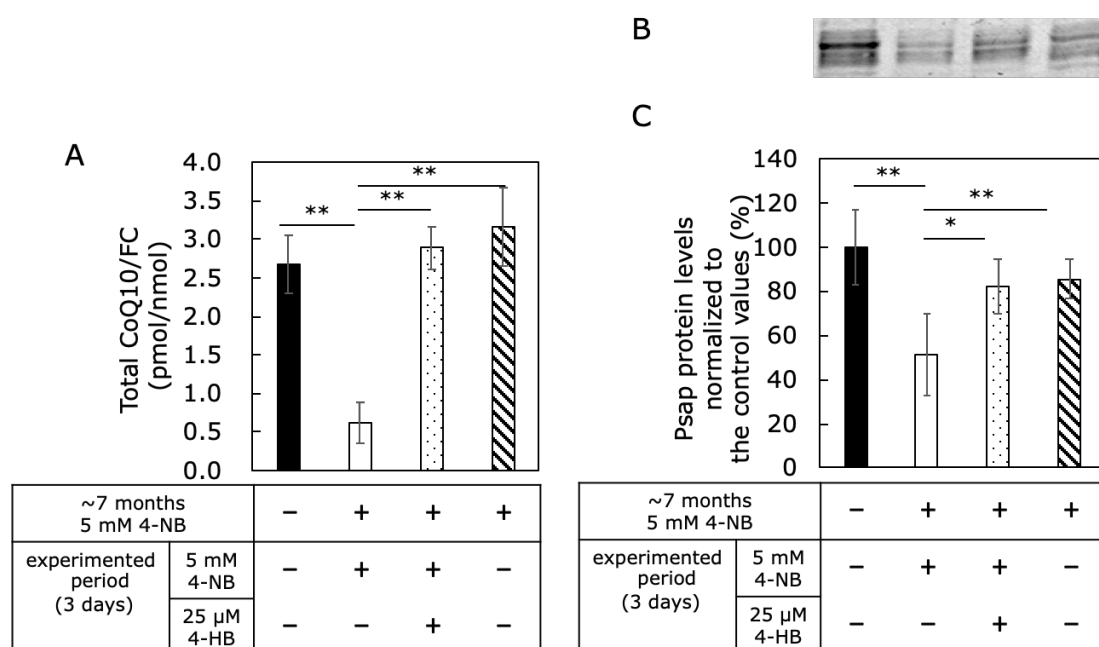


Fig. 13 CoQ10 および Psap タンパク質レベルに対する 4-NB および 4-HB 処理の影響.

細胞は 7 ヶ月間 4-NB で処理されたものとされなかったものがあった. その後, 4-NB で処理した細胞, 4-NB と 4-HB で共処理した細胞 (4-NB + 4-HB), 4-NB 除去培地の 3 群に分けた.

(A) 細胞中の CoQ10 定量

(B) Psap のウェスタンブロット解析

(C) ImageJ を用いた Psap タンパク質レベルの定量化. データは平均値 \pm SD (n=3) で表した. 統計解析は, 一元配置分散分析により行った.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. コントロール.

3-4-3 4-NB 処理した細胞におけるガングリオシドの細胞レベル

Psap は、スフィンゴ糖脂質を代謝する非酵素的必須タンパク質であるサポシン A-D の前駆体である。そこで、4-NB 処理した細胞におけるガングリオシドの細胞内レベルを解析した。Fig. 14A は TLC 分析の結果である。シアル酸に結合した脂質の量が 4-NB 投与により変化していることがわかる。シアル酸で陽性に染色された脂質は、コントロールと 4-NB 投与細胞の抽出物から検出された。GM3 をマーカーとした場合、GM3 と同じ位置に陽性に染色されたバンドが存在した。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。GM1, GM2, GD を同じ条件で TLC 分析したところ、GM3 よりも低い位置に染色された (data not shown) 。さらなる解析が必要であるが、この結果は、4-NB 処理細胞株ではシアル酸に結合した脂質の細胞内レベルが減少していることを示唆している (Fig. 14B) 。

