

# コエンザイム Q10 (CoQ10) の美肌、抗老化作用における ミトコンドリア移行の意義

同志社大学生命科学部

斎藤 芳郎

Coenzyme Q (CoQ) is a well-known electron transporter in the mitochondrial respiratory chain. Furthermore, ubiquinol (UQH<sub>2</sub>)—a reduced form of ubiquinone (UQ)—has been shown to act as a radical-scavenging antioxidant. Some studies have reported the beneficial effect of CoQ addition to cultured cells; however, the cellular uptake and distribution of CoQ have not been elucidated. Our recent study suggests that the added UQ10 as well as UQ10H<sub>2</sub> mainly localized in the mitochondrial fraction, which is similar to the localization of endogenous CoQ but different from that of  $\alpha$ T. These results suggest a certain system which accumulates CoQ preferentially in mitochondria. Benzoquinone ring of CoQ suggests a redox function, while the isoprenic side chain mediates the arrangement of CoQ in the lipid core of biomembranes; however, detail molecular mechanisms of accumulating system of CoQ in mitochondria are still unknown. In the present study, we examined the cellular distribution of CoQ with different isoprenic side chain. At first, we developed the measurement system of short chain homolog of CoQ using HPLC system. Now we examined the cellular uptake and distribution of short chain homolog of CoQ.

## 1. 緒言

コエンザイム Q (以下 CoQ) は、ATP 合成に必須の分子であり、酸化型のユビキノール (UQ) と、その還元型であるユビキノール (UQH<sub>2</sub>) が存在する<sup>1)</sup>。さらに、UQH<sub>2</sub> は活性酸素を消去する抗酸化作用を持つことが知られている<sup>2)</sup>。CoQ のベンゾキノン環が酸化還元反応を担い、イソプレレン側鎖が生体膜内での分布に関与すると考えられている。ヒトでは、イソプレレン側鎖が 10 残基連なっている CoQ10 が主に存在し、ラットなどのげっ歯類では CoQ9 が存在する。CoQ10 は、生体内で合成される抗酸化物質の一つであり、主にミトコンドリアで生合成される<sup>3)</sup>。実際、ミトコンドリアでの含量が他の細胞内小器官に比べて多い。CoQ10 の生体内含量が加齢と共に減少することなどから、サプリメントとしての摂取が推奨されている。また化粧品にも多数含まれており、美肌効果や肌の若返り作用、抗酸化作用などが期待されている。しかしながら、CoQ10 の生理機能およびそのメカニズムについては、不明な点が多い。特に細胞内分布・細胞内小器官への移行メカニズムについては明らかになっていなかった。

筆者らは、これまで神経細胞のモデルである PC12 細胞を用いて、CoQ10 の生理機能・抗酸化作用について検討してきた。細胞外から添加した CoQ10 の細胞内分布を内在性の CoQ (ラット由来の PC12 細胞の場合、CoQ9 を生合

成する) と比較した結果、両者が類似の細胞内分布を示し、ミトコンドリア画分に多く含まれることを見いだした<sup>4)</sup>。この結果から、細胞外から添加した CoQ10 が未知のメカニズムによりミトコンドリアに選択的に蓄積する可能性が考えられた。

本研究では、側鎖構造の異なる CoQ を用いて検討を行い、ミトコンドリア移行に重要な化学構造を同定し、コスメトロジーの分野において期待される CoQ10 の機能発現に重要な化学構造を提示することを目的としている。

## 2. 実験

### 2.1. 細胞培養

ラット褐色細胞腫 PC12 細胞 (以下 PC12 細胞) は、10% 非働化ウシ胎児血清および 5% 非働化ウマ血清を含む DMEM/F12 Medium を用いて培養した。短鎖 CoQ (エタノール溶液) を終濃度 10  $\mu$ M 添加し、一定時間培養した細胞を各種実験に供した。実験に供した短鎖 CoQ (CoQ4 および CoQ7) は、神戸学院大学 薬学部 岡本教授から供与された。

