

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 栗野 睦美

本研究は短寿命、酸素高感受性、活性酸素種過剰産生などの様々な表現型を持つ線虫変異株 *mev-1* を用い、原因遺伝子より生合成される変異型複合体 II の生化学的解析を行い、以下の結果を得ている。

1. *mev-1* 複合体 II のサブユニット構成および補欠分子族であるヘムの結合を解析するため、*C. elegans* から野生型および変異型の複合体 II の精製を試みた。野生型では *C. elegans* で初めて SDS-PAGE 後の CBB 染色にて複合体 II の 4 つのサブユニットに対応したバンドを検出した。さらにスペクトル解析から *C. elegans* の複合体 II に *b* タイプのヘムの結合を検出した。*mev-1* 複合体 II は可溶化および精製の過程において Fp、Ip サブユニットとアンカーサブユニット間の解離がおり 4 つのサブユニットを保持する複合体 II を精製することはできなかった。高解像度クリアネイティブ電気泳動法と SDS-PAGE を用いた二次元電気泳動およびウェスタンブロッティングによる解析から、野生型および *mev-1* 変異体の複合体 II のサブユニットの検出を行い、4 つのサブユニットを保持した *mev-1* 複合体 II の検出に成功した。さらに高解像度クリアネイティブ電気泳動後のヘム染色により *mev-1* 複合体 II に結合したヘムを検出した。これらの結果から、*mev-1* 複合体 II はミトコンドリア内において 4 つのサブユニットと補欠分子族であるヘムを保持し、複合体 II の基本的な構成を持つことを明らかにした。
2. *mev-1* の変異がキノン結合部位に与える影響を調べるため、ミトコンドリア試料を用いて UQ₁ を用いた速度論的解析を行い *K_m* 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 UQ₁ に対する親和性が低下していることが示された。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 IC₅₀ 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、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。
3. *mev-1* 複合体 II からのコハク酸濃度依存的なスーパーオキシドの発生を解析したところ、*mev-1* 複合体 II は野生型複合体 II とほぼ同じプロファイルを示し、*mev-1* 複合体 II では

in vitro において ROS 過剰産生が起きないことが示された。さらに高濃度のコハク酸によりスーパーオキシドの発生が抑制されたことから、FAD が *C. elegans* 複合体 II の主要なスーパーオキシド発生部位であることが強く示唆された。

以上、本論文は *mev-1* 複合体 II の生化学的特性を明らかにした。本研究で明らかにした変異型複合体 II の生化学的特性は複合体 II の変異により引き起こされるヒトの腫瘍形成やミトコンドリア病などの解明に応用することが可能であり、学位の授与に値するものと考えられる。