

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 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780131

研究課題名（和文） 一分子解析による食品成分間相互作用が吸収に及ぼす影響の解明

研究課題名（英文） Single molecular analyses on effects of food ingredients on peptide absorption

研究代表者

小堀 俊郎（KOBORI TOSHIRO）

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品工学研究領域・主任
研究員

研究者番号：10353971

研究成果の概要（和文）：腸管で発現するペプチドトランスポーター PepT1 と基質ペプチドの相互作用を検出する実験系の構築に必要な要素技術の最適化を行った。原子間力顕微鏡の相互作用力測定モードを活用するため、測定基板上の脂質二重膜に再構成した PepT1 と、基質であるオリゴペプチドで修飾したカンチレバーを作製して一分子解析系に適用した。一方、暗視野顕微鏡を用いることで腸管モデル細胞である Caco-2 細胞と金粒子の 1 粒子レベルでの相互作用解析が可能であり、粒子表面を基質ペプチドで修飾することにより生きた細胞レベルで PepT1 との相互作用解析ができる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We optimized conditions for an in vitro experimental model where we could study interactions between PepT1, peptide transporter expressed on intestinal tract, and its substrate peptide. Purified PepT1 reconstituted on lipid bilayer and cantilever modified with a substrate peptide were prepared and applied to force measurement with atomic force microscopy. An interaction of Au-nanoparticle with Caco-2 monolayer could also be analyzed with dark-field microscopy, suggesting that the PepT1 interaction could be studied using live cells in combination with surface modification of Au with the substrate peptides.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3380,000

研究分野：食品生化学

科研費の分科・細目：農芸化学、食品科学

キーワード：食品吸収、原子間力顕微鏡、暗視野顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓疾患は 2002 年に米国で提唱された概念であり、3 か月に渡って尿タンパクが陽性かつ紙球体濾過値が 60 mL/min 以下である状態を指す。放置すると将来人工透析

を余儀なくされる場合があるため、その対策は喫緊の課題である。日本慢性腎臓病対策協議会の調査によると、国民の 5 人に 1 人が慢性腎臓疾患の予備軍であるとされ、新たな国民病と呼ばれている。しかし、その有効な治

療法は確立されておらず、現在のところ薬剤投与に加え低タンパク質食事療法が併用されるが、低タンパク質食事療法は患者の QOL (Quality of Life) を著しく低下させる。一方、食事による疾病予防・症状改善に関心が高まっていることから、食事の質を保ったまま摂取したタンパク質の体内吸収を制御する技術の開発が求められている。

2. 研究の目的

慢性腎臓疾患には低タンパク質食事療法が有効であるが、食事療法は「生活の質」を低下させてしまう。そこで食事の質を維持したまま摂取タンパク質の吸収を制御する技術が望まれている。食事タンパク質由来のオリゴペプチドは小腸上皮のトランスポーターである PepT1 を介して吸収される。しかし、従来の吸収試験には動物あるいは培養細胞が必要であり、放射性同位体標識が必要である等、操作が煩雑であった。また、PepT1 は基質特異性が低いため、共存成分がオリゴペプチド吸収に与える影響を解析することが困難であると想定される。そこで課題では、オリゴペプチド基質と PepT1 間の 2 体間相互作用を解析するために原子間力顕微鏡による一分子解析系を構築する。

3. 研究の方法

AFM の相互作用力測定モードを活用し、PepT1 の分子認識を解析する技術を構築する。具体的には、AFM 測定基板上の人工脂質二重膜に再構成した PepT1 と、基質であるオリゴペプチドで修飾したカンチレバーを作製して一分子解析系を構築するとともに、PepT1-基質間に作用する相互作用を検出する。そのために取り組むべき課題は、(1) PepT1 の発現及び精製、(2) 人工脂質二重膜への PepT1 の基板上への再構成、(3) カンチレバーの修飾、(4) 基質-PepT1 間の相互作用検出のための条件最適化に大別できる。

4. 研究成果

PepT1 の発現、精製条件の検討を行うと共に、リポソームへの再構成を試みた。まず、ヒト PepT1 遺伝子のクローニング、及び発現ベクターの作製を行い、免疫染色法により培養細胞による膜画分への発現を確認した。フラスコに付着した細胞を 2 mM EDTA を含む HBS (Hepes Buffered Saline) 緩衝液で洗浄後、同緩衝液で回収した。細胞破碎した試料のうち、膜画分を遠心操作により取得した。この膜画分を 500 mM NaCl 1% CHAPS を含む HBS 緩衝液で可溶化し、引き続き超遠心分離によって上清画分を回収した。PepT1 はヒスチジンタグ (His-tag) 融合タンパク質として発現されるため、ニックルアガロースとともに懸濁・洗浄を行った後、イミダゾールで溶