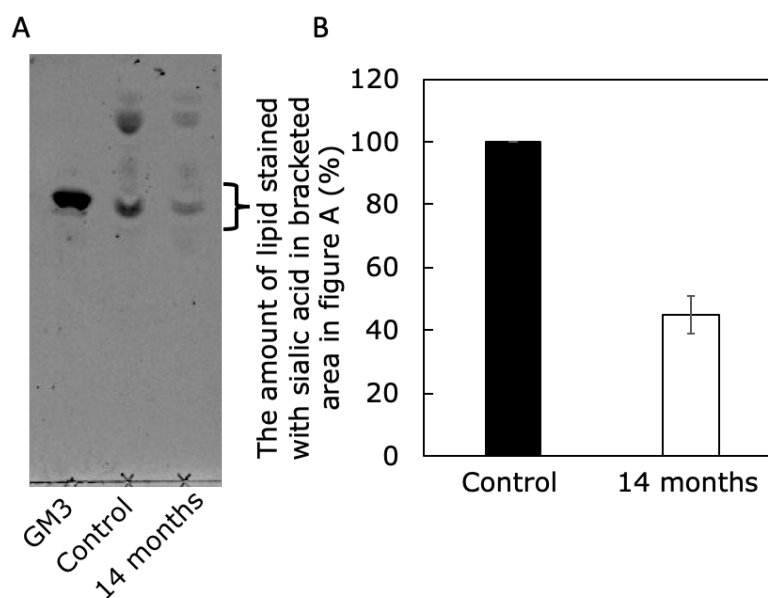


Fig. 14 シアル酸を含む脂質の TLC 分析。

(A) 代表的な TLC プレート。レーン 1: GM3 マーカー, レーン 2: コントロール細胞抽出物
レーン 3: 4-NB 処理した細胞からの抽出物

(B) ImageJ による脂質シアル酸含有量の定量的解析

データは平均値 ± SD で表した。(n=2) エラーバーは参考として表記した。

3-4-4 核内転写因子 Y サブユニット β (NF-YB) 4-NB 処理細胞の細胞レベル

Tharyan らは, NFYB-1 が Psap の発現を制御していることを以前に報告している.⁽⁶⁹⁾ 実際, NFYB-1 の発現を抑制すると, Psap mRNA の発現が上昇することが確認された. 4-NB 処置した細胞では Psap mRNA 量が減少していることがわかった. NF-YB は, *C. elegans* の NFYB-1 遺伝子のヒトホモログである. Fig. 15 に示すように, NF-YB mRNA レベルは, 4-NB 処理によって増加せず, むしろ減少した. したがって, 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.

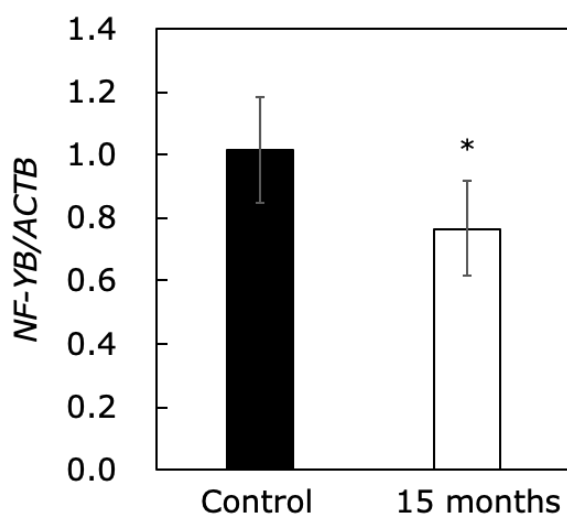


Fig. 15 NF-YB mRNA の発現量を ACTB mRNA レベルで正規化したもの
コントロール (黒棒) および 4-NB 処理細胞 (白棒) における遺伝子発現を, 定量 PCR により測定した. 結果は, 平均値 \pm SD (n=3) で示した. 平均発現量は, コントロールの発現量に対して正規化した ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法).
統計解析は Student's t-test で行った. *p<0.05,

3-5 考察

上記のように、長期の CoQ10 欠乏は Psap の細胞内レベルを低下させた。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、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。

細胞内の CoQ10 量の減少は、Psap の細胞量を低下させ、スフィンゴ糖脂質の細胞内含量に影響を及ぼした。Psap はスフィンゴ糖脂質の代謝に重要な役割を担っている。Psap 遺伝子の変異により Psap が欠損する疾患は、世界で少なくとも 4 家系で報告されている。⁽⁷⁰⁻⁷³⁾ 報告例すべてにおいて、出生直後あるいは新生児期、乳児期に全身痙攣発作や著しい肝脾腫などの重度の神経症状が見られるとされる。臨床的特徴はゴーシェ病 II 型（急性神経症状型）と類似している。また、胎児死亡も報告されている。それらの症例では、肝臓にセラミド、グルコシルセラミド、ラクトシルセラミド、スルファチド、ジガラクトシルセラミド（ジガラクトシルセラミド）、グロボトリオシルセラミド、グロボシド、GM1 および GM2 ガングリオシドなどの糖脂質が検出された。

藤田らは Psap 欠損マウスを作製し、ヒトの Psap 欠損に酷似した表現型を示した。⁽⁷⁴⁾ Psap 欠損マウスの出生率は非常に低く、出生前あるいは出生後 1-2 日でほとんどが死亡した。生後 30 日の Psap 欠損マウスでは、ヒトの症例で報告されたのと同様に、全身の組織に様々なスフィンゴ糖脂質が蓄積し、神経系や網膜系の細胞には膜様封入体が多数発生した^(33, 74) 従って、Psap の減少は脂質のホメオスタシスを崩壊させる。ここで、シアル酸含有脂質を測定し、4-NB 処理した細胞で減少していることを明らかにした。シアル酸を陽性に染色した脂質は、マーカーとして用いた GM3 と同様の位置に検出された。従って、このバンドは GM3 由来と考えた。このバンドの強度は、4-NB 投与により減少した。今後、他の脂質に対する 4-NB 投与の影響を解析することが必要である。

