The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ラット肝細胞質新規ユビキノン還元酵素系の存在と，その生体内抗酸化系への関与に関する研究
Author(s)	高橋，隆幸
Citation	大阪大学，1996，博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3110189
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

ラット肝細胞質新規ユビキノン還元酵素系の存在と、その生体内抗酸化系への関与に関する研究

髙橋　隆幸

ラット肝細胞質新規ユビキノン還元酵素系の存在と、その生体内抗酸化系への関与に関する研究

髙橋　隆幸

目　次

緒論 …… 1

本論 …… 6

第一章　ラット生体内のユビキノンならびにユビキノール同族体の分布 …… 6

第一節　組織中のユビキノンならびにユビキノール同族体の分布 …… 6

第二節　肝臓および腎臓中のユビキノンならびにユビキノール同族体の分布 …… 9

第三節　血液成分中のユビキノンならびにユビキノール同族体の分布 …… 20

第四節　考察および小括 …… 22

第二章　ラット肝臓ユビキノン還元酵素系の検索 …… 26

第一節　ユビキノン還元酵素の肝臓内分布 …… 26

第二節　肝細胞質ユビキノン還元酵素と既知のキノン還元酵素との異同 …… 31

第三節　考察および小括 …… 43

第三章　ラット肝細胞質ユビキノン還元酵素の性質 …… 46

第一節　肝細胞質ユビキノン還元酵素活性測定条件の基礎的検討 …… 46

第二節　肝細胞質ユビキノン還元酵素の性質 …… 52

第三節　肝細胞質ユビキノン還元酵素によるユビキノン還元機構 …… 63

第四節　考察および小括 …… 66

第四章　ラット肝細胞質ユビキノン還元酵素による脂質膜内ユビキノンの還元 …… 69

第一節　肝細胞質ユビキノン還元酵素による脂質膜内ユビキノンの還元 …… 69

第二節　生体内ユビキノンの還元比率に対する細胞質ユビキノン還元酵素の影響 …… 74

第三節　考察および小括 …… 75

第五章　ラット肝細胞質ユビキノン還元酵素の脂質過酸化反応抑制効果 …… 78

第一節　細胞質ユビキノン還元酵素による 2,2'-Azobis (2,4-dimethyl-valeronitrile) 誘導 Liposomes 膜脂質過酸化反応の抑制 …… 79

第二節　細胞質ユビキノン還元酵素による2,2'-Azobis(2-amidino-propane) Dihydrochloride 誘導ミクロソーム膜脂質過酸化反応の抑制 …… 85

第三節　考察および小括 …… 89

第六章　ユビキノン-10 投与ラットにおける肝細胞質ユビキノン還元酵素活性の上昇と、四塩化炭素誘導肝炎抵抗性の増大 …… 93

第一節　ユビキノン-10 投与のラット肝臓内抗酸化系への影響 …… 93

第二節　ユビキノン-10 投与ラットの四塩化炭素誘導肝炎抵抗性増大と、その作用機序 …… 101

第三節　考察および小括 …… 113

第七章　総括 …… 117

第八章　結論 …… 123

謝辞 …… 124

引用文献 …… 125

緒　論

ユビキノン (Ubiquinon, UQ) は 2,3-Dimethoxy-5-methyl-6-multiprenyl-1,4-benzoquinone 構造を有する一連の化合物群の総称である。歴史的には、UQ は、1940 年 Moore & Rajagopal [1] が、ラット肝臓の脂質抽出画分から 275nm に吸収極大を示す物質として報告したのが最初である。その後、この物質は Morton らの研究グループ [2] により、ウマの腸粘膜の不ケン化性画分から単離された。一方、1957 年 Crane ら [3] は、呼吸酵素系の研究中に、ウシ心筋ミトコンドリアから呼吸鎖の電子伝達に不可欠なキノン化合物として Coenzyme Q を大量に単離した。1958 年に Coenzyme Q、次いで UQ の化学構造が決定され、両者が同一物質であることが判明した [4),5)]。自然界には、6 位のイソプレノイド側鎖の単位数 (*n*) により UQ-1 から UQ-13 の同族体が見出されている (Fig.1 左)。ヒトを始め多くの高等動物は UQ-10 を唯一の UQ 同族体として含むが、ラットのように主同族体の UQ-9 の他に、副次的同族体として UQ-10 を含むものもある [6]。

UQ はミトコンドリア内膜に存在する呼吸鎖 (電子伝達系) の必須構成成分であり、フラビン蛋白質の脱水素酵素群 (Complex I あるいは Complex II) から Cytochrome bc_1 複合体 (Complex III) への電子の伝達と、それと共役したプロトンの経膜移送に関与し、ミトコンドリア内膜の内外にプロトン勾配を形成して、物質代謝で得られた還元当量を ATP に転換する酸化的リン酸化機構の一部を担っている [7]。しかし、UQ はミトコンドリアだけでなく、ゴルジ体 [8),9)] やミクロソーム膜 [10] を初めとする各細胞内オルガ

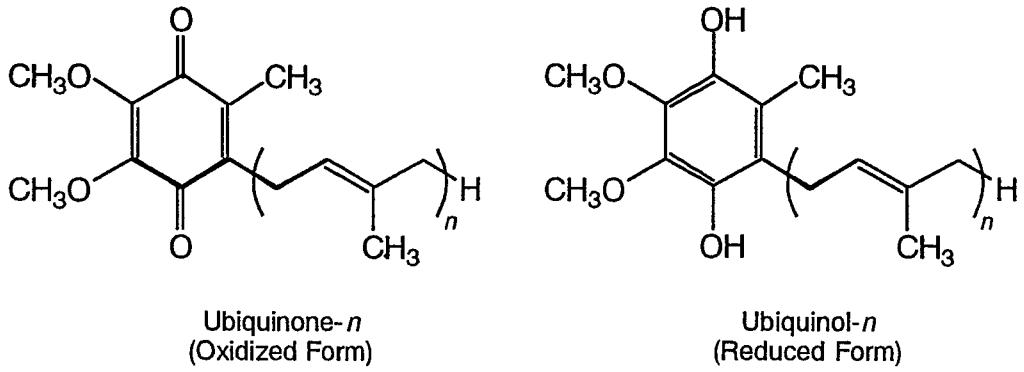


Fig.1　Chemical Structures of Oxidized and Reduced Forms of Ubiquinones

ネラ[11),12)]にも存在することが知られている。当初 UQ はミトコンドリア内膜で生合成されるものと考えられていたため、これらミトコンドリア外 UQ はミトコンドリア由来のものと考えられてきた。しかし、1987 年、Kalén ら[13)]は、UQ 合成活性がラット肝ミクロソーム膜画分にも存在することを発見し、UQ が必ずしもミトコンドリアだけで生合成されるのではない事を明らかにした。さらに、その後、細胞の分泌装置である小胞体 (ミクロソーム膜) ーゴルジ体システムばかりでなく、ペルオキシソーム以外の全ての細胞内オルガネラに、UQ 生合成の主要酵素である Nonaprenyl-4-hydroxybenzoate (NPHB) Transferase 活性が存在し、UQ 合成活性があることが明らかにされた[14)]。これらの事実から、個々の細胞内オルガネラに存在する UQ は、それぞれのオルガネラに存在する合成系により生合成されたものであると考えられている。しかもこれらオルガネラの UQ は、そのかなりの部分が酸化型 (キノン型) ではなく、還元型 (キノール型) のユビキノール (Ubiquinol, UQH_2) (Fig. 1 右) として存在することが指摘されている[15)]。しかしながら、これらミトコンドリア外に存在する UQ が、どのような生理的役割を担っているかは明らかでなく、多くの関心を集めている。

ミトコンドリア外 UQ の生理作用に関しては、すでに生体抗酸化系への関与、生体膜の流動性[16)]や Phospholipase 抵抗性[17)]の賦与、さらに、ゴルジ体[8)]や形質膜[18)]では、ミトコンドリアと同様に電子伝達体として機能している可能性が指摘されている。

UQ の抗酸化作用に関しては、1966年、Mellors & Tappel[19)]がミトコンドリア膜に対する UQH_2-6 の抗酸化作用を報告して以来、多くの検討がある。それらによれば、UQH_2 はミトコンドリア膜[20)-22)]だけでなく、他の細胞内オルガネラ膜[23)]や Liposomes 膜などの生体膜モデル[24)-26)]、低比重リポ蛋白質 (Low Density Lipoprotein, LDL)[27)-29)]等における脂質過酸化反応を防御すると報告されている。しかも、血漿 LDL などでの最近の検討では、UQH_2 が α-Tocopherol に匹敵する強い抗酸化作用を有することが認められている[25),27),28)]。また、UQH_2 は α-Tocopherol が共存する生体膜モデル系においては、脂質膜内に生じた脂質ラジカルを消去することによって生じた α-Tocopheroxyl ラジカルを、再び α-Tocopherol へ再生することにより、間接的に脂質過酸化反応を抑制す作用があることも報告されている[25),30),31)]。このように、*in vitro* における検討では、還元型の UQH_2 のみが抗酸化作用を有することが認められている。

一方、*in vivo* における検討では、酸化型の UQ もUQH_2 と同様に抗酸化効果のあることが確認されている。すなわち、UQ を動物に前投与することにより、薬物による

ラジカル性肝毒性[32)-34)]、臓器・組織の虚血・再環流障害[35)-37)]、エンドトキシンショック[38),39)]に伴う生体内脂質過酸化反応が有意に抑制され、障害が緩和されることが報告されている。この *in vitro* と *in vivo* における UQ の抗酸化能の違いは、酸化型の UQ を UQH_2 へ還元する機構が生体内に存在するとすれば容易に説明がつく。実際、UQ を動物に投与した場合、生体内に取り込まれた UQ のかなりの部分が UQH_2 となっていることが報告されている[40),41)]。また、血液中の UQ は、そのほとんどが UQH_2 として存在する[42)]が、その還元比率 [総ユビキノン (tUQ＝UQ と UQH_2 の和) 量に対する UQH_2 量の割合] は、UQ を動物に投与することにより、血中の UQ 量を増加させた場合でもほとんど変化しないと報告されている[43)]。これらの事実は、容易に UQ を UQH_2 に還元する機構が生体内に存在することを示唆する。

生体の UQ がミトコンドリア以外にも広く分布し、しかもその一部が強い抗酸化作用を有する UQH_2 であることは、上述のように生体抗酸化系の一端を担っているとすれば、生理的必然性があるように思われる。しかしながら、それを支える UQ 還元の機構については、これまで十分理解されていない。ミトコンドリアの呼吸鎖は、UQ の酸化還元を行っているが、他のオルガネラの UQ 還元にも関与していると考えるのは、細胞構造を考えると無理がある。したがって、UQH_2 が生体内で抗酸化剤として働いているか否かは、ミトコンドリア以外にも有効な UQ 還元系が存在するかどうかによって明確になると思われる。

そこで、著者はミトコンドリア外 UQ の生理作用を解明する研究の一端として、ラット組織や細胞内における UQ 同族体と UQH_2 同族体の分布 (第一章) ならびに UQ 還元酵素活性の分布 を詳細に調べた (第二章)。その結果、臓器・組織の UQ の還元比率は、著者が見出した細胞質の新規の NADPH 依存性 UQ 還元酵素活性と相関することを認めた。そこで、この細胞質 UQ 還元酵素の諸性質を明らかにしたところ (第三章)、組織内の UQ 還元とその還元比率の維持に対して中心的な役割を持つことを認めた (第四章)。さらに、本酵素は、細胞内オルガネラ膜の UQ 還元と共役して脂質過酸化に対する防御機構を構成していることを見い出した (第五章, 第六章) ので、以下に詳述する。

なお、本文中では以下の略語を用いた。

AAPH	:	2,2'-Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochloride
ADP	:	Adenosine 5'-diphosphate
2',5'-ADP	:	Adenosine 2',5'-diphosphate
AMP	:	Adenosine 5'-monophosphate
AMVN	:	2,2'-Azobis(2,4-dimethylvaleronitrile)
ATP	:	Adenosine Triphosphate
BHT	:	Butylated Hydroxytoluene
BSA	:	Bovine Serum Albumin
$\cdot CCl_3$	:	Trichloromethyl Radical
$CCl_3OO\cdot$	:	Trichloromethylperoxy Radical
CCl_4	:	四塩化炭素
Cu^{2+},Zn^{2+}-SOD	:	Cu^{2+},Zn^{2+}-containing Superoxide Dismutase
DCPIP	:	2,6-Dichlorophenolindophenol
ECD	:	Electrochemical Detection
EDTA	:	Ethylenediaminetetraacetic Acid
FAD	:	Flavin Adenine Dinucleotide
FMN	:	Flavin Mononucleotide
GSH	:	還元型 Glutathione
GSSG	:	酸化型 Glutathione
H_2O_2	:	過酸化水素
HPLC	:	High Performance Liquid Chromatography
K-Pi	:	Potassium Phosphate
LDH	:	Lactate Dehydrogenase
LDL	:	Low Density Lipoprotein
LH	:	(不飽和脂肪酸含有) 脂質
L•	:	脂質ラジカル
LOO•	:	脂質ペルオキシラジカル
LOOH	:	脂質ペルオキシド
MDA	:	Malondialdehyde

Mg^{2+}-ATPase	:	Na^+, K^+-insensitive Mg^{2+}-ATPase
Mn^{2+}-SOD	:	Mn^{2+}-containing Superoxide Dismutase
Na^+-K^+-ATPase	:	Na^+, K^+-sensitive Mg^{2+}-ATPase
NAD^+	:	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Oxidized Form)
NADH	:	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Reduced Form)
$NADP^+$	:	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (Oxidized Form)
NADPH	:	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (Reduced Form)
NADH-UQ Reductase	:	NADH-dependent Ubiquinone Reductase
NADPH-UQ Reductase	:	NADPH-dependent Ubiquinone Reductase
NMN	:	Nicotinamide Mononucleotide
NMNH	:	Nicotinamide Mononucleotide (Reduced Form)
NPHB	:	Nonaprenyl-4-hydroxybenzoate
$O_2^{\cdot-}$	:	Superoxide Anion
$\cdot OH$	:	Hydroxyl Radical
RNA	:	Ribonucleic Acid
SPF	:	Specific Pathogen Free
SH	:	Thiol
SOD	:	Superoxide Dismutase
TBARS	:	Thiobarbituric Acid 反応物質
α-Toc-O•	:	α-Tocopheroxyl Radical
tUQ-*n*	:	ユビキノン-*n* + ユビキノール-*n* (*n*=1～13)
UQ-*n*	:	ユビキノン-*n* (*n*=1～13)
UQH_2-*n*	:	ユビキノール-*n* (*n*=1～13)
UQH•-*n*	:	ユビセミキノンラジカル-*n* (*n*=1～13)

本　論

第一章　ラット生体内のユビキノンならびにユビキノール同族体の分布

UQ の研究は、長い間、主にミトコンドリア呼吸鎖における電子伝達体としての働きが中心であった[7]。そのため、UQ はゴルジ体[8,9]やミクロソーム膜[10]を初めとするミトコンドリア以外の細胞画分[11,12]にも存在することが 1960 年代から 1970 年代初めにかけて既に報告されていたが、測定法の信頼性の問題もあり、これはミトコンドリア由来のものと考えられ、それほど関心が持たれなかった。ところが High Performance Liquid Chromatography (HPLC) の登場により、微量な生体内物質の分離・検出・定量が可能となったことから、UQ は細胞膜をも含めたあらゆる細胞内オルガネラ[8,13]や血漿中[44]に存在するとした確かな報告が相次いでなされるようになってきた。1990 年、Kalén ら[14]により、細胞の分泌装置である小胞体－ゴルジ体システムやペルオキシソーム以外のあらゆる細胞画分に、UQ 合成の主要酵素である NPHB Transferase 活性と UQ 合成活性が確認されたことから、その生理的意義が注目を集めるようになった。生体内の UQ の一部は、常に還元型の UQH_2 であることが明らかにされている[15,41,45,46]が、分析方法等に問題のある報告もあり、生体におけるミトコンドリア外 UQ の存在意義とその生理作用を明らかとするためには、UQ の生体内分布と酸化・還元レベルについて、一定の方法で系統的に詳しく検討することが不可欠であると考えた。そこで、まず最初にラット生体内における UQ の分布とその酸化還元レベルについて検討することにした。

第一節　組織中のユビキノンならびにユビキノール同族体の分布

UQ 同族体の生体内における分布は、紫外部検出法[47,48]、HPLC-UV 法[44]や HPLC-Mass Spectrometry 法[49]などを用いてかなり調べられているが、同時に UQH_2 同族体の生体内における分布やその酸化・還元レベルまで含めて調べた報告[42]は少ない。そこでまず初めに、ラットの各組織における UQ 同族体の分布とその酸化・還元レベルについて、HPLC を用いて検討することにした。

実験方法

(1) 実験動物および飼育条件：

8 週齢 (170～180 g) のWistar 系雄性ラット (Specific Pathogen Free (SPF) 動物, 日本エスエルシー株式会社) を用い、実験開始まで室温 21 ± 1 ℃、湿度 55 ± 5%の恒温・恒湿の施設中で12 時間サイクルの照明下飼育を行った。固形食（ラボMRストック，日本エスエルシー株式会社）および水（滅菌精製水）は自由摂取とし、実験開始 24 時間前に絶食させた。

(2) 組織ホモジネートの調製：

Ether 麻酔したラットの右大腿静脈より Heparin (1,000 U/ml) 0.2 ml を投与した後開腹し、腹大動脈を切断して脱血死させた。摘出した各組織を速やかに冷生理食塩水で洗浄した後、湿重量の 4 倍量 (v/w) の 0.25M Sucrose と 1mM Ethylenediaminetetraacetate (EDTA) を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) を添加した。次にこれら各組織をハサミで細片にした後、テフロンホモジナイザーを用いて各組織ホモジネートを作成した。得られた各組織ホモジネートは、2 枚重ねたガーゼで濾過した後、実験に用いた。組織摘出後の操作はすべて氷冷下 (4 ℃) で行った。

(3) 血漿の調製：

ラットを Ether 麻酔下開腹し、シリコンチューブ (4 mm I.D. x 100 mm) の一端に注射針 (21G, テルモ) を取り付けた自作採血器を腹大動脈に穿刺して、シリコンチューブを通って流れ出る血液を、Heparin の入った真空採血管（テルモ）に採取した。さらに、得られた血液を 4 ℃で 1,500 x *g*, 10 分間遠心して血漿を得た。

(4) UQ および UQH_2 同族体の抽出ならびに定量：

褐色スピッツ管に組織ホモジネートあるいは血漿, 100 μl と 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4), 400 μl、Ethanol, 2 ml、*n*-Hexane, 5ml を加え、80 rpm, 10 分間機械振とうすることにより、組織中の UQ ならびに UQH_2 同族体を抽出した。次いで 1,500 x *g*, 10分間遠心し、上層の *n*-Hexane 層を、別の褐色スピッツ管に分取し、窒素気流下、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を減圧・留去した。残査に 50～500 μl の Ethanol を正確に加え、HPLC の試料とした。試料中の UQ および UQH_2 同族体の検出・定量は、Okamoto らの方法 [42] を用いた。装置および

HPLC 条件は以下に示した通りである。

装置：

Pump　　: Shimazu LC-3A （島津製作所）

Detector　　: Irica E-502 Amperometric Detector (Irica)

HPLC 条件：

Column　　: Finepak SIL $C_{18\text{-}5}$ (4.6 mm I.D. x 250 mm, 日本分光)

Mobile Phase　: 50mM $NaClO_4$ を含む $C_2H_5OH/CH_3OH/CH_3CN/70\%$ $HClO_4$ (400 : 300 : 300 : 1, v/v/v/v)

Flow Rate　　: 1 ml/min

Detection　　: 電気化学検出器 (Electrochemical Detection, ECD)
(Applied Potential = +0.6 V vs Ag/AgCl, Sensitivity = 8 nA)

(5) 蛋白質量の定量：

Lowry らの方法[50] を用いて定量した。蛋白質量は既知量の Bovine Serum Albumin (BAS) (Fraction Ⅴ, Sigma) を用いて作成した検量線より算出した。

実験結果

ラットの各組織は全て UQ 同族体を含み、しかも主 UQ 同族体の tUQ-9 の他、そのおよそ 11～52% 量の tUQ-10 を含むことを認めた (Table 1)。これら UQ 同族体の一部は還元型の UQH_2 同族体として検出されたため、各組織における UQ 同族体の還元比率を調べたところ、同一組織中の tUQ-9 と tUQ-10 の還元比率の間に差は認められなかった。しかし、組織間で比較すると、その還元比率は、血漿と肝臓では 70% から 80%、心臓, 腎臓, 脾臓では 10% から 30% と、組織により大いに異なることが認められた。なお、tUQ の抽出操作は、各組織のホモジネート調製後直ちに行っており (組織摘出後 10 分以内)、この組織間の還元比率の違いは、抽出操作中の UQH_2 の酸化のためでないことは、UQH_2 の添加・回収実験でも確かめられた。以上から、ラットの各組織は同族体として UQ-9 と UQ-10 を含み、その一部は UQH_2 の形で存在すること、しかも、その還元比率は同じ個体内でも個々の組織により異なることが明らかとなった。

Table 1

Distribution of Ubiquinone and Ubiquinol Homologues in Rat Tissues

Tissues	Rats	UQ-9 Contents [a]		Redox Ratios	UQ-10 Contents [a]		Redox Ratios
	(n)	tUQ [b]	UQH_2	of tUQ-9 [c] (%)	tUQ [b]	UQH_2	of tUQ-10 [c] (%)
Plasma	8	0.48±0.01	0.39±0.02	82.1±7.3	0.12±0.01	0.09±0.01	75.9±8.5
Liver	7	105.1±2.3	78.0±3.8	74.5±10.5	18.8±1.1	12.7±1.0	67.4±5.1
Heart	5	188.4±5.8	17.4±0.4	9.3±0.7	21.6±0.6	1.88±0.05	8.8±0.8
Kidney	4	122.6±3.6	19.9±0.9	16.2±2.8	31.8±0.9	4.89±0.09	15.3±2.8
Spleen	4	75.9±3.2	22.4±0.8	29.8±3.9	39.6±1.0	9.77±0.23	24.7±0.7

The values are the means ± SE of the number of rats listed.

a) The values are defined as μg/ml plasma or μg/g wet tissues.

b) The sum of oxidized and reduced forms of UQ of each of the homologues.

c) (UQH_2/tUQ) x 100.

第二節　肝臓および腎臓中のユビキノンならびにユビキノール同族体の分布

前節で、ラット組織中の UQ ならびに UQH_2 同族体の分布を調べたところ、血漿や肝臓のように tUQ の還元比率が 70% から 80% と高い組織と、心臓、腎臓、脾臓のように 10% から 30% と低い組織があった。そこで、還元比率の高い肝臓と低い腎臓について、UQ ならびに UQH_2 同族体の細胞内分布とその還元比率を調べることにした。

実験方法

(1)　実験動物：

第一節、実験方法(1)と同様、8 週齢 (170～180 g) の Wistar 系雄性ラット (SPF 動物, 日本エスエルシー株式会社) を用いた。

(2)　細胞画分の調製：

①　粗細胞画分の調製：

ラットを Ether 麻酔下開腹し、腹大動脈を切断することにより脱血死させた。次に、腎臓はそのまま、肝臓は門脈より生理食塩水 20 ml を環流させ、脱血した後摘出し、それぞれ速やかに湿重量の 4 倍量 (v/w) の 0.25M Sucrose と 1mM EDTA を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) を添加してハサミで細片にした後、

テフロンホモジナイザーを用いてホモジネートにした。ホモジネートは2枚重ねたガーゼで濾過した後、速やかにHogeboomの段階的遠心分画法[51]により、粗核画分(600 x *g*, 10分の遠心沈殿画分)、ミトコンドリア画分(6,500 x *g*, 20分の遠心沈殿画分)、粗リソソーム画分(10,000 x *g*, 15分の遠心沈殿画分)、粗ミクロソーム膜画分(105,000 x *g*, 60分の遠心沈殿画分)、細胞質(105,000 x *g*, 60分の遠心上清画分)に分画した。この分画操作において、上清画分と沈殿画分の境界部はできる限り多めに捨てた後、次の操作に移るようにした。各画分は0.25M Sucroseと1mM EDTAを含む50mM Tris-HCl緩衝液(pH7.4)で3回洗浄し、後述の方法でさらに分画した。なお、操作はすべて氷冷下(4℃)で行った。

② 精製核画分の調製：

上記①の操作で得た粗核画分を0.25M Sucrose, 25mM KCl, 5mM $MgCl_2$を含む50mM Tris-HCl緩衝液(pH7.4)で3回洗浄し、同緩衝液に再懸濁した後、Blobel & Potterの方法[52]に従い精製核画分を調製した。得られた精製核画分は、適当量の0.25M Sucroseと1mM EDTAを含む50mM Tris-HCl緩衝液(pH7.4)に懸濁して用いた。操作はすべて氷冷下(4℃)で行った。

③ 核小体、核小体外画分およびNucleolar wash画分の調製：

上記②の操作で得た精製核画分より、Muramatsu & Buschの方法[53]に従い、核小体、核小体外画分およびNucleolar wash画分を調製した。得られた核小体画分は、適当量の0.25M Sucroseと1mM EDTAを含む50mM Tris-HCl緩衝液(pH7.4)に懸濁して用いた。一方、核小体外画分およびNucleolar wash画分は、そのまま用いた。操作はすべて氷冷下(4℃)で行った。

④ ミトコンドリア内膜、ミトコンドリア外膜、マトリックスおよびIntermembrane Space画分の調製：

上記①の操作で得たミトコンドリア画分を10mM Tris-HCl緩衝液(pH7.4)に懸濁した後、Sottacasaらの方法[54]に従い、ミトコンドリア内膜、ミトコンドリア外膜、マトリックスおよびIntermembrane Space画分を調製した。得られたミトコンドリア内膜画分およびミトコンドリア外膜画分は、それぞれ適当量の0.25M Sucroseと1mM EDTAを含む50mM Tris-HCl緩衝液(pH7.4)に懸濁して用いた。一方、マトリックスおよびIntermembrane Space画分は、そのまま用いた。操作はすべて氷冷下(4℃)で行った。

⑤ 精製リソソーム画分の調製：

上記①の操作で得た粗リソソーム画分を 0.25M Sucrose で 2 回洗浄し、得られた沈殿画分を出発肝湿重量 3 g あたり 1 ml の 0.25M Sucrose に懸濁した後、Wattiaux らの方法[55]に従い、Ly-1, Ly-2, Ly-3 および Ly-4 画分を調製した。得られた Ly-1, Ly-2, Ly-3 および Ly-4 画分は、それぞれ適当量の 0.25M Sucrose と 1mM EDTA を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) に懸濁して用いた。操作はすべて氷冷下 (4 ℃) で行った。

⑥ ゴルジ体画分の調製：

Ehrenreich らの方法[56]に従い、8 週齢 (170～180 g) の Wistar 系雄性ラット (SPF 動物, 日本エスエルシー株式会社) の肝臓より、GF_1 画分 (Light Fraction)、GF_2 画分 (Intermediate Fraction) および GF_3 画分 (Heavy Fraction) からなる 3 つのゴルジ体画分を調製した。得られたゴルジ体画分は、それぞれ適当量の 0.25M Sucrose と 1mM EDTA を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) に懸濁して用いた。操作はすべて氷冷下 (4 ℃) で行った。

⑦ 粗面ミクロソーム膜および滑面ミクロソーム膜画分の調製：

上記①の操作で得た粗ミクロソーム画分を 0.25M Sucrose 溶液に懸濁し、2M Sucrose 溶液で終濃度 1.15M Sucrose となるよう調整した後、Ikehara & Pitot の方法[57]に従い、粗面ミクロソーム膜および滑面ミクロソーム膜画分を調製した。得られた滑面ミクロソーム膜および粗面ミクロソーム膜画分は、それぞれ適当量の 0.25M Sucrose と 1mM EDTA を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) に懸濁して用いた。操作はすべて氷冷下 (4 ℃) で行った。

⑧ 細胞膜画分の調製：

Koizumi らの方法[58]に従い、8 週齢 (170～180 g) の Wistar 系雄性ラット (SPF 動物, 日本エスエルシー株式会社) の肝臓より細胞膜画分を調製した。得られた細胞膜画分は、適当量の 0.25M Sucrose と 1mM EDTA を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) に懸濁して用いた。操作はすべて氷冷下 (4 ℃) で行った。

(3) 酵素活性測定法

① Succinate-cytochrome *c* Reductase 活性測定法：

Succinate-cytochrome *c* Reductase 活性は、Tisdale の方法[59]を用いて測定した。各細胞画分の Succinate-cytochrome *c* Reductase 活性は、Tisdale の

示した測定条件下、1分間あたり各細胞画分の蛋白質 1 mg が還元する Cytochrome *c* 量 (nmol/min/mg protein) として示した。

② Monoamine Oxidase 活性測定法：

Monoamine Oxidase (EC 1. 4. 3. 4) 活性は、Nagatsu の方法[60]を用いて測定した。各細胞画分の Monoamine Oxidase 活性は、Nagatsu の示した測定条件下、1分間あたり各細胞画分の蛋白質 1 mg により生成する 4-Hydroxyquinoline 量 (nmol/min/mg protein) として示した。

③ Acid Phosphatase 活性測定法：

Acid Phosphatase (EC 3. 1. 3. 2) 活性は、Walter & Schütt の方法[61]を用いて測定した。各細胞画分の Acid Phosphatase 活性は、Walter & Schütt の示した測定条件下、1分間あたり各細胞画分の蛋白質 1 mg が酸性条件 (pH4.8) 下、加水分解する 4-Nitrophenylphosphate 量 (nmol/min/mg protein) として示した。

④ Catalase 活性測定法：

Catalase (EC 1. 11. 1. 6) 活性は、Baudhuin らの方法[62]を用いて測定した。各細胞画分の Catalase 活性は、Baudhuin らの示した測定条件下、1分間に H_2O_2 を 90% 消去する酵素量を 1 unit と定義し、各細胞画分の蛋白質 1 mg あたりの活性 (unit/mg protein) として示した。

⑤ NADPH-cytochrome Reductase 活性測定法：

吸光度測定用キュベットに、0.1M NaN_3, 150 μl、1% Cytochrome *c*, 150 μl、0.2M K-Pi 緩衝液 (pH7.5), 300 μl と適当量の各細胞画分を入れ、蒸留水で 1.2 ml に調整した。37 ℃で 2 分間保温した後、0.05% Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (Reduced Form) (NADPH), 200 μl を添加し、波長 550 nm における吸光度変化を 37 ℃で 3 分間連続的に測定した。各細胞画分の NADPH-cytochrome Reductase (EC 1. 6. 2. 4) 活性は、550 nm における Cytochrome *c* のモル吸光係数 $18.5 \times 10^3\ M^{-1}cm^{-1}$ を用い、1分間あたり各細胞画分の蛋白質 1 mg が還元する Cytochrome *c* 量 (nmol/min/mg protein) として示した。

⑥ Lactate Dehydrogenase 活性測定法：

Lactate Dehydrogenase (LDH, EC 1. 1. 1. 27) 活性は、Bergmeyer & Bernt の方法[63]を用いて測定した。各細胞画分の LDH 活性は、Bergmeyer & Bernt の

示した測定条件下、1分間あたり340 nmにおける吸光度を1変化させる酵素量を1 unitと定義し、各細胞画分の蛋白質1 mgあたりの活性(unit/mg protein)として示した。

⑦ ATPase活性測定法：

Na^+, K^+-insensitive ATPase (Mg^{2+}-ATPase, EC 3. 6. 1. 3)活性ならびにNa^+, K^+-sensitive ATPase (Na^+-K^+-ATPase, EC 3. 6. 1. 3)活性は、Komatsu & Fujiiの方法[64]を用いて測定した。各細胞画分のMg^{2+}-ATPase活性ならびにNa^+-K^+-ATPase活性は、Komatsu & Fujiiの示した測定条件下、1時間あたり各細胞画分の蛋白質1 mgがATPを分解することにより遊離した無機リン酸量(nmol/h/mg protein)として示した。

(4) 無機リン酸量の定量：

無機リン酸量は、Fiske & Subbarowの方法[65]を用いて定量した。試料中の無機リン酸量は、既知量のKH_2PO_4を用いて作成した検量線より算出した。

(5) Ribonucleic Acid含量測定法：

Ribonucleic Acid (RNA)含量は、Le Pecq & Paolettiの方法[66]を用いて測定した。各細胞画分のRNA含量は、Calf Liver RNA (Type Ⅳ, Sigma)を用いて作成した検量線より算出し、各細胞画分の蛋白質1 mgあたりのRNAの量(ng/mg protein)として示した。

(6) UQおよびUQH_2同族体の抽出ならびに定量：

第一節、実験方法(4)に従い行った。

(7) 蛋白質量の定量：

第一節、実験方法(5)に従い定量した。

実験結果

(1) 肝臓および腎臓細胞内のUQならびにUQH_2同族体の分布

UQならびにUQH_2同族体の細胞内分布を調べるにあたり、実験に用いた各粗細胞画分中への他画分の混入の程度を各画分に局在する酵素(マーカー酵素)活性を指標に検定した。肝臓の各細胞画分におけるマーカー酵素活性はTable 2に、また腎臓におけるマーカー酵素活性の分布はTable 3に示した。各細胞画分の純度は、UQなら

びに UQH_2 同族体含量の比較に十分使えると判断された。

Table 2

Distribution of Marker Enzyme Activities in Intracellular Fractions of Rat Liver

Intracellular Fractions	Succinate-cytochrome c Reductase	Acid Phosphatase	NADPH-cytochrome Reductase	LDH	Mg^{2+}-ATPase	Na^{+}-K^{+}-ATPase
Nuclei	7.1±4.7	1.4±0.2	11.8±3.9	2.1±1.4	5.9±2.1	4.1±4.3
Mitochondria	100	9.0±1.5	33.3±17.6	2.8±2.4	15.3±8.0	4.8±6.5
Crude Lysosomes	6.4±3.4	100	29.7±8.0	2.1±1.4	11.1±0.4	9.7±4.2
Crude Microsomes	1.2±0.7	4.2±3.6	100	1.4±0.7	3.5±1.4	0.3±0.4
Cytosol	1.3±0.9	1.9±1.2	6.0±2.2	100	1.0±0.3	5.6±7.9
Plasma Membranes	9.2±1.6	4.3±2.0	25.4±1.9	0.7±0.0	100	100

The values are the means ± SE of four rats and are defined as 100% of relative enzyme activity of each enzyme.

The specific activities of marker enzymes in liver were as follows: 157 ± 22 nmol/min/mg protein for succinate-cytochrome c reductase activity in mitochondria; 745 ± 26 nmol/min/mg protein for acid phosphatase activity in crude lysosomes; 51 ± 5 nmol/min/mg protein for NADPH-cytochrome reductase activity in crude microsomes; 14.1 ±0.1 units/mg protein for LDH in cytosol; 28.7 ±1.7 and 4.10 ± 0.65 μmol phosphate released/mg protein/h for Mg^{2+}-ATPase activity and Na^{+}-K^{+}-ATPase activity in plasma membranes, respectively.

Table 3

Distribution of Marker Enzyme Activities in Intracellular Fractions of Rat Kidney

Intracellular Fractions	Succinate-cytochrome c Reductase	Acid Phosphatase	NADPH-cytochrome Reductase	LDH
Nuclei	34.0±13.7	16.6±4.7	6.9±4.9	5.4±2.9
Mitochondria	100	26.7±1.6	12.7±6.2	4.0±2.2
Crude Lysosomes	15.6±7.2	100	36.1±18.4	2.6±1.7
Crude Microsomes	8.5±2.7	9.9±2.3	100	6.4±3.3
Cytosol	3.7±2.6	3.3±3.0	11.8±5.5	100

The values are the means ± SE of three rats and are defined as 100% of relative enzyme activity of each enzyme.

The specific activities of marker enzymes in liver were as follows: 22.8 ± 3.6 nmol/min/mg protein for succinate-cytochrome c reductase activity in mitochondria; 12.8 ±3.3 nmol/min/mg protein for acid phosphatase activity in crude lysosomes; 13.3 ± 0.6 nmol/min/mg protein for NADPH-cytochrome reductase activity in crude microsomes; 6.72± 3.23 units/mg protein for LDH in cytosol.

ラット組織のうち、還元比率の高かった肝細胞の UQ ならびに UQH_2 同族体の分布は Table 4 に示した。肝細胞の各画分中には、いずれにも tUQ-9 の他、その約 10～20% 量の tUQ-10 が含まれていた。また、これら UQ 同族体の還元型もミトコンドリアは勿論のこと、全ての細胞画分に存在した。その還元比率はどの細胞画分の場合も肝臓ホモジネートとほぼ同じで、60～80% であった。また、各細胞画分の tUQ-9 と tUQ-10 の還元比率に差は認められなかった。各細胞画分の UQ 同族体は、ミトコンドリアのマーカー酵素である Succinate-cytochrome *c* Reductase 活性の分布で見る限り、ミトコンドリアの混入によるものとは考えられず、これまで報告されてきたように [8)-15),41)42)45)46)]、ミトコンドリア以外の細胞画分にも広く存在していることが確認された。なお、細胞膜画分にはミトコンドリア画分に匹敵する高濃度の tUQ 同族体が存在しているにもかかわらず、その還元比率が約 30% と著しく低いのは、細胞膜画分を調製する際の長い操作時間の間に、UQH_2 同族体が UQ 同族体へ酸化されたためと思われる。

Table 4

Distribution of Ubiquinone and Ubiquinol Homologues in Rat Liver Intracellular Fractions

Intracellular Fractions	Rats (n)	UQ-9 Contents (ng/mg protein)		Redox Ratios of tUQ-9 [b)]	UQ-10 Contents (ng/mg protein)		Redox Ratios of tUQ-10 [b)]
		tUQ [a)]	UQH_2	(%)	tUQ [a)]	UQH_2	(%)
Homogenate	7	279±25	224±22	80±3	31.0±6.9	24.1±7.0	80±7
Nuclei	11	322±104	219±66	67±6	31.7±10.8	22.2±7.8	69±5
Mitochondria	11	1,780±370	1,280±270	73±7	218±63	162±51	74±7
Crude Lysosomes	11	447±80	308±64	67±10	83.3±23.3	51.5±11.5	63±9
Crude Microsomes	11	121±41	83±31	69±7	17.7±3.4	11.8±3.0	66±9
Cytosol	11	21.3±5.7	16.9±5.3	74±7	2.37±1.11	1.53±0.58	72±5
Plasma Membranes	4	1,550±170	510±100	33±3	235±79	71±28	30±7

The values are the means ± SE of the number of rats listed.

a) The sum of oxidized and reduced forms of UQ of each of the homologues.

b) $(UQH_2/tUQ) \times 100$.

また、還元比率の低かったラット腎細胞のUQならびにUQH$_2$同族体の分布はTable 5に示した。肝臓の場合と同様、腎臓においてもtUQ-9の他、その約10～45%量のtUQ-10があらゆる細胞画分に認められた。また、各画分のtUQ同族体の還元比率は、腎臓ホモジネートの還元比率とほぼ等しく、23～27%であった。しかも肝臓と同様、各細胞画分のtUQ-9とtUQ-10の還元比率に差は認められなかった。

Table 5

Distribution of Ubiquinone and Ubiquinol Homologues in Rat Kidney Intracellular Fractions

Intracellular Fractions	UQ-9 Contents (ng/mg protein)		Redox Ratios of tUQ-9 [b)]	UQ-10 Contents (ng/mg protein)		Redox Ratios of tUQ-10 [b)]
	tUQ [a)]	UQH$_2$	(%)	tUQ [a)]	UQH$_2$	(%)
Homogenate	755±162	211±98	29±8	86.2±18.9	25.0±10.3	28±7
Nuclei	700±171	124±48	23±2	83.5±59.8	24.4±18.8	24±4
Mitochondria	901±89	232±19	26±1	98.3±53.5	25.3±12.8	27±2
Crude Lysosomes	478±301	150±74	25±3	69.0±7.9	16.1±1.4	24±3
Crude Microsomes	197±113	58±28	24±1	88.3±54.7	22.2±14.0	25±3
Cytosol	52.1±38.9	15.2±7.7	27±3	5.20±0.94	1.45±0.41	27±3

The values are the means ± SE of three rats.

a) The sum of oxidized and reduced forms of UQ of each of the homologues.

b) (UQH$_2$/tUQ) x 100.

(2) 肝細胞オルガネラ内のUQならびにUQH$_2$同族体の分布

UQ同族体の細胞内における局在をさらに詳しく知るため、ラット肝粗細胞内画分をさらに細かく分画し、UQならびにUQH$_2$同族体含量を調べた。

① 核画分中の分布

核画分を、さらに核小体画分、Nucleolar Wash画分および核小体外画分に分画し、UQ含量を測定した。結果はTable 6に示した。なお、UQH$_2$同族体は、複雑な分画操作中に低下することが認められたので測定を省略した。これらの画分中には、いずれもtUQ-9の他、その約9～13%量のtUQ-10が見出された。なお、核画分へのミトコンドリアの混入は、ミトコンドリアのマーカー酵素,

Succinate-cytochrome *c* Reductase 活性の分布から、約 7% と見積もられた (Table 2 参照)。したがって、これら画分に存在する UQ 同族体は、ミトコンドリアの混入では説明できず、核内の各画分にも UQ 同族体が存在することが明らかになった。

Table 6
Distribution of Ubiquinone Homologues in Rat Liver Nuclear Fractions

Intracellular Fractions	tUQ-9 [a] (ng/mg protein)	tUQ-10 [a] (ng/mg protein)
Nuclei	302±132	34.1±14.6
Nucleoli	518±216	50.1±26.6
Nucleolar Wash	609±204	54.0±23.9
Extranucleolar Fraction	245±62	32.2±9.1

The values are the means ± SE of seven rats.
[a] The sum of oxidized and reduced forms of UQ of each of the homologues.

