

平成21年5月12日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19580137  
 研究課題名（和文） コエンザイム Q 同族体の抗酸化能に関する研究：サプリメントとしての CoQ9  
 研究課題名（英文） Study on antioxidant activity of coenzyme Q homologues: CoQ<sub>9</sub> as a potential supplement  
 研究代表者  
 山田 一夫（YAMADA KAZUO）  
 鳥取大学・医学部・教授  
 研究者番号：00093831

研究成果の概要：哺乳類に存在する2種類のコエンザイム Q (CoQ) 同族体 (CoQ<sub>9</sub> と CoQ<sub>10</sub>) のうち CoQ<sub>9</sub> の機能を調べる目的で、CoQ<sub>9</sub> を過剰に含む培養ヒト肝細胞実験系を確立し、CoQ<sub>9</sub> 過剰細胞の酸化ストレス抵抗性について検討した。CoQ<sub>9</sub> 過剰細胞では酸化ストレスによる細胞内抗酸化物質の減少および細胞死が抑制されており、外来性の CoQ<sub>9</sub> が酸化ストレスによる細胞死を保護することを世界で初めて明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：農芸科学・食品科学

キーワード：コエンザイム Q<sub>9</sub>、抗酸化作用、サプリメント、酸化ストレス、細胞死

## 1. 研究開始当初の背景

コエンザイム Q (以下 CoQ と略す) は、生体内で合成され、主としてミトコンドリア膜に存在するイソプレノイド側鎖をもつキノン化合物であり、電子伝達系を構成する物質として知られている。我々は、これまでに CoQ が強力な内在性抗酸化物質であることを明らかにした (Matsura T, Yamada K, Kawasaki T. BBA 1123(3): 309-315, 1992)。また、CoQ は形質膜やその他の細胞内小器官 (核、ゴルジ、小胞体など) に存在することも明らかにした (Matsura T, Yamada K, Kawasaki T.

BBA 1083(3): 277-282, 1991)。自然界にはイソプレノイド側鎖の長さが異なる CoQ 同族体が複数存在しており、ヒト、イヌ、ブタ、モルモット、ウサギなどでは CoQ<sub>10</sub>、マウス、ラットでは CoQ<sub>9</sub> が主な同族体であり、それらの含有率も異なっている。例えばラット肝細胞においては総 CoQ<sub>9</sub> と総 CoQ<sub>10</sub> の比は 6:1 であるが、モルモット肝細胞においては 1:5 である (Matsura T, Yamada K, Kawasaki T. BBA 1123(3): 309-315, 1992)。ヒトにおいても CoQ<sub>9</sub> は数パーセント存在している。このように、同時に存在する同族体に関して、イソプ

レノイド側鎖長により CoQ の機能に差がみられるのかに関する研究は全く存在しない。

そこで CoQ の抗酸化作用に着目し、哺乳類に存在する 2 種類の CoQ 同族体 (CoQ<sub>9</sub> と CoQ<sub>10</sub>) の抗酸化作用に差が見られるのかを明らかにするために、細胞内 CoQ 量・種類を任意に制御することが可能な培養細胞実験系を確立し、抗酸化作用の違いを検討することは大いに意味のあることである。

## 2. 研究の目的

CoQ<sub>9</sub> と CoQ<sub>10</sub> は側鎖長がイソプレレン単位 1 個 (炭素原子 5 個分) の違いであるが、膜脂質二重層に存在する位置が若干異なっており、CoQ<sub>9</sub> の方がより膜表面近くに存在するか脂質二重層内の流動性が異なる可能性がある。そのため、脂質ラジカル消去の本体であるキノン骨格の水酸基がより細胞表面に移動しやすく、脂質二重層の浅いところで発生した脂質ラジカルをより効率的に消去できる可能性がある。本研究の目的は、まず細胞内 CoQ<sub>9</sub> と CoQ<sub>10</sub> の含量比の異なる細胞を調整することである。次にこれらの細胞を用いて、ラジカル発生剤や抗がん剤処理により細胞に酸化ストレスを与え、細胞の酸化ストレス抵抗性を検討し、CoQ<sub>9</sub> と CoQ<sub>10</sub> の抗酸化能の違いを明らかにする。

