

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 10 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790550

研究課題名（和文） ビタミン様キノン化合物ピロロキノリンキノンのトキシコゲノミクス解析

研究課題名（英文） Toxicogenomic analysis of pyrroloquinoline quinone of vitamin-like compound

研究代表者

橋 信二郎 (TACHIBANA SHINJIRO)

琉球大学・農学部・准教授

研究者番号：70447655

研究成果の概要（和文）：本研究では、ビタミン様の生理活性をもつことで知られるピロロキノリンキノン（PQQ）の Maus 骨芽細胞に対する細胞毒性および骨形成過程における遺伝子発現を解析した。その結果、PQQ は骨芽細胞に対し、濃度依存的に細胞毒性とともに増殖抑制を示した。骨形成過程では、PQQ 添加濃度依存的に石灰化能の低下が認められたが、PQQ は骨形成マーカー酵素であるアルカリホスファターゼ活性を増大することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed cytotoxicity and gene expression during osteogenesis by addition of pyrroloquinoline quinone (PQQ) showing vitamin-like bioactivity on murine osteoblast. The osteoblast treated with PQQ showed cytotoxicity and growth inhibition at the concentration of 0.1 mM. During osteogenesis after differentiation, the presence of PQQ increases the enzyme activity of alkaline phosphatase known as the marker enzyme of the osteogenesis, although the osteoblast exhibited the decreasing of mineralization along with the concentration-dependent of PQQ.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：ピロロキノリンキノン、ビタミン、マイクロアレイ、トキシコゲノミクス、

## 1. 研究開始当初の背景

ピロロキノリンキノン（PQQ）は、微生物のアルコール脱水素酵素の補欠分子族として単離・同定された o-キノン核を有する低分子有機化合物である。PQQ は微生物から動・植物の広範囲に存在していることが明らかにされている。微生物は PQQ 生合成経路を有することが明らかにされているが、動植物においてその経路はこれまで見出されていない。

い。

PQQ 欠乏食を給餌されたマウスにおいて骨格異常、発育不良および繁殖能力の低下などのビタミン B 群の欠乏症に似た症例が報告され、PQQ の生理活性が注目を集めた。その後、PQQ が植物成長因子として働く他、神経細胞保護作用、抗酸化作用および繊維芽細胞の繊維化・凝集阻害活性を有することが報告されている。このような背景から、PQQ は新世代

のバイオフィクターとして期待が高まっている。2008年、PQQは米国において脳機能改善効果をもつサプリメントとして認可され、市場展開を始めた。

PQQは自然界に広く存在することから、日常生活において不足することはないとされている。また、PQQ生合成経路を持たないとされている哺乳類では、食事によって体内に取り込まれたPQQが小腸で速やかに吸収され、24時間以内にそのほとんどが腎臓を経由して尿として排出されることが分かっている。このため、生体内においてPQQは極めて低い濃度（せいぜい数十nM）に保たれている。ところが、ヒトの母乳中には140~180 ng/mL (0.4~0.5 μM) ものPQQが検出され、他の臓器、組織に比べてその存在量は特異的であることも示されている。

母乳に含まれるPQQが生体内で濃縮・蓄積された結果であるならば、妊娠あるいは出産後の腎臓におけるPQQ排出メカニズムの変化が考えられる。このメカニズムの変化が哺乳類の性差に由来するものであるならば、腎臓におけるキノン化合物の再吸収メカニズムの変化を解明する手がかりになると考えられる。しかしながら、これらの証拠を示す報告はこれまでにない。従って、本メカニズムの解明は生体キノン化合物の吸収と排泄メカニズムの解明に資するところが大きい。すなわち、女性の閉経後に多く発症するとされる骨粗鬆症の改善効果が報告されているビタミンK(メナキノン)やコエンザイムQ<sub>10</sub>(ユビキノン)などの生体キノン化合物の再吸収改善効果が期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、PQQ調整合成食餌を給餌したマウスの血中PQQ動態を調べ、摘出臓器別のPQQ局在について雌雄の差異を解明することを目的とする。また、各種培養細胞を用いてPQQ添加による細胞毒性ならびに遺伝子発現変動とタンパク質発現変動を調べ、細胞毎の既存パスウェイおよび推定変動パスウェイについて解明するとともに生体キノン化合物のビタミンKおよびコエンザイムQ<sub>10</sub>についても同様の操作によりPQQ添加時の特徴的な発現遺伝子およびパスウェイを同定することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、まず培養細胞によるPQQ添加の影響について調べた。PQQと骨代謝に関する報告がこれまでに無かったことから、供試細胞株としてマウス骨芽細胞前駆細胞MC3T3-E1株を用い、10% FBSを含むα-MEM培地で37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下で

