

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580163

研究課題名(和文)食物繊維に対する消化管細胞応答の解明

研究課題名(英文)The important roles of intestinal cells in responses to dietary fibers

研究代表者

矢部 富雄(YABE, Tomio)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：70356260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：腸管の絨毛を構成する上皮細胞は、タイトジャンクション近傍に存在するフィブロネクチンを介して水溶性食物繊維のペクチンの化学構造を認識すること、またその結果、 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンを介して細胞内に情報を伝達し、細胞表面に存在するヘパラン硫酸糖鎖の硫酸化構造を変化させていることを明らかにした。これは、食物繊維の機能性が、従来知られている分子のかさ高さによって発揮される物理化学的性質や、大腸における腸内細菌を介した二次代謝産物に起因するものに加え、直接的な細胞応答に起因する可能性を新たに示したものである。

研究成果の概要(英文)：We found that intestinal epithelial cells recognized a pectic polysaccharide through the fibronectin located around tight junctions and altered sulfated structure of heparan sulfate on the cell surface through integrin. These findings show that functions of dietary fiber are not only exerted by physicochemical properties or enterobacteria.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食物繊維 ペクチン フィブロネクチン Caco-2細胞 ヘパラン硫酸 インテグリン

### 1. 研究開始当初の背景

健康食品素材として注目されている食物繊維が示す生理機能のうち、腸管上皮細胞への直接的な作用の結果もたらされる生体への影響は不明である。しかし、McCulloughらが食物繊維混合物を成分栄養剤に添加し与え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たところ、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) ことや、Brownらが、免疫賦活作用が知られている食物繊維の一種である  $\alpha$ -グルカンを認識するレセプター (Dectin-1) がマクロファージ細胞表面に存在することを報告した (Brown and Gordon, *Nature*, **413**, 36-37, 2001) ことから、研究代表者らは、腸管上皮細胞に食物繊維を化学構造特異的に認識するレセプターが存在するという仮説を提唱し、その立証を進めていた。

研究代表者らは、レセプターの同定を困難にしている原因は、多糖類の化学構造とタンパク質との非常に弱い相互作用にあると考え、それを改善する手法としてヒト小腸 cDNA ライブラリー由来ファージディスプレイ法を用いてレセプターのスクリーニングを行った。そしてその結果、食物繊維の一種であるペクチンを認識するペプチドとして同定されたアミノ酸配列に、細胞外マトリクスタンパク質であるフィブロネクチンとのホモロジーを確認した。また、食物繊維が腸内細菌の影響を受けることなく直接消化管細胞に作用することを確認するため、ヒト小腸上皮細胞モデルである Caco-2 細胞を用いて、管腔側と基底膜側の培地を分離できる条件下、ペクチンを管腔側に添加した際の細胞質内物質の変化を、LC-MS を用いてメタボローム解析したところ、ペクチンを添加した細胞では、プリン代謝系およびピリミジン代謝系に関連する物質の変化が確認された。これは、細胞外のペクチンの存在が、細胞内の代謝経路に影響を与えたことを意味し、ペクチンが誘導するシグナル伝達経路の存在が推察された。さらに、Caco-2 細胞の管腔側にペクチンを添加した際に基底膜側から分泌されるタンパク質の変化を、蛍光ディファレンス二次元電気泳動を用いて解析したところ、ペクチン添加によって複数の分泌タンパク質の量的変化が確認された。

### 2. 研究の目的

食物繊維の健康食品素材としての価値は、その物理化学的な性質や大腸における腸内細菌を介した二次代謝産物による生理機能にあると現在考えられている。しかし、腸管上皮細胞への直接的な作用の結果もたらされる生体への影響を示唆する知見も多数報告されており、食物繊維が高齢化社会を脅かすさまざまな現代病から健康を守るための食材として有効であるかを真に検証するた

めには、私たちの提唱する仮説を立証し、腸管上皮細胞による食物繊維の化学構造特異的な応答を解明することが重要である。

そこで、本研究課題では、これまでに得られている結果の妥当性を検証し、さらに食物繊維に対する腸管上皮細胞の応答を明らかにすることで、健康を維持する食品素材として食物繊維が利用できるかを検証することを目的とした。具体的には、研究期間内に以下のことを明らかにすることを目的とした。

