

還元型 CoQ10のラット肝における細胞内分布と 抗酸化因子としての役割

松井 美智代 竹嶋 美夏子 脇本 麗 原 孝之

Subcellular Distribution of Reduced Coenzyme Q10 in Rat Liver and Its Role as an Antioxidant

Michiyo Matsui Mikako Takeshima Rei Wakimoto Takayuki Hara
(2013年11月27日受理)

要 旨

コエンザイム Q10 (CoQ10) はミトコンドリアの電子伝達系の必須成分であり、唯一の内因的に生産された脂質可溶性の酸化防止剤である。

本研究では、酸化型 CoQ10 (CoQ10), 還元型 CoQ10 (CoQ10H) をラットに与え、肝臓における還元型 CoQ10の細胞内分布動態を調べた。また、還元型 CoQ10の抗酸化能を評価し、抗酸化因子として CoQ10が細胞内に分配されることを検討した。

ラットは Control 群, CoQ10投与群, CoQ10H 投与群の3群に分け、CoQ10, CoQ10H をそれぞれ7日間 2g/kg の割合で餌に混ぜて経口投与し、肝細胞のどの分画に取り込まれるか調べた。肝臓の細胞分画の分離の妥当性について各種マーカー酵素活性を指標に評価した。

CoQ10H の含量は Control 群ではミトコンドリアに高かったが、核や細胞質などにも分布していた。CoQ10投与群及び CoQ10H 投与群において CoQ10H 含量は、Control 群のミトコンドリアや核に比べて1.5~2倍増加しており、Control 群のリソソームに比べて、8倍及び19倍に著しく有意に増加した。

次に CoQ10H の抗酸化性を確認するために DPPH ラジカル消去活性を調べた。CoQ10に DPPH ラジカル消去活性はみられなかったが、CoQ10H には標準物質として用いた Trolox や α -トコフェロールと同等なラジカル消去活性がみられた。その IC₅₀は15 μ M であり、Trolox (13.5 μ M), α

-トコフェロール (14 μ M) とほぼ同等であった。Control 群, CoQ10投与群, CoQ10H 投与群の肝臓の Total CoQ10H 濃度は、それぞれ183 nmol/g liver, 364 nmol/g liver, 573 nmol/g liver であり、また、卵巣での値はそれぞれ、33.9~109 nmol/g ovary, 204~265 nmol/g ovary, 221~258nmol/g ovary であった。いずれも IC₅₀の15 μ M を上回っていたことから、CoQ10はラットの臓器において、抗酸化性を十分発揮する濃度にまで蓄積、濃縮されていることを示唆するものと考えられる。

目 的

1978年に世界で初の体外受精児が誕生した。以来、体外受精による新生児の誕生は、日本でもすでに15万人にのぼっている。生殖補助医療技術の向上は高い妊娠率に結びつき、先端生殖医療技術自体への抵抗感も次第に和らぎ、2009年に日本で誕生した体外受精児の割合は、新生児の40人に1人にまでなっている。しかし今日における女性の社会進出は著しい晩婚化を招来し、またキャリア女性の妊娠を許容しにくい社会環境もあり、結果的に今までの不妊治療とは異なる、高齢女性への治療が求められるようになってきた。高齢での妊娠を希望する女性は増加しているが、加齢に伴い妊娠率は低くなっていく^[1]。このことは、加齢に伴う抗酸化能の低下に起因する配偶子の酸化ストレス亢進、つまりミトコンドリアの活性酸素生成が卵子の質と深く関わっていると考えられる^[2]。生涯排卵する卵子は

別刷請求先：原孝之，中村学園大学大学院 栄養科学研究科，〒814-0198 福岡市城南区別府5-7-1

E-mail : thara@nakamura-u.ac.jp

[1] Forman EJ, Treff NR, Scott RT Jr. Fertility after age 45: From natural conception to assisted reproductive technology and beyond. *Maturitas* 70: 216-221 (2011).

[2] Bentov Y, Esfandiari N, Burstein E, Casper RF. The use of mitochondrial nutrients to improve the outcome of infertility treatment in older patients. *Fertil Steril* 93: 272-275 (2010).

胎生期につくられ、その後新たに作られることはない。1回目の減数分裂の途中で長期停止した卵母細胞の状態に成熟、排卵までの長期間を体内で生きる特殊な細胞である。故に卵子は長年酸化ストレスにさらされていることになる。卵子には多くのミトコンドリアが存在しているため、ミトコンドリアの質を保つことが卵子の質、次なる生命の安定、繁栄につながるのではないかと考えられている。

有気呼吸生物の呼吸代謝によって生じる活性酸素種には H_2O_2 、一重項酸素、スーパーオキシドラジカルアニオン、 $\cdot OH$ ラジカル、ヒドロペルオキシドなどがあり、いずれも生体膜の傷害、たんぱく質の変性、酵素の失活、リポたんぱく質 LDL の酸化による変性、DNA 複製エラーなど様々な細胞の機能の低下を招く。その積み重ねが老化、ガン化、生活習慣病を引き起こすと考えられている^[3]。活性酸素は、ストレス、過食、喫煙、薬物服用、大気汚染などによって増長され、生活習慣病と深く関わっている^[4]。活性酸素は細胞内で ATP のエネルギー産生の際であるミトコンドリアにおいて副次的に生成される。

生体内には、活性酸素を消去するいろいろなシステムがある。1つは、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、グルタチオンペルオキシダーゼなどに代表される酵素たんぱく質である。さらに、グルタチオンなどのペプチド、ビタミンCなどの水溶性ビタミン、ビタミンEなどの脂溶性ビタミンなどである。これらは酵素化学反応、あるいは化学反応によって活性酸素を消去する。特に化学物質については抗酸化剤と呼ばれている。最近、野菜や果実に

含まれるポリフェノールの抗酸化性が注目されており、野菜や果実の摂取によって、抗酸化性のビタミン補給だけでなく、ポリフェノールの摂取の重要性が指摘されている。しかし、一方でポリフェノールは一般的に脂溶性が低く、極性が比較的高いため、体内に吸収され難いという欠点がある。