本研究により、CoQ10 の長期的な減少が細胞内の Psap 量を減少させることが示された。実際、CoQ10 欠損細胞では Psap の mRNA 量が減少していた。Tharyan らは、高度に保存されたヒストン様転写因子である NFYB-1 が Psap の発現を抑制することを報告している。⁽⁶⁹⁾ 我々の長期 CoQ10 欠乏細胞モデルでは、ヒトの NFYB-1 ホモログの発現レベルはむしろ減少していた (Fig. 15)。したがって、Psap mRNA レベルの減少は、NF-YB とは独立したメカニズムによって引き起こされている可能性が高い。酸化ストレスは Psap タンパク質を増加させることが知られている。^(75, 76) 4-NB 処理細胞では、アクロレイン結合タンパク質のレベルおよび %CoQ10 値から判断して、酸化ストレスが増加していた (Fig. 11)。しかし、Psap mRNA とタンパク質レベルは減少した。したがって、4-NB 処理による Psap レベルへの影響を媒介する機構については、さらなる検討が必要である。

以上より、CoQ10 生合成阻害剤である 4-NB を細胞に投与することにより、長期的な CoQ10 欠乏細胞モデルを構築することができた。細胞内の CoQ10 結合タンパク質 Psap の量は、CoQ10 量の長期的な減少に伴い減少した。Psap はスフィンゴ糖脂質の代謝に関与するタンパク質である。また、CoQ10 の長期欠乏により Psap が減少した細胞では、ガングリオシドの量も変化していた。CoQ10 およびその結合蛋白質 Psap の量の変化が細胞内の糖脂質代謝に及ぼす影響については、さらなる検討が必要である。

第4章 長期 CoQ10 欠乏モデルにおけるミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量の解析

4-1 概要

第2章では、BN-PAGE を用いてミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量の測定手法の確立を行った。その結果、半定量的ではあるが、呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量の増減を議論できるレベルで測定できる手法を開発した。第3章では、長期 CoQ10 欠乏モデルの確立し、CoQ 結合タンパク質である Psap レベルが低下することを見出した。本章では、長期 CoQ10 欠乏モデルへの CoQ10 投与により、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量を測定し、Psap レベルの低下と CoQ10 の取り込みがどのように変動するかを検討した。

4-2 試薬・実験手法

4-2-1 HepG2 細胞の培養

HepG2 細胞は、10 %牛胎児血清 (HyClone, Thermo Scientific, MA, USA) , 100 units/ml penicillin, 100 μ g/mL streptomycin を添加した Dulbecco's MEM (Sigma, St. Louis, MO, USA)で 37°C , 5 %CO₂ と 95 %空気の加湿環境下で培養した。

4-2-2 4-NB 投与実験

4-NB (Wako, Japan) は DMSO に溶解して使用した。5 mM 4-NB を含む培養液にて培養を行なった。対照細胞は、対応する濃度の DMSO とともに培養した。4-NB 処理細胞と対照細胞は、同じ処理時間で培養した。これらの期間において、DMSO 処理した対照細胞では、肥大などの形態的な変化が見られなかったことに留意されたい。

4-2-3 CoQ10 投与実験

水溶性 CoQ10 を培養液中に溶解して投与した。1, 10 μ M の CoQ10 で処理し 72 時間投与した。細胞中もしくは、ミトコンドリア中の CoQ10 量の定量を行った。さらに界面活性剤で可溶化したミトコンドリアサンプルをブルーネイティブ電気泳動し、分画したゲル中の CoQ10 量も定量した。

4-2-4 HepG2 細胞からミトコンドリア単離

ミトコンドリアの単離は Wallace の方法によって行った⁽⁵⁹⁾。簡単に言えば、細胞を単離バッファー (210 mM マンニトール, 70 mM スクロース, 0.1 mM EDTA, 0.5%BSA (脂肪酸フリー), 5mM HEPES, pH 7.2) 中に回収した。次に、この懸濁液をガラスホモジナイザーで破碎し、1,000×g で 10 分間遠心分離した。上清を回収し、8,500×g、4°C で 15 分間遠心分離し、ペレットをミトコンドリア画分とした。

また、Rebeca の方法によってミトコンドリア膜可溶化物を得た⁽⁵⁵⁾。すなわち、HepG2 細

胞から得たミトコンドリアペレットのいずれかを適当量の PBS に懸濁し、界面活性剤を加えて膜タンパク質を可溶化し、氷上で 5 分間インキュベートした。20,000×g で 30 分間遠心分離後、上清を回収し、1M 6-アミノヘキサン酸中の 5% Serva Blue G 色素を等量加えた。ミトコンドリアの可溶化には以下の界面活性剤を用いた：Dodecilmaltoside (DDM), 14g/g, ジギトニン (DIG), 6 g/g.

