

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14729

研究課題名(和文) 食物繊維と相互作用する腸管上皮細胞由来膜タンパク質の探索

研究課題名(英文) Search for intestinal epithelial cell-derived membrane proteins interacting with dietary fiber

研究代表者

矢部 富雄 (YABE, Tomio)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：70356260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：食物繊維は、天然の健康食品素材であり、特に生活習慣病を予防する食材として最近大きな注目を集めている。食物繊維がもたらす生理作用は消化管機能への作用であり、腸内容物との相互作用や小腸の絨毛形態や消化・吸収機能に影響を及ぼすことが明らかにされている。本研究課題では、食物繊維が消化管内局所的に分泌される生理活性物質に影響を及ぼし、細胞増殖に関係していることに焦点を当て、生体内でペクチンと相互作用するタンパク質の同定を試みた。しかしながら、ペクチンと相互作用する可能性が高い膜タンパク質は得られなかった。今後も引き続き探索を継続する予定である。

研究成果の概要(英文)：Dietary fiber is a natural health food ingredient, and has attracted a great deal of attention recently, in particular as a food material for preventing lifestyle diseases. It is clarified that the physiological function brought by dietary fiber is an action on gastrointestinal function, which is reported that dietary fiber affects interaction with intestinal contents, villus morphology, and the function of digestion and absorption in the small intestine. In this research project, we focused on the fact that dietary fiber affects physiologically active substance locally secreted in the gastrointestinal tract and is involved in cell proliferation, and we attempted to identify proteins interacting with pectin in vivo. But we could not get anything highly. We are planning to continue exploring in the future.

研究分野：糖質生化学

キーワード：ペクチン 腸管上皮細胞 食物繊維

1. 研究開始当初の背景

食物繊維は、天然の健康食品素材であり、特に生活習慣病を予防する食材として最近大きな注目を集めている。食物繊維がもたらす生理作用は消化管機能への作用であり、腸内容物との相互作用や小腸の絨毛形態や消化・吸収機能に影響を及ぼすことが明らかにされている。

McCullough らは、食物繊維混合物を成分栄養剤に添加した場合の、消化管の形態変化と陰窩細胞の分化増殖度を調べ、腸内細菌の有無にかかわらず小腸では杯細胞の増加と陰窩の分化増殖が認められることを報告した (McCullough *et al.*, *Gut*, **42**, 799-806, 1998)。このことから、食物繊維と直接相互作用する消化器系細胞由来膜タンパク質の存在が予想されているものの、これまでのところまだ報告されていない。

申請者らは食物繊維と直接相互作用する消化器系細胞由来膜タンパク質を同定するために、ヒト小腸 cDNA ライブラリーを導入したフェージディスプレイ法を用いてスクリーニングを行った結果、細胞外マトリクスタンパク質であるフィブロネクチンをペクチン結合因子として同定した。また、小腸上皮様モデルの Caco-2 細胞を用いて、ペクチンに対してフィブロネクチンを介した細胞応答が起こることを詳細に解析した (Nishida *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **78**, 635-643, 2014)。これらのことから、同様に、ペクチン以外の食物繊維についても腸管上皮細胞膜上に認識タンパク質が存在する可能性は大いに考えられた。

2. 研究の目的

本研究課題では、食物繊維が消化管内局所的に分泌される生理活性物質に影響を及ぼし、細胞増殖に関係していることに焦点を当て、「腸管上皮細胞表面には、食物繊維の構造特異的に相互作用するタンパク質が存在する」という仮説を立証することを目的とした。

これまでのところ、食物繊維と膜タンパク質の相互作用を示す直接的証拠は報告されておらず、本研究の課題の遂行により、食物繊維による組織形態の変化や陰窩増殖といった作用が速やかに進行する機構を明示できることが期待された。

世界中の多くの研究者が食物繊維の消化管機能に及ぼす影響のメカニズム解明を目指しているが、食物繊維の作用効果は一般に次のように説明されることが多い。すなわち「食物繊維が消化管内容物の粘性を増加させる効果」「食物繊維が消化管内容物の嵩を増加させる効果」「食物繊維が大腸内で発酵して生産される、短鎖脂肪酸をはじめとした二次代謝産物による効果」が、食物繊維の作用効果であると考えられている。しかし、食物繊維の摂取によって影響が及ぶ消化管機能のうち、組織形態の変化や陰窩増殖といっ

た作用は、これらの効果のみによって説明されるものではないと考えている。

そこで本研究課題では、「腸管上皮細胞表面には、食物繊維の構造特異的に相互作用する膜タンパク質が存在する」という作業仮説を提唱し、食物繊維の消化管機能への影響がより適切に説明することができるようになることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 水溶性食物繊維ペクチン由来アフィニティカラムの作成

