

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450181

研究課題名(和文) CLEM法を用いた機能性食品成分の細胞内動態解析

研究課題名(英文) Intracellular kinetic analysis of functional food component by CLEM method

研究代表者

小林 謙一 (Ken-Ichi, Kobayashi)

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：80434009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒドロキシチロソール(HT)の大腸癌モデル細胞(Caco-2)における新規機能性を明らかにするとともに、CLEM法を用いたHTの細胞内動態のイメージングを試みた。その結果、HTには、オートファジー機構を制御する作用を有することが示唆された。また、FITCで標識したHT(FITC-HT)を合成に成功した。FITC-HTでCaco-2細胞を処理後、リソソームマーカーと反応させ、生細胞イメージングを行った。その結果、FITC-HTは一部リソソームに局在していることが明らかとなった。また、精細な画像とは言えないが、FITC-HTのCLEM画像を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the novel beneficial effects of hydroxytyrosol (HT) using colorectal cancer (Caco-2) cells and to analyze the localization of HT conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) in Caco-2 using Correlative light and electron microscopy (CLEM) method.

Our results revealed that HT inhibited cell proliferation dose-dependently in Caco-2 cells and induced DNA fragmentation, suggesting that HT induced apoptotic cell death. Furthermore, HT inhibited Akt/mTOR pathway to induce autophagy. Furthermore, HT was conjugated with FITC via the alcoholic hydroxyl group (FITC-HT). Caco-2 cells were incubated with 0.5 mM FITC-HT for 24 hours and subsequently labelled with Lysosome marker before imaging on the Olympus FV1200 Laser confocal microscope. As a result, FITC-HT was detected in the lysosome of Caco-2. Additionally, CLEM was performed using Caco-2 cells treated with FITC-HT and LysoTracker. As a result, primitive imaging data was obtained.

研究分野：栄養生化学

キーワード：ポリフェノール オリーブ葉 蛍光標識 CLEM法 機能性食品 オレウロペイン ヒドロキシチロソール 大腸癌

1. 研究開始当初の背景

近年、“Nutriceutical”なアプローチが、食品の機能を考えるうえで重要であるという認識が高まりつつある。“Nutriceutical”なアプローチとは、生体内の機能維持あるいは改善を目的として、生体内で生理機能を有する天然由来化合物を、経口的に摂取して補給するという考え方である。これは、食品に対して、単なる「栄養機能」だけでなく、「薬理効果に近い機能」を期待するものといえる。従って、これらの食品の機能性を検討するためには、栄養学的視点の他に、薬理的な観点からの研究が必要であるといえる。その薬理学的研究の重要なアプローチの一つに、「薬物動態」がある。薬物動態は、薬物が生体内特に細胞内へ「どのように」取り込まれて、「どのような」挙動を示すのかを明らかにすることである。今、この方法論が薬物動態の解析手法のみならず、生体や細胞内における機能性食品成分の局在や動態を把握するためのツールとしても、注目を集めつつある。その手法の中で、近年注目を集めている観察法の一つに、CLEM法がある。

CLEM法とは、Corelative Light and Electron Microscopyの略で、日本語で言うと光学—電子線相関顕微鏡解析法といい、同一の細胞を光学(蛍光)顕微鏡と電子顕微鏡の2種類の顕微鏡で観察して、最終的には重ね合わせた像を得て解析する方法である。それによって、特定分子の細胞内挙動や細胞内での超構造変化を詳細に捉えることが可能であることから、医学、薬学分野を中心に進歩を遂げてきた。しかし、これまでCLEM法は、操作過程の段階で細胞構造が変化することから、両画像の再配置をすることが非常に難しい方法で、かつコストがかかる方法であった。Kobayashiらは、これまでに簡便でかつ低コストで実施できるCLEM法を確立してきた。

そこで、この方法論を薬物動態の解析手法のみならず、機能性食品成分の細胞内動態の追跡する為のツールとして応用できるものと考えた。

2. 研究の目的

本研究の最大の目的は、CLEM法で、食品の機能性成分の細胞内動態解析を行うことである。本研究は、機能性食品成分の中でオリブ葉ポリフェノールであるヒドロキシチロソール(HT)に着目し、大腸癌モデル細胞内での動態を追跡するとともに、細胞内小器官に及ぼす形態的影響についての観察を行った。