(1) 食物繊維を認識する腸管上皮細胞局在タンパク質の候補となるフィブロネクチンが、ペクチンと生理条件下で相互作用するかを検討する。

(2) フィブロネクチンを介して細胞内に情報を伝える腸管上皮細胞様モデル細胞として Caco-2 細胞を用い、ペクチンを与えたときの細胞内代謝産物の変化を検討する。

(3) 動物細胞表面に普遍的に存在するヘパラン硫酸 (HS) がさまざまな生理機能に關与することに着目し、ペクチン添加による細胞表面 HS 構造への影響を調べる。また、この構造変化を指標として、細胞表面のインテグリンがペクチンと結合したフィブロネクチンのレセプターとして機能するかを検討する。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト小腸由来 cDNA ライブラリーを導入したファージディスプレイ法によって、プルーン由来ペクチンと相互作用することが明らかになったペプチドと類似配列をもつ、フィブロネクチン・フラグメント III<sub>1</sub> 領域 (FN-III<sub>1</sub>C) を生体内でペクチンと結合する候補タンパク質とした。FN-III<sub>1</sub>C をセンサーチップに固定し、ペクチンとの相互作用を表面プラズモン共鳴法により確認した。アナライトとして、プルーン由来ペクチン、レモン由来ペクチン、ポリガラクトン酸を用い、それぞれ解離定数 ( $K_D$ ) を求めた。

次に、フィブロネクチンどうしが結合することを利用し、固定された FN-III<sub>1</sub>C に対して、ペクチンと FN-III<sub>1</sub>C を同時に添加することによる競合阻害実験を行った。

さらに、通常、基底膜側に局在するとされているフィブロネクチンが、管腔側に存在するペクチンと相互作用することが生理的条件下で起こりうるかを検証するため、Caco-2 細胞を小腸上皮様に分化させた後、タイトジャンクションに存在する ZO-1 タンパク質とフィブロネクチンをそれぞれ蛍光標識して、共焦点蛍光顕微鏡による観察によりフィブロネクチンの局在を調べた。

(2) フィブロネクチンを介して細胞内に伝えられる情報を解析するため、分化した Caco-2 細胞にペクチンを与えた際の細胞内代謝産物の変化をメタボローム解析によって調べ

た。この際に使用したペクチンは、プルーン由来アルコール不溶性画分をさらに陰イオン交換カラムに供し、0.30 M NaHCO<sub>3</sub> によって溶出された主要画分を用いた。

次に、ペクチンによって誘導されるポリアミン代謝関連遺伝子の発現量の変化をリアルタイム RT-PCR を用いて解析した。特に注目した遺伝子は、ポリアミン合成に関与する ODC 遺伝子、ポリアミン合成を調節する OAZ 遺伝子、ポリアミン分泌に関与する SSAT 遺伝子、ポリアミン再合成に関与する PAO 遺伝子であり、ペクチンを細胞に添加し 6 時間後にトータル RNA を回収し、それぞれの遺伝子発現量を解析した。

(3) 動物細胞表面に普遍的に存在する HS は、さまざまな生理機能に関与するため、ペクチンが Caco-2 細胞表面 HS 構造へ与える影響を調べた。ペクチン添加後の Caco-2 細胞より HS を抽出し、微生物由来脱離酵素により特異的に二糖に分解し、イオン交換カラム HPLC により二糖分析を行うことで、HS の構造変化を分析した。

次に、HS 構造を変化させる要因として脱硫酸化酵素 HS 6-O-endosulfatase (HSulf) に注目し、ペクチン添加時の Caco-2 細胞内の発現量の増加をリアルタイム RT-PCR により確認した。また、フィブロネクチンとその受容体である 5 1 インテグリンが、ペクチンに対する細胞応答に関与するか検討するため、フィブロネクチンのペクチンとの結合部位である III<sub>1</sub>C ペプチドやフィブロネクチンのインテグリンとの結合部位である RGD ペプチドをペクチンと同時に Caco-2 細胞に与え、HSulf の発現が誘導されるかをリアルタイム RT-PCR により確認した。