② ミトコンドリア画分中の分布

ミトコンドリア画分を、さらにミトコンドリア内膜画分、ミトコンドリア外膜画分、マトリックス画分および Intermembrane Space 画分に分画し、UQ 同族体含量を測定した。結果は Table 7 に示した。これらの画分中には、いずれも tUQ-9 の他、その約 22～25% 量の tUQ-10 が存在していた。個々の画分中の tUQ 同族体含量を比較すると、ミトコンドリア外膜画分の tUQ 濃度は、呼吸鎖の存在するミトコンドリア内膜画分の濃度と比較し、およそ 2 倍の高値であった。なお、これら画分は、内膜のマーカー酵素, Succinate-cytochrome *c* Reductase 活性と外膜のマーカー酵素である Monoamine Oxidase 活性の分離状態から見て、良好に分画されており、アーティファクトとは考えられない。従来、ミトコンドリアの UQ は、大部分が内膜に分布するとされていた[67]が、今回の結果から明らかに誤りであることが判明した。

Table 7

Distribution of Ubiquinone and Ubiquinol Homologues in Rat Liver Mitochondrial Fractions

Intracellular Fractions	Marker Enzyme Activity [a] (%)		UQ-9 Contents (ng/mg protein)		Redox Ratios of UQ-9 [c]	UQ-10 Contents (ng/mg protein)		Redox Ratios of UQ-10 [c]
	Succinate-cytochrome c Reductase	Monoamine Oxidase	tUQ [b]	UQH_2	(%)	tUQ [b]	UQH_2	(%)
Mitochondria	100	100	1,670±360	1,150±120	70±7	225±76	157±43	71±9
Inner Membranes	133±35	27.4±14.0	559±226	270±94	49±5	125±68	57±12	49±7
Outer Membranes	24.8±10.6	277±32	1,290±380	680±75	52±9	284±75	148±56	50±10
Matrix & Intermembrane Space	3.0±2.6	28.0±6.6	339±138	140±40	41±10	86±41	28±7	33±6

The values are the means ± SE of seven rats.

a) The specific activities of succinste-cytochrome c reductase and monoamine oxidase in mitochondria were 172±141 and 37.9±22.1 nmol/mg protein/min, respectively.

b) The sum of oxidized and reduced forms of UQ of each of the homologues.

c) $(UQH_2/tUQ) \times 100$.

③ 粗リソソーム画分中の分布

粗リソソーム画分を、さらに Ly-1 画分、Ly-2 画分、Ly-3 画分、Ly-4 画分に分画し、UQ 同族体含量を測定した結果は Table 8 に示した。いずれの画分にも tUQ-9 の他、その約 9～18% 量の tUQ-10 が存在していた。個々の画分の UQ 同族体含量を比較すると、Ly-1 画分と Ly-2 画分の tUQ 濃度が高く、ミトコンドリア内膜画分の約 3 倍の高値を示した。なお、粗リソソーム画分に含まれるリソソー

Table 8

Distribution of Ubiquinone Homologues in Rat Liver Lysosomal Fractions

Intracellular Fractions	Marker Enzyme Activity (%) [a]		tUQ-9 [b] (ng/mg protein)	tUQ-10 [b] (ng/mg protein)
	Acid Phosphatase	Catalase		
Crude Lysosomes	100	100	542±62	86.9±12.0
Ly-1	162±24	2.0±0.6	1,430±260	269±76
Ly-2	207±50	5.9±2.2	1,560±350	292±80
Ly-3	88.7±10.1	70.6±11.7	598±75	103±15
Ly-4	18.6±6.1	188±24	447±86	42.3±5.8

The values are the means ± SE of four rats.

a) The specific activities of acid phosphatase and catalase in crude lysosomes were 791±118 nmol/mg protein/min and 23.3±6.3 units/mg protein, respectively.

b) The sum of oxidized and reduced forms of UQ of each of the homologues.

ムとペルオキシソームは、そのマーカー酵素活性 (Acid Phosphatase 活性と Catalase 活性) の分布から、それぞれ Ly-2 画分と Ly-4 画分に良好に分離されていた。また、粗リソソーム画分へのミトコンドリアの混入は、Succinate-cytochrome *c* Reductase 活性の分布から、約 6.4% と見積もられた (Table 2 参照)。したがって、これら画分の UQ 同族体は、ミトコンドリアの混入によるものとは考えられない。まお、Ly-1 および Ly-2 が、ミトコンドリア内膜より高濃度の tUQ 同族体を持つことは生理的意義を考える上で興味深い。

④ 粗ミクロソーム膜画分中の分布

粗ミクロソーム膜画分を、さらに滑面ミクロソーム膜画分、粗面ミクロソーム膜画分とゴルジ体画分 [GF_1 画分 (Light Fraction)、GF_2 画分 (Intermediate Fraction)、GF_3 画分 (Heavy Fraction)] に分画し、UQ 同族体含量を測定した結果は Table 9 に示した。いずれの画分にも tUQ-9 の他、その約 16～45% 量の tUQ-10 が存在していた。個々の画分中の UQ 同族体含量を見ると、滑面ミクロソー

Table 9

Distribution of Ubiquinone Homologues in Rat Liver Microsomal Fractions

Intracellular Fractions	NADPH-cytochrome c Reductase Activity [a] (%)	RNA Contents [b] (%)	tUQ-9 [c] (ng/mg protein)	tUQ-10 [c] (ng/mg protein)
Crude Microsomes	100	100	122±50	17.3±3.3
Smooth Endoplasmic Reticulum	133±37	14.7±3.8	144±64	23.6±10.7
Rough Endoplasmic Reticulum	117±36	135±2.8	119±43	26.5±20.1
Golgi Complex				
GF_1 (Light Fraction)	4.0±2.0	4.5±2.1	676±232	252±141
GF_2 (Intermediate Fraction)	3.6±1.3	11.1±1.7	723±539	260±160
GF_3 (Heavy Fraction)	6.7±3.6	9.1±0.7	212±126	94.4±48.7

The values are the means ± SE of seven rats.

a) The specific activitiy of NADPH-cytochrome c reductase in crude microsomes was 75.1±40.0 nmol/mg protein/min.

b) The RNA content in crude microsomes was 149±25 ngl/mg protein.

c) The sum of oxidized and reduced forms of UQ of each of the homologues.

ム膜画分と粗面ミクロソーム膜画分中のtUQ同族体含量は低かったが、GF_1画分(Light Fraction)とGF_2画分(Intermediate Fraction)のtUQ濃度は、ミトコンドリア内膜画分に匹敵した。粗ミクロソーム膜画分へのミトコンドリアの混入は、Succinate-cytochrome *c* Reductase活性の分布から、およそ1.2%と見積もられた(Table 2参照)。したがって、これら画分に存在するUQ同族体は、ミトコンドリアの混入によっては説明できず、特にGF_1画分とGF_2画分に高濃度のtUQ同族体が存在することは、ゴルジ体が細胞の膜構造の供給や細胞外への分泌等の機能を有することと考え合わせると興味深い。

第三節　血液成分中のユビキノンならびにユビキノール同族体の分布

UQ同族体が、血液中にも含まれることは既に確認されている[42]。著者もまた第一節で、ラット血漿中にUQならびにUQH_2同族体が存在すること、しかも、その還元比率がおよそ80%と高いことを示した。しかしながら、これまで血液に含まれる血球などの成分のUQ同族体ならびにUQH_2同族体の分布は詳しく調べられていない。そこでラット血液中のUQならびにUQH_2同族体の分布と、その還元比率を調べた。

実験方法

(1) 実験動物：

第一節、実験方法(1)と同様、8週齢(170～180 g)のWistar系雄性ラット(SPF動物, 日本エスエルシー株式会社)を用いた。

(2) 血小板および血漿(Platelet Poor Plasma)画分の調製：

第一節、実験方法(3)に従って得た血液を、250 x *g*, 10分間遠心し、沈殿画分(赤血球と白血球からなる画分)と上清画分(Platelet Rich Fraction)を得た。この上清画分(Platelet Rich Fraction)より、Shibata & Kobayashiの方法[68]に従い、血小板および血漿(Platelet Poor Plasma)画分を調整した。得られた血小板は、適当量のKrebs-Ringer緩衝液[127mM NaCl, 5mM KCl, 1mM $MgSO_4$, 1mM $CaCl_2$を含む10mM K-Pi緩衝液(pH7.4)]に懸濁して用いた。一方、血小板を除去した血漿

画分は、Platelet Poor Plasma 画分としてそのまま用いた。操作はすべて 4 ℃で行った。

(3) 精製赤血球画分の調製：

上記(2)の操作で得た赤血球と白血球を含む画分から、Beutler らの方法[69]に従い、精製赤血球画分を調整した。得られた精製赤血球画分は、Krebs-Ringer 緩衝液で 2 回洗浄した後、適当量の同緩衝液に懸濁して用いた。操作はすべて 4 ℃で行った。

(4) 赤血球膜 (Ghost Cells) および赤血球内容物 (Endosomes) 画分の調製：

Dodge らの方法[70]に従い、上記(3)の操作で得た精製赤血球画分より、赤血球膜 (Ghost Cells) および赤血球内容物 (Endosomes) 画分を調製した。得られた Ghost Cells 画分は、Krebs-Ringer 緩衝液で 2 回洗浄した後、適当量の同緩衝液に懸濁して用いた。一方、Endosomes 画分は、そのまま用いた。操作はすべて 4 ℃で行った。

(5) 白血球画分の調製：

Wakeyama らの方法[71]に従い、第一節、実験方法(3)で得た血液より白血球画分を調製した。得られた白血球画分は、Krebs-Ringer 緩衝液で 2 回洗浄した後、適当量の同緩衝液に懸濁して用いた。操作はすべて 4 ℃で行った。

(6) UQ および UQH_2 同族体の抽出ならびに定量：

第一節、実験方法(4)に従い行った。

(7) 蛋白質量の定量：

第一節、実験方法(5)に従い定量した。

実験結果

ラット血液中の UQ ならびに UQH_2 同族体の分布を調べた結果は Table 10 に示した。血液やそれを構成する血漿 (Platelet Poor Plasma)、顆粒球画分には、tUQ-9 の他、その約 20～76% 量の tUQ-10 が検出された。UQ 同族体含量を見ると、ミトコンドリアを持つ白血球画分や血小板画分では tUQ 濃度が高かったが、ミトコンドリアを持たない赤血球画分では tUQ 濃度が低かった。しかも、赤血球画分の UQ 同族体は、Ghost Cells 画分のみで確認され、Endosomes 画分には検出されなかった。還元比率

Table 10

Distribution of Ubiquinone and Ubiquinol Homologues in Rat Blood Cells

Fractions	UQ-9 Contents (ng/mg protein)		Redox Ratios of tUQ-9 b)	UQ-10 Contents (ng/mg protein)		Redox Ratios of tUQ-10 b)
	tUQ a)	UQH_2	(%)	tUQ a)	UQH_2	(%)
Blood	0.52±0.11	0.10±0.04	20±3	0.23±0.06	0.05±0.01	21±2
Platelet Poor Plasma	0.99±0.57	0.68±0.28	80±5	0.19±0.10	0.15±0.07	77±1
Erythrocytes	0.13±0.02	0.01±0.01	8.3±4.4	0.06±0.02	0.01±0.00	9.2±4.4
Ghost Cells	12.51±3.97	0.31±0.10	2.5±0.3	4.23±2.49	0.02±0.03	0.6±0.8
Endosomes	0	0	—	0	0	—
Leukocytes	42.10±8.85	1.18±1.66	3.6±5.0	20.37±6.80	0.89±0.65	5.6±4.0
Platelets	40.02±6.34	n.d.	—	30.59±17.25	n.d.	—

The values are the means ± SE of three rats. n.d., not determined.

a) The sum of oxidized and reduced forms of UQ of each of the homologues.

b) $(UQH_2/tUQ) \times 100$.

を見ると、血漿 (Platelet Poor Plasma) では約 80% と高かったが、顆粒球画分では 10% 未満であり、全血としては約 20% 程度であった。なお、各細胞画分の tUQ-9 と tUQ-10 の還元比率に差は認められなかった。

第四節　考察および小括

考　察

ラット生体内の UQ 分布を調べたところ、UQ はあらゆる組織に存在し、しかも主同族体の UQ-9 と共に、副次同族体として UQ-10 が必ず存在していた。また、Åberg ら [15] や Reahal & Wrigglesworth [41] が報告したように、これら組織中の UQ 同族体の一部は、UQH_2 同族体であり、還元比率は血漿と肝臓では 70% から 80%、心臓, 腎臓, 脾臓では 10% から 30% と、組織により異なっていた。Jayaraman ら [72] は、^{14}C-Mevalonate を腹腔内投与した場合、その放射能があらゆる生体内組織の UQ-9 中に取り込まれることを確認した。また、Kalén ら [14] はラットの各組織ホモジネートを用い

た検討で、あらゆる組織にUQ合成の主要酵素, NPHB Transferase活性とUQ合成活性があることを認めた。これらの報告は、いずれもUQが生体内の全ての組織内で生合成されうることを示唆している。また、UQを心室内に直接投与した場合、投与30分後には75%が肝臓に集まり、その後、時間の経過と共に肝臓のUQ含量は減少して行くが、その肝臓内UQ含量の減少に伴う他の組織のUQ含量の増加はほとんど観察されないことから、肝臓から各生体内組織へのUQの移行はほとんどないものと推定されている。したがって、著者がラットの各組織で認めたUQとUQH_2同族体は、肝臓のような還元比率の高い組織から供給されたものは少なく、個々の組織で生合成されたUQが主体であると考えられる。

著者はUQならびにUQH_2同族体の細胞内分布を知るため、還元比率の高い肝臓と低い腎臓について調べた。その結果、いずれの組織においてもUQ同族体は全ての細胞画分に存在することを認めた。さらに、肝臓のUQ同族体の分布を詳しく調べたところ、tUQ同族体は呼吸鎖の存在するミトコンドリア内膜よりミトコンドリア外膜に高濃度に存在することを認めた。また、リソソーム画分 (Ly-1, Ly-2 画分) や細胞膜画分のtUQ同族体含量もミトコンドリア内膜より高濃度であった。さらに、ゴルジ体画分 (GF_1, GF_2 画分) のtUQ同族体含量も、ミトコンドリア内膜に匹敵した。これまでUQは、ミトコンドリア内膜の酵素系によって生合成されるとされていた[73]。しかしながら、最近、Kalénら[13]は、^{3}H-Tyrosine、^{14}C-Tyrosineあるいは^{3}H-Mevalonateをラット肝切片と保温すると、ミクロソーム膜におけるUQ-9への放射能の取り込みがミトコンドリア以上に増加することを認めた。さらに、彼らはNPHB Transferase活性が、ラット肝臓の細胞質とペルオキシソーム以外のあらゆる細胞画分に存在し、しかも、Smooth II MicrosomesやGolgi III Vesicleでかなり高いことから、小胞体ーゴルジ体システムにおけるUQ合成を示唆した[14]。また、ミトコンドリア外膜、リソソーム、細胞膜における活性も、ミトコンドリア内膜より高いことから、これら画分でのUQ合成も示唆している。これら高いNPHB Transferase活性 (UQ合成活性) を有するとされた細胞画分は、今回の検討で、いずれもミトコンドリア内膜画分より高濃度のUQ同族体が存在していた画分である。また、UQ-9とUQ-10の存在比率も同一部位で合成されるのであれば、ほぼ一定でなければならないが、細胞画分によってかなり差があり、各画分が自前の生合成系でUQを合成していることを支持するように思われる。したがって著者が得た結果は、UQ同族体がミトコンドリア内膜以外でも生合成されているとい

うKalénらの報告[13),14)]を裏付けるものといえる。

肝臓と腎臓の各細胞画分のtUQ同族体の還元比率は、いずれも組織全体の還元比率とほぼ同じであった。UQは、ミトコンドリア呼吸鎖のNADH Dehydrogenase複合体(Complex Ⅰ)やSuccinate Dehydrogenase複合体(Complex Ⅱ)により還元されることはよく知られている[74),75)]。また、ゴルジ体[8)]や細胞膜[76)]にもミトコンドリア呼吸鎖に類似した電子伝達系(UQ還元系)が存在すると報告されている。さらにモルモットのミクロソーム膜のUQ-10は、NAD(P)Hの存在で還元されることも報告されている[77)]。しかしながら、全ての細胞画分のUQ同族体が、全て同じ還元比率であるのは、それぞれの画分に局在するUQ還元系により還元されるのではなく、全ての細胞画分のUQ同族体を一元的に還元する機構が存在する可能性を示唆するように思われる。このことについての検討結果は、第二章以降に述べる。

最後に、血液ではUQならびにUQH_2同族体は、あらゆる顆粒球画分に検出されたが、その還元比率は10%以下とかなり低かった。一方、血漿(Platelet Poor Plasma)のtUQ同族体の還元比率はおよそ80%と、極めて高値を示した。Elmbergerら[78)]はラット血漿のUQ-9が、主にリポ蛋白質画分に存在すると報告している。したがって、著者が血漿で認めた高いtUQ同族体の還元比率は、主にLDL中のUQの存在状態を表しているものと思われる。Kalénら[13)]は^{3}H-Mevalonateをラットの門脈へ投与すると、血液中に^{3}Hラベルされた UQ-9が検出されることを認めている。さらに続報[14)]で、肝小胞体ーゴルジ体システムで生合成されたUQ-9が、時間の経過と共に減少し血中に現れることから、リポ蛋白質に組み込まれて血液中に分泌されていることを示唆した。著者のラット血漿におけるUQ同族体の還元比率が、約80%と顆粒球画分に比べて著しく高く、肝臓の還元比率とほぼ等しい結果も、血漿UQが肝臓から分泌されたものである可能性を支持する。

小　括

(1) ラットは、UQ-9を主UQ同族体、UQ-10を副次的同族体として含有した。これらUQ同族体は全ての組織に分布し、しかも、その一部は還元型であった。tUQ同族体の還元比率は、肝臓・血漿の70～80%から心臓における10%まで、組織により異なっていた。

(2) 還元比率の高い肝臓と低い腎臓の細胞 UQ ならびに UQH_2 同族体の分布を調べたところ、全ての細胞画分に分布することを認めた。また、tUQ 同族体の還元比率は、いずれの細胞画分もほぼ同じで、組織ホモジネートの還元比率とほぼ一致した。これらの結果は、細胞内の全ての UQ を一元的に還元する機構が細胞内に存在する可能性を示唆した。

(3) ラット肝臓細胞オルガネラ内の UQ ならびに UQH_2 同族体の分布を比較したところ、ミトコンドリア外膜画分、リソソーム画分 (Ly-1、Ly-2 画分)、細胞膜画分は、ミトコンドリア内膜画分よりも高濃度の tUQ 同族体を含むことを認めた。さらに、ゴルジ体画分 (GF_1, GF_2 画分) も、ミトコンドリア内膜画分に匹敵する高値を示した。これら画分の UQ 合成の主要酵素, NPHB Transferase 活性は、ミトコンドリア内膜画分よりも高いことが報告されており [14]、著者の結果は、ミトコンドリア内膜外での UQ 合成を裏付けるものであった。

(4) ラット血液中の顆粒球画分や血漿にも、UQ-9 および UQ-10 が存在した。しかも、顆粒球画分の tUQ 同族体の還元比率は 10% 以下であるのに対し、血漿の還元比率は約 80% と、肝臓に匹敵する高値であった。この結果から、血漿の UQ 同族体は、リポ蛋白質に組み込まれた形で肝臓より分泌されたものであることが示唆された。

第二章　ラット肝臓ユビキノン還元酵素系の検索

UQH_2 同族体は非常に不安定であり、好気的条件下、セミキノンラジカルを経て UQ 同族体へと速やかに酸化される。Åberg ら [15] は UQ 同族体がラット生体内のあらゆる組織に存在し、しかも肝臓ではその殆どが、また他の組織においてもその一部が UQH_2 同族体であることを示した。著者もまた、第一章で、ラットの UQ および UQH_2 同族体含量の詳細な検討を行い、あらゆる組織の各細胞画分に広く存在することを確認した。特に肝臓では、tUQ の 60～75% が UQH_2 同族体であった。

Reahal & Wrigglesworth [41] は、ラットに UQ-10 を経口投与あるいは腹腔内注射すると肝臓や脾臓の UQ-10 含量が増加すること、さらに肝臓では、ミトコンドリア以外の細胞画分でも UQ-10 含量が増加し、しかも、それに伴い UQH_2-10 含量も増加することを認めた。UQ 同族体は、適当な呼吸基質の存在下、ミトコンドリア呼吸鎖の NADH Dehydrogenase と Succinate Dehydrogenase で還元されることは周知の事実である [74),75),79)]。また、ゴルジ体膜 [8] や細胞膜 [76] にもミトコンドリア呼吸鎖に類似した NADH Dehydrogenase の存在が報告されている。しかしながら、これら膜構造に組み込まれた UQ 還元酵素が、他の細胞画分の UQ 同族体をも還元するとは考えにくい。しかし、第一章での肝臓および腎臓の全ての細胞画分の詳細な分析は、各画分の UQ 同族体の一定割合が還元型の UQH_2 同族体であることを示した。これはミトコンドリアやゴルジ体膜や細胞膜以外にも UQ 同族体を還元・維持する機構の存在することを示唆する。そこで本章では、各細胞画分の UQ 還元酵素活性を、還元比率の高かった肝臓を用いて検討した。

第一節　ユビキノン還元酵素の肝臓内分布

生体の主要な電子供与体は NAD(P)H で、呼吸鎖の NADH Dehydrogenase を初め、ゴルジ体膜 [8] や細胞膜 [76] の UQ 還元酵素系は NADH を電子供与体としている。そこで、NADH および NADPH を電子供与体とし、UQ-10 からの UQH_2-10 生成量を測定することにより、ラット肝臓内の UQ-10 還元活性の分布を調べた。

実験方法

(1) 肝細胞画分の調製：

第一章、第二節、実験方法(2)-①に従い、8週齢 (170～180 g) の Wistar 系雄性ラット (SPF 動物, 日本エスエルシー株式会社) の肝臓より、粗細胞画分を調製した。引き続き第二節、実験方法(2)-②から(2)-⑦に従い、精製した各細胞画分を得た。

(2) UQ および UQH_2 同族体の抽出ならびに定量：

第一章、第一節、実験方法(4)に従い行った。

(3) UQ-10 還元活性測定法：

0.08% Triton X-100, 50μM UQ-10, 0.5mM 2-Mercaptoethanol, 0.2mM NAD(P)H と適当量の細胞画分を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) からなる反応液 250 μl を、37 ℃で正確に 10 分間保温した。*n*-Hexane/Ethanol (3 : 1) 混液 3.5 ml を加えて反応を停止し、80 rpm, 10 分間機械振とうすることにより、反応液中の UQ-10 と還元生成した UQH_2-10 を抽出した。次に 1,500 x *g*, 10分間遠心して得られた上層の *n*-Hexane 層を別の褐色スピッツ管に分取し、窒素気流下、溶媒を減圧・留去した。残査に適当量の Ethanol を正確に加え、HPLC の試料とした。この試料中の UQH_2-10 量は、Okamoto らの HPLC-ECD 法[42] を用いて分離・定量した。装置および HPLC 条件は第一章、第一節、実験方法(4)に示した通りである。UQ-10 還元活性は、1 分間あたり蛋白質量、1 mg の細胞画分が還元生成する UQH_2-10 量 (pmol/min/mg protein) として示した。

(4) ラット肝細胞質の Protease 処理：

反応液 1 ml あたり、蛋白質量 10 mg のラット肝細胞質と、1 mg の Trypsin (EC 3. 4. 21. 4, 1:250, DIFCO Laboratory) あるいは Pronase (アクチナーゼ, 科研製薬) を加え、50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中で、37 ℃, 1 時間保温した。同時に対照実験として、Protease を添加せずに同様に保温したラット肝細胞質も作成した。この Protease 処理したラット肝細胞質は、そのまま UQ-10 還元活性の測定に用いた。

(5) 蛋白質量の定量：

第一章、第一節、実験方法(5)に従い定量した。

実験結果

ラット肝臓の UQ-10 還元活性を肝ホモジネートを用いて調べた結果を Table 11 に示す。NADPH および NADH のいずれの存在でも UQ-10 還元活性が認められたが、電子供与体として NADH より NADPH を用いた方が約 2 倍高い活性を示した。NADH を用いた時の UQ-10 還元活性は、ミトコンドリア電子伝達系 Complex Ⅰ 阻害剤の Rotenone により、約 20% 阻害されたが、Cytochrome bc_1 Complex (Complex Ⅲ, EC 1. 10. 2. 2) 阻害剤の Antimycin A や Cytochrome Oxidase (Complex Ⅳ, EC 1. 9. 3. 1) 阻害剤の NaN_3 の添加では逆に促進された。しかしながら、Antimycin A と NaN_3 による UQ-10 還元の促進は、Rotenone の添加で阻害され、Rotenone 単独添加の場合と同程度の活性にまで低下した。これらの結果は、NADH 存在下に認められるラット肝ホモジネートの UQ-10 還元活性のうち、これら酵素阻害剤で影響される部分がミトコンドリア呼吸鎖に由来する活性であることを示している。一方、電子供与体として NADPH を用いた時の UQ-10 還元活性は、ミトコンドリア電子伝達系阻害剤の影響を全く受けなかった。

ラット肝臓にはキノン還元酵素の一種，NAD(P)H : (quinone-acceptor) Oxidoreductase (DT-diaphorase, EC 1. 6. 99. 2) の存在が知られている [80]。しかし、

Table 11

UQ Reductase Activities in Rat Liver Homogenate

Additions	UQ Reductase Activity (pmol/min/mg protein)		
	None	NADPH	NADH
None	36±4	312±7	147±1
5μM Dicoumarol	22±4 †	263±23 *	121±4 ‡
10μM Rotenone	35±7	306±16	118±9 ‡
1μM Antimycin A	38±4	310±15	167±10 *
10mM NaN_3	36±2	305±14	177±11 †
10μM Rotenone + 1μM Antimycin A	34±4	308±26	131±6 †
10μM Rotenone + 10mM NaN_3	37±3	308±15	127±5 ‡

The values are the means ± SD of four experiments.

*, †, ‡ Significant differences at levels of $P<0.01$, $P<0.005$ and $P<0.001$, respectively, compared with no addition using Student's unpaired *t* test.

DT-diaphorase を完全に阻害する濃度 (5 μM) の Dicoumarol は、全 UQ-10 還元活性を約 20% しか阻害しなかった。これらの結果から、NADPH 存在下に認められるラット肝ホモジネートの UQ-10 還元活性の大部分は、ミトコンドリア呼吸鎖や DT-diaphorase によるものではないことが示唆された。

さらに、NADPH あるいは NADH を添加しなくとも (肝ホモジネート中の内部基質の利用のみでも)、弱い UQ-10 還元活性が認められたが、Dicoumarol やミトコンドリア電子伝達系阻害剤に対する振る舞いは、NADPH を電子供与体として用いた時と同じであった。この結果から、ラット肝臓中の主な UQ-10 還元活性は、NADPH を電子供与体とする活性であることが示唆された。

そこで、この活性の本体を知る目的で、NADPH を電子供与体としてラット肝細胞画分の UQ-10 還元活性を詳細に調べた結果は Table 12 に示した。NADPH を電子供

Table 12

Distribution of NADPH-UQ Reductase Activities in Rat Liver Intracellular Fractions

Intracellular Fractions	NADPH-UQ Reductase Activity (pmol/min/mg protein)	Distribution (%)
Homogenate	181±128	100
Nuclei	16.3±11.6	5.8±6.1
Mitochondria	40.7±11.6	8.2±4.0
Inner Membranes	16.7±3.2	N.D.
Outer Membranes	8.3±5.9	N.D.
Matrix & Intermembrane Space	20.4±14.1	N.D.
Crude Lysosomes	8.7±9.0	2.6±0.5
Crude Microsomes	105±64	15.0±4.3
Smooth Endoplasmic Reticulum	50.8±49.1	N.D.
Rough Endoplasmic Reticulum	60.1±9.0	N.D.
Golgi Complex		
GF_1 (Light Fraction)	0	N.D.
GF_2 (Intermediate Fraction)	11.9±8.9	N.D.
GF_3 (Heavy Fraction)	32.8±21.9	N.D.
Cytosol	312±36	67.9±1.9

The values are the means ± SD of three rats. N.D., Not determined.

与体とする UQ-10 還元活性は、ゴルジ体の GF_1 画分 (Light Fraction) 以外のあらゆる細胞画分に存在し、中でも細胞質と粗ミクロソーム膜画分で高いことを認めた。特に細胞質は、細胞画分中、最も高い比活性を示し、量的にも肝ホモジネートの全活性の約 68% にのぼった。また、粗ミトコンドリア画分には、ラット肝臓の全 UQ-9 量 の約 80% が存在した (Succinate-cytochrome c Reductase の回収率より算出) が、NADPH を電子供与体とする UQ-10 還元活性は、肝臓の全活性の約 8% に過ぎなかった。これらの結果より、UQ-10 還元活性は主に細胞質に局在することが明らかとなった。

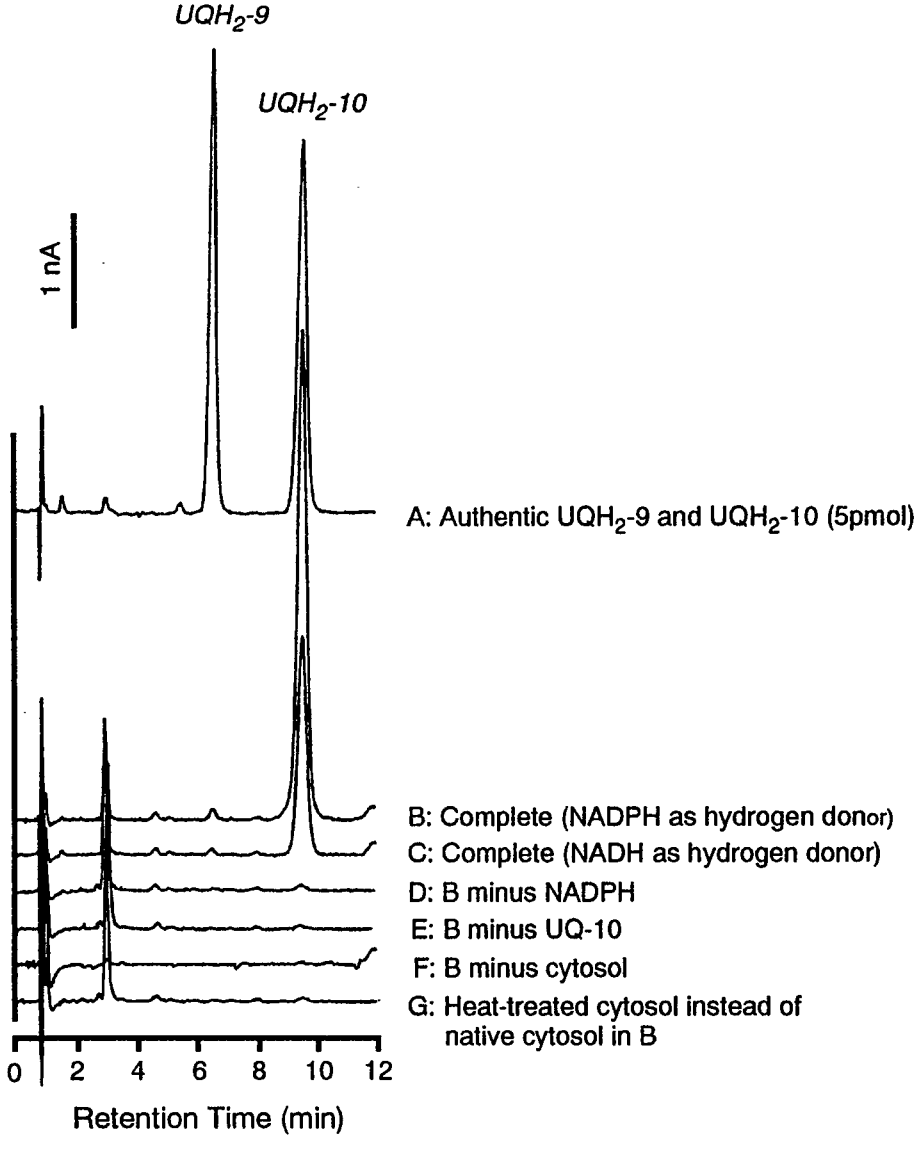


Fig.2 HPLC Profiles of Ubiquinone-10 Reduction by Rat Liver Cytosol

The complete reaction mixture (250 μl) consisted of 50mM Tris-HCl buffer (pH7.4) containing 0.08 % Triton X-100, 50μM UQ-10, 0.5mM 2-mercaptoethanol, 0.2mM NADPH and 0.25 mg cytosolic protein.

細胞質のUQ-10還元活性が、酵素によるものかどうかを検討した結果はTable 13に示した。UQ-10還元活性は、細胞質、UQ-10およびNAD(P)Hの三者が共存する時にのみ認められ、これらの一つを除いた時や、加熱処理(95℃, 10分間)した細胞質を用いた時には認められなかった(Fig. 2)。また、UQ-10還元活性は、細胞質をTrypsinやPronaseで処理すると完全に消失したが、95℃, 10分間の加熱処理で失活させたTrypsinやPronaseで処理した時には失われなかった(Table 13)。これらの結果は、ラット肝細胞質のUQ-10還元活性が酵素活性であることを示している。なお、細胞質のUQ-10還元酵素活性は、ラット肝ホモジネートを用いた時と同様、電子供与体としてNADHよりNADPHを用いた時の方がおよそ2倍高かった。

Table 13

UQ-10 Reduction by Heated and Protease-digested Cytosol

	UQ Reductase Activity (pmol/min/mg protein)	
	NADPH	NADH
Native Cytosol	235±21	113±35
Heated Cytosol [a)]	0 *	0 *
Trypsin-treated Cytosol		
Native Trypsin digestion	34±21 *	11±8 *
Heated-Trypsin digestion [a)]	238±41	104±21
Pronase-treated Cytosol		
Native Pronase digestion	0 *	0 *
Heated-Pronase digestion [a)]	198±42	91±17

The values are the means ± SD of three experiments.

* Significant differences at levels of $P<0.001$ compared with native cytosol using Student's unpaired *t* test.

[a)] Heat-treatment at 95°C for 10 min.

第二節　肝細胞質ユビキノン還元酵素と既知のキノン還元酵素との異同

前節で、ラット肝臓には、NAD(P)Hの存在下UQ-10を還元する酵素が存在し、しかもこの酵素は主に細胞質に存在することを明らかにした。UQを還元する酵素として、Ernster & Forsmark-Andrée [82)]は、ミトコンドリアや細胞膜のNADH Dehydrogenase

系、ミクロソーム膜の NADH-cytochrome b_5 Reductase (EC 1. 6. 2. 2) や NADPH-cytochrome Reductase (EC 1. 6. 2. 4)、細胞質の DT-diaphorase をあげている。また、Frei ら [27] はこれら酵素に加え、NADH : (quinone-acceptor) Oxidoreductase (EC 1. 6. 99. 5) やNADPH : (quinone-acceptor) Oxidoreductase (EC 1. 6. 99. 2) 、Cu^{2+},Zn^{2+}- containing Superoxide Dismutase (Cu^{2+},Zn^{2+}-SOD, EC 1. 15. 1. 1) もその候補にあげている。また、ゴルジ体膜の NADH Dehydrogenase 系 [8] も UQ を還元する可能性がある。これらのうち、DT-diaphorase は、キノン化合物をキノール化合物へ 2 電子還元することにより、キノン化合物の毒性から生体を防御する役割を担っていると考えられている [83),84] が、Takada ら [85] によれば UQ-10 を還元しうることが確認されている。しかしながら、前節で、ラット肝ホモジネートのUQ-10 還元酵素活性の大部分は Dicoumarol で阻害されなかったため、ラット肝細胞質の UQ-10 還元酵素の DT-diaphorase との異同を中心に上述の既知のキノン還元酵素との関連について検討することにした。

実験方法

(1) 肝細胞質の調製：

第一章、第二節、実験方法(2)-①に従い、8 週齢 (170～180 g) の Wistar 系雄性ラット (SPF 動物, 日本エスエルシー株式会社) の肝臓より調製した。

(2) UQ-10 還元活性測定法：

第二章、第一節、実験方法(3)に従い、電子供与体として NADPH を用いた時の UQ-10 還元活性を NADPH-UQ Reductase 活性として測定した。NADPH-UQ Reductase 活性は、1 分間あたり蛋白質量として 1 mg の試料が還元する UQ-10 量 (pmol/min/mg protein) として示した。

(3) DT-diaphorase 活性測定法：

DT-diaphorase 活性は、Ernster の方法 [81] に従い測定した。0.07 % BSA, 40μM 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP), 0.2mM NAD(P)H と適当量 の試料を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) からなる反応液 1 ml を吸光度測定用キュベットに入れ、波長 600 nm における吸光度変化を 37 ℃で 3 分間連続的に測定した。DT-diaphorase 活性は、600 nm における DCPIP のモル吸光係数 2.1 x 10^4

$M^{-1}cm^{-1}$ を用い、1分間あたり蛋白質量として1 mgの試料が還元するDCPIP量 (nmol/min/mg protein) として示した。

(4) Cibacron Blue-binding Agarose Gel Chromatography：

① Cibacron Blue-binding Agarose Gelの調製：

2% NaClを含む50%(v/v) Bio-gel A-5m (Bio-Rad) 懸濁液, 100 mlを Na_2CO_3 でpH 10に調整し、0.2 gのCibacron Blue F3GAを加えて37 ℃で保温した。24時間後と48時間後にさらに0.2 gのCibacron Blue F3GAを加え、計72時間保温した後、ゲル懸濁液をガラスフィルター上に移し、蒸留水で洗浄した。ゲルに結合しなかったCibacron Blue F3GAの青色が消えるまで洗浄した後、6M Ureaを含む0.5M NaOH, 300 mlで洗浄し、再び蒸留水で洗液のpHが中性～弱酸性 (約pH 6.5) になるまで洗浄した後、使用するまで蒸留水に懸濁した状態で4 ℃で保存した。このCibacron Blue-binding Agarose Gelは、使用直前にゲル容量の3倍量の蒸留水で洗浄した後、初期緩衝液 (0.15M NaCl) で平衡化した後、実験に用いた。

② Cibacron Blue-binding Agarose Gel Chromatographyによる分離操作：

Cibacron Blue- binding Agarose Gel ChromatographyはDT-diaphoraseの精製法であるProchaskaの方法[86]に従った。0.15M NaClで平衡化したCibacron Blue-binding Agarose Gel, 10 mlに、0.15M NaClを含むラット肝細胞質10 mlを加え、氷中で緩やかに撹拌しながら1.5時間保温した。XK16/20カラム (Pharmacia) にゲルを詰めた後、流速0.5 ml/minでゲルに結合しなかった蛋白質を0.15M NaClで洗い流し、3.5Mになるまで NaClの直線濃度勾配をかけた。次いで3.5M NaClを含む5mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.4)、5mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.4)、50% Ethylene Glycolを含む20mM Tris Base (pH 10)、50% Ethylene Glycolと1mM NADHを含む20mM Tris Base (pH 10) の順で溶出液を交換し、ゲルに結合した蛋白質を溶出した (Fig. 7)。カラムからの溶出液は波長280 nmにおける吸光度を連続的にモニターした後、1.5 mlづつ試験管に集め、DT-diaphorase活性とNADPH-UQ Reductase活性を測定した。

(5) 蛋白質量の定量：

第一章、第一節、実験方法(5)に従い定量した。

実験結果

(1) ミトコンドリア電子伝達系酵素との異同

ミトコンドリア呼吸鎖の NADH Dehydrogenase は NADH から UQ への電子の受け渡しを行っている[87]。この酵素は Rotenone により阻害される[88]が、肝ホモジネートの結果から予想されたように、ラット肝細胞質 NADPH-UQ Reductase 活性は Rotenone により阻害されないだけではなく、他のミトコンドリア電子伝達系阻害剤の影響も全く受けなかった (Table 14)。なお、ミトコンドリア外膜には、Rotenone で阻害されない NADH Dehydrogenase が存在する[54]が、これは、NADH 依存的な酵素であり、NADPH を電子供与体とした UQ-10 還元に寄与しているとは考えられない。さらに、細胞質へのミトコンドリアの混入は、ミトコンドリアのマーカー酵素, Succinate-cytochrome *c* Reductase 活性の測定からもおよそ 1% と見積もられる (第一章、第二節、Table 2 参照) が、細胞質 NADPH-UQ Reductase の比活性はミトコンドリア画分中の活性のおよそ 8 倍であった (Table 12)。以上の結果から、細胞質 NADPH-UQ Reductase 活性がミトコンドリア酵素の漏出や、ミトコンドリアの混入による可能性は否定された。

(2) ゴルジ体膜および細胞膜電子伝達系酵素との異同

ゴルジ体膜[8]や細胞膜[76]には、ミトコンドリア呼吸鎖と類似した NADH Dehydrogenase 活性が存在するが、ミトコンドリア酵素と同様に NADH に依存的な酵素とされている。さらに、ゴルジ体膜の NADH Dehydrogenase 活性は、KCN により促進されるが[8]、細胞質の NADPH-UQ Reductase 活性は、KCN の添加による影響を全く受けなかった (Table 14)。また細胞膜の NADH Dehydrogenase 活性は、NaN_3 や Insulin により阻害され、Glucagon により促進されるが[18]、細胞質 NADPH-UQ Reductase 活性は、KCN の添加や NaN_3, Insulin, Glucagon の添加による影響を全く受けなかった (Table 14)。これらの結果から、細胞質 NADPH-UQ Reductase 活性が、ゴルジ体膜や細胞膜に存在する NADH Dehydrogenase に由来する可能性は否定された。

(3) ミクロソーム膜電子伝達系酵素との異同

ミクロソーム膜の電子伝達系を構成する NADH-cytochrome b_5 Reductase と NADPH-cytochrome Reductase は、それぞれ NADH、NADPH の存在下、*p*-Benzoquinone や Menadione を還元するキノン還元酵素でもあることが知られている [89]。しかしながら、細胞質へのミクロソーム膜の混入は、ミクロソーム膜のマーカー酵素である NADPH-cytochrome Reductase 活性の測定からおよそ 6% と見積もられたにもかかわらず (第一章、第二節、Table 2 参照)、細胞質の NADPH-UQ Reductase 活性は粗ミクロソーム膜画分の活性の約 3 倍であった (Table 12)。また、ミクロソーム膜画分中には肝臓ホモジネートの全 NADPH-UQ Reductase 活性の約 15 % が存在するのみであった (Table 12)。さらに、NADH-cytochrome b_5 Reductase 活性は、$CaCl_2$ や $MgCl_2$ により阻害されるが [90]、細胞質 NADPH-UQ Reductase 活性は、$CaCl_2$ の影響を全く受けず、$MgCl_2$ は NADPH-UQ Reductase 活性をむしろ促進した (Table 14)。これらの結果から、細胞質 NADPH-UQ Reductase 活性がミクロソーム膜の電子伝達系酵素の漏出や、ミクロソーム膜の混入の可能性は否定された。

