

改良型可溶化コエンザイム Q10 の開発及び細胞内におけるその機能性と動態の解析

戒能智宏・吉清恵介

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、 γ -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。我々は、昨年度までに、CD 包接した CoQ10 を細胞外から添加することで分裂酵母 *Δdps1*、*Δppt1* 株の最少培地での生育不能を回復することを見いだした。

そこで我々は、グアニド基修飾した CD を合成し CoQ10 の溶解度をさらに向上させる試みと、さらに可溶化 CoQ10 が増殖促進効果以外に細胞に与える機能性の評価を行った。

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により調製した (Nishimura, et al. 2008, Higashi, et al. 2009)。モル比で CoQ10 : CD = 1 : 5 の混合試料にエタノール水溶液 (EtOH : H₂O = 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。作成した可溶化 CoQ10 は、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. 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ニリン酸合成酵素遺伝子破壊株 *Δdps1* および、出芽酵母 W303a 株とヘキサプレニルニリン酸合成酵素遺伝子破壊株 *Δcoq1* を用いた。完全培地で 30°C、16 時間前後培養した酵母の細胞数を計測して菌体数を 1×10^5 cells/ml に揃えて 10ml の最少培地 PMLU または YPG 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。

3. TTC (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride) を用いた呼吸欠損の測定は Nagai S. (1961) らの方法により行った。

結果と考察

分裂酵母の *Δdps1*、*Δppt1* 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 M., 2009)。昨年度までの研究により、混練法により作成した可溶化 CoQ10、1 mg を最少培地に添加することにより、分裂酵母 CoQ10 非生産株 *Δdps1* と *Δppt1* の最少培地での生育が回復することがわかっている。そこで、培地に添加した CoQ10 が呼吸能を相補しているか確かめるために、TTC を含む寒天溶液を YES+可溶化 CoQ10 プレートに生育したコロニーの上から重層し、30°C で培養した。野生株は呼吸能を持っているためコロニーが赤く染色されるのに対して、CoQ10 非生産株はコロニーが染色されなかったが、最少培地に可溶化 CoQ10 を添加したプレートで CoQ10 非生産株が生育しなかったため固体培地では培地に添加した可溶化 CoQ10 がうまく細胞に取り込めていないことが示唆された。今後は、液体培養した菌体を用いて酸素消費量の測定を行い、培地に添加した可溶化 CoQ10 がミトコンドリアに輸送され機能しているかどうかを検証する必要があると考えている。

出芽酵母は、ミトコンドリア呼吸鎖が機能しない場合非発酵性炭素源であるグリセロールを炭素源として生育できないことが知られている。そこで、分裂酵母と同様に、出芽酵母 CoQ6 非生産株 *Δcoq1* 株を用いて液体培地中に可溶化 CoQ10 を添加して生育が回復するかどうか検証した。その結果、*Δcoq1* 株は生育が相補されなかったことから、出芽酵母の場合培地中に添加した可溶化 CoQ10 は呼吸鎖の回復に寄与していないことが示唆された。しかしながら、出芽酵母 *Δcoq3* 株に CoQ6 を添加した場合、グリセロール培地で生育の回復が見られること (Padilla-López, S. et al. 2009)、出芽酵母に *Gluconobacter suboxydans* の *ddsA* 遺伝子を導入し細胞内で CoQ10 を合成させると、生育の回復が見られる (Okada, K. et al. 1998) ことから、今回、生育が回復しなかった原因としては取り込みによる側鎖長の影響や、CD 包接による細胞内への取り込みや細胞内への正しい位置への局在に何らかの影響を及ぼしたことが予想される。今後は、出芽酵母を用いた生育の回復に必要な条件の探索を行いたいと考えている。

本実験に用いた可溶化 CoQ10 は未修飾 CD を用いて調製されているが、未修飾 CD の代わりに極性の高い官能基を導入した CD を用いることで、より溶解度の高い可溶化

CoQ10の調製が可能だと考えられる。CDへの高極性官能基の導入の目的は、CD自身の溶解度を上昇させること、およびCoQ10を包接した隣り合うCD同士の水素結合の形成を防ぐこととである。そこで高極性官能基修飾CDとして、CDの一級水酸基のうちの一つにグアニド基を修飾したCDを合成し、それを用いて通常のCDと同様に可溶性CoQ10を調製した。そのように調製したサンプルを水に加えて攪拌し、溶液を0.20 μ mのフィルターで濾過した後に、溶液中のCoQ10量を超高速液体クロマトグラフを用いて定量した。測定の結果、グアニド基修飾CDを用いた際には、CoQ10の可溶性は改善されることが判った。原因としては、グアニド基を修飾することでCD自身の溶解度は上昇したものの、CDとCoQ10間の相互作用が弱くなり、結果的にCoQ10の可溶性が低下したと考えている。相互作用が弱くなった原因としては、CD空洞の開口部付近にグアニド基と対イオンが位置することで、比較的大きなCoQ10の包接に立体的に不利に働いたと考えている。これを解決するためには、CDの3種類の水酸基のうち、どの水酸基を官能基により置換するかを検討するために、他の2種類の異性体の合成とその可溶性を測定する必要がある。

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*,

tin, **57**, 965-970.

- Kawamukai, M. (2009). Biosynthesis and bioproduction of coenzyme Q10 by yeasts and other organisms. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **53**, 217-226.
- Nagai, S., Yanagishima, N. & Nagai, H. (1961) Advances in the study of respiration-deficient (RD) mutation in yeast and other microorganisms. *Bacteriol. Rev.* **25**, 404-426.
- 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.
- Okada, K., Kainou, T., Matsuda, H., Kawamukai, M. (1998). Biological significance of the side chain length of ubiquinone in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **431**, 241-244.
- Padilla-López, S., Jiménez-Hidalgo, M., Martín-Montalvo, A., Clarke, C. F., Navas, P., Santos-Ocaña, C. (2009) Genetic evidence for the requirement of the endocytic pathway in the uptake of coenzyme Q6 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 1238-1248.

謝 辞

本研究の遂行にあたりましてご助言賜りました川向誠教授、山本達之教授、協力頂いた西田達郎氏に感謝致します。