出することにより精製 PepT1 を得た。次に、精製した PepT1 をリポソームに再構成するため、CHAPS を透析により除去しつつ単層リポソームで PepT1 を安定化させる必要があった。HBS 緩衝液を透析外液として用いて、終夜室温で透析を行った。予備的検討の結果、透析法により PepT1 がリポソーム膜内へ再構成される可能性を示唆するデータを得た。

原子間力顕微鏡の相互作用力測定モードによって基質と PepT1 間の相互作用を測定するため、カンチレバーを基質の 1 つであるトリペプチド Cys-Gly-Ala で修飾した。そのために市販のクロスリンキング剤を用いて、カンチレバーに導入したマレイミド基とシステイン残基のチオール基間で結合した。PepT1 で再構成したリン脂質、あるいはリン脂質のみの試料を作製し、基質で修飾したカンチレバーと修飾しないカンチレバーを用いて相互作用力の測定を行った。その結果、PepT1 で再構成したリン脂質と基質で修飾したカンチレバーの組合せで測定した時に他の組合せの場合に比べて相互作用力が大きく測定される傾向が認められたものの、有意差として明確にはならなかった。再構成 PepT1 の密度は 1 マイクロメートル四方当たり 20 分子程度であり、再構成密度を向上させることが解決策の一つになると考えられる。

一方、試験管内腸管モデルである Caco-2 細胞単層シートを安定的に作製する方法を見出し、暗視野顕微鏡による観察方法について条件を最適化した。暗視野顕微鏡は観察視野が原子間力顕微鏡よりも広いにも関わらず、観察対象によっては非染色での解析が可能であることが知られている。そこで、Caco-2 培養上面に金コロイドを添加したところ、細胞と粒子の相互作用が 1 粒子レベル観察できることを見出した。粒径が等しく表面電荷が異なる金コロイドでは細胞に対する吸着挙動が大きく異なったため、表面電荷の改変によって腸管吸収効率を制御できる可能性が示唆された。

以上より、原子間力顕微鏡の相互作用測定による PepT1 の 1 分子解析系を構築した。また、暗視野顕微鏡では局在マーカーとして金粒子が適用できることを明らかにし、基質であるオリゴペプチドで金粒子を被覆することによって、生きた細胞を用いて PepT1 と基質との相互作用を可視化できる可能性が示唆された。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Toshiro Kobori, Jun Watanabe, Hidenobu

Nakao, Gold nanoparticles as localization markers for direct and live imaging of particle absorption through a caco-2 cell monolayer using dark-field microscopy, Analytical Sciences, 査読有、28 卷、2012、61-64

DOI: 10.2116/analsci.28.61

- ② 小堀俊郎、原子間力顕微鏡による食品の微細構造解析と相互作用評価、食糧、査読有、49 卷、2011、45-65

http://www.naro.affrc.go.jp/org/nfri/publications/pdf/sousetsu/kanko_sou49/49_p045.pdf

[学会発表] (計 2 件)

- ① Toshiro Kobori, Atsuko Matsumoto, Shigeru Sugiyama, Interactions between sodium caseinate and xanthan revealed by atomic force microscopy, International Conference on Food Applications of Nanoscale Science, 2010 年 6 月 11 日、東京

- ② Toshiro Kobori, Graham D. Smith, Richard Sandford, J. Michael Edwardson, The transient receptor potential channels TRPP2 and TRPC1 form a heterotetramer with a 2:2 stoichiometry and an alternating subunit arrangement, 第 12 回国際 SPM 会議、2010 年 5 月 10 日、札幌

[図書] (計 2 件)

- ① Toshiro Kobori, Kunio Takeyasu, Protocols for specimen and substrate preparation, and data correction methods, Atomic Force Microscopy in Nano Biology, Pan Stanford Publishing Pte Ptd, 2014

- ② Aiko Hibino, Toshiro Kobori, Kunio Takeyasu, A Short Story of AFM in Biology, Atomic Force Microscopy in Nano Biology, Pan Stanford Publishing Pte Ptd, 2014

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小堀 俊郎 (KOBORI TOSHIRO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品工学研究領域・主任研究員

研究者番号：10353971