3. 研究の方法

1) HTが細胞生存及び細胞死およびオートファジー機構に及ぼす影響の解析

Caco-2を500 μ MのHTで24時間処理後、細胞生存に及ぼす影響をMTT Assay法、アポトーシスに及ぼす影響をTUNEL染色法、活性酸素種(ROS)産生をROS-Glo™ H₂O₂ Assay kitを用いて検討した。また、Caco-2をBafilomycin A1存在下で500 μ MのHTで24時間処理後、細胞を回収し、LC3-⁺をwestern blotting法にて検討した。加えて、500 μ MのHTで処理したCaco-2細胞におけるAkt/mTORシグナル分子(p-Akt (Ser473)、Akt, p-mTOR (Ser2448)、mTOR, p-p70S6K (Thr389), p70S6K)をwestern blotting法にて検討した。

2) HTの蛍光標識化

反応容器に2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethyl alcoholを202 mg (1.31 mmol) および Fluorescein 5-isothiocyanate 522 mg (1.34 mmol) を入れ、N,N-ジメチルホルムアミド 4.3 mL に溶解させた。この反応溶液を120 °Cで1時間攪拌した後、室温まで放冷し、酢酸エチル 30 mL 及び1 mol/L 塩酸 30 mL で分液した。

有機層を飽和食塩水 20 mL で 3 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過、減圧下濃縮することで粗生物を得た。その粗生物を酢酸エチル 3 mL 及び塩化メチレン 3 mL を用いて再沈殿し、橙色粉末を得た。これをカラムクロマトグラフィー(シリカゲル 30 g, 塩化メチレン：酢酸エチル = 0:100 to 50:50, 2%酢酸含有, 2 回)で精製し、橙色粉末を得た。その後、この橙色粉末を NMR (JEOL 270MHz) および LC/MS (Waters 2695, ZQ, 2996, column Inertsil ODS-3 (4.6 x 75 mm)) に供し、構造および純度を確認した。

3) FITC-HT の蛍光顕微鏡を用いた細胞内動的イメージング

ヒト大腸癌モデル培養細胞である Caco-2 細胞をスライドガラス付き 3.5 cm ディッシュに 6×10^4 細胞を播種し、70%コンフルエントになるまで培養した。その後、Caco-2 細胞に FITC-HT を 500 μ M の濃度になるように処理して 24 時間反応させた。その後、リソソームマーカー (LysoTracker Red) もしくはミトコンドリアマーカー (MitoTracker Red) と反応させ 30 分間反応させた。その後、核マーカー (Hoechst 33342) で 30 分間反応後、生細胞イメージング装置 (KEYENCE BZ-X700) を用いて、6 時間イメージングムービーを取得した。

4) CLEM 法

細胞の位置を容易に確認可能なカーボンコーティングディッシュに Caco-2 を播種して、培養した後に、FITC-HT で 24 時間処理後、リソソームマーカー (LysoTracker Red) と反応させた、生細胞イメージングを行った。その後、直ちに電子顕微鏡用の固定および包埋を行い、観察部位のみの透過型電子顕微鏡観察を実施し、生細胞イメージング画像と電子顕微鏡画像の重ね合わせを行い、CLEM 画像の取得をおこなった。

4. 研究成果

1) HT が細胞生存及び細胞死およびオートファジーに及ぼす影響の解析

HT が Caco-2 細胞の細胞生存に及ぼす影響を検討した結果、濃度依存的に細胞生存率を低下させることを確認した。また、DNA の断片化、ROS の上昇が確認されたことから、HT によって Apoptosis が誘導されていることが示唆された。また、同条件下において HT は mTOR(Ser2448) のリン酸化抑制など、Akt/mTOR シグナルを負に制御することも確認された。その結果として、LC3-I・II の発現も有意に上昇していたことから、HT は Akt/mTOR シグナルを介して Autophagy を亢進させることが示唆された。しかし、HT による LC3 の発現量は、Bafilomycin A1 を添加しても変化しなかった。以上より、HT は、オートファゴソームの形成を誘導するものの、リソソームとの融合を阻害し内容物の分解を阻害することで、結果的にオートファジー機構自体が抑制されていることが示唆された。