水溶性食物繊維の一種であるペクチンをプルーンから抽出・精製した。まずプルーンエキスを蒸留水により希釈したのち、80%エタノールによりアルコール不溶性画分を調製した。これを DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにおいて主要な 0.30 M 炭酸水素ナトリウム溶出画分を試料として用いた。精製したペクチンは、ピオチン化したのちにストレプトアビジンを固定化した担体に結合させてアフィニティカラムを作成した。

(2) 腸管上皮細胞由来膜タンパク質の調製

小腸刷子縁膜をマウス小腸上部の空腸から調製し、さらに膜タンパク質を可溶化して ToMP (Total Membrane Protein) を調製した。この ToMP をペクチンアフィニティカラムに供してクロマトグラフィーを行い、0.5 M および 1.0 M 塩化ナトリウム含有緩衝液において溶出されるタンパク質 AsMP (Associated Membrane Protein) を得た。

(3) 食物繊維を構造特異的に認識する膜タンパク質の同定

AsMP は、SDS-PAGE、二次元電気泳動により分離したのち、MALDI-TOF-MS によるタンパク質の同定を試みた。

(4) 表面プラズモン共鳴法によるペクチンおよびフィブロネクチンとの相互作用解析

AsMP とフィブロネクチン (FN) のアミノ酸配列についてホモロジー検索を行って、相同性の高い配列を同定した。この配列を FN ペプチドとし、表面プラズモン共鳴法によりペクチンおよびフィブロネクチンとの相互作用を解析した。

(5) 細胞応答試験による FN ペプチドの機能の検討

分化 Caco-2 細胞にペクチンと FN ペプチドを添加して細胞応答を調べた。その際に、ペクチンにより発現の変動が知られている、アポトーシス促進遺伝子である p53 と細胞周期を停止させる p21 の mRNA 発現量に注目した。

4. 研究成果

作成したペクチンを固定化したアフィニティカラムにマウス小腸由来膜タンパク質を供してクロマトグラフィーを行った。その結果、0.5 M および 1.0 M 塩化ナトリウム含有緩衝液において溶出されるタンパク質が確認され、これらを生理的条件下に適うもので

あると判断し、AsMP とした (図 1)。

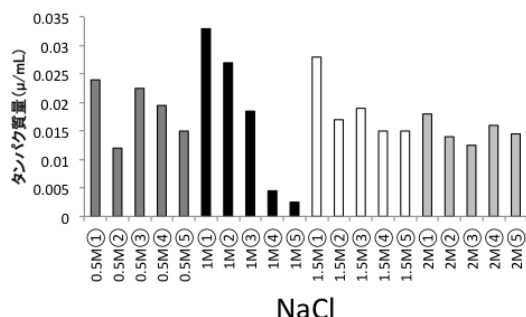


図 1 ペクチンカラムによる AsMP の溶出

AsMP として得られたタンパク質のうち、ペクチンと相互作用する可能性があるものを検討した結果、生体内でペクチンと相互作用する可能性が高いタンパク質を同定することは出来なかった。そこで、候補タンパク質とフィブロネクチン (FN) のアミノ酸配列についてホモロジー検索を行った結果、相同性の高い配列を発見した。この配列を FN ペプチドとし、表面プラズモン共鳴法によりペクチンおよび FN との相互作用を解析した。FN を固定したセンサーチップを用いた結果、FN ペプチドは FN に結合してペクチンとの結合を阻害することがわかった (図 2)。また、ペクチンと FN の結合部位と、FN ペプチドと FN の結合部位が競合していることから、それぞれ結合部位は一致している可能性が示唆された。

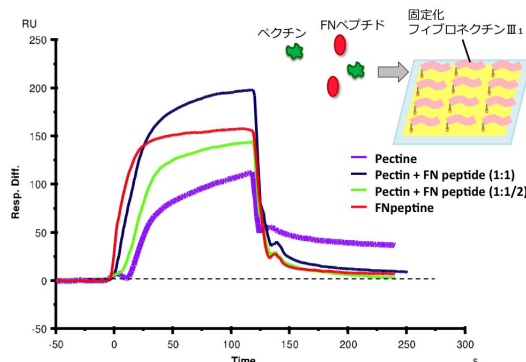


図 2 FN ペプチドとペクチンおよびフィブロネクチンとの相互作用

そこで、分化 Caco-2 細胞にペクチンと FN ペプチドを添加して、細胞応答を調べたところ、ペクチンと FN ペプチドのどちらでも、アポトーシス促進遺伝子である p53 と細胞周期を停止させる p21 の mRNA 発現量が促成されていた (図 3)。以上のことから、FN ペプチドは細胞応答の際にもペクチンが結合する FN の同じ部位に結合し、シグナルが伝達されていること、そしてペクチンによる小腸絨毛の伸長にはアポトーシスの抑制が関連していることが示唆された。

