

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23617042

研究課題名(和文)哺乳動物におけるコエンザイムQの抗老化作用

研究課題名(英文)Effects of coenzyme Q on aging in mammals

研究代表者

高橋 真由美 (Takahashi, Mayumi)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：50133632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：コエンザイムQ (CoQ) は抗老化作用が期待される栄養補助食品の1つであるが、その作用や効果については科学的に十分に検証されていない。そこでマウスを用いて解析した結果、加齢に伴って脳のミトコンドリア機能が低下したマウスに水溶性CoQ10を飲水投与したところ、CoQは脳関門を通過して脳細胞のミトコンドリアに到達し、ミトコンドリア機能を若齢マウスレベルに回復させることが判明した。またCoQ合成酵素をコードしている遺伝子のひとつであるclk-1がミトコンドリア機能の調節を介して寿命に影響を与えている可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Coenzyme Q (CoQ) is one of the dietary supplements and used in expectation of the anti-aging effects. However, its effects remain to be fully validated scientifically. Therefore, we here explored its anti-aging effects by the use of aging mice. We found that the mitochondrial function in the brains of mice declined during aging compared with younger mice. In addition, the reduced brain mitochondrial function in aged mice was rescued by exogenous administration of water-soluble CoQ10 through drinking water. Regarding the effects on lifespan, transgenic mice of the clk-1 gene, which encodes one of biosynthetic enzymes of CoQ, exhibited longer lifespan, smaller bodies, and lower metabolism than those of wild-type mice, which clearly suggest that clk-1 relates to the lifespan in mammals through the regulation of mitochondrial function.

研究分野：加齢基礎医学

キーワード：寿命 老化 コエンザイムQ ミトコンドリア 代謝 脳 骨格筋

1. 研究開始当初の背景

コエンザイム Q (CoQ) はミトコンドリアで電子伝達体として働き、生体のエネルギー源であるアデノシン 3 磷酸 (ATP) の合成に必要不可欠である。また加齢に伴って減少するとされる事から、服用により抗老化作用を期待される栄養補助食品の 1 つである。しかし、服用後の作用機序は勿論の事、老化予防や健康増進に効果があるのか科学的に充分証明されていないのが現状である。

一方、CoQ の寿命に対する影響が注目されたきっかけは線虫を用いた研究に始まる。すなわち、CoQ の合成酵素をコードしている *c1k-1* 遺伝子に変異し、体内の CoQ 量が少ない *c1k-1* 変異線虫は寿命が野生型の約 1.5 倍に延長する事が 1996 年に報告された。ところが哺乳動物において、寿命に対する CoQ の影響はいまだ明らかにされていない。

2. 研究の目的

そこで本研究は、哺乳動物において CoQ に抗老化作用があるのかまた寿命に対してどのような影響を与えるのかを明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 動物

寿命解析に必要な多数の個体を得るため、我々が以前作成した、CoQ 産生量が少ない *c1k-1* トランスジェニックマウス (*c1k-1Tg* マウス—B6 系統) に産仔数の多い ICR 系統のマウスを交配して得た雑種第 1 世代の野生型および *c1k-1Tg* マウスを全ての解析に用いた。

(2) 寿命解析

c1k-1Tg マウスおよび同腹の野生型マウスの雌雄を別々に 1 ケージあたり 5 匹ずつ飼育した。生存曲線は Kaplan-Meier 法によりプロットし、ログランク法により有意差検定を行った。

(3) CoQ 量

CoQ はマウス臓器のミトコンドリア画分から 2-プロパノールで抽出し、逆相クロマトグラフィー (HPLC) で分離した後、電気化学検出器で同定、定量を行った。結果は同じサンプルのタンパク質量で標準化した。

(4) 個体の呼吸代謝および単離ミトコンドリアの酸素消費速度 (V02)

マウス個体の酸素消費量は呼吸代謝計側装置 (室町機械 MK-5000RQ) 内でマウスを飼育し呼吸代謝をモニターした。

ミトコンドリア V02 は酸素電極を搭載した呼吸測定装置 (Oxygraph-2k, Oroboros) を用いて呼吸鎖複合体 I (C I) および II (C II) 依存性の酸素消費量を測定し、タンパク質量で標準化した。