CoQ<sub>10</sub> はサプリメントとして世界中で販売されているが、マウスやラットに多く存在し、ヒトには数パーセントしか存在しない CoQ<sub>9</sub> のサプリメントとしての利用の可能性は全く検討されていない。本研究により CoQ<sub>9</sub> の有用性が明らかになった場合、酸化ストレスの関与する虚血-再灌流障害、動脈硬化、老化などの予防に対して、CoQ<sub>9</sub> をサプリメントとして CoQ<sub>10</sub> とコンビネーションで用いることにより、より有効な結果が得られる可能性があり、本研究の成果は予防医学に貢献できるものと考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養

HeLa 細胞、HepG2 細胞は Riken BRC から購入し、非働化した 10% ウシ胎児血清 (FCS)、2 mM glutamine、抗生物質 (100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) を添加したダルベッコ変法必須培地 (DMEM) 中に細胞を懸濁し、37°C、95% 空気、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。全ての実験にはコンフルエント直前の細胞を用いた。

### (2) 細胞内 CoQ 量の分析

培養細胞から CoQ が含まれる脂溶性画分を抽出し、高速液体クロマトグラフィーシステムを用いて、細胞内 CoQ 量の測定を行った。

### (3) RNA 干渉 (RNAi)

RNAi のターゲットとして CoQ 生合成過程で、キノン骨格にイソプレノイド側鎖を結合させる酵素のヒト *COQ2* 遺伝子を選択した。培養細胞に、*COQ2* 発現を抑制すると予想される配列を持つ、20 残基程度の 2 本鎖 RNA (4 種類の siRNA: *COQ2.1*, *COQ2.2*, *COQ2.3*, *COQ2.4*) をリポフェクション法により細胞内に取り込ませ、一過的な発現抑制実験を行った。

### (4) リアルタイム RT-PCR

*COQ2* に対する PCR 用プライマーを作製し、リアルタイム RT-PCR により *COQ2* mRNA 発現量解析を行い、RNAi 法による *COQ2* mRNA の転写抑制効果を検討した。

### (5) 細胞生存率

RNAi 施行 6, 12, 24, 48 時間後の細胞生存率の差は培養ディッシュを顕微鏡下で観察し、写真撮影後、接着細胞数を比較することにより行った。

### (6) CoQ<sub>9</sub> リポソームの作製

Dimyristyl-phosphatidylcholine (DMPC) を用いて、CoQ<sub>9</sub> : DMPC = 1 : 20 になるような単層リポソームを作製した (CoQ 濃度は 1 mM)。

### (7) 脂肪染色

CoQ<sub>9</sub> リポソームを HepG2 細胞に添加後、リポソームが実際に細胞内に取り込まれているかを確認するために、細胞を洗浄後、ヘマトキシリン染色後、脂肪染色 (オイルレッド O 染色) を行った。

### (8) カスパーゼ-3 活性の測定

カスパーゼ-3 活性は酵素反応により分解され蛍光を発するカスパーゼ-3 に特異的なペプチド配列を持った基質 (Ac-DEVD-AMC) を用いて蛍光マイクロプレートリーダー (励起波長 360 ± 40 nm、蛍光波長 460 ± 40 nm) で測定した。カスパーゼ活性の 1 単位は 37°C で 1 分間に 1 pmol の AMC を遊離するために必要とされる酵素量をあらわす。

### (9) 細胞内グルタチオン量の測定

細胞内還元型グルタチオン (GSH) 量は SH 基と反応し、高い蛍光を示すマレイミド化合物である ThioGlo-1 を用いて蛍光マイクロプレートリーダー (励起波長 360 ± 40 nm、蛍光波長 530 ± 25 nm) で測定した。

### (10) 細胞内過酸化脂質量

肝組織内の過酸化脂質量はチオバルビツール酸反応陽性物質 (TBARS) 量として蛍光光度計 (励起波長 515 nm、蛍光波長 553 nm) を用いて測定した。標準液にはマロンジアルデヒド (MDA) 溶液を用いた。

### (11) タンパク質量

各試料のタンパク質量は、ウシ血清アルブミンを標準液として Bradford 法を用いて定量した。

### (12) 統計解析

各実験データは3例の平均値あるいはその代表例を示す。誤差範囲は標準誤差(S.E.)を表し、One-way ANOVAまたはスチューデントのt検定により、危険率5%未満を有意とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) コエンザイム Q 合成酵素発現抑制細胞の作製の試み

