

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：32692
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21500698
 研究課題名（和文）コエンザイム Q10 結合タンパク質サポシン B を介した脂質の腸管吸収機構の解明
 研究課題名（英文） Role of Saposin B in the intestinal absorption of coenzyme Q10.

研究代表者

加柴 美里（KASHIBA MISATO）
 東京工科大学・医療保健学部・講師
 研究者番号：80338186

研究成果の概要（和文）：

サポシン B は脂溶性のコエンザイム Q10 と結合してこれを可溶化する。本研究は小腸におけるサポシン B の役割解明を目的とした。小腸モデルとして Caco-2 細胞を用い、遺伝子工学手法を用いてサポシン B 前駆体タンパク質プロサポシンノックダウン株を作製したところ、細胞内コエンザイム Q10 量が低減した。細胞を 3 次元培養したところ、プロサポシンノックダウン株では経上皮電気抵抗値が上昇せず、タイトジャンクション形成がうまくできないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We previously reported that saposin B binds coenzyme Q10 and makes this lipid soluble in water. In order to clarify the role of saposin B in intestine, we used Caco-2 cell line. Saposin B is produced from its precursor protein, prosaposin. We produced prosaposin knockdown caco-2 cell line. Coenzyme Q10 contents in prosaposin knockdown caco-2 cell line was lower than that in control cell line. Furthermore, prosaposin knockdown resulted in the loss of transepithelial resistance and disruption of tight junctions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学，応用健康科学

キーワード：老化、脂質、食品、タンパク質、抗酸化物質、加齢

1. 研究開始当初の背景

コエンザイム Q10 は、ミトコンドリア内膜における好気性呼吸電子伝達系の一員として ATP 産生に必要不可欠な脂質である。さらに、その還元型であるユビキノールは優れた活性酸素消去能を有し、抗酸化物質としても重要な役割を担っている。

コエンザイム Q10 は、生合成される一方、食品やサプリメントからも摂取される。特に高齢者においてはコエンザイム Q10 の組織内濃度が減少するので(文献 1)、サプリメントとして補うことが必要と考えられる。

本脂質を経口投与することにより、血漿中のコエンザイム Q10 濃度が上昇すること、安定同位体を用いた検討により、経口投与したコエンザイム Q10 が血漿中に移行していることが報告されている(文献 2)。また、実験動物を用いた検討から、経口投与したコエンザイム Q10 は小腸において吸収されて、リンパ液を経て、血流に移行することが報告されている(文献 3)。興味深いことに、酸化型のコエンザイム Q10 を経口投与しても、リンパ液で検出される時点では、還元型のユビキノールとして検出されている(文献 3)。しかしながら、本脂質の小腸吸収におけるトランスポーターや輸送タンパク質は明らかにされていない。

脂溶性のコエンザイム Q10 が細胞内外の水溶性空間を移動するには、本脂質と結合して可溶化する物質の存在が示唆される。研究代表者らは、水溶液であるヒト尿に脂質であるコエンザイム Q10 が含まれることに注目し、尿タンパク質を分画・精製した結果、コエンザイム Q10 結合タンパク質としてサポシン B を同定した(文献 4)。

サポシン B は、前駆体タンパク質プロサポシンがリソソームで加水分解して産生する分子量 12 kDa の糖タンパク質である。立体構造解析の結果より、外側に親水性のアミノ酸を、内側に疎水性のアミノ酸を有しており、

タンパク質の疎水性キャビティーに脂質を結合しうることが分かっている。

さらに、ヒト精子中や、培養細胞(ヒト肝癌由来 HepG2, ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞)でコエンザイム Q10 とサポシン B とが結合していることを確認した(文献 4)。

ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞は、分化することによりタイトジャンクションを形成し、小腸上皮様の細胞となる。サポシン B とコエンザイム Q10 とは、生体内で複合体を形成して存在していること、小腸上皮細胞にサポシン B が存在すること、コエンザイム Q10 は小腸にて吸収されていることを考え合わせると、コエンザイム Q10 の小腸吸収におけるサポシン B の役割を解明することはきわめて興味深い。

