

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11778

研究課題名(和文) ミトコンドリア呼吸鎖超複合体へのコエンザイムQ10輸送機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of coenzyme Q10 in mitochondrial supercomplex

研究代表者

加柴 美里 (KASHIBA, Misato)

東京工科大学・教養学環・教授

研究者番号：80338186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000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、超複合体を形成して存在している。CoQ10も本複合体に含まれる。CoQ10の組織内濃度は、加齢やさまざまな病態で減少する。しかし、CoQ10量減少時の、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量の変動は不明である。我々は、ブルーネイティブ電気泳動手法とHPLC-ECDによるCoQ10の分析手法を駆使し、呼吸鎖超複合体中のCoQ10量定量手法を確立した。本研究では、細胞のCoQ10量低下時の呼吸鎖超複合体中のCoQ10量を検討した。結果、呼吸鎖超複合体中のCoQ10量も低下していることを見出した。

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るが、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。今回の測定結果より、呼吸鎖超複合体中のCoQ10量も低下することが認められた。今後、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 by various diseases conditions or not is not known. We have developed a new method to measure CoQ10 content in SCs. In this study, we analyzed the level of CoQ10 in SCs, and found out that the level of CoQ10 in SCs decreased in CoQ10 deficient cells.

研究分野：病態生化学

キーワード：呼吸鎖超複合体 ミトコンドリア コエンザイムQ10

1. 研究開始当初の背景

現在、老化に関する仮説は数多く提唱されているが、その1つに「老化ミトコンドリア原因説」が存在する。加齢に伴い、ミトコンドリアの呼吸機能が低下することが報告されている。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、コンプレックス1~5のタンパク質群と、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も本超複合体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))。実際、研究代表者らの解析でも、ブルーネイティブ電気泳動手法にて分離したミトコンドリア呼吸鎖超複合体画分にCoQ10の存在を確認している。

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))。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部位のCoQ10量や本部位へのCoQ10輸送量が、加齢により変動しているのかは不明である。

本研究の「問い」は、CoQ10が欠乏した細胞では、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体中のCoQ10量も低下しているのか?である。

2. 研究の目的

加齢や様々な病態により、組織中のCoQ10量は低減する。しかしながら、ミトコンドリア呼吸鎖の、まさに電子伝達を行っている場所にあるCoQ10量も低下しているのか、あるいは、このCoQ10レベルには変動はなく、細胞の他の部位のCoQ10のみが低下しているのかは不明である。本研究の目的は、CoQ10が欠乏した細胞では、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体

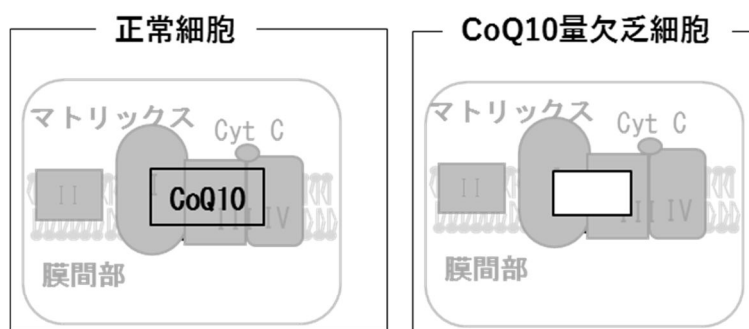


図1 研究目的のイメージ図

ミトコンドリア呼吸鎖は超複合体を形成し、ユビキノリン (CoQ10)も超複合体中に含まれている。CoQ10量欠乏細胞では、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体中のCoQ10量も低下するのか?

中のCoQ10量も低下しているのかを解析することである。研究目的のイメージ図を図1に示す。我々が確立してきたブルーネイティブ電気泳動手法とHPLC-ECDによるCoQ10の分析手法を駆使して解析を行う。

具体的には、CoQ10合成阻害剤を用いて、長期間CoQ10量が低下した細胞モデルを樹立し、樹立した細胞のミトコンドリア呼吸鎖超複合体中のCoQ10量の解析を行う。

3. 研究の方法

(1) HepG2 細胞の呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量の解析

ヒト肝がん由来細胞 HepG2 を培養した。細胞からのミトコンドリアの分画は、遠心分離手法を用いて行った。

CoQ10 量減少細胞モデルの樹立

本研究には、安定して CoQ10 量が低下している細胞株を用いて解析することが重要である。CoQ10 量低下細胞株を樹立した。具体的には、CoQ10 合成阻害剤である 4-ヒドロキシ安息香酸 (4-NB) を長期間 (6 カ月 ~ 1 年半) 投与した細胞モデルを作製した。作製した細胞において、CoQ 量が低下していることを確認した。