HeLa 細胞に 4 種類の siRNA を取り込ませ、導入後 48 時間にわたり細胞内 COQ2 mRNA 発現量を調べた。図 1 に示したように、COQ2.2 と COQ2.4 は時間依存性に COQ2 の転写抑制傾向を示した。特に、COQ2.4 導入 48 時間後は統計学的にも有意な抑制効果が見られた。他の 2 種類も時間依存性はみられなかったものの、導入 48 時間後にはいずれも抑制傾向を示した。しかしながら、抑制効率にバラツキが大きく、さらに効率の良いリポフェクション法の検討が必要と考えられた。

ミトコンドリアの電子伝達に必須である CoQ 合成抑制が細胞生存率に及ぼす影響を検討した。siRNA 導入により、細胞生存率の低下傾向が見られた。特に、COQ2.4 導入 48 時間後の接着細胞数は著明に減少していた(図 2)。

今回の実験で、RNAi 法による CoQ 合成酵素遺伝子発現抑制の可能性が示されたが、RNAi 自身による細胞死が著明で、以後の実験が困難になったため、野生型細胞に CoQ<sub>9</sub> リポソームを添加することにより CoQ<sub>9</sub> 過剰細胞を作製することとした。

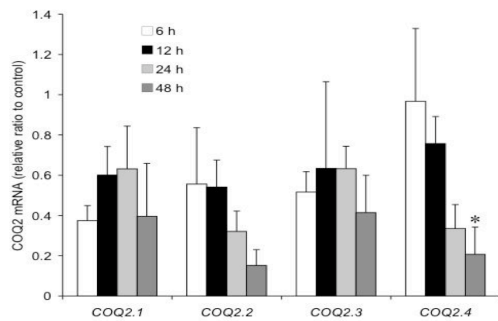


図1. 各種siRNAによるHeLa細胞COQ2 mRNA 発現量の抑制効果  
\* $P < 0.05$  vs 6 h, n = 3, Mean  $\pm$  S.E.

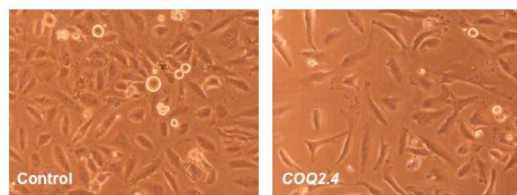


図2. COQ2.4導入48時間後の細胞生存率の変化(HeLa細胞)

##### (2) CoQ<sub>9</sub> 過剰ヒト肝細胞の作製

CoQ<sub>9</sub> の単層リポソームを作製し、ヒト肝癌細胞 HepG2 に、様々な濃度、時間で添加した後、高速液体クロマトグラフィーを用いて細胞内 CoQ 量を測定した。CoQ<sub>9</sub> リポソーム(最終濃度 10  $\mu$ M)を HepG2 細胞に添加すると、野生型細胞には存在しなかった CoQ<sub>9</sub> は経時的に増加し、添加 24 時間後の細胞内酸化型 CoQ<sub>9</sub>、還元型 CoQ<sub>9</sub>H<sub>2</sub> はそれぞれ 1200 pmol/mg protein, 800 pmol/mg protein まで増加した。しかしながら、添加 48 時間後の細胞内酸化型 CoQ<sub>9</sub> は 24 時間後の量とほとんど変わらなかったが、抗酸化作用を示す還元型 CoQ<sub>9</sub>H<sub>2</sub> は 24 時間後量の 4 分の 3 に減少していた(図 3)。また、リポソーム添加 24 時間後に継代を行い、その 24、48 時間後の細胞内 CoQ<sub>9</sub> を測定すると、酸化型還元型共に経時的に減少した(図 4)。CoQ<sub>9</sub> 添加により細胞内還元型 CoQ<sub>9</sub>H<sub>2</sub> は添加後 24 時間にピークを示したが、その後は培養過程における酸化ストレス等により還元型 CoQ<sub>9</sub>H<sub>2</sub> が消費され、48 時間後の還元型 CoQ<sub>9</sub>H<sub>2</sub> は減少したと考えられる。