引用文献

- 1) Kalen, A., et al., *Lipid*, **24** 579-584 (1989)
- 2) Tomono, Y., et al., *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* **24(10)** 536-41 (1986)
- 3) Mohy, D., et al., *Redox Report*, **4** 79-87 (1999)
- 4) Jin, G., et al., *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **42** 167-174 (2008)

2. 研究の目的

本研究の目的は小腸における糖タンパク質サポシン B の役割を解明することである。

3. 研究の方法

小腸モデルとしてヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を用いる。Caco-2 細胞は、分化することによりタイトジャンクションを形成し、小腸上皮様の細胞となる。

(1) Caco-2 細胞の培養系の確立

本研究の核となる Caco-2 細胞の分化法

を確立する。Caco-2 細胞の分化とタイトジャンクションの形成については、電気抵抗値の測定 (Millicell-ERS, Millipore 社) 手法により確認する。Caco-2 細胞の分化のための 3 次元培養手法の模式図を図 1 に示す。

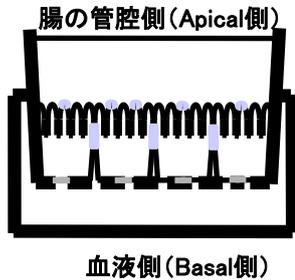


図1 Caco-2細胞3次元培養の模式図。
Caco-2細胞をインサートメンブラン上で3次元培養する。

(2) Caco-2 細胞におけるサポシン B の発現と局在の解析

分化した Caco-2 細胞から分泌されるサポシン B 量を Basal 側と Apical 側とに分けてウエスタンブロッティング手法を用いて解析する。

(3) Caco-2 細胞のコエンザイム Q10 輸送機構検討手法の確立

分化した Caco-2 細胞の Apical 側にコエンザイム Q10 を添加し、Basal 側への輸送を検討する。カイロミクロン分泌刺激剤 (オレイン酸) の効果も検討する。

(4) 遺伝子工学手法を用いたサポシン B ノックダウン株の作製

サポシン B はその前駆体タンパク質プロサポシンがリソソームで加水分解されて生成するタンパク質である (図 2) ことから、前駆体タンパク質プロサポシン遺伝子を miRNA 手法でノックダウンする。ノックダウンには BLOCK-iT POL II miR RNAi Expression Vector



図2 サポシンBタンパク質は前駆体タンパク質プロサポシンが加水分解されて生成する。

(Invitrogen) を用いる。プロサポシン遺伝子ノックダウンに必要な DNA オリゴ遺伝子配列は BLOCK-iT RNAi Designer (Invitrogen) を用いて設計した。

(5) プロサポシンノックダウン株の解析

遺伝子工学手法を用いて作製した細胞株を用いて、細胞内のコエンザイム Q10 動態解析、Caco-2 細胞における吸収機構の解明と、これに及ぼすサポシン B の役割について検討する。

4. 研究成果

(1) Caco-2 細胞の培養系の確立

コントロール Caco-2 細胞を 3 次元培養することにより経上皮電気抵抗値の上昇を確認した。また蛍光物質 Lucifer Yellow を Apical 側に投与し、一定時間後の Basal 側への漏出量を測定したところ、ほとんど漏出しておらず、タイトジャンクションの形成が確認できた。

(2) Caco-2 細胞におけるサポシン B の発現と局在の解析

Caco-2 細胞におけるサポシン B とコエンザイム Q10 との挙動を解析した結果、Caco-2 細胞にはサポシン B が存在しており、小腸上皮様に分化するにつれてその発現が増強すること、Caco-2 からサポシン B が分泌されて特に管腔側に相当する Apical 側に強く分泌していることが認められた。ウエスタンブロッティング解析結果の一例を図 3 に示す。



図3 Caco-2 細胞培養メディウム中のサポシン B 量
培養 7 日目および 14 日目のメディウムをウエスタンブロッティング手法により解析した。7 日目よりも 14 日目に顕著なサポシン B の分泌を認め、また、いずれの時点においても Apical 側により顕著な分泌を認めた。

(3) Caco-2 細胞のコエンザイム Q10 輸送機構 検討手法の確立

分化した Caco-2 細胞の Apical 側にコエンザイム Q10 を添加し, Basal 側への輸送を検討した. カイロミクロン分泌刺激剤 (オレイン酸) の効果も検討した. しかしながらコエンザイム Q10 投与時に使用する界面活性剤の影響で細胞のバイアビリティーが低下してしまう等の問題が生じ, 本検討項目に関しては, 研究期間内に一定の成果を上げることができなかった.

