

論文の内容の要旨

コエンザイム Q10 結合蛋白質の発見とその機能

氏名 金 光植

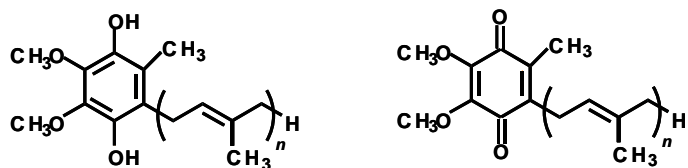
【緒論】

コエンザイム Q10 は真核細胞のミトコンドリア呼吸鎖の電子伝達因子でエネルギー産生に必要な不可欠な成分である。その還元型である Ubiquinol は脂溶性の抗酸化剤として注目されている。日本では 1974 年に心筋代謝改善薬として使われてきていたが、2001 年から食品成分としての利用が認可されている。

コエンザイム Q10 はすべての細胞、細胞小器官にユビキタスに存在する。その生合成部位は ER、ミトコンドリア内膜での合成が限定されることから、ER やミトコンドリア内膜で生合成されたコエンザイム Q10 を他の膜へ輸送するシステムが存在するに違いないが、まだ解明が進んでない。ラットの腹腔に投与された $[^3\text{H}]\text{CoQ10}$ は血漿、脾臓、肝臓、副腎、心臓、腎臓などほとんどすべての臓器に取り込まれていることが確認されている。また、肝臓の各細胞小器官

にも分布され、リソソームで取り込みが一番多く、形質膜、ER、ゴルジ装置、ミトコンドリアなどにも取り込まれていた。コレステロールと α -トコフェロールと同様に血漿中のコエンザイム Q10 は LDL レセプターを介した細胞内取り込みが考えられる。しかし、コエンザイム Q10 の取り込みと各臓器での LDL レセプターの分布は必ずしも一致するものではなく、LDL レセプターを介した細胞内取り込みだけでは完全に説明ができず、コエンザイム Q10 結合蛋白質の関与が強く示唆されていた。

当研究室では尿中のコエンザイム Q10 が蛋白質に結合していることを見出していたが、本論文はそれを発展させたものである。この蛋白質を各種クロマトグラフィーで精製し、同定した結果、コエンザイム Q10 の結合蛋白質はサポシン B であることが明らかになった。また、サポシン B を大量精製し、ポリクローナル抗体の作製と結合実験に用いた。作製したポリクローナル抗体を用いて、HepG2 細胞及びヒト精子でもサポシン B がコエンザイム Q10 を結合していることを明らかにした。試験管の結合実験によりサポシン B の結合能はコエンザイム Q10 (CoQ10) > コエンザイム Q9 (CoQ9) > コエンザイム Q7 (CoQ7) > α -トコフェロール (α -Toc) の順であり、側鎖が長いほど強く結合することを明らかにした。



Human: n = 10
Mouse, rat: n = 9

Ubiquinol

Ubiquinone

Fig. 1 Ubiquinol (reduced form of Coenzyme Q) and Ubiquinone (oxidized form of Coenzyme Q)

【実験と結果】

1) ヒト尿中コエンザイム Q10 結合蛋白質の分離と同定

ヒト尿から遠心分離により細胞成分を除去し、PD-10 カラムで脱塩し、セントリカットを用いて濃縮した。バッファー置換後 Proteome Lab PF-2D (PF-2D) システム (Beckman Coulter) にロードし、等電点クロマトグラフィーを行った。得られた各分画中のコエンザイム Q10 の濃度を HPLC-ECD で測定 (以後コエンザイム Q10 の濃度は HPLC-ECD で測定) した結果、コエンザイム Q10 は pH 4.5 付近で溶出された蛋白質分画中に含まれていた (Fig. 2)。このことから、コエンザイム Q10 結合蛋白質の等電点は 4.5 であることが分かった。

ヒト尿中コエンザイム Q10 結合蛋白質を、陰イオン交換クロマトグラフィー (DEAE)、ゲル濾過クロマトグラフィー (Gel Filtration)、疎水性クロマトグラフィー (Octyl FF) を用いて、分離精製した。コエンザイム Q10 結合蛋白質は、分画中に含まれるコエンザイム Q10 量を指標として行った。各ステップにおける蛋白質精製純度を 15 % SDS-PAGE で確認した (Fig. 3)。最終的に得られた単一蛋白質分画

中の蛋白質はエドマン分解法を用いて解析したところ、コエンザイム Q10 結合蛋白質は N-末端のアミノ酸配列解析によりサポシン B と同定された (Table 1)。

従来のサポシン B の精製法を改良し、Octyl CL-4B, DEAE sepharose, Superdex 200 gel filtration の順にサポシン B の大量精製を行い、抗体作製と結合実験に供した。

