

令和元年6月25日現在

機関番号：33708

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K21475

研究課題名(和文) PQQの体内動態と脂質代謝に及ぼす影響

研究課題名(英文) Metabolic fate of PQQ and effects of PQQ on lipid metabolism

研究代表者

三嶋 智之 (Mishima, Tomoyuki)

岐阜医療科学大学・保健科学部・准教授

研究者番号：00434522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：高脂肪食を摂取させたラットにおいて、ピロロキノリンキノン(PQQ)溶液を飲料水として投与すると血漿のコレステロールおよびトリグリセリド濃度が減少したが、肝臓の脂質量には変化がみられなかった。高濃度のグルコースおよびフルクトースとともにPQQを培地に添加して培養したHepG2細胞において、細胞内の脂肪蓄積量に減少傾向がみられた。Caco2細胞を用いたPQQの吸収実験において、酵素法では細胞内に吸収されたPQQが検出限界以下であったため、PQQの高感度検出法の確立を要することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PQQは微生物酵素の補酵素であり、多くの食品に含まれている。またPQQが抗酸化機能や認知機能改善など様々な生理機能を有することが報告され、最近ではサプリメントとして市販されている。哺乳動物におけるPQQの必須性は示されていないが、ヒトは日常的に食事から摂取していることからその影響を受けていると推測される。本研究成果は栄養学および食品機能学の観点からPQQについての知見を増やすものである。

研究成果の概要(英文)： In the rats fed with high fat diet, plasma cholesterol and triglyceride concentrations were decreased and hepatic lipid content was not changed by ingestion of pyrroloquinoline quinone (PQQ) solution. In the HepG2 cell treated with high glucose and fructose, lipid accumulation was decreased by simultaneous addition of PQQ. In the absorption experiment of PQQ using Caco2 cells, intracellular PQQ was below the detection limit in the enzymatic method. Therefore it was revealed that the establishment of a highly sensitive detection method of PQQ is required.

研究分野：食品機能学

キーワード：ピロロキノリンキノン 吸収 脂質 ラット 細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ピロロキノリンキノン (pyrroloquinoline quinone; PQQ, 図1) は一部の微生物が産生する酸化還元酵素の補酵素であり, NAD(P), フラビン類 (FAD・FMN) に次ぐ第3番目の酸化還元補酵素として注目を集めた。いくつかの報告では動物実験などの結果から PQQ が必須栄養素であると主張されてきたものの, 現在に至ってもその確たる証拠は示されていない。その一方で PQQ の生理作用に関して多くの報告がされてきた。In vitro の系における抗酸化作用, 動物やヒトにおける脳機能向上, 細胞を用いた実験系では PQQ により CREB の活性化や PGC-1 $\alpha$  の活性化が示された (Chowanadisai et al. J Biol Chem, 285, 142-152, 2010)。

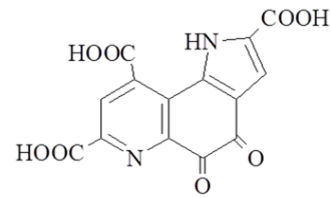


図1 PQQ

さらに申請者のラットを用いた予備的研究では血中の中性脂肪やコレステロールに減少傾向がみられたことから, PQQ によりミトコンドリアでの異化代謝が亢進され, 脂質の代謝を促進する可能性が推測された。

また GC/MS を用いた以前の報告では PQQ は広く自然界に分布し, 様々な食品中に含まれていることが示された (Kumazawa et al. Biochem J, 307, 331-333, 1995)。加えて LC/MS を用いた定量法では, 植物中における PQQ の存在とその合成の可能性が示唆されていた (野地ら, 化学と生物, 46, 339-345, 2008)。以上のことからヒトは PQQ を通常の食事から継続的に摂取しており, その影響を受けていると考えられる。しかしながら PQQ 摂取後の消化管や細胞における吸収をはじめとして, 体内動態に関してはよく分かっていない。またアミノ酸などと抱合体を形成する可能性も考えられ, LC/MS を用いた分析でも完全には追跡できていない。

当時, PQQ は米国食品医薬品局 (FDA) において食品素材として認められるとともに, 本邦でも PQQ 配合を謳った化粧品やサプリメントが販売されており, 新たな機能性成分として今後市場に多く出回るであろうと予想された。

