

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19780099
 研究課題名 (和文) 食品由来脂溶性成分の腸管吸収における経上皮輸送に関わるタンパク質の同定
 研究課題名 (英文) Search of protein molecules associated with the transepithelial transport of dietary lipophilic components in the intestinal absorption
 研究代表者
 室田 佳恵子 (MUROTA KAEKO)
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
 研究者番号：40294681

研究成果の概要：

脂溶性食品成分が摂食後小腸管腔から吸収上皮細胞を経て血管あるいはリンパ管へと輸送される経路に関わる種々のタンパク質分子について検討した。フラボノイドおよびビタミン E の腸管吸収機構について、小腸管腔における脂質消化酵素、細胞内代謝酵素、細胞内におけるカイロミクロン合成に関わるタンパク質の吸収における寄与を明らかにした。また、食事性脂肪酸の細胞膜輸送担体について、その吸収への関与を解析するための培養細胞を用いた実験系確立を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：食品科学

キーワード：リンパ、Caco-2、刷子縁膜輸送、脂肪酸、フラボノイド、ビタミン E、カイロミクロン、FATP4

1. 研究開始当初の背景

今日、糖尿病や動脈硬化等脂質代謝に関連した生活習慣病の予防は多くの関心を集めており、メタボリックシンドローム、肥満の主要な原因となる食事由来脂質の吸収を適切に調節することに役立つ情報が求められている。食品成分の吸収を調節するためには、その消化や吸収過程について知ることが重

要である。古典栄養学における脂肪の吸収は、a) 消化管内における消化、b) ミセル化による不攪拌層の通過、c) 単純拡散による細胞膜通過、d) 細胞内での再構成とカイロミクロン形成、e) エクソサイトーシスによる基底膜通過、f) リンパへの流入、として説明されてきた。

しかし、1980 年代以降、細胞膜に局在する

複数の脂肪酸輸送担体が見出され、最近ではコレステロールの輸送担体も同定されるなど、脂溶性成分についても膜輸送にはタンパク質が関与していることが認知されつつある。2005年に、脂肪酸の膜局在性輸送担体の1つであるCD36/FAT (Fatty Acid Translocase) が小腸におけるカイロミクロン分泌に関与することを示唆する論文が発表され (Drover et al., J. Clin. Invest., 115:1290-1297, 2005)、刷子縁膜輸送担体が脂質の小腸粘膜輸送の経路を決定する重要な因子であることが示唆された。

また、我々は植物性食品成分の1つであるフラボノイドの吸収と代謝の研究において、両親媒性のフラボノイドであるケルセチンが脂質と同様に腸管吸収後リンパへ輸送されることを明らかにした (Murota and Terao, FEBS Lett., 579: 5343-5346, 2005)。リンパ液中に存在したのはフラボノイドの抱合体であり、これは血中代謝物プロファイルと同等であったため、フラボノイド代謝物はリンパと血液の両方に同時に輸送されており、代謝物の水溶性/脂溶性による輸送経路選択の考え方では説明できないことが示唆されたが、一方で、フラボノイドの吸収は脂質の同時添加により促進することが知られているため、この輸送経路の選択が共存する脂質によって影響されることが予想される。

2. 研究の目的

前項のような背景をふまえ、本申請課題は、脂溶性成分の刷子縁膜通過に関わるタンパク質の同定および、粘膜通過後の血管あるいはリンパ管への選択的輸送について検討を行い、新たな知見を得ようとするものである。研究期間における目的としては特に、食品中の脂溶性成分について腸管吸収過程における粘膜輸送に関わるタンパク質を明らかにし、さらに粘膜通過後門脈あるいはリンパ管への選択的輸送が起こる機序を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) ヒト小腸 Caco-2 細胞における脂溶性食品成分の膜輸送に関わるタンパク質の発現調節