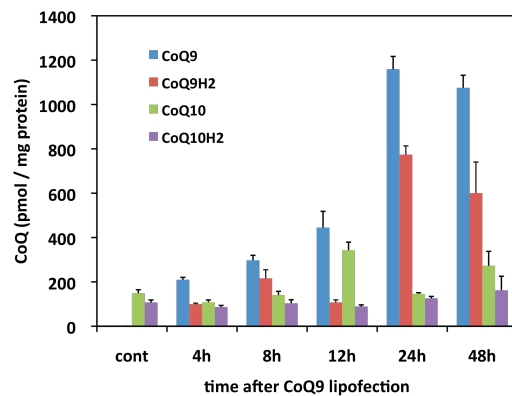


図3. CoQ<sub>9</sub>リポソーム添加後の細胞内CoQ量の変化

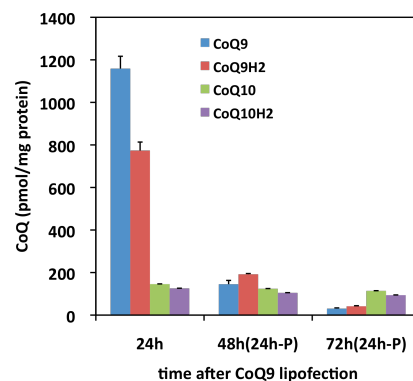


図4. CoQ<sub>9</sub>リポソーム添加24時間後に細胞を継代した後の細胞内CoQ量の変化

次に、CoQ<sub>9</sub> リポソームを添加することにより、HepG2 細胞に実際にリポソームが取り込まれているのか、そして細胞の形態に影響が

出ていないかを調べるために脂肪染色を行った(図5)。リポソーム添加後、細胞内には経時的に脂肪滴が増加した。このことより、CoQ<sub>9</sub>が経時的に細胞内に取り込まれていることが示唆された。また、リポソーム処理自身は細胞に形態学的な変化を起こさなかった。

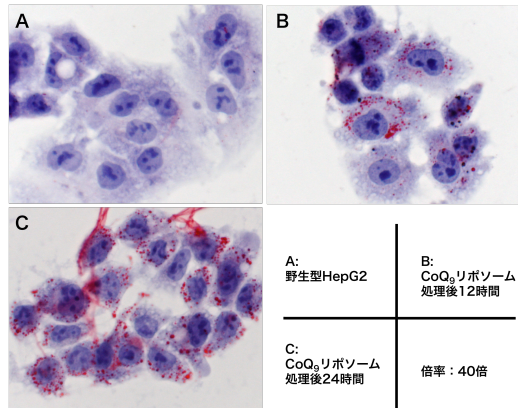


図5. CoQ<sub>9</sub>リポソーム添加後の細胞の脂肪染色像

以上の結果に基づき、CoQ<sub>9</sub>リポソーム添加後24時間の細胞をCoQ<sub>9</sub>過剰HepG2細胞(以下CoQ<sub>9</sub>過剰細胞)として使用することとした。

### (3) CoQ<sub>9</sub>過剰細胞の酸化ストレスに対する抵抗性の検討

野生型細胞とCoQ<sub>9</sub>過剰細胞に脂溶性ラジカル発生剤であるAMVN(200 μM)を処理し、3時間後のアポトーシス誘導を検討したところ、CoQ<sub>9</sub>過剰細胞ではカスパーゼ-3活性増加の抑制が認められた(図6A)。アポトーシス刺激としてエトポシドを用いた場合、アポトーシス実行過程で活性酸素が生成されることが知られている。細胞にエトポシド(400 μM)処理を行い、6時間後のアポトーシス誘導を検討したところ、野生型に比べてCoQ<sub>9</sub>過剰細胞においてカスパーゼ-3活性増加の抑制が認められた(図6B)。AMVNおよびエトポシドを野生型細胞に処理した時、12時間、24時間後の細胞はディッシュから剥離して浮遊した。形態学的にも細胞は膨潤しネクロシスを思わせる像を呈していた(データ未提示)。CoQ<sub>9</sub>過剰細胞にも同様の処理をするとネクロシスの像を呈したが、細胞の剥離は明らかに軽度であった(データ未提示)。AMVN(200 μM)処理後の細胞内還元型グルタチオン(GSH)量を測定したところ、野生型ではGSHが時間依存性に減少したが、CoQ<sub>9</sub>過剰細胞ではこのGSH減少が有意に抑制された(図7)。また、AMVN処理後の細胞内過酸化脂質量を測定した(図8)。細胞内過酸化脂