(5) ATP 量

マウス大腿四頭筋の組織懸濁液から ATP を抽出しホタル・ルシフェラーゼ法を用いて測定し、同一サンプルのタンパク質量で標準化した。

(6) ウェスタンブロット解析

脳ミトコンドリア画分を SDS ゲル電気泳動によりタンパク質を分離し、PVDF 膜に転写した後、ミトコンドリア呼吸鎖 I ~ V に対する特異抗体によりウェスタンブロット解析した。

4. 研究成果

(1) 野生型老齢マウスの脳ミトコンドリア機能に対する CoQ の効果

① 老齢雄マウスの脳ミトコンドリアにおける酸素消費量の低下

CoQ はミトコンドリア呼吸鎖において C I あるいは C II から C III へ電子を運搬する役割を担い、酸素消費を促し ATP 合成促進に寄与している。

そこで C I および C II 依存性の酸素消費量 (V02) を測定することにより CoQ 依存的ミトコンドリア機能を評価した。老齢 (12-14 ヶ月齢) の雌雄マウスの肝臓、腎臓、脳、心臓からミトコンドリアを分画し V02 を測定し若齢 (3-4 ヶ月齢) マウスと比較した。その結果、雄マウスの脳において C I および C II 依存性の V02 が若齢マウスに比し有意に低下していることが明らかとなった (図 1 a, b)。

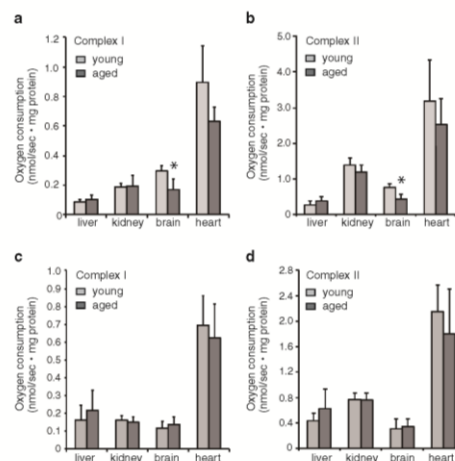


図 1 : C I および C II 依存的酸素消費量, 雄 (a, b) 雌 (c, d)

ところが、予想に反し、雄マウス脳ミトコンドリア中の CoQ 量には加齢に伴う有意な差は認められなかった。

② 単離脳ミトコンドリア V02 に対する外来性 CoQ10 の効果

次に外来性の CoQ が脳ミトコンドリア機能に与える影響について検討した。本研究ではこれまでの我々の研究から細胞内およびミ

トコンドリア内に取り込まれることが明らかとなっている水溶性 CoQ10 を用いて実験を行った。

老齢雄マウス脳から単離したミトコンドリアに 10 μ M の水溶性 CoQ10 を添加したところ、ミトコンドリア内 CoQ10 量は有意に増加し(図 2 b)、CI および CII 依存性の V02 も有意に増加した(図 2 c, d)。

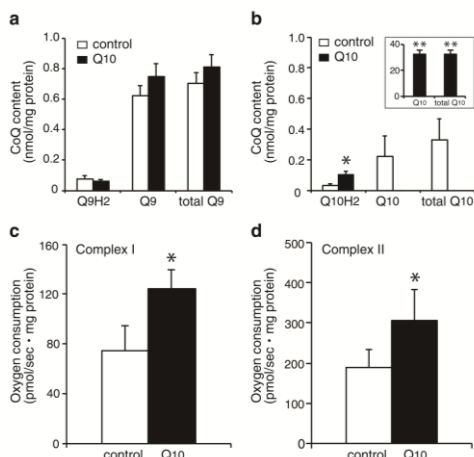


図 2: 外来性 CoQ10 投与によるミトコンドリア内 CoQ 量(a, b)および V02(c, d)の変化

③ CoQ10 飲水投与による脳ミトコンドリア内 CoQ 量および V02 の増加

次に老齢雄マウスに飲水投与された外来性 CoQ10 は脳のミトコンドリアに取り込まれミトコンドリア V02 に影響を与えるか検討した。

老齢雄マウスに 150 μ M CoQ10 を 1 週間飲水投与した結果、脳ミトコンドリアの CoQ9、CoQ10 量が有意に増加し(図 3 a, b)、CI および CII 依存性の V02 も有意に増加して(図 3 c, d)、若齢マウスと同レベルにまで回復する事が明らかとなった。

