

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18693

研究課題名(和文) スフィンゴ脂質の栄養素吸収に与える影響の解析

研究課題名(英文) Effect of dietary sphingolipids on the absorption of nutrients

研究代表者

酒井 祥太 (SAKAI, Shota)

北海道大学・先端生命科学研究院・特任助教

研究者番号：60611720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：様々な食品素材由来のグルコシルセラミド、またはそれを構成する各スフィンゴイド塩基を精製し、小腸上皮モデルに各スフィンゴ脂質を添加後の各種栄養素の取り込みに関わるトランスポーターの遺伝子発現および細胞内の各スフィンゴ脂質量をLC-MS/MSで調べた。その結果、植物由来および真菌類由来のグルコシルセラミドとそれらを構成するスフィンゴイド塩基は、ミネラル類の取り込みに関わるトランスポーターの遺伝子発現を亢進することを見出した。また、銅のトランスポーターであるCRT1の二量体形成を促進すること、鉄のトランスポーターDMT-1の糖鎖修飾体が増加することがわかった。

研究成果の概要(英文)：Glucosylceramides and their sphingoid bases were purified from various food materials and the effect of these sphingolipids on the mRNA expression of the transporter of various nutrients was investigated. The levels of mRNA of transporters related to minerals, such as calcium and magnesium, were significantly increased by the treatment of glucosylceramide and sphingoid base from plants and fungi. Furthermore, These sphingolipids facilitated the dimerization of CRT1 protein, which is involved in the incorporation of copper, and increased the contents of glycosylated iron transporter DMT-1 protein.

研究分野：脂質生化学

キーワード：スフィンゴ脂質 栄養素 トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

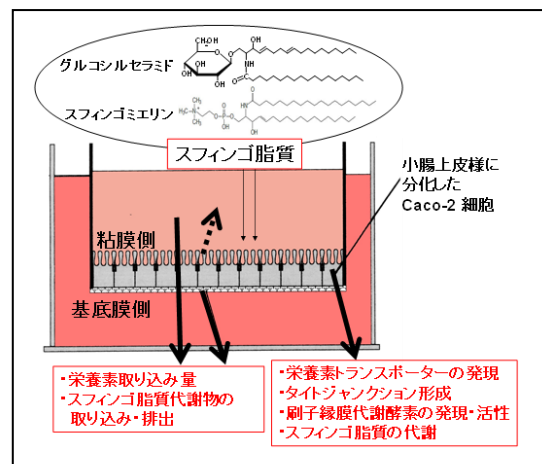
スフィンゴ脂質とは、スフィンゴイド塩基を基本骨格に持つ脂質の一群であり、セラミドやスフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質など多種多様な分子種が存在する。スフィンゴ脂質は一般的に、細胞膜の構成成分として各組織に普遍的に存在している。スフィンゴ脂質の機能については古くからよく研究され、発達期の神経突起伸長や神経伝達などの神経機能や、免疫細胞の遊走、炎症反応に関与することが明らかになってきた。スフィンゴ脂質の極性部位を持たない構造のセラミドは、それ自身が細胞の生存と死に関わる細胞内のシグナル分子として働くほか、皮膚の角質層に豊富に含まれることから皮膚のバリア機能や水分保持機能に関与している。スフィンゴ脂質の生体内における重要性が明らかになるとともに、最近では機能性の食品成分として注目されはじめ、経口摂取による抗腫瘍作用や免疫調節作用、皮膚機能改善作用など様々な生理機能を有することがわかってきた。現在もっとも盛んに行われている機能性は、皮膚機能改善作用であり、美肌効果を目的とした化粧品や飲料に配合されはじめている。しかしながら、これらの機能の作用機構については未だ不明な点が多い。