4-2-5 BN-PAGE

ブルーネイティブ電気泳動は既報⁽⁴⁶⁾に従い、若干の修正を加えて行なった。簡単に言えば、界面活性剤で可溶化したミトコンドリアサンプルを 2~15% グラジエントゲルに 30 μ g アプライし、電気泳動して呼吸鎖超複合体を分離した。その後、図 1A の様にゲルの半分を複合体の検出に使用した。もう一方は、well を除いた 6 mm~27 mm と 30~60 mm に分画してヘキサン抽出を行なった。

4-2-6 ヘキサン抽出

3 mm もしくは、上下に分画されたゲルを PBS : Methanol : Hexane = 1 : 5 : 10 (v/v/v) 溶液内でビーズクラッシュ (3200 r/min) した。ゲル粉碎後、遠心分離 (4 °C, 3000×g, 5 min) によりヘキサン層を分離して回収した。回収したヘキサンを窒素ガスで揮発させ、100 μ L の IPA を懸濁し CoQ10 分析サンプルとした。

4-2-7 CoQ10 および遊離コレステロールの分析

CoQ10 と遊離コレステロール (FC) の細胞内濃度は、以前に報告された方法に若干の修正を加えて HPLC で測定した^(60, 61)。2 本の分離カラム (Ascentis® C8, 5 μ m, 250 mm × 4.6 mm i.d. and Supelcosil™ LC-18, 3 μ m, 5 cm × 4.6 mm i.d.; Supelco Japan, Tokyo, Japan) と還元カラム (RC-10, 15 mm × 4 mm i.d.; IRICA, Kyoto, Japan) を使用した。移動相は 50 mM NaClO₄ in methanol/IPA (85/15, v/v) とし、0.8 mL/min の流速で供給した。カラムは 25 °C に保たれた。

4-3 結果

4-3-1 CoQ10 投与によるミトコンドリア呼吸鎖超複合体内の CoQ10 量の解析

外因性の CoQ10 はミトコンドリア呼吸鎖超複合体に取り込まれるかの検討を行った。CoQ10 の投与には水溶性 CoQ10 を培養培地中に溶解して投与した。Fig. 16A-B には HepG2 細胞内、および単離したミトコンドリア内の CoQ10 量は濃度依存的に増加した。しかしながら、これらの結果は、細胞膜中および、ミトコンドリア膜中に付着している水溶性 CoQ10 を反映していることは否定できない。次に、Fig. 16C-D に非投与細胞および、CoQ10 投与細胞中の呼吸鎖超複体の解析結果を示した。非投与細胞に比べて、CoQ10 投与細胞から単離したミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の CoQ10 レベルが増加していることがわかる。しかしながらこれらの結果も、呼吸鎖タンパク質に付着している CoQ10 であることは否定できない。第2章の Fig. 9 と比較すると細胞内 CoQ10 量は、1 μ M CoQ10 投与において、半量程度であった。しかしながら、10 μ M CoQ10 投与においては概ね同程度に定量された。興味深いことに、ミトコンドリアレベルでは、1, 10 μ M CoQ10 投与と共に Control に比較して、低値に定量された。さらに、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の CoQ10 レベルも低値に定量されたことから、Psa α レベルの低下により、外因性 CoQ10 の取り込み能が低下していることが示唆された。

