

可溶化コエンザイム Q10 の細胞内取り込み効率に及ぼす因子と細胞内分布が機能性に与える影響の解明

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。ヒトは元々 CoQ10 を合成することが可能であるが、加齢とともに細胞内含量は低下することから、各社からサプリメントとして販売されており、その需要は近年急拡大している。CoQ10 はその構造上水に難容であることから、細胞への吸収効率が低く、利用効率の高い形状の水への分散性が高い 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への分散性を高め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、更なる水への分散性の向上を目的としたグアニド基修飾 CD の合成や、CoQ10 の CD 包接体を細胞外から添加することで分裂酵母 *Adps1*、*Appt1* 株の最少培地での生育不能を回復することを見だし、出芽酵母では CoQ10 の CD 包接体がミトコンドリアに輸送されないことを示唆する結果を得た。

そこで我々は、CoQ10 の CD 包接体の細胞内動態を蛍光顕微鏡で観察するために必要な蛍光標識 CD の合成と構造確認、さらに CoQ10 の CD 包接体が細胞内でどのような機能を発揮しているかの機能性の評価を行った。

方 法

1. CD 包接体の作製

CD 包接体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、CD 包接体を得た。作成した CD 包接体は、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二リン酸合成酵素遺伝子破壊株 *Adps1* を用いた。完全培地で 30℃、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 YES に植菌した後、本培養を行わない経時的な菌体数の測定などの実験に用いた。

3. DHE (dihydroethidium) を用いた活性酸素種 (ROS) の検出は、Huard S. et al. (2008) らの方法により行った。

結果と考察

分裂酵母の *Adps1* 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 CD 包接体、1mg を最少培地に添加することにより、分裂酵母 CoQ10 非生産株 *Adps1* の最少培地での生育が回復することがわかっている。しかし、CoQ10 がどのように機能しているかは不明である。そこで、抗酸化能を持つグルタチオンを培地に添加したところ、同様に生育が回復した。また、ミトコンドリアにおける機能を調べるために、酸素消費量を生物用酸素モニター model53 (YSI) を用いて測定したところ、*Adps1* 株では CD 包接体を添加しても酸素消費量が全く回復しないことがわかった。これらのことから、CD 包接体はミトコンドリアの呼吸鎖には全く影響を与えないことが示唆された。

次に、CoQ10 非生産株 *Adps1* の細胞内酸化ストレス状態を蛍光色素 DHE を用いて測定した。酸化ストレスには、パラコート (PQ) を用いた。YES 培地に PQ を 1mM になるように添加し、野生株と *Adps1* 株のスポット培養を行ったところ *Adps1* 株は感受性を示した。さらに 2mM PQ 存在下で DHE を用いて分裂酵母を染色し、フローサイトメーターで経時的に ROS を測定したところ、*Adps1* 株で 5 時間後にピークのシフトが見られたことから CoQ10 欠損株では細胞内の酸化ストレスが昂進していることが示唆された。以上の結果から、CD 包接体はミトコンドリアの呼吸鎖は回復せず、サイトゾルにおいて抗酸化能を発揮していることが示唆された。今後は、CD 包接体の効果をさらに詳細に検討していく必要があると考えている。

上述の分子生物学的な実験の結果から、最少培地中の *Adps1* 株は CD 包接体を利用することが示唆された。しかしながら、培地に加えた CD 包接体が *Adps1* 株の細胞内に取り込まれる機構や、その後の細胞内分布を解明する手がかりは、今のところ得られていない。これらの点を

明らかにするためには、CD 包接体を可視化する事が有効だと考え、我々は CD 包接体の調製に用いる CD の蛍光標識化を試みた。本研究では蛍光プローブとして、水溶性の蛍光色素であるフルオレセインを使用した。

フルオレセインと CD を架橋するために、チオシアノ基を有するフルオレセイン誘導体 (fluorescein isothiocyanate isomer-I, FITC) (60.1 mg, 154 μ mol) を蛍光化試薬として用い、一方で CD には、FITC のチオシアノ基と特異的に結合するアミノ基を修飾したアミノ化 CD (105 mg, 80.9 μ mol) を用いた。両者を原料とした架橋反応後の反応溶液を逆層カラムクロマトグラフにより精製して、CD の開口部にフルオレセインが結合した蛍光標識 CD を得た (74.8 mg, 44.4 μ mol, 収率: 54.9%)。蛍光標識 CD の構造は ^1H NMR 測定により確認した。

今後は、蛍光標識 CD の合成収率を改善するとともに、得られた蛍光標識 CD を用いた「蛍光標識 CD 包接 CoQ10」を調製して同様の培養実験を行い、蛍光顕微鏡観察により *Δ dps1* 株への取り込みの機構、及び細胞内分布を明らかにする予定である。

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、大島朗伸准教授、協力頂いた西田達郎氏、竹内佳奈氏に感謝致します。

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/ γ -cyclodextrin supramolecular complexes and comparison of their pharmaceutical properties. *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 965-970.
- Huard, S., Chen, M., Burdette, K. E., Fenyvuesvolgyi, C., Yu, M., Elder, R. T., Zhao, R. Y. (2008). HIV-1 Vpr-induced cell death in *Schizosaccharomyces pombe* is reminiscent of apoptosis. *Cell Res.* **18**, 961-973.
- Kawamukai, M. (2009). Biosynthesis and bioproduction of coenzyme Q10 by yeasts and other organisms. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **53**, 217-226.
- Nishimura, K., Higashi, T., Yoshimatsu, A., Hirayama, F., Uekama, K., & Arima, H. (2008). Pseudorotaxane-like supramolecular complex of coenzyme Q10 with γ -cyclodextrin formed by solubility method. *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 701-706.