

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 フラボプロテイン
サブユニットアイソフォームの機能解析

指導教員 北 潔 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月進学

保健学博士課程

国際保健学専攻

氏名 坂井 千香

1. 序論

(1) 複合体 II

ミトコンドリアの呼吸鎖複合体 II (コハク酸-ユビキノン酸化還元酵素 : SQR) は TCA 回路中唯一の膜局在性酵素で、エネルギー代謝や低酸素適応に關与する非常に重要な酵素である。複合体 II は一般に 4 つのサブユニットからなり、フラボプロテイン (flavo protein : Fp) サブユニットと鉄硫黄タンパク質 (iron-sulfur protein : Ip) サブユニットは比較的親水性の触媒部位を形成しマトリック側に突出している。そして二つの疎水性のシトクロム *b* サブユニット (Cyb L, Cyb S) が膜アンカーとして Fp、Ip サブユニットを結合している。

ヒト複合体 II の 4 つのサブユニットのうち Ip 及び膜アンカーにおける変異は褐色細胞腫や傍神経細胞腫等の腫瘍形成に關連するという事実が数多く報告されており、これらのサブユニットはがん抑制遺伝子として機能していると考えられている。それらの変異は複合体 II の活性低下をもたらし、さらに基質であるコハク酸が蓄積すると Hypoxia inducible factor-1a (HIF-1a) を介した低酸素応答を引き起こし、腫瘍形成に關連していることが示唆されている。また、腫瘍形成には変異をもつ複合体 II から発生する活性酸素種の關与も示唆されている。さらにコハク酸が複合体 I と II の相互作用を促し活性酸素種の発生に寄与しているという報告もある。一方、Fp の変異による腫瘍形成は報告されていないが、後述する様にヒト Fp には二種類のタイプが存在するため変異が直接腫瘍形成に結びつかないと考えられる。一方 Fp に変異が生じると心筋症、神経、臓器障害、代謝異常などの様々な症状が引き起こされる。またミトコンドリア病の一つである Leigh 症候群が報告されており、筋肉や脳に障害をもたらすことも知られて

いる。さらに最近では複合体 II のアッセンブリーに關与するタンパク質が同定され、SDHAF1 と SDHAF2 (SDH5) と命名された。SDHAF1 は I_p サブユニットに作用して複合体 II のアッセンブリー及び安定化に關わると考えられており、変異が生じると複合体 II が減少し、乳児性の白質脳症を引き起こすことが報告されている。また、SDHAF2 については、F_p への FAD の挿入に關与すると考えられており、変異が生じると複合体 II が減少し、褐色細胞腫や傍神経細胞腫等を引き起こすことが判っている。

このように種々の変異により腫瘍や様々な疾患を引き起こす複合体 II は多様な機能を有することが予想され、実際に複合体 II が複数の機能をもつという報告がなされている。寄生性線虫である回虫 *Ascaris suum* は複合体 II の 4 つのサブユニットのうち F_p、Cyb S にアイソフォームを持ち、それぞれのアイソフォームから構成される複合体 II の機能は異なっている。発生に酸素を必要とする幼虫期には哺乳類と同じ好気代謝においてコハク酸からフマル酸への酸化を触媒するタイプの複合体 II を発現している一方、低酸素の宿主小腸内で生息する成虫では嫌気代謝を支えるフマル酸呼吸において逆反応を触媒するフマル酸還元を行う複合体 II を発現している。また、ヒトにおいても低酸素に適応するため、嫌気代謝として複合体 II がフマル酸からコハク酸への還元反応を触媒する可能性が示唆されてきた。そして最近、低酸素の腫瘍細胞において実際に複合体 II がフマル酸還元を行うことが明らかになった。さらに膵臓がんなどの一部の固形がんでは血流が乏しいために酸素及びグルコースの供給が不十分となっており、そのような低栄養の条件下で複合体 II がフマル酸還元を行うとコハク酸の蓄積が起こることが示されている。