コエンザイム Q (CoQ) はキノン骨格部分とイソプレノイド側鎖部分から成るベンゾキノン誘導体であり、広く生物界に存在することから「ユビキタスに存在するキノン」、ユビキノンと命名されている。ユビキノンを2電子還元したヒドロキノン体がユビキノール (Ubiquinol) である。ユビキノンはイソプレノイド側鎖部分が $n=1\sim 12$ の多数の同族体が天然に存在し、ヒトでは、 $n=10$ で、ラットでは、 $n=9$ が主である (Fig.1)。CoQ10は分子量が863.34であり、ポリフェノールと比べると脂溶性がかなり高い化合物である。

CoQ10はコレステロールと同様にメバロン酸経路で合成された^[4]、ミトコンドリア電子伝達系複合体IIから複合体IIIへの電子の伝達を仲介する非タンパク質であり、電子伝達とそれに共役した ATP 産生に必要不可欠である^[5]。すべての臓器、細胞に存在し、ミトコンドリア電子伝達系の複合体 I、II と複合体III間のキノン (酸化型) とキノール (還元型) の変換を行うことで、電子の受け渡しを行う (Fig. 2)。また、CoQ10は酸化還元成分と唯一の内因的に生産された脂溶性の酸化防止剤としても欠かせないため、すべての細胞内外にユビキタスに存在している^[6-8]。CoQ10の還元型である Ubiquinol (Fig. 2) は強い抗酸化作用があり、活性酸素によ

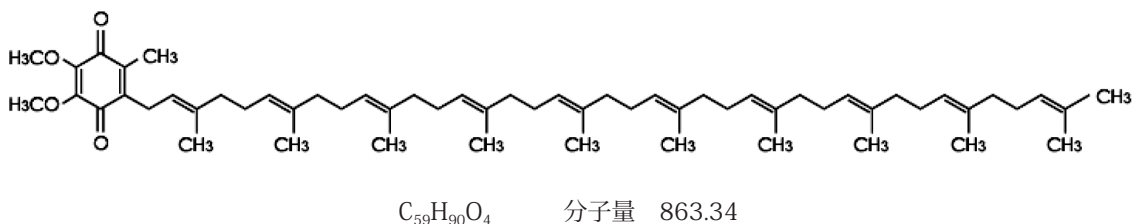


Fig.1 CoQ10の構造式

[3] Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 5: 9-19 (2012).

[4] Quinzii CM, Hirano M. Coenzyme Q and mitochondrial disease. *Dev Disabil Res Rev* 16: 183-188 (2010).

[5] 紀氏健雄, 高橋隆幸, 岡本正志. バイオフィクター研究のブレークスルー: 呼吸鎖における Coenzyme Q 研究の歴史と現状. *ビタミン* 75: 263-271 (2001).

[6] Takayanagi R, Takeshige K, Minakami S. NADH- and NADPH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. Dependence on the rate of electron flow in the respiratory chain and an antioxidant role of ubiquinol. *Biochem J* 192: 853-860 (1980).

は、これらの膜内で、脂質の過酸化を防ぎ、生体膜の安定性を保つ働きを持つと思われる。また、Zhangら^[16]は、酸化型 CoQ10をラットに与えた時の CoQ10の血清濃度、臓器分布、細胞内分布について検討している。これによれば、ラットに酸化型 CoQ10を12 μ mol/100g (10.36mg/100g B.W) 体重の割合で8日間与えると、肝臓の CoQ10Hは180 nmol/g liverで、コントロールラットの約8倍増加していた。また、CoQ10は比含量としては、リソソームに高く、次いでミトコンドリア、核、ミクロソームの順で存在した。CoQ10は脂溶性が高く、分子量も大きいので、経口で約40%と吸収が悪いことが知られており、還元型 CoQ10は極性が高まることから、吸収の改善が期待される。事実、Hosoeら^[17]はカネカの開発した CoQ10Hをヒトに投与した場合、CoQ10を投与した時の血清中の濃度が2~3倍増加することを報告している。しかし、ラットにおける CoQ10Hの細胞内分布についての研究は知られていない。CoQ10Hの試薬は、1mgが50万円と、研究のハードルは高い。今回はカネカの特別な支援で還元型 CoQ10供与を受け、還元型 CoQ10 (Ubiquinol) をラットに与えた時の肝臓における還元型 CoQ10の細胞内分布動態と抗酸化因子としての役割について研究した。

実験方法

1. 試薬

Coenzyme Q10H (CoQ10H) は、(株)カネカより供与された。CoQ6はAvanti Polar Lipids社製、Coenzyme Q10 (CoQ10)、 α -tocopherol、TroloxはCalbiochem社製、1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) は和光純薬製を用いた。NADPHはオリエンタル酵母社製を用いた。CoQ9はSigma社製、チトクロームcはSigma社製のウマ心筋のType IIIを用いた。その他の試薬は試薬特級を、メタノール、ヘキサンはHPLC特級試薬を用いた。

2. 対象ラット

雌雄のWistar系ラット12匹を本研究に用いた。ラットをCoQ10投与群 CoQ10H投与群、Control群の3群に分け、CoQ10、CoQ10Hをそれぞれ2

g/kg添加した飼料を、Control群にはCoQ10を添加しない一般飼料を7日間与えた。ラットをエーテル麻酔下に、大腿動脈より瀉血後、解剖し肝臓を摘出した。また、CoQ10経口投与の作用による卵巣の重量増加という報告がある雌については卵巣を摘出した。

3. 肝臓細胞分画

すべての操作は、4℃以下で行った。新鮮な肝臓を氷冷した生理食塩水で灌流し、重量を測定した。凍結保存用に1g除いた肝臓に重量の4倍量のホモジナイズ溶液、10mM Tris-HCl (pH 7.5)、1mM EDTAを含む0.25M ショ糖を入れ、ハサミを用いて肝臓を細かく刻んだ後、ガラステフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。その後、下記に示す遠心分離の条件で順に遠心分離 (2,700rpm 10min, 6,500rpm 15min, 10,000rpm 20minのそれぞれ2回ずつ、40,000rpm 60min) を行い、それぞれの遠心分離段階での沈殿を核 (Nc) 画分、ミトコンドリア (Mt) 画分、リソソーム (Ls) 画分、ミクロソーム (Ms) 画分および上清 (Sol) を可溶性画分とした。Solを除く各画分はホモジナイズ溶液を加え、再びホモジナイズした。それぞれの容量を測定し、サンプルを評価するまで、-80℃で凍結保存した。細胞分画の純度はマーカー酵素活性を測定することで確認した。