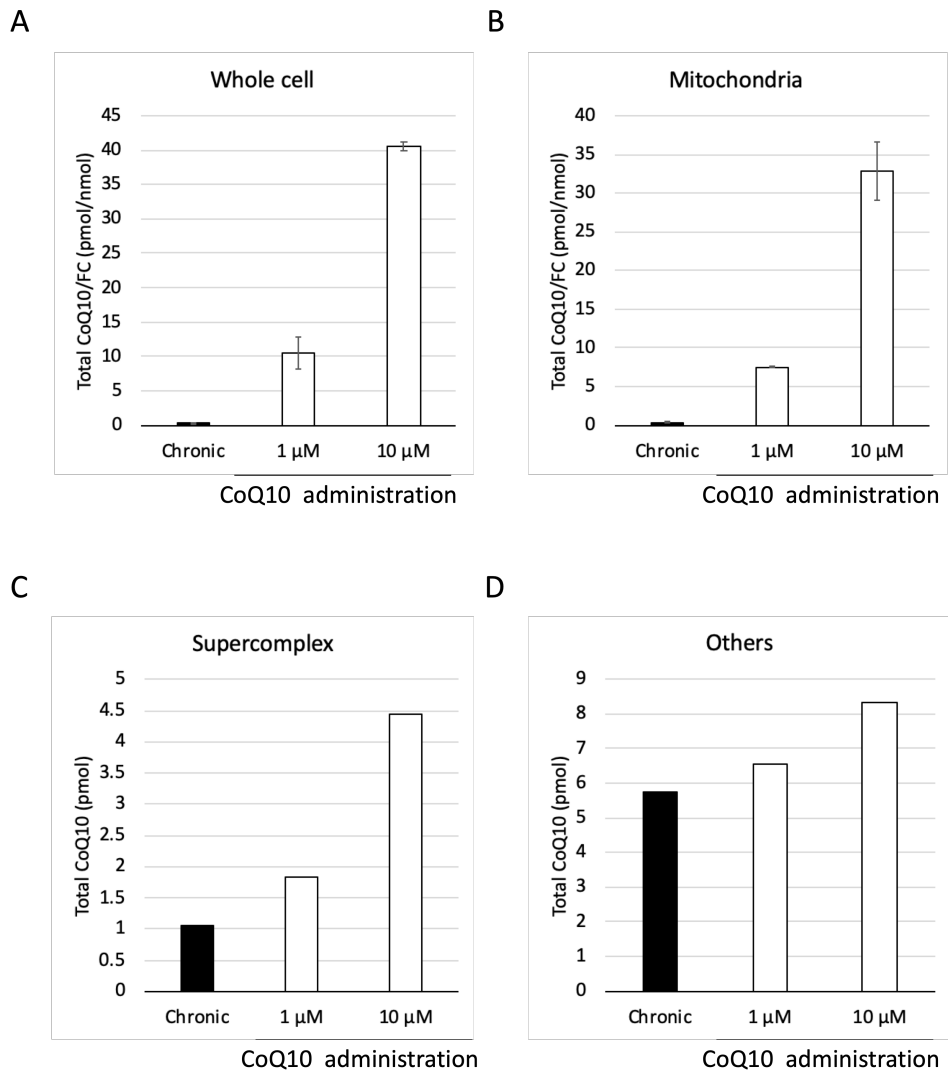


Fig. 16 CoQ10 投与によるミトコンドリア呼吸鎖超複体内 CoQ10 量変動解析

- (A) CoQ10 処理による細胞中の CoQ10 量(黒棒：Control, 白棒：CoQ10 処理)
- (B) CoQ10 処理によるミトコンドリア中の CoQ10 量(黒棒：Control, 白棒：CoQ10 処理)
- (C) CoQ10 処理によるミトコンドリア呼吸鎖超複体内の CoQ10 量(黒棒:Control, 白棒: CoQ10 処理)
- (D) CoQ10 処理によるミトコンドリア呼吸鎖超複体以外の CoQ10 量(黒棒：Control, 白棒：CoQ10 処理)

4-4 考察

第2章に示したミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量の定量手法を用いて、長期 CoQ10 欠乏モデルの呼吸鎖超複合体を解析した。第3章に示したように長期 CoQ10 欠乏モデルでは CoQ 結合タンパク質である Psap レベルが低下していることを見出した。本章で示したように、長期の CoQ10 欠乏モデルにおいて CoQ10 取り込みのレベルに差が観察された。細胞内 CoQ10 量は、1 μ M CoQ10 投与において、半量程度であったが、10 μ M CoQ10 投与においては概ね同程度に定量された。興味深いことに、ミトコンドリアレベルでは、1, 10 μ M CoQ10 投与共に Control に比較して、低値に定量された。さらに、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の CoQ10 レベルも低値に定量されたことから、Psap レベルの低下により、外因性 CoQ10 の取り込み能が低下していることが示唆された。

第5章 結語

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を形成していることが報告されており、内部に CoQ10 が含まれていることも報告されている。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、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の 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、これらのデータもミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の 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。Psap は既に CoQ10 結合タンパク質として見出されている。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、まずミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量の測定手法を確立した。次に細胞内 CoQ10 量変動時の呼吸鎖超複合体内の CoQ10 量がどのように変動するかを解析した。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。

第2章ではミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量の定量手法の確立した。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 BN-PAGE を用いて呼吸鎖タンパク質群を分離した。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。ウェスタンブロットティングもしくは In-gel assay により検出された呼吸鎖超複合体付近に CoQ10 のピークも検出された。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呼吸鎖超複合体タンパク質および、CoQ10 のピークは得られなかった。このことから、得られた CoQ10 のピークは呼吸鎖超複合体中の 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。

本手法を用いて細胞内 CoQ10 量の増減条件下におけるミトコンドリア呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量の解析を行ったところ、呼吸鎖超複合体内の CoQ10 量の変動も確認された。

これらの結果より、本手法により呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量の測定手法が確立できたと考えられる。

第3章では長期 CoQ10 欠乏株における Psap 量変動の解析を行った。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 4-NB を用いた。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 CoQ10 欠乏株において低下が見られた。一過性(CoQ10 低下 3 日目)では、Psap タンパク質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。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。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 Pssp 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章での解析において、長期 CoQ10 欠乏株では、CoQ10 結合タンパク質 Psap レベルが低下したことを見いだした。そこで、第4章では、長期 CoQ10 欠乏株への 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ところ、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。

以上をまとめると、これまでに加齢や様々な疾病において議論されてきた CoQ10 量は細胞およびミトコンドリアレベルであったが、本手法を用いることにより半定量的であるがミトコンドリア呼吸鎖超複合体レベルまで解析することが可能となった。少なくとも、呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量の増減は解析することができると考えられる。また、慢性的な CoQ10 量の低下は、輸送タンパク質である Psap レベルを低下させることが明らかとなった。

