

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05863

研究課題名(和文)植物性食品に見出された植物型セラミド1-リン酸の消化吸収と生理作用の解析

研究課題名(英文) Digestion, absorption and biological activity of phytoceramide 1-phosphate in vegetables.

研究代表者

田中 保 (TANAKA, Tamotsu)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・教授

研究者番号：90258301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物スフィンゴ脂質のグリコシルイノシトールホスホセラミド(GIPC)およびGIPCのDポジションの加水分解によって生じるファイト型セラミド1-リン酸(PC1P)について、単離法と定量法を開発した。また、これらの物理化学的安定性と消化性について調べた。PC1Pは通常のクロロホルム/メタノール/水系の二層分配で抽出され、GIPCは短鎖アルコールに水を加えた溶媒で抽出された。単離されたGIPCとPC1Pはリンモリブデン法で定量可能であった。GIPCは熱および酸に対し、不安定であった。GIPCに豚膵臓粉末を作用させても変化しなかったが、PC1Pは小腸のアルカリホスファターゼで消化を受けることが解った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スフィンゴ脂質は細胞膜成分であるだけでなく、ホルモン様物質の産生源や皮膚バリアの主成分として、重要な機能を担っている。体内のスフィンゴ脂質の生合成や分解が障害されると、神経や皮膚の健全性が損なわれる。また、老化に伴うスフィンゴ脂質産生量の低下は神経や皮膚のバリア機能の低下と関連する可能性がある。このような場合、食物中のスフィンゴ脂質で体内のスフィンゴ脂質産生の低下を補うことが考えられるが、食事性スフィンゴ脂質の消化吸収については十分な知見がない。本研究では植物スフィンゴ脂質のGIPCとPC1Pについて、その栄養価値を調べる目的で、抽出や分析方法を確立し、その消化性について調べた。

研究成果の概要(英文)：Glycosylinositol phosphoceramide (GIPC) and phytoceramide 1-phosphate (PC1P) are plant sphingolipids. We investigated isolation, physicochemical stability, quantification, structural analysis and digestibility of these phytosphingolipids. The PC1P was extractable with two-phase separation system of chloroform / methanol / water. On the other hand, GIPC was extractable with alcohol / water mixture. The isolated GIPC and PC1P were structurally confirmed by MALDI TOF MS and quantified by the phosphomolybdenum method. The GIPC was unstable to heat (125 °C) and acid (1 M HCl), and not hydrolyzed by the treatment of porcine pancreas enzymes. The PC1P was stable to heat and acid, but found to be hydrolyzed by alkaline phosphatase derived from the small intestine.

研究分野：脂質生化学

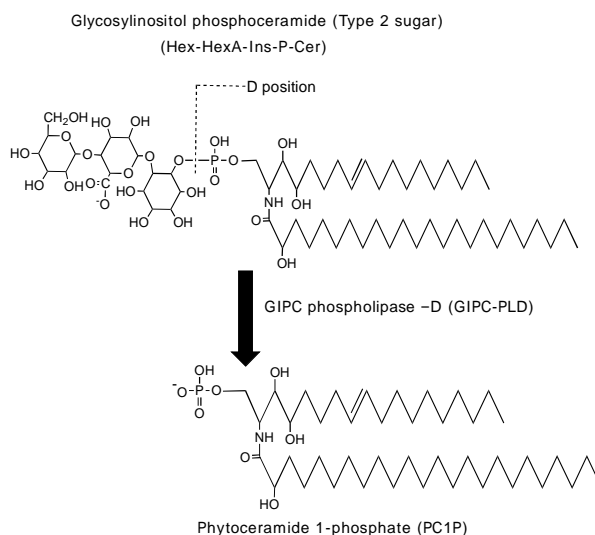
キーワード：スフィンゴ脂質 植物脂質 食事性脂質 消化吸収

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ脂質はグリセロ脂質と並び、真核生物に普遍的に見られる脂質である。植物では、グリコシルイノシトールホスホセラミド(GIPC)、グリコシルセラミドおよびセラミドが主なスフィンゴ脂質である。研究代表者はキャベツ脂質に含まれる活性脂質を調べる過程で、未同定リン脂質を見出し、これをファイト型セラミド 1-リン酸(PC1P)と構造決定した[1]。その後、PC1P は植物組織をホモジナイズすることで生じること、植物における最も豊富なスフィンゴ脂質の GIPC の D ポジションの加水分解により生じること、特にアブラナ科植物の若い葉や根はこの酵素活性が高く、キャベツやダイコンなど生野菜の調理や咀嚼の過程で GIPC から PC1P が生成することがわかった[2]。

