

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10992

研究課題名(和文) 脂溶性食品成分による細胞膜ドメイン制御を介した上皮バリア機能強化の分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying the promotion of epithelial barrier function by fat-soluble food components via regulating cell polarity

研究代表者

松浦 達也 (MATSURA, Tatsuya)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：00199746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脂溶性食品成分であるコエンザイムQ10 (CoQ10) による細胞膜ドメインの変化および細胞膜ドメイン制御を介した上皮バリア機能の調節(安定化)機構について調べるために、細胞極性モニタリングシステムを構築するとともに、上皮細胞の極性形成過程に及ぼす影響(上皮バリア機能に対する作用)を検討した。CoQ10は細胞間接着依存的な上皮細胞のタイトジャンクション形成を早め、上皮細胞の極性を促進することが明らかになった。その分子機構として、PI3キナーゼシグナルを介したatypical protein kinase Cの活性化により極性形成が促進されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により脂溶性食品成分(特にCoQ10)による細胞膜ドメイン制御を介した上皮バリア機能強化という新たな生理機能およびその分子メカニズムが解明されれば、食品成分に限らず、より効果的な化学物質を合成することができ、新規の創薬につながる可能性も含めて、本研究の成果は社会的に貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examined whether coenzyme Q10 (CoQ10) reinforces epithelial barrier function via regulating cell polarization. CoQ10 promoted repolarization by calcium addition of the depolarized MDCK cells, accelerating tight junction formation. Immunohistochemical analyses showed that CoQ10 increased localization of caveolin to the apical membrane domains of the cells. We found that CoQ10 activates atypical protein kinase C (aPKC) and PI3 kinase signaling. We also found that CoQ10 enhanced complex formation of aPKC and Par3 in MDCK cells.

Our study has demonstrated that CoQ10 promotes the cell polarization via caveolin/PI3 kinase/aPKC signaling pathway, enhancing epithelial barrier function.

研究分野：生化学、医科栄養学、酸化ストレス学

キーワード：脂溶性食品成分 コエンザイムQ10 細胞膜ドメイン 上皮バリア機能 細胞極性 atypical PKC PI3キナーゼ カベオラ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

極性化した上皮細胞は細胞間接着構造であるタイトジャンクション(TJ)を基点としてアピカル膜ドメイン(AD)およびバソラテラル膜ドメイン(BD)と呼ばれる膜ドメインに膜タンパク質および膜リン脂質を秩序立てて配置させている。この極性化により上皮細胞は生体の内外を隔てる上皮バリアとして機能し、ウイルス・細菌などの病原体や有害物質の侵入を防ぐとともに、栄養素などの方向性を持った取込みや放出を行っている(図1)。このため上皮バリア機能の破綻はウイルス・細菌感染や慢性炎症性疾患の原因となることが明らかになっている。近年、健康寿命を延ばすことに国民的関心が高まっている。健康寿命延伸には栄養摂取の重要性が指摘されており、上皮バリア機能を強化する食品機能性成分の探索は非常に重要である。これまで食品成分であるビタミンE(VE)に関しては、抗酸化作用以外に膜構造に対する作用も想定されているが(Zingg JM, J Sci Nutr Vitaminol 61:S76-S77, 2015) 未だ詳細な報告はなされていない。

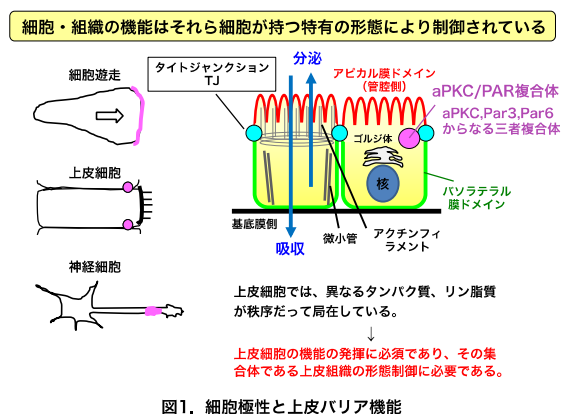
さらに、コエンザイムQ10(CoQ10)やVEを含めた脂溶性食品成分の細胞膜ドメインや上皮バリア機能制御に関する研究は全く行われていない。本研究では、脂溶性食品成分であるCoQ10による細胞膜ドメインの変化および細胞膜ドメイン制御を介した上皮バリア機能の調節(安定化)機構について調べるために、細胞極性モニタリングシステムを構築するとともに、上皮細胞の極性形成過程に及ぼす影響(上皮バリア機能に対する作用)を検討した。

