

学位論文概要

西暦 2022年 1月 5日

学位申請者
(岡本 瑞穂) 印

学位論文題目

mitochondria DNA copy numberがコエンザイムQ10量と呼吸鎖複合体遺伝子発現量に及ぼす影響

学位論文の要旨

健康寿命の延伸が求められている。健康維持に重要なオルガネラとしてミトコンドリアが注目されている。細胞内のATP産生の多くはミトコンドリアに依存している。ミトコンドリアは独自のDNA（ミトコンドリアDNA：mtDNA）を有している。ミトコンドリアDNAコピー数（mtDNAcn）は加齢や疾病により低下することが報告されている。mtDNAcnは、運動により増加することも報告されている。mtDNAcnは加齢や疾病のバイオマーカーとしても注目されている。

コエンザイムQ(CoQ)はミトコンドリア電子伝達系の必須因子である。また、その還元型は、脂溶性の抗酸化物質として重要である。加齢に伴い、組織中のCoQ量が減少することが報告されている。しかしながら、その生体内濃度の制御機構には、不明な点が多く残されている。本研究では、mtDNAcnの変動とCoQ量の変動について解析した。

まず、モノサイトのマクロファージへの分化過程について検討した。ヒトモノサイト様細胞THP-1はPMA刺激によりマクロファージ様細胞に分化する。phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 投与により、mtDNAcnは増加した。しかしながら、細胞内のCoQ量に顕著な変動は認められなかった。意外なことに、PMA投与によりmtDNAcnの増加が認められたものの、mtDNAにコードされた遺伝子の発現量は低下していた。Transmission Electron Microscope(TEM)の解析においてもミトコンドリアの電子密度は低下していた。また、ミトコンドリアのマーカーであるTom20タンパク質も低下していた。ミトコンドリア制御因子の遺伝子発現量を測定したところ、PMA刺激により、Sirtuin 1 (SIRT-1)が低下し、Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 α (PGC-1 α)の脱アセチル化量が低下した。結果、nuclear respiratory factor 1 (NRF-1)とMitochondrial transcription factor A (TFAM) が低下することにより、mtDNAにコードされているミトコンドリア電子伝達系タンパク質群の遺伝子発現量が低下する可能性を見出した。

次に、人為的にmtDNAcnを低下させた時のCoQ10量を解析した。mtDNAcnの低下手法として、エチジウムブロマイド (EtBr) を用いた。EtBr 投与2週間の細胞で、Total CoQ10量が増加することを見出した。CoQ合成酵素群の一部の遺伝子発現量、具体的には*PDSS2*, *coq6*, *coq7*, *coq8*が増加していた。*coq7*遺伝子発現量は活性酸素種により増加する。しかしながらEtBr投与で活性酸素産生量はむしろ低下した。PDSS量は、カロリー制限により変動する。カロリー制限により変動する転写因子として、SIRT-1に注目し解析した。EtBr投与により、*SIRT-1* mRNA量が増加した。プロサポシン (Psap) はCoQと結合するタンパク質である。EtBr投与により、Psap mRNA量が増加することも見出した。次に、SIRT-1とPsapのsiRNAによるKD株を作製した。SIRT-1 KD株とPsap KD株ではCoQ合成酵素群の一部の遺伝子発現量が低下した。SIRT-1 KD株ではPsap遺伝子の発現量も低下した。Psap KD株ではCoQ10量の低下が見られた。このことから、SIRT-1—Psap—CoQの経路によりCoQ量が制御されている可能性が

挙げられた。

最後に、生理的な条件下におけるCoQ量の制御機構の解明をめざし、卵の発生時のCoQ量を解析した。メダカの排卵を促し、受精卵のCoQ10量の変化を継時的に測定した。メダカ卵は受精後にCoQ10量が増加した。CoQ合成酵素群の遺伝子発現量を測定したところ、*coq9* の遺伝子発現量が増加していた。メダカ卵を用いたさらなる解析が期待される。

以上の結果はCoQ生合成機構調節機構の解明に寄与すると考えられる。CoQ生合成の増強を介した新たな抗加齢戦略の発展が期待される。

学位論文要旨

西暦 2022年 1月 5日

学位申請者
(岡本 瑞穂) 印

学位論文題目

mitochondria DNA copy numberがコエンザイムQ10量と呼吸鎖複合体遺伝子発現量に及ぼす影響

学位論文の要旨

健康寿命の延伸が望まれている。健康を維持するためには、個々人の健康状態を正確に把握し、より健康な状態を維持することが必要である。「ミトコンドリア」と、エネルギー産生に必須の脂質でもある「コエンザイムQ (CoQ)」は、いずれもその量や質が加齢や病態で変動することから、抗老化や健康維持のマーカーやターゲットとして注目されている。

