

氏 名 (本 籍)

と せき よし ひろ
小 関 良 宏

学立の種類

藥 學 博 士

学位記番号

第 23 号 博 藥

学位授与年月日

昭和44年12月10日

学位授与の要件

学位規則第5条第1項該当

研究科專門課程

東北大学大学院薬学研究科

(博士課程)薬学専攻

學位論文題目

培養細胞を用いた Ubiquinone に関する研究

(主 查)

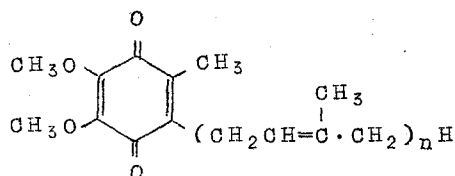
論文審查委員

教授 小澤 光 教授 内 山 充

教授 南 原 利 夫

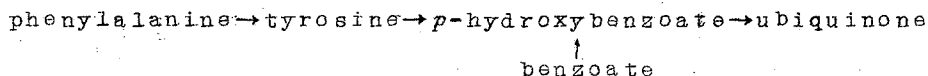
論文内容要旨

生体内に広く分布しているUbiquinone (以下UQと略)の生理活性については, Mitochondria (以下Mtと略)における電子伝達系の因子として関与していることが推測されるに至つたが, Hemmingら(1958年)およびSeshadriら(1961年)によりMt以外の細胞画分にも存在することが明らかになり, UQの生体内での役割が注目された。これに関連して exogenous UQの吸収, 分布, 排泄および代謝に関する研究が相次いで行われた。最近では病的状態でのUQの役割が論じられ, さらに各種疾患に exogenous UQを投与した場合の効果も問題視されてきている。



Ubiquinone-n (n=5,6,7,8,9,10)

また一方, UQ核の生合成についてはいまだ確定されておらず, phenylalanine (Pheと略)より直接的にUQへ取り込まれることがあると考えるのはOlson(1960), Dialammeh(1959), Olsonら(1961)である。Olsonら(1963)は ^{14}C -pheに比し, U- ^{14}C -tyrosineの方がUQ-9へのとり込みが多いのはbenzoateがUQ生合成の主経路にないということを示唆するものと報告した。更にOlson(1966)はラットを用いて実験を続け,



ようなSchemeを提唱した。これに対し, Wiss(1961)は ^{14}C -mevalonateとの比較実験で, ラットにPheを投与したが殆んどUQへのとり込みがみられなかつたと報告している。また, Azotobacter vinelandii及びラット腎を用いたRudney and Parson(1963, 1964, 1965, 1966)の一連の報告は, L-pheやL-tyrosine(以上Tyrと略)よりは, 共存する混在物のp-hydroxybenzaldehydeから直接合成されることを主張している。

以上のようにUQに関する研究は多くの人達によつて行われて来たが、その生体内における役割および生成に関しては依然として不明の点が残されている。また培養細胞を用いたUQの研究はほとんど行われていない。UQ研究のこのような現状をふまえ、本研究は細胞培養という比較的实验条件を規定し易い環境における細胞レベルでの実験を主体とし、特にexogenous UQのはたらきを解明せんとして行なわれたものである。

1. Exogenous ubiquinoneの生物活性

外因性UQが細胞レベルにおいて何らかの生物活性を示すかどうかについて先ず検討した。正常培地にUQを加えてもUQ無添加のものとの差がなかつたので、precursorと考えられているphe, tyrを欠いた培地での実験を試みた。その結果、両アミノ酸を欠いた場合はほとんど増殖しないが、UQ-9投与によつて増殖能の回復がみられた。この増殖の回復効果は、培地に含まれる他のアミノ酸、たとえばglutamineやarginineにおいてはみられず、またL-PheとL-Tyrの一方のみを欠いた場合でも増殖はかなり抑えられ、これにUQ-9を添加するとやはり増殖力はある程度まで回復した。

一方Phe, Tyrを欠いた場合、呼吸活性はかなり低く、これにUQ-9を添加すると添加後40時間前後で効果が顕著に表われ、それより短時間のincubationではほとんど効果がなかつた。

これらのことから増殖能の低下及び回復には少くとも呼吸活性が関連しており、外因性UQは生体内で不足したUQを何らの方法で補い得るものと考えられる。

2. FM3A細胞におけるUbiquinoneの確認とexogenous Ubiquinoneのとり込み

次にFM3A細胞は内因性UQを含んでいるかどうか、また外因性UQは細胞内へとり込まれるかどうかを問題にした。もしUQを含まず、しかもとり込みも行なわれないとすれば、外因性UQの上記効果は全く別の観点から考える必要がある。少くとも呼吸活性の大小が関与しているとは考えにくいからである。

細胞からのUQの抽出および標準品とのRf値の比較により、Ubiquinone-9を含んでいることが判明した。またacetone処理で脂質やUQを除いたMtにUQを加えると、呼吸活性の回復がみられ、この細胞のMtにもUQを含んでいることを示した。

次に外因性UQのとり込みを調べた。まず、オートラジオグラフィーで調べ、UQは細胞全般にほぼ一様に分布することを知つた。これだけの実験では細胞顆粒へのとり込みがはつきりしないので、さらに³H-UQの各画分へのとり込みを調べた。その結果³H-UQ添加後8hr位でMt画分への集積が現われ始め、25hr後では他の画分に比較しMtへの集積が明瞭となつた。

前述したように呼吸活性の回復が明瞭に現われるまでは40時間前後を要したとと合せ考えるとき、外から添加されたUQは細胞膜を通過しMtまでとり込まれてそこで効果を表わすことが推察出来る。しかしUQは膜のstabilityを増すという報告もみられ、その結果二次的に効果が現われることも考えられる。しかしいずれにしても、とり込みと作用との間に密接な関係があることは確かである。