4. ミトコンドリア膜とマトリックスの分離

遠心分離によって得られたMt画分5mlに10mM K-Pi buffer (pH 7.4) 5mlを加えてホモジナイズした。30~60sec超音波破碎し、次いで40,000rpm 60min遠心分離を行い膜画分とマトリックス画分に分離を行った。

5. 血清の分離

血液が凝固した後、3000rpm 10min遠心分離し、血清を採取した。

6. 卵巣

ラットの卵巣6例 (0.106g \pm 0.021) は20mg/mlとなるように蒸留水を加え組織を破碎し、CoQ10の抽出に用いた。

[16] Zhang Y, Aberg F, Appelkvist EL, Dallner G, Ernster L. Uptake of dietary coenzyme Q supplement is limited in rats. J Nutr 125: 446-453 (1995).

[17] Hosoe K, Kitano M, Kishida H, Kubo H, Fujii K, Kitahara M. Study on safety and bioavailability of ubiquinol (Kaneka QH) after single and 4-week multiple oral administration to healthy volunteers. Regul Toxicol Pharmacol 47: 19-28 (2006).

7. 組織中の CoQ10の抽出方法

12mlの共栓付試験管に Nc, Mt, Ls, Ms の各画分は100mgの重量に相当するように分注し, 0.1 M SDS 0.5ml, 内部標準液として0.1 mM CoQ6 0.02 ml 加えた。ボルテックスミキサーで5秒間攪拌した後, メタノール 4 ml, n-ヘキサン 6 ml を加えて振とう機 (240rpm/min) で5分間振とうし, 抽出を行った。3000 rpm 10min 遠心分離し, ヘキサン層をパスツールピペットで採取し, 20ml 試験管に入れた。残渣に n-ヘキサン 6 ml を加え, 再度振とう抽出し, 遠心分離を行った。ヘキサン層を試験管に加え窒素ガス気流下で乾燥させた。Sol, 血清, 卵巣組織浮遊液は 1 ml を抽出に用いた。

8. HPLC による定量

Waters 社製の M600 の HPLC 装置に島津 Shim-Pack CLC-ODS (M) カラム (4.6mmx250mm) を接続し, 移動相としてメタノール:ヘキサン=88:12, 流速 1 ml/min で分析時間を40minとした。検出は275nmで行った。上記の乾燥させた試験管に, 移動相の溶媒を200 μ l を加え, ボルテックスミキサーで数秒間攪拌し, HPLC で50 μ l を分析した。各ピーク面積を求め, CoQ10及び CoQ10H 濃度をそれぞれの標準物質との比較から算出した。

9. 酵素活性

Nc, Mt, Ls, Ms, ならびに Sol のマーカーとして, それぞれ DNA, コハク酸-チトクロム c レダクターゼ, 酸性ホスファターゼ, NADPH-チトクロム c レダクターゼ, 乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) を Fleischer と Kervina の方法で測定した^[18]

10. たんぱく質の定量

たんぱく質の定量は Bradford 法^[19]に従って行った。標準タンパク質としては, BSA (Bovine serum albumin) を用いた。

11. DPPH ラジカル消去活性の測定

1 mM CoQ10H を0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.1 ml にメタノールを加えて 1 ml とし, 0.08mM DPPH を 3 ml 加え, ボルテックスミキサーで10秒攪拌し, 室温・暗所で30分放置したのち, 515nm (DPPH ラジカル) の吸光度を測定した。Trolox を標準試薬として用いた。 α -トコフェロールについても同様に測定した。

統計解析

本研究で得られた結果は平均値±標準偏差 (SD) で表した。Student の t-test により, 有意差検定を行った。有意水準を 5% とした。

結 果

1. ラットの体重変化と CoQ10摂取量

Table1にラット体重の変化とラット 1 匹あたりの CoQ10摂取量を示した。Control 群, CoQ10H 投与群, CoQ10投与群のラットの体重に差はみられなかった (215±36g, 242±47g, 250±49g)。また, 摂取した試料量にも CoQ10H 投与群, CoQ10投与群に有意差は見られなかった (130±37g, 130±42g)。摂取した飼料量より計算した CoQ10H 量, CoQ10量もそれぞれ0.26±0.1g, 0.26±0.1g と差はみられなかった。投与された総

Table 1 ラット 1 匹あたりの CoQ10摂取量と体重の変化

Group		Control 群 (n=4)	還元型群 (n=4)	酸化型群 (n=4)
体重 (g)	前	————	205±35	207±34
	後	215±36	242±47	250±49
飼料量 (g)		————	130±37	130±42
摂取 CoQ10量 (g)	還元型	————	0.26±0.1	————
	酸化型	————	————	0.26±0.1

[18] Fleischer S, Kervina M. Subcellular fractionation of rat liver. Methods Enzymol 31: 6-40 (1974).

[19] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254 (1976).

