

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19716

研究課題名（和文）小腸吸収上皮細胞を構成する膜リン脂質による栄養素吸収機能の制御

研究課題名（英文）Regulation of Nutrient Absorption Function by Membrane Phospholipids Comprising Small Intestinal Absorptive Epithelial Cells

研究代表者

三浦 進司（Miura, Shinji）

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：10342932

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：LPLAT7の欠損は、lyso PC、lyso PE、lyso PSのsn-1位への18:0-CoA 導入活性と、小腸上皮細胞中の18:0-PC、18:0-PE、18:0-PS量を低下させた。さらに、小腸上皮細胞の主要なPC分子であるPC (18:0_18:2) は、18:0がsn-1位に結合した分子であり、LPLAT7の欠損がPC (18:0_18:2) 量を有意に減少させることを示した。ラクトース投与時の血糖値上昇はiKOマウスで抑制された。iKOマウスのグルコースの吸収には障害は認められなかったため、この変化にはラクターゼ活性とラクトース分解反応の低下が関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LPLAT7によるsn-1位へのstearoyl基(18:0)の導入が小腸の栄養素吸収機能に不可欠であるという新規概念を、in vivoモデルで検証した。責任酵素の同定、ラクトース吸収への影響について明らかにすることができた。本研究は小腸上皮細胞を題材に、“生体を構成する脂質の質”と生体機能の関係性まで踏み込んだ解析を行なった。本研究結果は、栄養学における脂質の新たな意義、新しい研究領域の開拓や新概念の提唱につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Deletion of LPLAT7 reduced the activity of lyso PC, lyso PE, and lyso PS to introduce 18:0-CoA into the sn-1 position and the amounts of 18:0-PC, 18:0-PE, and 18:0-PS in small intestinal epithelial cells. Furthermore, PC (18:0_18:2), the major PC molecule in small intestinal epithelial cells, is a molecule with 18:0 bound to the sn-1 position, indicating that loss of LPLAT7 significantly reduced PC (18:0_18:2) levels. The increase in blood glucose levels upon lactose administration was suppressed in iKO mice. iKO mice did not show impaired glucose absorption, suggesting that this change involves a decrease in lactase activity and lactose degradation reaction.

研究分野：分子栄養学

キーワード：リン脂質 リモデリング 小腸 ラクトース

1. 研究開始当初の背景

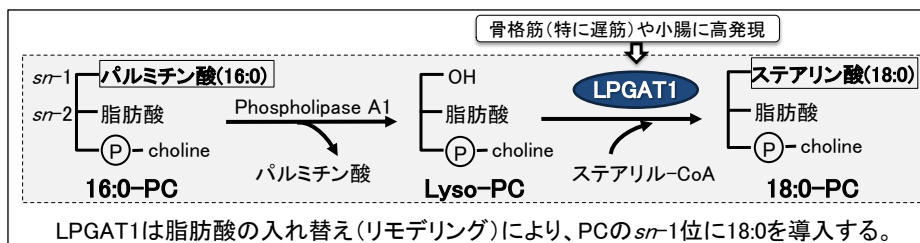
小腸の栄養素吸収とリン脂質 栄養素の約 90%が小腸で吸収されるため、小腸吸収上皮は栄養素吸収において不可欠である。小腸吸収上皮細胞は栄養素を選択的かつ能動的に吸収する機能を有しており、異なる機能が割り当てられた微絨毛膜と側底膜で構成され、栄養素はこの2つの膜を通過して生体内に吸収される。それぞれの膜の機能特性は、膜を構成するリン脂質やタンパク質(輸送体)によって決まるため、膜リン脂質は栄養素吸収において重要な役割を担うと推測される。事実、人工膜を用いた *in vitro* 実験においてリン脂質環境が栄養素輸送体の機能に影響することが報告されている(*Biochim Biophys Acta Biomembr* 2019)。