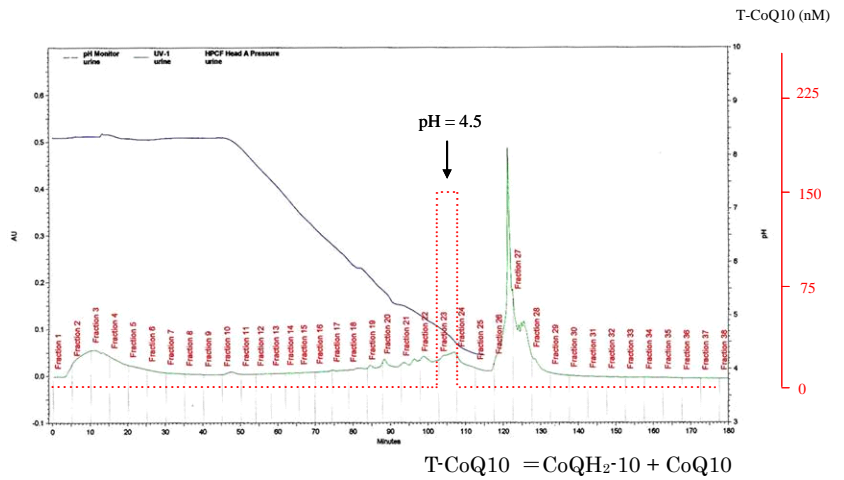


Fig. 2 Chromatofocusing of urinary protein by Proteome Lab PF-2D

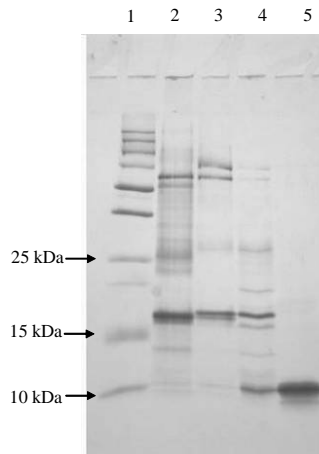


Fig. 3 15% SDS-PAGE (silver stain)

- 1: MW
- 2: Starting material
- 3: DEAE FF fraction
- 4: GF fraction
- 5: Octyl FF fraction

Table 1 Coenzyme Q10 binding protein amino acid composition

amino acid composition	
Coenzyme Q10 binding protein	saposin B from data bank
1 Gly	Gly
2 Asp	Asp
3 Val	Val
4 Cys	Cys
5 Gln	Gln
6 Asp	Asp
7 Tyr	Cys
8 Ile	Ile
9 Gln	Gln
10 Met	Met
11 Val	Val
12 Thr	Thr
13 Asp	Asp
14 Ile	Ile
15 Gln	Gln
16 Thr	Thr
17 Ala	Ala
18 Val	Val
19 Arg	Arg
20 Thr	Thr

2) サポシン B 抗体を用いたヒト尿, 精子, HepG2 細胞での免疫沈降

サポシン B 抗体 (anti sap B IgG) を用いて, ヒト尿を用いた免疫沈降を行った. Fig. 4 に示すように normal IgG とサポシン B 抗体の免疫共沈物を比較したところ, サポシン B 抗体を用いた免疫共沈物にのみ, サポシン B が検出され, コエンザイム Q10 も normal IgG より約 30 倍多かった.

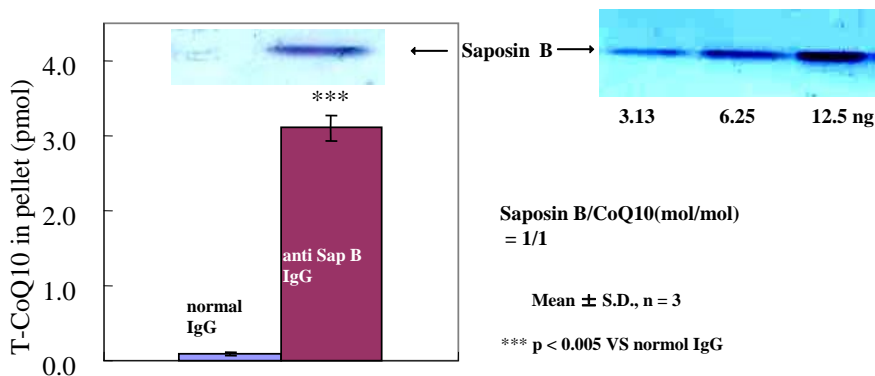


Fig. 4 Immunoprecipitation (IP) of Saposin B antibody in human urine

サポシン B とコエンザイム Q10 の結合は尿特異なのか, それともヒト細胞でもコエンザイム Q10 を結合しているかを解析する目的で, サポシン B 抗体を用いて HepG2 細胞 (ヒトヘパトーマ培養細胞) 及びヒト精子の lysate で免疫沈降を行い, 免疫共沈物に含まれているサポシン B の検出とコエンザイム Q10 の測定を行った. ヒト精子 (Fig. 5 A) と HepG2 細胞 (Fig. 5 B) ともにサポシン B が検出され, 免疫共沈物にコエンザイム Q10 が有意に高濃度含まれていることが分かった. 以上の知見より精子や培養細胞などのヒト細胞中でもサポシン B がコエンザイム Q10 を結合していることが確認された.