食餌性スフィンゴ脂質の消化吸収については、ラットを用いた実験から植物由来のスフィンゴ脂質が、実際に消化管から吸収されることが証明されている。また、フィトスフィンゴシンを合成できないマウスに、酵母由来フィトスフィンゴシンを摂取させると、肝臓でフィトセラミドが検出されることを確認している。したがって、どのような生物種由来のスフィンゴ脂質であっても、生体内に確実に吸収されることで、様々な生理機能発揮するということが明らかになってきている。さらに、生理機能の作用メカニズムとしては、特定のスフィンゴ脂質が核内受容体であるPPARを活性化することが報告されている。PPAR α の活性化は、脂肪酸の代謝に関連しており、その活性化剤は高脂血症改善薬として販売されている。また、PPAR β の活性化は、皮膚表皮角化細胞の分化と皮膚の創傷治癒を活性化し、PPAR γ は、表皮角化細胞の分化を誘導することが知られている。これらのことから、食餌性スフィンゴ脂質の有するメタボリックシンドローム予防効果や皮膚機能改善効果の作用機構は、核内受容体を介していることが示唆され、実際に、スフィンゴ脂質を経口摂取することによって、皮膚機能が改善することや高脂肪食により誘導される耐糖能異常が改善されること、さらに肝臓でのコレステロール量と中性脂肪量が減少することが報告されている。また他方で、食餌性スフィンゴ脂質が腸内細菌叢に影響を与えるといった観点からの作用機構解明へのアプローチも行われている。しかしながら、核内受容体への影響だけでは説明ができない部分が多いのが現状である。

2. 研究の目的

スフィンゴ脂質の機能性については、生体内の局所に注目した研究が大部分であるが、「栄養素成分としてのスフィンゴ脂質」といった観点からはあまり評価されていない。そこで本研究では、スフィンゴ脂質の摂取により、様々な栄養素の取り込みや代謝が変化を受け、その結果、生体内の局所における生理作用のみではなく、体全体として正の作用を引き起こす可能性を考え、「スフィンゴ脂質摂取による生体内の栄養バランスの変化」に着目した。消化管内における様々な栄養素の取り込みに注目し、食餌性スフィンゴ脂質の小腸上皮細胞における栄養素の代謝やトランスポーターの遺伝子発現および活性に与える影響を検討することにより、栄養学的観点からスフィンゴ脂質の生理作用の機構を解明するとともに、食餌性スフィンゴ脂質の機能性食品素材としての新たな可能性を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法



スフィンゴ脂質を構成するスフィンゴイド塩基部分は、生物種によって異なる。哺乳動物では炭素骨格の4位に二重結合を持つスフィンゴシンが主要成分であるが、高等植物ではスフィンゴシンの8位にも二重結合を持つスフィンガジエニンが、酵母ではスフィンゴシンの4位に二重結合ではなく水酸基の入ったフィトスフィンゴシンが主要な構成成分である。これらの構造の違いによる影響についても評価するため、食餌性スフィンゴ脂質として、哺乳動物型のスフィンゴミエリン(スフィンゴシン)、植物型グルコシルセラミド(スフィンガジエニン)、真菌類型グルコシルセラミドセラミドをそれぞれ調製した。

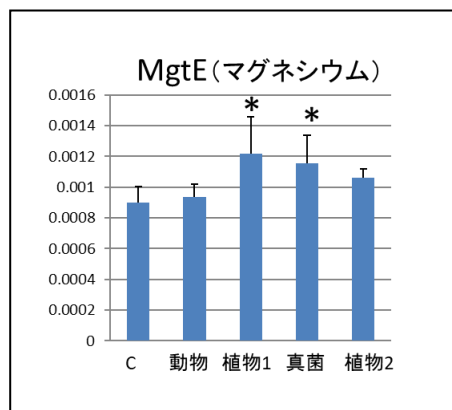
遺伝子発現を確認する栄養素としては、それぞれ同定されているトランスポーターや結合タンパク質を候補とし、脂質(コレステロール、脂肪酸など)、糖、ビタミン(ビタミンDや葉酸など)、アミノ酸、ペプチド、ミネラル(亜鉛、カルシウム、マグネシウムなど)などについて検討した。まず、小腸上皮様に分化したCaco-2細胞において、既知のものも含

めて、上述の栄養素のトランスポーターや代謝酵素の発現を確認した。次に、様々な濃度の各スフィンゴ脂質を、トランスウェル上で小腸上皮様に分化させた Caco-2 細胞に添加し、栄養素トランスポーターの経時的な遺伝子発現の変動をリアルタイム RT-PCR 法で、タンパク質をウェスタンブロット法で調べた。これらの結果、発現に変動が認められたものについて、実際の栄養素取り込み量変化を粘膜側から基底膜側の培養液に吸収された量の比較することで、候補トランスポーターの活性を検討した。また、内因性的スフィンゴ脂質の代謝変動について、スフィンゴミエリン分解/合成酵素やグルコシルセラミド分解/合成酵素などの遺伝子発現も同様に調べた。このとき、細胞および粘膜側/基底膜側の培養液を回収し、高速液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) を用いて、それぞれに含まれるスフィンゴ脂質 (代謝物) の分子組成およびそれぞれの含量を調べて、スフィンゴ脂質代謝に与える影響を検討した。