リン脂質に結合する脂肪酸種 膜リン脂質のうち、ホスファチジルコリン(PC)などのグリセロリン脂質は分子内にアシル基を2つ有し、*sn*-1 位には飽和脂肪酸や一価不飽和脂肪酸が、*sn*-2 位には多価不飽和脂肪酸が結合していることが多い。グリセロリン脂質に結合する飽和脂肪酸の炭素数は、生体膜の厚さの決定因子であり、膜タンパク質機能に影響する可能性があること(*J Gen Physiol* 2018)、脂肪酸の不飽和度は膜の柔軟性に関与することから(*Trends Cell Biol* 2015)、リン脂質に結合する脂肪酸種は生体機能に大きく影響する。これまでに *sn*-2 位の脂肪酸種を決定するアシル基転移酵素がいくつか同定され、これら酵素の欠損は肺、網膜、精子などの機能に大きく影響すると報告されている(*Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2019)。一方、*sn*-1 位の脂肪酸種を決定するアシル基転移酵素は、ホスファチジルイノシトール(PI)の *sn*-1 位にアラキドン酸を導入する LCLAT1 が同定されているが(*J Lipid Res* 2012)、PC など細胞膜を構成する主要なグリセロリン脂質の *sn*-1 位の脂肪酸種を決定する酵素の同定や、酵素欠損モデルを用いた *in vivo* での生理的意義の解明には至っていない。腸管でも、PC の *sn*-2 位の脂肪酸種決定に関与するアシル基転移酵素(LPCAT3)の欠損が中性脂肪の輸送を障害することが報告されているが(*eLife* 2015; *Cell Metab* 2016)、*sn*-1 位の脂肪酸種の決定機構や、吸収上皮の栄養素吸収機能との関連性については全く明らかにされていない。

2. 研究の目的

LPLAT7(LPGAT1)による *sn*-1 位に結合する脂肪酸種の制御 申請者らは、骨格筋において PC の *sn*-1 位への stearoyl 基(18:0)の導入に、LPLAT7 と呼ばれるアシル基転移酵素が関与することを突き止めた(右図、投稿中)。

全身で LPLAT7 を欠損したマウスを解析したところ、骨格筋中の 1-stearoyl-PC

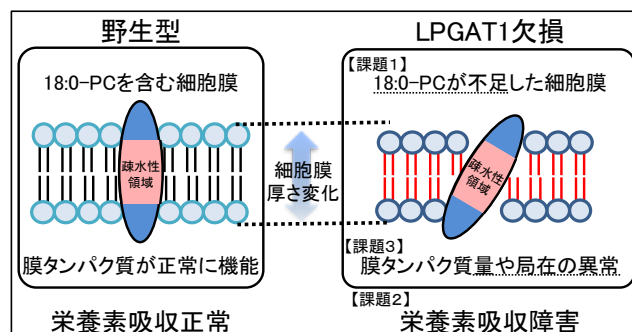


(18:0-PC)量の低下と運動継続能力の低下が認められたほか、母乳吸収阻害、授乳期生存率と成長速度の低下が認められ、栄養素吸収にも大きく影響することが示唆された(未発表)。また、LPLAT7 が小腸に高発現していること(*J Lipid Res* 2010)、LPLAT7 の SNPs が血中リポタンパク質プロファイルに影響すること(*Int J Mol Med* 2019)、野生型マウスの小腸吸収上皮中の 18:0-PC 量が全 PC 量の約 30%を占めること(未発表)から、小腸でも LPLAT7 が PC の *sn*-1 位への 18:0 導入に関与し、栄養素吸収に重要な働きをしているのではないかと考え、本研究ではこれを検証する。

3. 研究の方法

【課題1】小腸での LPLAT7 の欠損は PC の sn-1 位への 18:0 導入に影響するか: 腸管特異的 Cre リコンビナーゼ過剰発現マウス (villin-Cre マウス) と、申請者が保有する LPLAT7^(lox/lox) マウスを交配し、腸管特異的 LPLAT7 欠損(腸 LPLAT7-iKO)マウスを作成する。これら組換えマウスの小腸より吸収上皮を採取して脂質抽出を行い、LC/MS を用いて 18:0-PC 量が低下するか否かを明らかにする。

【課題2】小腸での LPLAT7 の欠損が栄養素吸収に影響するか: ①腸 LPLAT7-KO マウスの摂食量、体重の経時変化を測定する。②一定期間飼育後、一晩絶食させた腸 LPLAT7-KO マウスに、糖質を経口投与し、これら栄養素の血中移行量を測定する。これにより LPLAT7 が小腸における栄養素の吸収機能に影響するか否かを明らかにする(微絨毛膜と側底膜の両機能の総合的評価)。