### 2.2. 細胞分画

培養した細胞を回収して洗浄後、ホモジナイズバッファー (0.25M sucrose, 0.1mM EDTA, 0.7mM 2-mercaptoethanol を含む 50mM Tris-HCl, pH 7.4) に細胞を懸濁し、窒素破碎した。破碎後、500g で 10 分間、5000g で 10 分間、105,000g で 1 時間それぞれ遠心し、沈殿に核、ミトコンドリア、細胞膜を、上清に細胞質画分を得た。得られた各画分について、BCA protein assay kit (Pierce 社) を用い、ウシ血清アルブミンを標準物質としてタンパク量を測定した。さらに、各画分についてそれぞれのマーカー酵素である cytochrome c oxidase (ミトコンドリアマーカー)、NADPH-



Significance of translocation of coenzyme Q10 to mitochondria in its whitening and anti-aging effects

Yoshiro Saito

Faculty of Life and Medical Sciences,  
Doshisha University

cytochrome c reductase (ミクロソームマーカー)、と lactate dehydrogenase (細胞質マーカー) 活性を測定し、短鎖 CoQ の細胞内分布を見積もった。各々の測定方法については、文献5を参照。

### 2.3. CoQおよび $\alpha$ -トコフェロール( $\alpha$ T)の測定

細胞内CoQ及び $\alpha$ Tの測定は、電気化学的検出器(NANOSPACE SI-1, 資生堂, 700 mVの条件)を組み合わせた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて測定を行った<sup>6)</sup>。CoQは、細胞をPBSに懸濁し、メタノール/ヘキサン(1:5:10)と混合して、遠心後(15,000 rpm, 10分間)、上清のヘキサン層を分析サンプルとした。検討した溶媒中で、流速1 ml/min、C18カラム(LC8, 5 $\mu$ m, 250 $\times$ 4.6 mm, Sigma-Aldrich)で分離後、還元カラムでUQをUQH<sub>2</sub>に還元し、電気化学的検出器により検出した。 $\alpha$ Tの場合は、PBSに懸濁した細胞を、クロロフォルム/メタノール(1:2:1)と混合し、遠心後(15,000 rpm, 10分間)、下層のクロロフォルム層を分析サンプルとした。50 mM過塩素酸ナトリウムを含むmethanol/tert-butyl alcohol(95:5, v/v)を溶媒として用い、流速1 ml/min、C18カラム

(LC8, 5 $\mu$ m, 250 $\times$ 4.6 mm, Sigma-Aldrich)で分離後、電気化学的検出器により検出した。

## 3. 結果

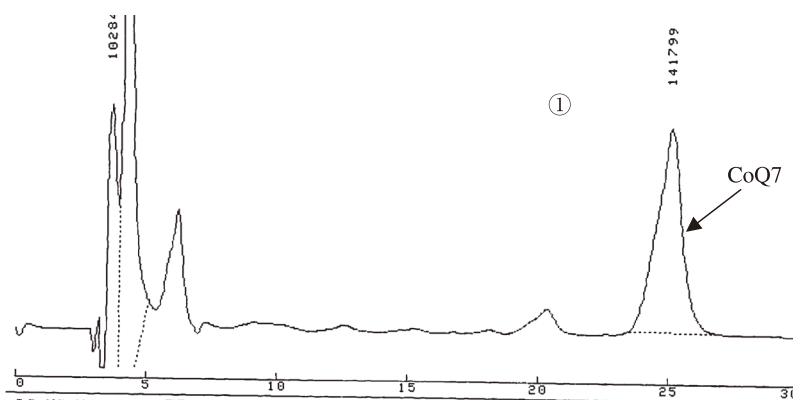
### 3.1. 短鎖 CoQ 測定条件の検討

まず、短鎖CoQを分離同定するため、電気化学的検出器を組み合わせたHPLCを用いて、種々の溶媒における分離条件を検討した。その結果、50 mM過塩素酸ナトリウムを含むmethanolの条件で、CoQ7が25分(図1A)に、CoQ4が7.5分(図1B)に溶出されることが分かった。CoQ9は、これまでに確立した50 mM過塩素酸ナトリウムを含むmethanol/tert-butyl alcohol(85:15, v/v)の条件で測定を行った。

### 3.2. CoQ7を用いた解析

10 $\mu$ M CoQ7で1時間反応した細胞の各画分について、CoQ9、CoQ7、 $\alpha$ -トコフェロール含量を測定した。これまでの結果から、CoQ9はミトコンドリア画分のマーカー酵素と類似の分布を、 $\alpha$ Tは膜画分のマーカー酵素と類似の分布を示すことがすでにわかっている<sup>3)</sup>。各々の測定値