4. 研究成果

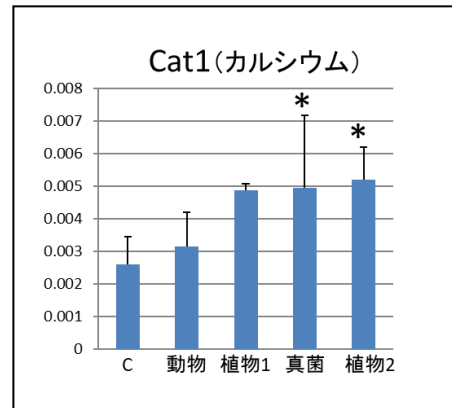
様々な食品素材由来のグルコシルセラミド、またはそれを構成する各スフィンゴイド塩基を単離、精製した。植物由来として、こんにゃくおよび米を、真菌類由来としてタモギダケを用いた。各抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、グルコシルセラミド画分を得た。薄層クロマトグラフィー (TLC) でグルコシルセラミドを精製し、純度を高速 HPLC で、分子種を LC-MS で確認した。調製したグルコシルセラミドを水酸化バリウム/ジオキサンを用いて加水分解した。分解物をメタノール/無水酢酸を用いてアセチル化し、HPLC で各アセチル化スフィンゴイド塩基を分取した。アセチル化スフィンゴイド塩基は、脱アセチル化後に精製し、純度および構造を確認した。植物由来スフィンゴイド塩基として、4trans, 8cis-スフィンガジエニン、4trans, 8trans-スフィンガジエニンを、真菌類由来として 9-メチル-4trans, 8trans-スフィンガジエニンをそれぞれ精製することができた。

小腸上皮様に分化させた Caco-2 細胞に各スフィンゴ脂質を添加し、24 時間後に各種



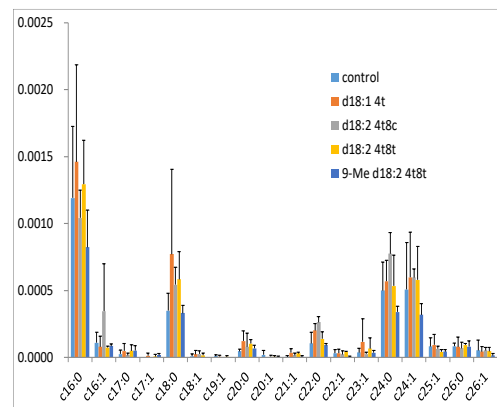
MgtE の mRNA 発現量

栄養素の取り込みに関わるトランスポーターの遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR で、細胞内のセラミド、スフィンゴミエリン、スフィンゴイド塩基、グルコシルセラミド量を LC-MS/MS で調べた。このとき、同時に各スフィンゴ脂質で処理後の DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、植物由来および真菌類由来のグルコシルセラミドとそれらを構成するスフィンゴイド塩基は、カルシウムやマグネシウムなどのミネラルの取り込みに関わるトランスポーターの遺伝子発現を亢進することを見出した。



Cat1 の mRNA 発現量

一方、各スフィンゴ脂質添加前後の Caco-2 細胞の細胞内における内因性的各スフィンゴ脂質量には有意な変化は認められなかった。



細胞内セラミド分子種の定量結果

顕著な変動が認められたトランスポーターについて、分化 Caco-2 細胞におけるそれらのタンパク質発現をウェスタンブロットで調べたところ、植物および真菌類由来のグルコシルセラミド処理によって、銅イオンの取り込みに関わるトランスポーターである CRT1 の二量体形成を促進すること、鉄イオンの細胞内への取り込みに関与する DMT-1 の糖鎖修飾体が増加することがわかった。以上の結果は、食餌性スフィンゴ脂質が銅や鉄などの吸収を促進する可能性を示唆しており、これまでに知られていないスフィンゴ脂質の新たな機能

性が明らかになった。

5. 主な発表論文等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 祥太 (Shota, Sakai)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・

特任助教

研究者番号：60611720