

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500872

研究課題名(和文) コエンザイムQ10結合蛋白質によるミトコンドリア電子伝達系の機能調節

研究課題名(英文) Prosaposin regulates coenzyme Q10 levels in HepG2 cells especially those in mitochondria

研究代表者

加柴 美里 (KASHIBA, Misato)

東京工科大学・教養学環・講師

研究者番号：80338186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：コエンザイムQ10 (CoQ10) はミトコンドリア電子伝達系の必須因子である。研究代表者らは、CoQ10結合蛋白質としてサポシンBとその前駆体蛋白質プロサポシンを分離同定した。本研究着手までに、プロサポシン高発現株では、細胞内、特にミトコンドリアのCoQ10量が増加することを見出している。本研究では、プロサポシン高発現株のミトコンドリア機能を検討した。酸素消費速度は、プロサポシン高発現株で上昇していた。ミトコンドリア電子伝達速度も高発現株で上昇していた。細胞内活性酸素量は高発現株で低下していた。これらの結果より、プロサポシンは細胞のCoQ10の量と機能の維持に重要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Coenzyme Q10 (CoQ10) is a key component of the mitochondrial electron transfer chain and an important antioxidant. We previously reported that saposin B (SapB) binds CoQ10 in human cells. To elucidate the physiological role of this complex, we made stable transfectants (Tf) of HepG2 that express prosaposin (Psap), precursor of saposin B. We also established Psap knockdown strain (KD). CoQ10 contents decreased in the following order: Wt-Tf > parent > KD. CoQ10 contents in mitochondrial fraction also decreased in the same order. Since CoQ10 is a component of the mitochondrial electron transfer chain, rate of oxygen consumption is measured by using Clark-type electrode. Rate of oxygen consumption increased in Tf. Reduced form of CoQ10 is a strong antioxidant. Cellular ROS levels are analyzed by using fluorescence probe DCFH-DA. DCF level was reduced in Tf. These data show that saposin B and/or its precursor Psap regulates cellular CoQ10 level and its effect in HepG2 cells.

研究分野：病態生化学

キーワード：コエンザイムQ10 プロサポシン ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

コエンザイム Q10 (CoQ10) はミトコンドリア電子伝達系の必須因子である。脂質である本物質の輸送や代謝には、本脂質と結合し、これを可溶化する蛋白質の存在が考えられる。研究代表者らは、水溶液であるヒト尿に脂質の CoQ10 が存在することに注目し、ヒト尿から CoQ10 結合蛋白質を分離同定した。CoQ10 結合蛋白質はサポシン B とその前駆体蛋白質プロサポシンであった。プロサポシン、サポシン B と CoQ10 との結合については、下記点がすでに明らかになっている。

(1) サポシン B モノクローナル抗体を作成し、ヒト尿やヒト細胞のライゼートを免疫沈降したところ、沈降物中にサポシン B と CoQ10 が共存していることを確認し、サポシン B がヒト細胞内でも CoQ10 と結合して存在していることを確認した。

(2) プロサポシン遺伝子量を遺伝子工学手法を用いて改変した細胞を樹立し、細胞内の CoQ10 量を解析したところ、細胞内の CoQ10 量はプロサポシン高発現株では増加し、ノックダウン株では低下していた。つまり、細胞のプロサポシン蛋白質量と CoQ10 量とに相関が認められた。

(3) プロサポシン高発現株およびノックダウン株の細胞内小器官を遠心分離手法にて分画したところ、ミトコンドリア分画において、CoQ10 量の増減が顕著にみとめられた。

以上のことから、CoQ10 結合蛋白質プロサポシンは、細胞の、特にミトコンドリア分画の CoQ10 量の維持に重要であると考えられた。また、プロサポシン蛋白質量は、加齢や病態でその蛋白質量が増減することが報告されている。

2. 研究の目的

CoQ10 結合蛋白質プロサポシン、サポシン B の生理機能について検討する。研究開始時点までの背景において、細胞内のプロサポシン量は細胞内、特にミトコンドリアの CoQ10 量維持に必須の蛋白質であることが示されていたことから、細胞内で本蛋白質量が増減した際の CoQ10 関連の細胞機能の変化を解析する。具体的には、下記点を検討する。

(1) CoQ10 がミトコンドリア電子伝達系の必須因子であることから、ミトコンドリア電子伝達系の酸素消費速度や電子伝達速度がプロサポシンの増減でいかに変動するのかを解析する。

(2) ミトコンドリア電子伝達系は細胞の活性酸素産生の主たるサイトである。プロサポ

シン蛋白質量が変化した場合の細胞内 ROS 量の変化について検討する。

本検討を通じて、CoQ10 結合蛋白質プロサポシンによる細胞のエネルギー代謝や活性酸素産生の調節機構が明らかとなることは、細胞の老化メカニズムやその抑制手法への理論基盤となることが期待される。