(4) 遺伝子工学手法を用いたサポシン B ノックダウン株の作製

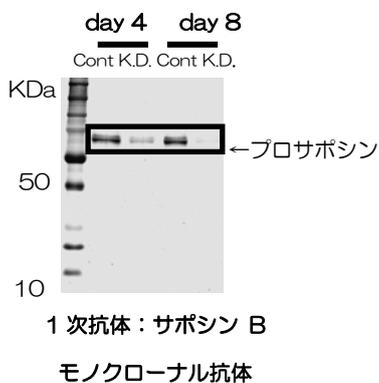


図 4 コントロール株とプロサポシンノックダウン株のプロサポシン量の解析.

サポシン B モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティング手法にて解析した.

プロサポシンノックダウン Caco-2 細胞株を樹立した. 研究の方法に記載のごとく, BLOCK-iT POL II miR RNAi Expression Vector (Invitrogen) を用いて安定株を樹立した. 作成したプロサポシンノックダウン株の培養メディウムをウエスタンブロッティング手法にて解析した結果を図 4 に示す. サポシン B モノクローナル抗体を用いて検出を行ったところ, 培養開始 4 日後でも 8 日後でもプロサポシンノックダウン株ではプロサポシタンパク質量が低下していることが確認できた.

(5) プロサポシンノックダウン株の解析

(5)-① 細胞内コエンザイム Q10 量の解析

プロサポシンノックダウン株のコエンザイム Q10 量を HPLC-ECD を用いて解析した. 結果を図 5 に示す. 細胞内のコレステロール値で補正したところ, 播種後いずれのタイムポイントでもノックダウン株のコエンザイム Q10 の値が低下していた.

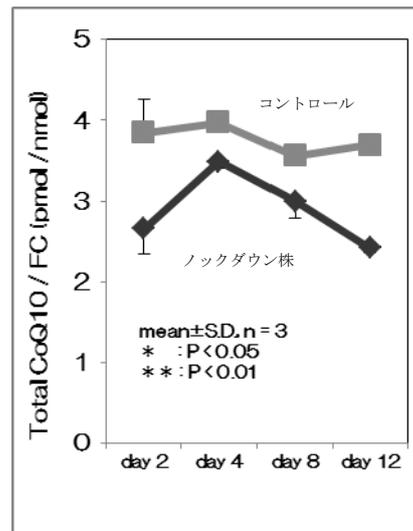


図 5 コントロール細胞およびプロサポシンノックダウン株の細胞内コエンザイム Q10 量. 細胞内フリーコレステロール値で補正した.

また, コエンザイム Q10 には酸化型と還元型が存在する. 酸化型と還元型の割合を%CoQ 値 (total コエンザイム Q10 量に占める酸化型コエンザイム Q10 量の割合) で評価したところ, ノックダウン株では%CoQ 値が上昇していた.

(5)-② 3 次元培養によるフェノタイプ解析

プロサポシンノックダウン株とコントロール株の細胞播種後の経上皮電気抵抗値を測定した. 結果を図 6 に示す. コントロール細胞では, 電気抵抗値が上昇し, タイトジャンクション形成が示唆されたが, ノックダウン株では電気抵抗値の上昇が認められなかった. そこで, Apical 側に Lucifer Yellow を投与し膜透過性を観測した. コントロール細胞では Basal 側から Lucifer Yellow が検出できなかったが, ノックダウン株では, Basal 側に Lucifer Yellow の漏出が認められ