(4) ミクロソーム膜 NAD(P)H-UQ Reductase との異同

最近、Shigemura らは、ミクロソーム膜に電子伝達系酵素とは異なる、NAD(P)H を電子供与体とする UQ 還元酵素の存在を報告した [91]。この酵素は UQ-10 を電子受容体とする他、電子供与体の種類や Rotenone, Dicoumarol の添加に対する感受性など、著者が ラット肝細胞質に見出した NADPH-UQ Reductase とかなり性質が似ていた。しかしながら、ミクロソーム膜の NAD(P)H-UQ Reductase 活性が、$NADP^+$ の添加でなんら影響を受けないのに対し、細胞質 NADPH-UQ Reductase 活性は $NADP^+$ の添加で阻害された (Table 14)。さらに、細胞質へのミクロソーム膜の混入は、ミクロソーム膜のマーカー酵素, NADPH-cytochrome Reductase 活性の測定から約 6% と見積もられたにもかかわらず (第一章、第二節、Table 2 参照)、細胞質の NADPH-UQ Reductase 活性は粗ミクロソーム膜画分中の活性の約 3 倍であった (Table 12)。これらの結果は、細胞質 NADPH-UQ Reductase がミクロソーム膜 NAD(P)H-UQ Reductase とは異なることを示している。

(5) DT-diaphorase との異同

肝細胞質に存在する DT-diaphorase は、Takada ら[85]により UQ-10 を還元することが報告されている。また多くの研究者により、DT-diaphorase が長鎖イソプレノイド側鎖を有する UQ 同族体を還元する可能性が示唆されている[27),82)]。したがって著者が細胞質に認めた NADPH-UQ Reductase は、DT-diaphorase と同一の酵素である疑いが強かった。そこで NADPH-UQ Reductase と DT-diaphorase との異同を明らかにするため、同じ肝細胞質に含まれる NADPH-UQ Reductase 活性と DT-diaphorase 活性について、電子供与体、安定性、Stimulator や DT-diaphorase 阻害剤の効果を比較・検討した。

① 電子供与体

ラット肝細胞質の UQ-10 還元酵素活性は、電子供与体として NADPH あるいは NADH を利用して UQ-10 を UQH_2-10 へと還元するが、その活性は NADPH を用いた方が 2 倍余り高かった (Fig. 2)。一方、DT-diaphorase は、NADPH および NADH を電子供与体として同程度に利用する酵素といわれる[80)]。そこで、両酵素に対する、NADPH と NADH の電子供与体としての効果を、Lineweaver-Burk Plot を用いて検討した (Fig. 3)。DT-diaphorase 活性に対する

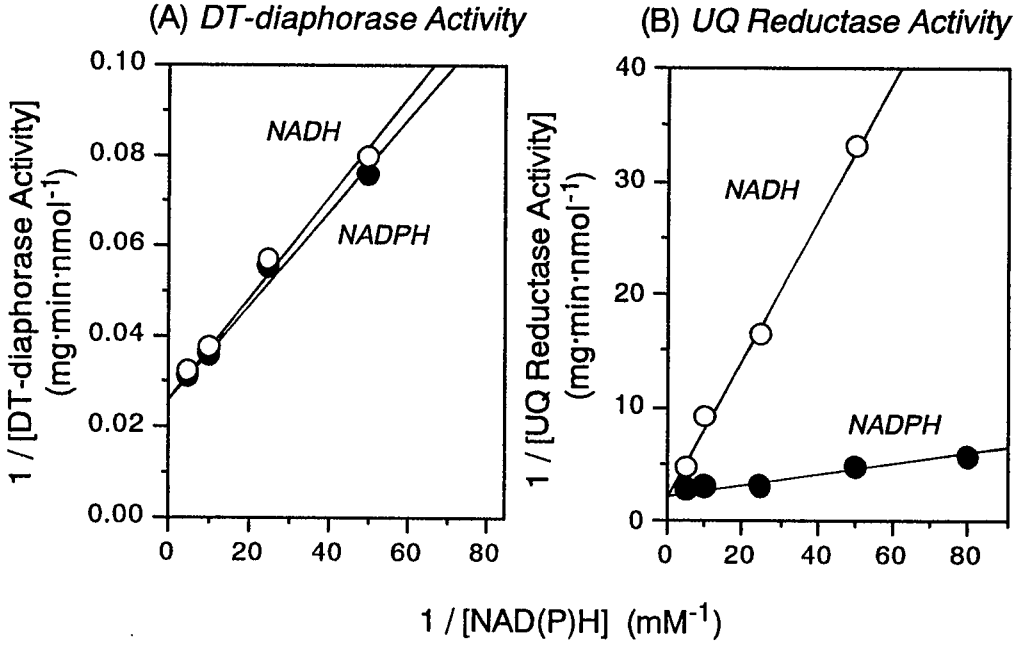


Fig.3 Lineweaver-Burk Plots of DT-diaphorase and UQ Reductase Activities in Rat Liver Cytosol

NADPH と NADH の K_m 値と V_{max} 値は、どちらの電子供与体を用いた時でもほぼ同じであった (K_m(NADPH)=36.3μM, V_{max}(NADPH)=36.2 nmol/min/mg protein, K_m(NADH)=36.3 μM, V_{max}(NADH)=36.0 nmol/min/mg protein) (Fig. 3A)。一方、同一の細胞質の UQ-10 還元酵素活性に対する V_{max} 値は、どちらの電子供与体を用いた時でもほぼ同じであった (V_{max}(NADPH)=487 pmol/min/mg protein ; V_{max}(NADH)=489 mol/min/mg protein) が、NADPH を電子供与体とした時の K_m 値 (K_m(NADPH)=19.2μM) は NADH を用いた時の K_m 値 (K_m(NADH)=307μM) のおよそ 1/15 であった (Fig. 3B)。この結果から、DT-diaphorase 活性は文献通り NADPH と NADH を同程度に利用するが、UQ-10 還元酵素活性は、NADH よりも NADPH の方をおよそ 15 倍良い基質とし、著しく異なることがわかった。

② 安定性

肝細胞質を -20 ℃で 7 日間保存した時、DT-diaphorase 活性は殆ど低下しなかったが、、同一の細胞質の NADPH-UQ Reductase 活性は日を追うごとに低下し、7 日目には細胞質調製直後の活性の約 20% にまで低下した (Fig. 4)。

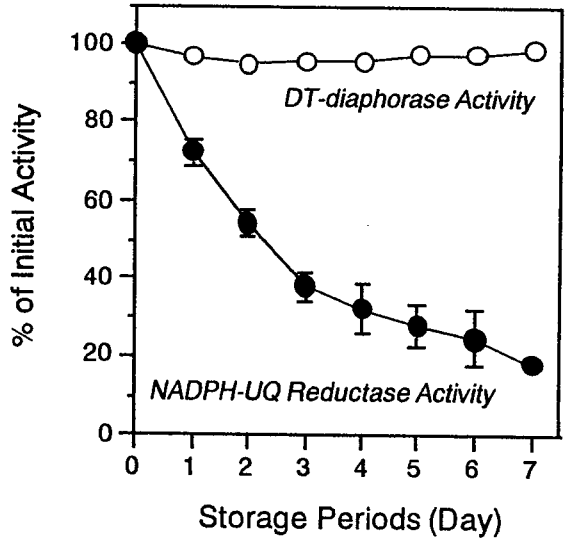


Fig.4 Stabilities of DT-diaphorase and NADPH-UQ Reductase Activities in Rat Liver Cytosol

Cytosol was freshly prepared from rat liver and immediately cryopreservation at -20°C. DT-diaphorase and NADPH-UQ reductase activities in same cytosol were determined every day and expressed as a percentage of the initial activities of day 0. The initial activities of DT-diaphorase and NADPH-UQ reductase were 46.2 ± 10.7 nmol/min/mg protein and 347 ± 28 pmol/min/mg protein, respectively. The values are the means ± SD of three experiments.

③ BSA と Triton X-100 の効果

BSA や Triton X-100 などのいくつかの界面活性剤は、DT-diaphorase 活性を促進することが報告されている[80]。そこで、DT-diaphorase 活性と UQ-10 還元酵素活性に対する BSA と Triton X-100 の効果を検討した。その結果、DT-diaphorase 活性は、1 X 10^{-7} % から 1 % の広い濃度範囲の BSA と Triton X-100 により、促進 (約 2 ～ 4 倍) された (Fig. 5A)。一方、同一の細胞質の NADPH-UQ Reductase 活性は、0.01 ～ 0.5 % の狭い濃度範囲の Triton X-100 で、最大でおよそ 4 倍 (0.08%) 促進されたが、BSA ではむしろ阻害された (Fig. 5B)。

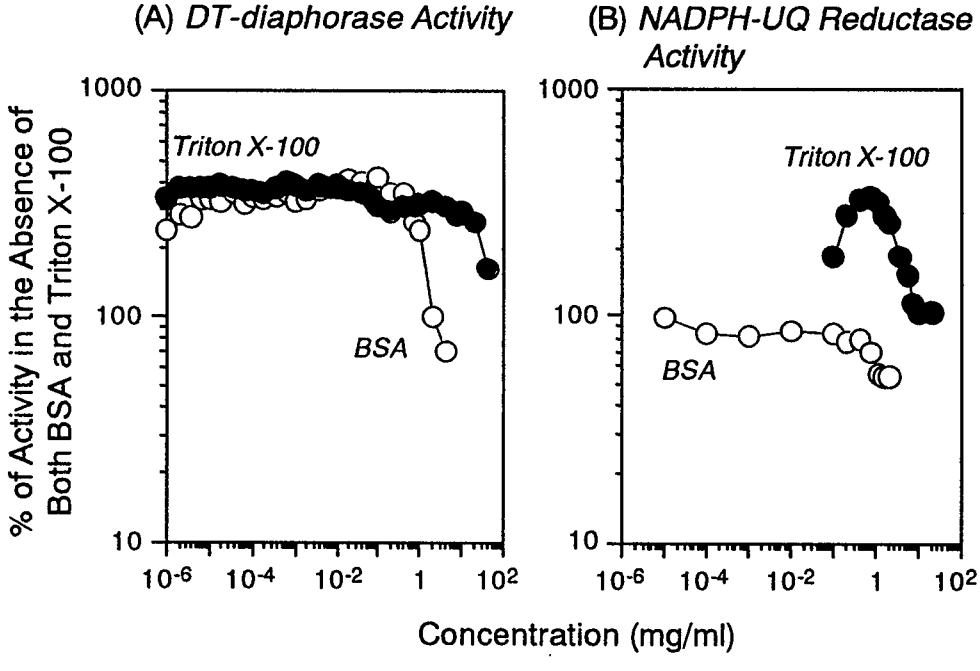


Fig.5 Effect of Bovine Serum Albumin and Triton X-100 on DT-diaphorase and NADPH-UQ Reductase Activities in Rat Liver Cytoaol

DT-diaphorase and NADPH-UQ reductase activities were determined in the presence of the indicated concentrations of BSA (○) and Triton X-100 (●). The values indicated a percentage of the activities in the absence of both BSA and Triton X-100. DT-diaphorase and NADPH-UQ reductase activities in the absence of BSA and Triton X-100 were 13.7 nmol/min/mg protein and 123 pmol/min/mg protein, respectively.

④ DT-diaphorase 阻害剤の効果

Dicoumarol は DT-diaphorase の強力な阻害剤である[80),81)]。そこで、ラット肝細胞質中の DT-diaphorase 活性と NADPH-UQ Reductase 活性に対する Dicoumarol の阻害効果を検討した。その結果、DT-diaphorase 活性は、Dicoumarol の 1nM 以上の濃度で阻害され、1 μM ではほぼ完全に阻害された (IC_{50}=6.5±0.7nM) (Fig. 6)。しかしながら、同じ細胞質の NADPH-UQ Reductase 活性は、1 μM Dicoumarol ではほとんど阻害されず、完全に阻害するには、10mM が必要であった (IC_{50}=16.0±1.0 μM)。また、DT-diaphorase は、Warfarin[92)] や Flavin Adenine Dinucleotide (FAD)、Flavin Mononucleotide (FMN)[80),81)] で阻害されるが、NADPH-UQ Reductase 活性はこれらによりほとんど阻害されず、FAD や FMN ではむしろ促進された (Table 14)。

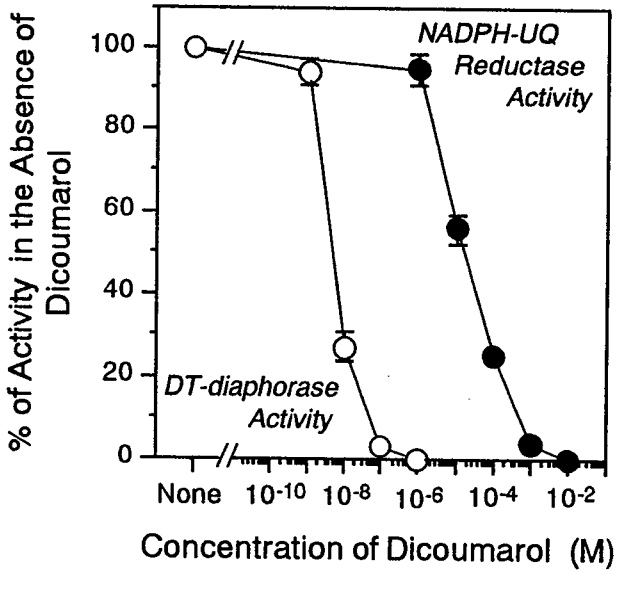


Fig.6 Inhibition of DT-diaphorase and NADPH-UQ Reductase Activities in Rat Liver Cytosol by Dicoumarol

DT-diaphorase and NADPH-UQ reductase activities were determined in the presence of the indicated concentrations of dicoumarol. The values indicated a percentage of the activities in the absence of dicoumarol. DT-diaphorase and NADPH-UQ reductase activities in the absence of dicoumarol were 46.2 ± 10.7 nmol/min/mg protein and 347 ± 28 pmol/min/mg protein, respectively. The values are the means ± SD of three experiments.

⑤ Cibacron Blue-binding Agarose Gel Chromatography による DT-diaphorase 活性と NADPH-UQ Reductase 活性の分離

ラット肝細胞質中の DT-diaphorase 活性と NADPH-UQ Reductase 活性とを分離するため、Cibacron Blue-binding Agarose Gel Chromatography を行った結果は Fig. 7 に示す。DT-diaphorase 活性の 93.8% は 50% Ethylene Glycol と 1mM NADH を含む 20mM Tris Base (pH 10) により溶出した。一方、NADPH-UQ Reductase は、Cibacron Blue-binding Agarose Gel にほとんど結合せず、0.15M NaCl から 3.5M NaCl への濃度勾配をかけている途中で、全活性の 99.0% が 溶出した。このように、NADPH-UQ Reductase 活性と DT-diaphorase 活性とは、性質がかなり異なるだけでなく、Cibacron Blue-binding Agarose Gel Chromatography により、互いに完全に分離することから、異なる酵素蛋白質であることが明らかとなった。

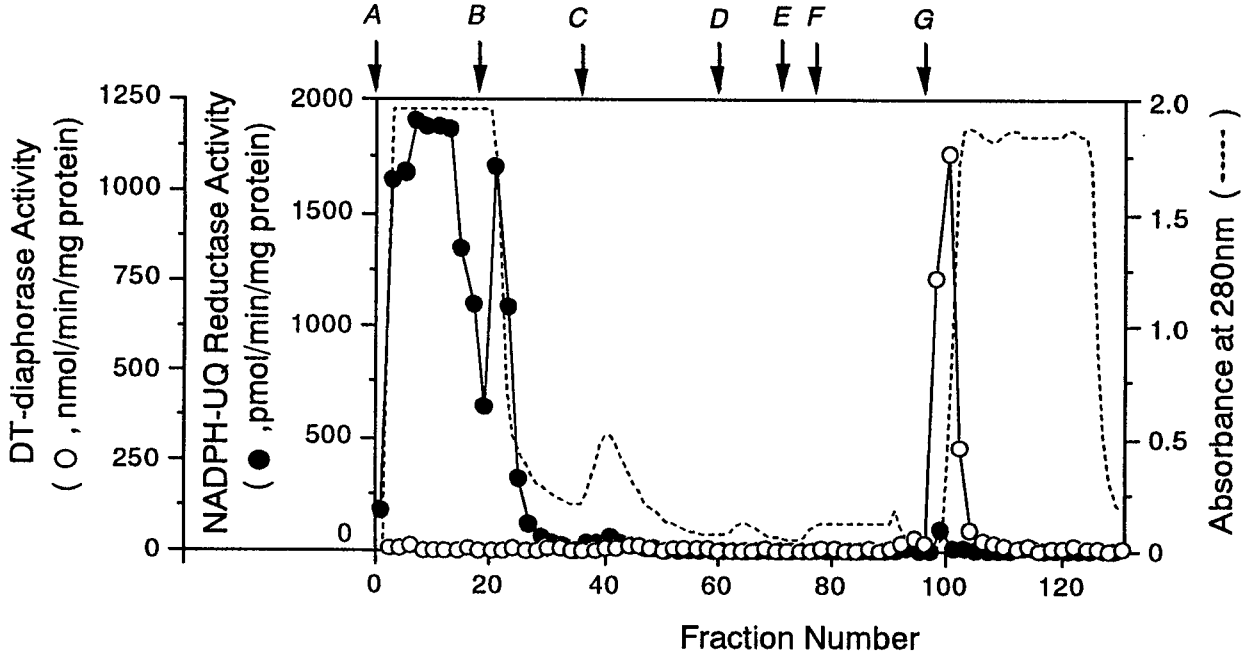


Fig.7 Separation of DT-diaphorase and NADPH-UQ Reductase Activities in Rat Liver Cytosol by Cibacron Blue-binding Bio-gel A-5m Chromatography

Cibacron blue-binding Bio-gel A-5m (10 ml) and rat liver cytosol (10 ml) were mixed and incubated at 4°C. After 1.5 h, the gel was packed into a column and eluted with buffers as follows; A, 0.15M NaCl. B to C, linear gradient of NaCl from 0.15M to 3.5M. C, 3.5M NaCl. D, 5mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 3.5M NaCl. E, 5mM Tris-HCl buffer (pH 7.4). F, 20mM Tris-base (pH 10) containing 50 % ethylene glycol. G, 20mM Tris-base (pH 10) containing 50 % ethylene glycol and 1mM NADH.

(6) 細胞質 NADH : (quinone-acceptor) Oxidoreductase および NADPH : (quinone-acceptor) Oxidoreductase との異同

ラット[93]およびブタ[93]の肝細胞質には、NADH : (quinone-acceptor) Oxidoreductase と NADPH : (quinone-acceptor) Oxidoreductase が見出されている。前者は NADH のみを電子供与体とし、その活性は Dicoumarol で全く阻害されず、Adenosine Monophosphate (AMP) や 2,4-Dinitrophenol で阻害されると報告されている[94]。また、後者は、NADPH だけでなく弱いながらも NADH 電子供与体とし、さらにその活性は、FMN では無効であるが FAD で促進され、しかも 2,4-Dinitrophenol では全く阻害されないと報告されている[94]。したがって、これら酵素の共存が、細胞質 NADPH-UQ Reductase 活性の本体であるとも考えられる。しかし、ラット肝細胞質 NADPH-UQ Reductase は、NADH、NADPH のどちらも電子供与体とし (Fig. 3)、NADPH と NADH を同時添加しても活性の相加効果が見られないこと (第三章、第一節、Table 15 参照)、また、NADPH-UQ Reductase 活性は 2,4-Dinitrophenol や Dicoumarol により阻害されるが AMP により全く阻害されないこと (Table 14)、さらに、その活性は FAD だけでなく FMN の添加でも促進されることから、細胞質 NADPH-UQ Reductase は NADH : (quinone-acceptor) Oxidoreductase および NADPH : (quinone-acceptor) Oxidoreductase の共存による作用では説明できず、明らかに異なる酵素であることがわかった。

(7) Cu^{2+},Zn^{2+}-SOD との異同

Cadenas らは Cu^{2+},Zn^{2+}-SOD が Superoxide : semiquinone Oxidoreductase 活性を有することを確認し、Superoxide Anion ($O_2^{\cdot-}$) を消去する際に共存するキノン化合物を還元することを報告した[95]。しかしながら、ラット肝細胞質 NADPH-UQ Reductase 活性は、Cu^{2+},Zn^{2+}-SOD 阻害剤である KCN[96] や $O_2^{\cdot-}$ 消去剤である Cytochrome *c* で全く影響を受けなかった (Table 14)。これらの結果は、細胞質 NADPH-UQ Reductase が、Cu^{2+},Zn^{2+}-SOD によるものである可能性を否定する。

Table 14

Effect of Various Quinone Reductase Inhibitors on NADPH-UQ Reductase Activities in Rat Liver Cytosol

	Published Data		IC_{50} for NADPH-UQ Reductase Activity [a]
	IC_{50} (μM)	References	(μM)
Mitochondrial Electron Transport:			
Antimycin A	Stimulation	77)	No Effect
KCN	Stimulation	77)	No Effect
NaN_3	Stimulation	77)	No Effect
Rotenone	Inhibition	77),88)	No Effect
Golgi Membrane NADH Dehydrogenase:			
KCN	Stimulation	8)	No Effect
NADH-cytochrome b_5 Reductase:			
$CaCl_2$	8,000	90)	No Effect
$MgCl_2$	18,000	90)	Stimulation
Microsomal NADPH-UQ Reductase:			
$NADP^+$	No Effect	91)	Inhibition
DT-diaphorase :			
Dicoumarol	0.001-0.1	80),81)	16.0±0.6
Warfarin	35	92)	>7,500
Chlorpromazine	500	80),81)	2,500±60
FAD	500	80),81)	Stimulation
FMN	7,000	85),81)	Stimulation
NADH : (quinone-acceptor) Oxidoreductase:			
AMP	Inhibition	94)	No Effect
Dicoumarol	No Effect	94)	16.0±0.6
2,4-Dinitrophenol	≒160	94)	990±20
NADPH : (quinone-acceptor) Oxidoreductase:			
Dicoumarol	≒40	94)	16.0±0.6
2,4-Dinitrophenol	No Effect	94)	990±20
FAD	Stimulation	94)	Stimulation
FMN	No Effect	94)	Stimulation
Cu^{2+},Zn^{2+}-SOD:			
KCN	Inhibition	96)	No Effect
Plasma Membrane NADH Dehydrogenase:			
Glucagon	Stimulation	18)	No Effect
Insulin	Inhibition	18)	No Effect
NaN_3	Inhibition	18)	No Effect

a) The values are the means ± SD of three experiments.

第三節　考察および小括

考　　察

酸化されやすい UQH_2 同族体が、ラット生体内で、ある一定の還元比率で維持されるには、生体内に何らかの UQ 還元機構が存在する必要があると予想された。そこで著者は、還元比率の高かったラット肝臓ホモジネートの UQ 還元活性を調べたところ、NADH および NADPH 存在下で高い UQ-10 還元活性を示すことを認めた。これらの UQ-10 還元活性のうち、NADH 存在下での UQ-10 還元活性は、ミトコンドリア呼吸鎖の Complex Ⅰ 阻害剤の Rotenone により阻害され、Complex Ⅲ 阻害剤の Antimycin A や Complex Ⅳ 阻害剤の NaN_3 により促進されることから、ミトコンドリア呼吸鎖の酵素によるものであることが示唆された。しかし、NADPH 存在下での UQ-10 還元活性は、NADH 存在時よりも約 2 倍高く、しかもミトコンドリア呼吸鎖阻害剤の影響を全く受けないことから、ラット肝臓には、ミトコンドリア呼吸鎖以外にも UQ-10 を還元する酵素の存在が示唆された。

ラット肝細胞画分の UQ-10 還元活性の分布を調べたところ、肝ホモジネート中の全 UQ-10 還元活性の約 67% が細胞質に存在していた。また、その比活性の比較でも細胞質が最も高いことが認められた。さらに、細胞質への他の細胞画分の混入は、各細胞画分のマーカー酵素活性の測定から 1 ～ 6 % であること (第一章、第二節、Table 2 参照) から、NADPH あるいは NADH の存在下、ラット肝ホモジネート中に認められる UQ-10 還元活性は、主に細胞質に由来するものであることがわかった。しかも、この活性は、細胞質の加熱処理や蛋白分解酵素処理により消失することから、酵素によるものであることが明らかとなった。

Ernster & Forsmark-Andrée [82] は、細胞内で UQ を還元する酵素として、ミトコンドリアや細胞膜の NADH Dehydrogenase の他、ミクロソーム膜の NADH-cytochrome b_5 Reductase や NADPH-cytochrome Reductase、細胞質の DT-diaphorase をあげている。また、ゴルジ体膜の NADH Dehydrogenase も適当な基質の存在下、UQ を還元すると報告されている [8]。さらに Shigemura ら [91] はラット肝ミクロソーム膜画分にはミクロソーム膜電子伝達系酵素とは異なる、UQ-10 還元酵素 (NAD(P)H-UQ Reductase) が存在すると報告している。しかしながら、著者がラット肝細胞質に見出

した UQ-10 還元酵素活性は、NADH より NADPH をおよそ 15 倍よい基質とする NADPH に依存的な酵素であり、上述のミトコンドリア膜[79),87)]やゴルジ体膜[8)]、細胞膜[76)]の NADH に依存的な Dehydrogenase とは明らかに異なる酵素であった。また、ラット肝細胞質へのミクロソーム膜の混入から考えると、ミクロソーム膜の酵素によるものでもないと判断された。実際、細胞質 NADPH-UQ Reductase 活性は、これら他の細胞画分のキノン還元酵素の促進剤や阻害剤に対する挙動が全く異なっていた。

1958 年、Ernster[97)]は、ラット肝細胞質に NAD(P)H 存在下に DCPIP を還元する酵素として DT-diaphorase を発見した。その後、DT-diaphorase は Menadione を還元するキノン還元酵素であることが明らかにされた[93)]。DT-diaphorase は、Menadione の他にも種々のキノン化合物 (主にナフトキノン化合物) やイソプレノイド側鎖の短い UQ-2 のような短鎖 UQ 同族体を電子受容体とするが、UQ-10 のような長鎖 UQ 同族体を殆ど還元しないと報告されていた[80)]。しかし、Takada ら[85)]は、モルモットの肝細胞質中に NADPH 存在下 UQ-10 を還元する酵素活性を認め、この活性が Sephacryl S-200 Gel Chromatography で DT-diaphorase 活性と同じ挙動を示すこと、しかも、両活性が互いに分離されないことから、DT-diaphorase は UQ-10 を還元しうる酵素であることを明らかにした。しかしながら著者の見出したラット肝細胞質 NADPH-UQ Reductase は、電子供与体の効果、安定性、Stimulator の違い、種々の DT-diaphorase 阻害剤 に対する感受性などの比較から、DT-diaphorase と生化学的性質が著しく異なることを示した。さらに、両酵素活性は、Cibacron Blue-binding Agarose Gel Chromatography により完全に分離することから、互いに異なるキノン還元酵素酵素であることが明らかとなった。

Frei ら[27)]はこれら酵素の他、細胞質 NADH : (quinone-acceptor) Oxidoreductase や NADPH : (quinone-acceptor) Oxidoreductase、Cu^{2+},Zn^{2+}-SOD も生体内で UQ を還元しうる酵素の候補にあげている。NADH : (quinone-acceptor) Oxidoreductase と NADPH : (quinone-acceptor) Oxidoreductase は、DT-diaphorase と共に Menadione を還元するキノン還元酵素として、ラット肝細胞質で見出された[93)]。その後、Koli ら[94)]により、ブタ肝細胞質より部分精製され、その諸性質が明らかにされた。また 1988 年、Cadenas ら[95)]は Cu^{2+},Zn^{2+}-SOD が Superoxide : semiquinone Oxidoreductase 活性を有し、$O_2^{\cdot-}$ から O_2 への不均化反応を行う際に、共存するキノン化合物を還元することを報告した。しかしながら、著者がラット肝臓細胞質に認めた NADPH-UQ

Reductase 活性は、これらキノン還元酵素と、その促進剤や阻害剤に対する挙動が全く異なっていた。

これらの結果から、ラット肝細胞質 NADPH-UQ Reductase は、これまでに報告されたキノン還元酵素とは明らかに異なる、新規のキノン還元酵素であることが明らかとなった。

小　括

(1) ラット肝臓には、NAD(P)H の存在下、UQ-10 を還元する酵素が存在した。この酵素は主に細胞質に存在し、電子供与体として NADH よりも NADPH の方をよい基質とする、一種の NADPH 依存性の酵素 (NADPH-UQ Reductase) であった。

(2) ラット肝臓細胞質の NADPH-UQ Reductase と DT-diaphorase は、その性質が異なるだけでなく、Cibacron Blue-binding Agarose Gel Chromatography により互いに分離することから、異なる酵素であることが明らかになった。

(3) ラット肝臓細胞質 NADPH-UQ Reductase は、各種キノン還元酵素の阻害剤に対する挙動から、細胞内に存在する既知のキノン還元酵素とは異なる新規のキノン還元酵素であることが示唆された。

第三章　ラット肝細胞質ユビキノン還元酵素の性質

前章で、NAD(P)H を電子供与体とする UQ 還元酵素活性は、ラット肝臓内に広く分布するが、その大半が特に細胞質に局在することを認めた。しかも、細胞質の UQ 還元酵素活性は、文献既知のキノン還元酵素との諸性質の比較から、新規のキノン還元酵素である可能性が高いことを認めた。そこで本章では、肝細胞質の UQ 還元酵素の諸性質について詳細に検討した。

第一節　肝細胞質ユビキノン還元酵素活性測定条件の基礎的検討

ラット肝細胞質 UQ 還元酵素は新規の酵素と考えられるので、諸性質の検討に先立って、まず、その標準的な活性測定法を確立する必要がある。そこで、本節では UQ 還元酵素活性測定のための基礎的条件の検討を行った。

実験方法

(1) 肝細胞質の調製：

第一章、第二節、実験方法(2)-①に従い、8 週齢 (170～180 g) の Wistar 系雄性ラット (SPF 動物, 日本エスエルシー株式会社) の肝臓より調製した。

(2) UQ-10 還元活性測定法：

UQ-10 還元活性は、基本的には、第二章、第一節、実験方法(3)に従って測定した。ただし、UQ 還元酵素活性測定の基礎的検討の必要上、変更した部分についてはその都度記述した。

(3) 蛋白質量の定量：

第一章、第一節、実験方法(5)に従い定量した。

実験結果

(1) 反応時間ならびに蛋白質量の影響

ラット肝細胞質 UQ 還元酵素による UQ-10 の還元量の経時的変化と、UQ-10 の還元量に及ぼす細胞質の蛋白質量 (酵素量) の影響を Fig. 8 に示した。反応液 1 ml 当たり蛋白質 1 mg 相当の細胞質を加えた時、UQ-10 還元は反応開始から 30 分後まで一定の速度で進行し、UQH_2-10 量が直線的に増加した (Fig. 8A)。また、定常速度で還元が進行した 10 分間に反応時間を固定し、添加する蛋白質量 (細胞質量) を変化させて UQ-10 の還元を見たところ、反応液 1 ml 当たり蛋白質 4 mg までの濃度範囲で UQ-10 の還元は直線的に進行した (Fig. 8B)。なお、電子供与体として NADPH, NADH のどちらを用いた時でも直線関係が得られたが、NADH よりも NADPH を用

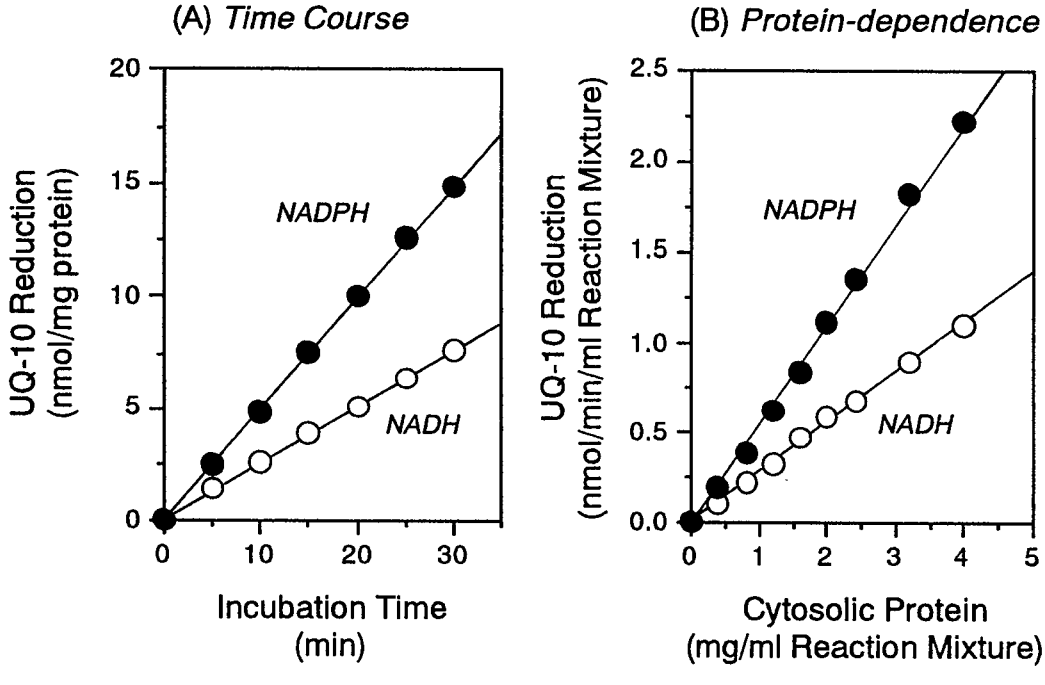


Fig.8 UQ-10 Reduction by Rat Liver Cytosol with NAD(P)H as Hydrogen Donor

(A) Time course of UQ-10 reduction. The reaction mixture (250μl) was consisted of 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 0.08% Triton X-100, 50μM UQ-10, 0.5mM 2-mercaptoethanol, 0.2mM NADPH (●) or NADH (○) and 0.25 mg of cytosolic protein. The reaction mixture was incubated at 37 ℃ for the indicated periods. (B) The effect of various concentrations of cytosolic protein on UQ-10 reduction. The reaction mixture was the same as (A) expect for the indicated quantities of cytosolic protein. The reaction proceeded at 37 ℃ for 10 min.

いた時のの方が、UQ-10 の還元量は、およそ 2 倍高かった。以上から、UQ 還元酵素活性測定には、この化学量論的関係が成り立つ範囲内の細胞質量 (通常、蛋白質量として 1 mg/ml) と反応時間 (10 分間) で測定することにした。

(2) UQ 還元酵素活性の至適温度と至適 pH

ラット肝細胞質 UQ 還元酵素の至適温度および至適 pH について検討した結果を Fig. 9 に示した。37 ℃の反応温度での至適 pH は、NADPH, NADH いずれの電子供与体を用いた時でも pH 7.4 (50mM Tris-HCl 緩衝液) 付近であった。また、NADPH を用いた時の活性は、NADH を用いた時と比較し、約 2～3 倍高かった (Fig. 9A)。

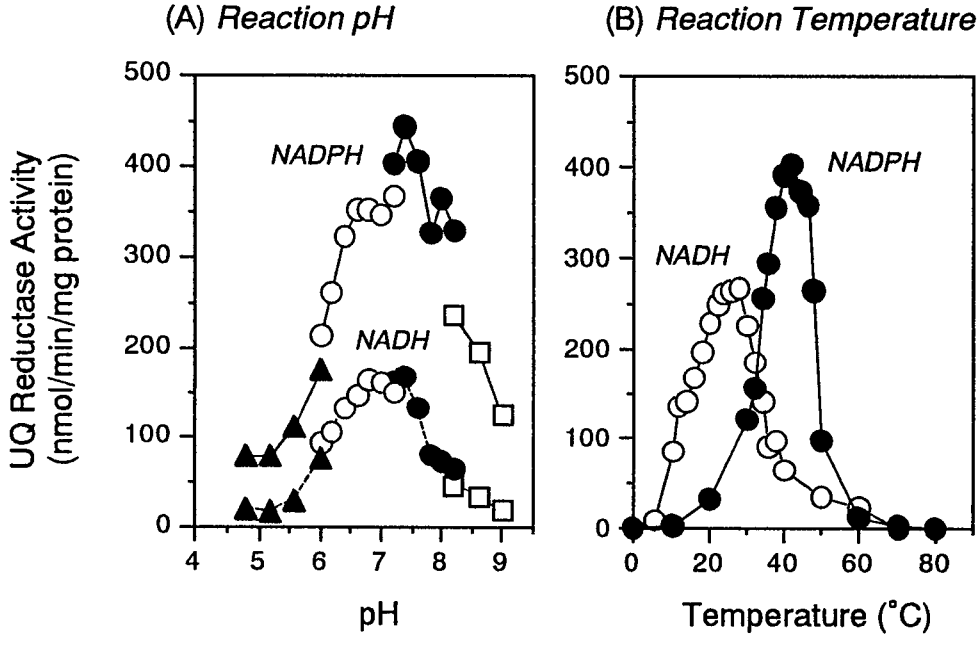


Fig.9 Effect of Reaction pH and Temperature on UQ-10 Reduction by Rat Liver Cytosol

(A) The effect of the reaction pH upon UQ-10 reduction by rat liver cytosol. The reaction mixture (250μl) consisted of various buffers at the indicated pH: ▲ , 50mM citrate buffer (pH 4.8 - 6.0); ● , 50mM K-Pi buffer (pH 6.0 - 7.2); □ , 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.2 - 8.2); ○ , 50mM borate buffer (pH 8.2 - 9.0), containing 0.08% Triton X-100, 50μM UQ-10, 0.5mM 2-mercaptoethanol, 0.2mM NADPH (solid lines) or NADH (dotted lines) and 0.25 mg of cytosolic protein. The reaction mixture was incubated at 37 ℃ for 10 min. (B) The effect of reaction temperature on UQ-10 reaction by rat liver cytosol. The reaction mixture (250μl) consisted of 50mM Tris-HCl buffer (pH7.4) containing 0.08% Triton X-100, 50μM UQ-10, 0.5m 2-mercaptoethanol, 0.2mM NADPH (●) or NADH (○) and 0.25 mg of cytosolic protein. The reaction was incubated at the indicated temperatures for 10 min.

Table 15

Additive Effect of NADPH and NADH on UQ-10 Reduction by Rat Liver Cytosol at 28°C and 37°C

Electron Donors	UQ Reductase Activity (pmol/min/mg protein)	
	28°C	37°C
0.2mM NADPH	200±4	397±23
0.2mM NADH	182±22	104±10
0.2mM NADPH + 0.2mM NADH	205±5	390±20

The values are the means ± SD of three experiments.

また、pH 7.4 での UQ 還元酵素の至適温度は、NADPH を電子供与体とした時は 37～40 ℃付近、NADH を電子供与体とした時は 28～30 ℃付近で、著しく異なっていた (Fig. 9B)。なお、この結果から、NADPH を用いた時の UQ 還元酵素活性と NADH を用いた時の UQ 還元酵素活性とは、異なる酵素によることも考えられた。しかしながら、37 ℃および 28 ℃のいずれの温度で UQ-10 還元活性を測定した時も、NADPH と NADH の同時添加による活性の相加効果が認められない (Table 15) ことから、NADPH と NADH のいずれを電子供与体とした時の UQ-10 還元活性も、単一の酵素によるものと結論づけた。以上の結果から、以後、UQ 還元酵素活性は、ラットの生体内環境を考慮して、pH 7.4, 37 ℃で測定することにした。

(3) 還元生成した UQH_2-10 の再酸化の防止

UQH_2 は非常に酸化されやすい物質であるため、還元生成した UQH_2-10 の再酸化を防ぐ手段を講じない限り、細胞質が本来有する UQ 還元活性を低く見積もる危険性がある。実際、Shigemura ら[91] はラット肝ミクロソーム膜の NAD(P)H-UQ Reductase 活性を好気的条件下で測定する際、還元生成した UQH_2-10 が速やかに再酸化されることを認め、ミクロソーム膜 NAD(P)H-UQ Reductase による UQ-10 還元の過小評価を防ぐ目的で、アルゴンガス下での活性測定を推奨している。そこで UQH_2-10 の酸化防止剤としての 2-Mercaptoethanol の効果について検討した結果を Table 16 に示した。

好気的条件下での UQ-10 還元活性は、窒素ガス下での UQ-10 還元活性と比較して有意に低く、好気的条件下では、明らかに還元生成した UQH_2-10 の再酸化が起

Table 16
Effect of 2-Mercaptoethanol on UQ-10 Reduction by Rat Liver Cytosol

Conditions	UQ Reductase Activity (pmol/min/mg protein)	
	+ 2-Mercaptoethanol	-2-Mercaptoethanol
NADPH:		
Air	450±32	359±27 *
N_2	447±27	443±20
NADH:		
Air	202±2	151±1 *
N_2	202±6	209±9

The values are the means ± SD of three experiments.
* Significant difference at level of $P<0.05$ compared with the presence of 0.5mM 2-mercaptoethanol under the same conditions, using Student's unpaired *t* test.

こっていることを示した。しかしながら、0.5mM 2-Mercaptoethanol 存在下では、好気的条件下でも窒素ガス下に測定した結果と全く同じで、UQ-10 還元活性の低下は認められなかった。なお、2-Mercaptoethanol の添加効果は、電子供与体として NADH, NADPH のどちらを用いた時も認められた。これらの結果から、UQ-10 還元活性の測定は、生成した UQH_2-10 の再酸化を防ぐため、特に支障がない限り、0.5mM 2-Mercaptoethanol 存在下で行った。

(4) 界面活性剤の影響

第二章、第二節において、Triton X-100 は細胞質 NADPH-UQ Reductase 活性を促進することを示した。そこで、NADPH-UQ Reductase 活性に対する各種界面活性剤の効果について検討した。結果は Table 17 に示した。イオン性界面活性剤では、陽イオン性界面活性剤と両イオン性界面活性剤とが NADPH-UQ Reductase 活性を促進したが、陰イオン性界面活性剤は NADPH-UQ Reductase 活性を阻害した。また、非イオン性界面活性剤では、Triton 系界面活性剤が NADPH-UQ Reductase 活性を著しく促進した。しかしながら、Tween 系界面活性剤では Tween 20 のみが活性を促進し、他は逆に活性を阻害した。また、Brij 系界面活性剤や HCO-60 も

NADPH-UQ Reductase 活性を阻害した。次に、0.08% Triton X-100 を用いて NADPH-UQ Reductase 活性促進機構について検討したところ、Triton X-100 は NADPH に対する K_m 値には影響を与えなかった (Triton X-100 存在下 = 13.8 μM, Triton X-100 非存在下 = 14.0 μM) が、V_{max} 値を上昇させた (Triton X-100 存在下 = 103 pmol/min/mg protein, Triton X-100 非存在下 = 344 pmpl/min/mg protein)。また、Triton X-100 は、電子受容体である UQ-10 に対する V_{max} 値に影響を与えなかった (Triton X-100 存在下 = 398 pmol/min/mg protein, Triton X-100 非存在下 = 406 pmpl/min/mg protein) が、K_m 値を低下させた (Triton X-100 存在下 = 85.4 μM,

Table 17

Effect of BSA and Detergents on NADPH-UQ Reductase Activities in Rat Liver Cytosol

Detergents [a]	NADPH-UQ Reductase Activity	
	pmol/min/mg protein	%
None	79.2±3.9	100
BSA	76.6±9.9	94±11
Anionic detergents:		
Sodium Dodecyl Sulfate	15.7±0.5	19±0
Sodium deoxycholate	62.2±3.6	76±3
Cationic detergents:		
Benzalkonium Chloride	441±10	553±37
Cethyltrimethylammonium bromide	144±5	190±11
Amphoteric detergents:		
CHAPS	93.5±2.9	123±6
Non-ionic detergents:		
Triton X-100	442±10	553±24
Triton X-114	440±12	545±17
Triton N-101	377±6	485±16
Tween 20	254±5	312±16
Tween 60	38.3±1.8	61±2
Tween 80	49.6±1.2	61±2
Brij-35	34.8±1.7	46±3
Brij-56	34.0±1.2	44±2
HCO-60	34.1±0.7	42±11

The values are the means ± SD of three experiments.