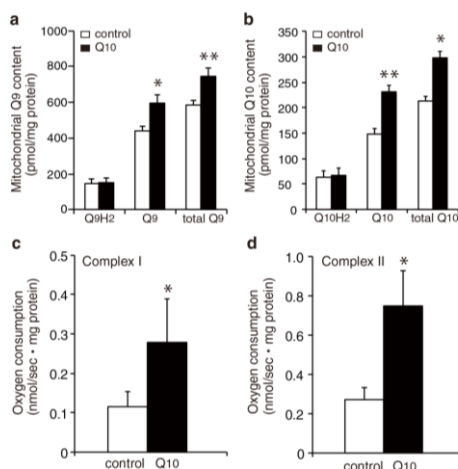


図 3: 老齢マウスに飲水投与された CoQ10 によるミトコンドリア内 CoQ および V02 の増加

④ 加齢に伴う脳ミトコンドリア機能低下の原因と CoQ による回復機構

老齢マウスの脳ミトコンドリアの機能低下の原因を探る為、CI から CV の酵素活性と発現量とを解析した結果、呼吸鎖複合体 CI の発現レベルが老齢マウスで有意に低下している事を見出した。さらに CoQ を飲水投与した老齢マウスの脳ミトコンドリアでは CI 発現レベルに変化は無かったが、CII, CIII, CIV の発現レベルが低下した。この結果は CoQ が各複合体間の発現バランスの調節を介して、ミトコンドリア酸素消費を制御している可能性を示唆している。

⑤ まとめ

正常老化過程において、他の臓器に先立ち脳におけるミトコンドリア機能が低下することが明らかとなった。その原因としてミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の発現レベルが低下していることを明らかにした。また本研究で使用した水溶性 CoQ10 は、飲水投与した時、老齢マウスの脳関門を通過し、脳細胞のミトコンドリア内に取り込まれ、ミトコンドリア機能を回復させることが明らかとなった。

(2) *clk-1* トランスジェニックマウスにおけるミトコンドリア機能低下と寿命延長

CoQ 合成酵素の一つをコードしている *clk-1* 遺伝子は酵母からヒトまで進化的に保存されている。また *clk-1* 変異線虫にマウス *clk-1* を遺伝子導入した所、延長した寿命を野生型レベルに戻すことが出来た。従って、*clk-1* 遺伝子は CoQ を介し哺乳動物でも寿命を制御する可能性が示唆された。

そこで以前我々が作成した CoQ 量の少ない *clk-1* トランスジェニック (Tg96/I) マウスの寿命を解析した。

① Tg96/I マウスの寿命延長

Kaplan-Meier の寿命曲線を Cox-Mantel log rank テストにより有意差検定した結果、Tg96/I マウスは雌雄ともに野生型に比べ有意に寿命が延長することが分かった(図 4)。また Tg96/I マウスは雌雄ともに平均寿命、最大寿命が野生型に比べ有意に延長した。