A CoQ7のHPLC解析結果



B CoQ4のHPLC解析結果

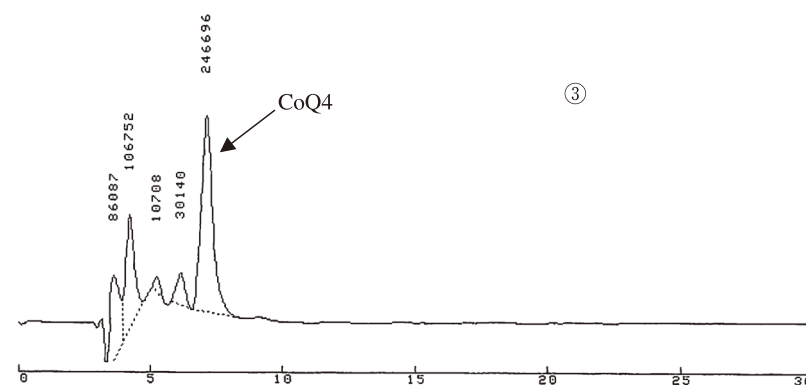


図1 短鎖 CoQ の HPLC 解析結果

を図2にまとめた。各々の面積が、核 (N)、ミトコンドリア (M)、細胞膜 (Mc)、細胞質 (C) への分布 (縦軸が各 CoQ の相対含量、横軸はタンパク質量を示す) を表している。この結果から、CoQ7 と内在性の CoQ9 の分布に類似性が認められた。一方、膜画分マーカーと類似の分布を示す  $\alpha$ T と比較して、CoQ7 の分布が異なっていることも確

認できた (図2)。以上の結果から、CoQ7 は、CoQ9 と同じくミトコンドリアに分布すると考えられた。

### 3.3. CoQ4 を用いた解析

CoQ7 と同様の解析を、CoQ4 でも行った。図3に得られた結果をまとめた。この結果から、CoQ4 は、内在性の

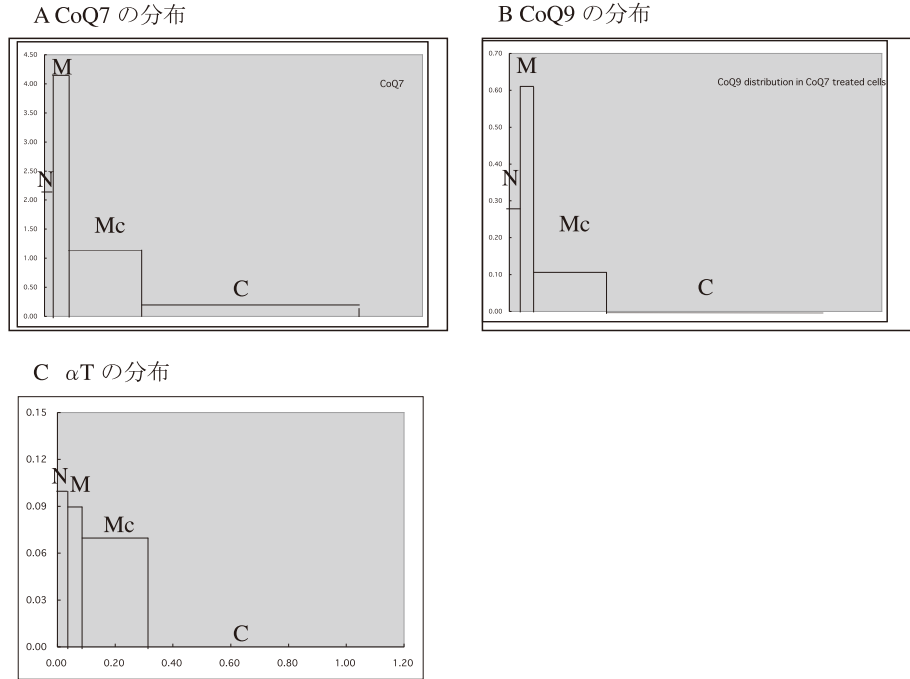


図2 CoQ7 処理細胞における CoQ7、CoQ9、 $\alpha$ T の細胞内分布  
各々の面積が、核 (N)、ミトコンドリア (M)、細胞膜 (Mc)、細胞質 (C) への分布 (縦軸が各化合物の相対含量、横軸はタンパク質量を示す) を現している。