## 2. 研究の目的

PQQ は多種にわたる食品中に存在し, 我々は通常の食事から必ず摂取している物質である。一部の生物では補酵素として機能していることや, 動物における必須栄養素説が挙げたりすることから栄養学ならびに食品機能学の両観点から興味深い物質である。PQQ がその強い酸化還元作用に基づいた生理効果を有する可能性は十分に考えられるが, そのデータは十分なものではない。また, PQQ に対する食経験は十分にあるといえるが, サプリメントなどに使用されることを考えると, 通常の摂取量や体内動態に関するデータは不可欠となる。本研究の全体構想としては, 科学的なデータに基づいて健康へ寄与する部分を解明し, 提示しようとするものである。そのため PQQ の脂質代謝への影響について調べることで, 脂質異常症に有効な成分としての可能性を探るとともに, その基礎的なデータとなる吸収について調べることで, 日常的に摂取される PQQ による影響を明らかとすることを目的とした。

本研究では PQQ について, 高脂肪食を投与したラットにおける血中および肝臓の脂質に対する影響, 脂質の蓄積を誘導した肝由来培養細胞に対する脂肪蓄積量への影響, 小腸由来培養細胞における吸収について調べることとした。

## 3. 研究の方法

### (1) 高脂肪食投与ラットの体内脂質量に対する PQQ の影響

実験には三菱ガス化学株式会社製の PQQ-ニナトリウムを用いた。4週齢の Wistar ST rat (オス) に, 牛脂粉末を 30% となるように添加した AIN-93G ベース高脂肪飼料と 100  $\mu$ g/mL PQQ 溶液を 28 日間自由摂取させた。また Water 群 (コントロール) には高脂肪食と水道水を自由摂取させた。飼育終了後にセボフルランによる麻酔下にて採血し, 肝臓, 腎臓, 脂肪組織を得た。得られた血漿はトリグリセリド (TG), 総コレステロール, HDL コレステロール, リン脂質の測定に供した。肝臓の一部は凍結切片作成後にズダン III 染色を行い, 顕微鏡にて脂肪蓄積の状態を観察し, 別の切片はヘマトキシリン エオジン (HE) 染色後に病理組織学的検査を行った。さらに残りの肝臓の一部から脂質の抽出液を得て, TG とコレステロールの測定に供した。

### (2) 中性脂肪の蓄積を誘導した肝由来細胞への PQQ の影響

24 穴プレート内の円形カルチャースライドグラス上に肝由来細胞 HepG2 細胞を播種し, コンフルエントになるまで 7 日間培養した。E-MEM 培地に終濃度 0.5 mM 脂肪酸 (パルミチン酸: オレイン酸=1:1) もしくは 5 mM 糖質 (フルクトース: グルコース=1:1) となるように各物質を溶解した PBS(-) を加え, さらに 4 日間培養することで細胞内への中性脂肪蓄積を誘導した。細胞を洗浄した後 0.1 ~ 0.5 mM となるように PQQ を加えた培地を添加し, さらに 4 日間培養した。得られた細胞をオイルレッド O にて染色し, 顕微鏡した。その後, 染色された中性脂肪をイソプロパノールにて抽出し, 吸光度による測定に供した。またコンフルエントになった細胞に, 上記と同様の脂肪酸溶液 (終濃度 0.5 mM) もしくは糖質溶液 (終濃度 5 mM) と PQQ を同時に加え, 4 日間培養して脂質の蓄積への影響を調べた。

### (3) 腸管由来細胞における PQQ の吸収実験

吸収実験には腸管由来細胞である Caco2 細胞を用いた。細胞は D-MEM 培地にて培養し, コ

ンフルエントとなった後に、さらに7日間培養した。その細胞にPQQを終濃度0~1 mMで添加して、24時間インキュベートを行った。細胞をPBS(-)で洗浄した後に細胞を回収し、抽出溶媒を加えてホモジナイズし、破砕液を採取した。破砕液から遠心分離、有機溶媒抽出、固相抽出によってPQQを抽出した。最終的に乾固物を脱イオン水に溶解し、PQQを含む測定用サンプルを得た。PQQの定量はアポ化したPQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼを用いたDCIPリサイクルアッセイ酵素法にて行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 高脂肪食投与ラットの体内脂質量に対するPQQの影響

体重増加量、飼料摂取量、飲水量、肝臓、腎臓および脂肪組織重量について両群間に有意な差は認められなかった。PQQ群における飼育期間を通じてのPQQ摂取量は64.6±3.6 mg (12.1±0.7 mg/kg 体重/日)であった。PQQ群において血漿総コレステロール濃度について有意に低値(p<0.05)を示した(表1)。また血漿HDL

表1 血漿脂質濃度

	Water	PQQ
総コレステロール(mg/100 ml)	62.0 ± 2.0	53.5 ± 2.5*
HDL-コレステロール(mg/100 ml)	47.7 ± 1.3	43.3 ± 1.8†
トリグリセリド(mg/100 ml)	88.6 ± 2.9	77.7 ± 4.4†
リン脂質(mg/100 ml)	107.4 ± 4.6	99.3 ± 4.3

