

## 生細胞に取り込まれた可溶化コエンザイム Q10 のリアルタイム・ラマンイメージング

吉清恵介・戒能智宏

## 目 的

コエンザイム Q10 (CoQ10) は、呼吸鎖の電子伝達系に関わる補酵素で、細胞内エネルギー合成に重要な役割を果たしている。CoQ10 は、加齢とともに体内合成量が低下するため、減少分を経口摂取により補って、ヒトの活力増進可能であることをうたった多くの製品が出回っている。CoQ10 はその構造上水には溶けないことから、細胞への吸収効率が低く、利用効率の高い形状の水溶性 CoQ10 の開発とそれを利用した細胞内動態と機能の解明が基礎と応用の両面で急務とされている。ごく最近では、 $\gamma$ -シクロデキストリン (CD) の包接作用を利用して水に可溶化した製品も販売されていて、これを経口摂取したヒトの血中 CoQ10 濃度が、顕著に上昇することも報告されている。

しかし、血液中の CoQ10 が、実際に細胞内に取り込まれ細胞代謝などを上昇させることを確認した報告は無く CoQ10 の生体への実効的効果については不明点が多い。そこで、我々は、CoQ10 を、CD によって効果的に可溶化する条件を探索し、CoQ10 に実際に増殖促進効果があることを確認すること、更に、細胞内に取り込まれた CoQ10 分子の細胞内動態をラマン散乱法によってリアルタイムで視覚化することを目指した。

## 方 法

## 1. 可溶化 CoQ10 の作製

可溶化 CoQ10 は既存の手法をもとに混練法と溶解法により調製した (Nishimura et al. 2008 ; Higashi et al. 2009)。混練法ではモル比で CoQ10 : CD = 1 : 5 の混合試料にエタノール水溶液 (EtOH : H<sub>2</sub>O = 1 : 1) を加え、懸濁液が完全に粉末になるまで乳鉢で混練した。その後、減圧、遮光条件下で室温にて 3 日間乾燥させ、混練体を得た。溶解法では、CoQ10 を  $\gamma$ -CD 水溶液に加え (モル比で CoQ10 :  $\gamma$ -CD = 1 : 7)、生じた懸濁液を 30 分間ソニケートした後に、遮光、窒素ガス下において 50°C で 5 日間インキュベートし、遠心分離で固体を回収した。いずれの可溶化 CoQ10 も、培地への添加前にオートクレーブにより滅菌して使用した。

## 2. 分裂酵母の培養方法

実験には分裂酵母野生株 PR110 および CoQ10 の側鎖であるデカプレニル二リン酸合成酵素遺伝子破壊株  $\Delta dps1$ 、キノン骨格転位酵素遺伝子破壊株  $\Delta ppt1$  を用いた。完全

培地で 30°C、16 時間前培養した分裂酵母の細胞数を計測して菌体数を  $1 \times 10^5$  cells/ml に揃えて 10ml の最少培地 PMLU に植菌した後、本培養を行ない経時的に菌体数を測定した。

## 結果と考察

分裂酵母の  $\Delta dps1$ 、 $\Delta ppt1$  株は、CoQ10 を合成することができないため、最少培地で生育できないことが知られている (Kawamukai 2009)。そこで可溶化 CoQ10 の細胞内取り込み試験のモデルとしてこれらの株を使用した。まず最初に、CoQ10、CD のみをそれぞれ培地に添加して CoQ10 非生産株の生育を調べ、増殖しないことを確認した。次に、混練法と溶解法で作成した可溶化 CoQ10 を最少培地に添加したところ、溶解法に比べて混練法で作成した可溶化 CoQ10の方がより早い増殖の回復が見られたため、以後の実験には混練法により作成した可溶化 CoQ10 を用いることにした。

