様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　６ 月 ２５ 日現在

機関番号：３２６９２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ０１８４２

研究課題名（和文）ミトコンドリア呼吸鎖超複合体中のコエンザイムQ10量は加齢により低下するのか？

研究課題名（英文）Analysis of coenzyme Q10 contents in mitochondrial respiratory supercomplexes

研究代表者
加柴　美里（KASHIBA, Misato）

東京工科大学・教養学環・准教授

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）：ミトコンドリア電子伝達系タンパク質群は,それぞれ独立ではなく超複合体を形成して存在している.　CoQ10も本コンプレックスに含まれて存在している.
CoQ10の組織内濃度は，加齢やさまざまな病態で減少することが報告されている．しかしながら，ミトコンドリア電子伝達系の真に電子を伝達しているCoQ10量が，加齢や病態時に変動しているのかは不明である．本研究では，呼吸鎖超複合体に結合して存在しているCoQ10量の定量手法を確立した.

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究では，呼吸鎖超複合体に結合して存在しているコエンザイムQ10（CoQ10）量の定量手法を確立した．今までの測定手法では，加齢やさまざまな病態において，細胞内のCoQ10量が低下することはわかっていても，エネルギーを産生するミトコンドリア電子伝達系のまさに電子伝達を行うCoQ10が不足しているのか，他の細胞内小器官のCoQが減少しているのかを区別して測定することができなかった．今後，本解析手法を応用することにより，加齢やさまざまな病態におけるCoQ10の欠損とそのメカニズムが解明され，治療法の開発にも寄与することが期待される.

研究成果の概要（英文）：Recent experimental evidence has replaced the random diffusion model of electron transfer with a model of supermolecular assemblies containing complexes I, III, and IV, known as supercomplexes (SCs, respirasomes). Coenzyme Q10 (CoQ10) is reported to be contained in SCs. Cellular and tissue levels of CoQ10 decrease with aging and under various diseases conditions. However, level of CoQ10 in SCs also decreased by aging and under various diseases conditions or not is not known. In this study, we have developed a new method to measure CoQ10 content in SCs.

研究分野：病態生化学

キーワード：ミトコンドリア　呼吸鎖超複合体　コエンザイムQ10　ブルーネイティブ電気泳動

１．研究開始当初の背景

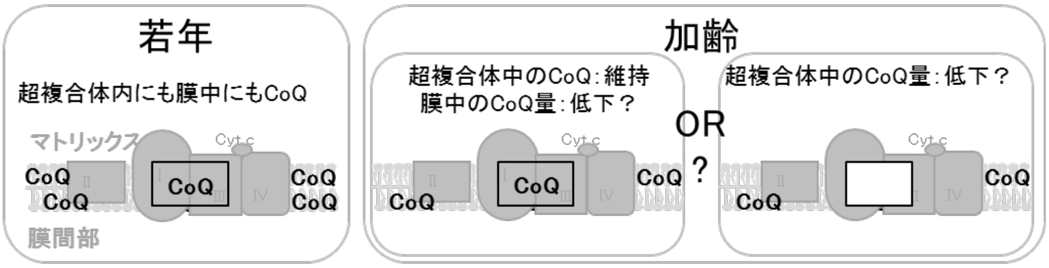
ミトコンドリア電子伝達系は，コンプレックス 1〜5 のタンパク質群と，コエンザイム Q10 (CoQ10)，チトクロム C から構成されている．近年の研究により，ミトコンドリア電子伝達系タンパク質群は，それぞれ独立ではなく超複合体を形成して存在していることが分かってきた (Science. 340(6140):1567(2013)）．具体的には，コンプレックス I，コンプレックス III，コンプレックス IV の超複合体が検出されており，CoQ10 も本コンプレックスに含まれて存在していることを示すデータが報告されている（Molecular Cell 32:529 (2008)).

CoQ10 は，ミトコンドリア電子伝達系の必須因子として，エネルギー産生に関与している．CoQ10 は，ミトコンドリア内膜のみでなく，核膜，形質膜等，さまざまな生体膜にユビキタスに存在している（Biochim Biophys Acta. 1660:171(2004))．これら膜系では，還元型の CoQ10 は抗酸化物質としても重要である．

CoQ10 の組織内濃度は，加齢に伴い減少することが報告されている（Lipids. 24(7):579 (1989))．また，いくつかの病態で細胞内の CoQ10 量の低下が報告されており，本現象と病態との関連が注目されている．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での CoQ10 量を解析したものであり，ミトコンドリア電子伝達系の真に電子を伝達している CoQ10 量が，加齢により変動しているのかは不明である．実際，ミトコンドリア内膜の CoQ10 量は，mol 比で計算するとミトコンドリア電子伝達系のタンパク質群量に比べて，大過剰に存在する．従って細胞レベルで CoQ10 が減少しても，電子伝達系への影響は不明である．