### 2. 研究の目的

本研究では、脂溶性食品成分のCoQ10が“細胞膜ドメイン制御を介して上皮バリア機能を調節(安定化)する”と仮定し、ADおよびBDの各ドメインに局在するタンパク質や脂質に特異的に結合するタンパク質ドメインとGFPとの融合分子を発現させた“細胞極性モニタリングシステム”を構築し、CoQ10による細胞膜ドメインの変化を解析する。また、CoQ10の上皮バリア機能に対する影響を調べるために、上皮細胞特有の細胞間接着構造であるTJの形成過程、すなわち上皮細胞の極性形成過程に対する作用を検討し、“細胞膜ドメイン制御を介した上皮バリア機能の調節(安定化)機構を解明する”ことを目的に研究を遂行する。上述したようにこれら脂溶性食品成分が細胞膜ドメインのダイナミクスにどのような影響を与えるかに関してはこれまで検討されていなかった。したがって、本研究により脂溶性食品成分(特にCoQ10)による細胞膜ドメイン制御を介した上皮バリア機能強化という新たな生理機能およびその分子メカニズムが解明されれば、食品成分に限らず、より効果的な化学物質を合成することができ、新規の創薬につながる可能性も含めて、本研究の成果は社会的に貢献できるものと考えられる。

### 3. 研究の方法

CoQ10の上皮バリア機能に対する影響を調べるために、MDCK細胞をカルシウム( $\text{Ca}^{2+}$ )除去培地で24時間培養して細胞間接着構造を消失させ、再び $\text{Ca}^{2+}$ 含有培地に変換した後、TJ形成をTJマーカーであるZO-1の免疫染色により検討した(カルシウムスイッチ法:CS)。TJは、上皮細胞層の内外を隔てるバリアー機能を有している。そのため、CSなどによるMDCK細胞の極性化過程においてTJ形成に伴う上皮細胞層間(細胞層の内外の間に)のTER(Trans epithelial electrical resistance)値が一次的に上昇することが知られている。そこでTJの機能を調べる



ために、TER を経時的に測定した。また、CoQ10 の細胞膜ドメインに対する影響を調べるために、BD に局在するイノシトールリン脂質 (PIP<sub>3</sub>) に特異的に結合する分子ドメインと GFP との融合タンパク質 (GFP-AktPH)、脂質ラフトに存在するカベオリン-1 (Cav-1) と GFP の融合タンパク質 (GFP-Cav-1)、ホスファチジルセリン (PS) に結合する Lact-C2 ドメインと GFP の融合タンパク質 (GFP-Lact-C2)、カベオラ構造に依存しない AD マーカーの p75 と GFP の融合タンパク質 (GFP-p75) を発現させた MDCK 細胞を作製し (細胞極性モニタリングシステム)、CoQ10 のそれらの局在に対する作用を検討した。さらに細胞極性の制御に関わる atypical protein kinase C (aPKC)-Par 複合体の形成および aPKC と PI3 キナーゼの活性化に対する CoQ10 の影響を生化学的手法により検討した。

#### 4. 研究成果

CoQ10 (10 μM) を加えた培地を用いて CS を行い CoQ10 の MDCK 細胞極性化に対する作用を経時的 (CS 0 時間 : 0 h、1 時間 : 1 h、2 時間 : 2 h) に観察した。TJ の形成は、そのマーカーである ZO-1 を蛍光免疫細胞染色することにより検討した。その結果、コントロール群 (Cont) と比較して CoQ10 処理群において、TJ 形成が促進されることが明らかになった (図 2)。また、