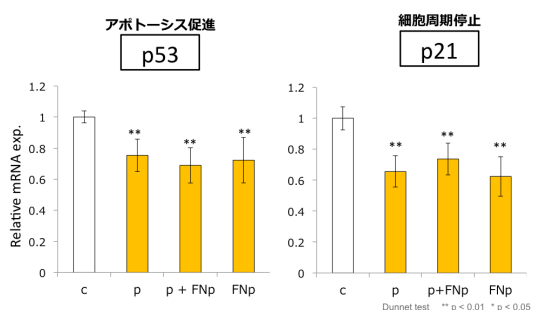


図 3 ペクチンおよび FN ペプチドによる細胞応答への影響

(C:コントロール , p: ペクチン添加 , p+FNp : ペクチンおよび FN ペプチド添加 , FNp : FN ペプチド添加)

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 12 件)

(1) 矢部 富雄 : 腸管免疫へのプロローグ : 食物繊維と腸管構成細胞との相互作用, 日本農芸化学会 2017 年度大会シンポジウム「腸管免疫の一端を切り開く (腸内免疫系と腸内フローラ)」, 2017 年 3 月 19 日, 京都女子大学 (京都市) (招待講演)

(2) 中智美, 宮本 菜由, 山根 菜摘, 北口 公司, 矢部 富雄 : 腸管上皮由来フィブロネクチンと相互作用するペクチン部分構造の解明, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 3 月 19 日, 京都女子大学 (京都市)

(3) 矢部 富雄 : 食物繊維ペクチンの未知の生理機能の探索, 平成 28 年度日本応用糖質科学会東北支部福島地区講演会, 2016 年 11 月 18 日, 日本大学工学部 (福島県郡山市) (招待講演)

(4) 矢部 富雄 : 多糖類の分子構造に隠された化学情報を読み解く, 第 9 回北陸合同バイオシンポジウム, 2016 年 11 月 4 日, 金津創作の森 (福井県あわら市) (招待講演)

(5) Tomio Yabe, Mitsutaka Nishida, Toshinari Kuwae, Mayu Miyamoto, Natsumi Yamane, and Kohji Kitaguchi : Pectin from *Prunus domestica* L. induces proliferation of intestinal cells through the alteration of cell-surface heparan sulfate on differentiated epithelial cells *in vitro*, 1st Food Chemistry Conference, 2016 年 11 月 1 日, アムステルダム (オランダ)

(6) 矢部 富雄 : 水溶性ペクチンは腸管上皮細胞表面のヘパラン硫酸糖鎖構造変化を誘導する, 第 16 回青森糖質研究会, 2016 年 10 月 7 日, 弘前大学 (弘前市) (招待講演)

(7) 中智美, 宮本 菜由, 山根 菜摘, 北口 公司, 矢部 富雄 : 腸管上皮細胞由来フィブロネクチン相互作用するペクチンの部分構造の解

明, 日本農芸化学会中部支部第 177 回例会,
2016 年 9 月 24 日, 名古屋大学 (名古屋市)

(8)宮本 茉由, 山根 菜摘, 岩本 悟志, 北口 公
司, 矢部 富雄: ペクチン分子中のフィブロネ
クチンと相互作用する多糖構造の解析, 日本
応用糖質科学会平成 28 年度大会 (第 65 回),
2016 年 9 月 14 日, 福山大学 (福山市)

(9)桑江 俊成, 西田 光貴, 伊藤 千弘, 北口 公
司, 矢部 富雄: ヘパラン硫酸糖鎖構造変化を
介したペクチンによる腸管上皮細胞応答の
解明, 日本糖質学会第 35 回年会, 2016 年 9
月 3 日, 高知市文化プラザかるぽーと (高知
市)

(10)下吉 美澄, 西田 光貴, 村田 一馬, 北口 公
司, 矢部 富雄: ペクチンによる細胞表面糖鎖
構造変化の誘導機構の解析, 日本農芸化学会
2016 年度大会, 2016 年 3 月 30 日, 札幌コン
ベンションセンター (札幌市)

(11)Tomio Yabe: Physiological function of
the dietary fiber for intestinal
epithelial cells in human, the 4th
UGSAS-GU International Symposium 2015,
August 26th, 2015, Gifu University (岐阜
市) (招待講演)

(12)矢部 富雄: ペクチンや澱粉等の多糖類の
新たな機能性について, 第 55 回澱粉研究懇
談会, 2015 年 6 月 5 日, ホテル川良 (伊東市)
(招待講演)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www1.gifu-u.ac.jp/~yabet/
index.html](http://www1.gifu-u.ac.jp/~yabet/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢部 富雄 (YABE, Tomio)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号: 7 0 3 5 6 2 6 0