引用文献

- 1 Crane FL, Hatefi Y, Lester RL, Widmer C. Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1957; **25**: 220-221.
- 2 Festenstein GN, Heaton FW, Lowe JS, Morton RA. A constituent of the unsaponifiable portion of animal tissue lipids (λ max. 272 m μ). *Biochem J* 1955; **59**: 558-566.
- 3 Morton RA. Ubiquinone. *Nature* 1958; **182**: 1764-1767.
- 4 Moore HW, Folkers K. COENZYME Q. LXII. STRUCTURE AND SYNTHESIS OF RHODOQUINONE, A NATURAL AMINOQUINONE OF THE COENZYME Q GROUP. *J Am Chem Soc* 1965; **87**: 1409-1410.
- 5 Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 1961; **191**: 144-148.
- 6 Mitchell P. The protonmotive Q cycle: a general formulation. *FEBS Lett* 1975; **59**: 137-139.
- 7 Nakamura T. Roles of Coenzyme Q in Basic Biology and Clinical Medicine .pdf. *Journal of Japan Oil Chemists' Society* 1988; **37**: 9.
- 8 Kröger A, Klingenberg M. Further evidence for the pool function of ubiquinone as derived from the inhibition of the electron transport by antimycin. *Eur J Biochem* 1973; **39**: 313-323.
- 9 Littarru GP. Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q. *Clin Investig* 1993; **71**: 587-588.
- 10 Norling B, Glazek E, Nelson BD, Ernster L. Studies with ubiquinone-depleted submitochondrial particles. Quantitative incorporation of small amounts of ubiquinone and its effects on the NADH and succinate oxidase activities. *Eur J Biochem* 1974; **47**: 475-482.
- 11 Rouslin W, Millard RW. Mitochondrial inner membrane enzyme defects in porcine myocardial ischemia. *Am J Physiol* 1981; **240**: H308-313.
- 12 Rouslin W. Mitochondrial complexes I, II, III, IV, and V in myocardial ischemia and autolysis. *Am J Physiol* 1983; **244**: H743-748.
- 13 Henning R, Stoffel W. Ubiquinone in the lysosomal membrane fraction of rat liver. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1972; **353**: 75-78.
- 14 Nyquist SE, Barr R, Morr  DJ. Ubiquinone from rat liver Golgi apparatus fractions. *Biochim Biophys Acta* 1970; **208**: 532-534.
- 15 Zambrano F, Fleischer S, Fleischer B. Lipid composition of the Golgi apparatus of rat kidney and liver in comparison with other subcellular organelles. *Biochim Biophys Acta* 1975; **380**: 357-369.

- 16 Jayaraman J, Ramasarma T. INTRACELLULAR DISTRIBUTION OF COENZYME Q IN RAT LIVER. *Arch Biochem Biophys* 1963; **103**: 258-266.
- 17 Mellors A, Tappel AL. The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol. *J Biol Chem* 1966; **241**: 4353-4356.
- 18 Kagan VE, Serbinova EA, Bakalova RA, *et al.* Mechanisms of stabilization of biomembranes by alpha-tocopherol. The role of the hydrocarbon chain in the inhibition of lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1990; **40**: 2403-2413.
- 19 Tzagoloff A, Dieckmann CL. PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 1990; **54**: 211-225.
- 20 Forsman U, Sjöberg M, Turunen M, Sindelar PJ. 4-Nitrobenzoate inhibits coenzyme Q biosynthesis in mammalian cell cultures. *Nat Chem Biol* 2010; **6**: 515-517.
- 21 Kalén A, Appelkvist EL, Dallner G. Age-related changes in the lipid compositions of rat and human tissues. *Lipids* 1989; **24**: 579-584.
- 22 Ogasahara S, Engel AG, Frens D, Mack D. Muscle coenzyme Q deficiency in familial mitochondrial encephalomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**: 2379-2382.
- 23 López LC, Schuelke M, Quinzii CM, *et al.* Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations. *Am J Hum Genet* 2006; **79**: 1125-1129.
- 24 Collaboration TM-SAR. Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy. *N Engl J Med* 2013; **369**: 233-244.
- 25 Quinzii CM, Emmanuele V, Hirano M. Clinical presentations of coenzyme q10 deficiency syndrome. *Mol Syndromol* 2014; **5**: 141-146.
- 26 Meyer RC, Giddens MM, Coleman BM, Hall RA. The protective role of prosaposin and its receptors in the nervous system. *Brain Res* 2014; **1585**: 1-12.
- 27 Wenger DA, Luzi P, Rafi MA. Lysosomal storage diseases: heterogeneous group of disorders. *Bioimpacts* 2013; **3**: 145-147.
- 28 Grande G, Barrachina F, Soler-Ventura A, *et al.* The Role of Testosterone in Spermatogenesis: Lessons From Proteome Profiling of Human Spermatozoa in Testosterone Deficiency. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022; **13**: 852661.
- 29 Jin G, Kubo H, Kashiba M, *et al.* Saposin B is a human coenzyme q10-binding/transfer protein. *J Clin Biochem Nutr* 2008; **42**: 167-174.
- 30 O'Brien JS, Kishimoto Y. Saposin proteins: structure, function, and role in human lysosomal storage disorders. *Faseb j* 1991; **5**: 301-308.
- 31 Kashiba M, Terashima M, Sagawa T, Yoshimura S, Yamamoto Y. Prosaposin knockdown in Caco-2 cells decreases cellular levels of coenzyme Q10 and ATP, and results in the loss of tight junction barriers. *J Clin Biochem Nutr* 2017; **60**: 81-85.

