

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19156

研究課題名（和文）食品成分による血管機能スイッチングシステム構築への新展開

研究課題名（英文）Construction of a switching system for vascular function controlled by food compounds.

研究代表者

加治屋 勝子 (KAJIYA, Katsuko)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授

研究者番号：00379942

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者は血管機能の破綻に血管内皮細胞及び平滑筋細胞のマイクロドメインが関与していることを突き止めた。一酸化窒素の産生能が低下する内皮機能の破綻や、Ca<sup>2+</sup>濃度非依存性の持続的な血管収縮が起きる平滑筋機能の破綻が見られる病的状態では、マイクロドメインがクラスター化して巨大化し、陥入構造が取り込まれる様子を透過型電子顕微鏡により観察した。また、いくつかの食品成分を血管系細胞にプレインキュベートさせ、病的状態を人工的に作り出すと、マイクロドメインのクラスター化が起らなかった。この食品成分が膜との複合体形成において特別な構造特性を持つことは、分子シミュレーションによる三次元解析でも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、病気の予防・診断・治療法の確立や医療費の削減という医療分野に寄与するだけでなく、血管機能の向上による細胞内酸素の取り込みや栄養のエネルギー効率上昇による運動分野での新機能向上という多様性を獲得する可能性を含んでいる。また、血管機能のスイッチングにかかわる食品成分の健康機能性が見直され、食に対する関心が向上し、食料生産分野での成長にも繋がることから、多角的に持続可能な開発目標(SDGs)に貢献でき、我々の世界を変革する取り組みとなる。

研究成果の概要（英文）：I have discovered that microdomains in vascular endothelial cells and smooth muscle cells maintain vascular function. Transmission electron microscopy revealed that microdomains cluster and enlarge in size and incorporate entrapment structures in pathological conditions where endothelial function is disrupted by reduced nitric oxide production and smooth muscle function is disrupted by sustained Ca<sup>2+</sup> concentration-independent vasoconstriction. When the pathological state was artificially created by preincubating the food compounds with vascular cells, microdomain clustering did not occur. The special structural properties of food compounds in the formation of complexes with membranes were also revealed by three-dimensional analysis using molecular simulations.

研究分野：食品科学

キーワード：マイクロドメイン

### 1. 研究開始当初の背景

全身を巡っている血管は、体の全ての細胞に酸素や栄養を供給し、老廃物や二酸化炭素を回収する生命維持に必須のライフラインである。研究代表者(加治屋)はこれまで一貫して、血管機能の正常化に関する研究成果を報告してきた。その中で、血管機能を破綻させる要因として注目されてきた炎症や酸化ストレス等の誘導因子による従来の概念を覆し、血管機能の破綻に細胞膜上マイクロドメインが関与していることを突き止めた。そのため、食品成分がヒトの血管内皮機能を改善する生理的作用機序を明らかにしたいと考え、生体の構造と機能の本質を分子レベルで明らかにするために本研究を立ち上げ、多岐に渡る疾患の発症や進展と密接に関連している血管機能において、食品成分による血管機能のスイッチングシステムを構築することとした。

### 2. 研究の目的

血管は三層構造をしており、内腔(血液)側から、血管内皮細胞層、血管平滑筋細胞層、線維芽細胞層が主な構成細胞である。最近、研究代表者(加治屋)は血管機能の破綻に細胞膜上マイクロドメインが関与していることを突き止めた。具体的には、健常時には小さなマイクロドメインが細胞膜全体に一樣に存在しているが、一酸化窒素の産生能が低下する内皮機能の破綻や、 $Ca^{2+}$ 濃度非依存性の異常な血管収縮が起きる平滑筋機能の破綻が見られる時は、マイクロドメインがクラスター化して巨大化して取り込まれることを視覚的に捉えた。また、血管内皮機能を向上させるトリゴネリンや血管平滑筋機能を向上させるフィセチンはいずれも食品成分であるが、これらによるクラスター化の制御の可能性が示唆されている。本研究では、生体の構造と機能の本質を分子レベルで明らかにするため、血管機能の異常をきたす際にどのようにしてマイクロドメインがクラスター化されているのか、マイクロドメインを効率的に制御可能な食品成分に共通の構造活性特性が存在するのか、食品成分でどのようにクラスター化を制御できるのか、という3点を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)マイクロドメインの脂質解析：細胞膜上マイクロドメインは生体高分子が集まった微小領域で、カベオラや膜ラフトといった機能や構造上のまとまりを持つ特定の部位を指す。血管のマイクロドメインは内皮細胞にも平滑筋細胞にも確認できるが、その組成については報告が無いため、クラスターの詳細を解明するために、まずは血管系細胞のマイクロドメインにおける脂質解析をおこなう。マイクロドメインの分画条件は、ショ糖密度勾配遠心法にてマイクロドメインを分画・精製後、マーカータンパク質であるカベオリンやフロチリンを指標にウェスタンブロット法で確認し、回収したマイクロドメイン画分を質量分析計により膜組成解析する。