脂溶性成分が小腸粘膜 (吸収上皮) を通過する過程を明らかにするために、ヒト小腸培養細胞モデルである Caco-2 を用いた。Caco-2 細胞を選択透過性フィルター上に培養したダブルチャンバー培養系を用い、刷子縁側に与えた目的成分が基底膜側へ輸送される経路上皮輸送について、経路上で働く輸送タンパク質や代謝酵素についての検討を行った。特に、RNAi および転写因子アゴニストを用いた膜輸送担体候補タンパク質の発現調節を行うための条件を検討した。

(2) ラットを用いたリンパ液/血液同時採取系による食品由来脂溶性成分吸収経路の検討

ラットの胸管リンパ管にカテーテルを留置し、術後 24 h 程度の回復期間を置いた後、非麻酔下における投与成分の吸収輸送を測定することが可能な、胸管リンパカニューレションラットを用いた。本課題においては、リンパ管と血管輸送の選択条件を明らかにすることが目的であるため、同一ラットにおいて目的成分投与時にリンパ液と血液を同時に採取する系を確立する必要がある。そこで、血液採取において簡便でラットへの負担が少なく、なおかつ血液の凝固による採取困難を回避しやすい尾部採血法を用いて、リンパ液と血液の双方を経時的に同時採取し、濃度変化を測定した。脂質は、胃ないし十二指腸に投与用カテーテルを留置し、直接消化管内へと試料を投与した。

4. 研究成果

(1) 脂肪酸および 2-MG の腸管吸収機構解明のための培養細胞実験系の確立と、それに関わる刷子縁膜結合タンパク質の探索

ヒト小腸培養細胞モデルである Caco-2 を用いた RNAi による膜輸送担体候補タンパク質の発現抑制を行うための条件を検討した。Caco-2 細胞は遺伝子導入効率が低いため、Caco-2 に対しても高い導入効率を示すことが期待される導入試薬を検索したところ、コントロール試験において発現抑制がかかることが示唆されるものはあったが、それほど強い導入試薬は見出せなかった。

一方、PPAR アゴニストであるフィブレート類が FATP4 の発現を増強することが強く示唆された。そこで、アゴニスト処理後の Caco-2 細胞において脂肪酸吸収評価を行ったが、脂肪酸取り込みへの影響を見出すには至らず、既知の膜輸送タンパク質の発現調節のための実験系は確立できなかった。

Caco-2 細胞はがん細胞由来のヘテロな細胞株であって正常小腸細胞とは異なること、また上記のように種々の操作に対して感受性が低いという不利な性質を有することから、候補となるタンパク質を発現した、より使いやすい細胞株を見出すことが重要であるといえる。

(2) フラボノイドの腸管吸収代謝機構およびリンパ輸送機序の解明

食品成分であるフラボノイドは、脂溶性は弱いものの、細胞膜に対して強い親和性を有し、また脂肪との同時摂取により吸収が促進されることが知られている。そこで、フラボノイドの腸管吸収について検討を行ったところ、野菜に含まれる代表的なフラボノール

であるケルセチンと、大豆に含まれるイソフラボンでは、構造の違いに由来すると思われる吸収代謝の差異が存在することを見出した。すなわち、フラボノイドは抱合代謝物へと変換され、その細胞外輸送には第二相代謝酵素および薬物排出ポンプが関与するが、この細胞内代謝において、フラボノールはイソフラボンよりも代謝酵素の基質となりやすかった。ここで用いた Caco-2 細胞のロッチでは、フラボノイドの代謝に関わる酵素として硫酸転移酵素 (Sulfotransferase) の発現が確認されている。