[a] The concentration of each detergent used is 0.08%.

Triton X-100 非存在下 = 3.3 μM)。UQ-10 は長い疎水性のイソプレノイド側鎖を持つため、そのままでは水系の反応液中に均一に分散しない。これらの結果から見て、Triton X-100 は、UQ-10 を水系溶媒中に均一に分散 (可溶化) させることにより、酵素分子上の UQ 結合部位との接触を容易にしているものと思われる。しかしながら、同じ非イオン性界面活性剤でも、他の非イオン性界面活性剤は、NADPH-UQ Reductase 活性を阻害した。これは、おそらく、界面活性剤ミセル中での UQ-10 の存在状態によるものと思われる。Takada らは、HCO-60 で可溶化した UQ-10 は、HCO-60 ミセルの疎水性の高い中心付近に主に存在し、外部からの還元を受けにくくなることを示している [40]。

非イオン性界面活性剤は蛋白質分子に対し比較的穏和に作用するため、膜酵素の可溶化を初め広く利用されている [98]。それ故、UQ 還元活性の測定には、非イオン性界面活性剤の中で最も強い活性促進作用を有する Triton X-100 を、最も活性を促進した 0.08% の濃度 (第二章、第二節、Fig.5 参照)で添加することにした。

第二節　肝細胞質ユビキノン還元酵素の性質

前節で、ラット肝細胞質 UQ 還元酵素の活性測定の基礎的条件を確立した。本節では、その測定条件下で、ラット肝細胞質 UQ 還元酵素の性質を詳細に検討した。

実験方法

(1) 肝細胞質の調製：

第一章、第二節、実験方法(2)-①に従い、8 週齢 (170～180 g) の Wistar 系雄性ラット (SPF 動物, 日本エスエルシー株式会社) の肝臓より調製した。

(2) UQ-10 還元活性測定法：

第二章、第一節、実験方法(3)に従い測定した。

(3) UQ-7, UQ-8, UQ-9 および UQ-11 還元活性測定法：

0.08 % Triton X-100, 0.5mM 2-Mercaptoethanol, 0.2mM NADPH, 反応液 1 ml 当たり蛋白質1 mg 量のラット肝細胞質と UQ-7, UQ-8, UQ-9 あるいは UQ-11

のいずれかのUQ同族体50μM を含む50mM Tris-HCl緩衝液(pH7.4)からなる反応液250μl を、37℃で正確に10分間保温し、*n*-Hexane/Ethanol (3 : 1)混液3.5 ml を加えることにより反応を停止した。反応液からのUQ同族体の抽出・濃縮操作は第二章、第二節、実験方法②に従い行った。還元生成した各UQH_2同族体の検出・定量は、Okamotoらの方法[42]を用いた。各UQ同族体の還元活性は、1分間あたり蛋白質量として1 mgの細胞質が還元する各UQ同族体量(pmol/min/mg protein)として示した。

(4) 蛋白質量の定量：

第一章、第一節、実験方法(5)に従い定量した。

実験結果

(1) UQ還元酵素の安定性

ラット肝細胞質のNADPH-UQ Reductaseは、-20℃での保存に対しても不安定であり、7日間の保存で約20%にまで活性が低下することを既に示した(第二章、第二節、Fig. 4参照)。この失活の原因として、蛋白分解酵素の関与と酵素分子上のSH基の酸化が考えられたため、種々の蛋白分解酵素阻害剤[金属Protease阻害剤(EDTA)、Serine Protease阻害剤(Phenylmethanesulfonyl Fluoride)、Aspartic Protease阻害剤(Pepstatin A)]とSH化合物や窒素ガス置換の効果を調べたが、いずれもNADPH-UQ Reductaseの失活に対して有効な防御手段ではなかった(Fig. 10)。このように、細胞質NADPH-UQ Reductaseは非常に不安定で、精製酵素を用いての諸性質の検討は困難であった。そこで以後、最も高い活性を有する分画直後の細胞質をそのまま用いて、その諸性質を検討した。

ラット肝細胞質を種々のpHで37℃, 1時間放置後、活性を測定してUQ還元酵素のpH安定性を比較した結果をFig 11に示したが、NADPH, NADHのどちらを電子供与体とした時も、pH 7.5付近での保存が最も安定であった。そこで、pH 7.4でのNADPH-UQ Reductaseの各温度での安定性について検討したところ、NADPH-UQ Reductaseは20℃以上の温度では速やかに失活し、37℃, 1時間の保温後には、およそ50 %が失活した(Fig.12A)。しかしながら、基質の0.2mM NADPHあるいはNADHの共存下では、NADPH-UQ Reductaseは40℃, 1時間の

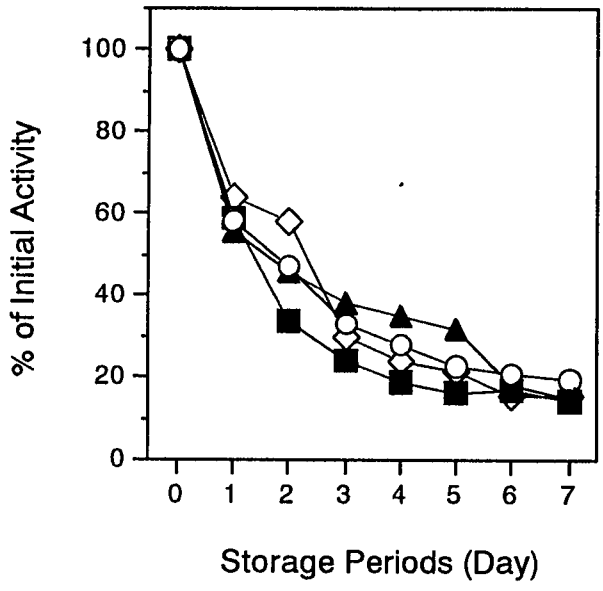


Fig.10 Protective Effect of Protease Inhibitors, 2-Mercaptoethanol and N_2 Gas on Inactivation of NADPH-UQ Reductase in Rat Liver Cytosol

Cytosol was freshly prepared from rat liver and immediately storage at -20 ℃ without (○) or with mixture of protease inhibitors (2mM EDTA, 1mM phenylmethanesulfonyl fluoride and 1 x 10^{-7}M pepstatin A, ▲), 0.5mM 2-mercaptoethanol (■) or N_2 gas (◇). NADPH-UQ reductase activity was determined every day and expressed as a percentage of the initial activity of day 0. The initial activitiy of NADPH-UQ reductase was 473 ± 32 pmol/min/mg protein.

保温でも、ほぼ 100% の活性を維持した。一方、もう一つの基質の 50 μM UQ-10 には、NADPH-UQ Reductase の失活を抑える効果はなかった。また、37 ℃での経時変化を見ると、NADPH および NADH 非存在下での失活は、保温時間に依存しており、3 時間の保温で約 28% にまで低下した。しかしながら、0.2mM の NADPH あるいは NADH の共存下では、3 時間の保温後でも、ほぼ 100% の活性が維持された (Fig.12B)。また、時間が長くなると、50 μM UQ-10 にも若干 NADPH-UQ Reductase の失活を抑える効果が見られた (3 時間の保温で約 55% にまで低下)。

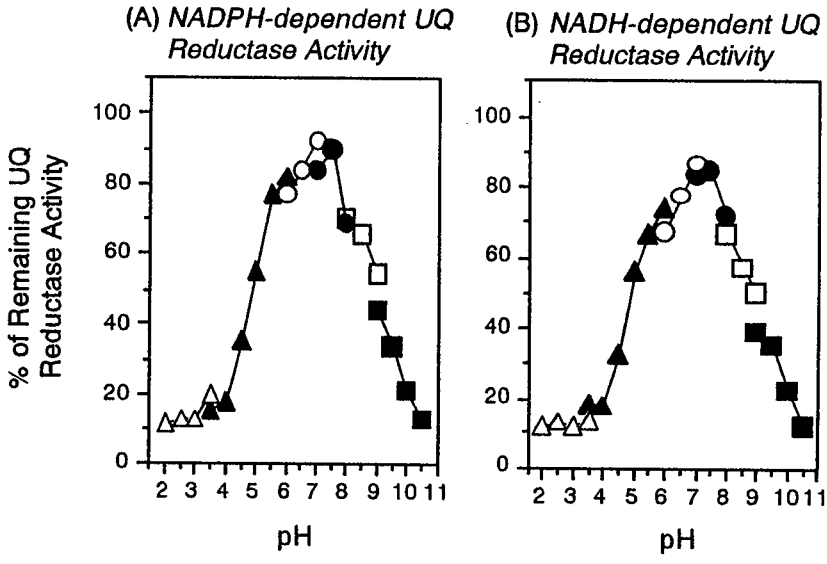


Fig.11 pH Stabilities of UQ Reductase in Rat Liver Cytosol

pH stabilities of NADPH- (A) or NADH-dependent (B) UQ reductase in rat liver cytosol at 4°C. Cytosolic protein (1mg/ml) was incubated with various buffers atthe indicated pH: △ , 10mM glycine-HCl buffer (pH 2.0-3.5); ▲ , 10mM citrate buffer (pH 3.5-6.0); ○ , 10mM K-Pi buffer (pH 6.0 -7.0); ● , 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.0-8.0); □ , 10mM borate buffer (pH 8.0-9.0); ■ ,10mm glycine-NaOH buffer (pH 9.0-10.5). After an 1 h incubation, UQ reductase activities were assayed.

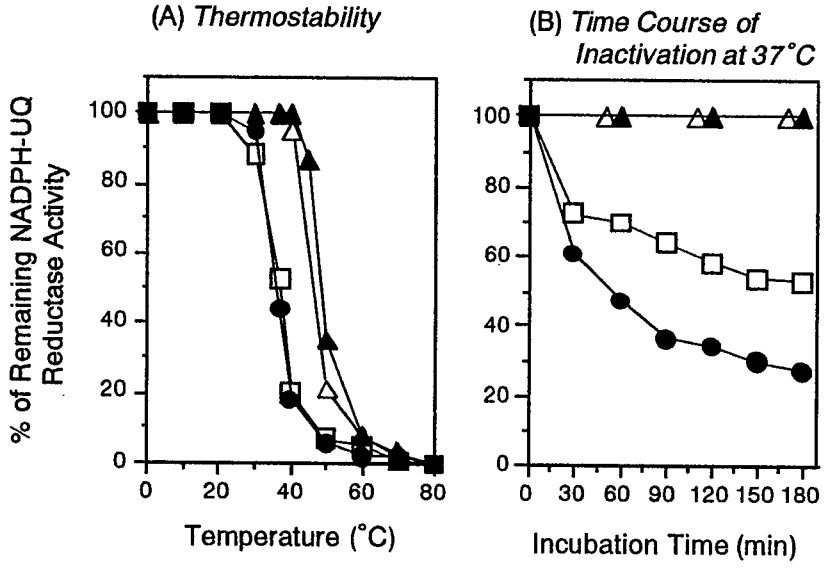


Fig.12 Thermostabilities of NADPH-UQ Reductase in Rat Liver Cytosol

(A) Thermostability of NADPH-UQ reductase in rat liver cytosol. Cytosolic protein (1mg/ml of 50mM Tris-HCl buffer, pH 7.4) was incubated at the indicated temperatures without (●) or with 0.2mM NADPH (▲), 0.2mM NADH (△) or 50μM UQ-10 (□) for 1 h. (B) Time course of NADPH-UQ reductase inactivation in rat liver cytosol. Cytosolic protein (1mg/ml of 50mM Tris-HCl buffer, pH 7.4) was incubated at 37°C for the indicated periods without (●) or with 0.2mM NADPH (▲), 0.2mM NADH (△) or 50μM UQ-10 (□).

(2) 電子供与体

ラット肝細胞質 UQ 還元酵素の、NADPH および NADH に対する K_m 値と V_{max} 値を比較した結果を Table 18 に示した。NADPH は、NADH より約 18 倍優れた電子供与体であった。また、他の還元型 Adenine Nucleotide では、NADPH と NADH の Adenine 構造中の 6 位のアミノ基を欠いた Deamino NADPH と Deamino NADH もまた、作用は劣るが UQ 還元酵素の電子供与体となった。なお、K_m 値と V_{max} 値の比較では、Deamino NADPH は、Deamino NADH より約 18 倍良い基質であった。また、Adenine 構造を完全に欠如した還元型 Nicotinamide Mononucleotide (NMNH) は UQ 還元酵素の電子供与体にはならなかった。還元型 Glutathione (GSH), Cysteine や 2-Mercaptoethanol などの SH 化合物, Ascorbate, Erythorbate も UQ 還元酵素の電子供与体とはならなかった。Dithiothreitol と Dithioerythritol は、非酵素的に UQ-10 を還元した。

Table 18

Reduction of UQ-10 by Rat Liver Cytosol in the Presence of Reduced Adenine Nucleotides, Ascorbate, Erythorbate and SH Compounds

Addition	UQ Reductase Activity [a] (pmol/min/mg protein)	K_m (μM)	V_{max} (pmol/min/mg protein)
None	0	N.D.	N.D.
NADPH	450±20	14.4±2.5	461±28
NADH	209±9	259±22	463±28
Deamino NADPH	413±68	31.7±2.5	459±16
Deamino NADH	160±31	557±46	463±17
NMNH	0	N.D.	N.D.
Ascorbate	0	N.D.	N.D.
Erythorbate	0	N.D.	N.D.
GSH	0	N.D.	N.D.
Cystein	0	N.D.	N.D.
2-Mercaptoethanol	0	N.D.	N.D.
Dithiothreitol	Non-enzymatic reduction		
Dithioerythritol	Non-enzymatic reduction		

The values are the means ± SD of three experiments. N.D., Not determined.

[a] The concentration of each compound used is 0.2mM.

UQ 還元酵素の基質特異性を明らかにするため、酸化型 Adenine Nucleotide による UQ-10 還元活性の阻害効果について検討した (Fig.13A)。 NADPH を電子供与体とした時の UQ 還元酵素活性は、Adenine 構造中の 2' 位にリン酸基を持つ酸化型 Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate ($NADP^+$) やそのアナログである Adenosine 2',5'-Diphosphate (2',5'-ADP) により競合的に阻害された ($NADP^+$ に対する K_i 値 61 μM、2',5'-ADP に対する K_i 値 120 μM)。しかし、2' 位にリン酸基を持たない酸化型 Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD^+) やそのアナログである Adenosine 5'-Monophosphate (AMP)、さらに Adenine 構造を欠く酸化型 Nicotinamide Mononucleotede (NMN) は、NADPH を電子供与体とした時の UQ 還元酵素活性を全く阻害しなかった。同様の結果は NADH を電子供与体とした UQ 還元酵素活性でも認められた ($NADP^+$ に対する K_i 値 59 μM、2',5'-ADP に対する K_i 値

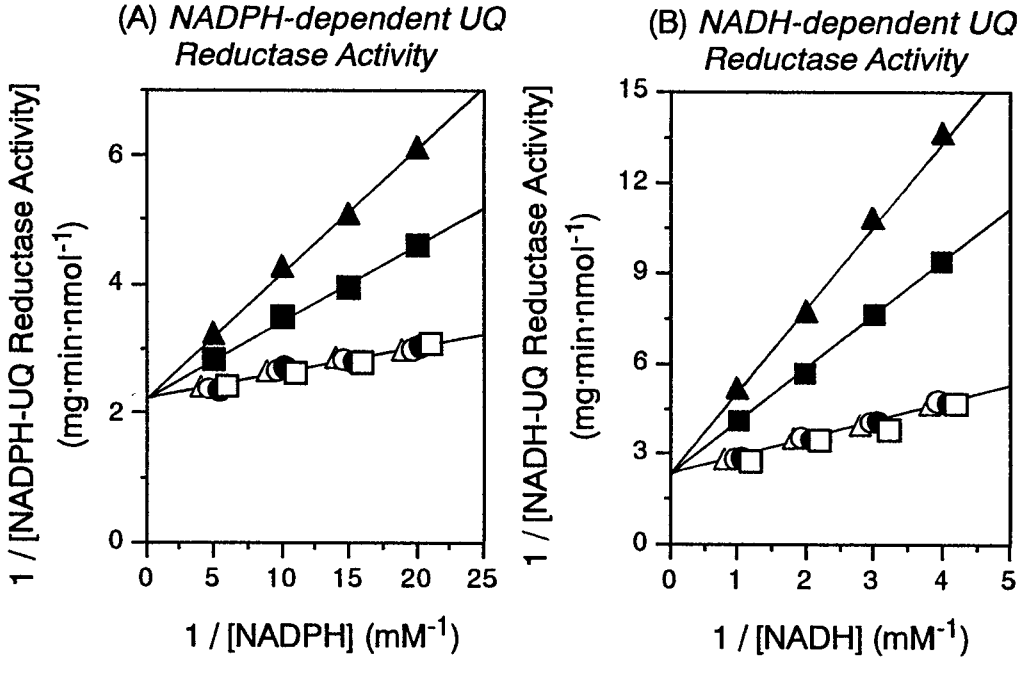


Fig.13 Effect of Oxidized Adenine Nucleotides and Its Analogues on UQ-10 Reduction by Rat Liver Cytosol

The reaction mixture (250μl) consisted of 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 0.08% Triton X-100, 50μM UQ-10, 0.5mM 2-mercaptoethanol, 0.25mg cytosolic protein, the indicated concentrations of NADPH (A) or NADH (B) and one of the following adenine nucleotides (○ , none; △ , 1mM NAD^+; ▲ , 0.2mM $NADP^+$; ● , 1mM NMN; □ , 1mM AMP; ■ , 2',5'-ADP). The reaction mixtures were incubated at 37 ℃ for 10 min.

121 μM) (Fig.13B)。これらの結果から、UQ 還元酵素は、2' 位にリン酸基を持つ Adenine Nucleotide に対して親和性が高く、この構造を有する NADPH を最も適した電子供与体とすると推察された。

(3) 電子受容体

UQ-0～UQ-11 の UQ 同族体の、ラット肝細胞質 NADPH-UQ Reductase の電子受容体としての効果について検討した。

NADPH-UQ Reductase が UQ-10 以外の UQ 同族体も電子受容体とするならば、UQ-10 と他の UQ 同族体が共存する場合、これら UQ 同族体と UQ-10 とが、酵素分子の基質結合部位で競合するため、UQ-10 のみの時と比べ、UQ-10 還元活性が低くなるはずである。そこで、UQ-0～UQ-11 までの UQ 同族体の共存下における UQ-10 還元活性を調べた。結果は Table 19 に示したが、UQ-4 以上の長鎖 UQ 同族体は UQ-10 還元活性を競合的に阻害した。この阻害効果は IC_{50} 値、K_i 値から見る

Table 19

Reduction of UQ Homologues by NADPH-UQ Reductase in Rat Liver Cytosol

UQ Homologues	Inhibition of UQ-10 Reduction		Kinetic Parameters [b]		
	IC_{50} (μM)	K_i [a] (μM)	K_m (μM)	V_{max} (pmol/min/mg protein)	V_{max}/K_m
UQ-0	Stimulation (No Effect [c])		N.D.	N.D.	N.D.
UQ-1	Stimulation (No Effect [c])		N.D.	N.D.	N.D.
UQ-2	Stimulation (No Effect [c])		N.D.	N.D.	N.D.
UQ-3	Stimulation (No Effect [c])		N.D.	N.D.	N.D.
UQ-4	14.6±1.8	2.01	N.D.	N.D.	N.D.
UQ-7	29.6±1.6	2.51	2.35±0.12	433±7	182±14
UQ-8	27.8±6.6	2.54	2.53±0.31	465±10	191±36
UQ-9	44.0±8.5	2.61	2.66±0.48	487±14	200±37
UQ-10	N.D.	N.D.	3.27±0.14	461±20	136±28
UQ-11	84.0±12.5	3.82	4.45±0.42	437±36	110±26

The values (except for K_i) are the means ± SD of three experiments. N.D., Not determined.

a) Determined from Dixon plots.

b) Determined from Lineweaver-Burk plots.

c) Effect of UQ homologues on cytosolic UQ-10 reductase activity in the presence of 5μM Dicoumarol.

限り、イソプレノイド側鎖が短くなるほど強くなる傾向があった。一方、UQ-3 以下の短鎖 UQ 同族体は UQ-10 還元活性を促進した。しかし、この効果は、5 μM Dicoumarol の存在下では全く認められなかった。DT-diaphorase は、UQ-10 を直接的には殆ど還元しないが、Menadione や 1,4-Naphthoquinone などの低級キノン化合物の共存下では、これらが Electron Mediator となって UQ-10 をよく還元する[81]と言われている。したがって、低級 UQ 同族体による UQ-10 還元の促進効果は、共存するDT-diaphorase が原因であると推察された。なお、これらの結果から、NADPH-UQ Reductase は UQ-4 以上の UQ 同族体を基質とすることが明らかになった。

UQ-7～UQ-11 について、その Kinetics Parameter を調べたところ、これら UQ 同族体に対する K_m 値は、前述の阻害実験の結果と同様、イソプレノイド側鎖が短くなるほど小さくなる傾向があったが、NADPH-UQ Reductase の基質になり安さの目安として、各 UQ 同族体の V_{max}/K_m 値を計算すると、基質になり安さは UQ-9 ≧UQ-8≧UQ-7＞UQ-10＞UQ-11 の順であり、ラットの主 UQ 同族体の UQ-9 を最も良い基質とすることが明らかになった。

(4) 各種阻害剤の影響

ラット肝細胞質 NADPH-UQ Reductase 活性は DT-diaphorase 阻害剤の Dicoumarol により阻害されたが、その 50% 阻害濃度 (IC_{50}) は同画分中の DT-diaphorase の 50% 阻害濃度の 2,500 倍に相当した (第二章、第二節、Fig. 6 参照)。しかも、同じく DT- diaphorase 阻害剤である Warfarin ではほとんど阻害されなかった (7.5mM で 20% の阻害) (Table 20)。また、NADPH-UQ Reductase 活性は、*p*-Chloromercuribenzoate や *N*-Ethylmaleimide などの SH 基阻害剤でも阻害された。このことは、酵素の活性発現に遊離の SH 基が重要な役割を持つことを示唆する。さらに NADPH-UQ Reductase 活性は、FAD, FMN のようなフラビン化合物によって促進され、フラビン拮抗物質である Chlorpromazine によって阻害されることから、フラビン酵素であることが示唆された。また、2,4-Dinitrophenol や ATP も NADPH-UQ Reductase 活性を阻害した。しかし、AMP や Adenosine 5'-Diphosphate (ADP) は NADPH-UQ Reductase 活性を全く阻害しなかった。

Table 20

Effect of Various Inhibitors on NADPH-UQ Reductase-catalyzed UQ-10 Reduction

Inhibitors	IC_{50} (μM)	K_i [a] (μM)
Dicoumarol	16.0±0.8	12.4
Warfarin	>7,500	N.D.
FAD	Stimulation	
FMN	Stimulation	
Chlorpromazine	2,500±60	136
p-Chrormercuribenzoic Acid	80.2±8.4	74.7
N-Ethylmaleimide	160±23	N.D.
2,4-Dinitrophenol	990±20	1,000
EDTA	No Effect	
NAD^+	No Effect	
$NADP^+$	1,610±330	61
Deamino NAD^+	No Effect	
Deamino $NADP^+$	No Effect	
NMN	No Effect	
AMP	No Effect	
ADP	No Effect	
ATP	7,250±200	687
2',5'-ADP	N.D.	121
$CdCl_2$	20.7±3.6	N.D.
$CeCl_3$	665±79	N.D.
$CoCl_2$	11,400±3,600	N.D.
$HgCl_2$	202±45	N.D.
$LaCl_3$	660±24	N.D.
$TiCl_4$	1,410±80	N.D.
$ZnCl_2$	45.2±4.5	N.D.

The IC_{50} values are the means ± SD of three experiments. N.D., Not determined.

[a] Determined from Dixon plots.

(5) FAD と FMN の影響

Table 20 で NADPH-UQ Reductase がフラビン酵素であることが示唆されたため、FAD, FMN による NADPH-UQ Reductase 活性の促進効果をさらに詳しく検討した結果を Fig. 14 に示した。NADPH-UQ Reductase 活性は、添加した FAD あるいは FMN の濃度に依存して増大し、最大活性が得られる 100 μM 以上で比較すると、FAD はおよそ 2.6 倍、FMN はおよそ 3.6 倍活性を促進した。

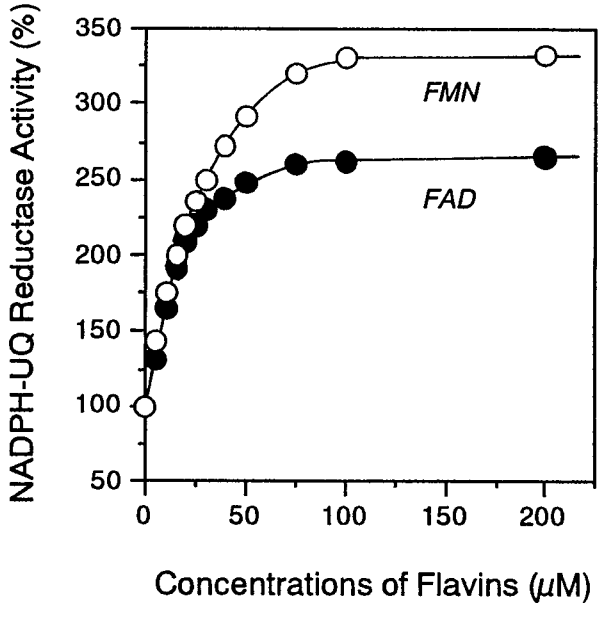


Fig.14 Effect of Flavin Nucleotides upon NADPH-UQ Reductase Activity in Rat Liver Cytosol

NADPH-UQ reductase activity was assayed in the presence of the indicated concentrations of either FAD (●) or FMN (○). NADPH-UQ reductase activity in the absence of both FAD and FMN was 412 pmol/min/mg protein and was defined as 100%.

(6) 金属イオンの影響

ラット肝細胞質 NADPH-UQ Reductase 活性に対する種々の金属イオンの影響は、Table 21 に示した。多くの金属イオンは無効か阻害効果を示したが、Mg^{2+} と Sr^{2+} のみが 10mM の濃度で NADPH-UQ Reductase 活性をおよそ 1.5 倍促進した。この NADPH-UQ Reductase 活性の促進は、Mg^{2+}, Sr^{2+} のどちらの金属イオンを用いた場合でも 6mM から20mM の濃度範囲で最大促進効果が得られた (データは示し

ていない)。なお、UQ-10 を還元するミクロソーム膜の NAD(P)H-dependent UQ Reductase も、10mM の Mg^{2+} により活性が促進されると報告されている [91]。一方、同濃度の Cd^{2+}, Ce^{3+}, Co^{2+}, Cu^{+}, Cu^{2+}, Hg^{2+}, La^{3+}, Ti^{4+}, Zn^{2+} は、いずれも NADPH-UQ Reductase 活性を阻害した。これら阻害作用を有した金属イオンのうち、Cd^{2+}, Cu^{+}, Cu^{2+}, Hg^{2+}, Zn^{2+} は強い SH 基酸化剤として働くことが知られている [99]。そのため、これら金属イオンが酵素分子上の SH 基を酸化することにより NADPH-UQ Reductase 分子を失活させたものと思われる。また、Cu^{+} と Cu^{2+} は強力な UQH_2-10 の酸化作用も有するため (データは示していない)、NADPH-UQ

Table 21

Effect of Metal Ions on NADPH-UQ Reductase Activities in Rat Liver Cytosol

Addition[a]	NADPH-UQ Reductase Activity	
	pmol/min/mg prptein	%
None	450±9	100
EDTA	No Effect	
LiCl	No Effect	
NaCl	No Effect	
KCl	No Effect	
$CaCl_2$	No Effect	
$CdCl_2$	31.7±5.9	7.1±1.3
$CeCl_3$	36.8±3.7	8.4±0.7
$CoCl_2$	179±14	40.8±2.7
CuCl	0	0
$CuCl_2$	0	0
$FeCl_2$	No Effect	
$FeCl_3$	No Effect	
$HgCl_2$	0	0
$LaCl_3$	59.3±9.0	13.5±1.8
$MgCl_2$	684±42	149±5
$MnCl_2$	No Effect	
$NiCl_2$	No Effect	
$SrCl_2$	587±63	139±13
$TiCl_4$	0	0
$ZnCl_2$	86.1±0.7	19.1±0.2

The values are the means ± SD of 3-12 experiments.

[a] 1mM EDTA or 10mM metal ions.

Reductase を直接阻害したためかどうかは明らかでないが、それ以外の金属イオン (Cd^{2+}, Ce^{3+}, Co^{2+}, Hg^{2+}, La^{3+}, Ti^{4+}, Zn^{2+}) は NADPH-UQ Reductase を直接的に阻害したものと推察している。また、Li^{+}, Na^{+}, K^{+}, Ca^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Ni^{2+}, Mn^{2+} や金属キレーターである EDTA は NADPH-UQ Reductase 活性に全く影響を与えなかった。Mg^{2+} と Sr^{2+} の NADPH-UQ Reductase 活性促進機構を詳しく検討すると、10mM の Mg^{2+} と Sr^{2+} は、電子供与体である NADPH に対する K_m 値に影響を与えなかった (金属イオン非存在下 = 14.0 μM, Mg^{2+} 存在下 = 14.8 μM, Sr^{2+} 存在下 = 14.5 μM) が、V_{max} 値をおよそ 1.4 倍上昇させた (金属イオン非存在下 = 394 pmol/min/mg protein, Mg^{2+} 存在下 = 574 pmol/min/mg protein, Sr^{2+} 存在下 = 567 pmol/min/mg protein)。また、10mM の Mg^{2+} と Sr^{2+} は、電子受容体である UQ-10 に対する K_m 値に影響を与えなかった (金属イオン非存在下 = 3.3 μM, Mg^{2+} 存在下 = 3.4 μM, Sr^{2+} 存在下 = 3.4 μM) が、V_{max} 値をおよそ 1.5 倍上昇させた (金属イオン非存在下 = 406 pmol/min/mg protein, Mg^{2+} 存在下 = 603 pmol/min/mg protein, Sr^{2+} 存在下 = 556 pmol/min/mg protein)。これらの結果は、Mg^{2+} と Sr^{2+} が、酵素分子上の基質結合部位への UQ-10 や NADPH の親和性に影響を与えずに酵素の触媒活性をあげていることを伺わせた。

第三節　肝細胞質ユビキノン還元酵素による UQ 還元機構

キノン還元酵素は、ミクロソーム膜の NADPH-cytochrome Reductase のような 1 電子還元酵素と、DT-diaphorase のような 2 電子還元酵素とに分類される。肝細胞質 NADPH-UQ Reductase は、NADPH を電子供与体とし、UQ-4 以上の長鎖 UQ 同族体を還元するキノン還元酵素であるが、1 電子還元酵素であるか 2 電子還元酵素であるかを検討した。

実験方法

(1) 肝細胞質の調製：

第一章、第二節、実験方法(2)-①に従い、8 週齢 (170～180 g) の Wistar 系雄

性ラット (SPF 動物, 日本エスエルシー株式会社) の肝臓より調製した。

(2) NADPH-UQ Reductase 活性測定法：

第二章、第二節、実験方法(2)に従い測定した。

(3) $NADP^+$ の定量：

Klingenberg の方法[100] に従い、$NADP^+$ 量を定量した。

(4) Acetyl 化 Cytochrome *c* の調製：

Kakinuma & Minakami の方法[101] に従い、Acetyl 化 Cytochrome *c* を作成した。得られた Acetyl 化 Cytochrome *c* 溶液の濃度は、0.25% $NaBH_4$ の存否における波長 550 nm の吸光度の差から、還元型 Acetyl 化 Cytochrome c のモル吸光係数 $19.1 \times 10^3\ cm^{-1}M^{-1}$ を用いて算出た。

(5) Acetyl 化 Cytochrome *c* 還元活性測定法：

吸光度測定用キュベットに、0.08 % Triton X-100, 50μM UQ-10, 0.5mM 2-Mercaptoethanol, 0.2mM NADPH, ラット肝細胞質 (蛋白質量 1 mg) と 20 μM Acetyl 化 Cytochrome *c* を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) からなる反応液 1 ml を入れ、波長 550 nm における吸光度変化を 37 ℃で 10 分間連続的に測定した。Acetyl 化 Cytochrome *c* 還元活性は、還元型 Acetyl 化 Cytochrome *c* のモル吸光係数 $19.1 \times 10^3\ cm^{-1}M^{-1}$ を用い、1 分間あたり蛋白質量として 1 mg の細胞質が還元する Acetyl 化 Cytochrome *c* 量 (nmol/min/mg protein) として示した。

(6) 蛋白質量の定量：

第一章、第一節、実験方法(5)に従い定量した。

実験結果

好気的条件下でのキノン化合物の 1 電子還元には、セミキノンラジカルの生成を介した $O_2^{\cdot-}$ の生成が伴うことが知られている[83),84)]。したがって、NADPH-UQ Reductase が 1 電子還元酵素であるならば、中間体として不安定なユビセミキノンラジカル (UQH•) が生成し、その自動酸化に伴う $O_2^{\cdot-}$ の生成が認められるはずである。そこで Acetyl 化 Cytochrome *c* の還元を指標に $O_2^{\cdot-}$ 生成の検出を試みたところ、Cu^{2+},Zn^{2+}-SOD 阻害剤である 1mM KCN を添加した時でさえ、UQ-10 還元に伴う $O_2^{\cdot-}$ の生成は全く認められなかった (Table 22)。同様の結果は、化学発光法を用いた時

Table 22

Effects of Cu^{2+},Zn^{2+}-SOD and Its Inhibitor on Superoxide Anion Generation and NADPH-UQ Reductase Activity of Rat Liver Cytosol

	Acetylated Cytochrome c Reduction (nmol/min/mg protein)	NADPH-UQ Reductase Activity (pmol/min/mg protein)
Complete	0.48±0.11	581±63
+ 100 units Cu^{2+},Zn^{2+}-SOD	0.48±0.12	592±56
+ 1mM KCN	0.44±0.03	596±18
- UQ-10	0.47±0.10	N.D.
- Acetylated Cytochrome c	N.D.	586±59

The values are the means ± SD of three experiments. N.D., Not determined.

にも得られた(データは示していない)。

さらに、細胞質 NADPH-UQ Reductase による UQ-10 の還元量 (*X*, UQH_2-10 生成量) と NADPH の酸化量 (*Y*, $NADP^+$ 生成量) とは化学量論的に対応し、UQ-10, 1 mole の還元に対し 1 mole の NADPH の酸化が認められた (Y=1.013X-0.047) (Fig.15)。これらの結果から、ラット肝細胞質中の NADPH-UQ Reductase は、2 電子還元酵素であると推察された。

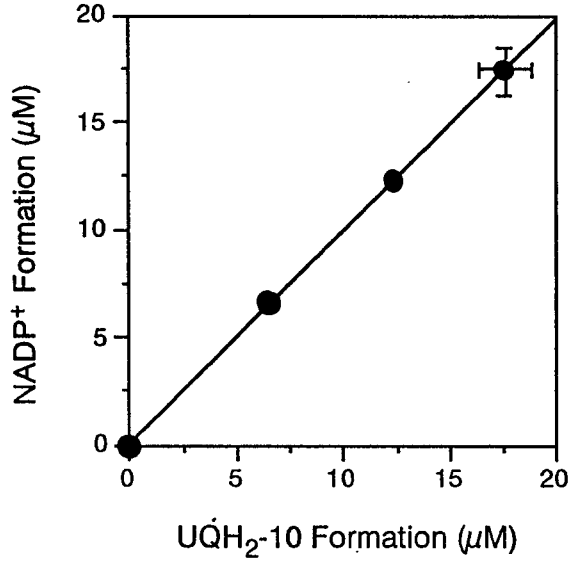


Fig.15 Correlation between NADPH oxidation and UQ-10 Reduction by Rat Liver Cytosol

The values are the means ± SD of three experiments.