培養した。PQQ添加による細胞毒性について各種PQQ濃度の影響を調べた。細胞増殖に与えるPQQ濃度の影響についても検討した。同培地で培養後、グリセロリン酸

(GP) およびアスコルビン酸(AAP)を添加する分化誘導刺激により同細胞を骨芽細胞に分化させ、14日間培養して骨様石灰化能をアリザリン染色とvon Kossa染色により確認した。細胞抽出液を調製し、骨形成代謝マーカー酵素であるアルカリホスファターゼ活性を調べた。また、14日間培養した細胞よりtotal RNAを抽出・精製し、Agilent社製DNAマイクロアレイにて遺伝子発現解析を行った。

## 4. 研究成果

未分化のMC3T3-E1細胞株を24時間培養し、各濃度のPQQを含む培地に交換してさらに24時間培養した後の細胞生存率をWST法で評価した(図1)。対照群として10% PBSを含む培地で培養した細胞を用いた。1×10<sup>-12</sup>~10<sup>-8</sup> M PQQ添加培地群では、対照群に比べて24時間培養後の生存率の低下は認められなかったが(102.7~106.2%)、1×10<sup>-6</sup>~10<sup>-4</sup> M PQQ添加培地群では対照群に比べて有意な細胞生存率の低下が認められた(88.3%, 22.6%, P<0.01)。

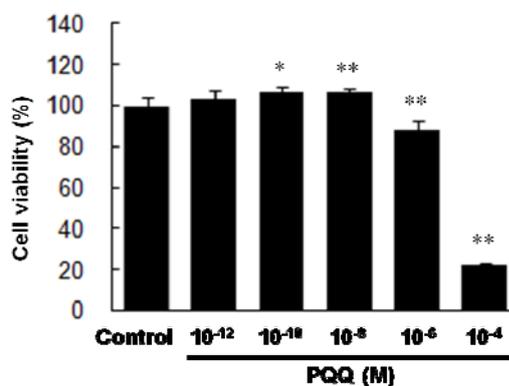


図1

また、コンフルエントに達した培地に対して72時間分化誘導したときの細胞毒性についても調べた結果、1×10<sup>-4</sup> M PQQを含む分化誘導刺激群においてのみ有意な細胞生存率の低下(72.9%, P<0.01)が認められた(図2)。これらの結果より、骨芽前駆細胞は骨芽細胞に比べてPQQに対する感受性が高いけれども、生体内PQQ濃度(~数十nM)を考慮すれば、通常の生活においてPQQによる細胞毒性は影響ないと考えられる。

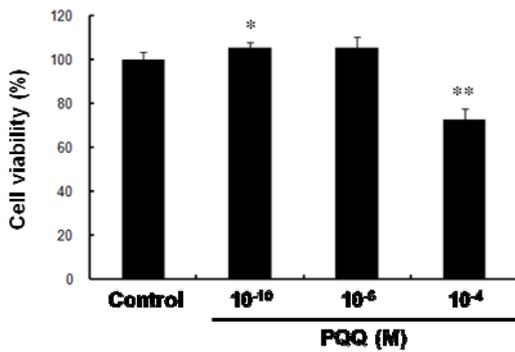


図 2

細胞増殖に及ぼす PQQ 濃度の影響について調べた (図 3). 各 PQQ 濃度 ( $10^{-10}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-4}$  M) を添加した培地で細胞を培養し, 24 時間毎の細胞増殖を WST 法で評価した. その結果,  $10^{-4}$  M PQQ 添加群において有意な細胞の増殖抑制作用が確認された.