２．研究の目的

加齢に伴いミトコンドリア呼吸機能は低下するが，その原因は解明されていない．ミトコンドリア電子伝達系は呼吸鎖超複合体を形成しており，コエンザイム Q10（CoQ10）もこの中に含まれて存在しているらしい．　背景に記載のごとく，CoQ10 の細胞全体中の濃度は加齢に伴い減少するが，呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量が加齢により変動するかは不明である．本研究は，呼吸鎖超複合体に結合して存在している CoQ10 量の定量手法を確立する．さらに，呼吸鎖超複合体への CoQ10 輸送機構の解明を試みる．本研究により，加齢や様々な病態によるミトコンドリア呼吸機能低下の一因が解明されるとともに，より有効な CoQ10 補充法の開発が期待される．



図：加齢により細胞内の CoQ 量は低下するが，ミトコンドリア超複合体中の CoQ 量は維持されるのだろうか？あるいは，ミトコンドリア超複合体中の CoQ 量も減少するのであろうか？

３．研究方法

本研究方法は下記４点からなる．

(1)　ミトコンドリア呼吸鎖超複合体に含まれる CoQ 量の解析手法の確立．
具体的には，呼吸鎖超複合体をブルーネイティブ電気泳動（BN-PAGE）にて分離し，複合体画分から抽出された CoQ を HPLC-ECD にて定量する．
(2) CoQ 合成酵素阻害剤投与時の CoQ 量解析．
(3) サプリメントとして投与した CoQ がミトコンドリア呼吸鎖超複合体に取り込まれるかを検討する．
(4) 呼吸鎖超複合体へのCoQ 取り込み機構の解明，特にCoQ10 結合タンパク質プロサポシンの役割解明．

４．研究成果

(1) ミトコンドリア呼吸鎖超複合体に含まれるCoQ量の解析手法の確立

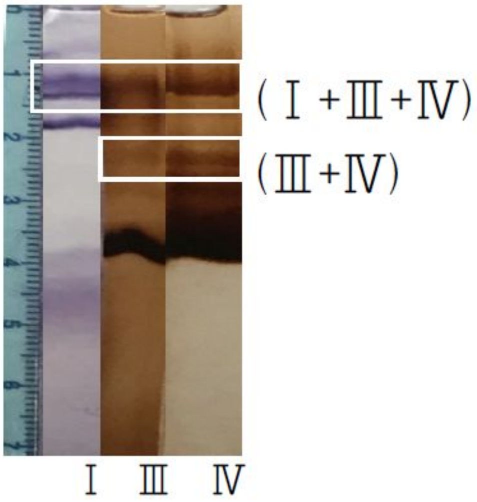


図1 ミトコンドリアを分画し，ブルーネイティブ電気泳動にて分離した．ゲルを分割し，その一部をin gel assayにて染色した．電気泳動度10 mm付近に複合体I，III，IVのバンドを認めたことから，超複合体を検出したと考えられる．

呼吸鎖超複合体をブルーネイティブ電気泳動（BN-PAGE）にて分離し，複合体画分から有機溶媒を用いてCoQを抽出し，抽出されたCoQをHPLC-ECDにて定量した．まずは分画したミトコンドリアをブルーネイティブ電気泳動（BN-PAGE）にて分離する技術を確立した．BN-PAGEはネイティブ電気泳動を改良した電気泳動手法であり，タンパク質複合体を壊すことなく，分子量により分画することができるとされている．主に膜蛋白質複合体の解析に用いられてきており，ミトコンドリア呼吸鎖超複合体に関する既報もBN-PAGEが多用されている．最初，用いる界面活性剤の種類を検討した．本点に関しては，ジギトニンを用いると呼吸鎖超複合体が検出されること，またn-Dodecyl-maltosideを用いるとコンプレックスIやIVが分解して電気泳動されることなど，既報どおりの結果が得られることを確認した．ジギトニンを用いて呼吸鎖超複合体の構造を維持したままで電気泳動した実験結果例を図１に示す．電気泳動度10 mm付近に複合体I，III，IVのバンドを認めたことから，超複合体を検出したと考えられる．