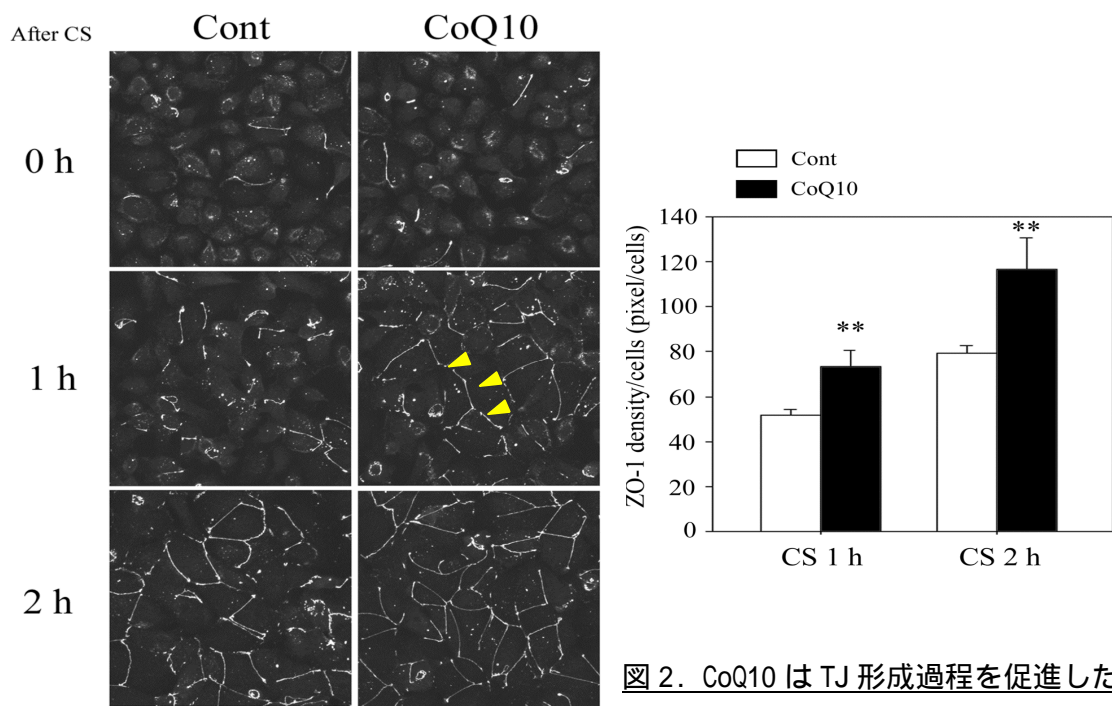


図 2. CoQ10 は TJ 形成過程を促進した

CS に伴う TER 値の上昇が CoQ10 処理群で早くなると共に、その値が上昇していることが明らかになった (図 3)。一方、極性が失われた MDCK 細胞では、F-actin 陽性 (アクチンフィラメント) のアピカルタンパク質を含む細胞内凝集体が形成され、CS による TJ の形成過程と同調して F-actin 陽性凝集体は AD へと輸送されるため細胞内から失われることが報告されている。CoQ10 処理群では、コントロール群と比較して CS 後迅速に F-actin 凝集体が消失することが明らかになった (図 4)。

以上の結果より、CoQ10 は細胞間接着依存的な上皮細胞の TJ 形成を早め、上皮細胞の極性化を促進することが明らかになった。

CoQ10 の細胞膜ドメインに対する作用を調べるため、MDCK 細胞に CoQ10 を添加し、2 時間後における GFP-AktPH、GFP-Cav-1 の局在変化を検討した。CoQ10 処理した細胞では GFP-AktPH と GFP-Cav-1 の形質膜への局在変化が確認された (図 5)。また、CoQ10 添加後の GFP-Lact-C2 の局在を調べたところ AD への局在が促進されており、CoQ10 はコレステロールリッチなカベオラ構造に