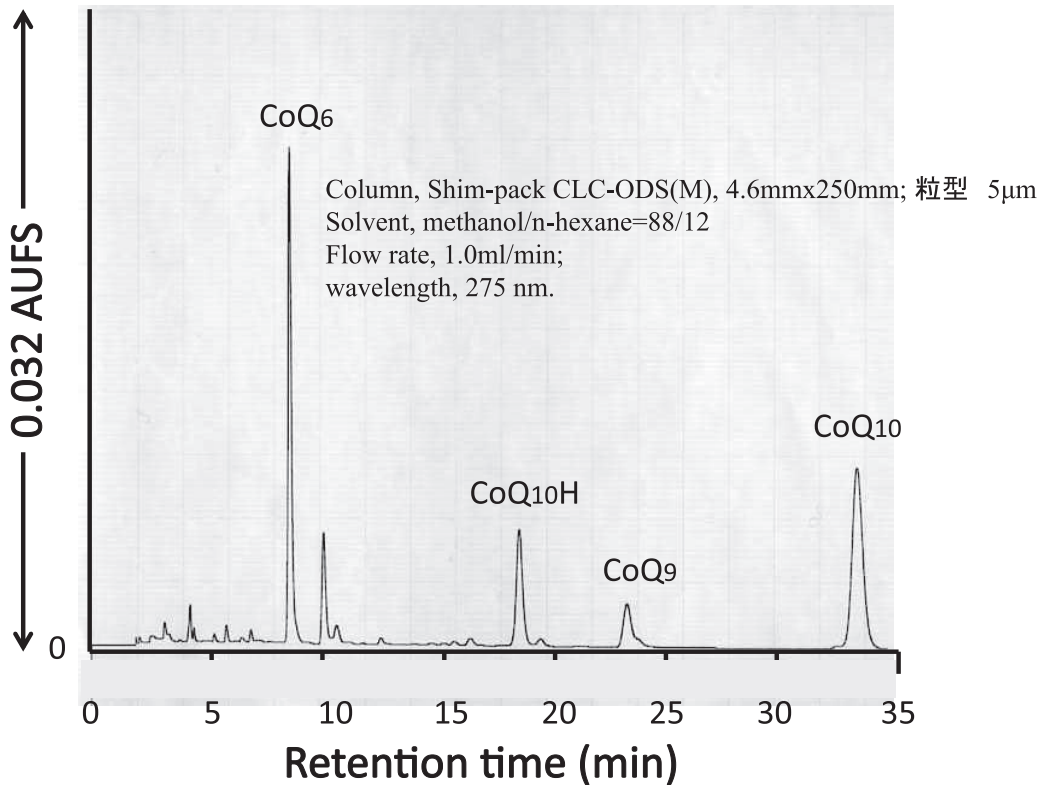


Fig.3 HPLCによるCoQ10のクロマトグラム

CoQ10H量, 総CoQ10量は, およそ1g/kg体重であると算出された。

2. HPLCによるCoQ10の定量

Fig. 3にCoQ10のクロマトグラムを示した。内部標準のCoQ6は保持時間8minに検出された。CoQ10H, CoQ9, CoQ10は, それぞれ18.0min, 23.0min, 33.0minに検出された。

3. 血清CoQ10の定量

CoQ10投与後の血清中のCoQ10を上記のHPLC法により定量した。CoQ10投与群, CoQ10H投与群, Control群のラット血清のCoQ10濃度は非常に低く, CoQ10H群で2例検出できないものがあった (Table 2)。

4. 肝臓の細胞分画とマーカー酵素の分布

Fig. 4に, 細胞分画した肝臓のNc, Mt, Ls, Ms, Solの各マーカー酵素の測定結果を示した。NcはDNA, Mtは, コハク酸-チトクロムcレダクターゼ, Lsは, 酸性ホスファターゼ, Msは, NADPH-チトクロムcレダクターゼ, SolはLDHにより調べた。いずれの分画も, マーカーの比含量あるいは比

Table 2 ラット血清中のCoQ10濃度

Group		Total CoQ10
	n	nmol/ml
Control 群	4	0.37±0.27
CoQ10投与群	4	0.54±0.20
CoQ10H 投与群	2	0.27~0.47

活性が明らかに高く, それぞれのオルガネラの分離が良好であることがわかった。また, たんぱく質の比率も, Sol 24%, Mt 15%, Ls 6%, Ms 10%, Sol 45%と最適な割合であった。

5. 肝臓の各分画におけるCoQ10の定量

Table 3にCoQ10投与群, CoQ10H投与群, Control群のラット肝臓のCoQ10の定量結果を示した。データに示していないが, Control群の雌雄ラットの肝臓の総CoQ10含量に差がみられなかったため, 今回のデータは雌雄ラットを一緒にしてデータをまとめたZhangら^[12]の結果と同じく, CoQ10Hの比率はCoQ10に比べて明らかに高かった。Table 4に示すように, Control群のラット肝臓