さらに、小腸絨毛陰窩の増殖細胞のモデルとしてラット小腸上皮細胞株の IEC-6 細胞を用い、小腸上皮細胞様に分化した Caco-2 細胞と小腸環境を模した複合培養系を構築した。そして、トランスウェルの分化 Caco-2 細胞のアピカル側にペクチンを添加した際に、アウトウェルの IEC-6 細胞の増殖に影響があるかを調べた。

#### 4. 研究成果

(1) フィブロネクチンに対するそれぞれのアナライトの解離定数 ( $K_D$ ) は、プルーン由来ペクチン:  $6.24 \times 10^{-7}$  M, レモン由来ペクチン:  $2.06 \times 10^{-3}$  M, ポリガラクトuron酸:  $3.79 \times 10^{-2}$  M と、植物種や化学構造の違いによって結合力が大きく異なることが明らかとなった。特に、フィブロネクチンはプルーン由来ペクチンが有する特徴的な構造に選択的に結合することが推察された。

次に、フィブロネクチンどうしの結合力を解析した結果、 $K_D = 2.65 \times 10^{-6}$  M であったことから、プルーン由来ペクチンによってフィブロネクチンどうしの相互作用を阻害することができると考え、他のペクチンと比較し

つつフィブロネクチンとの相互作用を競合的に確認した。その結果、プルーン由来ペクチンが最も強くフィブロネクチンどうしの結合を阻害し、レモン由来ペクチンやポリガラクトuron酸はより高濃度でのみ阻害作用を示すことが分かった。これにより、フィブロネクチンはプルーン由来ペクチンが特徴的に有する化学構造を認識し結合していることがわかった。

さらに、分化 Caco-2 細胞を用いて、タイトジャンクションに存在する ZO-1 タンパク質との位置関係から、フィブロネクチンの局在部位を調べた。その結果、主要な存在部位である基底膜側以外にも、タイトジャンクション付近にフィブロネクチンが局在することがわかり、腸管に到達したペクチンが、タイトジャンクション近傍のフィブロネクチンと相互作用する可能性が示唆された。

(2) ペクチンを分化 Caco-2 細胞に添加した際の細胞内代謝産物の変化をメタボローム解析により調べた結果、プトレシン、スペルミジン、スペルミンといった細胞内のポリアミン量が減少していることが示された。

次に、ペクチン添加時のポリアミン代謝関連遺伝子の発現量の変化を、リアルタイム RT-PCR を用いて解析したところ、オルニチンからプトレシンを合成する ODC 遺伝子と、合成したポリアミンをアセチル化する SSAT 遺伝子の mRNA 発現量が増加し、アセチル体を元のポリアミンに戻す PAO 遺伝子の mRNA 発現量が減少していた。また、ODC の阻害分子である OAZ の mRNA 遺伝子の発現量に変化は見られなかった (図 1)。メタボローム解析で細胞内のポリアミンが減少することとこれらの結果を合わせて考察すると、ペクチンの添加によって、アセチルポリアミンが細胞内に蓄積するか、もしくは細胞外に排出されていることが推察された (図 1)。

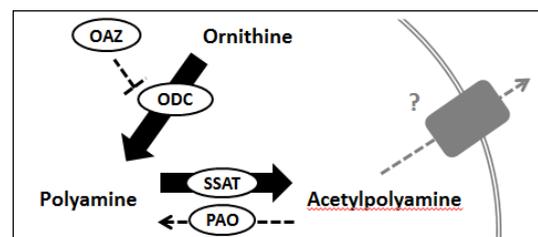


図 1. ペクチン添加によるポリアミン代謝の変化

(3) 分化 Caco-2 細胞にペクチンを添加した際の細胞表面 HS 構造の変化を二糖分析により調べたところ、非硫酸化構造の二糖が有意に増加し、二硫酸化二糖や三硫酸化二糖が有意に減少するといった、硫酸化構造の大きな変化が認められた (図 2)。