また、リンパ液/血液輸送の選択性については、リンパへ主に輸送される長鎖脂肪酸トリグリセリド (LCT) と門脈へ主に輸送される中鎖脂肪酸トリグリセリド (MCT) を用いてフラボノイドの吸収経路に与える影響を検討したところ、LCT の共存によりリンパ輸送が促進される傾向がみられた。このことは、脂肪の同時摂取によりフラボノイドの吸収が促進されるという報告例に、一部はリンパ輸送の促進が関わっていることを示唆するものである。しかしながら、リンパ液へ放出されたカイロミクロンへのフラボノイドの局在は観察されなかった。すなわち、カイロミクロンのアセンブリに関与するアポリポタンパク質である ApoB は、フラボノイド輸送には関与していないことが示唆された。一方で、リンパ液中のフラボノイドは殆どが水溶性の高い代謝物であったことから、脂溶性成分に関与するカイロミクロンではなく、水溶性成分のリンパ輸送を促進する要因として、リンパ液の流量 (および体積) が考えられた。リンパ液には吸収した体液を調節して急激に血液が希釈されるのを防ぐ働きがあると考えられる。すなわち、脂質吸収に伴うリンパ液へのカイロミクロン輸送のために、リンパ壁の透過性が亢進することと、同時に自由飲水させた水分を輸送するためにリンパ流量が増加したことが、フラボノイドのリンパ輸送を高めた可能性がある。リンパ液と血液の両方に同時に輸送される食品成分についての報告は存在しないため、これらの結果は非常に興味深いものである (論文投稿準備中)。

さらに、脂肪の非存在下でラットにおけるケルセチンとイソフラボンの吸収比較を行ったところ、リンパ液と血液への分配比率が異なることが示唆されており、フラボノイドの構造の差異もまた、リンパ/血液輸送の選択性に関与しているかもしれない。

一方、フラボノイドの刷子縁膜輸送において、その流入に関与しうる膜タンパク質として、ビロトランスロカーゼが報告された。そこで、本研究で用いている Caco-2 細胞におけるビロトランスロカーゼの発現を調べた。し

かし、共同研究者 (Prof. S. Passamonti, Italy) より入手した抗体は、ラットの分子に対するもので、ヒト細胞である Caco-2 細胞に対しては反応を示さなかった。今後、ビロトランスロカーゼの発現を明らかにして行くためには、ヒトにおける当該分子のホモログを明らかにする必要がある。

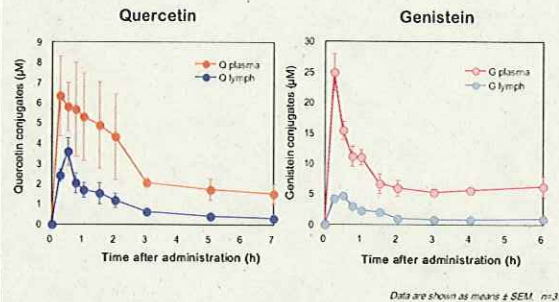


図1 胸管リンパカニューレーションラットにおけるケルセチン (左) およびゲニステイン (右) 代謝物のリンパおよび血液への輸送。ゲニステインの血液輸送がケルセチンに比べて高いことが示された。

(3) 脂溶性ビタミン (ビタミン E) の腸管吸収機構の検討

本研究では、代表的な脂溶性ビタミンであるビタミン E についても、腸管吸収促進に寄与する種々の因子を検討した。Caco-2 細胞のダブルチャンバー培養系にて吸収評価を行ったところ、細胞層への取り込み (および強い吸着) は投与量の 30-40%/8 h みられたが、基底膜側への輸送は 1% 前後/8 h と非常に低く、フラボノイドの場合 (基底膜輸送が約 20%/2 h) とは大きく異なっていた。このことは、ビタミン E は脂溶性が高くカイロミクロンへの局在が吸収に必須であるものの、Caco-2 ではその能力が不十分であるためだと考えられる。そこで、細胞画分からの回収量および基底膜側への輸送量をそれぞれモニターし、ビタミン E の吸収性を評価することとした。ビタミン E は油脂に溶解した状態で摂取されることから、細胞への投与液を腸管ミセルのモデル溶液としてインキュベートすると、吸収量が有意に上昇した。このことは、ビタミン E 吸収に共存する脂肪の消化が必須であることを示すものである。そこで、サプリメント等で利用されるような、粉末化して水溶性を高めたビタミン E 含有試料を用いて吸収性を検討したところ、Caco-2 細胞およびマウスにおいて、リパーゼの共存が吸収促進に重要な役割を果たしていることが示された (論文投稿準備中)。