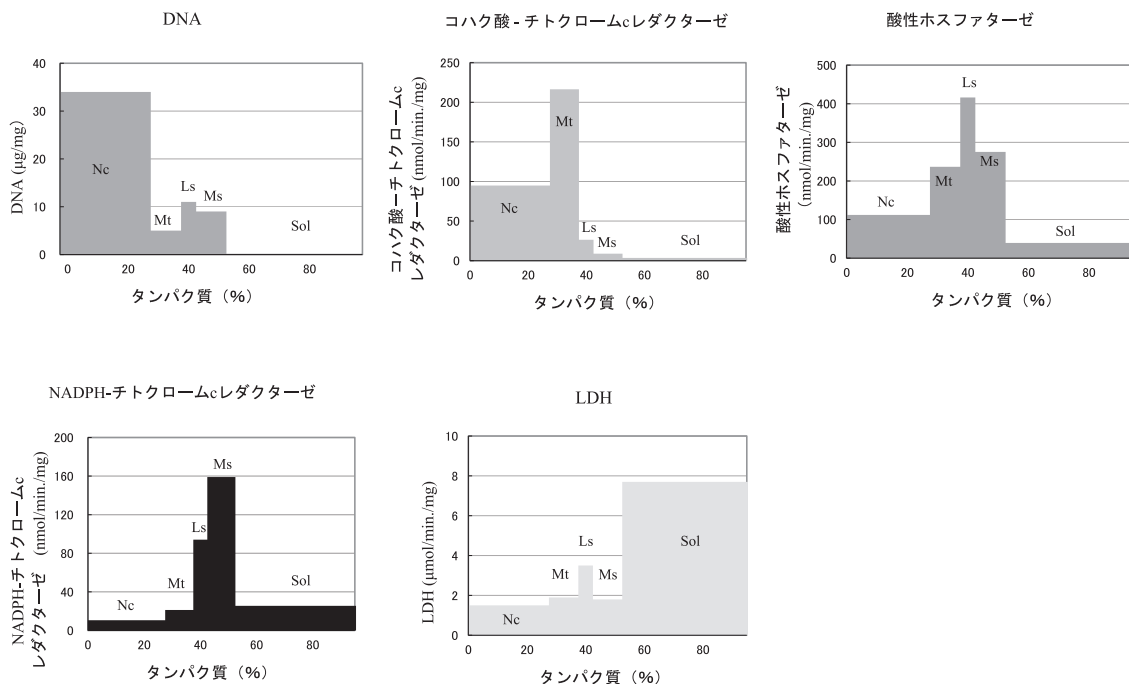


Fig.4 マーカー酵素の分布

Table 3 CoQ10投与群別肝中 CoQ10濃度

Feeding	nmol/g liver		
	総 CoQ10	CoQ10H	CoQ10
Control 群	200±29	183±34	17±2.0
CoQ10投与群	545±35 ^a	364±42 ^a	181±15 ^b
CoQ10H 投与群	849±54 ^a	573±63 ^b	275±16 ^a

a, vs control (p<0.01)

b, vs control (p<0.05)

の CoQ10H は Mt と Nc に多く分布しているが、他の分画にも存在した。なお、データには示さないが Mt を膜画分と可溶性画分に分けて、CoQ10を定量すると、90%以上が膜画分に回収された。しかし、肝臓分画では、生体膜を持たない Sol にも全体の10%以上の CoQ10が含まれていた。また、Ls では、CoQ10投与群で Control 群の約10倍、CoQ10H 投与群で Control 群の約19倍の増加がみられた。肝臓の総 CoQ10H 含量は CoQ10投与群で、Control 群の約2.7倍、CoQ10H 投与群で Control 群の約4.6倍、有意に増加した。

6. 各分画の CoQ10の比含量の検討

Fig. 5は、Control 群、CoQ10投与群、CoQ10H 投与群の各分画における CoQ10の比含量を比べた

ものである。比較のために、内因性の CoQ9の比含量も示した。CoQ9の比含量は、Nc, Mt, Ls に高いことがわかった (Fig. 5-2)。CoQ10H 投与群では、内因性の CoQ9の比含量の低下がみとめられた。CoQ10投与群、CoQ10H 投与群では、リソソームにおける CoQ10と CoQ10H の比含量の著しい増加がみられた。この効果を数値化するために、CoQ10投与群、CoQ10H 投与群の総 CoQ10のリソソームの比含量をミトコンドリアの比含量との比率にした。Table 5に示すように、CoQ10投与群、CoQ10H 投与群でその比率が有意に増加しており、特に CoQ10H 投与群でその比率が 2.3 ± 0.7 と、約8倍増加した。CoQ10のような脂溶性化合物は、小腸で吸収されたのち、カイロミクロン経由でリンパ管へと移行すると推察される。CoQ10投与群、

Table 4 肝臓の各分画別 CoQ10濃度

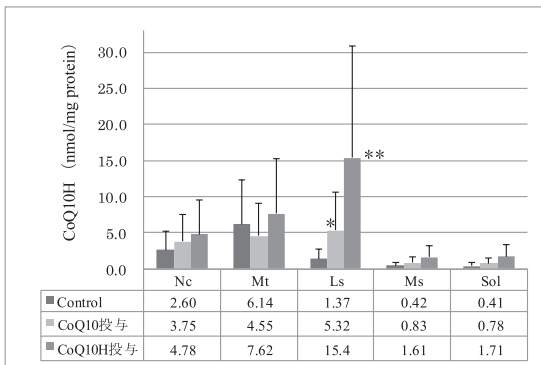
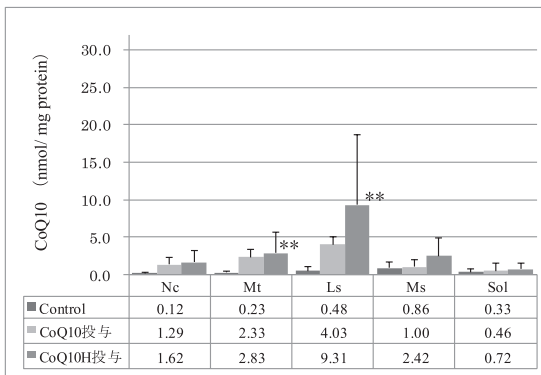
Fraction	Control 群 (n=4)		CoQ10投与群 (n=3)		CoQ10H 投与群 (n=3)	
	CoQ10H	CoQ10	CoQ10H	CoQ10	CoQ10H	CoQ10
	nmol/g liver					
Nuclei	65±22 (35%)	1.2±1.1 (7%)	118±21 ^b (32%)	38±18 ^d (21%)	146±14 ^a (26%)	51±24 ^d (19%)
Mitochondria	79±12 (43%)	3.0±1.6 (18%)	109±42 (30%)	57±36 ^d (31%)	199±107 (35%)	73±37 ^c (26%)
Lysosome	6.0±8.0 (3%)	2.7±3.0 (16%)	60±15 ^a (16%)	40±35 (22%)	111±59 ^b (20%)	70±18 ^c (25%)
Microsome	6.0±6.0 (3%)	4.3±6.3 (25%)	15±8.0 (4%)	18±11 (10%)	30±13 ^b (5%)	44±17 ^d (16%)
Soluble	27±12 (14%)	5.4±6.0 (32%)	62±22 (17%)	28±7.0 ^c (16%)	88±34 ^b (15%)	38±7.0 ^c (14%)
Total	183±34	17±2.0	364±42 ^a	181±15 ^c	573±63 ^a	275±16 ^c
	200±29		545±35 ^e		849±54 ^e	

数値はすべて平均値±標準偏差

a, vs control CoQ10H (p<0.01), b, vs control CoQ10H (p<0.05)

c, vs control CoQ10 (p<0.01), d, vs control CoQ10 (p<0.05)

e, vs control Total CoQ10H (p<0.01)