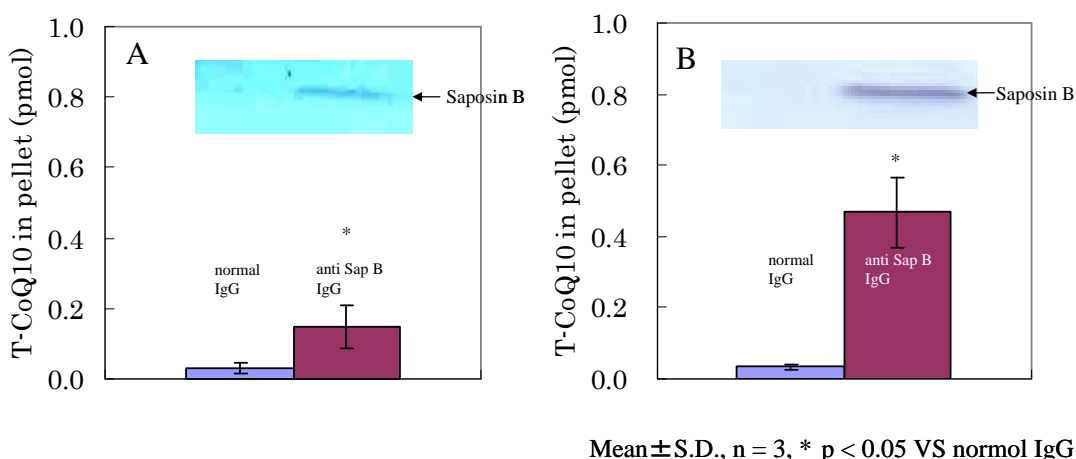


Fig. 5 Immunoprecipitation (IP) of Saposin B antibody in human sperm (A) and HepG2 cell (B)

3) サポシン B と脂質との結合実験

大量精製で得られたサポシン B 溶液と、コエンザイム Q10 や他の脂質のヘキサン溶液と攪拌後、サポシン B 分画へ引き抜かれた脂質量を HPLC-ECD システムを用いて定量した。

Fig. 6 A にコエンザイム Q10 の濃度依存性解析結果を示す。サポシン B の濃度は 0.5 μ M に固定した。ヘキサン層のコエンザイム Q10 が 10 mM の場合、有意な結合が認められた為、以後は脂質の濃度を 10 mM にして結合実験を行った。

HSA (human serum albumin) も同様の実験を行ったが結合能は認められず、コエンザイム Q10 の引き抜きはサポシン B 蛋白質特異的なものであると考えられた。

サポシン B とコエンザイム Q10 の結合能の pH 依存性を検討したところ、酸性では弱い結合能しか認められず、pH 6.4 から結合能の著しい増加が認められ pH 7.4, pH 8.0 で強い結合能を示した (Fig. 6 B)。

サポシン B (Sap B) とコエンザイム Q10 の結合特異性を解析するため、側鎖の異なるコエンザイム Q と α -トコフェロールとサポシン B の結合能を調べた。Fig. 6 C に示すようにコエンザイム Q10, コエンザイム Q9, コエンザイム Q7, α -トコフェロールの順で結合能が弱くなっていた。この結果からサポシン B はコエンザイム Q10 と強く結合し、脂質の結合能は側鎖の長さに依存することが示唆された。以上の結果から、サポシン B は中性から弱アルカリ性でコエンザイム Q10 を強く結合し、また、コエンザイム Q10 に対する結合能が高いことが分かった。