第四節　考察および小括

考　察

ラット肝細胞質のUQ還元活性が、NADPH-UQ Reductase、すなわち、NADPH依存性の酵素によることは極めて興味深い。Krebs & Veech ら[102]はラット肝細胞質内のNAD(P)H量とNAD(P)$^+$量を調べており、NADP$^+$/NADPH=0.014, NAD$^+$/NADH=1.164と、Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphateはそのほとんどが還元型のNADPHであるのに対し、Nicotinamide Adenine Dinucleotideは逆にそのほとんどが酸化型のNAD$^+$であることを報告した。さらにGlock & McLean[103]は、ラット肝細胞質中のNADPH濃度が97 ± 13 μMであることを報告している。肝細胞質NADPH-UQ ReductaseのNADPHに対するK_m値 (14.4 ± 2.5 μM) は、この細胞質NADPH量と比較し十分小さい値である。またNADPH-UQ Reductase活性は、ラット肝細胞質に存在する濃度(501 ± 57 μM)以上のNAD$^+$濃度でも全く阻害されなかった。これらの事実は、NADPH-UQ Reductaseの生理的意義を考える上で極めて重要な点と考えている。細胞のNADH産生系が、細胞のエネルギー供給系と連動して制御されているのに対し、NADPH産生系であるペントースサイクルは、NADPH自身が制御因子となっているので、細胞質NADPH-UQ Reductaseは常にUQ還元方向に作用する状態に置かれていることを意味している。

ミトコンドリア膜のNADH Dehydrogenase[104),105)]やSuccinate Dehydrogenase[105)]、ゴルジ体膜[106)]のNADH Dehydrogenaseは、UQ同族体を直接基質とするキノン還元酵素であり、UQ-9やUQ-10のような長鎖UQ同族体の他、UQ-1やUQ-2のような低級UQ同族体もよく還元する。また、細胞質のDT-diaphoraseは、UQ-10のような長鎖UQ同族体より、UQ-0やUQ-1のような低級UQ同族体を良い電子受容体とする[80),81)]。ラット肝細胞質NADPH-UQ Reductaseは、UQ-4以上の長鎖UQ同族体のみを基質とするという点では既知のキノン還元酵素と異なった。しかもUQ-7以上のUQ同族体に対するV_{max}/K_m値の比較より、ラットの主UQ同族体であるUQ-9を最も良い基質とすることを明らかにした。ラット肝臓の内因性UQ-9濃度は、Table 1の結果より、約132 μMと見積もられ、この濃度は肝細胞質NADPH-UQ ReductaseのUQ-9に対するK_m値 (2.66 ± 0.48 μM) と比較し十分大きい値であった。

また、UQ-3 以下の低級 UQ 同族体はラット肝細胞質の UQ-10 還元活性を促進した。Ernster ら[80]は、DT-diaphorase が Menadione や 1,4-Naphthoquinone のような脂溶性側鎖を持たないキノン化合物を Electron Mediator とし、UQ-10 や Cytochrome *c* の還元を促進することを認めている。著者が認めた低級 UQ 同族体共存下での細胞質 NADPH-UQ Reductase 活性の促進も、5 μM Dicoumarol で完全に阻害されることから、DT-diaphorase の作用によるものと判断された。しかし、生体内に、このような効果を示す適当なキノン化合物が存在するかは知られていない。したがって、これによって、直ちに DT-diaphorase が生体内で UQ 還元に大きく貢献しているとはいえない。

さらに NADPH-UQ Reductase 活性の至適 pH は 7.4、電子供与体として NADPH を用いた時の至適温度は 37 ℃ 付近であり、ラット肝臓における生理的濃度の Mg^{2+} (約 10mM)[107] で活性が促進された。また、NADPH-UQ Reductase は、FAD, FMN により活性を促進され、フラビン拮抗物質の Chlorpromazine によって活性を阻害されることから、多くのキノン還元酵素と同様[108]、フラビン酵素であることが示唆された。

肝細胞質には、NADPH-UQ Reductase が UQ 還元活性を発現するのに十分量の電子供与体 (NADPH) と、十分量の UQ-9 が存在する。しかも、この酵素の至適温度や至適 pH、活性促進に要する Mg^{2+} 濃度は、ラット肝細胞内環境そのものであるため、NADPH-UQ Reductase が、内因性 UQ 同族体を還元する条件が全て肝細胞内には整っているといえ、本酵素が重要な生理作用を担っている可能性が推察された。

キノン還元酵素は、その還元機構から、ミクロソーム膜の NADPH-cytochrome Reductase のような 1 電子還元酵素と、DT-diaphorase のような 2 電子還元酵素とに分類される。ミトコンドリア電子伝達系において、NADH Dehydrogenase, Succinate Dehydrogenase, Ubiquinol-cytochrome *c* Reductase (Complex Ⅲ, EC 1. 10. 2. 2) からの Free Radical 産生が確認されており、この産生は UQ の一電子還元により還元生成した UQH・ に起因すると言われている[109),110]。したがって、NADPH-UQ Reductase がミトコンドリア電子伝達系酵素と同様に 1 電子還元酵素であるならば、生成した UQH・ は好気的条件下、速やかに自動酸化されて $O_2^{\cdot-}$ を産生するはずである。しかしながら、NADPH-UQ Reductase による UQ-10 の還元では $O_2^{\cdot-}$ の生成は認められなかった。さらに UQ-10 の還元速度と NADPH の酸化速度とは、還元当量として 1 ： 1 で対応した。これらの結果から、NADPH-UQ Reductase は DT-diaphorase のような 2 電子還元酵素であると推察された。

小　括

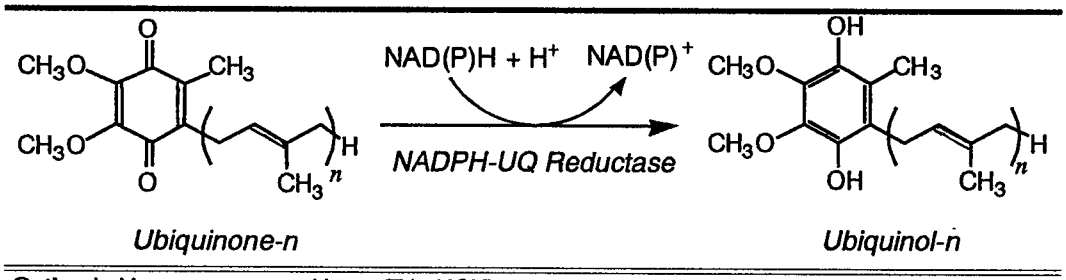
(1) ラット肝細胞質NADPH-UQ Reductaseの諸性質をTable 23の通り明らかにした。NADPH-UQ Reductaseの至適温度と至適pHは、ラット生体内(肝臓)環境に合致した。また、この酵素は、他のキノン還元酵素と同様、フラビン酵素であることが示唆された。

(2) NADPH-UQ Reductaseは、NADPHに依存的な酵素であり、UQ-4以上のUQ同族体を還元した。しかも、その還元は2電子還元であり、ラットの主同族体であるUQ-9を最も良い基質にした。これら基質に対するKinetic Parameter値より、この酵素は、細胞質に高い還元比率で存在するNADPHを利用して生体内のUQ-9を還元するのに十分機能することが明らかになった。

(3) ラット肝細胞質のDT-diaphoraseは、UQ-3以下の低級UQ同族体をElectron Mediatorとし、UQ-10を還元することが示唆された。

Table 23

Properties of NADPH-UQ Reductase in Rat Liver Cytosol



Optimal pH	pH 7.4 (Tris-HCl Buffer)
Optimal Temperature	37°C for NADPH, 28°C for NADH
Stability	Heat Labile (>20°C)
Electron Donors	NADPH (K_m=14.4±2.5μM) ≫ NADH (K_m=259±22μM) Deamino NADPH, Deamino NADH
Electron Acceptors	Ubiquinones: UQ-9 ≧ UQ-8 ≧ UQ-7 > UQ-10 > UQ-11 UQ-4
Stimulators	FAD, FMN Mg^{2+}, Sr^{2+}
Inhibitors	Chlorpromazine Cd^{2+}, Ce^{3+}, Co^{2+}, Hg^{2+}, La^{3+}, Tl^{4+}, Zn^{2+} $NADP^+$, 2',5'-ADP, ATP Dicoumarol, 2,4-Dinitrophenol SH-inhibitors: *p*-Chloromercuribenzoic Acid, *N*-Ethylmaleimide

第四章　ラット肝細胞質ユビキノン還元酵素による脂質膜内ユビキノンの還元

ミトコンドリア内膜の電子伝達系酵素[104),105)]、細胞膜 NADH Dehydrogenase[76)]、ミクロソーム膜 NAD(P)H-UQ Reductase[91)] は、適当な電子供与体の存在下、同じ膜内に存在する長鎖 UQ 同族体を直接還元すると報告されている。著者は、第一章でラット肝臓および腎臓内の UQ 同族体の分布を調べ、UQ 同族体があらゆる細胞画分に存在し、しかも、その各画分における還元比率はほとんど差がなく、組織全体の還元比率とほぼ同じであることを認めた。この結果は、ラット組織内の UQ 同族体が、個々の細胞画分に存在する酵素により還元されるとするよりはむしろ、あらゆる細胞画分の UQ 同族体が一元的に還元されていることを示唆しているように思われる。

前章において、細胞質に長鎖 UQ 同族体に親和性を持つ新規の NADPH-UQ Reductase が存在することを認めた (第二章)。細胞質は全てのオルガネラに接するので、この細胞質 NADPH-UQ Reductase が細胞内の UQ 同族体の還元比率の維持に対して重要な役割を果たしている可能性がある。しかしながら、UQ 同族体は、第一章で示したように主として細胞内の膜画分に分布している。しかも、その脂溶性長鎖イソプレノイド側鎖のため、主に脂質二重膜の中心付近に局在するとされている[111)]。したがって、細胞質 NADPH-UQ Reductase が、生体膜中の UQ 同族体を還元する能力を有するかどうかが興味がある。そこで、本章では、細胞質 NADPH-UQ Reductase が脂質膜内の UQ を還元しうるかどうか、さらに、生体内 UQ の還元比率維持に貢献しているか否かについて検討した。

第一節　肝細胞質ユビキノン還元酵素による脂質膜内ユビキノンの還元

ラット肝細胞質 NADPH-UQ Reductase 活性は、これまで NADPH の存在下、Triton X-100 で可溶化した UQ-10 を基質として測定してきた。しかしながら、ラット生体内の UQ 同族体 (UQ-9 あるいは UQ-10) は、主に脂質膜内に存在する。そのため本節では、肝細胞質 NADPH-UQ Reductase が脂質膜内に組み込まれた UQ を還元しうるか検討した。

実験方法

(1) 肝粗細胞画分の調製：

第一章、第二節、実験方法(2)-①に従い、8週齢 (170～180 g) の Wistar 系雄性ラット (SPF 動物, 日本エスエルシー株式会社) の肝臓より調製した。

(2) NADPH-UQ Reductase 画分とDT-diaphorase 画分の調製：

第二章、第二節、実験方法(4)に従い、Cibacron Blue-binding Bio-gel A-5m Chromatography を行い、0.15M から 3.5M NaCl で溶出される画分を NADPH-UQ Reductase 画分とした。この画分は、ラット肝細胞質中の全 NADPH-UQ Reductase 活性の 99.0% (52.4 nmol UQH_2-10 formed/min/fraction) と、全 DT-diaphorase 活性の 1.8% (128 nmol Menadiol formed/min/fraction) を含んだ。また、50% Ethylene Glycol と 1mM NADH を含む 20mM Tris Base (pH 10) で溶出される画分を DT-diaphorase 画分とした。この画分は、ラット肝細胞質中の全 DT-diaphorase 活性の 93.8% (6,690 nmol Menadiol formed/min/fraction) と、NADPH-UQ Reductase 活性の 0.6% (0.33 nmol UQH_2-10 formed/min/fraction) を含んだ。

(3) Lecithin Liposomes 懸濁液の調製：

ナス型フラスコに 5mM 卵黄 Lecithin (純度: >99%, AVANTI POLAR LIPID, INC.) と 2.5 μM UQ-10 を含むクロロホルム溶液を入れ、ロータリーエバポレーターで溶媒を減圧・留去して Lecithin の薄膜を得た。これに、10mM 卵黄 Lecithin と 5 μM UQ-10 となるように 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を加え、フラスコ内を窒素ガスに置換後、密栓した。1分間激しく Vortex した後、浴槽型超音波処理装置 (NEY ULTRAsonic 6QT/H, NEY) にて 4℃, 20 分間超音波処理し、Lecithin Liposomes 懸濁液としてそのまま使用した。

(4) Lecithin Liposome 膜内 UQ-10 の還元実験：

Lecithin Liposomes 懸濁液 , 0.5 ml に、25mM 2-Mercaptoethanol, 20 μl とラット肝細胞画分 (5.4mg 蛋白質量) あるいは NADPH-UQ Reductase 画分 (NADPH-UQ Reductase 活性として、3.5nmol UQH_2-10 formed/min。蛋白質 5.4 mg の細胞質相当量) あるいは DT-diaphorase 画分 (DT-diaphorase 活性として、2.1 μmol Menadione Reduction/min。蛋白質 5.4 mg の細胞質相当量) を加え、

50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で 980 μl に調整した。反応は、37 ℃で、10mM NADPH, 20 μl の添加で開始した。経時的に反応液の 0.25 ml を採取し、Okamoto らの方法[42]に従い、これに *n*-Hexane/Ethanol (3 : 1, v/v) 混液, 3.5ml を加えて還元生成した UQH_2-10 を抽出・定量した。

(5) ミクロソーム膜内 UQ-9 の還元実験：

ラット肝粗ミクロソーム膜は、凍結・融解を繰り返すことにより、内因性 UQH_2-9 の比率を 25～30 % に低下させた後、実験に用いた。0.25M Sucrose, 10mM NADPH, 0.5mM 2-Mercaptoethanol, 蛋白質量 1.5mg のラット肝細胞質と蛋白質量 1 mg の粗ミクロソーム膜を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) からなる反応液 (0.25 ml) を 37 ℃, 15 分間保温した。*n*-Hexane/Ethanol (3 : 1, v/v) 混液, 3.5ml を加え、還元生成した UQH_2-9 を UQH_2-10 に準じて抽出・定量した。

(6) UQ および UQH_2 同族体の抽出ならびに定量：

第一章、第一節、実験方法(4)に従い、抽出ならびに定量を行った。

(7) 蛋白質量の定量：

第一章、第一節、実験方法(5)に従い定量した。

実験結果

(1) Lecithin Liposome 膜内 UQ-10 の還元

ラット肝細胞質 NADPH-UQ Reductase による Lecithin Liposome 中の UQ-10 の還元は、Fig. 16 に示した。肝細胞質は、NADPH の存在下、2 時間の反応で Lecithin Liposome 中の UQ-10 の約 55 % を還元したが、ミトコンドリアを含め他の細胞画分は全く還元しなかった。

細胞質の代わりに、細胞質の活性に相当する NADPH-UQ Reductase 画分および DT-diaphorase 画分を用いて Lecithin Liposome 中の UQ-10 の還元を試みた結果は、Fig. 17 に示した。NADPH-UQ Reductase 画分は、4 時間で約 40%、8 時間で約 50% の UQ-10 を還元した。一方、DT-diaphorase 画分は、8 時間の反応でも、約 12% の UQ-10 を還元したに過ぎなかった。これらの結果は、ラット肝細胞質による脂質膜内 UQ の還元の主体が、NADPH-UQ Reductase であることを示唆した。

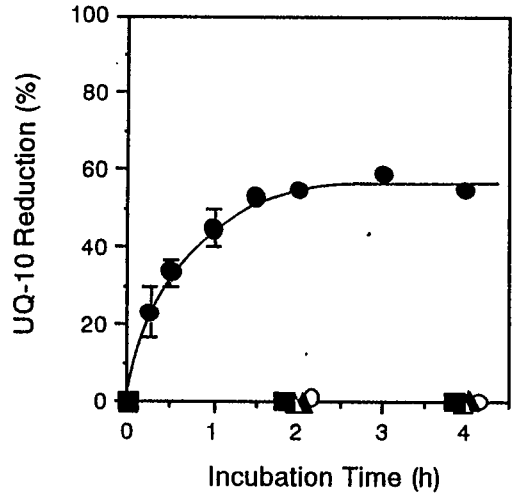


Fig.16 Reduction of UQ-10 in Egg Yolk Lecithin Liposomes by Rat Liver Intracellular Fractions

The reaction mixture consisted of 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 5mM lecithin liposomes (containing 3μM UQ-10), 0.2mM NADPH, 0.5mM 2-mercaptoethanol and 5.4 mg protein of intracellular fractions: ■ , nuclei; △ , mitochondria; ▲ , crude lysosomes; ○ , crude microsomes; ● , cytosol. The reaction was carried out at 37°C. The values are the means ± SD of three experiments.

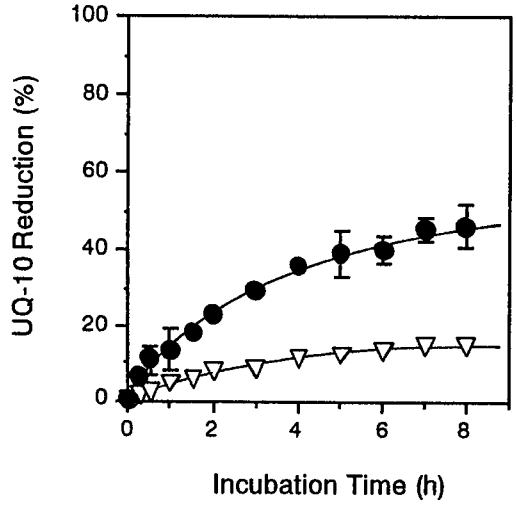


Fig.17 Reduction of UQ-10 in Egg Yolk Lecithin Liposomes by NADPH-UQ Reductase and DT-diaphorase Fractions from Rat Liver Cytosol

The reaction mixture consisted of 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 5mM lecithin liposomes, 0.2mM NADPH, 0.5mM 2-mercaptoethanol and either NADPH-UQ reductase-rich fraction (● , 3.5 nmol UQH_2-10 formed/min NADPH-UQ reductase activity per ml of reaction mixture) or DT-diaphorase-rich fraction (▽ , 2.1μmol meadiol formed/min DT-diaphoase activity per ml of reaction mixture) obtained from Cibacron Blue-binding Bio-gel A-5m chromatography. The reaction was carried out at 37°C. The values are the means ± SD of three experiments.

(2) ミクロソーム膜内 UQ-9 の還元

ミクロソーム膜内の、内因性 UQ-9 のラット肝細胞質 NADPH-UQ Reductase による還元は、Table 24 に示した。反応開始前、約 27% であったミクロソーム膜内の内因性 UQ-9 の還元比率は、反応終了後には約 63% にまで上昇した。また、電子供与体として NADPH の代わりに NADH を用いた時には、約 55% にまでしか上昇しなかった。しかし、細胞質を除くと、NADPH の添加はミクロソーム膜内の内因性 UQ-9 の還元比率をさらに低下させた。これはおそらく、ミクロソーム膜の NADPH-Cytochrome Reductase などの NADPH を基質とするラジカル生成酵素の影響によるものと思われる。好気的条件下で、NADPH がラット肝ミクロソーム膜内の内因性 UQ-9 の還元比率を低下させることは Shigemura ら[91] も報告している。なお、細胞質を除くと、NADH の場合は UQ-9 の還元比率に全く影響を与えなかった。また、細胞質による粗ミクロソーム膜内の UQ-9 の還元は、5 μM Dicoumarol や 10 μM Rotenone で全く阻害されないことから、DT-diaphorase やミトコンドリア酵素による可能性は否定された。

Table 24

Reduction of Endogenous UQ-9 in Microsomes by Cytosolic NADPH-UQ Reductase in the Presence of NAD(P)H

Reaction Mixtures	tUQ-9 Contents (ng)	UQH_2-9/tUQ-9 Ratios (%)		
		Before Incubation	After Incubation	
			NADPH	NADH
Complete	51.8±1.2	26.8±3.7	62.9±1.2 *	54.6±3.6 *
- Cytosol	42.5±2.4	26.2±5.2	19.1±2.1 *	26.9±1.4 *
- Microsomes	9.0±1.7	30.1±6.1	65.1±7.3 *	55.6±4.8 *
+ 5μM Dicoumarol	51.8±3.6	26.6±8.6	62.4±3.1 *	51.5±4.1 *
+ 10μM Rotenone	50.8±2.8	26.7±3	60.8±2.4 *	53.2±2.7 *

The complete reaction mixture (1ml) consisted of 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 0.25M sucrose, 0.2mM NAD(P)H, 0.5mM 2-mercaptoethanol, 1.5mg protein of rat liver cytosol and 1mg protein of rat liver microsomes. Incubation was carried out at 37 °C for 15 min. The values are the means ± SD of three experiments.

* Significant difference at level of $P<0.001$ compared with before incubation, using Student's unpaired *t* test.

第二節　生体内ユビキノンの還元比率に対する細胞質ユビキノン還元酵素の影響

ラット生体内 UQ 同族体の還元比率は、組織ごとに異なることを認めた (第一章、第一節)。しかし、各細胞画分間では差がなく、その組織全体の還元比率とほぼ同じであることを認めた (第一章、第二節)。また、前節で、ラット肝臓細胞質 NADPH-UQ Reductase は、Lecithin Liposome 膜内の UQ-10 や肝ミクロソーム膜の内因性 UQ-9 を還元しうることを示した。これらの事実を統合すると、細胞内各画分の UQ 同族体の還元比率がほぼ同じであるのは、あらゆる細胞画分に接している細胞質 NADPH-UQ Reductase が、これら細胞画分の UQ 同族体還元に中心的役割を果たしていることを示唆する。そこで、ラット生体内各組織の細胞質 NADPH-UQ Reductase が、当該組織の UQ 同族体の酸化還元比率に対してどのような影響を与えているかを検討した。

実験方法

(1) 組織ホモジネートおよび細胞質の調製：

第一章、第二節、実験方法(2)-①に従い、8 週齢 (170～180 g) の Wistar 系雄性ラット (SPF 動物, 日本エスエルシー株式会社) の組織より調製した。

(2) 血漿の調製：

第一章、第三節、実験方法(2)に従い調製した。

(3) UQ および UQH_2 同族体の抽出ならびに定量：

第一章、第一節、実験方法(4)に従い行った。

(4) NADPH-UQ Reductase 活性測定法：

第二章、第二節、実験方法(2)に従い測定した。

(5) 蛋白質量の定量：

第一章、第一節、実験方法(5)に従い定量した。

実験結果

ラット各組織ホモジネートの UQ-9 の還元比率と、それら組織の細胞質中の NADPH-UQ Reductase 活性との関係を調べた結果を Fig. 18 に示した。NADPH-UQ

Reductase 活性は、測定した全ての組織の細胞質に認められ、しかも、その比活性 (Y, pmol/min/mg protein) の対数と組織ホモジネート中の UQ-9 の還元比率 (X, %) との間に高い正の相関関係が得られた ($Y=3.95 \times 10^{0.0233x}$, $r=0.899$ ($P<0.01$))。この結果は、各組織の細胞質 NADPH-UQ Reductase が、それら組織中の UQ 同族体の還元に対し、中心的役割を果たしていることを示している。

ただし、血漿は例外で、UQ-9 の還元比率が、約 80%と肝臓に匹敵する高値にも関わらず、NADPH-UQ Reductase 活性が全く認められなかった。

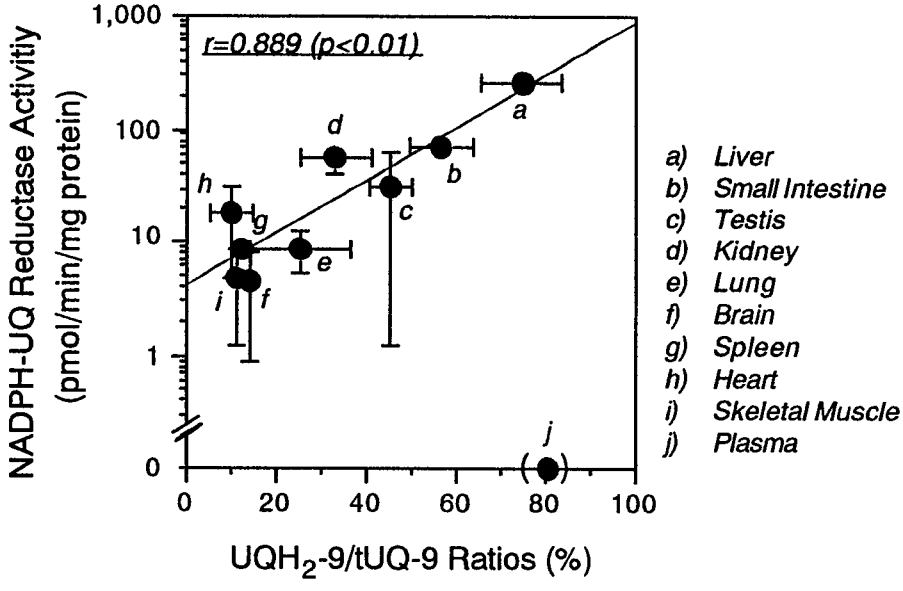


Fig.18 Relationship between UQH_2-9/tUQ-9 Ratios and Cytosolic NADPH-UQ Reductase Activities in Rat Tissues

The values are the means ± SD of three experiments.

第三節　考察および小括

考　　察

ラット肝細胞質 NADPH-UQ Reductase は、Lecithin Liposome およびミクロソーム膜に含まれる UQ-10 を還元した。NADPH-UQ Reductase 活性は、ラット肝臓以外の組織の細胞質中にも認められ、しかも、その活性の強さと各組織中の UQ-9 の還元比

率との間には高度の正の相関関係が認められた。これらの事実は、少なくともラットでは細胞質 NADPH-UQ Reductase が、各細胞画分の UQ 同族体を一定の還元比率に維持するのに中心的役割を担っているとの考え方を支持する。

脂質二重膜の疎水部に存在する[111] UQ を、細胞質に存在する NADPH-UQ Reductase がどのような機構で還元するかは非常に興味がある。Chazotte ら[112]は、蛍光ラベルした UQ を用いて、Liposome 膜内の UQ が自由に脂質膜内を移動 (膜表面に対して水平の動き) できることを確認した。Fato ら[113]は、Liposome 膜と Mitochondria 膜における UQ-3 の拡散定数がほぼ同じであることを報告した。また、Futami ら[114]は、脂質二重膜の中心部に存在している UQ-10 の Benzoquinone 骨格部分は、膜表面に対して垂直方向に自由に動くことができ (Flip-Flop 運動)、膜外の親水性領域に存在する水溶性の酸化・還元物質と相互に作用し合うことを報告した。さらに、Ulrich ら[115]も、Liposome 膜内の長鎖 UQ が、電子やプロトンを脂質二重膜の外側から内側に移行させることを認めている。また、Liposome 膜内の UQ の還元は、Dithionite や BH_4^- のような水溶性低分子還元剤[114]の外、DT-diaphorase[85] や Submitochondrial Particle[20]などを共存させても起こることが報告されている。以上の事実から、膜内 UQ は、脂質膜内を水平方向にも垂直方向にもかなり自由に動くことができると考えられ、膜表面に移動してきた UQ が順次脂質膜外に存在する NADPH-UQ Reductase と接触して還元されるものと考えられる。

ラット血漿中の UQ 同族体の還元比率は、ラット肝臓に匹敵したが、NADPH-UQ Reductase 活性は全く認められなかった。Stocker & Suarna[116]は、ヒト血液中や赤血球に強い UQ-1 還元活性が存在していることを確認し、さらに LDL 中の UQ-10 の還元に赤血球細胞膜の酵素が関与していることを示唆した。しかしながら、赤血球膜による UQ-10 還元活性は非常に弱いことを認めている。Kalén ら[13]は、UQ 生合成の前駆体である ^{3}H-Mevalonate を門脈より投与した場合、同位体ラベルされた UQ 同族体が血中に検出されることを確認した。また Elmberger ら[78]はラット血漿中の UQ-9 が、主にリポ蛋白質画分に存在していることを明らかにした。これらの事実は、肝臓で生合成された UQ 同族体が、リポ蛋白質に組み込まれた形で血漿中に供給されることを示している。したがって、血漿中の UQ 同族体の高い還元比率は、分泌源の肝臓の反映と思われる。

小　括

(1) ラット肝細胞質 NADPH-UQ Reductase が、Lecithin Liposome 膜やミクロソーム膜中の UQ 同族体を還元することを明らかにした。

(2) 細胞質 NADPH-UQ Reductase は、ラット生体内のあらゆる組織に存在していた。しかも、その比活性の対数と組織中の UQ 同族体の還元比率との間に正の相関関係が認められ、細胞質 NADPH-UQ Reductase は各組織中の UQ 同族体の還元に対し、中心的役割を演じていることが示唆された。

(3) ラット血漿には、NADPH-UQ Reductase 活性が全く認められないのにも関わらず、肝臓に匹敵する高い還元比率の UQ 同族体が存在したが、これは、血漿中の UQ 同族体が、リポ蛋白質に組み込まれた形で肝臓から分泌されているためであると推察された。

第五章　ラット肝細胞質ユビキノン還元酵素の脂質過酸化反応抑制効果

UQH_2 の抗酸化作用は、1966年 Mellors and Tappel [19] がミトコンドリア膜に誘導した脂質過酸化反応を UQH_2-6 が抑制することを報告して以来、Liposomes 膜などの生体膜モデル [24)-26)] を初め、LDL [27)-29)]、ミトコンドリア膜 [20)-22)] や、他の細胞内オルガネラ膜 [23)] などで報告され、UQH_2 が α-Tocopherol に匹敵する強い抗酸化作用を示すとした報告もある [25),27),28)]。UQH_2 の直接的な抗酸化作用 (Fig.19, *Reaction 1*) は、Liposomes 膜を用いた実験で証明されている [24)-26)]。また、UQH_2 は、α-Tocopherol 共存時には、脂質膜内に生じた脂質ラジカルとの反応で生じた α-Tocopheroxyl Radical を、α-Tocopherol に再生することにより、間接的に脂質過酸化反応を抑制することも報告されている (Fig.19, *Reaction 2*) [25),30),31)]。一方、Landi らの研究グループは、Liposomes 膜 [117)-120)] や LDL [121)] に誘導した脂質過酸化反応に対し、UQ-3 以下の UQ 同族体が酸化型のままでも抗酸化作用を発現することを認めた。しかしながら、

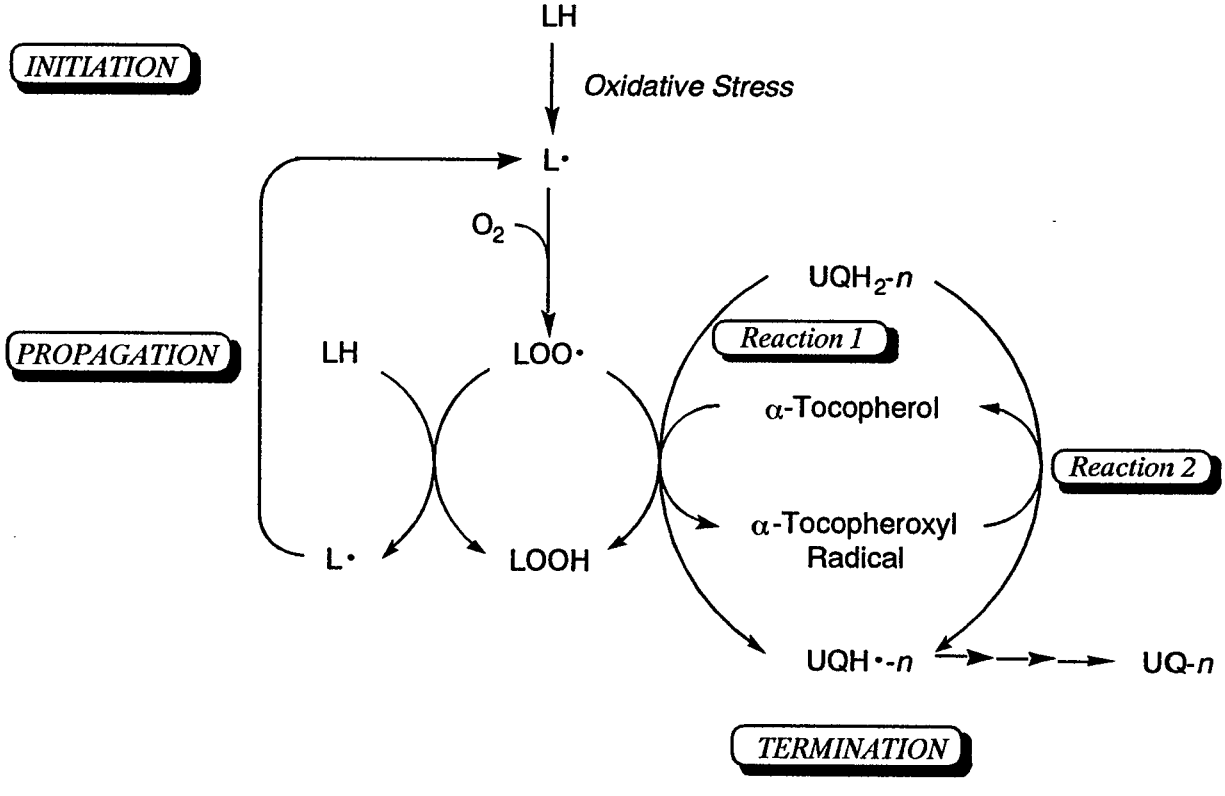


Fig. 19　Sites of Antioxidant Action of Ubiquinol and α-Tocopherol as Inhibitors of Lipid Peroxidation

LH, lipids containing unsaturated fatty acid(s); L•, carbon based lipid radical; LOO•, lipid peroxyl radical; LOOH, lipid peroxide; UQH_2-*n*, ubiquinol-*n*; UQH•-*n*, ubisemiquinone-*n*; UQ-*n*, ubiquinone-*n*.

UQ-9 や UQ-10 のような長鎖 UQ 同族体は、*in vitro* では還元型の UQH_2 同族体のみが抗酸化作用を有するとされている。しかし、*in vivo* の実験では、酸化型の UQ 同族体の投与でも抗酸化作用が認められている。すなわち、動物への UQ の前投与は、虚血・再環流時における組織の酸化的損傷を防御したり [35)-37)]、CCl_4 や Ethanol によるラジカル性肝障害を軽減することが報告されている [32)-34)]。しかしながら、生体に投与された UQ は、そのかなりの部分が還元型の UQH_2 として検出される [40),41)]ので、UQ 同族体の抗酸化作用は、生体内で速やかに UQH_2 同族体へ還元され発現されたものと思われる。

著者は、前章までの検討で、ラット肝細胞質に脂質膜内の UQ をも還元する NADPH-UQ Reductase が存在することを明らかにした。また、この酵素活性は生体内のあらゆる組織の細胞質に存在し、しかも、その活性の強さと組織全体の UQ の還元比率との間に正の相関が認められた。換言すれば、細胞質 NADPH-UQ Reductase が、組織全体の UQ 同族体の還元比率の維持に対し中心的役割を演じている可能性が示された。UQH_2 同族体は強い抗酸化作用を有するので、これらの事実から、細胞質 NADPH-UQ Reductase は、生体膜中の UQ 同族体の還元を介して、生体内抗酸化機構に寄与していることが予想された。そこで著者は、ラット肝細胞質 NADPH-UQ Reductase が、脂質膜内に存在する UQ 同族体の還元を介して、脂質過酸化反応を抑制するか検討した。

第一節　細胞質ユビキノン還元酵素による 2,2'-Azobis (2,4-dimethylvaleronitrile) 誘導 Liposomes 膜脂質過酸化反応の抑制

ラット肝細胞質 NADPH-UQ Reductase は、脂質膜中の UQ を還元した (第四章)。UQH_2 は Liposomes 膜 [24)-26)] だけでなく、LDL [27)-29)] やミトコンドリア膜などの生体膜 [20)-23)] でも強い抗酸化物質として働くため、NADPH-UQ Reductase は脂質膜中の UQ の還元を介して、生体の過酸化抑制に働くことが期待される。脂溶性アゾ化合物である 2,2'-Azobis (2,4-dimethylvaleronitrile) (AMVN) は、好気的条件下、脂質膜内で温度依存的に分解してペルオキシラジカルを生成し、一定の速度で脂質過酸化反応を誘導することが知られている [122)-124)]。しかも、AMVN 誘導脂質過酸化反応は、膜外の親水

性部分に存在する水溶性抗酸化剤の直接的な影響 (抗酸化作用) を受けないため [125]、脂溶性抗酸化物質の抗酸化能を比較・検討する上で有用な化合物である。そこで、ラット肝細胞質 (NADPH-UQ Reductase) と NADPH から成る UQ 還元系が、Lecithin Liposomes 膜内の UQ-10 の還元を介して AMVN で誘導した脂質過酸化反応を抑制するか検討した。

実験方法

(1) 肝細胞質の調製：

第一章、第二節、実験方法(2)-①に従い、8 週齢 (170～180 g) の Wistar 系雄性ラット (SPF 動物, 日本エスエルシー株式会社) の肝臓よりを調製した。

(2) Lecithin Liposomes の調製：

ナス型フラスコに 5mM 卵黄 Lecithin (純度: >99%, AVANTI POLAR LIPID, INC.)、1mM AMVN と 2.5 μM UQ-10 あるいは UQH_2-10 を含むクロロホルム溶液を入れ、ロータリーエバポレーターで溶媒を減圧・留去して Lecithin の薄膜を得た。これに、10mM Lecithin, 2mM AMVN, 6 μM UQ-10 あるいは UQH_2-10 となるように 1mM EDTA と 0.25M Sucrose を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を加えた後、引き続く操作による Lecithin の酸化を防ぐため、フラスコ内を窒素ガスに置換した。1 分間激しく Vortex した後、浴槽型超音波処理装置にて 4℃, 20 分間超音波処理し、Lecithin Liposomes 懸濁液を作成した。これら Lecithin Liposomes 懸濁液のうち、UQ-10 を含有する Liposomes を UQ-10 含有 Liposomes、UQH_2-10 を含有する Liposomes を UQH_2-10 含有 Liposomes とした。また、これとは別に、同様の操作で UQ-10 と UQH_2-10 のどちらも含有しない Lecithin Liposomes 懸濁液を作成し、Control Liposomes とした。

(3) Liposome 膜の AMVN 誘導脂質過酸化反応：

実験方法(2)で調製したいずれかの Lecithin Liposomes 懸濁液, 0.5 ml、25mM 2-mercaptoethanol, 20 μl、10mM NADPH, 20 μl、100mM Glucose-6-phosphate, 100 μl、500 units/ml Glucose-6-phosphate Dehydrogenase (EC 1.1.1.49, オリエンタル酵母工業), 10 μl とラット肝細胞質 (NADPH-UQ Reductase 活性として 450 pmol/min/ml Reaction Mixture) を加え、1mM EDTA と 0.25M

Sucrose を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で終容量 1 ml の反応液を調製した。反応液の調製は全て氷冷下 (4℃) で行い、温度を 37 ℃に上げることにより反応を開始した。

(4) 脂質の抽出ならびに Conjugated Dienes の定量：

経時的に反応液の 50 μl を採取し、氷冷した 200 μl の Ether/Ethanol (3 : 1) 混液を加えた後、1 分間の Vortex により脂質を抽出した。1,500 x *g*, 10 分間の遠心操作により脂質を含む Ether 層を得、Kohen らの方法 [126] に従い Conjugated Dienes 量を定量した。装置および HPLC 条件は以下に示した通りである。

装置：

Pump : JASCO PU-980 (日本分光)

Detector : JASCO UV-970 (日本分光)

HPLC 条件：

Column : COSMOSIL 5SL (4.6 mm I.D. x 150 mm, ナカライテスク)

Mobile Phase : Methanol/H_2O (95 : 5, v/v)

Flow Rate : 1.0 ml/min

Detection : UV, 234nm

試料中の Conjugated Dienes 含量は、既知量の Conjugated Dienes を含む卵黄 Lecithin の Methanol 溶液 (標準溶液) を用いて作成した検量線より算出した。この標準溶液は、5mM 卵黄 Lecithin と 1mM AMVN からなる Methanol 溶液を 37 ℃で 1 時間保温することにより作成し、Conjugated Dienes 含量は波長 234nmにおける吸光度より算出した (ε=28,000 $M^{-1}cm^{-1}$)。

(5) UQH_2-10 の抽出ならびに定量：

経時的に反応液, 50 μl を採取し、200 μl の 0.25M Sucrose を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) と 3.5 ml の *n*-Hexane/Ethanol (3 : 1) 混液を加えた後、第一章、第一節、実験方法(4)に従い、還元生成した UQH_2-10 を抽出・定量した。

(6) 蛋白質量の定量：

第一章、第一節、実験方法(5)に従い定量した。

実験結果

(1) Control Liposomes に対する UQ 還元系の効果

UQ-10 あるいは UQH_2-10 を含まない Control Liposomes の AMVN 誘導脂質過酸化反応に対する UQ 還元系の抗酸化効果を Fig. 20 に示した。Control Liposomes は、AMVN 誘導脂質過酸化反応の進行に伴い一定の速度で Conjugated Dienes を生成した。この Conjugated Dienes の生成速度は、ラット肝細胞質あるいは NADPH 再生系のどちらか一方を添加した時だけではなく、その両者を添加した時 (完全系) でさえ抑制されなかった。これらの結果から、Liposomes が UQ-10 を含まない場合には、肝細胞質と NADPH 再生系からなる完全系を加えても、AMVN による脂質過酸化反応を直接抑制する効果がないことが明らかになった。

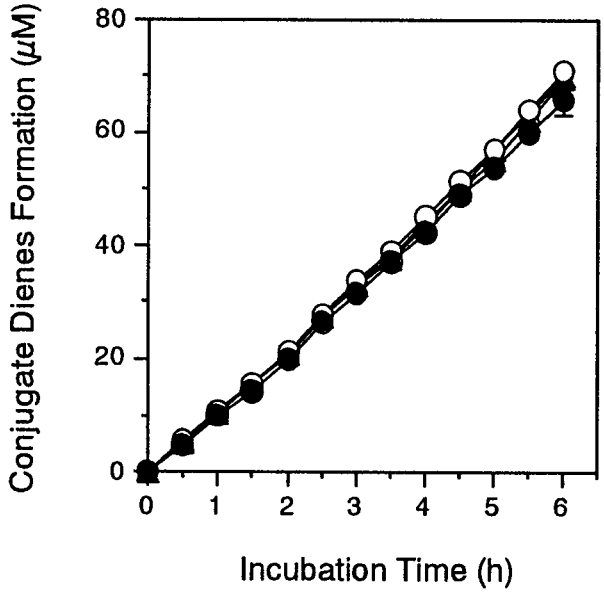


Fig.20 Antioxidant Effect of NADPH-UQ Reductase in Rat Liver Cytosol on AMVN-induced Lipid Peroxidation of Egg Yolk Lecithin Liposomes

The reaction mixture consisted of 50mM Tris-HCl buffer (pH7.4) containing 1mM EDTA and control liposomes (consist of 1mM AMVN and 5mM lecithin) in the absence (△) or presence of NADPH-regenarating system (consist of 0.2mM NADPH, 10mM glucose-6-phosphate and 5 unit of glucose-6-phosphate dehydrogenase per ml of reaction mixture) (▲), 1.45mg of cytosolic protein per ml of reaction mixture (○) or both (●). The reaction was carried out at 37 °C. The values are the means ± SD of three experiments.

(2) UQ-10 含有 Liposomes に対する UQ 還元系の効果

UQ-10 含有 Liposomes の AMVN 誘導脂質過酸化反応に対する UQ 還元系の抗酸化効果について検討した。結果は Fig. 21 に示した。UQ-10 含有 Liposomes 膜は、AMVN 誘導脂質過酸化反応の進行に伴い一定の速度で Conjugated Dienes を生成した。この Conjugated Dienes の生成速度は、ラット肝細胞質あるいは NADPH 再生系のどちらか一方を添加した時には全く抑制されなかったが、その両者を添加した時 (完全系) には有意に抑制された (Fig. 21A)。同時に Liposomes 膜内

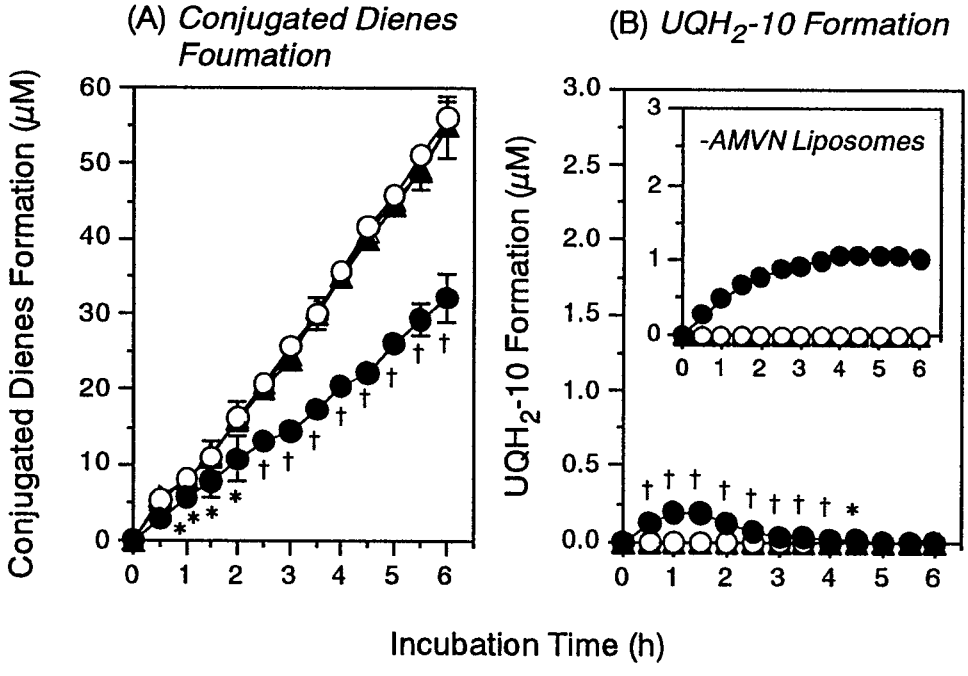


Fig.21 Antioxidant Effect of NADPH-UQ Reductase in Rat Liver Cytosol on AMVN-induced Lipid Peroxidation of UQ-10-containing Liposomes

(A) Time course of conjugated dienes formations. (B) Time course of UQH_2-10 formations. The reaction mixture consisted of 50mM Tris-HCl buffer (pH7.4) containing 1mM EDTA and UQ-10-liposomes (consist of 1mM AMVN, 3μM UQ-10 and 5mM lecithin) or -AMVN liposomes (consist of 3μM UQ-10 and 5mM lecithin) (inserted figure in B) in the absence (△) or presence of NADPH- regenarating system (consist of 0.2mM NADPH, 10mM glucose-6-phosphate and 5 unit of glucose-6-phosphate dehydrogenase per ml of reaction mixture) (▲), 1.45mg of cytosolic protein per ml of reaction mixture (○) or both (●). The reaction was carried out at 37 °C. The values are the means ± SD of three experiments. *,† Significant differences at levels of $P<0.05$ and $P<0.01$ respectively, compared with UQ-10-liposome in the absence of NADPH-regenerating system and cytosol, using Student's unpaire *t* test.