4. 研究成果

4-1. 体重変化

離乳前と離乳後における雄性 LPLAT7^{lox/lox} マウスおよび LPLAT7 iKO マウスの体重の推移をそれぞれ測定した。離乳前、離乳後のどの週齢においても LPLAT7^{lox/lox} マウスと LPLAT7 iKO マウス間で体重に有意な差は認められなかった。

4-2. LPLAT7 iKO マウスの小腸および大腸における LPLAT7 遺伝子発現量の変化

8 週齢の雄性 LPLAT7^{lox/lox} マウスおよび LPLAT7 iKO マウスから採取した小腸上部、中部、下部および大腸上皮細胞の LPLAT7 mRNA 発現量を測定したところ、LPLAT7^{lox/lox} マウスと比較して LPLAT7 iKO マウスでは、小腸上部において 82.86%、中部において 81.59%、下部において 68.98%、大腸において 54.09%、それぞれ有意に減少した。

4-3. LPLAT7 欠損による腸管上皮細胞リン脂質クオリティへの影響

小腸上部の上皮細胞において、LPLAT7^{lox/lox} マウスと比較して LPLAT7 iKO マウスで palmitoyl 基 (16:0) および oleoyl 基 (18:1) を含む PC、PE 分子、palmitoleoyl 基 (16:1) を含む PE 分子の含有率が高値であった。一方で stearoyl 基 (18:0) を含む PC、PE 分子、linoleoyl 基 (18:2) を含む PE 分子の含有率が有意に低値であった。小腸中部において、LPLAT7^{lox/lox} マウスと比較して LPLAT7 iKO マウスで 16:0 を含む PC、PE 分子、16:1 および 18:1 を含む PE 分子の含有率が高値であった。一方で 18:0 を含む PC、PE 分子、18:2 を含む PE 分子の含有率が有意に低値であった。小腸下部において、LPLAT7^{lox/lox} マウスと比較して LPLAT7 iKO マウスで 16:0 を含む PC、PE 分子、16:1、18:1 を含む PE 分子の含有率が有意に高値であった。一方で、18:0 を含む PC、

PE 分子、18:2、docosahexaenoyl 基 (22:6) を含む PE 分子の含有率が有意に低値であった。大腸において、LPLAT7^{flx/flx} マウスと比較して LPLAT7 iKO マウスで 18:1 を含む PC、PE 分子の含有率が有意に高値であった。一方で、18:0 を含む PC、PE 分子、18:2、arachidonoyl 基 (20:4)、22:6 を含む PE 分子の含有率が有意に低値であった。

4-4. LPC、LPE および LPS の sn-1 位への *in vitro* アシル基導入活性の測定

LPLAT7 が欠損した小腸上皮細胞における、LPC、LPE、LPS の sn-1 位へのアシル基導入活性に及ぼす影響を調べるため、8 週齢の雄性 LPLAT7^{flx/flx} マウスおよび LPLAT7 iKO マウスの小腸中部の上皮細胞から膜画分を単離し、酵素溶液を調製した。sn-2-rich LPC、sn-2-rich LPE および sn-2-rich LPS をアシルアクセプター基質、^[13C16]-16:0-CoA、^[13C18]-18:1-CoA および ^[13C18]-18:0-CoA をアシルドナー基質として活性測定を行った。その結果、sn-2-rich LPC および sn-2-rich LPE への ^[13C16]-16:0-CoA、^[13C16]-18:1-CoA および ^[13C18]-18:0-CoA 導入活性 (LPCAT activity, LPEAT activity) は、いずれも LPLAT7^{flx/flx} マウスに比べ LPLAT7 iKO マウスで有意に低値を示した。また、sn-2-rich LPS への ^[13C18]-18:0-CoA の導入活性 (LPSAT activity) は、LPLAT7^{flx/flx} マウスに比べ LPLAT7 iKO マウスで有意に低値を示した。sn-2-rich LPS への ^[13C16]-16:0-CoA、^[13C18]-18:1-CoA の導入活性については、有意差はなかったものの、LPLAT7^{flx/flx} マウスに比べ LPLAT7 iKO マウスで低値傾向を示した。