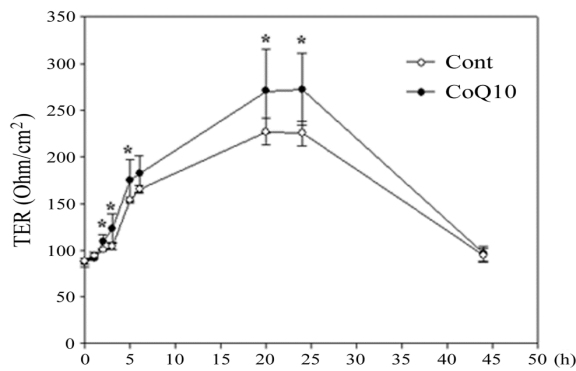


図3. CoQ10はCSによるTER値上昇を促進した

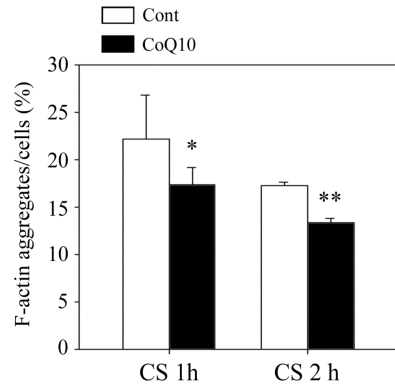


図4. CoQ10はCSによる細胞内凝集体の消失を早めた

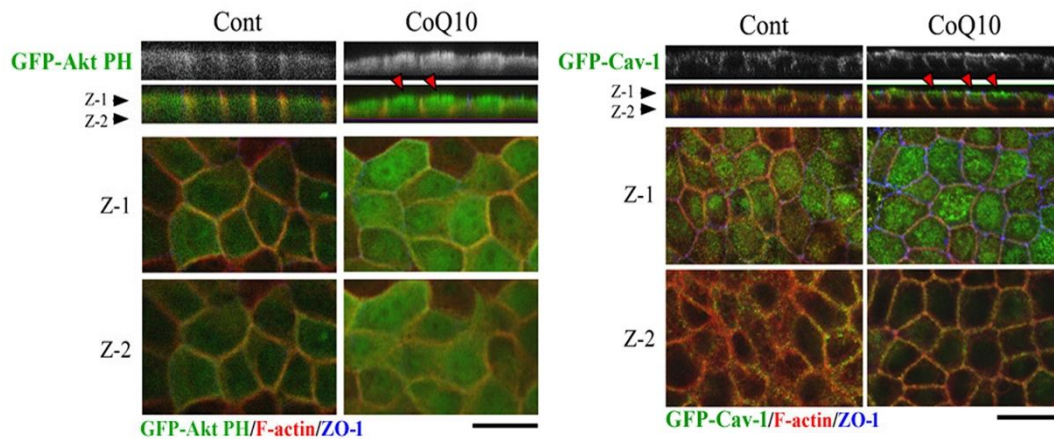


図5. CoQ10の細胞膜ドメインに対する作用

局在するPSのADへの局在を促進することが明らかになった(データ未提示)。一方、コレステロールリッチドメイン以外に局在するp75のADへの局在は促進されなかった(データ未提示)。

細胞極性制御因子であるaPKCは上皮細胞の極性化に必須であることが報告されている。また、aPKCのキナーゼ活性の阻害によりTJの消失が誘導されることも知られている。そこで、CoQ10処理によりaPKC活性に変化が生じているかaPKC活性化に関わるスレオニン560のリン酸化(T560-P)に対する抗体を用いて検討した。aPKCのリン酸化についてCoQ10を処理した細胞では、CS後、0.5h、1h、24hにおいてコントロール群よりもaPKC T560のリン酸化が上昇していた。また、aPKC活性に働くPI3キナーゼシグナルの活性変化についてAkt S473のリン酸化を指標に検討した。その結果、Akt S473のリン酸化もCoQ10処理によって上昇しておりPI3キナーゼシグナルの活性化が起きていることが明らかになった(図6)。CoQ10によるaPKCの活性化(T560-リン酸化)はPI3キナーゼの阻害剤LY処理により減少した(図7)。また、LY処理によってもGFP-Cav-1の局在化は阻害されていないことから(データ未提示)、CoQ10処理によりカベオラ構造の形成が促進され、その後、PI3キナーゼシグナルが活性化していることが示唆された。一方、aPKCと同じく極性制御分子であるPar-3は、aPKCと複合体(aPKC-Par複合体)を形成することが知られている。この複合体の形成は、上皮細胞の極性化に必須であることが明



