

## 論文の内容の要旨

論文題目 線虫コハク酸-ユビキノン酸化還元酵素 (複合体 II) シトクロム *b* 変異株 *mev-1*  
の生化学的解析

指導教員 北 潔 教授

東京大学大学院 医学系研究科

平成 19 年 4 月進学

博士後期課程 国際保健学専攻

氏名 栗野 睦美

線虫 *Caenorabditis elegans* (*C.elegans*) 変異株 *mev-1* はミトコンドリア電子伝達系に存在するコハク酸-ユビキノン酸化還元酵素 (複合体 II) のシトクロム *b* 大サブユニットに点変異を持つ変異体である。*mev-1* は短寿命、酸素高感受性、ミトコンドリアにおける活性酸素種 (Reactive oxygen species, ROS) の過剰産生を示し、酸素により早期から老化が進行する変異体である。最近、線虫 *mev-1* と同様の部位に変異を導入したトランスジェニックマウス細胞株、酵母およびショウジョウバエが作成され、これらの変異体も *mev-1* と同様に酸素ストレス高感受性、ROS 過剰発生を表現形として示すことが報告されている。さらにトランスジェニックマウスの細胞株の解析ではアポトーシスの増加、腫瘍の形成が報告されており、*C. elegans* だけではなく、哺乳類においても活性酸素種の増大、老化の加速さらにアポトーシスや腫瘍形成における複合体 II の重要性が確認されている。現在、これら変異体の解析は表現形の解析が主であり、変異が存在する複合体 II 自体の生化学的解析は

殆ど行われていない。*mev-1* の複合体 II の生化学的特徴を明らかにすることは複合体 II の変異が表現型に至る分子機構を解析するために重要であると考えられる。そこで本研究では *mev-1* 複合体 II の生化学的特徴に焦点を絞り解析を行った。

## 1. *mev-1* 複合体IIのサブユニット構成およびヘムの解析

*mev-1* 複合体 II のサブユニット構成およびヘムの結合を解析するため、*C. elegans* から複合体 II の精製を試みた。

*C. elegans* 野生型複合体 II の精製では DEAE-sepharose FF 、SOURCE 15Q を用いた 2 段階のクロマトグラフィーにより、1 回の精製で約 200 mg のミトコンドリアから 0.5 mg の部分精製された試料を得る事ができる。精製試料中の複合体 II の活性は SDH 活性で 16.2 倍、SQR 活性で 11.5 倍上昇し、比活性は SQR 活性で 3.6 ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )まで上昇した。また、得られた標品を用いて、*C. elegans* では初めて複合体 II の 4 つのサブユニットに対応したバンドを SDS-PAGE で同定した。得られた部分精製標品の酸化還元差スペクトルにおいてシトクロム *b* に特徴的な  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の 3 つのピークがそれぞれ 561.8 nm、530 nm、426.6 nm に観察され、*C. elegans* の複合体 II は *b* タイプのヘムを持つことが明らかになった。

*mev-1* の複合体 II の精製では一段階目の DEAE-sepharose FF を用いたクロマトグラフィーにおいて Fp、Ip サブユニットと CybL サブユニットが異なる画分に回収され、さらに SQR 活性の殆ど全てが失われ、以後の精製を断念した。この結果から *mev-1* の変異がこれらのサブユニット間の相互作用に影響を及ぼしている可能性が示された。

*mev-1* 複合体 II サブユニット構成およびヘムの結合については、高解像度クリアネイティブ電気泳動法 (high-resolution clear native electrophoresis: hrCNE)を用いて解析を継続した。hrCNE 後の SDH 活性染色の結果、高分子側と低分子側に 2 つの複合体 II が検出された(図 1A)。二次元電気泳動後の銀染色とウェスタンブロッティングの結果から、これら 2 つのバンドから複合体 II の 4 つのスポットが同定され、*mev-1* の複合体 II がミトコンドリア内において 4 つのサブユニットが複合体を形成していることが示された (図 1C)。

