

## 博士学位論文審査結果要旨

西暦 2023年 2月 15日

研究科、専攻名 バイオ・情報メディア研究科 バイオニクス専攻

学位申請者氏名 菅原 響介

論文題目 ミトコンドリア呼吸鎖超複合体中のCoQ10定量手法の確立と応用

### 審査結果の要旨

2023年（令和5年）2月15日に東京工科大学において、学位申請者菅原響介の学位審査公開発表会が開催され、以下の要旨に示す博士論文に関する発表と関連する質疑応答が行われた。

本学位論文は、ミトコンドリア電子伝達系タンパク質群に含まれるコエンザイム Q10 (CoQ10) に着目したものである。酸化リン酸化により ATP を産生しているミトコンドリア電子伝達系タンパク質群は、独立して存在するのではなく呼吸鎖超複合体 (SC) を形成していることが報告されている。電子伝達系に含まれる必須因子として CoQ10 が存在しており、SC 中に CoQ10 が含まれていることも報告されている。CoQ10 は核膜、形質膜など、生体内にユビキタスに存在している脂溶性物質であり、その還元型は抗酸化物質としても重要である。加齢に伴い組織中の CoQ10 量が低下することが報告されている。しかしながら、これらのデータは細胞レベルや細胞小器官レベルトータルの CoQ10 量を解析したデータであり、SC 中の CoQ10 量の変動については不明である。本論文では、SC 中の CoQ10 量の測定手法を半定量的にはあるが確立し、本手法をもちいて CoQ10 欠乏細胞や CoQ10 投与時の SC 中の CoQ10 の測定をおこなった。

第 1 章では、本研究の背景とそれを踏まえた本研究の目的を記述している。CoQ10 の生理機能や合成経路が述べられ、またミトコンドリア電子伝達系複合体について詳述された。加齢や病態における CoQ10 量の変動についても議論されている。具体的には、CoQ10 は加齢に伴い生体内濃度が低下すること、またこのため食事やサプリメントでの摂取が推奨されていることが述べられている。ラットに静脈投与した CoQ10 が細胞小器官に取り込まれ、ミトコンドリアに取り込まれることが報告されているが、SC 中の CoQ10 量の変動については不明であり、生体内における CoQ10 の輸送機序も不明な点が多く残されている。また、CoQ10 結合タンパク質として見出されている Prosaposin (Psap) についても述べられている。Psap 発現量を低下させた細胞株では、細胞内及びミトコンドリア内 CoQ10 量が低下することが報告されている。しかしながら、加齢による長期の CoQ10 量低下状態が Psap の合成量にどのように影響するかは不明である。本論文では、まず SC 中の CoQ10 量の測定手法を確立した。次に細胞内 CoQ10 量変動時の SC 内の CoQ10 量がどのように変動するのかを解析した。また、長期間 CoQ10 量を低下させることによる Psap タンパク質量の挙動の解析を通じて、ミトコンドリア電子伝達系への CoQ10 量輸送機序の解明を試みた。

第 2 章では、SC 中の CoQ10 量の定量手法の確立について述べられている。HepG2 細胞から単離したミトコンドリアは界面活性剤を添加して可溶化し電気泳動サンプルとした。電気泳動はブルーネイティブ電気泳動法を用いて SC を分離した。電気泳動したゲルは、半分に切り分け片方を複合体タンパク質の検出に用いた。他方は CoQ10 測定用に使用した。SC が検出された泳動度付近に CoQ10 のピークが検出されたことから、SC に含まれている CoQ10 であると示唆された。また異なる界面活性剤を用いた検討の結果も、測定した CoQ10 が SC 中に含まれるものであることを強く示唆するものであった。以上の結果より、本測定手法は、半定量

的にではあるが、細胞内の SC 中の CoQ10 量の測定手法として妥当なものであるとした。次に CoQ10 合成阻害剤投与(4-Nitrobenzoate:4-NB)による SC 中の CoQ10 量の解析を行った。細胞レベル、ミトコンドリアでは濃度依存的に CoQ10 量が低下した。興味深いことに SC 中の CoQ10 量は、全ての濃度で同程度に低下した。次に投与した CoQ10 が SC に取り込まれるかを検討した。細胞やミトコンドリアで、投与した水溶性 CoQ10 の濃度依存的に CoQ10 量が増加した。SC 中でも、濃度依存的な CoQ10 量の増加が認められた。

第 3 章では、長期間 CoQ10 低下細胞株を作製し、Psap レベルの解析を行った。3 日、6 ヶ月、12 ヶ月の 4-NB 投与により細胞内 CoQ10 量が同程度に低下した。細胞内 Psap レベルの評価を行ったところ、遺伝子レベル、タンパク質レベル共に長期間(3 ヶ月以降)CoQ10 量低下細胞株において低下が見られた。一過性(CoQ10 低下 3 日目)では、Psap タンパク質レベルの低下は見られなかった。これらの結果は、CoQ10 が減少した直後ではなく、慢性的に低値を維持している場合に Psap 量が減少することを示唆している。

第 4 章では、長期間 CoQ10 量低下細胞株への CoQ10 投与により、SC 中に取り込まれる CoQ10 量について解析した。4-NB 非投与群と比較して、取り込み量が低値に定量された。上述のごとく、長期間 CoQ10 低下細胞株では、細胞内 Psap レベルが低下している。Psap レベルの低下と外因性の CoQ10 の取り込みの低下にとの関連について、さらなる検討が期待される。

第 5 章は結語として、本研究で得られた知見と今後の検討課題を簡潔にまとめて記述している。

上記の研究に対する学位審査公開発表及び応答も妥当なものであり、審査員会は、本論文の著者に対し、博士(工学)の学位を授与するための十分な学力と能力を有しているものと認める。

審査委員 主査

東京工科大学 教授 藤沢 章雄