(2)人工モデル膜の作製とクラスター化の条件検討：細胞ごとのマイクロドメイン膜組成を基に人工モデル膜を作製し、膜の集合形態が変化する化合物を探索することでクラスター化に関与する条件の絞り込みをおこなう。固体 NMR では人工モデル膜中における分子の配向性を明らかにすることができ、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法では膜と分子の結合・解離のしやすさや速度を数値化することができ、これらの物理化学的手法を取り入れることでマイクロドメインの全容の解明に繋げる。

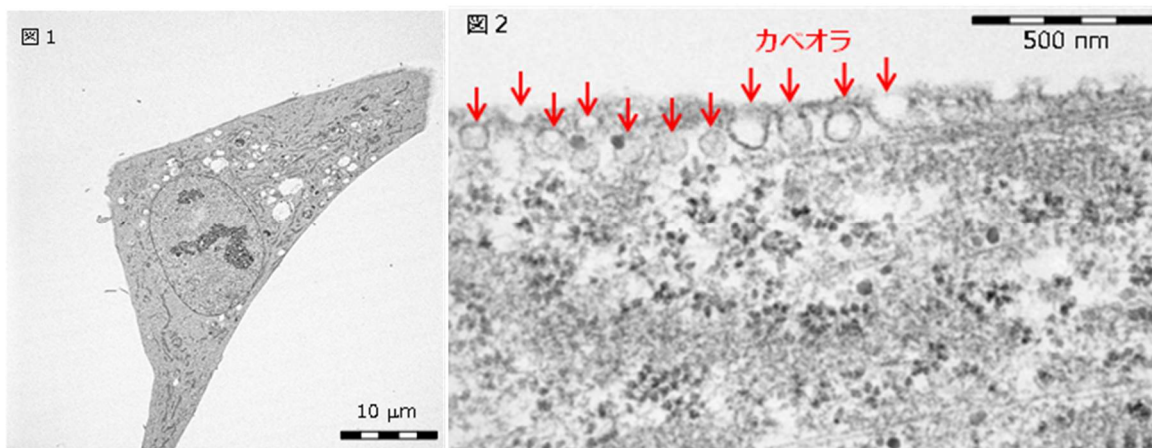
(3)マイクロドメインと食品成分との相互作用解析：血管異常収縮誘発物質であるスフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) の細胞内局在や作用点を明らかにするため、蛍光標識した NBD-SPC の局在をライブイメージングにより確認する。マイクロドメインは、細胞の刺激により集合体 (クラスター) 化して大きくなったり、小領域のまま数が増えたりする。これまでに、桜島大根由来トリゴネリンなどの食品成分を血管系細胞に作用させたところ、機能にかかわる病的タンパク質の発現が減少するだけでなく、マイクロドメインの異常なクラスター化を抑制した。これらの食品成分は二次元的な化学構造上の類似性は認められないため、膜との複合体形成における分子シミュレーションを用いた三次元解析により構造的特性の共通項を探る。さらには構造的特性を持つ食品成分を天然物より探索して核磁気共鳴法、質量分析計、赤外吸収スペクトル等の各種機器分析を駆使して成分同定をおこなう。

(4)食品成分によるマイクロドメインクラスター化の制御：血管機能において、マイクロドメインのクラスター化は破綻を導く反応の場となっている可能性が高いため、食品成分とプレインキュベートした血管系細胞を用いて、マイクロドメインのクラスター化に対する制御レベルを評価する。

#### 4. 研究成果

##### (1) マイクロドメインの脂質解析

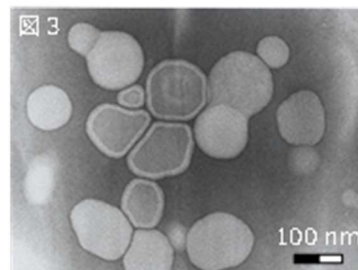
透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて血管平滑筋細胞の形態を観察した (図 1)。測定条件は樹脂包埋超薄切片法にて、前固定は 2% グルタルアルデヒド + 2% パラホルムアルデヒド / 0.1 M



リン酸緩衝液 (pH7.4)、後固定は 2% グルタルアルデヒド / 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4)、包埋はエポキシ樹脂、切片厚は 70 nm、電子染色は 2% 酢酸ウラニル、鉛染色液、加速電圧は 80 kV でおこなった。その結果、細胞膜上にマイクロドメインの一種であるカベオラを撮影することに成功した (図 2)。また、休息凍結・凍結置換法による免疫電顕も実施した。