** : vs control (p<0.01) * : vs control (p<0.05)

Fig. 5-1 各細胞分画における CoQ10の比含量

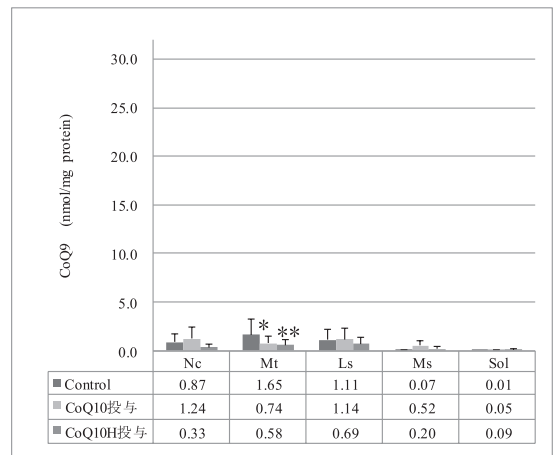


Fig. 5-2 各細胞分画における CoQ9の比含量

Table 5 リソソームとミトコンドリアの比含量の比率

Specific Content Ls/Mt	Control 群 (n=4)	CoQ10投与群 (n=3)	CoQ10H 投与群 (n=3)
Total CoQ10	0.3±0.3	1.3±0.1 ^a	2.3±0.7 ^{a,b}
CoQ9	0.7±0.4	1.2±0.5	1.3±0.6

数値はすべて平均値±標準偏差

a, vs control (p<0.01)

b, vs CoQ10 (p<0.05)

CoQ10H 投与群で、リソソームの CoQ10 の比含量が著しく増加したのは、肝臓への CoQ10 の取り込みに、エンドサイトーシスによる CoQ10 の取り込み、エンドソームへの移行、さらに、リソソームとの融合などの機構が考えられる。

7. CoQ10の抗酸化活性と肝臓における役割

Fig. 6に CoQ10H の DPPH ラジカル消去能を他の抗酸化剤と比較した。CoQ10H の DPPH ラジカル消去能の IC₅₀は、15 μ M であり、Trolox の 13.5 μ M、α-トコフェロールの 14 μ M とほぼ同じ能力を有していると思われる。肝臓における CoQ10H の濃度は、Control 群、CoQ10 投与群、CoQ10H

投与群で、それぞれ 183 nmol/g liver, 364 nmol/g liver, 573 nmol/g liver であり、1 g の肝臓を 1 ml の水と仮定すると、濃度はそれぞれ 183 μ M, 364 μ M, 573 μ M となり、CoQ10H の DPPH ラジカル消去能の IC₅₀の 15 μ M よりもはるかに高い数値となる。したがって、ラット肝臓において、CoQ10H は十分な抗酸化性を発揮していることが示唆される。

卵巣の CoQ10 についても定量を試みた。

Control 群、CoQ10 投与群および CoQ10H 投与群の総 CoQ10 は 33.9~109 nmol/g ovary, 204~265 nmol/g ovary および 221~258 nmol/g ovary であった。CoQ10H の IC₅₀=15 μ M よりも高い濃度

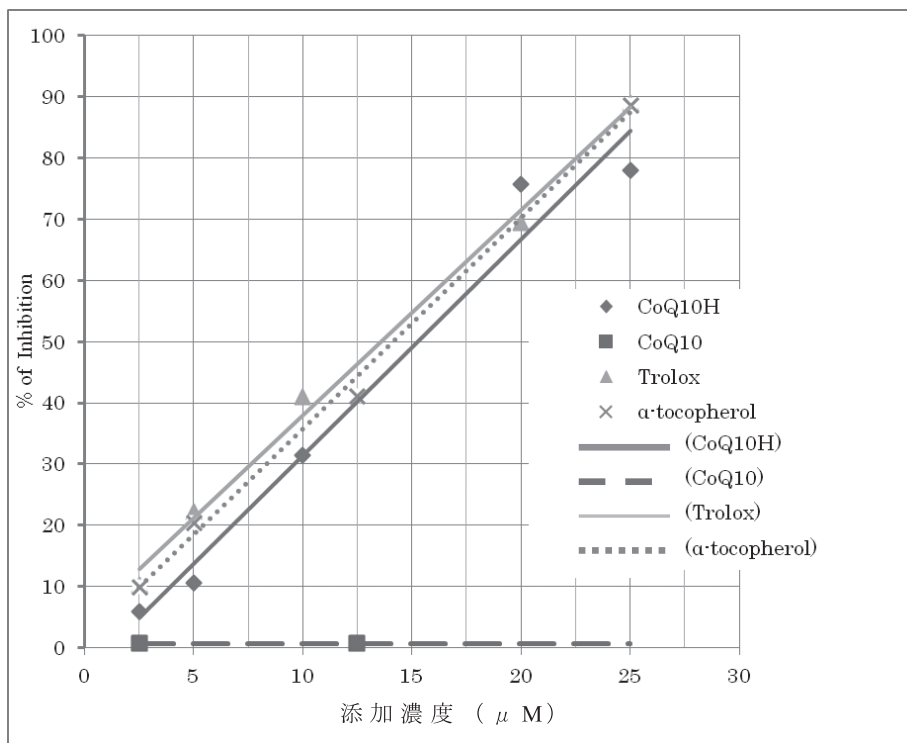


Fig. 6 CoQ10H および CoQ10 の DPPH ラジカル消去活性

Table 6 卵巣破碎組織より抽出した CoQ10含有量

	Control 群 (n=2)	CoQ10投与群 (n=2)	CoQ10H 投与群 (n=2)
	(nmol/g)		
Total CoQ10	33.9~109	204~265	221~258
CoQ10H	10.6~99.0	153~173	193~244
CoQ9	12.3~18.3	13.4~15.1	13.0~16.1