混練法により作成した可溶化 CoQ10 を、最少培地に 1~0.001mg の範囲でそれぞれ添加した培地を作成し、経時的に  $\Delta dps1$  の細胞数を測定したところ、添加量に関係なく増殖が回復することが明らかとなった。これは分裂酵母が培地中の可溶化 CoQ10 を細胞内に取り込み、機能することで生育が相補されたためと考えられる。次に同様の実験を異なる遺伝子を破壊した CoQ10 非生産株  $\Delta ppt1$  を用いて行ったところ、1mg の可溶化 CoQ10 の添加により同様の生育の回復を示したことから破壊する遺伝子にかかわらず CoQ10 の機能が相補されていることが示唆された。

分裂酵母 CoQ10 非生産株は、最少培地では生育しないため前培養には完全培地 (YES) を用いているため、本培養に移行する時に最少培地には含まれない成分が細胞内に残っている可能性が考えられラマンイメージングへの影響が懸念される。そのため、本培養開始後に可溶化 CoQ10 を添加する時期の検討を行った。本培養開始後、0、6、9、24 時間後に CoQ10 を添加して増殖を観察すると、添加が遅れるに従って増殖が遅れ、24 時間後に添加するとほとんど生育の回復が見られないことがわかった。これまでの研究から CoQ10 非生産株の生存率は、菌株により異なるが 2 日で 20-50%、3 日で数%にまで低下することが知られていることから、CoQ10 の添加を遅らせると細胞が死滅している可能性が示唆された。以上

のことから、ラマンイメージングに用いる細胞は本培養後速やかに CoQ10 を添加し、増殖が回復した細胞を用いることが必要である。

次に、分裂酵母野生株と CoQ10 非生産株 (*Δdps1*) を用いてラマンスペクトルを取得し、野生型株のラマンスペクトルには存在し、CoQ10 非生産株では顕著に消失しているピークを同定することができた。このピークが CoQ10 由来であるかどうかを確かめるために、可溶化 CoQ10 を添加して培養した CoQ10 非生産株のラマンスペクトルを取得したところ、確かにこのピークが出現していることから、細胞内における CoQ10 のピークを確認するとともに、培地に添加した CoQ10 が細胞内に取り込まれていることが示唆された。

本研究において CD を用いて包接させることによりこれまで困難であった可溶化 CoQ10 を作成し、分裂酵母 CoQ10 非生産株を用いて可溶化 CoQ10 による生育の回復が観察されたことから、可溶化 CoQ10 が細胞に取り込まれ機能することを明らかにした。また、ラマンイメージングにより細胞内の CoQ10 と思われるピークを同定することができた。これらの結果は、細胞レベルで可溶化 CoQ10 の機能性と動態を明らかにした点で画期的であり、今後時間経過における細胞内の CoQ10 の局在、動態や分解をリアルタイムで解析することによりサプリメントや医薬における最適な摂取量や吸収効率を高めた分子の創製などの応用に利用できることが期待される。

## 引用文献

- Higashi, T., Nishimura, K., Yoshimatsu, A., Ikeda, H., Arima, K., Motoyama, K., et al. (2009). Preparation of four types of coenzyme Q10/gamma-cyclodextrin supramolecular complexes and comparison of their pharmaceutical properties. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 57, 965-970.
- Kawamukai, M. (2009). Biosynthesis and bioproduction of coenzyme Q10 by yeasts and other organisms. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 53, 217-226.
- Nishimura, K., Higashi, T., Yoshimatsu, A., Hirayama, F., Uekama, K., & Arima, H. (2008). Pseudorotaxane-like supramolecular complex of coenzyme Q10 with gamma-cyclodextrin formed by solubility method. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 56, 701-706.

## 謝 辞

本研究の遂行にあたりまして、ご助言賜りました山本達之教授、川向誠教授、協力頂いた岩野耕助氏、林和弘氏に感謝致します。ラマンイメージングのデータ取得でご協力いただきました東京大学濱口宏夫教授に感謝致します。