

Title	Higd1a is a positive regulator of cytochrome c oxidase
Author(s)	林, 隆治
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/51950
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏名 Name	林 隆治
論文題名 Title	Higd1a is a positive regulator of cytochrome c oxidase (Higd1aはチトクロームcオキシダーゼの正の調節因子である)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>ミトコンドリアは酸化的リン酸化によって細胞活動に必要なアデノシン三リン酸 (ATP) を供給している。この酸化的リン酸化は五つの蛋白複合体 (complex I~V) から構成されており、水素イオンを膜を介した濃度勾配に逆らってくみ出すことで駆動力を得て、ATPを産生している。水素イオンの汲み上げには電子の化学エネルギーが使用され、電子は最終的にはcomplex IVにおいて酸素を最終受容体とすることで無害な水に変換されている。酸素濃度の変化が生体および細胞に広く影響を及ぼすことが知られているが、大部分の酸素を消費している酸化的リン酸化の酸素濃度の変化による調節機構については不明のままであった。本研究では、低酸素下におけるミトコンドリアでのエネルギー産生調節機構を明らかにすることを目的とした。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>比較的ミトコンドリアが豊富に存在するラット心筋細胞を用いて、低酸素刺激によって早期に発現誘導される遺伝子群に着目した。この中で (i) 種族間を越えて保存され、(ii) ミトコンドリア遺伝子のデータベースであるMitoCartaに収載されているHypoxia inducible gene domain family, member 1A (Higd1a)に着目した。Higd1aはミトコンドリアに局在し、二回膜貫通型の分子量12kDaの小さいタンパク質であることがすでに報告されていたが、詳細な機能については不明であった。そこでまず、Higd1aの結合タンパク質を免疫沈降と質量分析で同定することとした。免疫沈降およびnative PAGEによってHigd1aはcomplex IV (cytochrome c oxidase: CcO) と結合していることが示された。</p> <p>次に、大腸菌で産生しaffinity精製したtag付のHigd1aとウシ心臓から結晶が作成可能な高度に精製されたCcOが結合し得るか否かをpull-down assayとnative PAGEで評価した。いずれの実験でもCcOとHigd1aの結合が確認されたので、Higd1aの結合によるCcO活性の変化を評価した。Higd1aの結合によりCcO活性は約2倍上昇した。</p> <p>続いて活性変化により引き起こされる構造変化を共鳴ラマン法で評価した。結果、Higd1aの結合によりCcOの① heme aの電子スピンの状態がlowからhighに変化②heme aの周辺構造であるformyl groupの伸縮状態が変化することが明らかとなった。これはHigd1aの結合がCcOの活性中心であるheme aの周辺構造を変化させ、CcOの水素イオン輸送 (H-pathway) に影響を与えていることを示すものであった。</p> <p>Higd1aの生理機能を解明するために、ラット心筋細胞でCcO活性と酸素消費量を計測したところ、Higd1aのknock downによってCcO活性と酸素消費量が共に減少し、過剰発現によっていずれも増加するということが示された。酸化的リン酸化の最終産物であるATPを測定したところ、CcO活性や酸素消費量と同様の挙動を示すことがわかった。さらにはFRET (蛍光共鳴エネルギー移動) を用いた蛍光ATP濃度可視化probe (ATeam) を用いて低酸素環境におけるミトコンドリア内ATP濃度を評価したところ、Higd1aのKnock downによって低酸素環境初期からATP濃度が低下すること、過剰発現によってATP濃度の低下が抑制されることが示された。最後にviabilityを評価するために心筋細胞でHigd1a knock downを行い低酸素環境で培養したところ、control群に比較して有意にviabilityが低下することが判明した。このviabilityの低下はexogenousなHigd1aの発現によってrescueされることが示された。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>今回の研究により我々が同定した低酸素刺激で早期に発現が上昇するHigd1aは、ミトコンドリアのcomplex IV (CcO) の活性中心近傍に結合し、その活性を水素イオンの輸送に影響を与えることで調整していることが示された。水素イオンの輸送に影響することで、結果としてATPの産生に影響を及ぼし、その発現上昇が低酸素環境におかれた細胞に保護的に作用することが示された。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 林 隆治

	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	大阪大学教授 高島 成二
	副 査	大阪大学教授 南池 尊
	副 査	大阪大学教授 吉森 保

論文審査の結果の要旨

ミトコンドリアにおけるATP産生機構である酸化リン酸化の調節因子を発見した研究である。ラット心筋細胞を用いて低酸素環境で一過性に発現上昇する遺伝子のスクリーニングを行い、Higd1aに着目した。Higd1aはミトコンドリア内膜に局在し、酸化リン酸化の過程で酸素を直接消費するタンパク複合体であるチトクロームcオキシダーゼ (complex IV) に結合してその活性を調節している。この調節機構はcomplex IVの活性中心であるheme aの周辺構造の変化に起因するもので、水素イオンの排泄経路に影響を及ぼすという作用機序が示された。このHigd1aの効果は、心筋細胞においてエネルギー枯渇状態と想定される低酸素環境において、ミトコンドリアでのATP産生能を向上させて細胞に保護的に作用するということが明らかとなった。この結果は、ミトコンドリア病のようなエネルギー枯渇が一因と考えられる難治性の疾患に対する治療として介入し得る可能性を有しており、学位の授与に値する内容の論文であると考えられる。