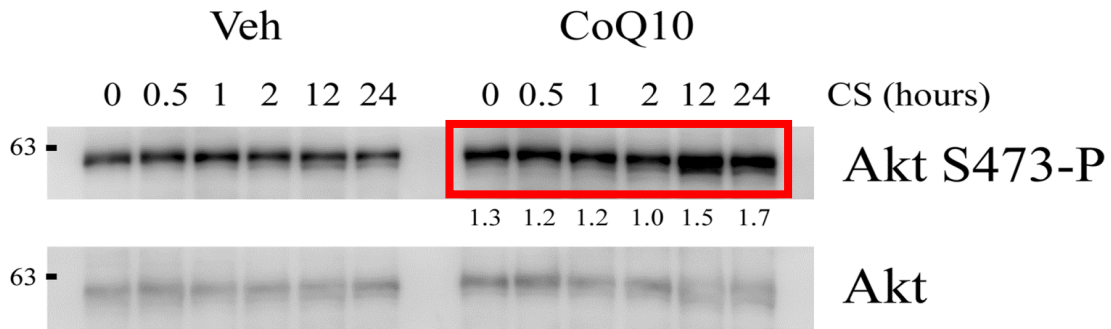
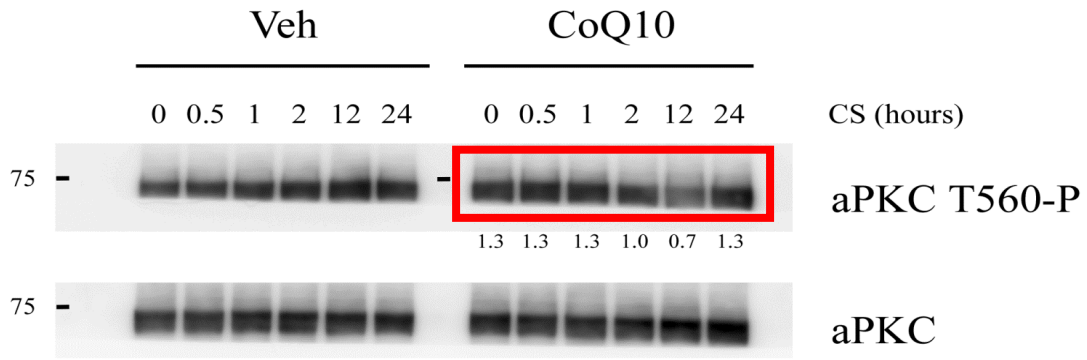