複合体 II に対するヘムの結合を hrCNE 後のヘム染色にて解析したところ、高分子側の複合体 II については野生型および *mev-1* でヘムのシグナルが検出され *mev-1* 複合体 II はヘムを保持していることが示された (図 1B)。一方、低分子側の複合体 II については *mev-1* 変異体のヘムのシグナルが検出されなかった。二次元電気泳動後のウェスタンブロッティングの結果より、野生型と比較し、*mev-1* では低分子側の位置に存在する CybL サブユニットのスポットの量が少ないことから、サブユニットの解離とともにヘムも遊離した可能性が考えられる (図 1C)。

これらの結果より *mev-1* 複合体 II はミトコンドリア内では 4 つのサブユニットを持ち、補欠分子族のヘムを保持していることが示された。また、精製および hrCNE の解析を通して *mev-1* 複合体 II はサブユニット間の相互作用が不安定であり、解離し易い性質を持つことが示された。

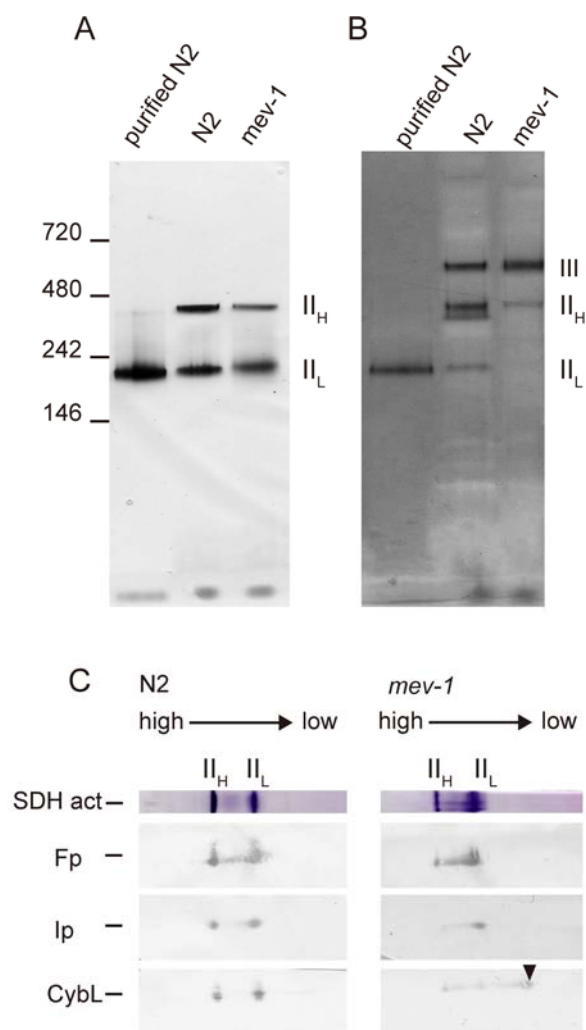


図 1. 高解像度クリアネイティブ電気泳動法 (hrCNE) によるサブユニット構成およびヘムの解析

hrCNE を行ったゲルを A. SDH 活性染色、B. ヘム染色によりそれぞれ染色した。Purified N2: SOURCE 15Q 精製画分、N2、*mev-1*: ミトコンドリア可溶化画分、II<sub>H</sub>: 複合体 II 高分子側、II<sub>L</sub>: 複合体 II 低分子側、III: 複合体 III。C. 二次元電気泳動 (一次元目: hrCNE、二次元目: SDS-PAGE) を行った後、複合体 II のサブユニットをウェスタンブロッティングにより検出した。SDH act: 一次元目の hrCNE のゲルを SDH 活性染色したもの。矢頭にて示した CybL は Fp, Ip サブユニットから乖離したものと考えられる。