電気泳動の際，ゲルの残り半分は，3 mm間隔で切り出した．切り出したゲルからのCoQ抽出は，有機溶媒を用いておこなった．ゲルの破砕にはBEADS CRUSHERを用いた．サンプルからのCoQの抽出と測定についても検討し，抽出手法を確立した．実際にHepG2細胞からミトコンドリアを抽出し，解析した実験結果を図2に示す．ゲル中のCoQを測定したところ，電気泳動度9～18 mm付近にCoQのピークを認めた．電気泳動距離から，このCoQは超複合体中に含まれるCoQであると考えられる．また，DDM添加サンプルでは，泳動度10 mm付近にCoQのピークをみとめないこと，タンパク質を含まないCoQのみの泳動サンプルでは，ゲルからCoQが回収されないことも確認した．

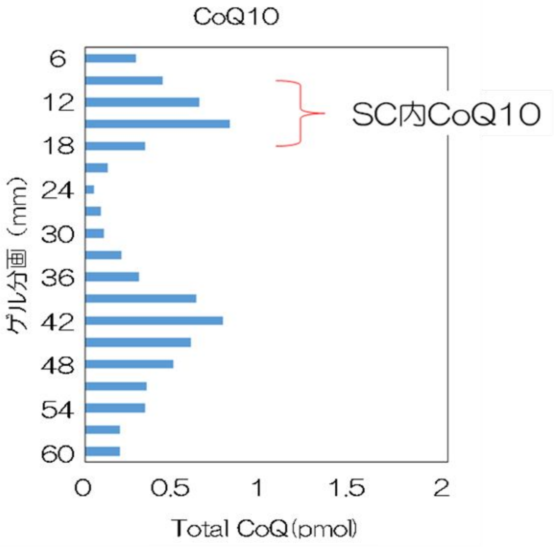


図2 残りのゲルを3 mm間隔に分けて，ヘキサン抽出した．それぞれのフラクションのCoQ値を測定した．

(2) CoQ 合成酵素阻害剤投与時の CoQ 量解析

CoQ10 合成阻害剤の添加により，超複合体中の CoQ10 量がまず低下し，その後，ミトコンドリアの他のフラクションの CoQ10 が低下することがわかった．CoQ 合成を阻害して CoQ 値が低下した細胞を作成し，その後，この細胞の CoQ 合成を再開させると，呼吸鎖超複合体中の CoQ 量からまず増加し，合成酵素阻害以前より高値となった．このことから，生合成された CoQ は，まず呼吸鎖超複合体に運ばれることが示唆された．

(3)　サプリメントとして投与した CoQ が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

マウスにCoQ10を投与したのちのマウスの肝臓からミトコンドリアを抽出し，同様にブルーネイティブ電気泳動を行った．しかしながら，マウス肝臓のミトコンドリアの解析では，CoQが高分子側から低分子側にまでブロードに検出され，超複合体中のCoQのみを検出することが難しいことが分かった．本検討については，電気泳動条件の検討等をおこなったが，今後のさらなる検討を必要とする．

(4)　呼吸鎖超複合体へのCoQ 取り込み機構の解明，特にCoQ10 結合タンパク質プロサポシンの役割解明

コエンザイムQ10結合蛋白質プロサポシンに注目している．ミトコンドリアを分離精製したところ，プロサポシン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低下していた．これら遺伝子改変株のミトコンドリア超複合体に含まれるCoQ10量の解析を行ったところ，プロサポシンノックダウン株では，超複合体中のCoQ値が低値であった．本実験結果より，超複合体へのCoQの輸送にはプロサポシンが関与していることが示唆された．

５．主な発表論文等

〔学会発表〕（計 3 件）

1. 菅原響介，中村朱里，田中裕人，山本順寛，藤沢章雄，加柴美里
ミトコンドリア電子伝達系呼吸鎖超複合体中のコエンザイム Q10 量の解析
第 71 回日本酸化ストレス学会学術集会
2018（平成 30）年 5 月 17 日（木）〜18 日（金）　京都

2. Kyousuke Sugawara, Yuto Tanaka, Akio Fujisawa, Yorihiro Yamamoto, Misato Kashiba
Incorporation of CoQ10 in mouse mitochondrial respiratory supercomplexes
8th Joint Meeting of Society for Free Radical Research Australasia and Japan
2017 年 12 月 9 日（土）〜12 日（火）Tokyo

3. 菅原響介，田中裕人，山本順寛，加柴美里
ミトコンドリア電子伝達系超複合体内の CoQ10 量測定法の確立と応用
第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会
2017（平成 29）年 6 月 28 日（水）〜29 日（木）つくば

６．研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：山本 順寛
ローマ字氏名：YAMAMOTO, yorihiro
所属研究機関名：東京工科大学
部局名：応用生物学部
職名：教授
研究者番号（8 桁）：60134475