における UQH_2-10 の生成を追跡すると、完全系の存在では、膜内の全 UQ-10 量の約34% (反応開始 6 時間目) が UQH_2-10 として検出された (Fig. 21B, 挿入図)。一方、AMVN で脂質過酸化反応を誘導した場合には、膜内に UQH_2-10 の生成がほとんど認められなかった (Fig. 21B)。しかし、AMVN 誘導脂質過酸化反応は、完全系の存在では有意に抑制されることから、UQ-10 含有 Liposomes 膜内に還元生成した UQH_2-10 が、AMVN で誘導した脂質過酸化反応を抑制するために消費された結果であると思われる。以上の結果から、細胞質 NADPH-UQ Reductase は、NADPH の存在下、脂質膜内の UQ-10 を還元することにより、脂質膜内に誘導した過酸化反応を抑制することが明らかになった。

(3) UQH_2-10 含有 Liposomes に対する UQ 還元系の効果

UQH_2-10 含有 Liposomes の AMVN 誘導脂質過酸化反応に対する UQ 還元系の抗酸化効果について検討した。結果は Fig. 22 に示した。UQH_2-10 含有 Liposomes のみの場合、AMVN 誘導脂質過酸化反応に伴う Conjugated Dienes の生成は、膜内 UQH_2-10 の消失する反応開始 2.5 時間後までほとんど認められなかったが、膜内 UQH_2-10 の消失した 3 時間目以降、ほぼ一定の速度で Conjugated Dienes が生成した。すなわち、脂質膜内の UQH_2-10 が AMVN 誘導脂質過酸化反応を直接阻害することを示した。同様の結果は Yamamoto ら [25] や Cabrini ら [31] も報告している。また、この AMVN 誘導脂質過酸化反応の進行に伴う、膜内 UQH_2-10 の消失ならびに Conjugated Dienes の生成は、細胞質あるいは NADPH 再生系のどちらか一方の添加では抑制されなかった。しかしながら、その両者を添加した時 (完全系) には、膜内 UQH_2-10 の消費は有意に抑制され、反応開始 6 時間後でも膜内の全 UQ-10 量の約 40% が UQH_2-10 として残存していた。また、Conjugated Dienes の生成も、反応開始 6 時間後でもほとんど認められなかった。

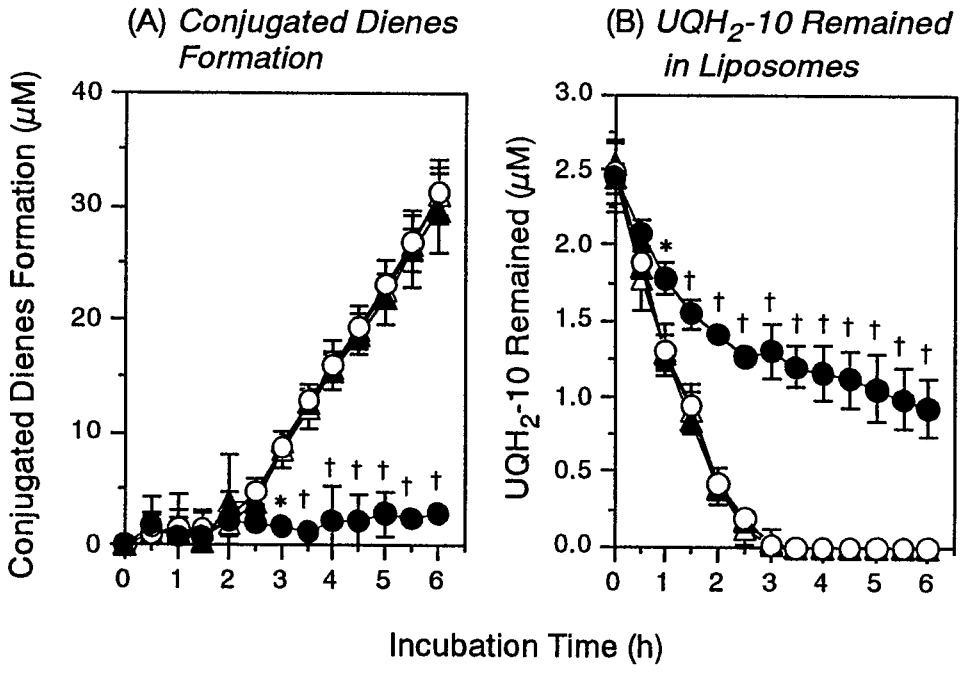


Fig.22 Antioxidant Effect of NADPH-UQ Reductase in Rat Liver Cytosol on AMVN-induced Lipid Peroxidation of UQH_2-10-containing Liposomes

(A) Time course of conjugated dienes formations. (B) Time course of UQH_2-10 oxidations. The reaction mixture consisted of 50mM Tris-HCl buffer (pH7.4) containing 1mM EDTA and UQH_2-10-liposomes (consist of 1mM AMVN, 3μM UQH_2-10 and 5mM lecithin) in the absence (△) or presence of NADPH-regenarating system (consist of 0.2mM NADPH, 10mM glucose-6-phosphate and 5 unit of glucose-6-phosphate dehydrogenase per ml of reaction mixture) (▲), 1.45mg of cytosolic protein per ml of reaction mixture (○) or both (●). The reaction was carried out at 37 °C. The values are the means ± SD of three experiments. *,† Significant differences at levels of $P<0.05$ and $P<0.01$ respectively, compared with UQH_2-10-liposome in the absence of NADPH-regenerating system and cytosol, using Student's unpaire *t* test.

第二節 細胞質ユビキノン還元酵素による 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochloride 誘導ミクロソーム膜脂質過酸化反応の抑制

前節で、肝細胞質 NADPH-UQ Reductase は、Liposomes 膜内の UQ-10 を還元することにより、AMVN 誘導脂質過酸化反応を抑制することが示された。第四章、第一節で、著者は、肝細胞質 NADPH-UQ Reductase がミクロソーム膜内の内因性 UQ-9 をも還元することを確認した。これらの結果から、細胞質 NADPH-UQ

Reductase は、生体膜中の内因性 UQ の還元を介して抗酸化作用を発現することも期待された。そこで、水溶性ラジカル誘導剤である 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochloride (AAPH) を用いて肝ミクロソーム膜に脂質過酸化反応を誘導し、ラット肝細胞質と NADPH から成る UQ 還元系が、内因性 UQ-9 の還元を介して脂質過酸化反応を抑制するか検討した。

実験方法

(1) 肝粗ミクロソーム膜画分および細胞質の調製：

第一章、第二節、実験方法(2)-①に従い、8 週齢 (170～180 g) の Wistar 系雄性ラット (SPF 動物, 日本エスエルシー株式会社) の肝臓より調製した。

(2) ラット肝細胞質の前処理：

蛋白質として 10mg 量のラット肝細胞質、0.2mM NADPH、0.1mM 1-Chloro-2,4-nitrobenzene、2 units の Ascorbate Oxidase (EC 1. 10. 3. 3, オリエンタル酵母工業) と 1.15% KCl を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) からなる反応液, 1 ml を、37 ℃で 10 分間保温した。反応終了後、反応液をあらかじめ 1.15% KCl を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で平衡化した PD-10 カラム (Pharmacia) を用いてゲル濾過し、蛋白質を含む素通り画分を集めて前処理細胞質とした。処理前の細胞質中の GSH 含量は 34.5±2.6 nmol/ml、酸化型 Glutathione (GSSG) 含量は 1.3±1.7 nmol/ml 、Ascorbate 含量は 11.7±2.2 nmol/ml であったが、処理後の細胞質 (前処理細胞質) 中には GSH, GSSG, Ascorbate 共に全く検出されなかった。また、細胞質 NADPH-UQ reductase 活性は、処理前 (456 ± 89 pmol/min/mg protein) と処理後 (446 ± 76 pmol/min/mg protein) で差が認められなかった。

(3) ラット肝ミクロソーム膜の AAPH 誘導脂質過酸化反応：

ラット肝粗ミクロソーム膜画分は、凍結・融解を繰り返すことにより、内因性 UQ-9 の還元比率を低下させた後 (約 25～30 %) 実験に用いた。蛋白質量 1.5 mg の前処理細胞質、蛋白質量 1 mg の粗ミクロソーム膜画分、5mM AAPH、0.2mM NADPH 、 10mM Glucose-6-phosphate 、 5 units Glucose-6-phosphate Dehydrogenase と 1.15% KCl を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) からなる反

応液, 1 ml を調製し、37 ℃で保温することにより反応を開始した。反応は 4 時間行った。

(4) 過酸化脂質測定法：

脂質過酸化反応に伴い増加するMalondialdehyde (MDA) 含量を、Esterbauer らの方法 [127] に従い定量した。反応終了後の試料, 100 μl に対し Acetonitrile, 100 μl を加え、よく撹拌した後、1,500 x *g*, 30 分間遠心することにより除蛋白し、得られた上清中の MDA 含量を HPLC にて測定した。装置および HPLC 条件は以下に示した通りである。

装置：

Pump	: JASCO PU-980 (日本分光)
Detector	: JASCO UV-970 (日本分光)

HPLC 条件：

Column	: Lichrosorb-NH_2 (4.6 mm I.D. x 250 mm, Merck)
Mobile Phase	: CH_3CN/0.03M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) (1 : 9, v/v)
Flow Rate	: 1.0 ml/min
Detection	: UV, 270nm

試料中の MDA 含量は、既知量の MDA 標準溶液を用いて作成した検量線より算出した。MDA 標準溶液は、10mM 1,1,3,3-Tetraethoxypropane の 1% H_2SO_4 溶液を室温で 2 時間放置し、この溶液中に生成した MDA 含量を波長 245nm における吸光度より、分子吸光係数 13,700 $M^{-1}cm^{-1}$ を用いて算出した後、0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で適当な濃度に希釈し作成した。

(5) 蛋白質量の定量：

第一章、第一節、実験方法(5)に従い定量した。

実験結果

GSH と Ascorbate は、AAPH より誘導した水溶性ペルオキシラジカルを直接的に消去する [122]。また、GSH と Ascorbate は、抗酸化作用発現によって消費された生体膜中の α-Tocopherol の再生を介して脂質過酸化反応を防御することが知られている

[122),124),125)]。それ故、前処理をしてGSHとAscorbateを完全に酸化・除去した細胞質を用いて、NADPH-UQ Reductaseがミクロソーム膜の内因性UQの還元を介してAAPH誘導脂質過酸化反応を抑制するか検討した。

AAPHにより、ラット肝ミクロソーム膜に誘導した過酸化反応に伴うMDAの生成は、前処理したラット肝細胞質あるいはNADPH再生系のどちらか一方を添加した時には抑制されなかったが、両者を添加した時(完全系)には有意に抑制された(Fig. 23)。一方、AAPHで脂質過酸化反応を誘導したミクロソーム膜では、完全系の共存でも内因性UQH_2-9は完全に消失してしまったが、AAPHによる脂質過酸化反応を誘導しない場合には、UQH_2-9量が有意に上昇することを認めた(Fig. 24)。これらの結果から、細胞質NADPH-UQ Reductaseは、NADPHの存在下、ミクロソーム膜内の内因性

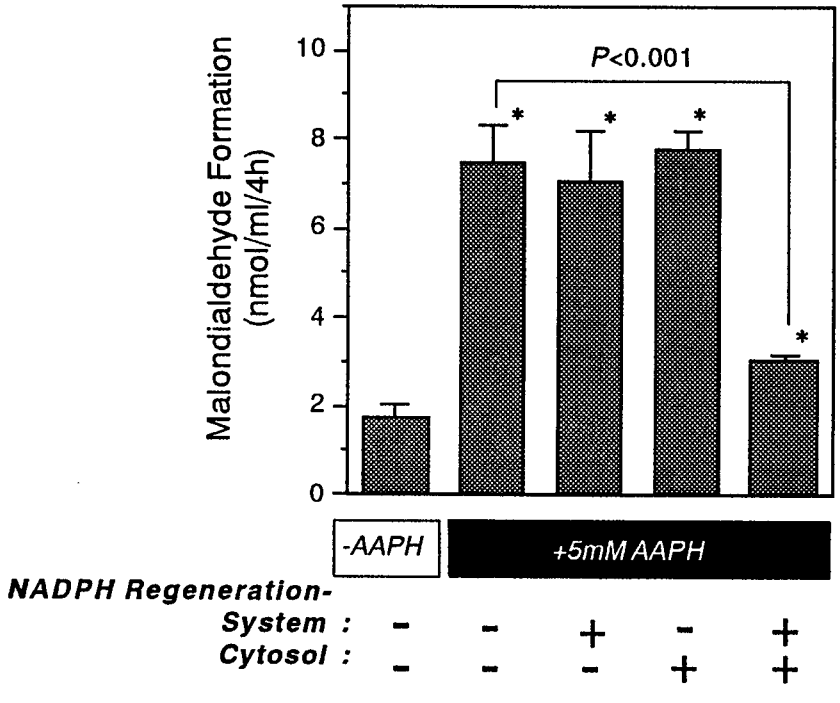


Fig.23 Antioxidant Effect of NADPH-UQ Reductase in Cytosol on AAPH-induced Lipid Peroxidation of Lat Liver Microsomes in the Presence of NADPH

The reaction mixture (1 ml) consisted of 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 1mM EDTA, 1.15% KCl, 5mM AAPH, 10mM glucose-6-phosphate, 5unit of glucose-6-phosphate dehydrogenase, 0.2mM NADPH, 1.5 mg protein of glutathione- and ascorbate-oxidized cytosol and 1 mg protein of microsomes. The reaction was carries out at 37 °C for 4 h. The values are the means ± SD of three experiments. * Significant differences at level of $P<0.001$, compaired with the absence of AAPH, using Student's unpaied *t*-test.

UQ-9 を還元することにより、ミクロソーム膜に誘導した過酸化反応を抑制することが明らかになった。

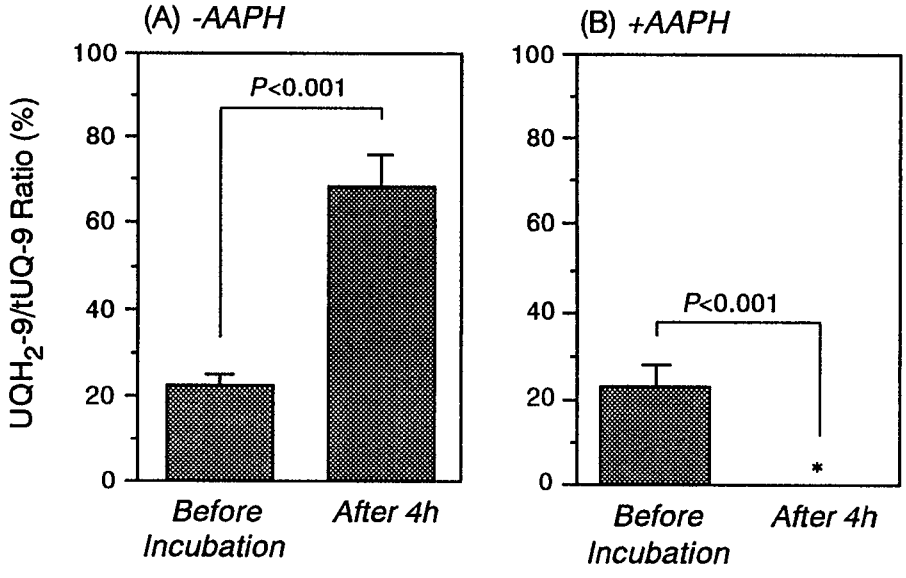


Fig.24 Change of Endogenous UQH_2-9 Contents in Rat Liver Microsomes by AAPH-induced Lipid Peroxidation in the Presence of Cytosol and NADPH

The reaction mixture (1 ml) consisted of 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 1mM EDTA, 1.15% KCl, 10mM glucose-6- phosphate, 5unit of glucose-6-phosphate dehydrogenase, 0.2mM NADPH, 1.5 mg protein of glutathione- and ascorbate-oxidized cytosol and 1 mg protein of microsomes in the absence (A) or presence (B) of 5mM AAPH. The reaction was carried out at 37 ℃ for 4 h. The UQH_2-9/tUQ-9 ratios were measured at 0 and 4 h by the method described in text. The values are the means ± SD of three experiments. * Significant differences at level of $P<0.001$, compaired with the absence of AAPH, using Student's unpaied *t*-test.

第三節　考察および小括

考　察

細胞質 NADPH-UQ Reductase が、脂質膜内の UQ 同族体の還元を介して抗酸化酵素として働くかどうか検討したところ、ラット肝細胞質は、NADPH の存在下、Liposomes 膜内 UQ-10 の還元を介して AMVN で脂質膜に誘導した過酸化反応を抑制することを認めた。さらに、UQH_2-10 含有 Liposomes を用いた実験より、

NADPH-UQ Reductase は、抗酸化作用の結果生じた UQ-10 を、再び UQH_2-10 へと還元 (UQH_2-10 の再生) することを明らかにした。

UQH_2 は脂質ペルオキシラジカル (LOO•) や α-Tocopheroxyl Radical (α-Toc-O•) を消去することにより、それ自身は Ubisemiquinone Radical (UQH•) へと酸化される ([1] 式～[3] 式)。

$$(LOO\cdot)_{lipid} + (UQH_2)_{lipid} \rightarrow (LOOH)_{lipid} + (UQH\cdot)_{lipid} \quad [1]$$

あるいは

$$(LOO\cdot)_{lipid} + (\alpha\text{-Tocopherol})_{lipid} \rightarrow (LOOH)_{lipid} + (\alpha\text{-Toc-O}\cdot)_{lipid} \quad [2]$$

$$(\alpha\text{-Toc-O}\cdot)_{lipid} + (UQH_2)_{lipid} \rightarrow (\alpha\text{-Tocopherol})_{lipid} + (UQH\cdot)_{lipid} \quad [3]$$

(lipid は脂質膜内を示す)

したがって、ラット肝細胞質 NADPH-UQ Reductase が、抗酸化作用の結果、酸化された UQH_2 同族体の再生に働いているのであれば、この酵素が UQH• を基質とするかどうかが問題となる。しかしながら、今回の検討では NADPH-UQ Reductase が UQH• を基質とするかどうかを明らかにすることはできなかった。Landi ら [128] は、UQH_2 がラジカルを消去するために与えることができる電子の数 (Stoichiometric Factor) は理論的には 2 であるにも関わらず、実験的に求められた Liposomes 膜内の UQH_2-3 の Stoichiometric Factor は約 0.5 と低い値であることを示した。同様の結果は Yamamoto ら (Stoichiometric Factor for UQH_2-10 = 1) [25] や Fiorentini ら (Stoichiometric Factor for UQH_2-7 = 0.84～0.98) [26] や Frei ら (Stoichiometric Factor for UQH_2-10 = 1.1) [27] によっても、長鎖 UQH_2 同族体を用いた実験より確認されている。これらの事実から Landi ら [128] や Ingold ら [29] は、1 分子の脂質ラジカルを消去することにより生じた UQH• は、さらにもう 1 分子の脂質ラジカルを消去することなく、その過剰な電子を速やかに水相へ放出して UQ になることを示唆した ([4] 式～[6] 式)。

$$(UQH\cdot)_{lipid} + O_2 \rightarrow (UQ)_{lipid} + (H^+ + O_2^{\cdot-})_{aqu} \quad [4]$$

あるいは、

$$(UQH\cdot)_{lipid} \rightarrow (UQ^{-}\cdot)_{lipid} + (H^+)_{aqu} \quad [5]$$

$$(UQ^{-}\cdot)_{lipid} + O_2 \rightarrow (UQ)_{lipid} + (O_2^{\cdot-})_{aqu} \quad [6]$$

(lipid は脂質膜内, aqu は水相を示す)

したがって、ラット肝細胞質 NADPH-UQ Reductase が UQH・ を UQH_2 へと還元することができなくとも、UQH・ は速やかに UQ へと酸化されるため、細胞質 NADPH-UQ Reductase はこれを基質として再び抗酸化作用を有する UQH_2 を供給することができる。ところで、[4] 式と [6] 式で示した過程で $O_2^{\cdot-}$ が産生する。この $O_2^{\cdot-}$ は不均化反応により H_2O_2 となるが ([7] 式)、これがさらに $O_2^{\cdot-}$ と反応して、より強力な活性酸素種 (Hydroxyl Radical (・OH)) を産生する ([8] 式)。また、$O_2^{\cdot-}$ は Fe^{3+} などの金属イオンを還元して Fe^{2+} を産生し ([9] 式)、これがさらに H_2O_2 と反応して、・OH を産生する (Fenton 反応) ([10] 式)。

$$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2 \quad [7]$$

$$H_2O_2 + O_2^{\cdot-} \rightarrow \cdot OH + {}^-OH + O_2 \quad [8]$$

$$Fe^{3+} + O_2^{\cdot-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2 \quad [9]$$

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + {}^-OH + Fe^{3+} \quad [10]$$

しかしながら、生体内（主に細胞質）にはこの水溶性ラジカルを消去する巧妙なラジカル消去機構 (SOD, Catalase などの酵素系や Ascorbate などの低分子抗酸化剤) が存在するため、$O_2^{\cdot-}$ の産生に起因した脂質過酸化反応の誘導は、生体内ではそれほど問題にはならないものと思われる。事実、ミクロソーム膜を用いた検討で、完全系の存在下、脂質過酸化反応 (TBARS の生成) が促進されることはなかった。

Takeshige ら [20),129)] は、反転したウシ心臓ミトコンドリア膜を用いて内因性 UQ-10 の酸化・還元状態と脂質過酸化反応との関係を研究しており、呼吸基質として NADH の存在下、Antimycin A や CN^- などを用いてミトコンドリア膜内に存在する UQ 同族体を還元状態にしてやるとミトコンドリア膜に誘導した脂質化酸化反応が阻害されることを確認した。同様の結果は、呼吸基質として Succinate を用いたときにも確認されている[22)]。これらの報告は、ミトコンドリア呼吸鎖の電子伝達系において電子を受け取った UQ 同族体が、その電子を Cytochrome bc_1 複合体 (Complex Ⅲ) へと伝達するだけではなく、ミトコンドリア膜に生じた脂質過酸化反応を抑制することにも使っていることを示している。また Kagan ら [23)] は、ラット肝ミクロソーム画分や脳シナプトソーム画分に種々の濃度の UQH_2 同族体を取り込ませると、その濃度に依存して脂質過酸化反応が抑制されることを確認した。このように UQH_2 同族体はミトコンドリア以外の細胞内オルガネラ膜でも抗酸化作用を示すことが確認されているが、膜内 UQ

同族体を還元するミトコンドリアのような機構が存在しない細胞内オルガネラにおいて、UQH_2 同族体はどのようにして供給されているのかがこれまで明らかにされていなかった。しかしながら、今回の検討より、細胞質 NADPH-UQ Reductase は、各種生体膜内に存在する UQ 同族体を還元してその還元比率を常にある一定レベルに維持し、何らかの原因で生体内に酸化的ストレスが生じた場合、酸化的障害から生体を防御するための生体内抗酸化系を形成していることが示唆された。

小　括

ラット肝細胞質 NADPH-UQ Reductase は、NADPH の存在下、 Liposomes膜内の UQ-10 やミクロソーム膜内の内因性 UQ-9 を還元することによりラジカル誘導剤の AMVN や AAPH による脂質過酸化反応に対して抗酸化作用を発現することが明らかとなった。これらのことから細胞質 NADPH-UQ Reductase は、生体膜内に存在する UQ 同族体を還元することにより、その還元比率を常にある一定レベルに維持し、何らかの原因で生体内に酸化的ストレスが生じた場合、酸化的障害から生体を防御するための生体内抗酸化系を形成していることが示唆された。

第六章　ユビキノン-10 投与ラットにおける肝細胞質ユビキノン還元酵素活性の上昇と、四塩化炭素誘導肝炎抵抗性の増大

1980 年, Sugiyama ら[130]は、酸化型の UQ-10 をラット腹腔内に投与することにより、肝臓と心臓のミトコンドリア膜内 Lipoperoxide 含量が有意に低下することを認めた。その後、UQ の前投与は、四塩化炭素 (CCl_4)[32),33)]や Ethanol[33)]、D-Galactosamine[34)]などで引き起こされるラジカル性肝障害、また、組織の虚血・再環流傷害[35)-37)]やエンドトキシンショック[38),39)]に伴う脂質過酸化障害を抑制することが明らかにされた。しかしながら、投与された UQ が、生体内でどのような機構で抗酸化作用を発現するかは正確には把握されていない。著者は、前章までに述べた細胞質 NADPH-UQ Reductase による UQ 還元系が関与しているのではないかと考え、本章では生体 UQ 含量の高いラットを作成し、この点の検討を行った。

第一節　ユビキノン-10 投与のラット肝臓内抗酸化系への影響

α-Tocopherol や Ascorbate の生体内での抗酸化作用機構を知る目的では、しばしば Vitamin E 欠乏動物や Ascorbate 合成能を欠如したラット (Osteigenic Disorder Shionogi ラット) が使用される。しかしながら、UQ は生体内で生合成されること、また、ミトコンドリア電子伝達系の必須構成成分であり、ATP 産生に必要不可欠な物質であるため、UQ 欠乏動物の作成は困難である。実際、UQ 合成酵素の一つである 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A Reductase (EC 1. 1. 1. 34) を阻害する Lovastatin による処理は、生体内 UQ 含量を、20～30 % 程度低下させることが知られているが[131),132)]、この程度の生体内 UQ 含量の減少でも、心機能の低下など生体にとって重篤な病態を引き起こすことが報告されている[132)]。そのため、*in vivo* での UQ の抗酸化作用についての報告は、すべて UQ 投与動物で検討されている[32)-39)]。それ故、著者も細胞質 NADPH-UQ Reductase と共役した膜結合 UQH_2 が、生体抗酸化系でどのような役割を演じているかを *in vivo* で解析するモデル動物として、UQ 投与ラットを用いることにした。本節では、まず、UQ-10 投与によるラット肝臓 UQ 同族体含量ならびに生体内抗酸化因子 (低分子抗酸化物質含量と抗酸化酵素活性) の変動について検討

した。

実験方法

(1) 実験動物の前処理：

8 週齢 (170～180 g) の Wistar 系雄性ラット (SPF 動物, 日本エスエルシー株式会社) 8 匹を、1 群 4 匹として以下の 2 群に分け、それぞれに示した前処理を行った。

① 対照群ラット

2 % HCO-60 を含む生理食塩水を、ラット体重 100 g あたり、0.2 ml を 2 週間毎日腹腔内投与した。

② UQ ラット

2 % HCO-60 で可溶化した UQ-10 を含む生理食塩水 (1 mg UQ-10/ml) を、ラット体重 100 g あたり、0.2 ml を 2 週間毎日腹腔内投与した。

前処理期間中、ラットは室温 21 ± 1 ℃、湿度 55 ± 5 %の恒温・恒湿の施設中で 12 時間ごとの照明下、飼育を行った。固形食 (ラボ MR ストック, 日本エスエルシー株式会社) および水 (滅菌精製水) は自由に摂取させ、解剖 24 時間前に絶食させた。

(2) 肝臓ホモジネートの調製：

前処理終了後のラットより、第一章、第一節、実験方法(2)-①に従い調整した。

(3) 低分子抗酸化物質含量の定量：

① UQ および UQH_2 同族体の抽出ならびに定量：

第一章、第一節、実験方法(4)に従い行った。

② α-Tocopherol の抽出ならびに定量：

α-Tocopherol 含量は、Tamai らの方法 [133] を一部変更して測定した。褐色スピッツ管に試料, 0.5 ml と、6% Pyrogallol, 1 ml、0.27mM EDTA を含有する 150mM K-Pi 緩衝液 (pH 7.4), 0.5 ml, 2 μg/ml 2,2,5,7,8-Pentamethyl-6-hydroxychroman (Ethanol 溶液), 1 ml を加え、70 ℃で 2 分間保温した。60% KOH, 0.2 ml を加えてよく撹拌し、さらに 70 ℃で 30 分間保温した後、*n*-Hexane, 5 ml と H_2O, 2.5 ml を加え、80 rpm, 10 分間機械振とうして α-Tocopherol を抽出した。次に 1,500 x *g*, 10分間遠心し、得られた上層の

n-Hexane 層を別の褐色スピッツ管に分取し、窒素気流下、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を減圧・乾固した。残査に適当量の Ethanol を正確に加え、HPLC の試料とした。定量に用いた HPLC 装置および 分析条件は以下に示した通りである。

装置：

Pump　　: JASCO PU-980 (日本分光)

Detector　　: JASCO 840EC (日本分光)

HPLC 条件：

Column　　: COSMOSIL 10C18

(4.6 mm I.D. x 250 mm, ナカライテスク)

Mobile Phase　: Methanol/H_2O/$NaClO_4$ (1,000 : 2 : 7, v/v/w)

Flow Rate　　: 1 ml/min

Detection　　: ECD

(Applied Potential = +0.6V vs Ag/AgCl, Sensitivity = 8nA)

試料中の α-Tocopherol 含量は、2,2,5,7,8-Pentamethyl-6-hydroxychroman を内部標準とした内部標準法より算出した。

③ Ascorbate および総 Ascorbate の抽出ならびに定量：

Ascorbate 含量は、Coustard & Sudraud の方法 [134] を一部変更して測定した。試料, 50 μl に 200mM Deferoxamine Mesylate, 50 μl と 6.25% メタリン酸, 400 μl を加え、よく撹拌した後、1,500 x *g*, 10 分間遠心し、その上清を Ascorbate 定量用 HPLC 試料とした。これとは別に、試料, 50 μl に 200mM Deferoxamine Mesylate, 50 μl と 20mM Dithioerythritol, 5 μl を加え、よく撹拌した後、10 分間放置した。その後、6.25% メタリン酸, 395 μl を加え、1,500 x *g*, 10 分間遠心し、その上清を総 Ascorbate 定量用 HPLC 試料とした。以上の操作はすべて氷冷下 (4 ℃) で行った。定量に用いた HPLC 装置および 分析条件は以下に示した通りである。

装置：

Pump　　: JASCO PU-980 (日本分光)

Detector　　: JASCO 840EC (日本分光)

HPLC 条件：

Column　　：COSMOSIL 10C18

(4.6 mm I.D. x 250 mm, ナカライテスク)

Mobile Phase　：5mM Cetyltrimethylammonium Bromide と

0.1M KH_2PO_4 を含む H_2O/Methanol (95 : 5, v/v)

Flow Rate　　：0.8 ml/min

Detection　　：ECD

(Applied Potential = +0.6V vs Ag/AgCl, Sensitivity = 8nA)

試料中の Ascorbate 含量および総 Ascorbate 含量は、既知量の Ascorbate を用いてあらかじめピーク高さを基に作成した検量線より算出した。

④ GSH および GSSG の抽出ならびに定量：

Hissin & Hilf の方法[135]に従い、GSH 含量ならびに GSSG 含量を測定した。

(4) 抗酸化酵素活性測定法：

① Catalase 活性測定法：

Aebi の方法[136]に従い、Catalase 活性を測定した。Catalase 活性は、Aebi の示した測定条件下、試料蛋白質 1 mg が 1 分間あたりに分解する H_2O_2 の量 (μmol/min/mg protein) として示した。

② 総 Superoxide Dismutase (SOD) および Mn^{2+}-containing Superoxide Dismutase (Mn^{2+}-SOD) 活性測定法：

Oyanagui の方法[137]に従い、総 SOD 活性 (Cu^{2+},Zn^{2+}-SOD 活性と Mn^{2+}-SOD 活性の和) および Mn^{2+}-SOD 活性を測定した。総 SOD 活性および Mn^{2+}-SOD 活性は、Oyanagui の示した測定条件下、試料の代わりに蒸留水を用いた時の発色 (吸光度値) を 100 % とし、この発色を 50% 阻害する時の試料の活性を 1 NU と定義して、試料蛋白質 1 mg あたりの活性 (NU/mg) として示した。

③ Glutathione Peroxidase (EC 1. 11. 1. 9) 活性測定法：

Paglia & Valentine の方法[138]に従い、Glutathione Peroxidase 活性を測定した。Glutathione Peroxidase 活性は、Paglia & Valentine の示した測定条件下、試料蛋白質 1 mg が 1 分間あたりに酸化する NADPH 量 (nmol/min/mg protein) として示した。

④ Glutathione S-transferase (EC 2. 5. 1. 18) 活性測定法：

Habig & Jakoby の方法[139]に従い、Glutathione S-transferase 活性を測定した。Glutathione S-transferase 活性は、Habig & Jakoby の示した測定条件下、試料蛋白質 1 mg が 1 分間あたりに GSH 抱合する 1-Chloro-2,4-nitrobenzene の量 (nmol/min/mg protein) として示した。

⑤ Glutathione Reductase 活性測定法：

Carlberg & Mannervik の方法[140]に従い、Glutathione Reductase 活性を測定した。Glutathione Reductase 活性は、Carlberg & Mannervik の示した測定条件下、試料蛋白質 1 mg が 1 分間あたりに酸化する NADPH 量 (nmol/min/mg protein) として示した。

(5) NADPH-UQ Reductase 活性測定法：

第二章、第二節、実験方法(2)-①に従い測定した。

(6) DT-diaphorase 活性測定法：

第二章、第二節、実験方法(3)に従い測定した。

(7) 蛋白質量の定量：

第一章、第一節、実験方法(5)に従い定量した。

実験結果

(1) ラットの成長に対する UQ-10 投与の影響

14 日間、UQ-10 (UQ ラット) およびその溶媒 (対照群ラット) を投与したラットの体重変化は Fig. 25 に示した。UQ ラットでは 175 ± 4 g から 200 ± 9 g に、また、対照群ラットでは 175 ± 6 g から 201± 11 g に体重が増加した。両群のラットの成長には差が全く認められなかった。

(2) 肝重量に対する UQ-10 投与の影響

対照群ラットと UQ ラットから摘出した肝臓の湿重量を測定した。対照群ラットの肝湿重量は 5.42 ± 0.61 g、UQ ラットの肝湿重量は 5.40 ± 0.26 g であり、肝湿重量に対する UQ-10 投与の影響は認められなかった。

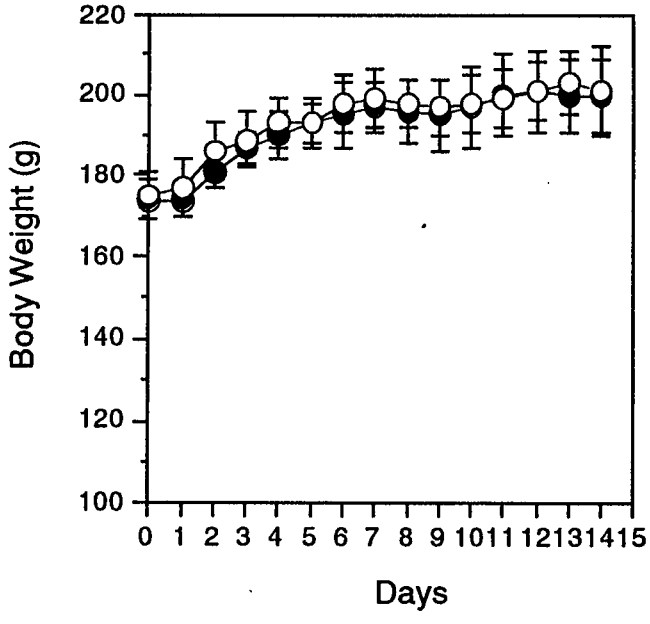


Fig.25 Growth Curves of Control and UQ-10 Supplemented Rats

UQ-10 supplemented rats and control rats were prepared by intraperitoneal injection of 2 ml/kg body weight of UQ-10 (1 mg UQ-10 and 2% HCO-60 in saline) and the same volume of the vehicle (2% HCO-60 in saline) daily for 14 days, respectively. ○ , Growth curve of control rats; ● , growth curve of UQ-10 supplemented rats. The values are the means ± SD of four rats.

(3) 肝臓内 UQ 同族体含量に対する UQ-10 投与の影響

対照群ラットの肝臓には、tUQ-9 の他、その約 10 % 量の tUQ-10 が存在していた (Fig. 26)。しかも、そのほとんどが還元型であった。一方、UQ ラットでは、肝臓内の UQ-9 および UQH_2-9 含量に全く影響を与えずに、tUQ-10 含量を約 4.5 倍増加させた。しかも、そのほとんどが還元型の UQH_2-10 であることから、投与された UQ-10 は、UQH_2-10 へ還元されて肝臓に蓄積されることが認められた。

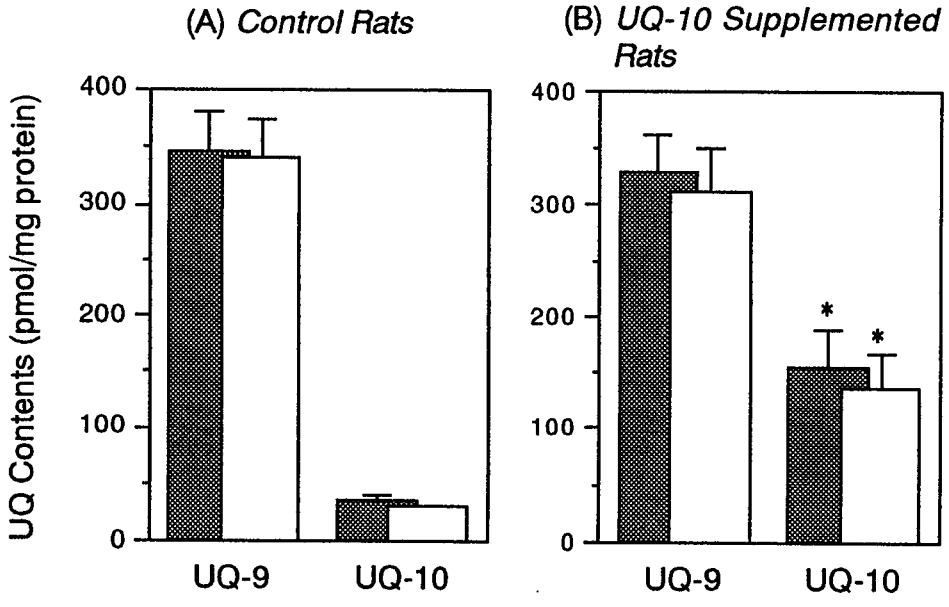


Fig.26 Effect of UQ-10 Supplementation on UQ-9 and UQ-10 Contents in Rat Livers

(A) UQ homologue contents in control rat liver homogenates. (B) UQ homologue contents in UQ-10 supplemented rat liver homogenates. Solid bars, tUQ homologue contents; open bars, UQH_2 homologue contents. The values are the means ± SD of four rats. * Significant difference at level of $p<0.001$ compared with the same UQ or UQH_2 homologues in the control rats, using Studen's unpaired *t* test.

(4) 肝臓内抗酸化因子およびキノン還元酵素活性に対する UQ-10 投与の影響

UQ-10 投与による UQ および UQH_2 同族体以外の生体内抗酸化因子およびキノン還元酵素活性の変動を、肝ホモジネートを用いて検討した結果を Table 25 に示した。ラット肝臓内の低分子抗酸化物質含量、抗酸化酵素活性や DT-aphorase 活性は、UQ-10 投与によって全く変動しなかったが、UQ ラットの NADPH-UQ Reductase 活性は増加傾向にあった。そこで、細胞質を分離して調べたところ、細胞質の NADPH-UQ Reductase 活性は、UQ-10 投与により有意に増加していることが認められた (Fig. 27)。細胞質 NADPH-UQ Reductase が、肝 UQ 量の増加に対応して誘導される事実は、本酵素が細胞の UQ 還元の主体となっていることを示唆しているように思われる。

Table 25

Effect of UQ-10 Supplementation on Antioxidant Contents and Antioxidant Enzyme and Quinone Reductase Activities in Rat Liver Homogenate

		Control Rats	UQ-10 Supplemented Rats
Low Molecular Weight Antioxidants:			
GSH	(nmol/mg protein)	6.77±0.33	6.51±0.85
GSSG	(nmol/mg protein)	0.29±0.02	0.30±0.04
Ascorbate	(nmol/mg protein)	1.60±0.19	1.53±0.22
Ascorbate + Dehydroascorbate	(nmol/mg protein)	1.75±0.11	1.81±0.14
α-Tocopherol	(pmol/mg protein)	217±11	222±18
Antioxidant Enzymes:			
Catalase	(μmol/min/mg protein)	247±62	251±8.6
Mn^{2+}-SOD	(NU/mg protein)	72.8±35.5	71.7±29.6
Cu^{2+},Zn^{2+}-SOD + Mn^{2+}-SOD	(NU/mg protein)	559±218	566±162
Glutathione Peroxidase	(nmol/min/mg protein)	805±91	832±33
Glutathione S-transferase	(nmol/min/mg protein)	348±36	352±31
Glutathione Reductase	(nmol/min/mg protein)	31.0±3.3	30.9±2.7
Quinone Reductases:			
DT-diaphorase	(nmol/min/mg protein)	36.0±13.1	34.6±11.4
NADPH-UQ Reductase	(pmol/min/mg protein)	269±72	323±55

The values are the means ± SD of four rats.

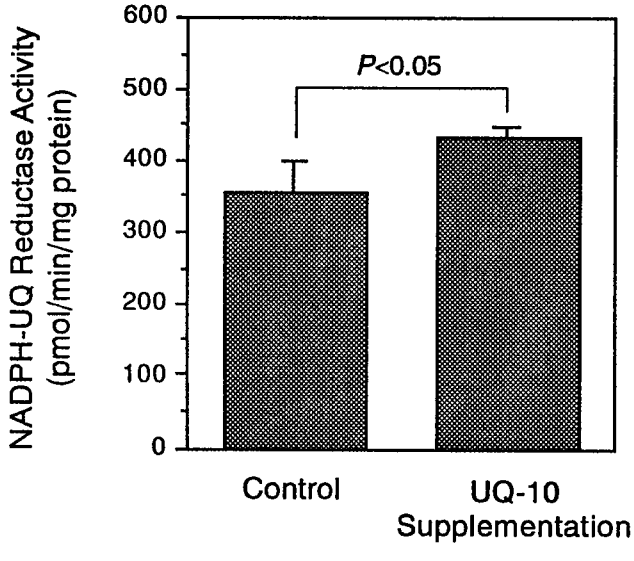


Fig.27 Effect of UQ-10 Supplementation on NADPH-UQ Reductase Activity in Rat Liver Cytosol

The values are the means ± SD of four rats. Significant difference indicated was compaired with control rats using Student's unpaired *t* test.