## 2. *mev-1* 複合体IIのキノン結合に関する生化学的解析

最近、大腸菌およびブタにおいて複合体 II の結晶構造解析が報告され、複合体 II の電子受容体であるユビキノンの結合部位に関与する残基が特定された。キノン結合部位の配列は種を通じて保存されており、配列の比較から *mev-1* の点変異はユビキノンの結合および還元に関与するセリン残基の隣に存在するグリシンがグルタミン酸に変化していることが報告されている。これらのことから *mev-1* の変異が SQR の電子受容体であるユビキノンの結合部位に影響を及ぼしていることが推測される。*mev-1* の変異が複合体 II のユビキノンの結合部位に与える影響を調べるため、複合体 II のキノン結合部位特異的な阻害剤であるアトペニン A5 およびフルトラニルを用いた阻害実験と、ユビキノンの親和性の解析を行った。

UQ<sub>1</sub> を用いた速度論的解析を行い *K<sub>m</sub>* 値を求めたところ、*mev-1* では野生型と比較し 2.5 倍上昇していることから、基質である UQ<sub>1</sub> に対する親和性が低下していることが示された(表 1)。アトペニン A5 およびフルトラニルによる SQR 活性の阻害を解析したところ、*mev-1* では IC<sub>50</sub> の値が野生型と比較しそれぞれ 53 倍と 22 倍の上昇がみられた(表 1)。この様にキノン結合部位に結合する阻害剤に対する *mev-1* 複合体 II の親和性が野生型と比較し非常に低下していることが示された。これらの結果から、*mev-1* の変異がキノン結合部位の立体構造を変化させることでユビキノンの結合および還元を阻害していることが示された。

| strain       | <i>K<sub>m</sub></i> (μM) |            | IC <sub>50</sub> (nM) |  |
|--------------|---------------------------|------------|-----------------------|--|
|              | UQ <sub>1</sub>           | Atpenin A5 | flutolanil            |  |
| N2           | 10.8 ± 1.2                | 18.0 ± 2.1 | 144 ± 6.4             |  |
| <i>mev-1</i> | 27.3 ± 6.4                | 950 ± 29   | 3200 ± 240            |  |

表 1. *mev-1* 複合体 II のユビキノンの *K<sub>m</sub>* 値および、ユビキノンの結合部位特異的阻害剤に対する IC<sub>50</sub> 値。

### 3. *mev-1* 変異体電子伝達系におけるROS発生機構の解析

*mev-1* 変異体では電子伝達系からの ROS の発生が増大していることが報告されており、ROS が変異型複合体 II から産生されている可能性が強く示唆されている。しかし、実際に変異型複合体 II から ROS の発生が増大していることを示した報告はなく、ROS 発生機構については明らかにされていない。また、*mev-1* 変異体では抗酸化物質の濃度が低下していることから、検出された ROS 発生量の増大は、発生量の増加によるものか、抗酸化能の低下による見かけ上の増加によるものか不明であった。そこで、凍結融解により ROS 消去活性を除去したミトコンドリア膜画分を調製し、コハク酸濃度依存的なスーパーオキシドの発生量を解析した。

その結果、野生型および *mev-1* においてコハク酸濃度依存的なスーパーオキシドの発生量には差が見られず *mev-1* の電子伝達系は野生型と同等の ROS の発生を行うことが示された (図 2)。また、スーパーオキシドの発生量はコハク酸濃度が 0.02 mM から 0.2 mM と増加するにしたがって増加が見られ、0.5 mM より高濃度のコハク酸を加えると抑制された。この結果は大腸菌 FRD における FAD からのスーパーオキシドの発生モデルと一致しており、*C. elegans* 複合体 II における ROS 発生部位が FAD である可能性が示唆された。今回の結果は *in vitro* において変異型酵素を含む電子伝達系からの ROS 発生量が野生型と差がないことを示している。この結果から、*mev-1* での ROS 発生量の増加は変異型酵素からの過剰産生によるものではなく、複合体 II の機能低下により引き起こされた代謝系の異常や細胞内環境の変化により誘導された結果である可能性が示唆された。

