

2 ヒト表皮ケラチノサイト HaCaT 細胞中プロ サポシンのノックダウンによるコエンザイム Q10 の減少と酸化ストレスの亢進

○澤村佳美, 加柴美里, 芋川玄爾, 山本順寛
東京工科大学応用生物学部

【緒言】

脂溶性のコエンザイム Q10 が生体内にユビキタスに存在するためには、本物質を結合し輸送する蛋白質の存在が考えられる。当研究室ではコエンザイム Q10 を結合する蛋白質としてサポシンBを見だし、ヒト細胞内で両者の複合体が存在することを明らかにした (J. Clin. Biochem. Nutr. (2008) 42, 167-174)。サポシンBはその前駆体蛋白質プロサポシンの加水分解により生成する蛋白質である。そこで本研究では、コエンザイム Q10 結合蛋白質の生理的意義を明らかにする目的で、プロサポシンをノックダウンした細胞を作製し、コエンザイム Q10 とその酸化還元バランスを測定した。

【方法】

プロサポシン遺伝子をターゲットとしたインサートを pcDNA6.2-GW/EmGFP-miRNA ベクターに組み込み、miRNA ベクターを作製した。これをヒト表皮ケラチノサイト HaCaT 細胞に導入し、一過性プロサポシンノックダウン細胞を作製した。miRNA ベクター投与後、2, 5, 7 日後の細胞から脂質を 2-ブロパノールで抽出し、コエンザイム Q10 の酸化型 (CoQ₁₀) と還元型 (CoQ₁₀H₂)、遊離コレステロール (FC) を高速液体クロマトグラフィーで定量した。細胞内酸化ストレスは全コエンザイム Q10 中の酸化型の割合 (%CoQ₁₀) で評価した。ウェスタンブロット法でプロサポシンおよびサポシンBのノックダウンを確認した。

【結果と考察】

HaCaT 細胞中プロサポシンのノックダウンにより、サポシンBはday 2, day 5, day 7 で顕著に減少した。プロサポシンもday 2で明らかに減少したが、妨害蛋白質の出現により day 5 と day 7 については不明であった。細胞内FC濃度と蛋白質濃度はノックダウンによりコントロールに比べ顕著に減少していた。したがって、プロサポシンのノックダウンが細胞増殖や生存に影響を与えている可能性がある。

コエンザイム Q10 量はFCとの比で評価した。ノックダウンにより (CoQ₁₀H₂ + CoQ₁₀) / FC が有意に減少した。特に CoQ₁₀H₂/FC の減少が顕著であったのに対し、CoQ₁₀/FC はほぼ横ばいであった。%CoQ₁₀ はコエンザイム Q10 の酸化還元バランスを示すものであり、良い酸化ストレスの指標である。ノックダウンにより %CoQ₁₀ は有意に上昇するので、HaCaT 細胞中の酸化ストレスの亢進を意味すると考えられる。

以上まとめると、HaCaT 細胞中プロサポシンのノックダウンは細胞内コエンザイム Q10 の減少と酸化ストレスの増大を招き、細胞増殖や生存を阻害した。これらは、プロサポシンのノックアウトマウスが生後 30 日程度で死亡する (Fujita N et al. Hum. Mol. Genet. (1996) 5 : 711-725) こととも良く対応していると考えられる。