図 6. CoQ10 は CS 後の aPKC、Akt の活性化を促進した

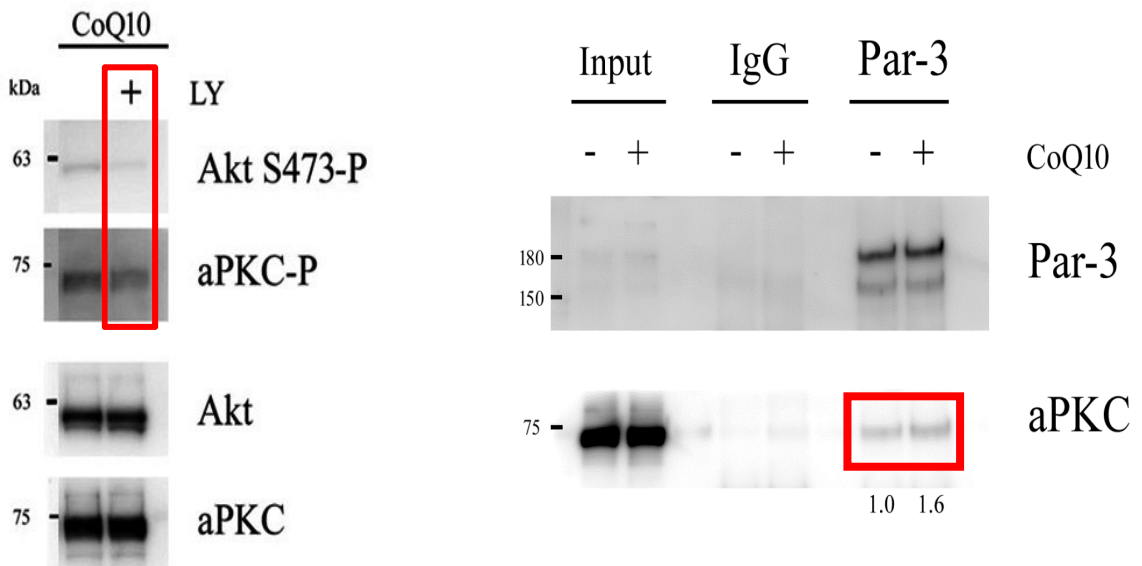


図 7. CoQ10 による aPKC の活性化は PI3 キナーゼ阻害により減少した

図 8. CoQ10 は極性制御分子 aPKC-Par 複合体形成を促進した

らかにされている。そこで、CoQ10 の aPKC-Par 複合体形成に対する作用について抗 Par-3 抗体を用いた免疫沈降実験により検討した。その結果、CoQ10 処理群では Par-3 と結合している aPKC の量 (Par-3 と共沈降される aPKC) がコントロールと比較して増加していることが明らかになった (図 8)。このことから、CoQ10 による上皮細胞の極性化促進効果は、aPKC-Par 複合体形成促進を介していることが示唆された。