第二節　ユビキノン-10 投与ラットの四塩化炭素誘導肝炎抵抗性増大と、その作用機序

CCl_4 は、それ自身の毒性が低いにも関わらず、肝臓に対して特異的に障害をもたらすことが知られている。CCl_4 誘導肝毒性は、ミクロソームのCytochrome *P450* 系による代謝過程において、反応性の高いラジカル中間体が形成されることによる[141),142)]。1961 年 Butler は、肝臓において CCl_4 から Trichloromethyl Radical (・CCl_3) が生成することを示唆した[142)]。その後、CCl_4 からの ・CCl_3 の生成は、NADPH を加えたラット肝ミクロソームや分離肝細胞で起こることが Spin-trapping 法を用いて証明された[143), 144)]。さらに、・CCl_3 は、分子状酸素と反応し、より反応性の高い Trichloromethylperoxy Radical (CCl_3OO・) に変化することが確認されている[145)]。したがって、CCl_4 の肝毒性は、この ・CCl_3 や CCl_3OO・ が生体膜を構成する不飽和脂質から水素原子を引き抜くことにより開始する脂質過酸化反応が主原因であると考えられている[146)]。実際、CCl_4 投与により誘発される肝炎は、肝臓内での脂質過酸化反応を伴っており[32),33),146)]、α-Tocopherol などの抗酸化剤の前投与で軽減される[147), 148)]。

UQ-10 の腹腔内投与は、CCl_4 誘導肝炎を減弱させることが知られている。これは、投与した UQ-10 の生体内での抗酸化作用に起因すると言われているが、その作用機序の詳細は現在知られていない。前節で、UQ-10 の腹腔内投与は、ラット肝臓中の他の抗酸化因子には全く影響を与えずに、UQH_2-10 含量の増加と細胞質 NADPH-UQ Reductase 活性を有意に増加させることを認めた。したがって、UQ-10 投与による CCl_4 誘導肝炎減弱効果は、UQ 還元系の亢進による UQH_2 同族体含量の増加に起因するのではないかと考えられた。そこで、この点を明らかにする目的で、対照群ラットと UQ ラットの CCl_4 誘発肝炎に対する抵抗性と肝臓内抗酸化因子の変動との関連を検討した。

実験方法

(1)　実験動物の前処理：

8 週齢 (170～180 g) の Wistar 系雄性ラット (SPF 動物, 日本エスエルシー株式会社) 16 匹を、1 群 8 匹の 2 群に分け、それぞれを第六章、第一節、実験方法(1)に従い前処理して、対照群ラットと UQ ラットにした。

(2) CCl_4 肝炎の誘発：

実験方法(1)で作成した 対照群ラットと UQ ラットを、さらに 4 匹づつの 4 群に分け、それぞれに以下の処理を行った。

① 対照群ラット (生食処理群)

対照群ラットに、体重 100 g あたり 0.2 ml の生理食塩水を腹腔内投与した。

② 対照群ラット (CCl_4 処理群)

対照群ラットに、体重 100 g あたり 0.2 ml の CCl_4 を腹腔内投与した。

③ UQ ラット (生食処理群)

UQ ラットに、体重 100 g あたり 0.2 ml の生理食塩水を腹腔内投与した。

④ UQ-10 ラット (CCl_4 処理群)

UQ ラットに、体重 100 g あたり 0.2 ml の CCl_4 を腹腔内投与した。

生理食塩水あるいは CCl_4 処理したラットは、室温 21 ± 1 ℃、湿度 55 ± 5 %の恒温・恒湿の施設中でさらに 15 時間飼育を続けた後、実験に用いた。この間、ラットは絶食させ、水 (滅菌精製水) のみを自由摂取とさせた。

(3) 肝粗細胞画分の調製：

第一章、第二節、実験方法(2)-①に従い調製した。また、各細胞画分への他の画分の混入を、第一章、第二節、実験方法(3)-①,③,⑤,⑥に従いマーカー酵素を測定して検定したところ、各細胞画分の純度は、ほぼ以前に示した通りであり (第一章、第二節、Table 2 参照)、各画分の比較に十分使えることが認められた。

(4) 血漿の調製：

第一章、第一節、実験方法(3)に従い、腹下大動脈より採取した血液より血漿画分を調製した。

(5) 低分子抗酸化物質含量の定量：

① UQ および UQH_2 同族体の抽出ならびに定量：

第一章、第一節、実験方法(4)に従い行った。

② α-Tocopherol の抽出ならびに定量：

第六章、第一節、実験方法(3)-②に従い行った。

③ Ascorbate および総 Ascorbate の抽出ならびに定量：

第六章、第一節、実験方法(3)-③に従い行った。

④ GSH および GSSG の抽出ならびに定量：

第六章、第一節、実験方法(3)-④に従い行った。

(6) 抗酸化酵素活性測定法：

① Catalase 活性測定法：

第六章、第一節、実験方法(4)-①に従い測定した。

② 総 SOD および Mn^{2+}-SOD 活性測定法：

第六章、第一節、実験方法(4)-②に従い測定した。

③ Glutathione Peroxidase 活性測定法：

第六章、第一節、実験方法(4)-③に従い測定した。

④ Glutathione S-transferase 活性測定法：

第六章、第一節、実験方法(4)-④に従い測定した。

⑤ Glutathione Reductase 活性測定法：

第六章、第一節、実験方法(4)-⑤に従い測定した。

(7) Aspartate Aminotransferase 活性測定法：

ラット血漿中の Aspartate Aminotransferase [=Glutamic-oxaloacetic Transaminase (GOT), EC 2. 6. 1. 1] 活性は、GOT-UV テストワコー (和光純薬) を用いて測定した。GOT 活性は Karmen らの指定した条件下 (25 ℃) [149]、波長 340 nm における吸光度が 1 分間あたり 0.001 減少した時の活性を 1 Karmen Unit と定義し、血漿 1 ml あたりの活性 (Karmen Units) として示した。

(8) Alanine Aminotransferase 活性測定法：

ラット血漿中の Alanine Aminotransferase [=Glutamic-pyruvic Transaminase (GPT), EC 2. 6. 1. 2] 活性は、GPT-UV テストワコー (和光純薬) を用いて測定した。GPT 活性は Karmen らの指定した条件下 (25 ℃) [149]、波長 340 nm における吸光度が 1 分間あたり 0.001 減少した時の活性を 1 Karmen Unit と定義し、血漿 1 ml あたりの活性 (Karmen Units) として示した。

(9) NADPH-UQ Reductase 活性測定法：

第二章、第二節、実験方法(2)に従い測定した。

(10) DT-diaphorase 活性測定法：

第二章、第二節、実験方法(3)に従い測定した。

(11) 過酸化脂質測定法：

実験方法(3)で得られた粗細胞画分を洗浄し、20 mg/ml の蛋白質量となるように適当量の 1.15% KCl を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) に懸濁したものを TBARS 含量測定用試料とした。過酸化脂質生成の指標となる TBARS 含量は、Ohkawa らの方法[150]に従い測定した。試料中の TBARS 含量は、Ohkawa らの示した測定条件下、試料の代わりに定量的に赤色呈色物質 (Malondialdehyde) を生成する 1,1,3,3-Tetraethoxypropane を用いてあらかじめ作成した検量線より算出し、試料中の蛋白質 1 mg あたりの TBARS 含量 (nmol/mg protein) として示した。

(12) 蛋白質量の定量：

第一章、第一節、実験方法(5)に従い定量した。

実験結果

(1) CCl_4 処理による肝炎の誘発と UQ-10 前投与の効果

生食処理では、肝炎発症の重要な指標となる血漿 GOT 活性と GPT 活性は極

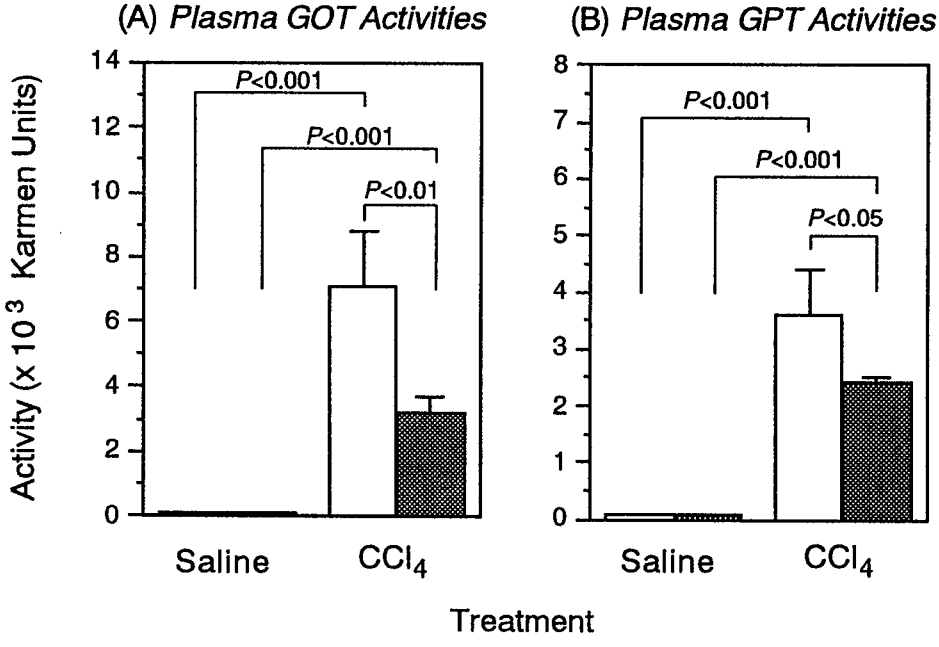


Fig.28 Effect of UQ-10 Pretreatment on Increase in Plasma Aminotransferase Activities by CCl_4-induced Hepatitis

□ , Control rats; ▩ , UQ-10 supplemented rats. The values are the means ± SD of 3-4 rats. Signuficant differences indicated were compaired with saline treated rats using Student's unpaired *t* test.

めて低く、対照群ラットと UQ ラット間で全く差がなかった (Fig. 28)。一方、CCl_4 処理では、対照群ラットの血漿 GOT 活性と GPT 活性は、生食処理に比べて、それぞれ約 100 倍と 70 倍に上昇した。また、CCl_4 処理による血漿 GOT 活性, GPT 活性の上昇は、UQ ラットでも認められたが、対照群ラットの 50～70% 程度で、有意に低かった。これらの結果から、CCl_4 処理はラットに肝炎を誘発するが、この CCl_4 誘発肝炎は UQ-10 の前投与により有意に軽減されることが確認された。

(2) CCl_4 処理による肝重量の増加と UQ-10 前投与の効果

CCl_4 処理による肝炎発症では肝浮腫が起こることが知られている[151)]。そこで、CCl_4 処理による肝重量の増加と、それに対する UQ-10 前投与の効果を検討した。生食処理では、対照群ラットと UQ ラットの肝重量に差はなかった (Fig. 29)。一方、CCl_4 処理では、両ラット共に肝重量の増加が認められたが、UQ ラットの肝重量の増加は対照群ラットの 50% 程度であり、有意に抑制されていた。これらの結果から、CCl_4 処理により引き起こされる肝浮腫は、UQ-10 の前投与により著しく軽減されることが明らかとなった。

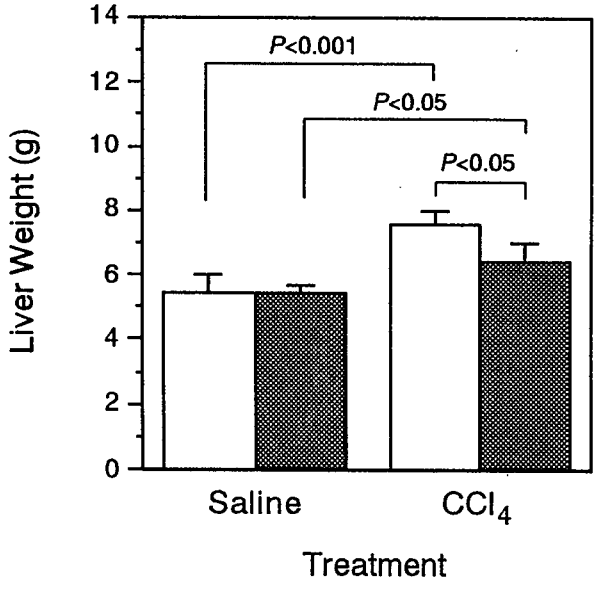


Fig.29 Effect of UQ-10 Pretreatment on Increase in Liver Weight by CCl_4-induced Hepatitis

□, Control rat livers; ▩, UQ-10 supplemented rat livers. The values are the means ± SD of 3-4 rats. Significant differences indicated were compaired with saline treated rats using Student's unpaired *t* test.

(3) CCl_4 処理による肝臓過酸化脂質の増加と UQ-10 前投与の効果

CCl_4 処理による肝臓過酸化脂質の増加に対する UQ-10 前投与の効果について検討した。結果は Fig. 30 に示した。生食処理では肝臓 TBARS 含量は、対照群ラットと UQ ラットで全く差がなかった (Fig. 30A)。一方、CCl_4 処理では、対照群ラットの肝臓 TBARS 含量は、生食処理の約 2 倍に増加したが、UQ ラットの肝臓内 TBARS 含量は、ほとんど増加しなかった。これらの結果から、CCl_4 処理により誘発される肝臓の脂質過酸化反応は、UQ-10 前投与により防止されることが明らかとなった。

また、CCl_4 処理による肝臓の脂質過酸化反応は、主としてミトコンドリア膜とミクロソーム膜で起こることが報告されている [32]。そこで、CCl_4 処理によるミトコンドリア画分および粗ミクロソーム膜画分の過酸化脂質の増加に対する UQ-10 前投与の効果について検討した。生食処理では、対照群ラットと UQ ラットの間で、ミトコンドリア画分と粗ミクロソーム膜画分の TBARS 含量に差がなかった (Fig. 30B, C)。一方、CCl_4 処理では、対照群ラットの粗ミクロソーム膜画分の

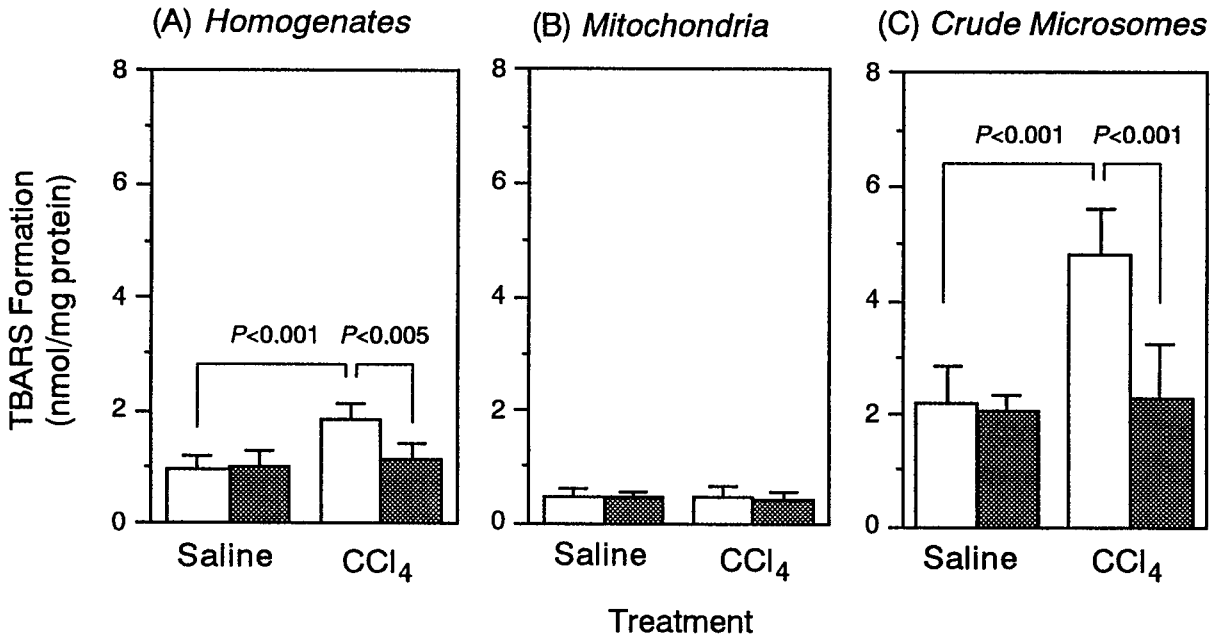


Fig.30 Effect of UQ-10 Pretreatment on CCl_4-induced Lipid Peroxidation in Rat Liver Intracellular Fractions

□ , Control rats; ▩ , UQ-10 supplemented rats. The values are the means ± SD of 6-7 rats. Significant differences indicated were compaired with saline treated rats using Student's unpaired *t* test.

TBARS含量は、生食処理の対照群ラットの約2倍に増加したが、UQラットでは、ほとんど増加しなかった(Fig. 30C)。また、ミトコンドリア画分のTBARS含量は、CCl_4処理時でもUQラット、対照群ラット共ほとんど増加しなかった(Fig. 30B)。これらの結果から、CCl_4投与により誘発される肝臓脂質過酸化反応は、主にミクロソーム膜で起こっており、UQ-10前投与は、このミクロソーム膜に起こる脂質過酸化反応を防止することが明らかとなった。

(4) CCl_4投与による肝臓抗酸化因子の変動とUQ-10前投与の効果

① 水溶性低分子抗酸化物質含量に対する影響

生食処理時の肝臓Ascorbate含量とGSHおよびGSSG含量は、対照群ラットとUQラットで差がなかった(Table 26)。CCl_4処理では、肝臓Ascorbate含量とGSH含量は、生食処理時と比較して有意に減少したが、この減少は、対照

Table 26

Effect of CCl_4 Treatment on Antioxidant Contents and Antioxidant Enzyme and Quinone Reductase Activities in Control and UQ-10 Supplemented Rat Livers

		Control Rats		UQ-10 Supplemented Rats	
		+ Saline	+CCl_4	+ Saline	+CCl_4
Low Molecular Weight Antioxidants:					
GSH	(nmol/mg protein)	6.76±0.31	3.89±0.36 ‡	6.50±0.85	4.01±0.20 †
GSSG	(nmol/mg protein)	0.29±0.01	0.29±0.03	0.30±0.03	0.29±0.03
Ascorbate	(nmol/mg protein)	1.60±0.19	0.49±0.05 ‡	1.53±0.22	0.51±0.16 ‡
Ascorbate + Dehydroascorbate	(nmol/mg protein)	1.75±0.11	0.53±0.09 ‡	1.81±0.14	0.53±0.16 ‡
α-Tocopherol	(pmol/mg protein)	217±11	131±10 ‡	222±18	161±11 †,§
Antioxidant Enzymes:					
Catalase	(μmol/min/mg protein)	247±63	243±44	251±9	261±73
Mn^{2+}-SOD	(NU/mg protein)	72.8±35.5	75.4±23.0	71.7±29.6	65.5±13.6
Cu^{2+},Zn^{2+}-SOD + Mn^{2+}-SOD	(NU/mg protein)	559±218	558±148	566±162	521±172
Glutathione Peroxidase	(nmol/min/mg protein)	805±91	792±35	832±34	809±87
Glutathione S-transferase	(nmol/min/mg protein)	348±37	270±10 *	352±31	324±36 §
Glutathione Reductase	(nmol/min/mg protein)	31.0±3.3	28.8±1.1	30.9±2.7	30.2±2.6
Quinone Reductases:					
DT-diaphorase	(nmol/min/mg protein)	36.0±13.1	37.8±12.2	34.6±11.4	35.3±5.2
NADPH-UQ Reductase	(pmol/min/mg protejn)	269±73	141±10 *	323±55	154±19 †

The values are the means ± SD of 3-4 rats.

*, †, ‡ Significant differences at levels of $P<0.05$, $P<0.005$ and $P<0.001$ respectively, as compaired with saline-administerd rats (+salin) in the same treated-group using Student's unpaired *t* test.

§ Significant differences at level of $P<0.05$ as compaired with control rats using Student's unpaired *t* test.

群ラットと UQ ラットで全く差がなかった。また、Ascorbate 含量と GSH 含量の減少に相応した Dehydroascorbate 含量や GSSG 含量の増加は起こらなかった。これらの結果から、CCl_4 処理により引き起こされる水溶性低分子抗酸化物質含量の減少は、UQ-10 を前投与しても防止することができないことが明らかとなった。

② 脂溶性低分子抗酸化物質 (α-Tocopherol) 含量に対する影響

肝臓 α-Tocopherol 含量は生食処理では影響されず、対照群ラットと UQ ラット間でも差がなかった (Table 26 & Fig.31A)。一方、CCl_4 処理では、対照群ラット、UQ ラット共に α-Tocopherol 含量が有意に減少したが、UQ ラットの減少量は、対照群ラットより約30%少なく、UQ-10 の前投与が α-Tocopherol の消費を有意に抑制していることが認められた。

ミトコンドリア画分と粗ミクロソーム膜画分の α-Tocopherol 含量に対する UQ-10 前投与の効果は Fig. 31B, C に示した。生食処理は、ミトコンドリア画分と粗ミクロソーム膜画分の α-Tocopherol 含量に全く影響を与えなかったが、CCl_4 処理は、対照群ラットのミトコンドリア画分と粗ミクロソーム膜画分の

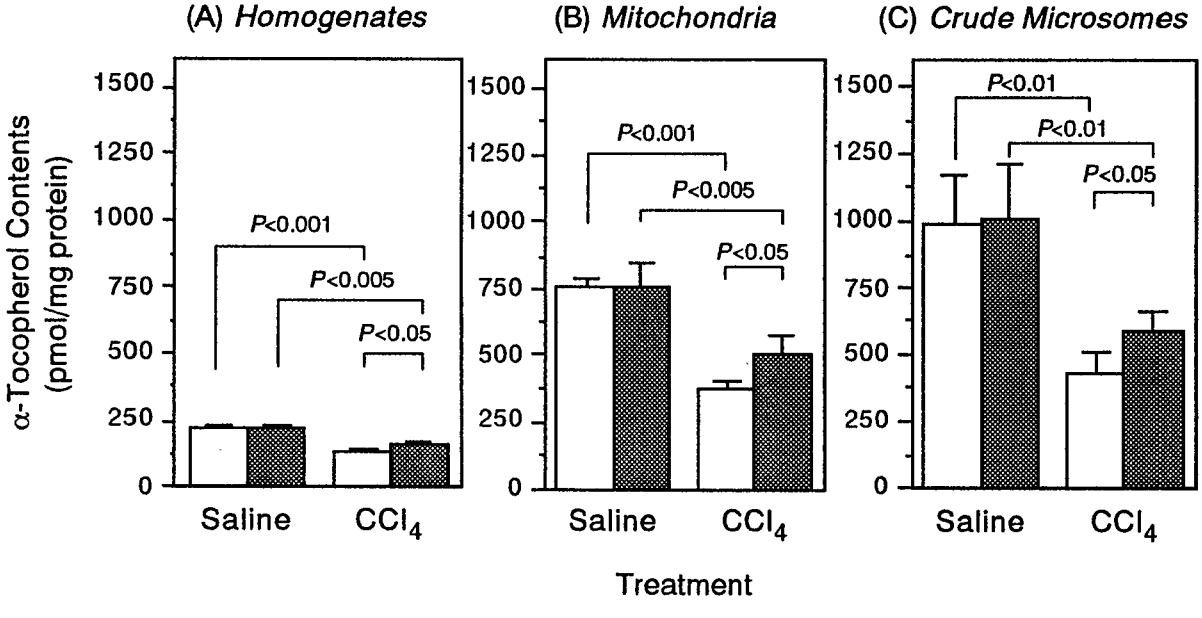


Fig.31 Effect of CCl_4 Treatment on α-Tocopherol Contents in Control and UQ-10 Supplemented Rat Livers

□ , Control rats; ▩ , UQ-10 supplemented rats. The values are the means ± SD of 3-4 rats. Significant differences indicated were compaired with saline treated rats using Student's unpaired *t* test.

α-Tocopherol 含量を有意に低下させた。しかし、この減少量は、UQ ラットのミトコンドリア画分とミクロソーム膜画分では 20～30% 少なく、UQ-10 の前投与が α-Tocopherol の減少を防止することが認められた。

③ 抗酸化酵素活性に対する影響

肝臓の抗酸化酵素活性は、対照群ラットと UQ ラット間で差がなく、また、生食処理による影響もなかった (Table 26)。CCl_4 処理では、抗酸化酵素活性のうち、Glutathione S-transferase 活性のみが対照群ラットで有意に低下したが、UQ ラットでは、そのような低下は認められなかった。他の抗酸化酵素活性は、対照群ラットと UQ ラット共に、CCl_4 処理の影響を全く受けなかった。

④ キノン還元酵素活性に対する影響

DT-diaphorase 活性は、対照群ラットと UQ ラットで差がなく、生食処理および CCl_4 処理の影響を全く受けなかった (Table 26)。NADPH-UQ Reductase 活性も肝ホモジネートで比較すると、対照群ラットと UQ ラットで有意な差はなく、生食処理の影響も受けなかった (Table 26 & Fig. 32A)。しかし、

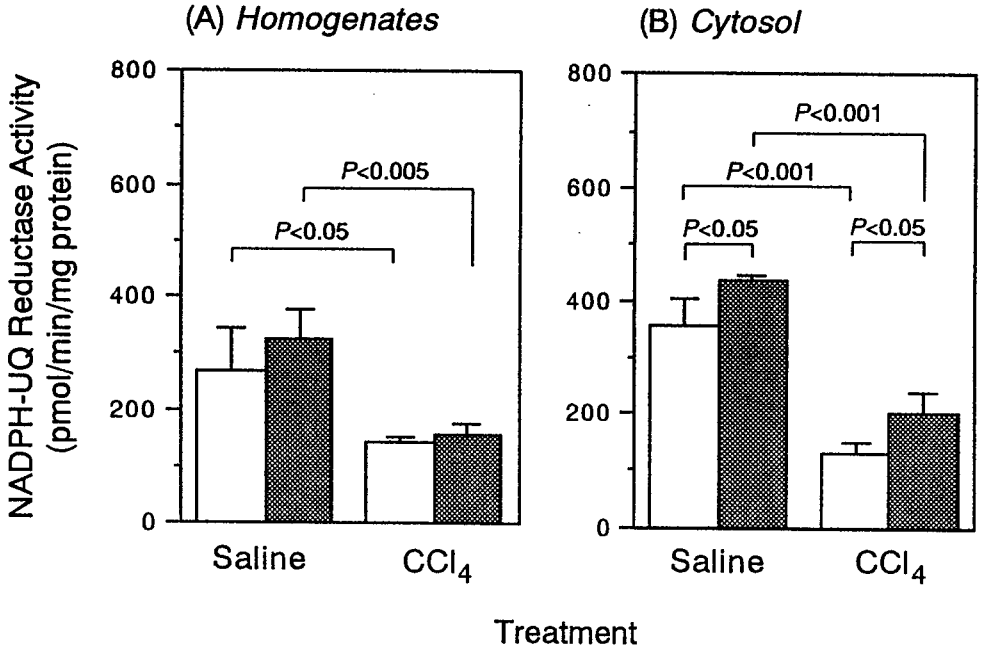


Fig.32 Effect of CCl_4 Treatment on NADPH-UQ Reductase Activities in Control and UQ-10 Supplemented Rat Livers

□, Control rats; ▩, UQ-10 supplemented rats. The values are the means ± SD of 3-4 rats. Significant differences indicated were compaired with saline treated rats using Student's unpaired *t* test.

CCl_4 処理では、対照群ラット、UQ ラット共に NADPH-UQ Reductase 活性は生食処理時の 50% 程度まで有意に低下した。また、対照群ラットと UQ ラット間で活性の有意な差は認められなかった。

細胞質 NADPH-UQ Reductase 活性について検討した結果は Fig. 32B に示した。UQ ラットの肝細胞質 NADPH-UQ Reductase 活性は、対照群ラットと比較し有意に高く、この活性は、生食処理では全く変化を受けなかった (Fig. 27 & Fig. 32B)。一方、CCl_4 処理では、対照群ラット、UQ ラット共に細胞質 NADPH-UQ Reductase 活性が生食処理時の 40～50% 近くまで有意に低下した。しかし、UQ ラットの活性は、なお対照群ラットの約 1.5 倍の高値を保っていることが認められた。

(5) CCl_4 投与による肝臓 UQ 同族体含量の変動と UQ-10 前投与の効果

UQ-10 投与は、肝臓粗細胞画分の tUQ-9 含量と UQH_2-9 含量には全く影響せず、tUQ-10 含量と UQH_2-10 含量のみを 2.8～6.4 倍高めた (Fig. 26 参照) が、この状態に対し、生食処理はなんら影響しなかった (Table 27 & Table 29)。一方、CCl_4 処理は、対照群ラットおよび UQ ラットの各粗細胞画分の UQH_2-9 および UQH_2-10 含量の有意な減少と、それに伴う還元比率の有意な低下を引き起こした (Table 28 & 30)。しかし、tUQ-9 および tUQ-10 含量にはなんら影響を与えず、CCl_4 処理によって UQH_2-9 および UQH_2-10 の UQ-9 および UQ-10 への酸化が起こっていることを示した。なお、CCl_4 処理したUQ ラットの UQ 同族体の還元比率は、対照群ラットと比較し、有意に高値を保っていることが認められた (Table 28 & 30)。

Table 27

Distribution of Ubiquinone and Ubiquinol Homologues in Control Rat Livers

Intracellular Fractions	UQ-9 Contents (ng/mg protein)		Redox Ratios of tUQ-9 [b]	UQ-10 Contents (ng/mg protein)		Redox Ratios of tUQ-10 [b]
	tUQ [a]	UQH_2	(%)	tUQ [a]	UQH_2	(%)
Homogenate	347±35	342±32	97±5	34.9±3.8	30.7±2.4	89±12
Nuclei & Cell Debris	446±28	356±38	80±9	33.5±5.0	27.3±3.9	80±17
Mitochondria	1,620±240	1,100±65	64±5	214±25	139±16	65±6
Crude Lysosomes	696±75	444±25	64±6	104±8	62±3	60±6
Crude Microsomes	139±17	80±11	58±5	25.0±3.5	14.5±3.5	58±9
Cytosol	13.1±2.2	9.2±1.2	71±11	2.6±0.7	1.9±0.1	74±17

The values are the means ± SD of four rats.

a) The sum of oxidized and reduced forms of UQ of each of the homologues.

b) $(UQH_2/tUQ) \times 100$.

Table 28

Distribution of Ubiquinone and Ubiquinol Homologues in Control Rat Livers Treated with CCl_4

Intracellular Fractions	UQ-9 Contents (ng/mg protein)		Redox Ratios of tUQ-9 [b]	UQ-10 Contents (ng/mg protein)		Redox Ratios of tUQ-10 [b]
	tUQ [a]	UQH_2	(%)	tUQ [a]	UQH_2	(%)
Homogenate	344±20	171±36 ‡	50±9 §	35.1±0.8	16.2±3.8 ‡	46±11 ‡
Nuclei & Cell Debris	462±36	137±7 §	28±7 §	40.4±6.8	12.0±1.6 ‡	31±8 †
Mitochondria	1,620±100	630±110 §	39±5 ‡	218±19	83±20 †	42±10 *
Crude Lysosomes	638±32	254±36 §	40±5 ‡	103±7	32±8 §	31±8 ‡
Crude Microsomes	146±32	26±11 ‡	18±5 §	26.0±7.9	4.8±3.0 *	22±19 *
Cytosol	16.6±1.7	6.3±1.0 *	39±5 *	3.0±0.5	1.1±0.4 *	36±11 *

The values are the means ± SD of three rats.

a) The sum of oxidized and reduced forms of UQ of each of the homologues.

b) $(UQH_2/tUQ) \times 100$.

*, †, ‡, § Significant differences at levels of $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.005$ and $P<0.001$ respectively, compaired with control rats (in Table 27) using Student's unpaired *t* test.

Table 29

Distribution of Ubiquinone and Ubiquinol Homologues in UQ-10 Supplemented Rat Livers

Intracellular Fractions	UQ-9 Contents (ng/mg protein)		Redox Ratios of tUQ-9 [b)]	UQ-10 Contents (ng/mg protein)		Redox Ratios of tUQ-10 [b)]
	tUQ [a)]	UQH_2	(%)	tUQ [a)]	UQH_2	(%)
Homogenate	328±34	313±36	95±3	155±33 $	135±31 $	87±3
Nuclei & Cell Debris	441±68	392±70	89±4	216±29 $	182±30 $	84±6
Mitochondria	1,780±430	1,120±225	64±12	1,250±430 $	830±270 $	66±5
Crude Lysosomes	704±100	453±53	65±12	610±70 $	365±59 $	60±4
Crude Microsomes	140±22	84±20	60±6	88.3±27.7 $	49.9±20.3 $	56±8
Cytosol	17.5±6.9	11.5±3.7	68±14	7.4±2.1 $	5.6±2.3 $	72±13

The values are the means ± SD of four rats.

a) The sum of oxidized and reduced forms of UQ of each of the homologues.

b) (UQH_2/tUQ) x 100.

$ Significant differences at level of $P<0.001$ compaired with control rats (in Table 27) using Student's unpaired *t* test.

Table 30

Distribution of Ubiquinone and Ubiquinol Homologues in UQ-10 Supplemented Rat Livers Treated with CCl_4

Intracellular Fractions	UQ-9 Contents (ng/mg protein)		Redox Ratios of tUQ-9 [b)]	UQ-10 Contents (ng/mg protein)		Redox Ratios of tUQ-10 [b)]
	tUQ [a)]	UQH_2	(%)	tUQ [a)]	UQH_2	(%)
Homogenate	320±95	191±22 ‡	69±10 ‡,‖	193±70 $	124±9 $	70±11 *,‖
Nuclei & Cell Debris	462±36	174±20 §,‖	38±7 §,‖	216±9 $	109±23 *,$	50±8 §,‖
Mitochondria	1,810±220	900±135 ‖	50±4 ‖	1,110±110 $	640±100 $	57±4 ‖
Crude Lysosomes	736±129	403±65 ‖	55±3 #	663±115 $	352±34 $	54±6 ¶
Crude Microsomes	148±34	54±16 ‖	39±16 *,‖	96.9±30.8 $	40.5±20.6 $	42±17 ‖
Cytosol	16.5±3.3	8.4±1.4	52±11	7.5±1.2 $	3.0±0.6 $	40±10 †

The values are the means ± SD of four rats.

a) The sum of oxidized and reduced forms of UQ of each of the homologues.

b) (UQH_2/tUQ) x 100.

*, †, ‡, § Significant differences at levels of $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.005$ and $P<0.001$ respectively, compaired with UQ-10 supplemented rats (in Table 29) using Student's unpaired *t* test.

‖, ¶, #, $ Significant differences at levels of $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.005$ and $P<0.001$ respectively, compaired with control rats treated with CCl_4 (in Table 28) using Student's unpaired *t* test.

第三節　考察および小括

考　　察

投与されたUQが、生体内で抗酸化作用を発現するためには、UQH_2へと還元されねばならない。Reahal & Wrigglesworth[41]は、ラットに投与したUQが、UQH_2として肝臓内に蓄積することを報告し、Takada & Watanabe[40]もモルモットを用いて同様のことを確認している。著者の結果もUQ-10の腹腔内投与がラット肝臓内のUQH_2-10含量とtUQ-10含量の増加を引き起こすことを確認した。しかも、UQ-10の還元比率は、ほぼ一定に保たれた。また、UQ-10投与は、肝臓内の他の低分子抗酸化物質含量や抗酸化酵素活性には何ら影響を与えず、肝細胞質NADPH-UQ Reductase活性を有意に上昇させた。換言すれば、UQ-10投与ラット(UQラット)は、肝臓内におけるUQH_2の抗酸化作用と細胞質NADPH-UQ Reductaseの役割を検討する上で極めて有用なモデルであることが判明した。

CCl_4処理は肝炎を誘発し、しかも、それに伴う肝臓過酸化脂質の蓄積を引き起こした。TBARSの蓄積は、主としてミクロソーム膜内で起こり、CCl_4がこの画分に存在するNADPH-cytochrome Reductaseにより、反応性の高い・CCl_3やCCl_3OO・へと代謝された後、脂質過酸化反応を引き起こすという報告[146]と一致した。CCl_4誘導肝炎は、UQラットにおいて有意に軽減された。すなわち、UQ投与は、CCl_4誘導肝炎に伴う血漿GOTおよびGPTの上昇、肝重量増加、および肝臓過酸化脂質生成を有意に抑制した。

水溶性抗酸化物質含量の変動を見ると、CCl_4処理は肝臓内GSH含量およびAscorbate含量を有意に低下させた。しかし、対応量の酸化型の増加は見られなかった。CCl_4から派生した・CCl_3は、GSHと容易にラジカル複合体(GS-CCl_3)を形成すると報告されている[152),153)]ためGSH含量の低下がGSSGの増加を伴わないのは、ラジカル複合体の生成を意味しているものと思われる。CCl_4処理によるGSH含量やAscorbate含量の低下は、UQ前投与では全く防止されなかった。このことは、UQH_2が主として細胞の脂溶性画分、すなわち膜画分に局在し、水溶性領域では有効な抗酸化剤となり得ないことを示しているように思われる。

CCl_4処理は、また、Glutathione Reductase活性やGlutathione Peroxidase活性

に影響を与えずに、 Glutathione S-transferase 活性を低下させた。同様の結果は、Danni ら[154]のラット分離肝細胞を用いた検討でも認められている。CCl_4 処理による Glutathione S-transferase 活性の低下は、UQ ラットでは有意に抑制された。Glutathione S-transferase は生体内解毒機構の一つである Glutathione 抱合を触媒する酵素であり[155]、しかも Glutathione Peroxidase 活性も有することが報告されている[156]。しかしながら、肝臓内の Glutathione S-transferase の基質である GSH 含量や Glutathione Reductase 活性は、対照群ラットと UQ ラット間で差がないことから、UQ ラットが CCl_4 誘導肝炎に対して高い抵抗性を持つのは、UQ-10 投与による Glutathione S-transferase 活性低下の抑制が主原因であるとは考えにくい。キノン還元酵素活性では、細胞質 NADPH-UQ Reductase 活性のみが CCl_4 処理によって低下した。また、この低下は UQ ラットで有意に抑制された。ここで注目すべきは、NADPH-UQ Reductase 活性が肝ホモジネートで測定された時には、UQ-10 前処理による有意な効果が認められなかったことである。ミトコンドリア酵素も含めた細胞全体の UQ 還元活性に差がないのに、 UQ-10 を前投与したラットで CCl_4 毒性に対する抵抗性が増したことは、とりもなおさず、細胞質 NADPH-UQ Reductase が、細胞全体の UQ 還元に大きく貢献していることを示唆するように思われる。

脂溶性抗酸化物質では、全ての細胞画分の UQ-9 および UQ-10 の還元比率が CCl_4 処理により低下した。この低下は UQ ラットで有意に抑制された。これらの結果は UQ-10 投与により増加した UQH_2-10 が、抗酸化作用を発現した結果であると思われる。また、肝臓内の α-Tocopherol 含量も CCl_4 処理により低下したが、この低下もまた UQ ラットで有意に抑制された。これは、UQH_2 の優先消費で α-Tocopherol が節約されたと考えられるが、また、α-Tocopheroxyl Radical の再生に UQH_2 が働いていることも考えられる。Matsura ら[158]は、ラット分離肝細胞を用いた実験で、細胞内の UQH_2 同族体が α-Tocopherol と相互作用することなしに直接的に脂質過酸化反応を阻止することを確認している。また、α-Tocopherol は、脂質膜中に生じた脂質ラジカルを消去することにより、それ自身は α-Tocopheroxyl Radical、さらに α-Tocoquinone へと酸化されるが、UQH_2 同族体はこの α-Tocopheroxyl Radical を再び α-Tocopherol へ還元することで間接的に脂質過酸化反応を防止することも *in vitro* で認められている (Fig.19)[25),30),31)]。

今回の検討より、UQ-10 の前投与は、抗酸化作用を有する肝細胞内 UQH_2-10 含

量の増加と細胞質 NADPH-UQ Reductase 活性のみを上昇させることが判明した。CCl_4 処理による UQH_2 同族体の還元比率の低下は、UQ ラットで有意に抑制され、しかも、同時に、CCl_4 誘導脂質過酸化反応による各種障害を軽減することが認められた。これらの両事実を連結すると、UQ-10 投与は肝 UQH_2-10 プールと細胞質 NADPH-UQ Reductase 活性を上昇させ、このことが CCl_4 によるラジカル性肝炎を軽減したとの結論へ必然的に導くように思う。

小　括

(1) UQ-10 の腹腔内投与は、ラット肝臓内の低分子抗酸化物質含量や抗酸化酵素活性に影響を与えずに、UQH_2-10 および tUQ-10 含量の増加と、細胞質 NADPH-UQ Reductase 活性の上昇を導き、肝臓内の UQ 還元系を活性化することを確認した。

(2) UQ-10 の腹腔内投与は、CCl_4 処理による肝炎と、それに伴う肝臓内 TBARS 含量の増加およびミクロソーム膜内 TBARS 含量の増加を有意に抑制した。

(3) CCl_4 処理は、肝臓内水溶性抗酸化物質含量の低下と Glutathione S-transferase 活性の低下を引き起こしたが、他の抗酸化酵素活性に全く影響を与えなかった。UQ-10 の腹腔内投与は、CCl_4 処理による肝臓内水溶性抗酸化物質含量の低下を防止せず、Glutathione S-transferase 活性の低下のみを有意に抑制した。しかしながら、Glutathione S-transferase の基質となる GSH 含量や Glutathione Reductase 活性は、UQ-10 の腹腔内投与の有無で差がないことから、UQ-10 の腹腔内投与による Glutathione S-transferase 活性低下の防止が、UQ-10 の腹腔内投与による CCl_4 誘導脂質過酸化反応抑制の直接的な原因でないと判断された。これらの結果から、UQ-10 投与による CCl_4 誘導脂質過酸化反応の防止に、肝臓内の抗酸化酵素や水溶性抗酸化物質は貢献していないことが示唆された。

(4) 肝臓の各細胞画分の UQ-9 および UQ-10 の還元比率の CCl_4 処理による低下は、UQ-10 を前投与したラットで有意に抑制された。さらに、肝臓内 α-Tocopherol 含量の低下も UQ-10 を前投与したラットで有意に抑制された。これらの結果から、UQ-10 の腹腔内投与は、肝細胞質 NADPH-UQ Reductase を活性化すると共に、UQH_2-10 含量を増加させ、結果として、この増加した UQH_2 同族体が直接的に、あるいは肝臓の同じ脂溶性領域に存在する α-Tocopherol の再生を介して間接的に

脂質過酸化反応を抑制することによって、CCl_4 肝障害を軽減することが示唆された。

第七章 総　括

ミトコンドリア外 UQ の生理作用としては、*in vitro* の検討より、ゴルジ体膜[8]や細胞膜[18]で電子伝達体として働くこと、Phospholipase 処理に対する膜抵抗性の増大[17]、膜流動性に対する影響[16]などが示唆されている。さらに、還元型の UQH_2 は、生理的濃度で十分強い抗酸化作用を発現しうること[27]から、生体内抗酸化物質として働いている可能性[19)-29),32)-39)]が示唆されている。しかしながら、ミトコンドリア以外の全てのオルガネラが UQ を含むばかりでなく、UQ 合成系までも持つ生理的必然性を説明するに足る明確な解答は得られていない。近年、Åberg ら[15]や Reahal & Wrigglesworth[41]により、ラット生体内に存在する UQ の一部が、還元型の UQH_2 として存在することが報告された。また、ヒトや動物に投与された UQ は、そのかなりの部分が還元型の UQH_2 へと変換することが認められている。したがって、ミトコンドリア外 UQ が UQH_2 の形で生体膜の脂質過酸化に対して抗酸化剤として働くとする説は、合理性があるように思われる。そこで、ミトコンドリア外 UQ の生理作用解明の一端として、ラット組織や細胞内の UQH_2 同族体含量ならびに UQ 還元酵素活性の分布を調べた。その結果、細胞質に新規の NADPH-UQ Reductase の存在を見出し、これと共役した膜内 UQ 還元系が生体内抗酸化系として重要な役割を演じていることを明らかにした。