平均±標準誤差,\*; p<0.05, †; p<0.1, Student's t-test

コレステロールおよびTG濃度についてはPQQ群において低値傾向(p<0.1)を示し、リン脂質濃度には有意差は認められなかった。また肝臓中の脂

質量については、両群間のコレステロール量およびTG量について有意な差は認められず(表2)。ズダンIII染色を行なった肝臓組織切片においても両群のラットに脂肪蓄積が認められたものの、群間に有意な差はなかった。HE染色を行った組織切片についての病理組織学的検査の結果、すべての標本に病変等の目立った変化は観察されなかった。PQQを投与したラットにおいて、血漿TG濃度が低値を示し、β-hydroxybutyric acidの上昇が認められたとの報告(Bauerly et al. PLoS One. 6, e21779, 2011)や血清TGおよびLDLコレステロール高値のヒトにおいて、PQQを摂取した場合、LDLコレステロールの低下が認められたと報告がある(Nakano et al. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 61, 233-240, 2015)。これらのことからPQQが脂質の代謝に影響を及ぼしていると推測されるため、今後代謝に関わる酵素活性(β酸化など)や調節因子(CREBなど)について詳しく調べる必要があると考えられる。

表2 肝臓中脂質量

	Water	PQQ
コレステロール(mg/liver)	45.8 ± 4.7	43.5 ± 2.8
トリグリセリド(mg/liver)	1369 ± 156	1430 ± 95

平均±標準誤差

##### (2) 中性脂肪の蓄積を誘導した肝由来細胞へのPQQの影響

HepG2細胞に対し、培地に脂肪酸もしくは糖質を添加して中性脂肪の蓄積を誘導した後にPQQを添加したが、終濃度0.1~0.5mMにおいて蓄積された脂肪量に有意な差は認められなかった。一方、コンフルエントになった後に上記と同様の脂肪酸溶液もしくは糖質溶液を含む培地とともにPQQを同時に加え、4日間培養して脂質の蓄積への影響を調べた結果、糖質を加えた細胞では0.5 mM PQQを添加した際に中性脂肪の蓄積量が減少する傾向(p<0.1)が認められた(図2)。これらの結果から、PQQがフルクトース負荷による脂肪の蓄積過程において影響を及ぼしている可能性が示唆される。

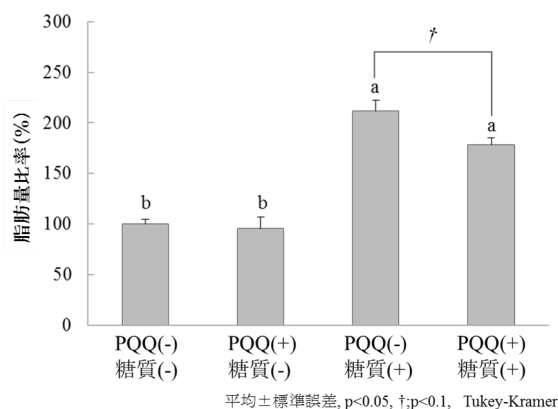


図2 糖質により脂肪蓄積を誘導したHepG2へのPQQの効果

##### (3) 腸管由来細胞におけるPQQの吸収実験

いくつかの食品について上記の方法でPQQの検出を行なったところ、以前の報告に近い数値が得られた(納豆~50 ng/g, 緑茶葉~10 ng/g)。そこでPQQに暴露したCaco2細胞中に吸収されたPQQ量について測定を試みた。PQQ終濃度が1 mMの際に細胞数の減少が認められたため、終濃度を0.5 mMまでとした。しかしながら終濃度0.5 mMのPQQに暴露した際の細胞内液中のPQQについては酵素法による検出限界以下であり、本方法においてPQQの細胞への吸収に関して調べることができなかった。そのため、さらに微量のPQQを測定可能な方法を採用する必要性が明らかとなった。最近になってLC/MS/MSによるPQQの検出方法が報告されたが、PQQ-タンパク質複合体やアミノ酸と結合したアダクト(imidazolopyrroloquinoline; IPQなど)については未だ測定が困難であり、さらに高感度な分析方法の確立を要する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 1件)

日本ビタミン学会編, ビタミン・バイオフィクター総合事典(仮), 3.7 ピロロキノリンキノン, 朝倉書店, 2021 刊行予定

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

1) 三嶋智之, 藤根悦子, 末政朱美, 服部高幸, 岩崎尚美, 上田彩加, 神谷英里, 伊佐保香 高脂肪食投与ラットの血漿および肝臓脂質に対するピロロキノリンキノンの影響, 衣食住生活研究, 査読有, 紀要, 1, 17-21, 2018.

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 伊佐保香

ローマ字氏名: ISA, Yasuka

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。