た。これらの結果より、プロサポシンノックダウン株ではタイトジャンクション形成に不備が生じていると考えられた。

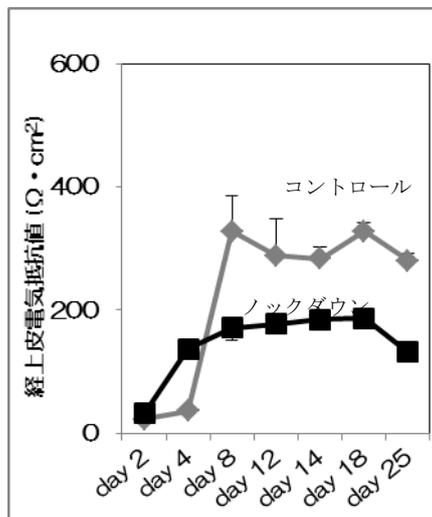


図6 コントロール細胞とノックダウン細胞の3次元培養時の経上皮電気抵抗値

(6)まとめ

以上の実験結果より、小腸のプロサポシンは、小腸細胞のコエンザイムQ10量とその酸化還元動態維持に必要であること、さらには、小腸のタイトジャンクション形成に必要なタンパク質であることが明らかとなった。

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)

[学会発表] (計9件)

- ① ジョン・チュンユン, 長嶋康平, 大泉美希子, 鈴木優, 森内寛, 加柴美里, 吉村眞一, 山本順寛
 コエンザイムQ結合蛋白質プロサポシン発現量改変株の酸化ストレスに対する感受性
 日本コエンザイムQ協会第9回研究会
 2012年1月24日
 東京 (東京工科大学)

- ② 宮内優樹, 関学, 宮前多佳子, 藤田秀次郎, 石田史彦, 森内寛, 加柴美里, 横田俊平, 山本順寛
 母乳中のコエンザイムQ10とその結合タンパク質プロサポシン
 日本コエンザイムQ協会第9回研究会
 2012年1月24日
 東京 (東京工科大学)
- ③ Misato Kashiba, Mikiko Oizumi, Masaru Suzuki, Yoshimi Sawamura, Kohei Nagashima, Choon Yuen Jong, Shinichi Yoshimura, Yorihiro Yamamoto
 A role of prosaposin /saposin B in regulating coenzyme Q10 and cholesterol contents in HepG2 cells
 第34回日本分子生物学会
 2011年12月13日—16日
 横浜 (パシフィコ横浜)
- ④ 及川慎吾, 寺嶋政之, 加柴美里, 山本順寛
 CoQ10結合タンパク質プロサポシン遺伝子を改変した小腸上皮細胞様Caco-2細胞
 第64回日本酸化ストレス学会
 2011年7月2日~3日
 北海道 (ルスツリゾートホテル&コンベンション)
- ⑤ 宮内優樹, 寺嶋政之, 石原秀浩, 加柴美里, 山本順寛
 小腸上皮細胞様Caco-2細胞によるCoQ10の取り込みと分泌
 第64回日本酸化ストレス学会
 2011年7月2日~3日
 北海道 (ルスツリゾートホテル&コンベンション)
- ⑥ 寺嶋政之, 及川慎吾, 加柴美里, 山本順寛
 Caco-2細胞コエンザイムQ10の酸化還元バランスに対するプロサポシンの

役割

日本コエンザイムQ協会第8回研究会
2011年1月28日(金)(東京工科大学)

- ⑦ 石原秀浩、佐川智史、宮田幸祐、加柴美里、山本順寛

小腸上皮細胞様 Caco-2 細胞によるコエンザイム Q10 の取り込みと分泌：酸化還元状態の影響

第7回 コエンザイム Q10 協会研究会
2010年1月26日(東京工科大学)

- ⑧ 石原秀浩、佐川智史、加柴美里、山本順寛

小腸上皮細胞様 Caco-2 細胞は CoQ10 を取り込み、還元して分泌する

第24回 日本酸化ストレス学会関東支部会

2010年1月9日

つくば市(つくば国際会議場)

- ⑨ 加柴美里、佐川智史、永田圭、山本順寛

Caco-2 細胞は CoQ10 を取り込み還元して分泌する

第62回 日本酸化ストレス学会学術集会

2009年6月11日

福岡市(九州大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加柴 美里 (KASHIBA MISATO)

東京工科大学・医療保健学部・講師

研究者番号：80338186

(2) 研究分担者

山本 順寛 (YAMAMOTO YORIHICO)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：60134475