3. 研究の方法

(1) プロサポシン高発現株とノックダウン株の樹立

プロサポシン高発現株およびノックダウン株については、既に樹立しており(基盤研究(C)H21-H23 課題番号 21500698) これら細胞株を使用した。

(2) 細胞内プロサポシン量の定量

細胞内プロサポシン量はウエスタンブロッティング手法を用いて定量した。

(3) CoQ10 量の定量

細胞やミトコンドリア画分の CoQ10 量は HPLC-ECD を用いて測定した。細胞等からの抽出は、2-プロパノールを用いて行った。

(4) 酸素消費速度の測定

クラークタイプの酸素電極を用いて測定した。細胞をジギトニン処理した後、呼吸基質や阻害剤を添加し、酸素消費速度を測定した。測定に使用する基質と阻害剤を図 1 に示す。

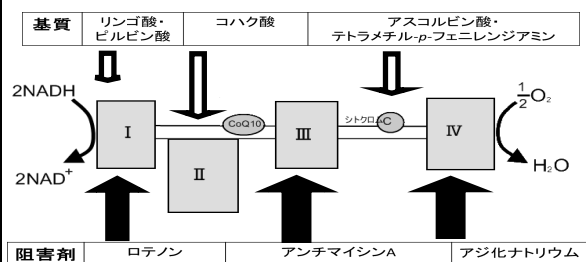


図1ミトコンドリア電子伝達系の基質と阻害剤

(5) ミトコンドリア電子伝達速度の解析

細胞からシュークロース-マンニトール法によりミトコンドリアを分画し、文献 (Method Enzymology (1996) 264:484-509) の手法に従い電子伝達速度の解析を行った。

(6) 細胞内活性酸素量の定量

細胞内の活性酸素量の定量は、蛍光プローブ DCFH-DA を用いておこなった。

4. 研究成果

(1) プロサポシン高発現株、ノックダウン株のプロサポシン量の確認

ウエスタンブロッティング手法を用いて、プロサポシン高発現株およびノックダウン株の細胞内プロサポシン、サポシンB量の定量を行った。結果、プロサポシン高発現株では確かにプロサポシン、サポシンB量ともに増加していること、また、ノックダウン株では低減していることを確認した。プロサポシン高発現株のプロサポシン蛋白質質量解析結果を下記図2に示す。

(2) プロサポシン高発現株、ノックダウン株のCoQ10量

プロサポシン高発現株では細胞内CoQ10量が増加していること、ノックダウン株では、低下していることを確認した。

プロサポシン高発現株の細胞内CoQ10量測定結果を下記図2に示す。

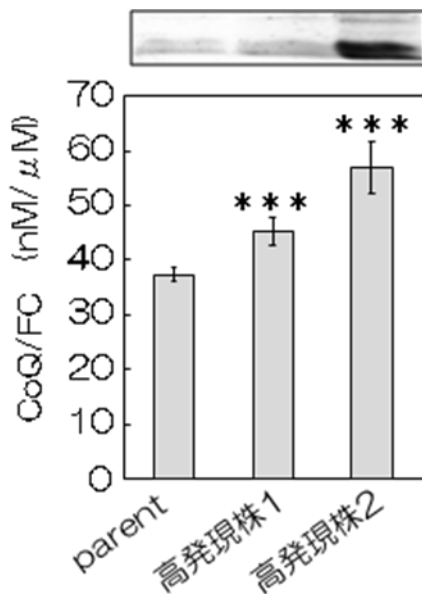


図2 (上) プロサポシン高発現HepG2細胞のサポシンB抗体を用いたウエスタンブロッティング。プロサポシン高発現株ではサポシンB蛋白質質量が増加している。(下)細胞内CoQ10量(表記の値は細胞内フリーコレステロール(FC)量で補正したもの)。プロサポシン高発現株ではCoQ10量が増加している。

(3) プロサポシン高発現株、ノックダウン株のミトコンドリアCoQ10量

プロサポシン高発現株およびノックダウ

ン株から、シュークロースマンニトール法を用いてミトコンドリアを分画し、ミトコンドリア中のCoQ10量を解析した。結果、高発現株ではCoQ10量が増加しており、ノックダウン株ではCoQ10量が低下していた。

(4) プロサポシン高発現株の酸素消費速度

プロサポシン高発現株の酸素消費速度を測定した。結果、プロサポシン高発現株では酸素消費速度が亢進していた。

(5) プロサポシン高発現株のミトコンドリア電子伝達速度

プロサポシン高発現株から、シュークロース-マンニトール法にてミトコンドリアを分画し、文献(Method Enzymology (1996) 264:484-509))の手法に従い、電子伝達速度を測定した。結果、プロサポシン高発現株のミトコンドリアは、コンプレックスIからIIIへの電子伝達速度も、IIからIIIへの電子伝達速度も亢進していた。

(6) プロサポシン高発現株の細胞内活性酸素量

プロサポシン高発現株とコントロール株の細胞内活性酸素量を蛍光プローブDCFH-DAを用いて解析した。結果、プロサポシン高発現株でDCFH-DA由来の蛍光強度が低下しており、活性酸素産生が抑制されていることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Kashiba M, Oizumi M, Suzuki M, Sawamura Y, Nagashima K, Yoshimura S, Yamamoto Y. Prosaposin regulates coenzyme Q10 levels in HepG2 cells, especially those in mitochondria.