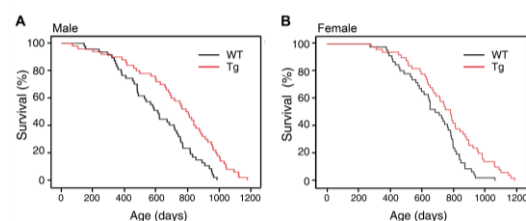


図 4: Tg96/I マウスの寿命曲線

② Tg96/I マウスにおける小型化と低酸素消費量

Tg96/I マウスは雌雄ともに野生型に比べ

低体重であった(図5)。

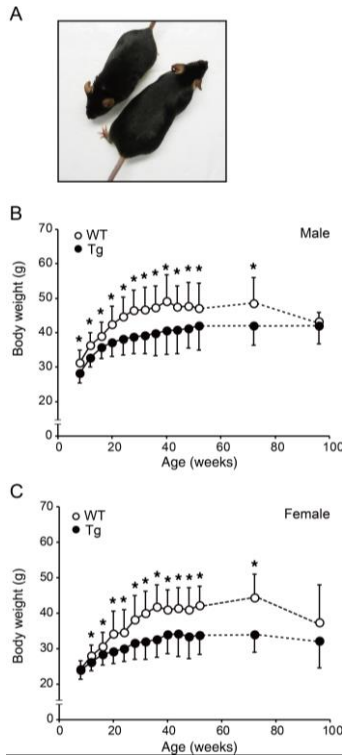


図5: Tg96/I マウスは低体重

そこで、血清中のインスリン様成長因子(IGF-1)を測定したが、Tg96/I マウスと野生型マウスで有意な差は認められなかった。従って、Tg96/I マウスにおいては、哺乳動物で良く知られている長寿シグナルの IGF-1 経路が働いて長寿になっているわけではない事がわかった。

c1k-1 変異線虫では代謝速度の低下による寿命延長が示唆されているため、Tg96/I マウス個体のエネルギー代謝測定を行った。その結果、活動期である暗期における酸素消費速度が雌雄ともに野生型に比べ減少していた(図6)。

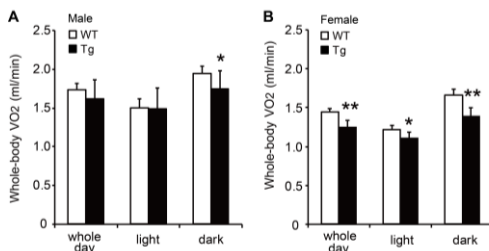


図6: マウス個体の酸素消費量

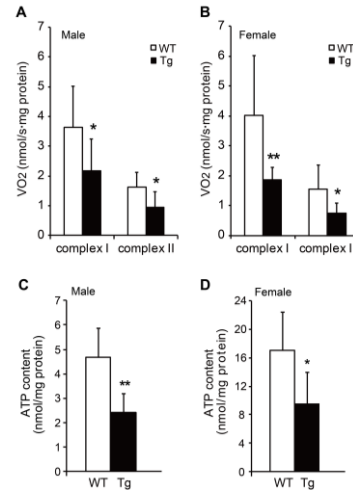
③ Tg96/I マウスにおける骨格筋の小型化とミトコンドリア機能

Tg96/I マウスでは個体のエネルギー代謝が減少していたことから、体内で最もエネルギー消費の盛んな組織のひとつである骨格筋の生理機能を検討した。

5種類の下肢骨格筋(大腿四頭筋、ヒラメ筋、ヒフク筋、全頸骨筋、長指伸筋)の重量

が Tg96/I マウスでは雌雄共に野生型に比べ有意に小さかった。

骨格筋のミトコンドリア機能を検討するため、大腿四頭筋のミトコンドリア VO2 を測定した。その結果、C I および C II 依存性の VO2 は雌雄ともに、野生型に比べ Tg96/I マウスで有意に減少していた(図7 A, B)。また、ミトコンドリア呼吸鎖の最終産物である ATP 産生量も野生型に比べ Tg96/I マウスで有意



に減少していた(図7 C, D)。

図7: Tg96/I マウス骨格筋のミトコンドリア機能の低下

④ Tg96/I マウスにおける CoQ 量

我々が作成した CoQ 産生量が少ない *c1k-ITg* マウスは B6 系統であり産仔数が少ない。寿命解析には多数の個体が必要であるため、多産系の ICR マウスとの交配し雑種第 1 世代を全ての解析に使用した。そこで、これまでに得られた結果と CoQ 減少との関連を確かめる為、骨格筋、肝臓、脳のミトコンドリア画分での CoQ を定量した。その結果、予想に反し Tg96/I マウスの CoQ 量は野生型マウスと同レベルであった。

