

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	ミトコンドリア呼吸鎖複合体I~IVに対するゲル内活性検出法の改良およびスーパーコンプレックス形成の解析
作成者(著者)	原, 司
公開者	東邦大学
発行日	2020.03.15
掲載情報	東邦大学大学院理学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.
資料種別	学位論文
内容記述	主査: 松本 紋子 /
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第967号
学位記番号	甲第156号
学位授与年月日	2020.03.15
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD44043797

論文審査の要旨及び審査結果の要旨

2017年入学	研究分野 生物学	氏名 原 司
審査委員	(主査) 東邦大学理学研究科 准教授 松本紋子 (副査) 東邦大学理学研究科 教授 増尾好則 (副査) 東邦大学理学研究科 准教授 蓮沼至 (副査) 東邦大学医療センター 佐倉病院脳神経内科 教授 榊原隆次	
(論文題目) ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I~IV に対するゲル内活性検出法の改良およびスーパーコンプレックス形成の解析		
(論文審査の要旨及び審査結果の要旨) ミトコンドリア呼吸鎖スーパーコンプレックス (SC) は、電子伝達系を構成する各呼吸鎖からなる超複合体であり、電子伝達効率の向上による複合体活性の上昇や、活性酸素種の発生を抑制するとの報告がある。さらに近年では、SC が会合したメガコンプレックス (MC) の存在も報告されている。また、MC や SC の形成は、細胞内やミトコンドリア内の状態によって変化していることが報告されている。神経変性疾患では、病変部のみならず、白血球のミトコンドリア呼吸鎖複合体の活性や、複合体タンパク質の発現も変化していることが報告されている。アルツハイマー病患者白血球では、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の総活性は健常者より上昇していたが、その構成サブユニットのタンパク質発現は低下し、複合体 IV では複合体の総活性と構成サブユニットのタンパク質発現のどちらも低下していたとの報告がある。パーキンソン病患者白血球では、複合体 I と IV の総活性がともに低下していたとの報告がある。これらの報告より、アルツハイマー病やパーキンソン病患者の白血球では、SC の形成も変化していると予想できるものの、白血球の SC 形成を解析した報告例はない。high resolution clear native-polyacrylamide gel electrophoresis (hrCN-PAGE) は、非共有結合を保持した状態で呼吸鎖複合体を分離できるので、各複合体に対する基質を用いたゲル内活性検出法と組み合わせることにより、構成する呼吸鎖複合体数が異なる SC から複合体単体まで、種々の形態の複合体を識別して複合体活性を検出することが理論上可能である。しかしながら、従来の複合体 I のゲル内活性検出法は、微量な白血球の SC 形成を検出できるほど高感度ではなく、複合体 III のゲル内活性検出法は特異性が不明瞭で感度も低く、検出法として確立されていない。		

本研究では、複合体 III と IV に会合して電子の授受に寄与するシトクロム *c* がペルオキシダーゼ活性を呈することに着目し、市販の enhanced chemiluminescence (ECL) 試薬を用いたゲル内活性検出法を確立した。hrCN-PAGE でラット心臓のミトコンドリア膜タンパク質を分離した後、ゲルを種々の界面活性剤とインキュベートすることにより SC の立体構造をほぐしてゲル内活性の検出感度を向上させ、hrCN/SDS-PAGE 二次元電気泳動により、ペルオキシダーゼ活性を呈するヘムタンパク質はシトクロム *c* であると同定した。特異性に関しては、複合体 III や IV のミトコンドリア DNA がコードしているサブユニットのタンパク質発現を阻害した培養細胞を用いて、複合体 III と IV の発現低下に伴いペルオキシダーゼ活性も低下することを確認した。複合体 I や II のゲル内活性は、検出反応液に界面活性剤を添加することにより難溶性のフォルマザンを可溶化し、検出感度を向上させた。この呼吸鎖複合体 I の改良型ゲル内活性検出法による、MC と SC 形成の解析では、複合体 I 活性が検出された 5 領域のバンド強度を合計し、5 領域それぞれのバンド強度の割合を算出した。5 領域は高分子領域から順に、MC が 1 領域、構成複合体数の異なる SC が 3 領域、単体の複合体 I が 1 領域あり、健常者単核白血球では、SC 形成に性差があることや、年齢層が高いほど SC の割合が増加していることを見出した。同様に、健常者や各神経変性疾患患者 buffy coat の MC と SC の形成を解析したところ、MC の割合がアルツハイマー病やパーキンソン病患者で健常者より増加しており、レビー小体型認知症患者では MC の割合が健常者より減少していることを見出した。この解析では、MC、各 SC、単体の複合体 I の割合の増減が互いに影響するため、これら 5 領域の割合をそれぞれ縦軸と横軸にした、10通りの組み合わせの散布図マトリクスを用いて、領域間の割合の増減の相関性を解析した。アルツハイマー病、パーキンソン病、レビー小体型認知症において、MC の割合が減少する場合、単体の複合体 I の割合が増加することを見出した。さらに、パーキンソン病とレビー小体型認知症患者において、MC、各 SC、複合体 I の割合をそれぞれ縦軸にとり、Hoehn-Yahr の重症度分類を横軸にした、5通りの組み合わせの散布図により解析すると、重症な患者ほど、MC や構成複合体数の多い SC の割合が減少し、構成複合体数の少ない SC や複合体 I の割合が増加することを見出した。この結果より、パーキンソン病とレビー小体型認知症患者では、症状の進行に伴って、MC を含めた SC 形成が低下するのではないかと考えられた。