ミトコンドリアは、多くの真核生物の細胞小器官の一種であり、二重の生体膜を持っている。細胞内のATP産生の多くはミトコンドリアに依存している。近年、ミトコンドリアの質や量が加齢や疾病により低下することが報告されている。一方で、運動やカロリー制限によりミトコンドリア機能が增强することもわかってきている。ミトコンドリアを活性化させる制御機構の解明が望まれている。ミトコンドリアは独自のDNA (ミトコンドリアDNA: mtDNA) を有している。ミトコンドリアDNAコピー数 (mtDNAcn) は加齢や疾病により低下することが報告されている。mtDNAcnは、運動により増加することも報告されている。mtDNAcnは加齢や疾病のバイオマーカーとしても注目されている。

CoQはベンゾキノン環とイソプレノイド側鎖からなるユニークな分子である。CoQの同族体にはイソプレノイド側鎖が異なったものが存在し、ヒトはイソプレノイド側鎖が10回繰り返されたCoQ 10の状態で存在している。マウスやラットはCoQ 9であり、酵母や細菌はCoQ 6~CoQ8であるなど、種により側鎖長は差がある。CoQは生体内では、二つの役割がある。一つ目はミトコンドリア電子伝達系の電子を輸送する成分として、二つ目が生体内で合成される脂溶性の抗酸化物質としての役割である。加齢に伴い、組織中のCoQ量が減少することが報告されている。CoQはミトコンドリア内膜で生合成される。CoQは重要な小分子であるにもかかわらず、その生体内濃度の制御機構などには、不明な点が多く残されている。特に、ミトコンドリア量とCoQ量との関連は興味深いものであるが、加齢や疾病によるミトコンドリアの変動とCoQ量の変動の相関については明らかになっていない。

そこで本論文では、ミトコンドリアとCoQについて注目し、生理的条件下や、人為的にミトコンドリアの濃度を変動させた場合のCoQ量やその合成酵素遺伝子発現量の挙動の解析を通して、CoQ量の制御機構の解明を試みた。本論文は、6章からなる。第1章では以上の研究背景を述べた。2章以下の内容について以下に詳細を示す。

まず、モノサイトのマクロファージへの分化過程について検討した。ヒト単球系細胞株であるTHP-1細胞は、単球-マクロファージにおける研究モデルとして使用され、細胞分化における転写制御ネットワーク解析などが行われてきている。しかしながら、mtDNAにコードされている遺伝子群の発現量や、mtDNAcnの解析は十分にはなされていない。THP-1はPMA刺激によりマクロファージ様細胞に分化する。PMA投与により、mtDNAcnは増加した。しかしながら、細胞内のCoQ量に顕著な変動は認められなかった。意外なことに、PMA投与によりmtDNAcnの増加が認められたものの、mtDNAにコードされた遺伝子の発現量は低下していた。そこで、この現象についてさらなる解析を行った。TEMによるミトコンドリア解析においてもミトコンドリアの電子密度は低下し

ていた。また、ミトコンドリアのマーカである Tom20 タンパク質も低下しており、ミトコンドリア量の低下が考えられた。ミトコンドリア量や mtDNA にコードされた遺伝子発現量の低下の解明を目的として、ミトコンドリア制御因子の遺伝子発現量を測定したところ、ミトコンドリア制御の中心的な転写因子の変動を見出した。PMA 刺激により、Sirtuin 1 (SIRT-1) が低下し、Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 α (PGC-1 α) の脱アセチル化量が低下した。結果、Nuclear Respiratory Factor 1 (NRF-1) と Mitochondrial transcription factor A (TFAM) が低下することにより、mtDNA にコードされているミトコンドリア電子伝達系タンパク質群の遺伝子発現量が低下する可能性を見出した (第 2 章)。

CoQ10 量は加齢に伴い低下する。また、加齢や疾病により mtDNAcn も低下する。しかしながら、mtDNAcn の低下と CoQ10 量の低下の相関関係は明らかにされていない。次に、mtDNAcn 低下時の CoQ10 量を解析した。ヒト単球系細胞モデルである THP-1 細胞と、ヒト乳癌由来細胞株の MDA-MB-231 細胞を用いた。mtDNAcn の低下手法として、古くから用いられているエチジウムブロマイド (EtBr) を用いた。EtBr 存在下では、mtDNA の合成は阻害され、長期培養により、mtDNA 欠失細胞 (ρ 0 細胞) を作製することができる。EtBr 投与 2 週間の細胞で、Total CoQ10 量が増加することを見出した。次に、この増加メカニズムを解明するため、CoQ 合成酵素群の mRNA 発現量解析を行った。CoQ 合成酵素群の一部の遺伝子発現量、具体的には PDSS2, coq6, coq7, coq8 が両方の細胞で増加していた。これらの遺伝子の転写制御機構は一部解明されている。Coq7 遺伝子発現量は活性酸素種により増加することが報告されている。そこで、EtBr 投与細胞の活性酸素産生量を測定した。活性酸素産生量はむしろ低下していた。PDSS 量は、カロリー制限により変動することが報告されている。カロリー制限により変動する転写因子として、SIRT-1 に注目し解析した。EtBr 投与により、SIRT-1 mRNA 量が増加した。プロサポシン (Psap) は CoQ と結合するタンパク質である。EtBr 投与により、Psap mRNA 量が増加することも見出した。EtBr 投与による CoQ 増加メカニズムに、SIRT-1 と Psap が関与している可能性が示された (第 3 章)。

