

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500681

研究課題名（和文） 遺伝子改変動物や培養細胞を用いたコエンザイム Q10 結合蛋白質の生理的意義の解明

研究課題名（英文） Biological relevance of Coenzyme Q10 binding protein. -Study with prosaposin knockout animal and cell lines-

研究代表者

山本 順寛 (YAMAMOTO YORIHITO)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：60134475

研究成果の概要（和文）：代表者らはサポシンBがCoQ10結合蛋白質であることを報告してきた。サポシンB前駆体タンパク質プロサポシンのノックアウトマウスでは、CoQ投与食添加後の血漿中や臓器中の外因性CoQ量が低下し、外因性のCoQがミトコンドリアに到達しないことを見出した。ヒト肝がん由来HepG2細胞のプロサポシン発現量改変株解析の結果、高発現株ではCoQ10量が増加し、ノックダウン株では減少することを見出した。以上の知見から、サポシン類は、CoQ10量の維持に必須のタンパク質であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Coenzyme Q10 (CoQ10) is necessary for ATP biosynthesis. It also is an antioxidant. Saposin B (SapB) is a CoQ10 binding protein.

Analysis using prosaposin (Psap, precursor of SapB) knockout mouse revealed that concentrations of exogenous CoQ10 in plasma and liver were significantly reduced in homo-type animal. Psap transfectant (Tf) and knockdown (KD) HepG2 cells are established. CoQ10 contents decreased as follows: Tf > parent > KD. These data imply that SapB and/or its precursor Psap is a modulator for CoQ10 contents.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学 応用健康科学

キーワード：コエンザイム Q10, プロサポシン, サポシン, 脂質, 脂質結合タンパク質, ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

CoQ10 は、ミトコンドリア電子伝達系の一員としてエネルギー産生に必須なベンゾキノン誘導体である。ベンゾキノン型である酸化型は2電子還元されるとヒドロキノン型である還元型となり、強い還元力を持つ。ミトコンドリア膜のみならずあらゆる生体膜そしてリポ蛋白質に還元型 CoQ10 が存在するのは、抗酸化物質として生体脂質を酸化ストレスから防御するためと考えられている。細胞の CoQ10 濃度は加齢とともに大きく減少する (Karen A et al. *Lipids* (1989) 24: 579-584) . 例えば、心臓では20歳でピークとなり、40歳で30%、80歳で50%以上が失われるが、その原因は不明である。

CoQ10は10単位のイソプレレン側鎖を持つ脂溶性物質である。CoQはミトコンドリア、ゴルジ、ペルオキシソームで生合成され、他のオルガネラやリポ蛋白質に輸送されると考えられている。水に不溶である本脂質の輸送にはCoQ10の結合/輸送蛋白質が必要であると考えられる。研究代表者らは、ヒト尿からCoQ10を結合している蛋白質の分離をし、それがサポシンBであることを明らかにした (J. Clin. Biochem. Nutr. (2008) 42: 167-174) . サポシンBはスフィンゴ脂質の代謝酵素に必要な因子として知られ、CoQ10と同様に細胞内外にユビキタスに存在する。

本研究計画申請時に既に解明されていたCoQ結合タンパク質としてのサポシンBの特性を下記に示す。

(1) サポシンBに結合する脂質の特異性

CoQ10などの脂質へのヘキサン溶液とサポシンBの水溶液を混和すると、脂質が水相に移行し、サポシンBと結合することを確認した。結合能はCoQ10が最も強く、イソプレレン鎖が短くなると結合が弱まることが明らかとなった。側鎖のさらに短い α -トコフェロールの結合能は小さく、コレステロールは全く結合しなかった。

(2) サポシンBのポリクローナルおよびモ

ノクローナル抗体の作成

サポシンBを大量精製し、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を作成した。本抗体は、ウエスタンブロット法や免疫沈降法に有用であることを確認した。

(3) サポシンB-CoQ10複合体の細胞内での存在確認

サポシンBポリクローナルおよびモノクローナル抗体を用いて、ヒト精子やヒト肝癌由来細胞 (HepG2細胞) のライゼートを免疫沈降したところ、沈殿物中にサポシンB蛋白質とCoQ10を検出した。このことから、サポシンBは細胞内でもCoQ10を結合していると考えられる。

2. 研究の目的

ATP産生に不可欠であり抗酸化物質としても重要であるが、加齢とともに細胞内濃度が減少するコエンザイムQ10 (CoQ10) が加齢・老化に伴う機能障害の鍵を握る物質の一つとして注目を集めている。脂溶性であるCoQ10の細胞内外への輸送にはその結合蛋白質が必須であり、研究代表者らは世界で初めてサポシンBがCoQ10結合蛋白質であることを明らかにした (J. Clin. Biochem. Nutr. (2008) 42: 167-174) . 遺伝子工学手法によりCoQ結合蛋白質サポシンBをノックダウンまたは高発現させたマウスや動物細胞を用いて、サポシンBの生理的意義や加齢・老化に対する影響を解明する。