で存在した (Table 6)。

考 察

Fig. 3の HPLC クロマトグラムに示したように, CoQ10誘導体の保持時間の差から, 脂溶性の順位は, CoQ10 (33min) > CoQ9 (23min) > CoQ10H (18min) > CoQ6 (8min) の順となり, 溶出の遅いものが, 脂溶性が大きいと仮定されるので, 脂溶性の順位は, CoQ10 > CoQ9 > CoQ10H > CoQ6となり, CoQ10が還元されると, 極性の増加がイソプレン単位1個の欠失よりもはるかに大きいことが示唆された。CoQ10Hの極性は, CoQ10に比べてかなり高くなっており, そのバイオアベイラビリティがかなり高まることが期待された。事実, CoQ10H投与群の肝臓へのCoQ10の総取り込み量は, 849nmol/g liverであり, Control群の約3倍に有意に増加し, CoQ10投与群 (545nmol/g liver) に比べても有意に高かった。しかし, 今回の血清における分析では, CoQ10H投与群, CoQ10投与群ともにControl群と有意な差を見出すことが出来なかった (Table 2)。その原因として, 血清に存在するCoQ10がHPLCの定量の検出限界近くであることが考えられた。いずれにせよ, CoQ10が血清にわずかしか存在しないことは興味深いことである。肝臓のCoQ10濃度と血清の濃度との間に1000倍以上の開きがあるのは, おそらくCoQ10を肝臓に積極的に取り込む機構が存在すると考えられる。その1つは, カイロミクロンなどのリポたんぱく質による輸送であろうが, そのような報告は知られていない。

今回の肝細胞分画におけるCoQ10の定量から, Control群では, CoQ10は主にミトコンドリアに分布した。しかし, 他の細胞内小器官の核やリソソーム, ミクロソームにも存在した。ミトコンドリアの分析から, それらは, 外膜と内膜に90%以上が存在していた。おそらく他の小器官についても膜に存在しているものと思われる。また, 可溶性の細

胞質にもCoQ10の存在がみとめられた。脂溶性のCoQ10が水系の細胞質にどのようにして存在するのか興味深い。おそらく, たんぱく質に結合して存在するものと思われる。

CoQ10H投与群, CoQ10投与群では, ミトコンドリア, 核への増加が1.4~2.5倍程度みられたが (Table 4), リソソームにおけるCoQ10Hの増加は, CoQ10H投与群で19倍 (111 ± 59 nmol/g liver), CoQ10投与群で10倍 (60 ± 15 nmol/g liver) と有意に増加した。これは, 前述したように, カイロミクロンなどのリポたんぱく質中のCoQ10がエンドサイトーシスによって, 肝細胞内のエンドソームに取り込まれ, リソソームと融合して, さらにゴルジ体を経て, ミトコンドリアや核に運ばれることが起きていることを示唆している。Fig. 7にエンドサイトーシスによるコレステロールの細胞内への取り込みの過程を示した。リポたんぱく質のアポたんぱく質が細胞のレセプターと結合し (Fig. 7A)。この時, 細胞膜に裏打ちされたクラスリンが細胞膜の内部への陥入の引き金となる (Fig. 7B, 7C)。内部に取り込まれた小胞はエンドソームと呼ばれている (Fig. 7D)。エンドソームからクラスリンが除かれ (Fig. 7E), エンドソームはリソソームと融合し, リソソームの加水分解酵素によって脂質の消化が起きる (Fig. 7F)。その後, 脂質は, 小胞輸送を介して, ゴルジ体へ移行し, 小胞体, ミトコンドリア, あるいは核などへと輸送される。今回のControl群のデータから, CoQ10Hは, 最終的には活性酸素を主に発生するミトコンドリアへ運ばれていくものと考えられるが, 今回のデータはそのプロセスの途中を捕まえたものと思われる。CoQ10Hの薬理作用として, リソソームやゴルジ体における活性酸素過剰による傷害の疾患などに応用できるのではないかと考えられる。そのような, アイデアの研究はこれまでに知られていない。

今回の研究から, 脂溶性の薬物やビタミン類の生体内動態の研究には, in vivoの研究が欠かせないことを痛感させられた。脂溶性の物質は, 体内に吸

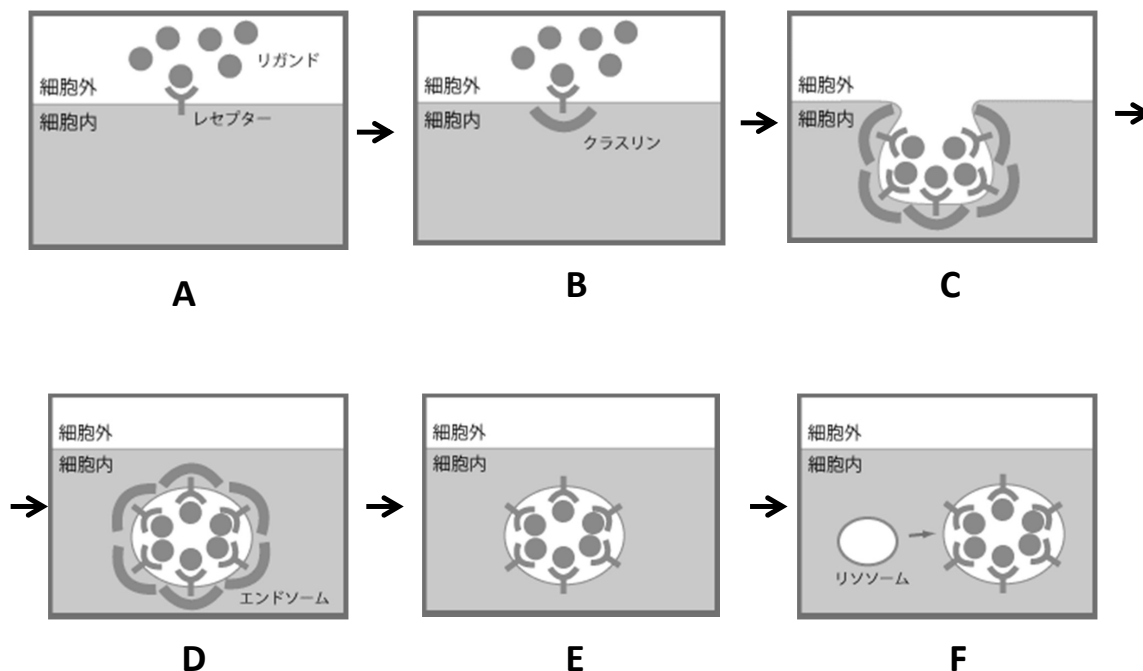


Fig. 7 エンドサイトーシスのプロセス

取されたのち、カイロミクロンやVLDLを介して、標的臓器へ運ばれる。最近、培養細胞を用いた研究も多くみられる。CoQ10においても、培養細胞によるCoQ10の取り込みの研究がある。Saitoら^[20]は、PC12細胞におけるCoQ10及びCoQ10Hの取り込みを調べ、いずれもミトコンドリアに取り込まれるとしている。カイロミクロンやVLDLを介さない培養細胞系における取り込みは、あくまでもin vitro実験であることを考慮しなければならない。