また、実験によっては、4-NB の濃度を変更させて検討した。

また、短期間の 4-NB 投与 (3 日) の実験も併せて行った。

CoQ 量減少細胞モデルの呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量測定

ミトコンドリアをジギトニン処理し、可溶化した。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手法にて分離した。その後、ゲルを切り出し、有機溶媒中で CoQ10 を抽出した。抽出した CoQ10 を HPLC-ECD を用いて解析した。測定手法のイメージ図を図 2 に示す。

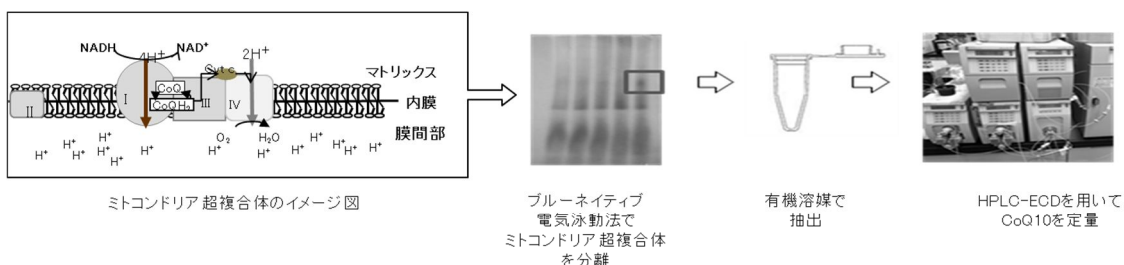


図2 実験概要のイメージ図

ミトコンドリア超複合体をブルーネイティブ電気泳動法で分離し、インゲルアッセイにてバンドを認識後、切り出す。これを有機溶媒中で抽出し、抽出した脂質をHPLC-ECDを用いて分離する。

(2) 実験動物(マウス)の臓器中の呼吸鎖超複体の解析

実験動物(マウス)の肝臓及び脳中の呼吸鎖複合体中の CoQ 量の解析を行った。

4. 研究成果

(1) HepG2 細胞の呼吸鎖超複体の解析

呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量の解析手法の確認

HepG2 細胞中の呼吸鎖複合体中の CoQ 測定系の確認を中心に行った。具体的には、インゲルアッセイにてスーパーコンプレックスの存在を確認していたが、これが本当に目的とするバンド、目的とするタンパク質であるかの検証を行った。検証は複合体それぞれに特異的な抗体を用いたウエスタンブロッティング手法を用いた。結果、複合体 I を含む呼吸鎖超複体の存在を確認した。複合体 III のタンパク質と複合体 IV のタンパク質もこのフラクションに含まれることを確認した。この複合体のフラクションを切り出し、ヘキサン抽出し、HPLC-ECD を用いて測定することにより、超複体に CoQ が含まれていることを確認した。

CoQ10 量減少細胞モデルの樹立と呼吸鎖超複合体中の CoQ10 量の測定

本研究には、CoQ 量低下細胞モデルの樹立が必要不可欠である、4-ニトロ安息香酸を用いて、細胞内の CoQ10 量が低下した細胞モデルを樹立した。呼吸鎖複合体画分とその他の部位の CoQ10 量がともに顕著に低下していることを確認した。4-NB 濃度を变化させたときの細胞内濃度、ミトコンドリア濃度、呼吸鎖超複合体中の CoQ10 濃度を図 3 に示す。