- 32 Kashiba M, Oizumi M, Suzuki M, *et al.* Prosaposin regulates coenzyme Q10 levels in HepG2 cells, especially those in mitochondria. *J Clin Biochem Nutr* 2014; **55**: 85-89.
- 33 Doering T, Holleran WM, Potratz A, *et al.* Sphingolipid activator proteins are required for epidermal permeability barrier formation. *J Biol Chem* 1999; **274**: 11038-11045.
- 34 Matsuda J, Yoneshige A, Suzuki K. The function of sphingolipids in the nervous system: lessons learnt from mouse models of specific sphingolipid activator protein deficiencies. *J Neurochem* 2007; **103 Suppl 1**: 32-38.
- 35 Yamashita T. Recent advances in the study of glycosphingolipids. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; **13**: 2663-2668.
- 36 Eich C, Manzo C, de Keijzer S, *et al.* Changes in membrane sphingolipid composition modulate dynamics and adhesion of integrin nanoclusters. *Sci Rep* 2016; **6**: 20693.
- 37 Muthusamy T, Cordes T, Handzlik MK, *et al.* Serine restriction alters sphingolipid diversity to constrain tumour growth. *Nature* 2020; **586**: 790-795.
- 38 Russo D, Della Ragione F, Rizzo R, *et al.* Glycosphingolipid metabolic reprogramming drives neural differentiation. *Embo j* 2018; **37**.
- 39 能登 恒. ホートン生化学, H. R. Horton 他著, 鈴木紘一・笠井献一・宗川吉注訳, 東京化学同人, A4,584 頁, 6,400 円. ファルマシア 1998; **34**: 888.
- 40 Genova ML, Lenaz G. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1837**: 427-443.
- 41 Althoff T, Mills DJ, Popot JL, Kühlbrandt W. Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I1III2IV1. *Embo j* 2011; **30**: 4652-4664.
- 42 Heinemeyer J, Braun HP, Boekema EJ, Kouril R. A structural model of the cytochrome C reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria. *J Biol Chem* 2007; **282**: 12240-12248.
- 43 Eubel H, Heinemeyer J, Sunderhaus S, Braun HP. Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria. *Plant Physiol Biochem* 2004; **42**: 937-942.
- 44 Acin-Perez R, Enriquez JA. The function of the respiratory supercomplexes: the plasticity model. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1837**: 444-450.
- 45 Lapuente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, *et al.* Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* 2013; **340**: 1567-1570.
- 46 Schägger H, Pfeiffer K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo j* 2000; **19**: 1777-1783.
- 47 Schägger H. Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life* 2001; **52**: 119-128.
- 48 Schägger H, Pfeiffer K. The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine

- heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 2001; **276**: 37861-37867.
- 49 Schäfer E, Seelert H, Reifschneider NH, Krause F, Dencher NA, Vonck J. Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 2006; **281**: 15370-15375.
- 50 Rieger B, Shalaeva DN, Söhnle AC, *et al.* Lifetime imaging of GFP at CoxVIIIa reports respiratory supercomplex assembly in live cells. *Sci Rep* 2017; **7**: 46055.
- 51 Lenaz G, Genova ML. Supramolecular organisation of the mitochondrial respiratory chain: a new challenge for the mechanism and control of oxidative phosphorylation. *Adv Exp Med Biol* 2012; **748**: 107-144.
- 52 Benard G, Faustin B, Galinier A, *et al.* Functional dynamic compartmentalization of respiratory chain intermediate substrates: implications for the control of energy production and mitochondrial diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; **40**: 1543-1554.
- 53 Calvo E, Cogliati S, Hernansanz-Agustín P, *et al.* Functional role of respiratory supercomplexes in mice: SCAF1 relevance and segmentation of the Q(pool). *Sci Adv* 2020; **6**: eaba7509.
- 54 Enríquez JA. Supramolecular Organization of Respiratory Complexes. *Annu Rev Physiol* 2016; **78**: 533-561.
- 55 Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Peleato ML, Pérez-Martos A, Enriquez JA. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* 2008; **32**: 529-539.
- 56 Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1660**: 171-199.
- 57 Manzar H, Abdulhusein D, Yap TE, Cordeiro MF. Cellular Consequences of Coenzyme Q10 Deficiency in Neurodegeneration of the Retina and Brain. *Int J Mol Sci* 2020; **21**.
- 58 Nakamura T. Trends in Coenzyme Q10 Research. *Biomedical and Clinical Aspects of Coenzyme Q* 1980; **2**: 3.
- 59 Trounce IA, Kim YL, Jun AS, Wallace DC. Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmittochondrial cell lines. *Methods Enzymol* 1996; **264**: 484-509.
- 60 Okamoto M, Shimogishi M, Nakamura A, *et al.* Differentiation of THP-1 monocytes to macrophages increased mitochondrial DNA copy number but did not increase expression of mitochondrial respiratory proteins or mitochondrial transcription factor A. *Arch Biochem Biophys* 2021; **710**: 108988.
- 61 Nagase M, Yamamoto Y, Mitsui J, Tsuji S. Simultaneous detection of reduced and oxidized forms of coenzyme Q10 in human cerebral spinal fluid as a potential marker of oxidative stress. *J Clin Biochem Nutr* 2018; **63**: 205-210.