以上の結果より、CoQ10 による上皮細胞の極性化促進効果は、PI3 キナーゼシグナルの活性化を介した aPKC の活性化によって起こることが示唆された。また、PI3 キナーゼシグナルの活性化にはカベオラ構造の形成が関与することが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 松浦達也	4. 巻 14
2. 論文標題 コエンザイムQ10の摂取と健康寿命	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本食品安全協会誌	6. 最初と最後の頁 277-284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Morimoto Masaki, Horikoshi Yosuke, Nakaso Kazuhiro, Kurashiki Tatsuyuki, Kitagawa Yoshinori, Hanaki Takehiko, Sakamoto Teruhisa, Honjo Soichiro, Umekita Yoshihisa, Fujiwara Yoshiyuki, Matsura Tatsuya	4. 巻 470
2. 論文標題 Oncogenic role of TYRO3 receptor tyrosine kinase in the progression of pancreatic cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 149 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2019.11.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsura Tatsuya	4. 巻 65
2. 論文標題 Protective Effect of Tocotrienol on In Vitro and In Vivo Models of Parkinson 's Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 S51 ~ S53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3177/jnsv.65.S51	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitagawa Yoshinori, Nakaso Kazuhiro, Horikoshi Yosuke, Morimoto Masaki, Omotani Takuma, Otsuki Akihiro, Inagaki Yoshimi, Sato Hideyo, Matsura Tatsuya	4. 巻 9
2. 論文標題 System xc <sup>-</sup> in microglia is a novel therapeutic target for post-septic neurological and psychiatric illness	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-44006-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Horikoshi Yosuke, Kamizaki Kouki, Hanaki Takehiko, Morimoto Masaki, Kitagawa Yoshinori, Nakaso Kazuhiro, Kusumoto Chiaki, Matsura Tatsuya.	4. 巻 44
2. 論文標題 -Tocopherol promotes HaCaT keratinocyte wound repair through the regulation of polarity proteins leading to the polarized cell migration.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BioFactors	6. 最初と最後の頁 180-191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/biof.1414	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 堀越洋輔、倉敷達之、松浦達也	4. 巻 92
2. 論文標題 コエンザイムQによる脂肪組織の代謝制御を介した抗肥満・抗糖尿病効果	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ビタミン	6. 最初と最後の頁 381-385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 堀越洋輔、野中智生、倉敷達之、中曾一裕、松浦達也
2. 発表標題 上皮細胞極性形成に対するコエンザイムQ10の作用の検討
3. 学会等名 日本ビタミン学会第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中曾一裕、大端 周、北川良憲、堀越洋輔、倉敷達之、松浦達也
2. 発表標題 MPTP誘発パーキンソン病モデルにおける活動性低下はミクログリアxCT/xc-系と関係している
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会 / 第20回日本N0学会合同学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀越洋輔、松浦達也
2. 発表標題 コエンザイムQ10の上皮細胞接着および膜ドメインに対する作用
3. 学会等名 第365回脂溶性ビタミン総合研究委員会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 K. Nakaso, Y. Horikoshi, T. Matsura
2. 発表標題 System Xc- in microglia is a regulator of cognitive decline and hypoactivity in vitamin E deficient mice.
3. 学会等名 The 9th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (SFRR-Asia) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本 昌樹, 堀越 洋輔, 倉敷 達之, 北川 良憲, 中曾 一裕, 本城 総一郎, 藤原 義之, 松浦 達也
2. 発表標題 受容体型チロシンキナーゼTAMIは膵臓癌の増悪化に関与する
3. 学会等名 第60回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川 良憲, 中曾一裕, 倉敷 達之, 森本 昌樹, 堀越洋輔, 佐藤英世, 松浦達也
2. 発表標題 敗血症後の認知・精神障害におけるXc-系 / xCTの関与
3. 学会等名 第72回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 堀越洋輔, 野村聡子, 新藤有夏, 松井亮仁, 森本 昌樹, 倉敷 達之, 北川 良憲, 中曾一裕, 松浦達也
2. 発表標題 新規インフラマソーム経路は上皮細胞の極性形成を介し傷修復を促進する
3. 学会等名 第72回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀越洋輔, 野村聡子, 新藤有夏, 松井亮仁, 森本昌樹, 倉敷達之, 北川良憲, 中曾一裕, 松浦達也
2. 発表標題 酸化ストレス/炎症刺激によるaPKCの機能制御を介した傷修復促進作用の検討
3. 学会等名 日本過酸化脂質・抗酸化物質学会第27回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本 昌樹, 堀越 洋輔, 倉敷 達之, 北川 良憲, 中曾 一裕, 本城 総一郎, 藤原 義之, 松浦 達也
2. 発表標題 受容体型チロシンキナーゼTYR03は膵臓癌の増悪化に関与する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中曾一裕, 北川 良憲, 堀越洋輔, 森本 昌樹, 松浦達也
2. 発表標題 ビタミンE欠乏マウスの精神神経症状とシスチン・グルタミン酸アンチポーター
3. 学会等名 第31回ビタミンE研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野中智生、堀越洋輔、森本 昌樹、倉敷 達之、中曾一裕、松浦達也
2. 発表標題 コエンザイムQ10の上皮細胞極性形成に対する作用
3. 学会等名 日本コエンザイムQ協会第17回研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Y. Horikoshi, M. Morimoto, T. Hanaki, T. Kurashiki, Y. Kitagawa, K. Nakaso, T. Matura
2. 発表標題 Molecular mechanisms underlying the promotion of wound repair by vitamin E.
3. 学会等名 The 3rd International Sympojium on Rice Science in Global Health (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Matura
2. 発表標題 Symposium IV (Phytonutrients): Protective effect of tocotrienol on in vitro and in vivo models of Parkinson's disease.
3. 学会等名 The 3rd International Sympojium on Rice Science in Global Health (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野村聡子、堀越洋輔、森本昌樹、倉敷達之、北川良憲、中曾一裕、松浦達也
2. 発表標題 酸化ストレス刺激によるインフラマソームを介した傷修復促進作用の検討
3. 学会等名 日本過酸化脂質・抗酸化物質学会 第26回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松浦達也
2. 発表標題 シンポジウムB3「酸化ストレス・抗酸化物質研究の先導的展開」ビタミンEのシグナル伝達制御を介した細胞保護・障害修復作用
3. 学会等名 日本食品科学工学会 第65回大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯塚舜介、松浦達也、桑原正憲、内田幸男
2. 発表標題 魚うるこ由来コラーゲン摂取の顔肌状態に対する有効性：ランダム化二重盲検試験
3. 学会等名 第16回日本機能性食品医用学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野村聡子、堀越洋輔、森本昌樹、倉敷達之、北川良憲、中曽一裕、山崎 章、松浦達也
2. 発表標題 トコトリエノールによるエストロゲン受容体を介した創傷治癒促進効果
3. 学会等名 第30回ビタミンE研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------