次にこうした構造変化の原因と考えられる脱硫酸化酵素 HSulf 遺伝子の Caco-2 細胞における発現を調べたところ、ペクチン添加により、HSulf-1 遺伝子は mRNA の発現が検出されなくなるのに対し、HSulf-2 は mRNA の

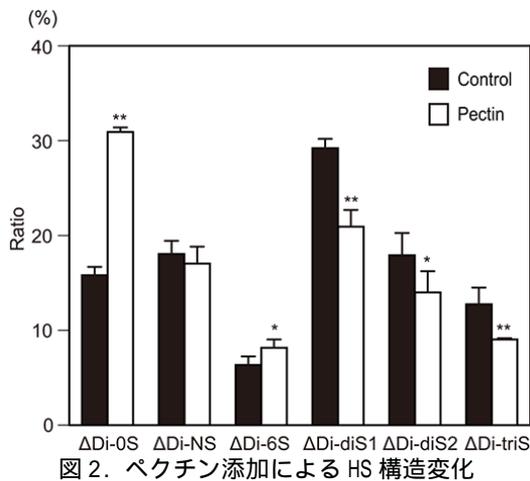


図 2. ペクチン添加による HS 構造変化

発現がペクチン添加 3 時間後に増加することが明らかとなった (図 3)。そこで、この

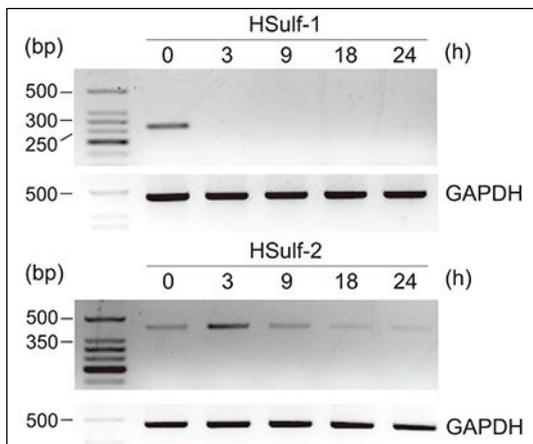


図 3. ペクチン添加後の HSulf の発現

HSulf-2 の発現誘導を指標として、分化 Caco-2 細胞のペクチンに対する応答に、細胞外マトリクスタンパク質のフィブロネクチンとその受容体である  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンが関与しているか検討したところ、フィブロネクチンのペクチンとの結合部位である III<sub>1</sub>C ペプチドやフィブロネクチンのインテグリンとの結合部位である RGD ペプチドをペクチンと同時に添加すると、ペクチンによる HSulf-2 の発現誘導を抑制し、ヘパラン硫酸の構造変化をもたらしていることが示唆された (図 4)。

さらに、小腸絨毛陰窩の増殖細胞のモデルとしてラット小腸上皮細胞株の IEC-6 細胞を用い、小腸上皮細胞様に分化した Caco-2 細胞と小腸環境を模した複合培養系を構築した。トランスウェル上で分化した Caco-2 細胞にアピカル側からペクチンを与えると、アウターウェルの IEC-6 細胞の生育数が、ペクチンの濃度依存的に増加することを見出した。また、ペクチン添加時に Caco-2 細胞内 Wnt3a タンパク質の発現量が上昇すること、Caco-2 細胞表面のヘパラン硫酸の硫酸化構造が、Wnt タンパク質に対して結合力を著しく減少させる方向へ変化することを明らかにした。