3. 細胞レベルにおけるUbiquinoneの生合成

これまでPheとTyrはUQのprecursorであり、これが欠乏するとUQの生合成が行われず、従つてUQの欠乏をまねくと仮定して来た。果してそうであろうか。前述した様に、UQ核の生合成についてはいまだ定説がなく、特にtyrosineからの合成が行われるかどうか興味ある点である。そこで精製したtyrosine- $U-^{14}C$ を用いてUQへのとり込みを調べた。

その結果はtyrosineのUQへのとり込みは明瞭で、Olsonらの説を支持する結果が得られた。Pheからのとり込みは調べていないが、この細胞ではTyrからUQ核が合成されることは先ず間違いないと思われる。従つてPheやTyrが欠けた培地ではUQの合成もかなり抑制されると考えるのは妥当であろう。

4. FM3A細胞のenergy生産系

最後に実験材料として選んだこの細胞のenergy生産系には何か特性があるかどうかを調べた。もし何か変つた特性があれば、上の結果は広く細胞全般に適用することは無理があると考えざるを得ないからである。

元来この細胞はC3H mouseの乳癌起源であるから癌細胞の特性の1つと云われるCrabtree効果の有無について調べた。その結果Crabtree効果は明らかに見られ、この観点に立つと癌としての特性を保持していると言える。また一方、酸素電極法による解析の結果は、SuccinateまたはNADを介する基質の両方を呼吸基質として利用し、呼吸因子の少なくともUQ, Cytochrome系を経て O_2 に至る呼吸鎖があり、さらにこの呼吸鎖にリン酸化反応が共役していることが推測される。従つて一般の哺乳類Mtと特に異つた点はみられなかつた。

総 括

培養細胞FM3Aを用いexogenous Ubiquinone (UQと略)の生理活性、UQ核の生合成並びに細胞のenergy生産系について検討し次のような結果を得た。

1. Exogenous UQの生理活性 i) phenylalanine (Pheと略)およびtyrosine (Tyrと略)欠除培地において低下した増殖能力はUQの添加によりある程度まで回復される。
- ii) Phe Tyr欠除培地において低下した呼吸活性はUQ-9添加後45時間前後で明瞭に回復

される。

2. FM3A細胞におけるUQの確認とexogenous UQのとり込み i) FM3A細胞にはUQ-9が含まれる ii) acetone処理Mtの呼吸活性はUQ添加により回復される。 iii) exogenous UQは初めsupernatantに多く、8hr前後でMitochondria (Mtと略)への集積が目立ち始め、25hrではMt画分が他の画分より多量のUQ-9をとり込む。
3. 細胞レベルにおけるUQ核の生合成

精製されたL-tyrosine-U-¹⁴CのUQへのとり込みが明らかに見られ、L-tyrosineのUQ核生合成への関与を示唆した。

4. FM3A細胞のenergy生産系 i) FM3A細胞はCrabtree効果を明らかに示し、癌細胞の特性を保持していた。 ii) 哺乳類一般にみられる電子伝達系因子を有し、これに共役した酸化のリン酸化機構の存在も暗示された。

exogenous UQの生理活性並びにとり込みについて若干の知見を得たことは、外因性UQの生理的意義のみならず、内因性UQの生体内での意義も同時に示唆するものであり意義深いと考えられる。またtyrosineがUQ核のprecursorとなり得ることを明らかにしたことは、いまだ確定されていないUQの生合成過程の解明に役立つものと思われる。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は、培養細胞に対する外部からの呼吸因子 ubiquinone の、主として取込みおよび生合成に関するものである。

材料としてもちいた FM3A 細胞はマウスの乳ガン起源のもので、管内において細胞培養が可能であり、継代培養により、ガン性はなお保持しており特殊なものと考えられる。また ubiquinone (UQ) に関しては微生物や哺乳動物の各組織における取込みや生合成は、Rudneyら (1963/66) の研究があるが、培養細胞における研究は本論文が始めてである。

その結果としてまず第 1 に、外因性の UQ が利用されるか否かを検討したが、前駆物質と考えられる L-Phe や L-Tyr を欠除した培地をもちいた培養において UQ-9 の添加は、増殖および呼吸活性の回復を示すが、効果はかなりおくれで発現し大体 40 時間前後である。この点から外因性 UQ もよく取込まれ利用されることを証明した。

第 2 に同じことを ^3H -でラベルした UQ-9 をもちい、オートラジオグラフィーでも細胞顆粒への取込みが証明できたが、8hr. 位でミトコンドリアへの集中がみられ、25hr. 位では他の画分への移行もおこなわれた。

第 3 にこの培養細胞における生合成の過程を追求し、 ^{14}C ラベルの L-Tyr をもちいて UQ の生合成をしらべたところ、明らかに L-Tyr が前駆物質となることを証明した。この結果から L-Tyr か UQ のベンゼン核を形成することは間違いないと思われる。

第 4 に FM3A 細胞の Crabtree 効果をしらべ、その存在が明らかとなり、ガン細胞としての特性を保持していることを認め、また酸素電極法による解析の結果は succinate または NAD を有する基質の両方とも呼吸に利用し、UQ や cytochrome 系を経て O_2 に至る呼吸チェーンを有し、さらにこれとリン酸化反応が共役していることを推測した。

以上の如く exogenous UQ の培養細胞に対するとり込みと生理活性、並びに細胞内での生合成について種々の新しい知見を得ており、これは培養細胞の生理面においてもまた UQ の生化学においても大いに意義あるものと考え、学位論文として充分価値あるものと認める。