

論文の内容の要旨

論文題目 ヒトミトコンドリア呼吸鎖複合体 II(コハク酸-ユビキノン酸化還元酵素)の多様性とその機能的変化

指導教員 北 潔 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

博士後期課程

国際保健学専攻

冨塚 江利子

【背景・目的】

ミトコンドリアは細胞が生存する上で不可欠なエネルギー転換反応を行なう細胞内小器官である。近年、ミトコンドリアは生物の発生、老化、疾病などに重要な役割を果たしていることが示されている。ミトコンドリアのエネルギー代謝の最終段階である電子伝達系酵素群の一酵素である複合体 II(コハク酸-ユビキノン還元酵素;SQR)は電子伝達系と TCA 回路を直接結ぶ酵素であり、4つの核 DNA 由来のサブユニット(Fp; flavoprotein subunit, Ip; iron-sulfur protein subunit, CybL; cytochrome *b* large subunit, CybS; cytochrome *b* small subunit)により構成されている。複合体 II の遺伝子変異による疾患が報告されているが、ヒトミトコンドリア病においては Fp サブユニットのみの遺伝子変異が報告されている。一方、Fp 以外のサブユニットの遺伝子変異は傍神経節細胞腫(paranglioma)や褐色細胞腫(pheochromocytoma)などの腫瘍において数多く報告され、これらの遺伝子ががん抑制遺伝子であることが示唆されている。さらに、paranglioma は酸素センサーである頸動脈小体に好発するため、複合体 II が酸素適応にも関わっていることが示唆されている。また、これまでも哺乳類以外の生物では複合体 II が複数存在することが示されて

いる。生活環において環境の酸素分圧が変化する回虫(*Ascaris suum*)の複合体 II はサブユニット構成が変化し、受精卵の発生過程における好气的環境下では哺乳類と同様のコハク酸-ユビキノン還元酵素 (SQR) として、また宿主小腸内の低酸素環境下に生息する成虫では NADH-フマル酸還元系の末端酸化酵素、キノール-フマル酸還元酵素 (QFR) として機能している。そして、最近、寄生虫 NADH-フマル酸還元系酵素を標的とした抗蠕虫薬パモ酸ピルビニウムは低栄養下のがん細胞に対し、毒性を示すことが報告され、がん細胞における代謝系、特に複合体 II の機能と寄生虫低酸素下の代謝系との関連性が示唆された。

以上のことよりヒト複合体 II は疾病における様々な役割を有することが考えられる。そこで本研究ではヒト複合体 II の多様性と機能的変化を知ることを目的とし、まず、複合体 II と疾患との関係を知るため、ヒト複合体 II 欠損患者における複合体 II の解析を行なった。次に、ヒト複合体 II の機能的変化の存在を調べるために、様々な環境下のがん細胞における複合体 II の SQR と QFR という機能的変化を解析した。最後に複合体 II の多様性という観点で、がんにおける複合体 II の役割を解析した。

【結果・考察】

まず、複合体 II 活性欠損を示すミトコンドリア病患者の病因を明らかにする目的で遺伝子変異解析を行ない、複合体 II Fp サブユニットの遺伝子変異があることを見い出した。さらにヒト複合体 II は二種類の Fp アイソフォームが存在するが、本患者において Fp アイソフォームの発現異常を見い出した。また、複合体 II の活性測定を行ない、それらが複合体 II 活性低下原因であることを突き止めた。このことより、疾病における Fp アイソフォームの重要性が示された。

近年のミトコンドリアプロテオミクス解析より、電子伝達系酵素群におけるリン酸化修飾が検出され、ウシ複合体 II においてはリン酸化 Fp サブユニットの存在が示されているが、その機能的意義は判っていなかった。そこで、ヒト複合体 II の機能的変化の検出と、その Fp サブユニットのリン酸化との関係を知るために、まず、哺乳類ミトコンドリア、特にヒト培養細胞ミトコンドリアにおける二種類の複合体 II 活性、コハク酸-ユビキノン還元酵素 (SQR) とフマル酸還元酵素 (FRD) の活性の検出を行ない、哺乳類においても複合体 II は二種類の活性、SQR と FRD を有することを示した。また、培養細胞における培養環境変化における複合体

II の活性変化を測定し、低栄養および低酸素下において複合体 II 活性は SQR が減少し、FRD が上昇することを示した。これより、低酸素環境に生育する回虫の NADH-フマル酸還元系をヒトがん細胞が有している可能性が示された。さらに、ヒトミトコンドリアにおける Fp サブユニットのリン酸化を検出し、リン酸化・脱リン酸化酵素処理により Fp のリン酸化量が変化し、さらに複合体 II の活性変化が生ずることを示した。また、Fp リン酸化部位の探索を行ない、いくつかのリン酸化候補アミノ酸部位の変異により、複合体 II 活性の変化が起こることを示した。これらより、複合体 II の活性変化と Fp のリン酸化との関連性が示された。

次に、抗蠕虫薬で寄生虫の NADH-フマル酸還元系を標的とするパモ酸ピルビニウムはグルコース欠乏がん細胞特異的に抗がん作用を有することが報告されていることから、がん細胞における複合体 II の機能と寄生虫の低酸素における複合体 II との関連性が考えられた。そこで、このパモ酸ピルビニウムの寄生虫および宿主である哺乳類における作用機構の解析を行なった。その結果、パモ酸ピルビニウムは複合体 II 阻害だけでなく、複合体 I の阻害を起こすことが判った。さらに、寄生虫特異的なパモ酸ピルビニウムの毒性発現は、哺乳類宿主に対してはパモ酸ピルビニウムが複合体 II (SQR) の活性上昇を起こし細胞障害が補償されることによることが判った。また、パモ酸ピルビニウムのグルコース欠乏がん細胞特異的な細胞障害作用の作用機序の解析を行ない、パモ酸ピルビニウムの SQR 活性上昇効果が低栄養・低酸素状態により消失することによるものであることが判った。つまり複合体 II の環境変化へ対する機能的変化がパモ酸ピルビニウムの効果の鍵となっていることを見出した。また、パモ酸ピルビニウムにより Fp の脱リン酸化が生じることが判り、パモ酸ピルビニウムによる脱リン酸化が複合体 II の機能的変化のみならず複合体 I の阻害にも関係していることが示唆された。

これらより、ヒト複合体 II はいままで知られていた TCA 回路の一酵素としての機能だけではなく、低栄養・低酸素環境下のがん細胞において、フマル酸還元酵素として機能していることが示され、それらは Fp サブユニットのリン酸化修飾に関係していることが、タンパク質のリン酸化による複合体 II の機能制御の可能性が示唆された。また、複合体 II の機能的変化が抗がん剤の標的となる可能性を示した。

本研究によってヒト複合体 II には SQR と FRD という二種類の活性があり、環境変化によりその機能的変化が生じることが示され、がんを始めとするさまざまな疾病に関わる複合体 II の役割を知る上で大きな進展があったと考えられる。これらを複合体 II の機能的変化を標的とした治療法・治療薬の開発に役立て

たい。