3. 研究の方法

CoQ10結合蛋白質 (サポシンB) の生理的意義を明らかにするために、サポシンBの前駆体であるプロサポシンのノックアウトマウスを解析した。ワイルド体、ヘテロ体、ホモ体の各臓器中のCoQ等の濃度を測定し、比較した。

次に、ヒト肝癌由来HepG2のプロサポシンの高発現株やノックダウン株を用いて、

CoQ10 とサポシン B の各オルガネラやサイトゾルにおける分布を測定した。

(1) プロサポシンノックアウトマウスを用いたCoQ10 結合蛋白質の生理的意義の解明

サポシン B はその前駆体蛋白質プロサポシンがリソソームで加水分解されて生成する蛋白質であることから、プロサポシンノックアウトマウスを用いる。プロサポシンノックアウトマウスは University of North Carolina の Suzuki らにより作製されている。その受精卵を入手し、東海大学医学部吉村眞一講師(連携研究者)のもとで繁殖させ、さらにヘテロ体を交配することによりホモ体を得られる。

ホモ体は発育が悪く、生後 1 ヶ月程度で死亡すると報告されている (Hum Mol Genet (1996) 5: 711-25) ので、生後 3 週齢で解剖した。心臓、肝臓、腎臓、脳、肺、筋肉、小腸、脾臓、皮膚などの臓器と血漿中の脂質等の測定を行い、3 週齢のワイルド体やヘテロ体のそれと比較した。

測定項目は、CoQ9 (酸化型と還元型)、CoQ10 (酸化型と還元型)、ビタミン E、コレステロール、コレステロールエステル、プロサポシン、サポシン B である。

(2) プロサポシン遺伝子改変培養細胞を用いたCoQ10 結合蛋白質の生理機能の解明

遺伝子工学技術を用いて、ヒト培養細胞にプロサポシンのノックダウン株あるいはプロサポシンを高発現させた細胞株を作製することができる。プロサポシン遺伝子のノックダウンには miRNA 手法を用いた。ノックダウンには BLOCK-iT POL II miR RNAi Expression Vector (Invitrogen) を用いる。

プロサポシン遺伝子ノックダウンに必要な DNA オリゴ遺伝子配列は BLOCK-iT RNAi Designer (Invitrogen) を用いて設計した。作製した DNA オリゴをベクターに組み込み、少なくとも 2 種類のベクターがプロサポシン遺伝子をノックダウンすることを確認した。これによりヒト肝癌由来 HepG2 細胞のプロサ

ポシンそしてサポシン B のノックダウン株を作製した。一方、プロサポシン高発現株を作成するために、cDNA コンストラクトとして pcDNA3.1/V5-His TOPO (Invitrogen 社) を用いた。

4. 研究成果

(1) プロサポシンノックアウトマウスを用いたCoQ10 結合蛋白質の生理的意義の解明

CoQ10 結合蛋白質 (サポシン B) の生理的意義を明らかにするために、サポシン B の前駆体であるプロサポシンのノックアウトマウスを解析した。そのヘテロ体の受精卵を入手し、繁殖させ、さらにヘテロ体を交配することによりホモ体を得られることを確認している。ワイルド体、ヘテロ体、ホモ体の各臓器中の CoQ 等の濃度を測定し、比較した。さらには CoQ 添加食を投与し、ワイルド体、ヘテロ体、ホモ体の各臓器中の CoQ 等の濃度を測定し、比較した。結果、ホモ体においては、CoQ 投与食添加後の血漿中および臓器中の外因性 CoQ 量が有意に低下していることを認めた。

さらに肝臓の細胞小器官を分画し、各細胞小器官における CoQ 量を解析した。結果、プロサポシンノックアウトマウスでは、外因性の CoQ がミトコンドリアに到達していないことを見いだした。

(2) プロサポシン遺伝子改変培養細胞を用いたCoQ10 結合蛋白質の生理機能の解明

ヒト肝癌由来 HepG2 のプロサポシンの高発現株やノックダウン株を用いて、細胞内 CoQ10 量を解析した。高発現株では CoQ10 量が増加し、ノックダウン株では CoQ10 量が減少していた。

さらに、細胞小器官に分画して解析したところ、高発現株ではミトコンドリア CoQ10 量が上昇し、ノックダウン株では減少していた。CoQ10 はミトコンドリア電子伝達系に必須の因子である。高発現株を解析したところミトコンドリア呼吸活性が上昇していた。また、ノックダウン株では外因性の CoQ10 の取り込

みが低下することも明らかとなった。

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5件)

- (1) Toriumi K, Horikoshi Y, Henzan H, R. Osamura Y, Yamamoto Y, Nakamura N, Takekoshi S
Carbon tetrachloride induced hepatic injury through the formation of oxidized diacylglycerol and its activation of the PKC/NF- κ B pathway
Lab Invest, 93, 218-229 (2013).
査読有
10.1038/labinvest.2012.145
- (2) Miyamae T, Seki M, Naga T, Uchino S, Asazuma H, Yoshida T, Iizuka Y, Kikuchi M, Imagawa T, Natsumeda Y, Yokota S, Yamamoto Y
Increased Oxidative Stress and Coenzyme Q10 Deficiency in Juvenile Fibromyalgia: Amelioration of Hypercholesterolemia and Fatigue by Ubiquinol-10 Supplementation
Redox Report, 18, 12-19 (2013).
査読有
10.1179/1351000212Y.0000000036
- (3) Nishi K, Takasu A, Shinozaki H, Yamamoto Y, Sakamoto T
Hemodilution as a result of aggressive fluid resuscitation aggravates coagulopathy, but not survival, in a rat model of uncontrolled hemorrhagic shock
J Trauma Acute Care Surg, g, 74, 808-12 (2013). 査読有