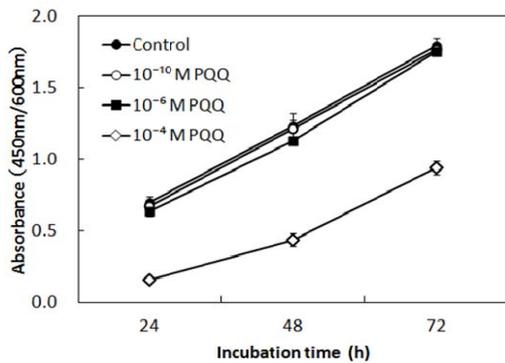


図 3

分化骨芽細胞の石灰化能に及ぼす各 PQQ 濃度の影響について調べた (図 4). von Kossa 染色およびアリザリン染色ともに PQQ 濃度依存的な骨様石灰化の減少が確認された.

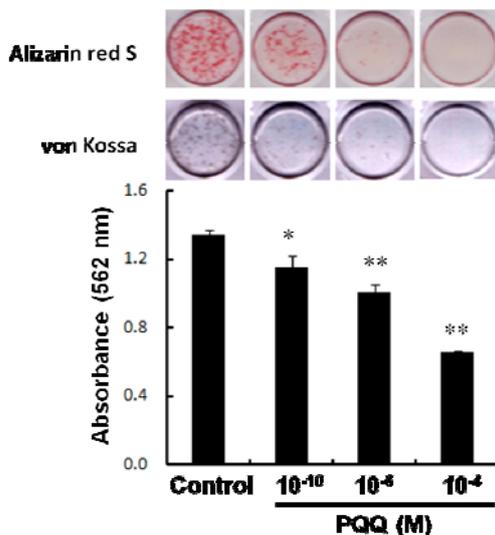


図 4

分化誘導後 14 日間培養した各細胞抽出液を用いて細胞内局在骨形成代謝マーカー酵素であるアルカリホスファターゼ活性を測定した (図 5). アルカリホスファターゼ活性は, PQQ 濃度依存的な活性の減少を示したが,  $10^{-10}$  M および  $10^{-6}$  M の PQQ 濃度においても対照群と比べて有意に高い酵素活性を示した.

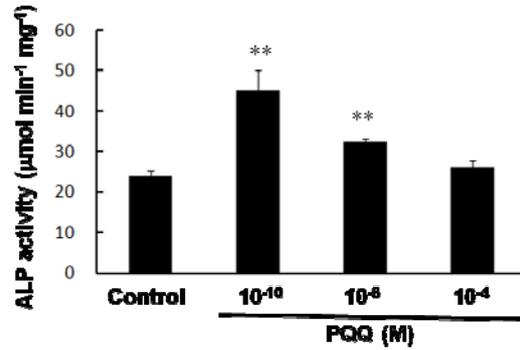


図 5

分化誘導刺激後 14 日間培養した各細胞から total RNA を抽出し, DNA マイクロアレイを用いて発現変動遺伝子を網羅的に解析した. 対照群 (分化誘導刺激のみ; DM) に対して  $10^{-10}$  M PQQ 添加群 (PQ-10) および  $10^{-4}$  M PQQ 添加群 (PQ-4) の遺伝子発現変動を解析した. 対照群 (DM) に対して発現変動が 2 倍以上認められた遺伝子のプロット図を図 6 に示す.