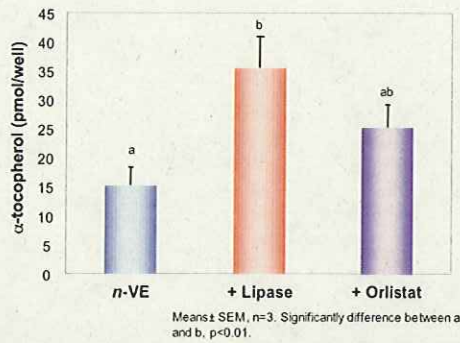


図2 Caco-2細胞における粉末化ビタミンE (n-VE)の基底膜側輸送に対するリパーゼおよびリパーゼ阻害剤(Orlistat)添加の影響

n-VE由来ビタミンEの基底膜輸送量は、投与溶液にリパーゼを添加することで有意に上昇した。さらに、リパーゼによる上昇はリパーゼ阻害剤の添加により抑制された。

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)

[学会発表] (計9件)

- ① 室田佳恵子ら、植物性フラボノイドの生体利用性、第7回脂質工学研究部会講演会、2009年3月13日、大阪(大阪市立工業研究所)
- ② 室田佳恵子ら、可溶化α-トコフェロールの腸管吸収性評価、第20回ビタミンE研究会、2009年1月24日、奈良(奈良県文化会館)
- ③ 室田佳恵子ら、ヒト小腸Caco-2細胞におけるフラボノイドおよびイソフラボノイドの代謝、第13回日本フードファクター学会、2008年11月7日、東京(タワーホール船堀)
- ④ 室田佳恵子ら、食品由来脂溶性成分腸管吸収に及ぼす共存物質の影響、生理研研究会「上皮膜輸送制御の分子機構：体内環境恒常性維持機構解明を目指して」、2008年7月16日、愛知県岡崎市(生理学研究所)
- ⑤ 室田佳恵子ら、α-トコフェロールの腸管吸収における脂質分解酵素の重要性、第50回日本脂質生化学会、2008年6月

5日、徳島(徳島県郷土文化会館)

- ⑥ 室田佳恵子ら、食事性フラボノイドの吸収におけるリンパ輸送の寄与、日本農芸化学会2008年度大会、2008年3月27日、愛知県名古屋市(名城大学)
- ⑦ Judith Storch et al., Lipid transport in the intestine, 4th International Conference on Food Factors (ICoFF2007), 2007年11月29日、京都(国立京都国際会館)
- ⑧ Kaeko Murota et al., Lymphatic transport of isoflavone genistein in thoracic lymph-cannulated rats, 3rd International Conference on Polyphenols and Health, 2007年11月26日、京都(国立京都国際会館)
- ⑨ 神崎範之ら、小腸でのアポタンパク質の生成におけるPPARαの役割に関する検討、第28回日本肥満学会、2007年10月19日、東京(都市センターホール)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

室田 佳恵子 (MUROTA KAEKO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号：40294681

(2) 研究協力者

海外研究協力者

Judith Storch (米国)
Rutgers University, Department of Nutritional Sciences, Professor

Sabina Passaomonti (イタリア)
University of Trieste, Department of Biochemistry, Biophysics, and Macromolecular Chemistry, Assistant Professor

Siegfried Wollfram (ドイツ)
Christian-Albrechts-University of Kiel, Institute of Animal Nutrition and Physiology, Professor

Rainer Cermak (ドイツ)
University of Leipzig, Institute of Veterinary Physiology, Professor