10.1097/TA.0b013e31827e1899

- (4) Wada H, Hagiwara S, Saitoh E, Ieki E, Yamamoto Y, Adcock IM, Goto H
Up-regulation of blood arachidonate (20:4) levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease
Biomarkers, 17, 520-523 (2012).
査読有
10.3109/1354750X.2012.692393
- (5) Nishi K, Takasu A, Shibata M, Uchino S, Yamamoto Y, Sakamoto T
Hypothermia reduces resuscitation fluid volumes required to maintain blood pressure in a rat hemorrhagic shock model
J Trauma Acute Care Surg, 72, 130-135 (2012). 査読有
10.1097/TA.0b013e31821e61d8

[学会発表] (計9件)

- (1) 柿澤祐樹, 山崎好裕, 勇内山広樹, 長谷川誠, 森内寛, 山本順寛
コエンザイムQ10結合タンパク質プロサポシンはビタミンEも結合する
2012, 1, 24 日本コエンザイムQ協会研究会
発表場所: 東京都
- (2) ジョン・チュンユン, 長嶋康平, 大泉美希子, 鈴木優, 森内寛, 加柴美里, 吉村眞一, 山本順寛
コエンザイムQ結合蛋白質プロサポシン発現量変株の酸化ストレスに対する感受性
2012, 1, 24 日本コエンザイムQ協会研究会
発表場所: 東京都
- (3) 関学, 浅利真司, 長尾美好, 山本順寛, 吉村眞一
ヒト・プロサポシン過剰発現マウスにおけるコエンザイムQとビタミンEの体内動態

2012, 1, 24 日本コエンザイム Q 協会研究会
発表場所：東京都

(4) 宮内優樹, 関学, 宮前多佳子, 藤田秀次郎, 石田史彦, 森内寛, 加柴美里, 横田俊平, 山本順寛

母乳中のコエンザイム Q10 とその結合タンパク質プロサポシン

2012, 1, 24 日本コエンザイム Q 協会研究会
発表場所：東京都

(5) 加柴美里, 大泉美希子, 鈴木優, 澤村佳美, 寺嶋政之, 長嶋康平, 及川慎吾, ジョン・チュンユン, 森内寛, 吉村眞一, 山本順寛
プロサポシン遺伝子の改変で細胞内 CoQ10 の量とその酸化還元状態が変わる

2011, 12, 10 日本酸化ストレス学会 関東支部会

発表場所：東京都

(6) Honda K, Wada H, Tamura M, Takata S, Nakamura M, Yasutake T, Kurai D, Ishii H, Goto H, Fujii K, Yamamoto Y

Reduction of oxidative stress in successfully treated patients with community acquired pneumonia (CAP), as measured by redox status of coenzyme Q10 (%CoQ-10)

2011, 9, 30 European Respiratory Society Meeting, Amsterdam, Nederland

(7) 吉村眞一, 長尾美好, 浅利真司, 川合巧真, 関学, 内野晋也, 加柴美里, 山本順寛, 大塚正人, 猪子英俊

ヒト・プロサポシン過剰発現マウスにおける CoQ 含量とサポシン B の組織内分布

2011, 1, 28 日本コエンザイム Q 協会研究会
発表場所：東京都

(8) 山本順寛, 加柴美里, 吉村眞一
コエンザイム Q10 結合タンパク質プロサポシンファミリーの生理的意義に関する考察

2011, 1, 28 日本コエンザイム Q 協会研究会

発表場所：東京都

(9) Yorihiro Yamamoto, Misato Kashiba, and Shinichi Yoshimura

Saposin B and its precursor protein prosaposin play key roles in absorption and transfer of CoQ10

The 6th Conference of the International Coenzyme 10 Association

May 27-30, 2010

Bedford Hotel, Brussels, Belgium

[図書] (計 2 件)

(1) 山本順寛

コエンザイム Q10 と皮膚

「機能性化粧品と薬剤デリバリー」杉林堅正木仁, 市橋正光監修 シーエムシー出版 (2013) 印刷中

(2) Yorihiro Yamamoto

Plasma marker of oxidative stress in circulation and in tissue

“Free Radical Biology in Digestive Diseases. Front Gastrointest Res” Eds. by Naito Y, Suematsu M, Yoshikawa T, Karger (2011) pp 64-70

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 順寛 (YAMAMOTO YORIHRO)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：60134475

(2) 研究分担者

加柴 美里 (KASHIBA MISATO)

東京工科大学・医療保健学部・講師

研究者番号：80338186

(3) 連携研究者

吉村 眞一 (YOSHIMURA SHINICHI)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：30230808