令和 2 年 2 月 13 日、博士学位論文提出者の原司には、公聴会にて論文内容の発表と質疑応答を行わせた。その後、上記 4 名の審査委員は、博士学位論文の内容および関連事項に関して口頭試問を行った。その結果、審査委員全員は、原司が博士（理学）の学位を受けるのに十分な学力と資格があると認めた。

論 文 要 旨

氏名 原 司

論文題目

ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I~IV に対するゲル内活性検出法の改良およびスーパーコンプレックス形成の解析

論文要旨

ミトコンドリア呼吸鎖スーパーコンプレックス (SC) は、電子伝達系を構成する各呼吸鎖からなる超複合体であり、電子伝達効率の向上による複合体活性の上昇や、活性酸素種の発生を抑制するとの報告がある。さらに近年では、SC が会合したメガコンプレックス (MC) の存在も報告されている。また、MC や SC の形成は、細胞内やミトコンドリア内の状態によって変化していることが報告されている。神経変性疾患では、病変部のみならず、白血球のミトコンドリア呼吸鎖複合体の活性や、複合体タンパク質の発現も変化していることが報告されている。アルツハイマー病患者白血球では、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の総活性は健常者より上昇していたが、その構成サブユニットのタンパク質発現は低下し、複合体 IV では複合体の総活性と構成サブユニットのタンパク質発現のどちらも低下していたとの報告がある。パーキンソン病患者白血球では、複合体 I と IV の総活性がともに低下していたとの報告がある。これらの報告より、アルツハイマー病やパーキンソン病患者の白血球では、SC の形成も変化していると予想できるものの、白血球の SC 形成を解析した報告例はない。high resolution clear native-polyacrylamide gel electrophoresis (hrCN-PAGE) は、非共有結合を保持した状態で呼吸鎖複合体を分離できるので、各複合体に対する基質を用いたゲル内活性検出法と組み合わせることにより、構成する呼吸鎖複合体数が異なる SC から複合体単体まで、種々の形態の複合体を識別して複合体活性を検出することが理論上可能である。しかしながら、従来の複合体 I のゲル内活性検出法は、微量な白血球の SC 形成を検出できるほど高感度ではなく、複合体 III のゲル内活性検出法は特異性が不明瞭で感度も低く、検出法として確立されていない。

本研究では、複合体 III と IV に会合して電子の授受に寄与するシトクロム *c* がペルオキシダーゼ活性を呈することに着目し、市販の enhanced chemiluminescence (ECL) 試薬を用いたゲル内活性検出法を確立した。hrCN-PAGE でラット心臓のミトコンドリア膜タンパク質を分離した後、ゲルを種々の界面活性剤とインキュベートすることにより SC の立体構造をほぐしてゲル内活性の検出感度を向上させ、hrCN/SDS-PAGE 二次元電気泳動により、ペルオキシダーゼ活性を呈するヘムタンパク質はシトクロム *c* であると同定した。特異性に関しては、複合体 III や IV のミトコンドリア DNA がコードしているサブユニットのタンパク質発現を阻害した培養細胞を用いて、複合体 III と IV の発現低下に伴いペルオキシダーゼ活性も低下することを確認した。複合体 I のゲル内活性は、

検出反応液に界面活性剤を添加することにより難溶性のフォルマザンを可溶化し、検出感度を向上させた。この呼吸鎖複合体 I の改良型ゲル内活性検出法による、MC と SC 形成の解析では、複合体 I 活性が検出された 5 領域のバンド強度を合計し、5 領域それぞれのバンド強度の割合を算出した。5 領域は高分子領域から順に、MC が 1 領域、構成複合体数の異なる SC が 3 領域、単体の複合体 I が 1 領域あり、健常者単核白血球では、SC 形成に性差があることや、年齢層が高いほど SC の割合が増加していることを見出した。同様に、健常者や各神経変性疾患患者 buffy coat の MC と SC の形成を解析したところ、MC の割合がアルツハイマー病やパーキンソン病患者で健常者より増加しており、レビー小体型認知症患者では MC の割合が健常者より減少していることを見出した。この解析では、MC、各 SC、単体の複合体 I の割合の増減が互いに影響するため、これら 5 領域の割合をそれぞれ縦軸と横軸にした、10 通りの組み合わせの散布図マトリクスを用いて、領域間の割合の増減の相関性を解析した。アルツハイマー病、パーキンソン病、レビー小体型認知症において、MC の割合が減少する場合、単体の複合体 I の割合が増加することを見出した。さらに、パーキンソン病とレビー小体型認知症患者において、MC、各 SC、複合体 I の割合をそれぞれ縦軸にとり、Hoehn-Yahr の重症度分類を横軸にした、5 通りの組み合わせの散布図により解析すると、重症な患者ほど、MC や構成複合体数の多い SC の割合が減少し、構成複合体数の少ない SC や複合体 I の割合が増加することを見出した。この結果より、パーキンソン病とレビー小体型認知症患者では、症状の進行に伴って、MC を含めた SC 形成が低下するのではないかと考えられた。