著者の測定では、ラット生体内には、主 UQ 同族体の tUQ-9 の他、そのおよそ 11～52% 量の tUQ-10 が存在した。しかも、これら tUQ-9 と tUQ-10 の還元比率は、互いにほぼ同じレベルであり、肝臓や血漿においては 70～80%、心臓、腎臓、脾臓においても 10～30% にのぼることを認めた。そこで還元比率の高い肝臓と低い腎臓を用いて、各組織の細胞画分における UQ 同族体の分布と、その還元比率について調べたところ、UQ 同族体はミトコンドリア以外にもあらゆる細胞画分に存在し、しかも、どの細胞画分でも、その還元比率は組織全体の還元比率とほぼ等しいことを認めた。

生体内に存在する UQ 還元酵素としては、ミトコンドリア呼吸鎖の NADH Dehydrogenase および Succinate Dehydrogenase が知られている[79]。しかしながら、これらの UQ 還元酵素は、ミトコンドリア内膜に存在する酵素であり、外膜を隔てた他の細胞画分に存在する UQ を直接還元するとは考えがたい。したがって、ミトコンドリア以外の細胞画分が UQ 同族体の一部を酸化されやすい UQH_2 同族体として恒常的に保持するには、ミトコンドリア以外にも UQ を還元・維持する何らかの機構が存在する

はずであると考えた。そこで、この考えに基づき、高い還元比率のUQ同族体を有するラット肝臓について、UQ還元活性の検索を行ったところ、肝ホモジネート中にNADPHあるいはNADHを電子供与体とする強いUQ-10還元酵素活性を認めた。このUQ-10還元酵素活性は、電子供与体としてNADHよりNADPHを用いた時の方が強く、明らかにミトコンドリア呼吸酵素とは異なる酵素活性であった。そこで、電子供与体としてNADPHを用いた時のUQ-10還元活性(NADPH-UQ Reductase活性)を指標に、肝細胞画分のNADPH-UQ Reductase活性の分布を調べたところ、細胞質に高い比活性のNADPH-UQ Reductaseが認められた。しかも、この画分のNADPH-UQ Reductase活性は、肝全体の活性の約68%を占めたことから、細胞質の酵素であることを確認した。

ところで、ラット肝細胞質には既知のキノン還元酵素としてDT-diaphoraseが存在する[80),93),97)]。しかもDT-diaphoraseはUQ-10を還元するとの報告がある[85)]。そこで、細胞質に認めたNADPH-UQ Reductaseが、DT-diaphoraseと同一であるかどうか検討したが、要求する電子供与体の違い、StimulatorやInhibitorに対する挙動や安定性の違いなどから、DT-diaphoraseとは性質が明確に異なることを確認した。しかも両酵素活性はCibacron Blue-binding Agarose Gel Chromatographyにより完全に分離されることから、NADPH-UQ ReductaseはDT-diaphoraseとは互いに異なった酵素蛋白質であることがわかった。さらに、他の細胞画分に存在することが確認されているキノン還元酵素の混入の可能性も検討したが、これまで報告されている種々のキノン還元酵素[8),18),77),90),91),94),95)]とはStimulatorやInhibitorに対する挙動が異なることから、著者が細胞質に見出したNADPH-UQ Reductaseは、これまでに報告された、どのキノン還元酵素とも異る、新規のUQ還元酵素であることが判明した。

ラット肝細胞質NADPH-UQ Reductaseは極めて不安定で、現在のところ精製に成功していないため、分画直後の細胞質を用いて、その諸性質を明らかにした。NADPH-UQ Reductaseの至適pHは7.4、至適温度はNADPHを電子供与体として用いた時は37℃付近、NADHを電子供与体とした時は28℃付近であった。また、電子供与体が存在しないと20℃以上の温度で速やかに失活する易熱性酵素であった。また、細胞質NADPH-UQ Reductaseは、他の多くのキノン還元酵素がそうである[108)]ように、フラビン酵素であることが示唆された。さらに電子供与体の検討より、NADPH-UQ Reductaseは、細胞質に高い還元比率($NADPH/NADP^+$=71.4)で存在する[102)]NADPH

を最も良い電子供与体とするNADPH依存性の酵素であること、また、電子受容体の検討より、ラットの主UQ同族体であるUQ-9を最も良い基質とすることを明らかにした。さらに、Kinetic Parameterの検討より、NADPH-UQ ReductaseのNADPHとUQ-9に対するK_m値 (K_m for NADPH=14.4±2.5 μM, K_m for UQ-9=2.66±0.48 μM)は、細胞質のNADPH濃度 (97.1±13 μM [103]) や肝臓中のUQ-9濃度 (132±3 μM) より十分小さいことから、生体内環境で内因性UQ同族体の還元を行うのに非常に適した条件を備えている酵素であることが明らかになった。

ところで、NADPH-UQ Reductaseはキノン還元酵素であるが故、1電子還元酵素であるか2電子還元酵素であるかが重要な問題になってくる。今回の結果では、UQ-10, 1molの還元に対し、1molのNADPHの酸化が認められること、さらにUQ-10還元に伴った$O_2^{\cdot-}$の産生が認められないことから、ラット肝細胞質NADPH-UQ ReductaseによるUQの還元は、2電子還元機構であると推測された。1電子還元酵素によるキノン化合物の還元ではセミキノンラジカルが生成するが、このセミキノンラジカルは好気性条件下、酸化還元サイクルにより有害な活性酸素種を生成し、しばしば重篤な細胞傷害を引き起こす可能性のあることが知られている [83),84)]。したがって、NADPH-UQ Reductaseが2電子還元酵素であることは、抗酸化作用を有するUQH_2の生成ということの他、セミキノンラジカルの生成に伴う活性酸素種の生成を防ぐという意味でも、極めて合目的性を持っているように思われる。

生体内に存在するUQは、その脂溶性のため、主に生体膜中に存在する。したがって、NADPH-UQ Reductaseが生体内UQ還元の主体であるとするならば、脂質膜内に存在するUQ同族体を還元する能力が必須となる。そこで、この点について検討したところ、細胞質NADPH-UQ Reductaseは、NADPHの存在下、リポソーム膜中のUQ-10だけでなく、肝ミクロソーム膜中の内因性UQ-9を還元することを認めた。これらの結果より、各細胞画分の脂質膜中に存在するUQ同族体が、どの画分においてもほぼ一定の還元比率で維持されているのは、あらゆる細胞画分 (オルガネラ) に接している細胞質中のNADPH-UQ Reductaseが、これら脂質膜中のUQ同族体を還元するためであることが示唆された。そこで、ラットの各組織中のUQ-9の還元比率と、その組織の細胞質NADPH-UQ Reductase活性との関連を調べたところ、両者の間に正の相関関係が得られた。この結果は、細胞質NADPH-UQ Reductaseが、あらゆる細胞画分の脂質膜に存在するUQの還元に対して、中心的役割を演じているとの考えを支持し

た。

1966年, Mellors & Tappel [19]により UQH_2 の抗酸化作用が報告されて以来、*in vitro* [20)-29),31)] や *in vivo* [32)-39)] において UQH_2 が抗酸化作用を有するという報告が数多くなされている。しかも UQH_2 は、α-Tocopherol に匹敵するほど強い抗酸化作用を有し[25),27),28)]、生理的濃度で十分強い抗酸化作用を発現することも確認されている [27)]。UQH_2 は、α-Tocopherol と同様、脂質膜内に存在することにより、そこで生じた脂質ラジカル (あるいは脂質ペルオキシラジカル) を消去する、いわゆるラジカル連鎖反応停止剤 (Chain Braking Antioxidant) として働くことが確認されている [26),29)]。したがって、細胞質 NADPH-UQ Reductase は、脂質膜内の UQ の還元を介して脂質過酸化反応を抑制するという、新規の生体内抗酸化系を形成していることが期待された。そこで、この可能性を検討したところ、細胞質 NADPH-UQ Reductase は、NADPH の存在下、UQ-10 含有リポソーム膜内の UQ-10 の還元を介して、脂質膜に誘導した脂質過酸化反応を抑制することを認めた。同様の結果は、肝ミクロソーム膜に誘導した脂質過酸化反応の場合にも得られた。これらの結果より、細胞内では、細胞質 NADPH-UQ Reductase による、脂質膜内 UQH_2 リサイクリングという新たな生体内抗酸化系が機能していることが示唆された (Fig. 33)。

生体膜内の UQH_2 は、生体膜内に生じた脂質ラジカルや脂質ペルオキシラジカルを消去することによりラジカル連鎖反応を阻止し、それ自身は UQH• となると考えられる。この UQH• が NADPH-UQ Reductase の基質となるかどうかは現在のところ不明であるが、UQH• は比較的速やかに水相中の酸素分子に電子を渡し、NADPH-UQ Reductase の基質となる UQ へと酸化されると考えられている [29)]。実際、UQH_2 含有リポソーム膜に誘導した脂質過酸化反応に対し、UQH_2 の消費量と UQ の生成量とは等しいこと [157),158)] や、UQH_2 が理論的にラジカルを消去するために与えることができる電子の数 (Stoichiometric Factor) が 2 であるにも関わらず、実験的に求められたリポソーム膜内の UQH_2-10 の Stoichiometric Factor がおよそ 1 であるという報告は [25),27)]、この考えを支持するものと思われる。

in vitro での UQH_2 の抗酸化作用については数多くの報告 [19)-29),31)] があるが、著者が得た、リポソーム膜や肝ミクロソーム膜に誘導した脂質過酸化反応が、UQ 還元系の存在下に抑制されるという結果も、それらの報告を裏付けるものであった。しかしながら、このような細胞質 NADPH-UQ Reductase による生体膜 UQ 還元系が、実際に *in*

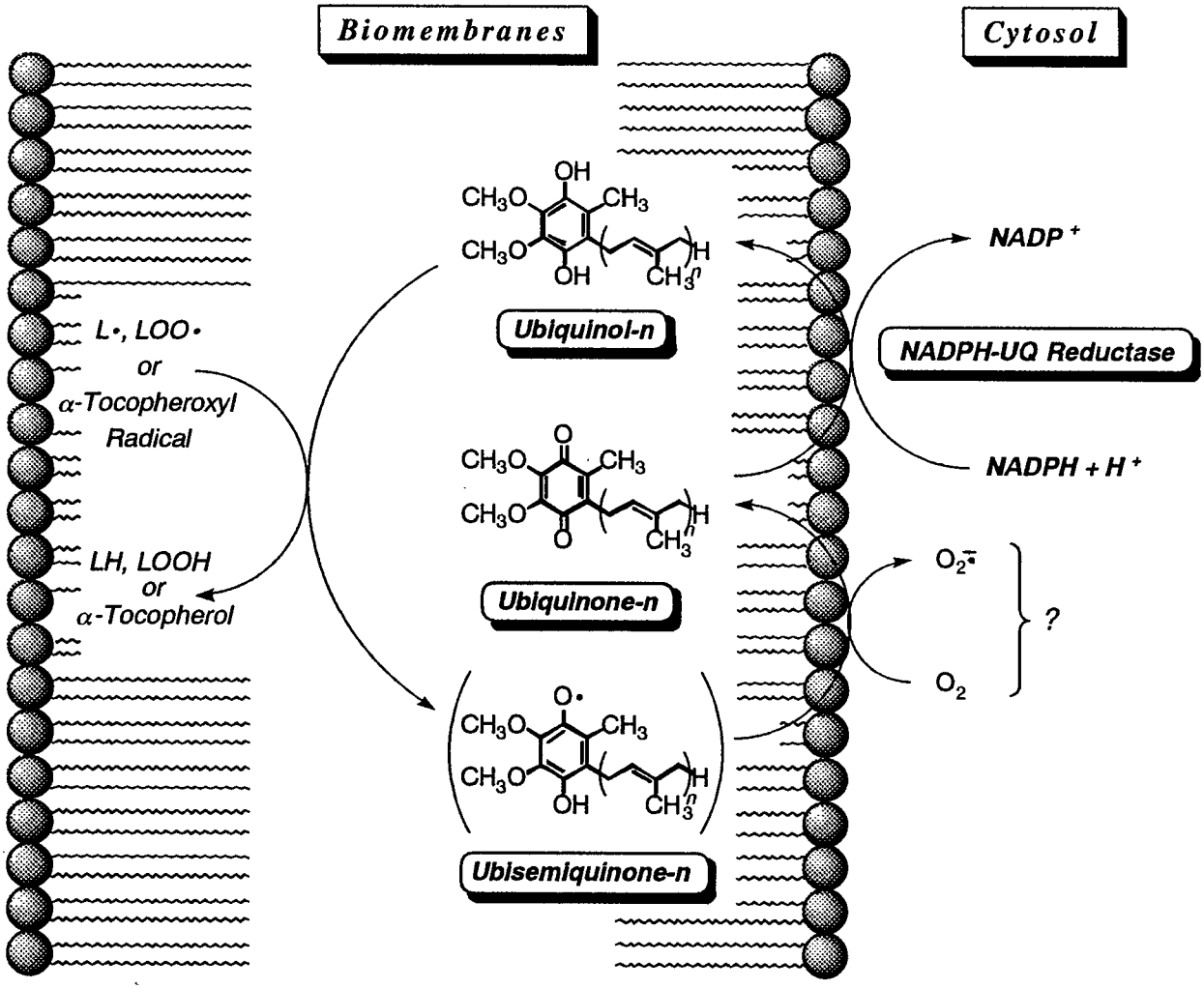


Fig.33 Possible Mechanism of Ubiquinol Recycling in Biomembranes

LH, Phospholipids containing unsaturated fatty acids; L•, lipid radicals; LOOH, lipid peroxides; LOO•, lipid peroxyl radicals

vivo でも機能するかどうかは明らかでない。そこで、UQ 投与によって生体 UQH_2 プールを拡大した動物を作成して、UQ 還元系がラット体内で機能しているか検討した。

UQ-10 の投与は、肝臓内低分子抗酸化物質含量や抗酸化酵素活性、DT-diaphorase 活性に影響を与えず、tUQ-10 含量の増加と細胞質 NADPH-UQ Reductase 活性のみの上昇を導いた。しかも、tUQ-10 含量の増加は、主として UQH_2-10 含量の増加であった。この結果より、UQ-10 を投与したラットは、生体内での UQ の抗酸化作用や、細胞質 NADPH-UQ Reductase による UQ 還元系の *in vivo* での役割を検討する上で非常に有用なモデル系であることが判明した。そこで、UQ 投与が CCl_4 による脂質過酸化反応を伴った肝炎を軽減するという *in vivo* での報告[32),33)]に

基づき、細胞質 NADPH-UQ Reductase による UQ 還元系が、ラット生体内で機能しているかどうかを、UQ-10 投与ラットを用いて検討した。

これまでに報告されたように[32),33)]、UQ-10 の前投与は、CCl_4 誘導肝炎を有意に抑制した (血漿 GOT 活性、GPT 活性の上昇や肝湿重量の増加の抑制)。さらに、それに伴う肝臓過酸化脂質の蓄積も有意に抑制した。CCl_4 処理は、水溶性低分子抗酸化物質含量の低下を導いたが、この低下は、UQ-10 の前投与により防止されなかった。また、Glutathione S-transferase 活性も低下したが、この活性低下はUQ-10 の前投与により抑制された。しかしながら、Glutathione S-transferase の基質となる GSH 含量や Glutathione Reductase 活性に差が認められないことから、UQ-10 の前投与によって Glutathione S-transferase 活性の低下が防止されたとしても、CCl_4 誘導脂質過酸化反応を抑制する直接的な原因ではないと推測された。一方、CCl_4 処理による UQH_2-9 や α-Tocopherol などの脂溶性抗酸化物質含量の減少は、UQ-10 を前投与したラットでは有意に抑制された。また、細胞質 NADPH-UQ Reductase 活性は、CCl_4 処理により低下したが、UQ-10 を前投与したラットでは、低下はそれほど著しくなかった。*in vitro* の検討で、UQH_2 は、抗酸化作用の結果生じた α-Tocopheroxyl Radical を、再び α-Tocopherol へと還元することで、α-Tocopherol 倹約効果を示すことが認められている[25),30),31)]。したがって、UQ-10 を投与したラットでは、細胞質 NADPH-UQ Reductase の活性上昇と、それに伴った UQH_2 の増加が、ラット肝臓内において、CCl_4 により生じた脂質過酸化反応を直接的に、あるいは、α-Tocopherol の再生を介して間接的に抑制することにより、CCl_4 誘導肝炎を減弱したと推論された。なお、今回の *in vivo* 実験で明確になったことは、UQH_2 は細胞内の膜画分内での脂質過酸化には極めて有効な抗酸化剤であるが、水溶性画分でのラジカル消去には殆ど働かないことが示された。

これまで UQ-10 投与が種々の薬物による *in vivo* での脂質過酸化反応の抑制に有効とする報告は多いが[32)-39)]、今回の結果から類推して、それらの報告についても UQ-10 投与による肝臓内の UQH_2-10 含量ならびに NADPH-UQ Reductase 活性の上昇 (UQ 還元系の活性化) が、脂質過酸化反応抑制の主原因となっているものと思われる。

第八章 結　論

ラット組織や細胞画分のUQ同族体とUQH_2同族体の分布ならびにUQ還元酵素活性の分布を詳細に調べ、ミトコンドリア外UQの還元機構とその生理作用に関し、以下の結論を得た。

(1) UQ-9およびUQ-10は、ラット組織のあらゆる細胞画分に存在し、しかもその一部は還元型のUQH_2同族体であることを認めた。また、各細胞画分の還元比率には差がなく、組織全体の還元比率と同じであった。

(2) 肝臓のUQ-10還元活性の大半は細胞質に局在し、その本体は新規のNADPH依存性キノン還元酵素 (NADPH-UQ Reductase) であることを明らかにした。また、本酵素はラットの主UQ同族体であるUQ-9を最も良い電子受容体とする酵素であることを明らかにした。

(3) 肝細胞質NADPH-UQ Reductaseは、脂質膜内のUQ同族体をも還元することを明らかにした。しかもこの酵素は組織中のUQ同族体の還元比率の維持に対し、中心的役割を演じていることが示唆された。

(4) 肝細胞質NADPH-UQ Reductaseは、脂質膜内のUQの還元を介して脂質膜に誘導した脂質過酸化反応を抑制することを明らかにし、この酵素が生体内で新規の抗酸化系を形成している可能性を示した。

(5) UQ-10の前投与は、生体内抗酸化物質含量や抗酸化酵素活性に影響を与えずに、肝細胞質NADPH-UQ Reductase活性の促進によるUQ還元系の活性化と、それに伴う肝臓内UQH_2-10含量の増加を引き起こすことを明らかにした。さらに、CCl_4誘導ラット肝炎のUQ-10の前投与による減弱は、このような細胞質NADPH-UQ Reductaseと共役したUQH_2再生系の増強が、肝臓での脂質過酸化を抑制するためであることを明らかにした。

以上、細胞内オルガネラに広く分布するUQは、細胞質に存在する新規の酵素, NADPH-UQ Reductaseと共役しており、UQH_2として脂質膜内で起こる脂質過酸化反応に対する抗酸化剤として働いていることを *in vitro* およびUQ-10を前投与したラットを用いた *in vivo* 実験を通して明らかにした。

謝　辞

本研究を行うにあたり、御指導と御鞭撻、さらに本論文の御校閲を賜りました神戸学院大学薬学部・紀氏健雄教授に心より感謝の意を表します。

本論文作成にあたり、有益な御指導、御助言ならびに御校閲を賜りました大阪大学薬学部・真弓忠範教授に深謝致します。

また、本研究を遂行するにあたり、有益な御助言、御協力を賜りました神戸学院大学薬学部・梅澤智佐江教授、佐野圭二助教授、岡本正志講師、尾谷三枝子助手、新眞理子助手を初めとする第八研究室の諸氏、ならびに神戸学院大学人文学部・五島喜與太教授と、本研究内容の討論に参加していただき、有益な御助言を賜りました大阪大学薬学部薬剤学講座の皆様に深謝致します。

引用文献

1) Moore,T. and Rajagopal,K.R. (1940) *Biochem.J. 34*, 335-342.

2) Festenstein,G.N., Heason,F.W., Lowe,J.S. and Morton,R.A. (1955) *Biochem. J. 59*, 558-566.

3) Crane,F.L., Hatefi,Y., Lester,R.L. and Widmer,C. (1957) *Biochim. Biophys. Acta 25*, 220-221.

4) Morton,R.A., Gloor,U., Schindler,O., Wilson,G.M., Chopard-dit-Jean,L.H., Hemming,F.W., Isler,O., Leat,W.M.F., Pennock,J.F., Rüegg,R., Schwieter,U. and Wiss,O. (1958) *Helv. Chem. Acta 41*, 2343-2357.

5) Lester,R.L., Crane,F.L. and Hatefi,Y. (1958) *J. Am. Chem. Soc. 80*, 4751-4752.

6) Ramasarma,T. (1985) in *Coenzyme Q* (Lenaz,G., ed) pp. 67-81, John Wiley & Sons Ltd., Chichester.

7) Ernster,L. (1977) in *Biomedical and Clinical Aspects of Coenzyme Q* (Folkers,K. and Yamamura,Y., eds.) Vol. 1, pp. 15-21, Elsevier, Amsterdam.

8) Crane,F.L. and Morré,D.J. (1977) in *Biomedical and Clinical Aspects of Coenzyme Q* (Folkers,K. and Yamamura,Y., eds.) Vol. 1, pp. 3-14, Elsevier, Amsterdam.

9) Nyquist,S.E., Barr,R. and Morré,D.J. (1970) *Biochim. Biophys. Acta 208*, 532-534.

10) Leonhäuser,S., Leybold,K., Krisch,K., Staudinger,H., Gale,P.H., Page,A.C.,Jr., and Folkers,K. (1962) *Arch. Biochem. Biophys. 96*, 580-582.

11) Seshadri Sastry,P., Jayaraman,J. and Ramasarma,T. (1961) *Nature 186*, 557.

12) Jayaraman,J. and Ramasarma,T. (1963) *Arch. Biochem. Biophys. 103*, 258-266.

13) Kalén,A., Norling,B., Appelkvist,E.-L. and Dallner,G. (1987) *Biochim. Biophys. Acta 926*, 70-78.

14) Kalén,A., Appelkvist,E.-L., Chojnacki,T. and Dallner,G. (1990) *J. Biol. Chem. 265*, 1158-1164.

15) Åberg,F., Appelkvist,E.-L., Dallner,G. and Ernster,L. (1992) *Arch. Biochem.*

Biophys. 295, 230-234.

16) Spisni,A., Sartor,G., Masotti,L. and Lenaz,G. (1981) *Membr. Biochem. 4*, 149-157.

17) Sugiyama,S., Hattori,M., Nagai,S., Takamura,T. and Ozawa,T. (1985) *Arzneimittelforschung 35*, 23-25.

18) Goldenberg,H. Crane,F.L. and Morré,D.J. (1979) *J. Biol. Chem. 254*, 2491-2498.

19) Mellors,A. and Tappel,A.L. (1966) *J. Biol. Chem. 241*, 4353-4356.

20) Takeshige,K., Takayanagi,R. and Minakami,S. (1980) in *Biomedical and Clinical Aspects of Coenzyme Q* (Yamamura,Y., Folkers,K. and Ito,Y., eds.) Vol. 2, pp. 15-26, Elsevier, Amsterdam.

21) Bindoli,A., Cavallini,L. and Jocelyn,P. (1982) *Biochim. Biophys. Acta 681*, 496-503.

22) Eto,Y., Kang,D., Hasegawa,E., Takeshige,K. and Minakami,S. (1992) *Arch. Biochem. Biophys. 295*, 101-106.

23) Kagan,V.E., Serbinova,E.A., Koyova,G.M., Kitanova,S.A., Tyurin,V.A., Stoytchev,T.S., Quinn,P.J. and Packer,L. (1990) *Free Radic. Biol. Med. 9*, 117-126.

24) Booth,R.F.G., Galanopoulou,D.G. and Quinn,P.J. (1982) *Biochem. Int. 5*, 151-156.

25) Yamamoto,Y., Komuro,E. and Niki,E. (1990) *J. Nutr. Sci. Vitaminol. 36*, 505-511.

26) Fiorentini,D., Cabrini,L. and Landi,L. (1992) *Free Rad. Res. Comms. 18*, 201-209.

27) Frei,B., Kim,M.C. and Ames,B.N. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87*, 4879-4883.

28) Stocker,R., Bowry,V.W. and Frei.B. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88*, 1646-1650.

29) Ingold,K.U., Bowry,V.W. Stocker,R. and Walling,C. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90*, 45-49.

30) Mukai,K., Kikuchi,S. and Urano,S. (1990) *Biochim. Biophys. Acta 1035*, 77-82.

31) Cabrini,L., Stefanelli,C., Fiorentini,D. and Landi,L. (1991) *Biochem. Int. 23*, 743-749.

32) Bertelli,A., Giovannini,L., Bertelli,A.A.E., Maltinti,G., Scalori,V. and Romano,M.R. (1986) *Int. J. Tiss. Reac. 8*, 343-346.

33) Beyer,R.E. (1988) *Free Radic. Biol. Med. 5*, 297-303.

34) Sugrobova,N.P., Medvednik,R.S., Efimova,L.V., Katarzhnova,T.V., Lyubarev,A.E., Shaposhnikov,V.M., Obol'nikova,.E.A. and Poznanskaya,A.A. (1992) *Bull. Exp. Biol. Med. 114*, 1652-1655.

35) Marubayashi,S., Dohi,K., Ezaki,H., Yamada,K. and Kawasaki,T. (1983) *Transplant. Proc. 15*, 1297-1299.

36) Marubayashi,S., Dohi,K., Ezaki,H., Hayashi,K. and Kawasaki,T. (1982) *Surgery 91*, 631-637.

37) Matsushima,T., Sueda,T., Matsuura,Y. and Kawasaki,T. (1992) *J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 103*, 945-951.

38) Sugino,K., Dohi,K., Yamada,K. and Kawasaki,T. (1987) *Surgery 101*, 746-752.

39) Sugino,K., Dohi,K., Yamada,K. and Kawasaki,T. (1989) *Surgery 105*, 200-206.

40) Takada,M. and Watanabe, J. (1987) *J. Pharmacobio-Dyn. 10*, 124-127.

41) Reahal,R. and Wrigglesworth,J. (1992) *Drug Metab. Dispos. 20*, 423-427.

42) Okamoto,T., Fukunaga,Y., Ida,Y. and Kishi,T. (1988) *J. Chromatogr. 430*, 11-19.

43) Mohr,D., Bowry,V.W. and Stocker,R. (1992) *Biochim. Biophys. Acta 1126*, 247-254.

44) Okamoto,T., Fukui,K., Nakamoto,M. and Kishi,T. (1985) *J. Chromatogr. 342*, 35-46.

45) Ikenoya,S., Takada,M., Yuzuriha,T., Abe,K. and Katayama,K. (1981) *Chem. Pharm. Bull. 29*, 158-164.

46) Lang,J.K., Gohil,K. and Packer.L. (1986) *Anal. Biochem. 157*, 106-116.

47) Crane,F.L. (1965) in *Biochemistry of Quinones* (Morton,R.A., ed.) pp.183-206, Academic Press, New York.

48) Aramaki,Y., Yokotani,H., Ogiwara,S., Nakaguchi,T., Usui,T., Nomura,M.,

Morimoto,H. and Imada,I. (1970) *Pharmacometrics 4*, 659-672.

49) Imabayashi,S., Nakamura,T., Sawa,Y., Hasegawa,J., Sakaguchi,K., Fujita,T., Mori,Y. and Kawabe,K. (1979) *Anal. Chem. 51*, 534-536.

50) Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L. and Randall,R.J. (1951) *J. Biol. Chem. 193*, 265-275.

51) Hogeboom,G.H. (1955) in *Methods in Enzymology* (Colowick,S.P. and Kaplan,N.O., eds.) Vol. 1, pp. 16-19, Academic Press, New York.

52) Blobel,G. and Potter,V.R. (1966) *Science 154*, 1662-1665.

53) Muramatsu,M and Busch,H. (1967) in *Methods in Cancer Research* (Busch,H., ed.) Vol. 2, pp. 303-359, Academic Press, New York.

54) Sottocasa,G.L., Kuylenstierna,B., Ernster,L. and Bergstrand,A. (1967) *J. Cell Biol. 32*, 415-438.

55) Wattiaux,R., Wattiaux-de Coninck,S., Ronveaux-Dupal,M.F. and Dubois,F. (1978) *J. Cell Biol. 78*, 349-368.

56) Ehrenreich,J.H., Bergeron,J.J.M., Siekevitz,P. and Palade,G.E. (1973) *J. Cell. Biol. 59*, 45-72.

57) Ikehara,Y. and Pitot,H.C. (1973) *J. Cell Biol. 59*, 28-44.

58) Koizumi,K., Ito,Y., Kojima,K. and Fujii,T. (1976) *J. Biochem. 79*, 739-748.

59) Tisdale,H.D. (1967) in *Methods in Enzymology* (Estabrook,R.W. and Pullman,M.E., eds.) Vol. 10, pp. 213-215, Academic Press, New York.

60) Nagatsu,T. (1973) *Biochemistry of Catecholamines*, pp. 191-192, Tokyo University Press, Tokyo.

61) Walter,K. and Schütt,C. (1974) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer,H.U., ed) Vol. 2, pp. 856-860, Academic Press, New York.

62) Baudhuin,P., Beaufay,H., Rahman-Li,Y., Sellinger,O.Z., Wattiaux,R., Jacques,P. and De Duve,C. (1964) *Biochem. J. 92*, 179-184.

63) Bergmeyer,H.U. and Bernt,E. (1974) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer,H.U., ed.) Vol. 2, pp. 574-579, Academic Press, New York.

64) Komatsu,Y. and Fujii,T. (1971) *Chem. Pharm. Bull. 19*, 1943-1948.

65) Fiske,C.H. and Subbarow,Y. (1925) *J. Biol. Chem. 66*, 375-400.

66) Le Pecq,J.-B. and Paoletti,C. (1966) *Anal. Biochem. 17*, 100-107.

67) 小沢高将, 浅井淳平, 内海耕慥 (1971) *ミトコンドリア*, 南江堂, 東京.

68) Shibata,S. and Kobayashi,B. (1969) *Life Science 8*, 727-732.

69) Beutler,E., West,C. and Blume,K.-G. (1976) *J. Lab. Clin. Med. 88*, 328-333.

70) Dodge,J.T., Mitchell,C. and Hanahan,D.J. (1963) *Arch. Biochem. Biophys. 100*, 119-130.

71) Wakeyama,H., Takeshige,K., Takayanagi,R. and Minakami,S. (1982) *Biochem. J. 205*, 593-601.

72) Jayaraman,J., Joshi,V.C. and Ramasarma,T. (1963) *Biochem. J. 88*, 369-373.

73) Olson,R.E. and Rudney,H. (1983) in *Vitamins and Hormons* (Aurbach,G.D., ed.) Vol. 40, pp. 1-43, Academic Press, New York.

74) Kröger,A. and Klingenberg,M. (1973) *Eur. J. Biochem. 34*, 358-368.

75) Norling,B., Glazek,E., Nelson,B.D. and Ernster,L. (1974) *Eur. J. Biochem. 47*, 475-482.

76) Sun,I.L., Sun,E.E., Crane,F.L., Morré,D.J., Lindgren,A. and Löw,H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89*, 11126-11130.

77) Takada,M., Ikenoya,S., Yuzureha,T. and Katayama,K. (1982) *Biochim. Biophys. Acta 679*, 308-314.

78) Elmberger,P.G., Kalén,A., Brunk,U.T. and Dallner,G. (1989) *Lipids 24*, 919-930.

79) Tzagoloff,A. (1982) *Mitochondria*, Plenum Press, New York.

90) Ernster,L., Danielson,L. and Ljunggren,M. (1962) *Biochim. Biophys. Acta 58*, 171-188.

81) Ernster,L. (1967) in *Methods in Enzymology* (Estabrook,R W. and Pullman,M.E., eds.) Vol. 10, pp. 309-317, Academic Press, New York.

82) Ernster,L. and Forsmark-Andrée,P. (1993) *Clin. Investig. 71*, S60-S65.

83) Thor,H., Smith,M.T., Hartzell,P., Bellomo,G., Jewell,S.A. and Orrenius,S. (1982) *J. Biol. Chem. 257*, 12419-12425.

84) Lind,C., Hochstein,P. and Ernster,L. (1982) *Arch. Biochem Biophys. 216*, 178-185.

85) Takada,M., Yuzuriha,T. and Yamato,C. (1985) *J. Nutr. Sci. Vitaminol. 31*,

147-155.

86) Prochaska,H.J. (1988) *Arch. Biochem. Biophys. 267*, 529-538.

87) Hackenbrock,C.R. (1981) *Trends Biochem. Sci. 6*, 151-154.

88) Yagi,T. (1990) *Arch. Biochem. Biophys. 281*, 305-311.

89) Iyanagi,T. and Yamazaki,I. (1969) *Biochim. Biophys. Acta 172*, 370-381.

90) Tamura,M., Yubisui,T. and Takeshita,M. (1988) *Biochem. J. 251*, 711-715.

91) Shigemura,T. Kang,D., Nagata-Kuno,K., Takeshige,K. and Hamasaki,N. (1993) *Biochim. Biophys. Acta 1141*, 213-220.

92) Myszka,D.G. and Swenson,R.P. (1991) *J. Biol. Chem. 266*, 4789-4797.

93) Ernster,L., Ljunggren,M. and Danielson,L. (1960) *Biochem. Biophys. Res. Commun. 2*, 88-92.

94) Koli,A.K., Yearby,C., Scott,W. and Donaldson,K.O. (1969) *J. Biol. Chem. 244*, 621-629.

95) Cadenas,E., Mira,D., Brunmark,A., Lind,Christina, Segura-Aguilar,J. and Ernster,L. (1988) *Free Radic. Biol. Med. 5*, 71-79.

96) Rigo,A. and Viglino,P. (1975) *Anal. Biochem. 68*, 1-8.

97) Ernster,L. (1958) *Federation Proc. 17*, 216.

98) Helenius,A. and Simons,K. (1975) *Biochim. Biophys. Acta 415*, 29-79.

99) 石黒正恒 (1978) *生物化学実験法 8, SH 基の化学修飾*, 学会出版センター, 東京.

100) Klingenberg,M. (1974) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer,H.U., ed.) Vol. 4, pp. 2045-2059, Academic Press, New York.

101) Kakinuma,K. and Minakami,S. (1978) *Biochim. Biophys. Acta 538*, 50-59.

102) Krebs,H.A. and Veech,R.L. (1969) in *Advances in Enzyme Regulation* (Weber,G. ed.) Vol. 7, pp. 397-413, Pergamon Press, London.

103) Glock,G.E. and McLean,P. (1956) *Exp.Cell. Res. 11*, 234-236.

104) Hatefi,Y. and Rieske,J.S. (1967) in *Methods in Enzymology* (Estabrook,R.W. and Pullman,M.E. eds.) Vol. 10, pp. 235-239, Academic Press, New York.

105) Lenaz,G., Daves,Jr.,G.D. and Folkers,K. (1968) *Arch. Biochem. Biophys. 123*, 539-550.

106) Crane,F.L., Sun,I.L., Barr,R. and Morré,D.J. (1984) in *Biomedical and Clinical*

Aspects of Coenzyme Q (Folkers,K. and Yamamura,Y., eds.) Vol. 4, pp. 77-86, Elsevier, Amsterdam.

107) Veloso,D., Guynn,R.W., Oskarsson,M. and Veech,R.L. (1973) *J. Biol. Chem. 248*, 4811-4819.

108) Iyanagi,T. and Yamazaki,I. (1970) *Biochim. Biophys. Acta 216*, 282-294.

109) Beyer,R.E. (1990) *Free Radic. Biol. Med. 8*, 545-565.

110) Sugioka,K., Nakano,M., Totsune-Nakano,H., Minakami,H., Tero-Kubota,S. and Ikegami,Y. (1988) *Biochim. Biophys. Acta 936*, 377-385.

111) Michaelis,L. and Moore,M.J. (1985) *Biochim. Biophys. Acta 821*, 121-129.

112) Chazotte,B., Wu,E.-S. and Hackenbrock,C.R. (1991) *Biochim. Biophys. Acta 1058*, 400-409.

113) Fato,R., Battino,M., Esposti,M.D., Castelli,G.P. and Lenaz,G. (1986) *Biochemistry 25*, 3378-3390.

114) Futami,A., Hurt,E. and Hauska,G. (1979) *Biochim. Biophys. Acta 547*, 583-596.

115) Ulrich,E.L., Girvin,M.E., Cramer,W.A. and Markley,J.L. (1985) *Biochemistry 24*, 2501-2508.

116) Stocker,R. and Suarna,C. (1993) *Biochim. Biophys. Acta 1158*, 15-22.

117) Landi,L., Fiorentini,D., Cabrini,C., Stefanelli,C. and Sechi,A.M. (1989) *Biochim. Biophys. Acta 984*, 21-25.

118) Landi,L., Fiorentini,D., Stefanelli,C., Pasquali,P. and Pedulli,G.F. (1990) *Biochim. Biophys. Acta 1028*, 223-228.

119) Landi,L., Cabrini,L., Fiorentini,D., Sartor,G., Pasquali,P. and Masotti,L. (1991) *Free Rad. Res. Comms. 14*, 1-8.

120) Landi,L., Cabrini,L., Fiorentini,D., Sechi.A,M., Sartor,G., Pasquali,P. and Masotti,L. (1990) *Cell Biophys. 16*, 1-12.

121) Merati,G., Pasquali,P., Vergani,C. and Landi,L. (1992) *Free Rad. Res. Comms. 16*, 11-17.

122) Niki,E., Saito,T., Kawakami,A. and Kamiya,Y. (1984) *J. Biol. Chem. 259*, 4177-4182.

123) Niki,E., Kawakami,A. Saito,M., Yamamoto,Y., Tsuchiya,J. and Kamiya,Y. (1985)

J. Biol. Chem. 260, 2191-2196.

124) Doba,T., Burton,G.W. and Ingold,K.U. (1985) *Biochim. Biophys. Acta 835*, 298-303.

125) Niki,E., Kawakami,A., Yamamoto,Y. and Kamiya,Y. (1985) *Bull. Chem. Soc. Jpn. 58*, 1971-1975.

126) Kohen,R., Yamamoto,Y., Cundy,K.C. and Ames,B.N. (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85*, 3175-3179.

127) Esterbauer,H., Lang,J., Zadravec,S. and Slater,T.F. (1984) in *Methods in Enzymology* (Packer,L., ed.) Vol. 105, pp. 319-328, Academic Press, New York.

128) Landi,L., Cabrini,L., Fiorentini,D., Stefanelli,C. and Pedulli,G.F. (1992) *Chem. Phys. Lipids 61*, 121-130.

129) Takayanagi,R., Takeshige,K. and Minakami,S. (1980) *Biochem. J. 192*, 853-860.

130) Sugiyama,S., Kitazawa,M., Ozawa,T., Suzuki,K. and Izawa,Y. (1980) *Experimentia 36*, 1002-1003.

131) Willis,R.A., Folkers,K., Tucker,J.L., Ye,C.-Q., Xia,L.-J. and Tamagawa,H. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87*, 8928-8930.

132) Folkers,K., Langsjoen,P., Willis,R.A., Richardson,P., Xia,L.-J., Ye,C.-Q. and Tamagawa,H. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87*, 8931-8934.

133) Tamai,H., Manago,M., Yokota,K., Kitagawa,M. and Mino,M. (1988) *Internat. J. Vit. Nutr. Res. 58*, 202-207.

134) Coustard,J.M. and Sudraud,G. (1981) *J. Chromatgr. 219*, 338-342.

135) Hissin,P.J. and Hilf,R. (1976) *Anal. Biochem. 74*, 214-226.

136) Aebi,H. (1984) in *Methods in Enzymology* (Packer,L., ed.) Vol. 105, pp. 121-126, Academic Press, New York.

137) Oyanagui,Y. (1984) *Anal. Biochem. 142*, 290-296.

138) Paglia,D.E. and Valentine,W.N. (1967) *J. Lab. Clin. Med. 70*, 158-169.

139) Habig,W.H. and Jakoby,W.B. (1981) in *Methods in Enzymology* (Jakoby,W.B., ed.) Vol. 77, pp. 398-405, Academic Press, New York.

140) Carlberg,I. and Mannervik,B. (1975) *J. Biol. Chem. 250*, 5475-5480.

141) Johansson,I. and Ingelman-Sundberg,M. (1985) *FEBS Lett. 183*, 265-269.

142) Butler,T.C. (1961) *J. Pharmacol. Exp. Ther. 134*, 311-319.

143) Lai,E.K., McCay,P.B., Noguchi,T. and Fong,K.-L. (1979) *Biochem. Pharmacol. 28*, 2231-2235.

144) McCay,P.B., Noguchi,T., Fong,K.-L., Lai,E.K. and Poyer,J.L. (1980) in *Free Radicals in Biology* (Pryor,W.A. ed.) Vol. 4, pp. 155-186, Academic Press, New York.

145) Mönig,J., Bahnemann,D. and Asmus,K.-D. (1983) *Chem. -Biol. Interact. 45*, 15-27.

146) Recknagel,R.O., Glende Jr.,E.A. and Hruszkewycz,A.M. (1977) in *Free Radicals in Biology* (Pryor,W.A. ed.) Vol. 3, pp. 97-132, Academic Press, New York.

147) Gallagher, C.H. (1961) *Nature 192*, 881-882.

148) Di Luzio, N.R. and Costales,F. (1965) *Exp. Molec. Pathol. 4*, 141-154.

149) Karmen,A., Wróblewski,F. and LaDue,J.S. (1955) *J. Clin. Invest. 34*, 126-131.

150) Ohkawa,H., Ohishi,N. and Yagi,K. (1979) *Anal. Biochem. 95*, 351-358.

151) Rechnagel,R.O. and Glende,Jr.,E.A. (1973) *CRC Crit. Rev. Toxic. 2*, 263-297.

152) Connor,H.D., Lacagnin,L.B., Knecht,K.T., Thurman,R.G. and Mason,R.P. (1989) *Mol. Pharmacol. 37*, 443-451.

153) Edwards,M.J., Keller,B.J., Kauffman,F.C. and Thurman,R.G. (1993) *Toxicol. Appl. Pharmacol. 119*, 275-279.

154) Danni,O., Chiarpotto,E., Aragno,M., Biasi,F., Comoglio,A., Belliardo,F., Dianzani,M.U. and Poli,G. (1991) *Toxicol. Appl. Pharmacol. 110*, 216-222.

155) 渡部烈, 平塚明 (1988) *蛋白質 核酸 酵素* Vol. 33, pp. 1405-1416, 共立出版, 東京.

156) Prohaska,J.R. and Ganther,H.E. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun. 76*, 437-445.

157) Matsura,T., Yamada,K. and Kawasaki,T. (1992) *Biochim. Biophys. Acta 1127*, 277-283.

158) Matsura,T., Yamada,K. and Kawasaki,T. (1992) *Biochim. Biophys. Acta 1123*, 309-315.