- 62 Knapp-Wilson A, Pereira GC, Buzzard E, *et al.* Maintenance of complex I and its supercomplexes by NDUF-11 is essential for mitochondrial structure, function and health. *J Cell Sci* 2021; **134**.
- 63 Greggio C, Jha P, Kulkarni SS, *et al.* Enhanced Respiratory Chain Supercomplex Formation in Response to Exercise in Human Skeletal Muscle. *Cell Metab* 2017; **25**: 301-311.
- 64 Linnane AW, Kopsidas G, Zhang C, *et al.* Cellular redox activity of coenzyme Q10: effect of CoQ10 supplementation on human skeletal muscle. *Free Radic Res* 2002; **36**: 445-453.
- 65 Eggens I, Elmberger PG, Löw P. Polyisoprenoid, cholesterol and ubiquinone levels in human hepatocellular carcinomas. *Br J Exp Pathol* 1989; **70**: 83-92.
- 66 Dallner G, Sindelar PJ. Regulation of ubiquinone metabolism. *Free Radic Biol Med* 2000; **29**: 285-294.
- 67 Quinzii CM, Tadesse S, Naini A, Hirano M. Effects of inhibiting CoQ10 biosynthesis with 4-nitrobenzoate in human fibroblasts. *PLoS One* 2012; **7**: e30606.
- 68 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 2001; **25**: 402-408.
- 69 Tharyan RG, Annibal A, Schiffer I, *et al.* NFYB-1 regulates mitochondrial function and longevity via lysosomal prosaposin. *Nat Metab* 2020; **2**: 387-396.
- 70 Schnabel D, Schröder M, Fürst W, *et al.* Simultaneous deficiency of sphingolipid activator proteins 1 and 2 is caused by a mutation in the initiation codon of their common gene. *J Biol Chem* 1992; **267**: 3312-3315.
- 71 Bradová V, Smíd F, Ulrich-Bott B, Roggendorf W, Paton BC, Harzer K. Prosaposin deficiency: further characterization of the sphingolipid activator protein-deficient sibs. Multiple glycolipid elevations (including lactosylceramidosis), partial enzyme deficiencies and ultrastructure of the skin in this generalized sphingolipid storage disease. *Hum Genet* 1993; **92**: 143-152.
- 72 Hulková H, Cervenková M, Ledvinová J, *et al.* A novel mutation in the coding region of the prosaposin gene leads to a complete deficiency of prosaposin and saposins, and is associated with a complex sphingolipidosis dominated by lactosylceramide accumulation. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 927-940.
- 73 Elleder M, Jerábková M, Befekadu A, *et al.* Prosaposin deficiency -- a rarely diagnosed, rapidly progressing, neonatal neurovisceral lipid storage disease. Report of a further patient. *Neuropediatrics* 2005; **36**: 171-180.
- 74 Fujita N, Suzuki K, Vanier MT, *et al.* Targeted disruption of the mouse sphingolipid activator protein gene: a complex phenotype, including severe leukodystrophy and wide-spread storage of multiple sphingolipids. *Hum Mol Genet* 1996; **5**: 711-725.

- 75 Panigone S, Bergomas R, Fontanella E, *et al.* Up-regulation of prosaposin by the retinoid HPR and its effect on ceramide production and integrin receptors. *Faseb j*2001; **15**: 1475-1477.
- 76 Toyofuku T, Nojima S, Ishikawa T, *et al.* Endosomal sorting by Semaphorin 4A in retinal pigment epithelium supports photoreceptor survival. *Genes Dev* 2012; **26**: 816-829.

謝辞

本博士論文は、2019年4月から2022年10月までの約4年間の東京工科大学大学院 バイオ情報メディア研究科 バイオニクス専攻の細胞酸化ストレス研究室において得られた研究成果をまとめたものです。

本研究を進めるにあたり、たくさんの方に大変お世話になりましたので、ここに深く御礼申し上げます。

まず、研究を行うにあたり、いつも前向きな姿勢でのアドバイスや、数え切れないほどの激励のお言葉頂戴し、モチベーションを上げていただきました加柴美里教授に厚く御礼申し上げます。

また、本論文の第2章は、当研究室修士1年生の佐藤誠治君に、第3章は2019年に本学を修了した竹内光君との共同研究によるものです。文句も言わずに本研究に多くの助力を賜りましたので厚く御礼申し上げます。

引退後であるにも関わらず快くご指導を賜りました山本順寛教授、また機器のメンテナンス等をしていただきました藤澤章雄教授と温かく見守ってくださった助教の永瀬翠先生に心より感謝申し上げます。さらに、本研究の実験方法や、研究に対する姿勢などを丁寧に指導いただきました山本研究室 2016 年度修士卒業生の田中裕人先輩に厚く御礼申し上げます。

東京工科大学編入以前には、実験技術の基礎を厳しくも温かくご指導いただきました田中秀幸先生をはじめ日本工学院八王子専門学校の先生方に厚く御礼申し上げます。

そして、実験方法の改善において、ご協力いただきました東京工科大学橋野賢名誉教授と、工学部の上野祐樹先生に深く感謝いたします。

最後に充実した学生生活を提供していただきました東京工科大学職員の方々や友人、そして最後まで応援し、自分を信じてくれた家族に深く感謝いたします。

令和4年 菅原響介