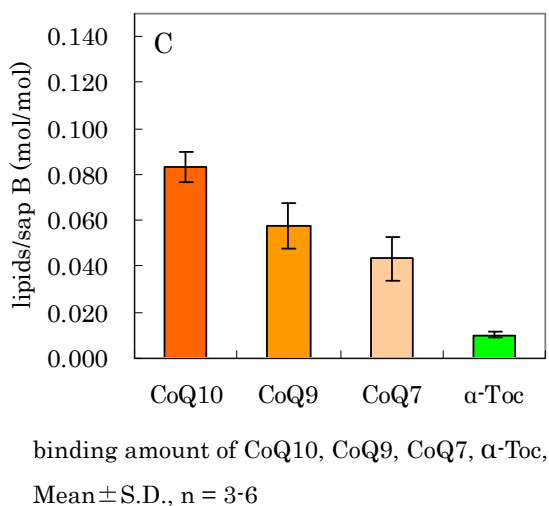
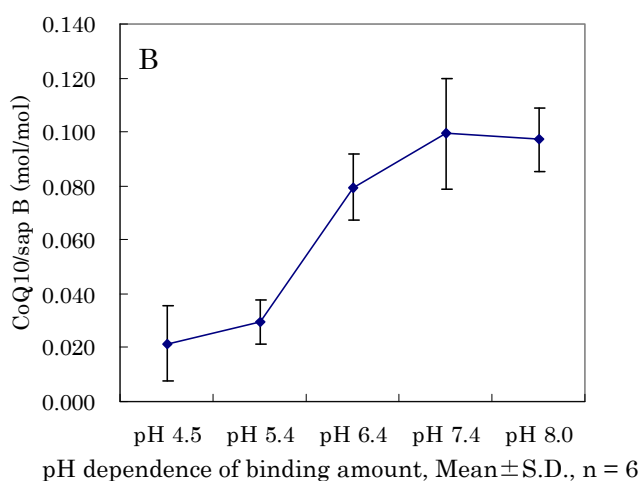
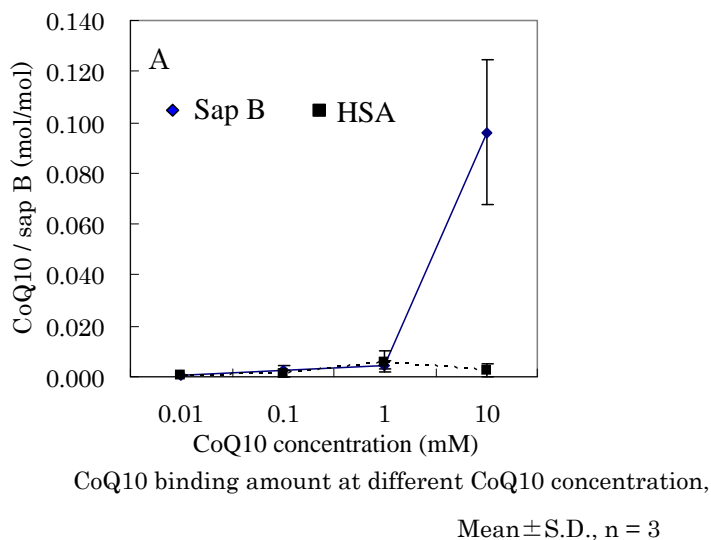


Fig. 6 Lipid's binding assay of Saposin B

【結語】

サポシン B は 1964 年に、スルファチド (スフィンゴ糖脂質) を加水分解する際に必要な蛋白として同定された。その後の研究でサポシン B は α -ガラクトシダーゼ A によるグロボロトリアオシルセラミドの加水分解, β -ガラクトシダーゼによる GM1 ガングリオシドの加水分解などの酵素活性も促進することが報告された。サポシン B は、脂質と水溶性の複合体を形成し、基質 (脂質) が酵素による加水分解を受け易くし、結果的に酵素活性を促進するものと考えられている。サポシン B は試験管の実験でセレブロシド, フォスファチジルコリンなど多種脂質との結合と輸送の可能性も報告されている。

本研究は、サポシン B がヒト尿, 精子, HepG2 細胞でコエンザイム Q10 を結合していることを発見した。また、サポシン B とコエンザイム Q10 の結合に特異性があることが試験管内の実験により示された。サポシン B はほぼすべての組織に存在しており、各細胞小器官にもユビキタスに分布していることが報告されている。コエンザイム Q10 もユビキタスに存在している。以上の知見より、サポシン B が細胞内でコエンザイム Q10 を結合してコエンザイム Q10 の細胞内輸送に関与していることが予想される。サポシン B とコエンザイム Q10 の更なる研究により、今まで不明だったコエンザイム Q10 の吸収, 輸送機構の解明に大きく寄与することと思われる。

【発表論文】

- 1) GuangZhi Jin, Hiroshi Kubo, Horinouchi Ryo, Shinichi Yoshimura, Akio Fujisawa, Misato Kashiba, Yorihiro Yamamoto; Saposin B binds Coenzyme Q10 in human urine, sperm and HepG2 cells, in preparation
- 2) GuangZhi Jin, Horinouchi Ryo, Misato Kashiba, Yorihiro Yamamoto; Saposin B binds γ -tocopherol more preferentially than α -tocopherol, in preparation

【参考論文】

G. Hasegawa, Y. Yamamoto, J.G. Zhi, et al., Acta Diabetol (2005) 42: 179-181