J Clin Biochem Nutr. 査読あり

2014 Sep;55(2):85-9.

doi: 10.3164/jcfn.13-106. Epub 2014 Jul 4.

〔学会発表〕(計10件)

マクロファージはコエンザイムQ10結合タンパク質プロサポシンと貪食した組織中のコエンザイムQ9を細胞外に分泌する

下岸雅憲、田中裕人、森内寛、吉村真一、加柴美里、山本順寛

日本コエンザイムQ協会第12回研究会

2015年2月3日

東京工科大学、東京都八王子市

コエンザイム Q10 結合タンパク質プロサポシンによる細胞接着の制御
根本 亘、加柴美里、鈴木優、吉村真一、山本順寛
第 29 回日本酸化ストレス学会関東支部会
2014 年 12 月 20 日
筑波大学東京キャンパス文京校舎、東京都文京区

コエンザイム Q10 結合タンパク質プロサポシンによる CoQ 酸化還元動態の制御
加柴美里、大泉美希子、寺嶋政之、吉村真一、山本順寛
第 67 回日本酸化ストレス学会学術集会
2014 年 9 月 4 日
同志社大学、京都府京都市上京区

The role of prosaposin and saposin B as the coenzyme Q10 binding and transfer protein
Yorihiro Yamamoto, Makoto Hasegawa, Kazunari Takase, Mayuko Nishimura, Miyoshi Nagao, Yoshihiro Yamazaki, Yuki Kakizawa, Hiroshi Moriuchi, Junko Matsuda, Misato Kashiba, Shinichi Yoshimura
17th biennial meeting of society for free radical research international
2014 年 3 月 25 日
京都国際会議場、京都府京都市左京区

Prosaposin regulates Coenzyme Q10 levels in HepG2 cells especially those in mitochondria
Misato Kashiba, Mikiko Oizumi, Masaru Suzuki, Yoshimi Sawamura, Tatsuya Sakemi, Kohei Nagashima, Hiroshi Moriuchi, Shinichi Yoshimura, Yorihiro Yamamoto
17th biennial meeting of society for free radical research international
2014 年 3 月 25 日
京都国際会議場、京都府京都市左京区

コエンザイム Q10(CoQ10)結合蛋白質プロサポシンは細胞内 CoQ10 量を制御する
加柴美里、大泉美希子、鈴木優、澤村佳美、長嶋康平、ジョン・チュンユン、森内寛、吉村真一、山本順寛
第 66 回日本酸化ストレス学会学術集会
2013 年 6 月 13 日
ウインクあいち、愛知県名古屋市中村区

CoQ10 結合蛋白質プロサポシン発現量改变株の細胞内 CoQ10 量と活性酸素量の変動
ジョン・チュンユン、長嶋康平、森内寛、加柴美里、吉村真一、山本順寛
第 10 回日本コエンザイム Q 協会研究会
2013 年 2 月 1 日

東京工科大学、東京都八王子市

コエンザイム Q10 結合タンパク質プロサポシンの血漿レベルとリポタンパク質との相互作用
宮内優樹、緋田哲也、永瀬翠、森内寛、加柴美里、吉村真一、山本順寛
第 10 回日本コエンザイム Q 協会研究会
2013 年 2 月 1 日
東京工科大学、東京都八王子市

マイクロ二次元電気泳動を用いた CoQ 結合タンパク質サポシン B の定量法の開発
野村剛、田中秀幸、加柴美里、森内寛、吉村真一、山本順寛、藤沢章雄
第 10 回日本コエンザイム Q 協会研究会
2013 年 2 月 1 日
東京工科大学、東京都八王子市

コエンザイム Q10 結合タンパク質プロサポシンの母乳中での役割
宮内優樹、関学、宮前多佳子、石田史彦、森内寛、加柴美里、横田俊平、山本順寛
第 65 回日本酸化ストレス学会学術集会
2012 年 6 月 7 日
徳島県郷土文化会館、徳島県徳島市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加柴 美里 (KASHIBA, Misato)
東京工科大学・教養学環・講師
研究者番号：80338186

(2) 研究分担者

山本 順寛 (YAMAMOTO, Yorihiro)
東京工科大学・応用生物学部・教授
研究者番号：60134475

(3) 連携研究者

笠原 恵美子 (KASAHARA, Emiko)
大阪市立大学・医学部・特任講師
研究者番号：30468269

影山 晴秋 (KAGEYAMA, Haruaki)
桐生大学・医療保健学部・准教授
研究者番号：00433839

(4) 研究協力者

吉村 真一 (YOSHIMURA, Shinichi)
東京工科大学・非常勤講師