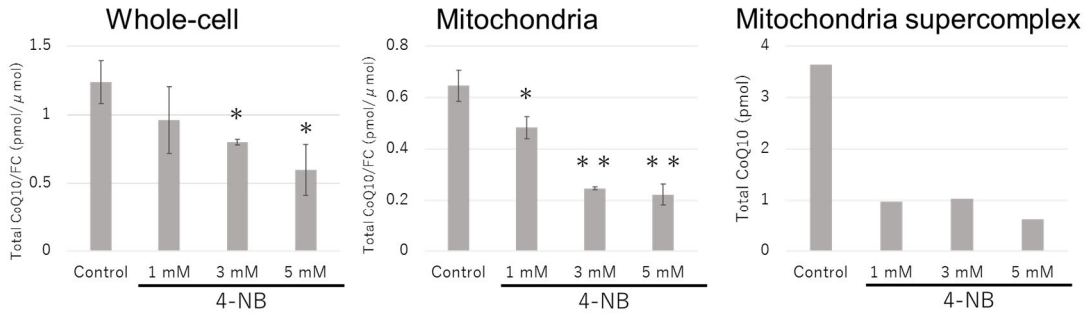


図 3 4-ニトロ安息香酸(4-NB)投与により、細胞内CoQ10量を低下させたときの細胞中、ミトコンドリア中、呼吸鎖超複合体中のCoQ10量も低下している。

CoQ10 量減少細胞モデルの呼吸鎖超複体の解析

上述のごとく、CoQ 量低下細胞モデルを用いて解析をおこなった。興味深いことに、CoQ10 欠乏細胞株においては、呼吸鎖超複体の構成そのものが変化していることを見出した(図 4)。これは、CoQ10 低下によるミトコンドリアの機能変化に関与すると考えられ興味深い。

(2) 実験動物(マウス)の臓器中の呼吸鎖超複体の解析

実験動物の臓器の解析も行い、脳や肝臓の呼吸鎖複合体からの CoQ10 量の測定もおこなった。いずれの臓器からも、複合体 I, III, IV の存在と、呼吸鎖超複体の確認ができた。しかしながら、電気泳動後に測定した CoQ10 量は、細胞の実験とは異なり、呼吸鎖複合体の存在部位のみに局在するのではなく、他の部位にも多く存在した。

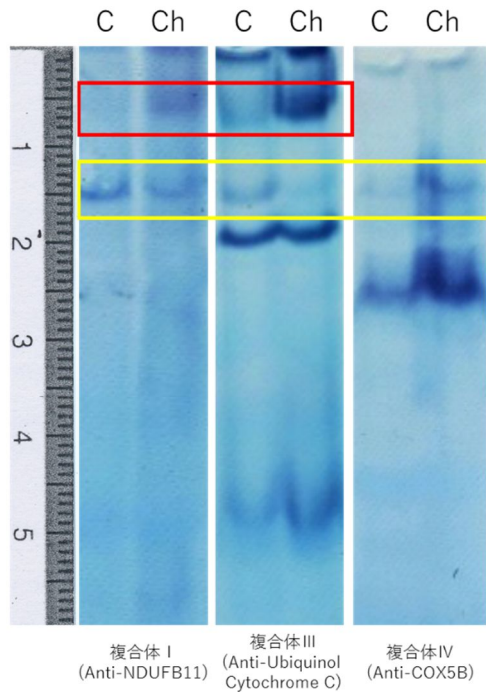


図 4 コントロール細胞 (C) と、4-NB 投与細胞 (Ch) のブルーネイティブ電気泳動結果。4-NB 投与細胞では、高分子の複合体量が増加する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kyoussuke Sugawara, Yuto Tanaka, Akari Nakamura, Tsukika Tanaka, Akio Fujisawa, Yorihiro Yamamoto, Misato Kashiba
2. 発表標題 Establishment of analytical method to detect Coenzyme Q10 level in mitochondrial supercomplex
3. 学会等名 20th Biennial Meeting of SFRR International (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅原 響介, 田中裕人, 中村朱里, 山本順寛, 藤沢章雄, 加柴美里
2. 発表標題 ミトコンドリア呼吸鎖超複合体中のCoQ量定量手法の開発
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅原響介, 竹内光, 田中月佳, 中村朱里, 田中裕人, 山本順寛, 藤沢章雄, 加柴美里
2. 発表標題 長期間コエンザイムQ10低下細胞モデルのミトコンドリア呼吸鎖複合体の解析
3. 学会等名 第74回酸化ストレス学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅原響介, 佐藤誠治, 田中裕人, 中村朱里, 藤沢章雄, 山本順寛, 加柴美里
2. 発表標題 ミトコンドリア呼吸鎖超複体内のCoQ10測定手法の確立と応用
3. 学会等名 第18回日本コエンザイムQ協会研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	和田 裕雄 (WADA Hiroo) (50407053)	順天堂大学・大学院医学研究科・教授 (32620)	
研究分担者	亀田 貴寛 (KAMEDA Takahiro) (80758558)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------