##### (2) 人工モデル膜の作製

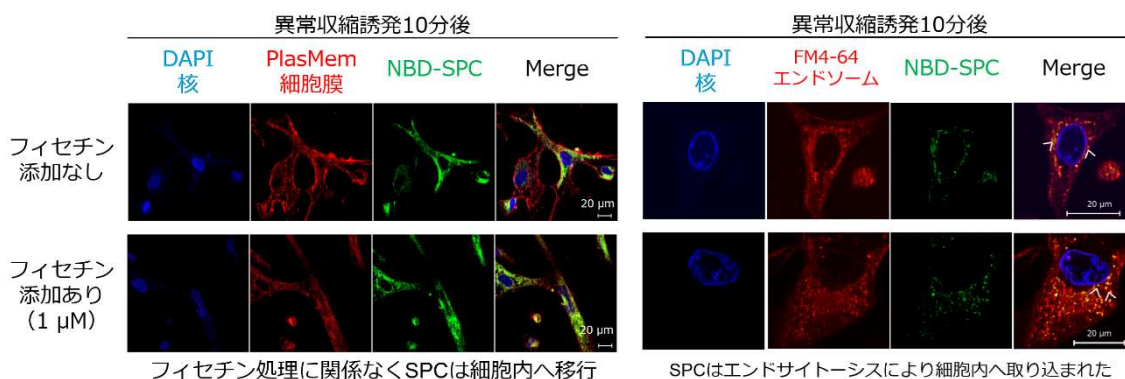
マイクロドメイン膜組成を基に人工モデル膜を作製し (図 3)、膜の集合形態が変化する化合物を探索することでクラスター化に関与する条件の絞り込みをおこなった。SPR による測定条件を確立し、膜と分子の結合・解離のしやすさや速度を数値化することができた。



##### (3) マイクロドメインと食品成分との相互作用解析

##### (4) 食品成分によるマイクロドメインクラスター化の制御

ポリフェノールの一種であるフィセチンを血管平滑筋細胞に作用させたところ、機能にかかわる病的タンパク質の発現が減少するだけでなく、マイクロドメインの異常なクラスター化を抑制した。また、血管機能において、マイクロドメインのクラスター化は破綻を導く反応の場となっている可能性が高いため、食品成分とプレインキュベートした血管系細胞を用いて、マイクロドメインのクラスター化に対する制御レベルを評価した。血管の異常収縮を引き起こす SPC はフィセチン処理に関係なく、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることが確認できた。これらの研究成果については論文掲載済みである。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Natsuko Tsurudome, Yuji Minami, Katsuko Kajiya(責任著者)	4. 巻 12
2. 論文標題 Sphingosylphosphorylcholine (SPC), a Causative Factor of SPC-Induced Vascular Smooth Muscle Cells Contraction, Is Taken Up via Endocytosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ cells12020265	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 Katsuko Kajiya(責任著者), MadokaArino, Akari Koshio, Yuji Minami	4. 巻 13
2. 論文標題 Composition and taste of beef, pork, and duck meat and bioregulatory functions of imidazole dipeptides in meat	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-29351-z	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 N. Tsurudome, Y. Minami, K.Katsuko(責任者)
2. 発表標題 Intracellular intake mechanism of SPC, a causative molecule for vascular abnormal contraction
3. 学会等名 The 39th Congress of the International Union of Physiology Sciences (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 後田熙、南雄二、加治屋勝子(責任者)
2. 発表標題 栽培地の異なる農産物が示す生体調節機能
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鶴留奈津子、南雄二、加治屋勝子(責任者)
2. 発表標題 桑葉由来成分 Fisetin による血管異常収縮予防効果と病態形成メカニズムの検討
3. 学会等名 第 44 回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 榊原夢未、南雄二、加治屋勝子(責任者)
2. 発表標題 血管弛緩により高血圧予防に寄与するオクラの解析
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 N. Tsurudome, Y. Minami, K.Katsuko(責任者)
2. 発表標題 Use of fisetin and mulberry leaves as nutraceuticals to prevent vascular abnormal contraction
3. 学会等名 21th World Congress of Food Science & Technology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂口万里子、南雄二、加治屋勝子
2. 発表標題 トリゴネリンによる血管内皮機能改善作用のメカニズム解明
3. 学会等名 日本食品科学工学会西日本支部 & 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部2022年度合同支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuri Nonoshita, Yuji Minami, Katsuko Kajiya(責任者)
2. 発表標題 Effects of trigonelline on human renal glomerular endothelial cells function
3. 学会等名 22nd IUNS- International Congress of Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuri Nonoshita, Yuji Minami, Katsuko Kajiya(責任者)
2. 発表標題 Effects of trigonelline, a regulator of vascular function, on human renal glomerular endothelial cell function
3. 学会等名 The 100th Anniversary Annual Meeting of The Physiological Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小原佑輝、山之内博紀、南雄二、加治屋勝子(責任者)
2. 発表標題 血圧調節作用を示す里芋の主要成分の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 加治屋勝子	4. 発行年 2022年
2. 出版社 南方新社	5. 総ページ数 301
3. 書名 新・地域と大学第4章地方国立大学の地方創生への取り組み	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 血管攣縮抑制剤、血管攣縮予防剤、血管攣縮予防用経口組成物、血管攣縮抑制用経口組成物及び抗酸化剤	発明者 加治屋勝子、竹之内俊夫	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-144883	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 紫外線吸収剤及び紫外線吸収剤の製造方法	発明者 加治屋勝子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-006459	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------