4-5. LPLAT7 欠損が PC、PE への重水素標識ステアリン酸取り込み活性に及ぼす影響

13-16 週齢の雄性 LPLAT7^{flx/flx} マウスと LPLAT7 iKO マウスの小腸上部をより単離した小腸上皮細胞を、重水素標識ステアリン酸 (18:0-*d*₃₅) と反応させ、生成した 18:0-*d*₃₅ を含む PC および PE 分子種の存在量を測定した。その結果、LPLAT7^{flx/flx} マウスに比べ LPLAT7 iKO マウスで、PC (18:0-*d*₃₅-16:0)、PC (18:0-*d*₃₅-16:1)、PC (18:0-*d*₃₅-18:0)、PC (18:0-*d*₃₅-18:2)、PC (18:0-*d*₃₅-20:4)、PC (18:0-*d*₃₅-22:6) 量が有意に低値を示した。一方で、PE 分子への 18:0-*d*₃₅ を含む PE 分子の存在量は、両マウスで有意な差は認められなかった。

4-6. LPLAT7 欠損が単糖類および二糖類の消化・吸収に及ぼす影響

LPLAT7 欠損によるリン脂質クオリティ変化が、単糖類および二糖類の消化・吸収機能に及ぼす影響を検討するために、単糖類であるグルコース、二糖類であるマルトース、スクロース、ラクトースをそれぞれ 8 - 15 週齢の雄性 LPLAT7^{flx/flx} マウスおよび LPLAT7 iKO マウスに経口投与し、投与後の血糖値の経時変化を調べた。グルコース投与後の血糖値は、どのタイムポイントにおいても LPLAT7^{flx/flx} マウスと LPLAT7 iKO マウスとの間で有意な差は見られなかった。血糖値曲線より算出した曲線下面積 (area under the curve, AUC) も、両群間に差は認められなかった。マルトース投与後の血中グルコース濃度は、投与 15 分後の血糖値が、LPLAT7 iKO マウスと比較して LPLAT7^{flx/flx} マウスで有意に低値を示したが、それ以外のタイムポイントでは差は認められなかった。AUC にも両群間に差は認められなかった。スクロース投与後の血中グルコース濃度は、すべてのタイムポイントと AUC で差は認められなかった。ラクトース投与後の血中グルコース濃度は、投与 15 分後および 90 分後で、LPLAT7^{flx/flx} マウスと比較して LPLAT7 iKO マウスで有意に低値を示し、AUC も LPLAT7 iKO マウスで有意に低値を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ono, R., Sato, T., Murakami, S., Kawana, H., Aoki, J., and Miura, S.
2. 発表標題 LPGAT1 generates distinctive phospholipid composition in small intestine.
3. 学会等名 The 25th Shizuoka Forum on Health and Longevity (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤友紀、小野利佳子、村上紗希、三好規之、川名裕己、青木淳賢、三浦進司
2. 発表標題 小腸上皮細胞のリン脂質sn-1位アシル基リモデリング機構と栄養素吸収に及ぼす影響の解明
3. 学会等名 第78回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 小野利佳子、佐藤友紀、村上紗希、三好規之、川名裕己、幡野敦、松本雅記、青木淳賢、三浦進司
2. 発表標題 アシル基転移酵素LPLAT7を介した腸管上皮細胞のアシル基リモデリングと腸管上皮機能への影響
3. 学会等名 第82回日本栄養・食糧学会中部支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小野利佳子、佐藤友紀、村上紗希、三好規之、川名裕己、青木淳賢、三浦進司
2. 発表標題 アシル基転移酵素LPLAT7による腸管上皮細胞のPCアシル基リモデリングと糖質の消化・吸収への影響
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小野利佳子、佐藤友紀、村上紗希、三好規之、川名裕己、青木淳賢、三浦進司
2. 発表標題 腸管上皮におけるアシル基転移酵素LPGAT1/LPLAT7を介したリン脂質クオリティの制御と栄養素吸収機能への影響
3. 学会等名 第65回日本脂質生化学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	佐藤 友紀 (Tomoki Sato) (30908455)	静岡県立大学・食品栄養科学部・助教 (23803)	
研究分担者	林 久由 (Hisayoshi Hayashi) (40238118)	静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授 (23803)	

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
---------	---------