スフィンゴ脂質の消化はスフィンゴミエリンやグリコシルセラミドについて調べられており、前者ではスフィンゴミエリナーゼで、後者では、グルコシダーゼによってセラミドに分解された後、セラミダーゼによって、遊離脂肪酸とスフィンゴイド塩基に分解され、小腸から吸収されると報告されている。一方、野菜に含まれる GIPC や PC1P については、その消化性不明のままである(図1)。

図1 GIPC 特異的ホスホリパーゼ D によって生じる PC1P



2. 研究の目的

GIPC はその構造決定[3]から既に 60 年以上を経ており、量的にも豊富な植物脂質であるにもかかわらず、あまり解析が進んでいない。これは、GIPC の単離が難しいこと、標品が市販されていないこと、定量法が開発されていないこと、物理化学的性質が不明なことなどがその要因と思われる。そこで、本研究では、PC1P および GIPC の単離法と定量法を開発し、その物理化学的性質を調べると共に、その栄養的価値を知るために、消化性について調べることとした。

3. 研究の方法

(1) GIPC の抽出・定量・構造解析

GIPC は Markham らの報告した [2-プロパノール:ヘキサン:水=55:20:25 (v/v/v)] の下層 (solvent A) を用いる抽出法 [4] を用い、キャベツ葉あるいはダイコン根より、GIPC を抽出した。まず、脂質分解酵素を不活性化するために 5 分間材料を煮沸した。その後、材料と等量の solvent A を加えてホモジナイズを行った。得られたホモジネートの遠心上清を減圧留去し、残渣に適量の [40%メチルアミン:エタノール=1:1 (v/v)] を加え、1 時間、50 で加熱することでアルカリ加水分解を行った。溶媒を減圧留去した後、solvent A を溶媒とするセファデックスカラムクロマトグラフィーを行い、GIPC 溶出画分を集めた。これより、TLC にて GIPC を単離した。得られた GIPC はリンモリブデンマラカイトグリーン法により比色定量した。また精製した GIPC は、MALDI-TOF MS による解析で構造を確認した。

(2) PC1P の抽出・定量・構造解析

キャベツ葉あるいはダイコン根より、Bligh & Dyer 法により脂質を抽出した後、0.1N KOH (95%メタノール溶液) に溶解し、アルカリ加水分解を行った。酸性条件下の Bligh & Dyer 法で脂質を回収し、抽出した脂質の TLC を行い、PC1P を単離した。得られた PC1P はリンモリブデンマラカイトグリーン法により比色定量し、Phos-tag を用いる MALDI-TOF MS によりその構造を確認した。

(3) GIPC および PC1P の消化性

PC1P のホスファターゼによる消化性は市販酵素のウシ小腸ホスファターゼを用いて調べた。PC1P より生成するファイトセラミドを TLC 上で蛍光試薬のプリムリンで検出し、その発色強度をイメージ J で数値化した後、既知量の標準品ファイトセラミドの発色強度と比較することで

定量した。GIPC を市販の豚膵臓パンクレアチンと反応させた。反応混合物の TLC を行い、GIPC の減少の有無、および、分解物と思われるバンドの有無を TLC 上で調べた。

4. 研究成果

(1) GIPC および PC1P の単離方法

単離した GIPC および PC1P の各種有機溶媒および水への溶解性を調べた結果、GIPC は水に溶けるが、クロロホルムやアルコールに溶けず、アルコールに水を加えた混合溶媒に溶けることがわかった。また、イソプロパノール/水に少量のヘキサンを加えた Solvent A [4]は GIPC をよく溶かすことがわかった。Solvent A は GIPC のセファデックスカラムクロマトグラフィーにおいても GIPC を溶出させる溶媒として有効であった。詳細な条件を整え、