2) HT の蛍光標識化

HT の蛍光標識化を行った結果、橙色粉末を NMR (JEOL 270MHz) および LC/MS (Waters 2695, ZQ, 2996, column Inertsil ODS-3 (4.6 x 75 mm)) に供し、構造および純度を確認した。NMR および LC/MS で化学構造を確認し、FITC-HT が合成に成功した。

3) FITC-HT の蛍光顕微鏡を用いた細胞内動的イメージング

Caco-2 細胞を FITC-HT と反応させ、細胞内への取り込みと挙動を動的に追跡した結果、FITC-HT は細胞内に存在していたことから、細胞内に取り込まれることを確認した。また、細胞内局在性を検討した結果、FITC-HT は、リソソームマーカーと一部共

局在が認められたのに対し、ミトコンドリアマーカーと核マーカーとの共局在は認められなかった。加えて、6時間の生細胞イメージング画像の取得も成功し、FITC-HTが蛍光強度を失うことなく、蛍光画像を取得できることを証明した。

また、FITC-HTの細胞内取り込みがHTの構造に依存したものかどうかを、FITCおよびフルオロセインを用いて検討した結果、FITCは、わずかに細胞内に取り込まれるものの、FITC-HTに比べるとごくわずかなものであった。フルオロセインに関しては、細胞内に取り込まれることはなかった。従って、上記のFITC-HTの細胞内の挙動は、HTの化学構造を反映しているものと判断した。

4) CLEM法

上記の結果を踏まえ、CLEM法の実施を試みた。その結果、完全に精細な画像とは言えないが、リソソームに局在しているFITC-HTの画像を得ることができた。まだ予備的結果にとどまっているので、より詳細な条件検討を行いつつ、精細な画像化に努めていきたいと考えている。

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 9 件)

1) 松本雄宇、鈴木 司、山本祐司、小林謙一、ヒト大腸癌由来培養細胞 Caco-2 における蛍光標識化イソフラボンの細胞内動的イメージング、消化と吸収 **38** (2): 113-116 (2016)(査読有)

2) Aizawa Y, Shirai T, Kobayashi T, Hino O, Tsujii Y, Inoue H, Kazami M, Tadokoro T, Suzuki T, Kobayashi KI, Yamamoto Y., Metabolic abnormalities induced by mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of the renal carcinoma Eker (TSC2^{+/-}) rat model. Biosci Biotechnol Biochem. **31**:1-7. (2016) (査読有)

DOI 10.1080/09168451.2016.1165603

3) 小林謙一, 山岸彩乃, 中川徹, 前田雪恵, 伊藤有紗, 山田千晴, 徳永洗貴, 藤田沙也, 鈴木司, 辻井良政, 高野克己, 山本祐司, アルファ化玄米が肥満モデルラットにおける血中コレステロール値に及ぼす影響, 日本食品保蔵学会誌, **42**(1): 3-8,(2016) (査読有)

4) 小林謙一, 茂木裕暉, 高橋明日香, 相澤有美, 鈴木司, 山本祐司, オリーブ葉由来ヒドロキシチロソール蛍光化誘導物を用いた細胞内動態解析法について, 日本食品保蔵学会誌, **42**(1): 23-28,(2016) (査読有)

5) Aizawa Y, Shirai T, Kobayashi T, Hino O, Tsujii Y, Inoue H, Kazami M, Tadokoro T, Suzuki T, Kobayashi K, Yamamoto Y., The tuberous sclerosis complex model Eker (TSC2^{+/-}) rat exhibits hyperglycemia and hyperketonemia due to decreased glycolysis in the liver. Arch Biochem Biophys. **590**: 48-55. (2016) (査読有)

DOI 10.1016/j.abb.2015.10.019

6) Shirai T, Shichi Y, Sato M, Tanioka Y, Furusho T, Ota T, Tadokoro T, Suzuki T, Kobayashi K, Yamamoto Y., High dietary fat-induced obesity in Wistar rats and type 2 diabetes in nonobese Goto-Kakizaki rats differentially affect retinol binding protein 4 expression and vitamin A metabolism. Nutr Res., **36**(3):262-270.(2016) (査読有)