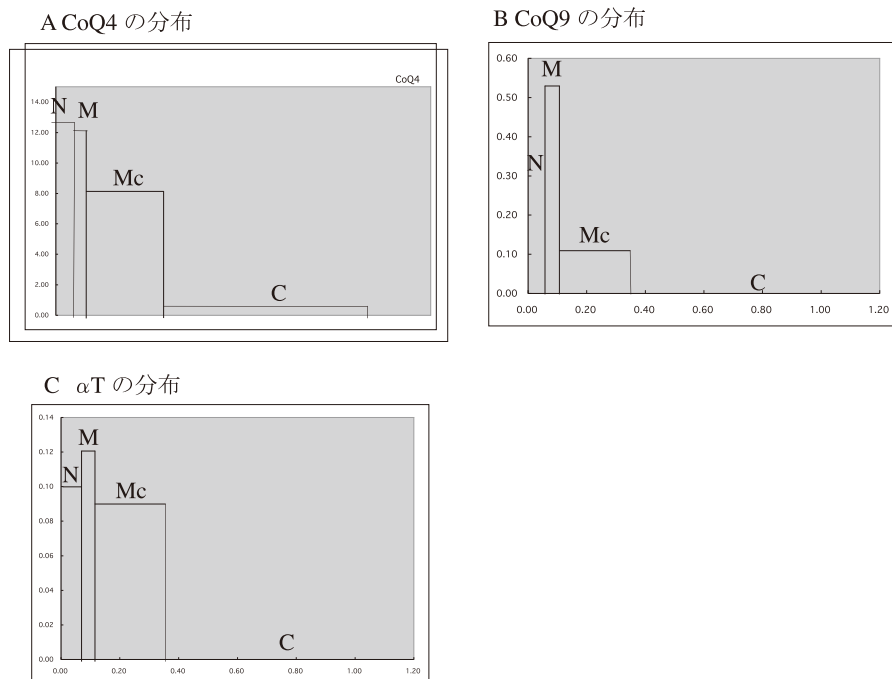


図3 CoQ4 処理細胞における CoQ4、CoQ9、 $\alpha$ T の細胞内分布

CoQ9とは異なり、膜画分へ多く分布する可能性が考えられた。同サンプル中の $\alpha$ Tの分布と比較すると、CoQ4の分布に類似性が認められる。これらの結果から、CoQ4の場合には、CoQ9やCoQ7とは異なる細胞分布を示すと考えられた。

#### 4. 考 察

以上の結果から、CoQがミトコンドリアに移行するために必要な側鎖の繰り返し、7では十分条件を満たしており、4より長い側鎖が必要であることが分かった。今後、CoQ5またはCoQ6で検討を行うことにより、ミトコンドリア移行に必要な化学構造が決定できると考えられる。また、CoQのミトコンドリア移行メカニズムが、細胞の種類の違いで変わるかという点も今後の課題である。

#### (文献)

- 1) Lenaz, G., Fato, R., Formiggini, G. et al. The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport. *Mitochondrion* **7 Suppl**, S8-33, 2007
- 2) Shi, H., Noguchi, N. and Niki, E. Comparative study on dynamics of antioxidative action of alpha-tocopheryl hydroquinone, ubiquinol, and alpha-tocopherol against lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 334-46, 1999
- 3) Fernandez-Ayala, D.J., Brea-Calvo, G., Lopez-Lluch, G., and Navas, P. Coenzyme Q distribution in HL-60 human cells depends on the endomembrane system. *Biochim. Biophys. Acta* **1713**, 129-37, 2005
- 4) Saito, Y., Fukuhara, A., Nishio, K. et al. Characterization of cellular uptake and distribution of coenzyme Q10 and vitamin E in PC12 cells. *J. Nutr. Biochem.*, **20**, 350-357, 2008
- 5) Saito, Y., Yoshida, Y., Nishio, K., Hayakawa, M., and Niki, E. Characterization of cellular uptake and distribution of vitamin E. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1031**, 368-75, 2004.
- 6) Yoshida, Y., Hayakawa, M., Habuchi, Y., and Niki, E. Evaluation of the dietary effects of coenzyme Q in vivo by the oxidative stress marker, hydroxyoctadecadienoic acid and its stereoisomer ratio. *Biochim. Biophys. Acta*, **1760**, 1558-68, 2006.