今回、カネカのCoQ10Hを用いて、DPPHラジカル消去能を、標準物質であるTroloxや α -tocopherolと比較した。CoQ10にはDPPHラジカル消去能は全くなかったが、CoQ10Hには、Troloxや α -tocopherolに匹敵する消去活性が認められた。その IC_{50} は、 $15\mu M$ で、Troloxの $13.5\mu M$ 、 α -トコフェロールの $14\mu M$ とほぼ同じ能力を有していた (Fig. 6)。肝臓におけるCoQ10Hの濃度は、Control群、CoQ10群、CoQ10H群で、それぞれ 183nmol/g liver 、 364nmol/g liver 、 573nmol/g liver であり (Table 4)、1gの肝臓を1mlの水と仮定すると、濃度はそれぞれ $183\mu M$ 、 $364\mu M$ 、

$573\mu M$ となり、CoQ10HのDPPHラジカル消去能の IC_{50} の $15\mu M$ よりもはるかに大きい数値となる。したがって、ラット肝臓において、CoQ10Hは十分な抗酸化性を発揮していることが示唆された。何故、肝臓には、このように高濃度のCoQ10Hが含まれているのか？今回の実験に用いたDPPHラジカル濃度は $60\mu M$ である。肝臓には、もっと高濃度の活性酸素が存在するのかもしれない。事実、マロンジアルデヒドのラット肝臓における濃度は、 6nmol/mg protein であり、肝臓gあたりになるとおよそ 600nmol/g liver となる^[21]。今回、Control群においても、肝臓にCoQ10Hが高濃度に存在するという結果は、肝臓における高濃度の活性酸素の発生のために存在が必要不可欠のものかもしれない。

最後に、CoQ10Hの抗酸化剤としての有用性について議論したい。抗酸化剤には、水溶性のビタミンC、やや脂溶性のポリフェノール、そして脂溶性のCoQ10やビタミンE (α -トコフェロール) などがある。ビタミンCは、過酸化脂質のような脂溶性の物質とは反応しにくいし、生体膜で発生する活性

[20] Saito Y, Fukuhara A, Nishio K, Hayakawa M, Ogawa Y, Sakamoto H, Fujii K, Yoshida Y, Niki E. Characterization of cellular uptake and distribution of coenzyme Q10 and vitamin E in PC12 cells. J Nutr Biochem 20: 350-357 (2009).

[21] Babitha S, Banji D, Banji OJ. Antioxidant and hepatoprotective effects of flower extract of Millingtonia hortensis Linn. on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. J Pharm Bioallied Sci 4: 307-312 (2012).

酸素の消去には働きにくいと思われる。一方、食物から摂取するやや脂溶性のポリフェノールは吸収が悪く、抗酸化性を体内で十分に発揮しているのか？疑問が持たれている。Chenら^[22]は、ラットにエピガロカテキンガレート、エピガロカテキン、エピカテキンを25mg/kg 静脈注射して、その臓器濃度を測定している。投与後1時間でほとんどが肝臓から消失しており、その濃度は0.5 μ g/g liver 以下であると報告している。その濃度は、およそ2 nmol/g liver となり、上記のDPPHラジカル消去能を発揮するには不足であることがわかる。次に、ビタミンEについて、Ibrahimら^[23]は、ビタミンEとCoQ10の同時投与で、肝臓のビタミンE、CoQ10が最高3000nmol/g liver まで蓄積されること示している。ビタミンEはヒトでは一日摂取の上限が600~800mgとされており^[24]、CoQ10は一日1200mgを与えても安全であることが知られている^[25]。従って、CoQ10は安全な抗酸化剤であり、CoQ10Hは吸収性が高まることから、最も推奨される抗酸化剤であると言えよう。卵巣においても、CoQ10Hは本実験のDPPHラジカル消去能のIC₅₀を発揮する濃度を上回るほど高濃度に存在していることが本実験から示された。従って、CoQ10Hは卵巣機能の維持に安全かつ確実な抗酸化剤であると思われる。

謝 辞

本稿は、平成24年度中村学園大学大学院に提出した修士論文の一部を加筆・修正したものである。なお本研究の一部は、平成25年度日本生化学会九州支部会において報告された。本研究を遂行するにあたり、還元型コエンザイムQ10をご提供いただきました、株式会社カネカの藤井健志氏に深謝します。

[22] Chen L, Lee MJ, Li H, Yang CS. Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metab Dispos* 25: 1045-1050 (1997).

[23] Ibrahim WH, Bhagavan HN, Chopra RK, Chow CK. Dietary coenzyme Q10 and vitamin E alter the status of these compounds in rat tissues and mitochondria. *J Nutr* 130: 2343-2348 (2000).

[24] Meydani SN, Meydani M, Blumberg JB, Leka LS, Pedrosa M, Diamond R, Schaefer EJ. Assessment of the safety of supplementation with different amounts of vitamin E in healthy older adults. *Am J Clin Nutr* 68: 311-318 (1998).

[25] Ikematsu H, Nakamura K, Harashima S, Fujii K, Fukutomi N. Safety assessment of coenzyme Q10 (Kaneka Q10) in healthy subjects: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Regul Toxicol Pharmacol* 44: 212-218 (2006).