DOI 10.1016/j.nutres.2015.11.018

7) 小林謙一、友永省三、藤田萌、飯塚宏和、伊勢瑛、後藤圭太、瀬崎沙織、武井史郎、福岡伸一、佐々木隆造、柴田克己、鈴木司、山本祐司、トリプトファン代謝中間産物キノリン酸の蓄積は腎糸球体濾過能を低下させる、アミノ酸研究, **9**(2), 91-94 (2015) (査読無)

8) Inoue H, Kobayashi K, Ndong M, Yamamoto Y, Katsumata S, Suzuki K, Uehara M, Activation of Nrf2/Keap1 Signaling and Autophagy Induction

against Oxidative Stress in Heart in Iron Deficiency, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **79**(8):1366-1368 (2015)

DOI 10.1080/09168451.2015.1018125

9) **小林 謙一**、松本 雄宇、廣田 弥里、遠田 昂史、寺本 明子、吉野 美香、山本 祐司、田所 忠弘、高脂肪食摂取ラットにおけるシルク（家蚕・野蚕）パウダー排便促進効果および糞中脂質排泄促進効果、*日本食生活学会誌*, **25**(3), 185-190 (2014) (査読有)

DOI:http://doi.org/10.2740/jisdh.25.185

〔学会発表〕(計 18 件)

1) **小林謙一**、島野愛美、柳 佑芽、茂木裕暉、高橋明日香、鈴木 司、山本祐司、蛍光標識レスベラトロールを用いた細胞内動的イメージング、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 30 日、札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

2) 茂木裕暉、柳 佑芽、高橋明日香、鈴木 司、**小林謙一**、山本祐司、オリーブ葉ポリフェノールは大腸癌細胞においてアポトーシス及びオートファジーを亢進する、第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会、2015 年 12 月 2 日、神戸ポートアイランド（兵庫県神戸市）

3) **小林謙一**、ヒト大腸癌由来培養細胞 Caco-2 における蛍光標識化イソフラボンの細胞内動的イメージング、第 46 回日本消化吸収学会総会、2015 年 11 月 27 日、東京ディズニーシーホテルミラコスタ（千葉県浦安市）

4) Inoue H, **Kobayashi K**, Yamamoto Y, Katsumata S, Takahashi N, Uehara M, Iron deficiency induced autophagy through activation of Nrf2/Keap1 system and phosphorylation of p62 (Thr351) against oxidative stress. 6th International Conference on Food Factors (ICoFF2015), 2015 年 11 月 23 日, Seoul, Korea

5) **小林謙一**、松本雄宇、茂木裕暉、高橋明日香、鈴木 司、山本祐司、コーヒーポリフ

ェノールの蛍光標識化と細胞内動的イメージング、日本食生活学会第 51 回大会、2015 年 11 月 21 日、ノートルダム清心女子大学、（岡山県岡山市）

6) **小林謙一**、友永省三、藤田萌、飯塚宏和、伊勢瑛、後藤圭太、瀬崎沙織、武井史郎、福岡伸一、佐々木隆造、柴田克己、鈴木司、山本祐司、トリプトファン代謝中間産物キノリン酸の蓄積は腎糸球体濾過能を低下させる、2015 年 10 月 23 日、第 9 回日本アミノ酸学会学術集会、滋賀県立大学（滋賀県彦根市）

7) **Kobayashi KI**, Tomonaga S, Goto K, Ise A, Fujita M, Iizuka H, Matsumoto Y, Takei S, Fukuoka SI, Sasaki R, Shibata K, Suzuki T, and Yamamoto Y, QPRT DEFICIENCY IN MICE CAUSES RENAL IMPAIRMENT, The 14th International Society for Tryptophan Research (ISTRY 2015), 2015 年 9 月 16 日、Michigan, USA

8) 山岸彩乃、前田雪恵、徳永洸貴、藤田沙也、辻井良政、風見真千子、鈴木司、**小林謙一**、高野克己、山本祐司、アルファ化米が肥満モデル Zucker rat の脂質代謝に及ぼす影響、日本食品工学会第 62 回大会、2015 年 8 月 28 日、京都大学（京都府京都市）