EtBr 添加により変動した SIRT-1, Psap と CoQ10 量との関係を解析した。SIRT-1 と Psap の siRNA による KD 株を作製し、CoQ 合成酵素群の遺伝子発現量解析と CoQ10 量を解析した。SIRT-1 KD 株と Psap KD 株では CoQ 合成酵素群の一部の遺伝子発現量が低下した。興味深いことに SIRT-1 KD 株では Psap 遺伝子の発現量も低下した。Psap KD 株では CoQ10 量の低下が見られた。このことから、SIRT-1—Psap—CoQ の経路により CoQ 量が制御されている可能性が挙げられた。(第 4 章)

生理的な条件下における CoQ 量の制御機構の解明をめざし、次に卵の発生時の CoQ 量を解析した。メダカは、飼育しやすく長期的に卵を得ることができるなど、実験動物モデルとして注目されている。最初にメダカの CoQ の側鎖長の長さの同定を行ったところ、メダカの CoQ は CoQ10 であることがわかった。メダカの排卵を促し、受精卵の CoQ10 量の変化を継時的に測定した。メダカ卵は受精後に CoQ10 量が増加した。CoQ 合成酵素群及び、プロサポシン、スクワレンシンターゼ (FDFT1) の遺伝子発現量を測定したところ、coq9 の遺伝子発現量が増加していた。coq9 は CoQ 合成酵素群を調整していると考えられており、卵形成における CoQ 増加メカニズムの主要因子である可能性が挙げられた。メダカ卵を用いたさらなる解析が期待される。(第 5 章)

第 6 章では以上の研究を総括した。

CoQ はミトコンドリア電子伝達系の必須因子であり抗酸化物質としても機能している。また、老化や疾病においてその生理的濃度が低下することからサプリメントとしても注目されている。以上の結果より、その生体内での合成機構の制御機構の一端が明らかとなった。mtDNAcn も加齢とともに減少する。人為的な mtDNAcn の減少はむしろ PGC-1 α や SIRT-1 などの転写因子の変動を介して、CoQ 合成遺伝子群の mRNA の発現を増強した。mtDNAcn の減少により変動する転写因子群が CoQ 量の合成に関与していると考えられた。また、メダカもヒトと同じ CoQ10 を使用していること、メダカの卵の成熟過程において、CoQ10 量が増加し、これには CoQ 合成酵素 coq9 の関与が示唆された。以上の結果は CoQ 生合成機構調節機構の解明に寄与すると考えられる。CoQ 生合成の増強を介した新たな抗加齢戦略の発展が期待される。

(様式 6)

S u m m a r y

Applicant for degree :

Mizuho Okamoto

Title of thesis :

Effect of mitochondria DNA copy number on coenzyme Q10 levels and respiratory chain complex gene expression

[Introduction] Mitochondria DNA (mtDNA) copy numbers are altered by a variety of physiological conditions. Level of coenzyme Q10 (CoQ10) has also been reported to be altered by various physiological conditions. CoQ10 is an essential cofactor for mitochondria electron transport system and is known to be biosynthesized in mitochondria. However, the mechanism(s) how this biosynthetic mechanism(s) regulate is not known. We hypothesized that mitochondrial level might correlate with the level of CoQ10, the relationship between the number of mtDNA and the amount of CoQ10 are studied. Prosaposin is a CoQ10 binding protein. The role of prosaposin on the regulation of CoQ10 level is also studied.

[Method] Three models of mtDNA variation were used. Firstly, differentiation into monocyte-macrophages was used as a model for increased mtDNA levels. Secondly, ethidium bromide was administered as a model for decreased mtDNA levels. Thirdly, as an animal model of mtDNA changed, a developmental model of medaka fish was analyzed. CoQ level was analyzed with HPLC-ECD system. mtDNAcn is analyzed by real-time PCR methods. mRNA expression levels are analyzed by real-time PCR.

[Results] mtDNA copy number was not simply correlate with cellular CoQ10 level. CoQ10 levels were increased when mtDNA was reduced by ethidium bromide treatment. Similarly, prosaposin, a CoQ-binding protein, was also increased. Levels in coq4 and coq7, which contribute to CoQ biosynthesis is increased by the treatment of ethidium bromide, and these levels are reduced by knockdown of prosaposin by siRNA. It was suggested that the increase in CoQ10 levels during mtDNA depletion may be caused by an increase in prosaposin.

In medaka embryogenesis, mtDNA levels were increased but mtDNA/nuclear DNA was decreased. CoQ10 levels increased during embryogenesis. Gene expression of the CoQ synthesis gene coq9 also increased during embryogenesis. The role of coq9 in CoQ synthesis is expected to be clarified in the future.