

## 審査の結果の要旨

氏名 坂井 千香

ヒト呼吸鎖複合体 II (コハク酸-ユビキノン酸化還元酵素 : SQR) のフラボプロテイン (Fp) サブユニットには構成アミノ酸が二つ異なるアイソフォーム (Type I Fp、Type II Fp) が存在する。本研究はアイソフォームの発現をヒトの組織、培養細胞において解析し、またそれぞれのアイソフォームから構成される複合体 II の生化学的な解析を RNAi を用いて行い、下記の結果を得ている。

1. これまで Type I Fp が正常な組織において主要な成分として発現している一方で、Type II Fp が優勢に発現しているがん細胞があることが判っていた。本研究において、さらに詳しく組織や培養細胞におけるアイソフォームの発現比率を調べた。正常の組織や細胞では Type I Fp が優勢に発現しており、がん細胞、がん組織や胎児組織では Type II Fp が優勢に発現している例があるということが判った。膵臓がんなどの一部の固形がんでは血管新生が不十分であることでしばしば低酸素、低栄養状態に暴露されることが明らかになっている。また胎児の組織においても、発生初期に低酸素状態に暴露されるということが報告されている。よって Type II Fp は特にがんの組織や胎児の組織で低酸素、低栄養状態に適応するために重要な働きを担っている可能性が示された。
2. 各 Fp アイソフォームの発現を抑制した RNAi 細胞における複合体 II の Fp タンパク質当たりの酵素活性を調べたところ、ほぼ等しいという結果から各アイソフォームから構成される複合体 II はほぼ同程度の SQR 活性を有することが判った。よってどちらかのアイソフォームに変異が生じた場合には、相手のアイソフォームに変異のある方を補償し SQR 活性を維持することが可能であることが示された。
3. 各アイソフォームから構成される複合体 II の SQR 活性における至適 pH 及び基質であるコハク酸に対する親和性を調べたところ、ミトコンドリアの生理的 pH である pH 8.0 において Type I Fp から構成される複合体 II は至適 pH となり、コハク酸に対する  $K_m$  が  $0.21 \pm 0.08$  mM である一方、Type II Fp から構成される複合体 II では  $K_m$  が  $0.75 \pm 0.14$  mM となった。この結果から、pH 8.0 においては Type I Fp から構成される複合体 II は Type II Fp から構成される複合体 II に比べ約 3.6 倍、基質であるコハク酸に対する親和性が高いことが判った。よって通常の条件下のミトコンドリアにおいては Type I Fp から構成される複合体 II が SQR として主に働いている可能性が示された。一方、Type II Fp から構成される複合体 II は pH 7.5 に至適 pH を持ち、その時のコハク酸に対する  $K_m$  値は  $0.23 \pm 0.07$  mM であり、Type I Fp の至適 pH である pH 8.0 での  $K_m$  値とほぼ等しいことが判った。pH 7.5 における Type I Fp から構成される複合

体 II の  $K_m$  は  $0.86 \pm 0.09$  mM であり、pH 7.5 においては Type II Fp から構成される複合体 II は Type I Fp から構成される複合体 II に比べ約 3.7 倍、基質であるコハク酸に対する親和性が高いことが判った。したがってミトコンドリアのマトリックスの pH が比較的酸性に偏った際に Type II Fp から構成される複合体 II は SQR 活性を維持するために重要である可能性が示された。ミトコンドリアのマトリックスの pH が低下する要因の一つとしては組織が低酸素、虚血状態に陥ったときが挙げられる。よって Type II Fp はそのような状況に細胞が適応するために重要な役割を持つ可能性が示された。

4. 各アイソフォームから構成される複合体 II の阻害剤に対する感受性を調べたところ、コハク酸結合部位の阻害剤であるマロン酸、オキサロ酢酸及び 3-nitropropionic acid に対しては異なる  $IC_{50}$  値や阻害曲線が見られた一方、キノン結合部位の阻害剤である Atpenin A5 については各アイソフォーム間で相違が見られなかった。さらに測定時の pH を固定した際のコハク酸に対する  $K_m$  値が各アイソフォーム間で異なる一方で、ユビキノンに対する  $K_m$  値は同様であった。以上から、各アイソフォームはキノン結合部位ではなくコハク酸結合部位に相違がある可能性が示された。

本研究によってヒトの Fp アイソフォームにおける生化学的な相違が明らかになった。さらにその生理的な役割の相違として Type I Fp から構成される複合体 II が通常ミトコンドリア内で SQR として主に機能しており、Type II Fp から構成される複合体 II は低酸素や低栄養状態への適応に関与していることが示唆された。さらに Type II Fp はヒトの発生、がん組織の代謝など非常に重要な生体機能に関与している可能性が示された。よって本研究は低酸素適応やヒトの発生、がんの研究に対し重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。