9) **小林 謙一**、友永 省三、伊勢 瑛、後藤 圭太、松本 雄宇、武井 史郎、福岡 伸一、佐々木 隆造、柴田 克己、鈴木 司、山本 祐司、トリプトファン代謝異常によるキノリン酸蓄積と慢性腎臓病発症との関連性、日本食生活学会第 50 回大会 2015 年 5 月 30 日、東京農業大学（東京都世田谷区）

10) Yamagishi A, Maeda Y, Ito A, Yamada C, Majima S, Nagashima M, Tsujii Y, Suzuki T, **Kobayashi K**, Takano K, Yamamoto Y, Pregelatinized brown rice ameliorates liver injury and pancreatitis in obese model rats. 12th Asian Congress of Nutrition, 2015 年 5 月 15 日, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan

11) Yamagishi A, Maeda Y, Tsujii Y, Suzuki T, **Kobayashi K**, Takano K, Yamamoto Y, Hepatoprotective effects of pregelatinized rice (White and Brown rice) in obese model rats, East Asia Conference on Standardization of Rice Function, The 3rd International Symposium on Rice and Disease Prevention, Pre-symposium of 9th Asia Pacific Conference on Clinical Nutrition, 2014年12月10日, Kyoto, Japan

12) 友永省三、後藤 圭太、伊勢 瑛、鈴木 司、山本 祐司、福岡 伸一、佐々木 隆造、柴田 克己、**小林謙一**、QPRT ノックアウトマウスの血清メタボローム解析、日本トリプトファン研究会 第36回学術集会、2014年10月17日、旭川医科大学（北海道旭川市）

13) **小林謙一**、友永省三、後藤圭太、伊勢 瑛、武藤真悠、瀬崎沙織、宮原麻美、松本雄宇、鈴木 司、武井史郎、福岡伸一、佐々木隆造、柴田克己、山本祐司、QPRT ノックアウトマウスは非侵襲性腎線維化モデルマウスとなりうるか？日本トリプトファン研究会 第36回学術集会、平成26年10月17日、旭川医科大学（北海道旭川市）

14) 後藤 圭太、友永 省三、伊勢 瑛、武藤 真悠、瀬崎 沙織、宮原 麻美、藤田 萌、武井 史郎、福岡 伸一、佐々木 隆造、柴田 克己、鈴木 司、**小林 謙一**、山本祐司、日本アミノ酸学会 第8回学術大会、トリプトファン代謝中間産物であるキノリン酸は腎線維化の惹起因子の一つである、2014年11月8日・9日、東京農業大学（東京都世田谷区）

15) 茂木裕暉、高橋明日香、鈴木司、**小林謙一**、山本祐司、オリーブ葉ポリフェノールの新規機能解析、第8回日本ポリフェノール学会学術集会、2014年8月8日、東京農業大学（東京都世田谷区）

16) 後藤 圭太、伊勢 瑛、瀬崎 沙織、宮原 麻美、松本 雄宇、武井 史郎、福岡 伸一、佐々木 隆造、柴田 克己、鈴木 司、**小林 謙一**、

山本 祐司、トリプトファン代謝の代謝産物であるキノリン酸が腎臓のエリスロポエチン産生機構に及ぼす影響、2014年6月1日、第68回日本栄養・食糧学会大会 酪農学園大学（北海道 江別市）

17) 井上博文、**小林謙一**、山本祐司、勝間田真一、高橋信之、上原万里子、オリーブポリフェノールの骨代謝改善効果に関する研究、日本食生活学会 第48回大会、2014年5月24日、東京聖栄大学（東京都葛飾区）

18) **Ken-Ichi Kobayashi**, Yuki Mogi, Fumika Saito, Takahiro Shiga, Shiro Takei, Minh Huynh, Delfine Cheng, Tsukasa Suzuki, Filip Braet, Yuji Yamamoto, Imaging of Fluorescently labeled Olive Polyphenol Hydroxytyrosol in Caco-2 Cells, 27th International Conference on 3D Image Processing in Microscopy, and 26th International Conference on Confocal Microscopy (Focus on Microscopy 2014), 2014年4月14日, Sydney, Australia

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕解説記事

小林謙一、バイオメディア 機能性食品成分の「見える化」、生物工学会誌, **94** (6), 347, (2016)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 謙一 (Ken-Ichi Kobayashi)

東京農業大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号：80434009

(2) 研究分担者

特になし

(3) 連携研究者

特になし