質量の指標であるTBARS量はCoQ<sub>9</sub>過剰細胞で抑制傾向を示した。

以上より、CoQ<sub>9</sub>添加は酸化ストレスが関与すると考えられている細胞死に対して抵抗性を示すことが明らかになった。これは外來性のCoQ<sub>9</sub>がその抗酸化作用により細胞障害を防御することを世界で初めて見いだしたものであり、学術的意義が非常に高いと考えられる。

今後は、CoQ<sub>10</sub>リポソームを細胞に投与しCoQ<sub>9</sub>過剰細胞と同等の還元能を持つCoQ<sub>10</sub>過剰細胞を作製し、CoQ<sub>9</sub>とCoQ<sub>10</sub>の抗酸化能の相違を調べ、CoQ<sub>10</sub>に加えて(あるいはそれ以上に)、CoQ<sub>9</sub>がサプリメントとして有効かどうかを検討する予定である。

質量の指標であるTBARS量はCoQ<sub>9</sub>過剰細胞で抑制傾向を示した。

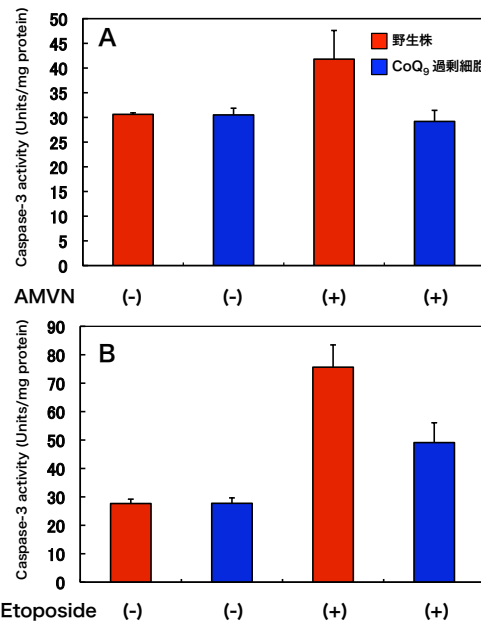


図6. AMVN (A)およびエトポシド(B)投与後のCoQ<sub>9</sub>過剰細胞と野生型細胞におけるカスパーゼ-3活性

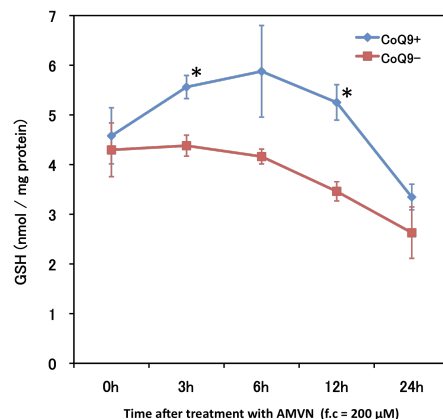


図7. AMVN投与後のCoQ<sub>9</sub>過剰細胞(CoQ<sub>9</sub>+)と野生型細胞(CoQ<sub>9</sub>-)における細胞内GSH濃度の変化. \* p < 0.05 vs CoQ<sub>9</sub>-

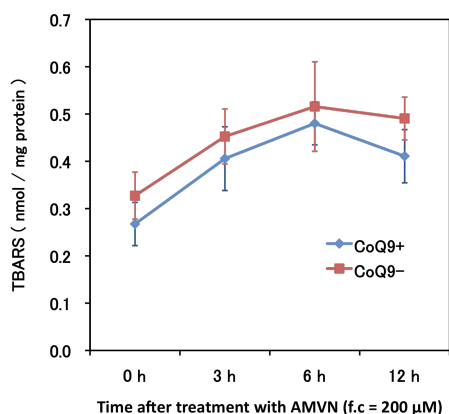


図8. AMVN 投与後のCoQ<sub>9</sub>過剰細胞 (CoQ9+)と野生型細胞 (CoQ9-)における細胞内過酸化脂質量の変化

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

①楠本智章、松浦達也、山田一夫、コエンザイム Q9 過剰ヒト肝細胞の作製とアポトーシス刺激に対する効果の検討、第 5 回日本コエンザイム Q 協会研究会、2008 年 1 月 25 日、東京工科大学片柳研究所棟

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 一夫 (YAMADA KAZUO)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：00093831

### (2) 研究分担者

松浦 達也 (MATSURA TATSUYA)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：00199746

### (3) 連携研究者

甲斐 政親 (KAI MASACHIKA)

鳥取大学・医学部・技術専門職

研究者番号：70423267