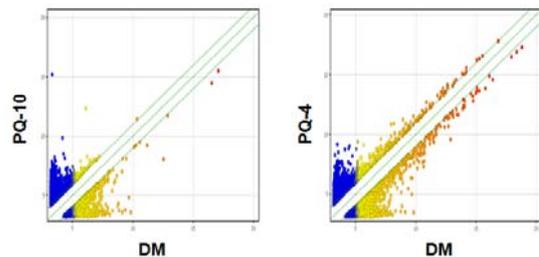


図 6

その結果, PQ-10 添加群において 525 遺伝子が 2 倍以上発現上昇 ( $\log \text{ratio} > 1$ ) し, 619 遺伝子が 0.5 倍以下に発現減少 ( $\log \text{ratio} < -1$ ) していた. また, PQ-4 添加群では, 759 遺伝子が 2 倍以上発現上昇し, 954 遺伝子が 0.5 倍以下に発現減少していた. PQ-10 添加群および PQ-4 添加群において共通して 2 倍以上発現上昇した遺伝子が 43 遺伝子, 0.5 倍以下に発現減少した遺伝子が 380 遺伝子であった. 共通の発現上昇遺伝子には, さらなる発現解析およびパスウェイ解析が必要である.

<考察および今後の展望>

マウス骨芽細胞を用いて PQQ 添加による骨形成に及ぼす影響と遺伝子発現について調べた. PQQ はビタミン様の生理活性が報告され, 脳機能改善や抗酸化作用などの効果から

サプリメントとしても注目を集めている。ヒトでは、母乳中のPQQ含量が他の組織、器官の存在量に比べて顕著に高い濃度であることが知られており、PQQが乳幼児の骨形成あるいは骨格形成に重要な役割を果たしているのではないかと考えた。

本研究において、PQQは $10^{-6}$ ~ $10^{-4}$ Mの濃度で細胞毒性を示し、有意な細胞生存率の低下を招いた。この濃度は、これまでに報告されているPQQの生体内存在量から考えて極めて高濃度であり、通常、食事摂取で体内に取り込まれたPQQはアミノ酸と付加態を形成するか腎臓を経由して速やかに尿中に排出されることが分かっている。したがって、通常の日常生活において摂取したPQQが細胞毒性を示すことは考えられにくい。

MC3T3-E1細胞の分化誘導後にPQQを添加した場合の細胞毒性では、さらに高濃度の $10^{-4}$ M濃度を添加することではじめて細胞毒性が顕在化することも踏まえて、PQQ摂取による毒性は極めて低いと考えられる。この事実は、PQQのサプリメント摂取の危険リスクを評価する上でもひとつの指針を与えるものと期待される。

分化誘導刺激後のMC3T3-E1細胞による骨様石灰化能の評価では、PQQ添加濃度依存的な石灰化の減少が確認された。本研究の目的である骨形成に及ぼすPQQの影響評価においてはネガティブな結果が得られた。しかしながら、一方で低濃度PQQの添加は骨形成代謝マーカー酵素であるアルカリホスファターゼ活性を有意に増大させた。これは、PQQによる骨形成亢進の可能性を示唆する結果が得られたのではないかと考えられる。

DNAマイクロアレイの結果から、PQQ添加によって特異的に発現変動する遺伝子群を推定することができた。当初の想定よりもはるかに多方面での遺伝子発現変動が認められたことは、今後の発展が期待される。また、骨形成促進に関わる生体キノン化合物の遺伝子発現解析の結果とも比較することで、脂溶性キノンと水溶性キノンの働きの違いや相互作用による骨形成の亢進作用が期待される。

今後は上記遺伝子発現解析の結果をさらに詳細に精査し、関連するパスウェイおよび生体キノン化合物との相互作用等について明らかにしたい。また、破骨細胞を用いた骨吸収代謝メカニズムとPQQの関わりについても明らかにしたい。

## 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)

特になし

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋 信二郎 (TACHIBANA SHINJIRO)

琉球大学・農学部・准教授

研究者番号：70447655

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：