⑤ まとめ

今回寿命解析に使用した Tg96/I マウスは CoQ 量が野生型レベルに回復してしまったことから、寿命への CoQ の直接の関与を明らかにすることはできなかった。しかし、CoQ 合成酵素をコードする *c1k-1* を *c1k-1* 欠損マウスに遺伝子導入することにより、エネルギー代謝が盛んな骨格筋でのミトコンドリア機能が低下し、個体の代謝レベルも低下することにより寿命が延長することを明らかにした。

従って、CoQ の直接の作用でないけれども、*c1k-1* 遺伝子が寿命に対しミトコンドリア機能を介し何らかの関与をしている可能性が示唆された。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Takahashi K, Noda Y, Ohsawa I, Shirasawa T, Takahashi M. Extended lifespan, reduced body size and leg skeletal muscle mass, and decreased mitochondrial function in *clk-1* transgenic mice. *Exp. Gerontol.* 58, 146-153 (2014) 査読有
2. K. Takahashi, M. Takahashi: Exogenous administration of coenzyme Q10 restores mitochondrial oxygen consumption in the aged mouse brain. *Mechanisms of Aging and Development*, 134, 580-586 (2013) 査読有
3. Takahashi, M., Shimizu, T., Shirasawa, T. Reversal of slow growth and heartbeat through restoration of mitochondrial functions in *clk-1*-deficient mouse embryos by exogenous administration of coenzyme Q₁₀. *Exp. Gerontol.* 47 (6), 425-431 (2012) 査読有
4. Takahashi, M., Ogawara, M., Shimizu, T., Shirasawa, T. Restoration of the behavioral rates and lifespan in *clk-1* mutant nematodes in response to exogenous CoQ₁₀. *Exp. Gerontol.* 47 276-279 (2012) 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. 高橋真由美、野田義博、大澤郁朗、白澤卓二、高橋和秀. *clk-1* トランスジェニックマウスにおける寿命延長とミトコンドリア機能低下 第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014. 11. 24-27
2. 高橋真由美、大澤郁朗、高橋和秀. 加齢に伴うマウス大脳のミトコンドリア機能低下とコエンザイム Q による回復. 第37回日本基礎老化学会年会、大府、2014. 6. 26-27
3. 高橋真由美、大澤郁朗、高橋和秀. 加齢に伴うマウス脳ミトコンドリア機能の低下は水溶性コエンザイム Q₁₀ 飲水投与により回復する. 第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013. 12. 3-6
4. 高橋真由美、小河原緑、清水孝彦、白澤卓二. コエンザイム Q は線虫の生体リズムと寿命を制御する. 第10回日

本コエンザイム協会研究会、東京、2013. 2

5. 高橋真由美、小河原緑、清水孝彦、白澤卓二. コエンザイム Q の新たな機能：生体リズムと寿命の調節. 第35回日本分子生物学会大会、福岡、2012. 12.
6. 高橋真由美、小河原緑、清水孝彦、白澤卓二. コエンザイム Q₁₀ は *clk-1* 変異線虫の寿命延長と行動リズム遅延及び *clk-1* 欠損マウスの生体リズム遅延を完全レスキューする. 第35回日本基礎老化学会大会、千葉、2012. 7.

[図書] (計 4 件)

1. 高橋真由美: RYR2; RYANODINE RECEPTOR 2. 老化ゲノム300 (東京都健康長寿医療センター研究所), 240-241, (2013)
2. 高橋真由美: COQ7; COQ7, S. SEREVISIAE, HOMOLOG OF. 老化ゲノム300 (東京都健康長寿医療センター研究所), 74-75, (2013)
3. 高橋真由美: 生体リズムと寿命. 時間薬理学による最新の治療戦略 (医薬ジャーナル社), 325-334, (2013)
4. 高橋真由美: 寿命：究極の生体リズム. ファルマシア (日本薬学会) 47(7), 654-658 (2011)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://www.tmghig.jp/J_TMIG/J_index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 真由美 (TAKAHASHI MAYUMI)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所) 東京都健康長寿医療センター研究所・研究員
研究者番号：50133632

(2) 研究分担者

清水 孝彦 (SHIMIZU TAKAHIKO)
千葉大学
医学 (系) 研究科 (研究院) ・その他
研究者番号：40301791