

2 ミトコンドリア呼吸鎖超複合体に含まれる CoQ 定量手法の確立

○田中裕人, 吉村眞一, 加柴美里, 山本順寛
東京工科大学応用生物学部

【緒言】

ミトコンドリア電子伝達系は、コンプレックス I ~ V のタンパク質群と、CoQ10、シトクロム C から構成されている。近年の研究により、ミトコンドリア電子伝達系タンパク質群は、それぞれ独立ではなく超複合体を形成して存在していることが分かってきた。具体的には、コンプレックス I、コンプレックス III、コンプレックス IV の超複合体が検出されており、CoQ10 もこの中に含まれて存在しているらしい。

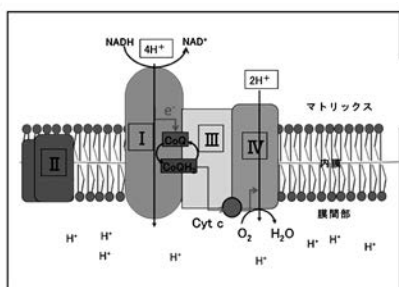
CoQ10 の組織内濃度は、加齢や病気に伴い減少することが報告されている。しかしながら、これらのデータは細胞レベルや細胞小器官レベルトータルでの CoQ10 量を解析したものであり、ミトコンドリア電子伝達系で電子を伝達している局所部位の CoQ10 量が、加齢や病態により変動しているのかは不明である。本研究では、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体に含まれる CoQ 定量手法の確立を試みた。

【実験方法】

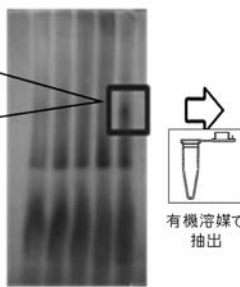
ミトコンドリアは、培養細胞やラット組織から遠心操作により抽出した。ミトコンドリア膜サンプルはブルーネイティブ電気泳動手法 (BN-PAGE) により分離した。BN-PAGE はネイティブ電気泳動を改良した電気泳動手法であり、タンパク質複合体を壊すことなく、分子量により分画することができる。主に膜蛋白質複合体の解析に用いられてきており、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体に関する既報も BN-PAGE が多用されている。サンプルを 3 群に分け、界面活性剤①無添加、② digitonin 添加、③ n-Dodecyl-maltoside 添加、の各条件で電気泳動を行った。電気泳動後の各蛋白質の検出は、In-gel enzyme activity assay により行った。BN-PAGE 後のメンブレンを切り出し、ヘキサン抽出にて CoQ を抽出、HPLC-ECD を用いて測定を行った。

【結果と考察】

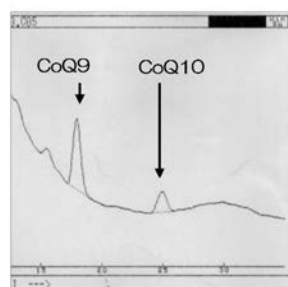
digitonin 処理サンプルにおいて、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体の存在を確認した。切り出したゲルをヘキサン抽出したところ、超複合体含有バンドで CoQ を検出した。このことから、一定量の CoQ は超複合体に含まれていることがわかった。本実験手法を用いて細胞内 CoQ 濃度の変動が超複合体中の CoQ 量にあたる影響を解析している。



ミトコンドリア超複合体



ブルーネイティブ電気泳動法でミトコンドリア超複合体を分解



ミトコンドリア超複合体