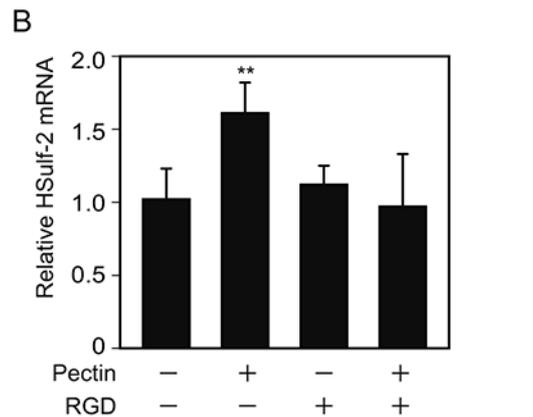
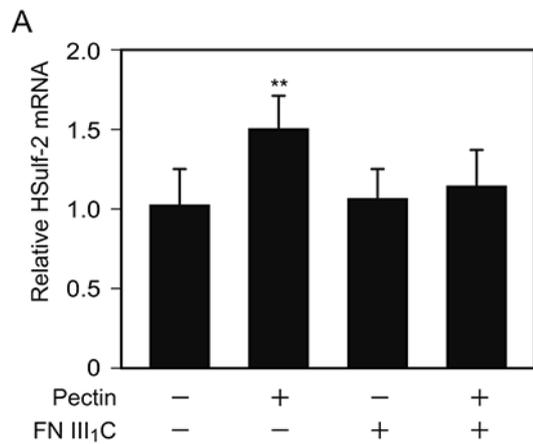


図 4. FN III とインテグリンによるペクチン応答

## 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)

Nishida, M., Murata, K., Kanamaru, Y., and Yabe, T.: Pectin of *Prunus domestica* L. alters sulfated structure of cell-surface heparan sulfate in differentiated Caco-2 cells through stimulation of heparan sulfate

6-O-endosulfatase-2. *Biosci. Biotechnol.*

*Biochem.*, in press. (DOI:

10.1080/09168451.2014.891937) 査読あり

Hara, Y., Mizukawa, H., Yamamoto, H., Ikami, T., Kato, K., and Yabe, T.: The simple refinement method of arabinan polysaccharides by the alcohol extraction from prune, *Prunus domestica* L. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 2137-2139, 2013.

(<http://dx.doi.org/10.1271/bbb.130392>) 査読あり

〔学会発表〕(計 7 件)

西田光貴, 村田一馬, 森雄一郎, 山元宏貴, 伊神孝生, 北口公司, 金丸義敬, 矢部富雄: 小腸上皮様細胞表面のヘパラン硫酸糖鎖にペクチンが与える影響の解明, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 28 日, 明治大学 (川崎市)

伊藤千弘, 石川愛美, 北口公司, 金丸義敬, 森雄一郎, 山元宏貴, 伊神孝生, 矢部

富雄：食物繊維摂取による小腸絨毛の形態変化機構の解明，日本食物繊維学会第 18 回学術集会，2013 年 11 月 24 日，仁愛大学（越前市）

Yabe, T., Itoh, C., Honda, A., Ishikawa, M., Nakamura, A., Yamamoto, H., Ikami, T., and Kanamaru, Y.: A specific structure in the pectin from prune recognizes fibronectin and affects on the expression level of polyamines in Caco-2 cells. EPNOE 2013 International Polysaccharides Conference, 2013 年 10 月 24 日，Nice, France

西田光貴，村田一馬，伊藤千弘，本田明里，矢部富雄：小腸上皮様細胞表面へパラン硫酸のペクチンに対する応答，糖鎖科学中部拠点第 11 回「若手の力」フォーラム，2013 年 9 月 9 日，名古屋市立大学（名古屋市）

村田一馬，本田明里，矢部富雄：小腸上皮様細胞表面へパラン硫酸のペクチンによる構造変化と機能解析，糖鎖科学中部拠点第 11 回「若手の力」フォーラム，2013 年 9 月 9 日，名古屋市立大学（名古屋市）

西田光貴，村田一馬，金丸義敬，矢部富雄：小腸上皮細胞表面へパラン硫酸のペクチンに対する応答，第 32 回日本糖質学会年会，2013 年 8 月 7 日，大阪国際交流センター（大阪市）

矢部富雄：腸管由来タンパク質によるペクチンの構造特異的認識作用，第 67 回日本栄養・食糧学会大会，2013 年 5 月 26 日，名古屋大学（名古屋市）（招待講演）

〔その他〕

ホームページ等

<http://gifu.yabets.info/projects/yabe/yabeprojectpectin>

## 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・准教授

研究者番号：7 0 3 5 6 2 6 0