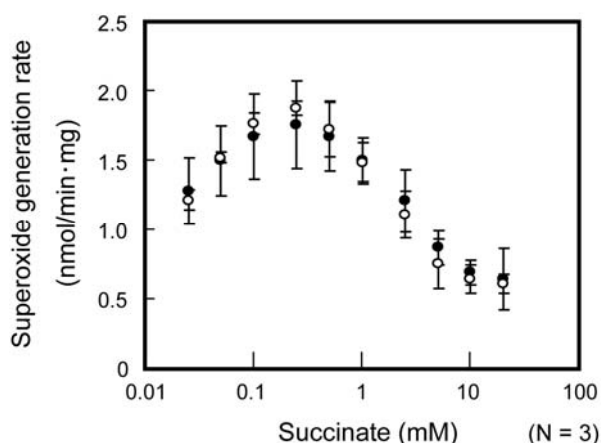


図 2. コハク酸濃度依存的なミトコンドリア電子伝達系からのスーパーオキシドの発生  
○*mev-1* 変異体。●野生型

## 結語

本研究では *mev-1* 複合体 II の生化学的特性に焦点を絞り解析を行った。まず、*mev-1* 変異体の複合体 II がミトコンドリア中では酵素として基本的なサブユニット構成およびヘムを持つものの、複合体として不安定な性状であることを明らかにした。また、基質であるユビキノンとユビキノン結合部位特異的な阻害剤に対する親和性が低下し SQR 活性の低下を引き起こしていることを示した。さらに *mev-1* の電子伝達系における ROS 産生量は野生型と同等であった。この結果から、複合体 II の変異により引き起こされる代謝系の変化や細胞内環境の変化により ROS 産生が誘導されている可能性を示唆した。図 3 に、本研究で明らかにした *mev-1* 複合体 II の生化学的な特性をまとめた。

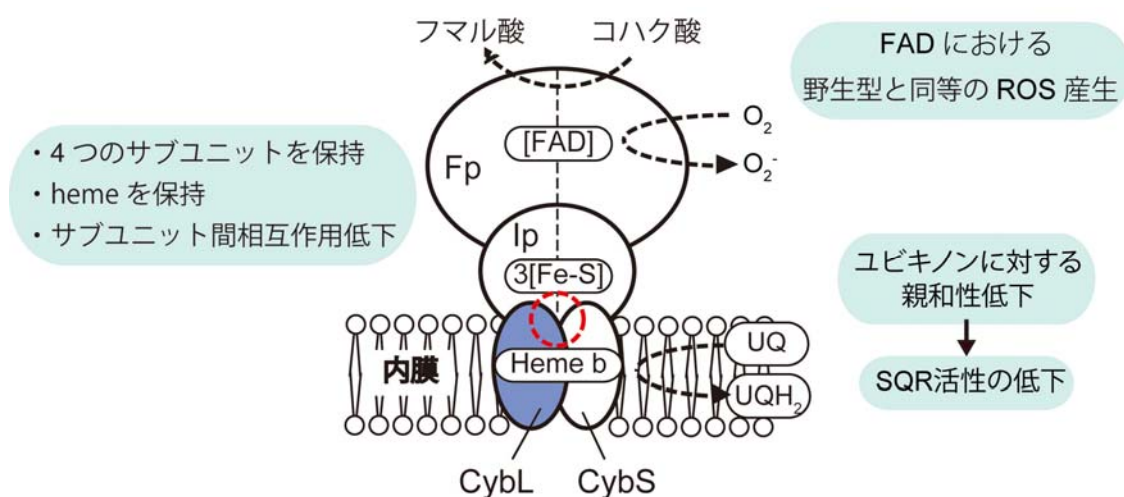


図 3. *mev-1* 複合体 II の生化学的特性