(2) ヒト複合体 II F_p アイソフォーム

2003 年、冨塚らはヒトの複合体 II の F_p サブユニットにおいてアイソフォームが存在することを明らかにした。二つのアイソフォームは 6 塩基、2 アミノ酸が異なっていた (図)。Type I F_p 遺伝子は染色体 5p15 に位置する一方、Type II F_p 遺伝子の染色体上の位置は明らかではない。F_p アイソフォームの臓器における発現は、肝臓、心臓、骨格筋、脳、腎臓全てにおいて Type I F_p の発現量が Type II F_p より高いことが報告されている。培養細胞においても繊維芽細胞 (Fibroblast)、筋芽細胞 (Myoblast)、大腸由来腺がん細胞 (HT-29)、肺がん細胞 (A549)、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUV-EC-C) など多くの細胞において同様の傾向が見られる一方で、大腸由来腺がん細胞 (DLD-1)、乳腺がん細胞 (MCF-7)、悪性リンパ腫由来細胞 (Raji) などの Type II F_p の発現が優勢である腫瘍細胞の存在が明らかになっている。

3. 目的と方法

本研究の目的はなぜ二つの Fp アイソフォームが存在するのかを明らかにすることである。臓器及び多くの培養細胞に Type I Fp の優勢な発現がみられ、またアミノ酸配列の比較から Type I Fp が多くの哺乳類に共通であることから、Type I Fp の発現が本来の複合体 II の機能に必須であることが考えられる。一方で腫瘍細胞において優勢に発現している Type II Fp は腫瘍などのように細胞増殖が盛んな組織に特徴的な低酸素や栄養飢餓などの環境やそのような組織特異的な代謝に参与している可能性が考えられる。そこで腫瘍と Type II Fp の関連をより詳しく調べるためにがんの組織などをはじめとする組織や培養細胞におけるアイソフォームの発現比率を解析した。また、現在までにこれらのアイソフォームについての生化学的な解析はほとんど行われておらず、酵素学的な違いについては明らかではなかった。そこで、本研究ではアイソフォームの生化学的な特徴を明らかにすることにした。それぞれのアイソフォームを個別に解析するためには、完全に片方のアイソフォームのみを発現した細胞株を用いる必要があったが、現在そのような発現の細胞株は見つかっていない。そこで修士課程において作製した一方のアイソフォームを発現抑制の標的とした siRNA 安定発現細胞 (RNAi 細胞) を解析に用いることにした。それぞれのアイソフォームを標的とした RNAi 細胞からミトコンドリアを調製し、各アイソフォームから構成される複合体 II の酵素タンパク質としての解析を行った。

4. 結果と考察

ヒトの組織、及び培養細胞におけるアイソフォームの発現比率を調べた結果から、正常の組織や細胞では Type I Fp が優勢に発現しており、がんの組織やがん培養細胞、胎児の組織では Type II Fp が優勢に発現しているものがあるということが判った。よって Type II Fp はがん組織や胎児の代謝に参与している可能性があると考えられる。

RNAi 細胞の解析の結果、二つのアイソフォームから構成される複合体 II は同程度の SQR 活性を有している事が判った。しかし、ミトコンドリアマトリックスの生理的 pH として知られる pH 8.0 では Type I Fp、Type II Fp から構成される複合体 II のコハク酸に対する K_m はそれぞれ 0.21 ± 0.08 mM、 0.75 ± 0.14 mM であり、Type I Fp の方がコハク酸に対する親和性が約 3.6 倍高いことが判った。さらに、至適 pH は Type I Fp、Type II Fp でそれぞれ pH 8.0、7.5 であった。Type II Fp の至適 pH である pH 7.5 では Type I Fp、Type II Fp から構成される複合体 II のコハク酸に対する K_m はそれぞれ pH 8.0 とは逆に 0.86 ± 0.09 mM、 0.23 ± 0.07 mM であり Type II Fp の方の親和性が約 3.7 倍高いことが判った。

以上の結果から通常の組織においては Type I Fp から構成される複合体 II が SQR として機能しており、ミトコンドリアマトリックスがやや酸性に偏った場

合に Type II Fp が SQR 活性を維持するために重要な役割を担っているのではないかと考えられる。生体内でミトコンドリアマトリックスの pH が低下する要因としては、低酸素、虚血等が示唆されている。さらに、がんや発生初期の組織は低酸素状態に暴露される事が知られている。以上の結果及びこれまでの知見から Type II Fp から構成される複合体 II は細胞が低酸素や虚血状態に適応するために重要な役割を担っていると考えられ、特にがん組織の代謝やヒトの発生などへ関与している可能性が考えられる。