Solvent A を用いた抽出、セファデックスカラムクロマトグラフィーおよび TLC を用いた GIPC の単離手法を確立した [5]。一方、PC1P は通常のリン脂質抽出法の Bligh and Dyer 法が利用できることがわかり、TLC によって精製できた。我々の確立した植物素材からの単離法では共に、50~70%の収率で高い純度の GIPC および PC1P が単離できた [5] (図 2)。

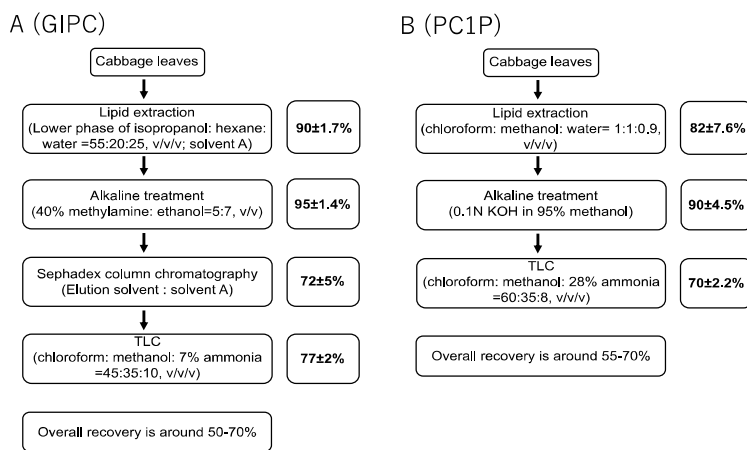


図 2 A:GIPC の単離方法と収率 B:PC1P の単離方法と収率

(2) GIPC および PC1P の安定性

GIPC および PC1P の温度安定性を調べた結果、PC1P は 125℃、60 分の処理で 20%程度分解すること、アルカリ溶媒の 40%メチルアミンの処理では安定であるが、1M HCl の 30 分処理で 10%程度が分解することがわかった。一方、PC1P はこれらの処理に安定であった。このことから、GIPC の糖鎖部分が熱および酸への不安定要因になっていることが推測された [5]。

(3) GIPC および PC1P の定量方法

リン脂質の定量方法として、リン・モリブデン複合体の青色を利用した発色法がある。この方法は過塩素酸を加えて加熱することで、リン脂質から無機リンを遊離させた後に、モリブデンを加えるが、GIPC や PC1P に対してもこの方法が適用できることが確認できた [5]。

(4) GIPC および PC1P の MALDI-TOF MS による構造解析

GIPC および PC1P の標品は市販されていないために、TLC 上で単離されても、どのバンドが目的脂質なのかかわからない。目的物質の特定には構造の確認が必要になる。GIPC は陰イオン検出モードを用いて、PC1P は Phos-tag と複合体を形成させた後の陽イオン検出モードで、MALDI TOF MS で検出可能であることが確認された。この方法により 2 糖タイプだけでなく 3 糖タイプの GIPC の単離・確認もできるようになった。

(5) GIPC および PC1P の消化性

GIPC に市販のパンクレアチン (豚膵臓消化酵素粉末) を作用させたが、GIPC は減少せず、消化された形跡を認めることはなかった。一方、PC1P にウシ小腸アルカリホスファターゼを作用させたところ、PC1P のリン酸が加水分解され、セラミドへと変換された。この反応は胆汁酸の一種のデオキシコール酸の添加で 3 倍に活性化されることが明らかになった。この反応をグリセロ型リン酸モノエステル型脂質であるホスファチジン酸 (PA) と比較すると、ウシ小腸アルカリホスファターゼの PC1P および PA に対する K_m はそれぞれ、15.5 μM および 16.1 μM で、両者間に殆ど差はなかった。また、 V_{max} は、それぞれ、5.7 および 7.4 $\text{nmol}/\text{sec}/\text{mg protein}$ であった。デオキシコール酸を加えた場合はそれぞれ、 V_{max} が 4 倍および 6 倍に上昇し、加水分解効率が高くなることがわかった。

【参考文献】

1. T. Tanaka, T. Kida, H. Imai, J. Morishige, R. Yamashita, H. Matsuoaka, S. Uozumi, K. Satouchi, M. Nagano and A. Tokumura: Identification of a sphingolipid-specific phospholipase D activity associated with the generation of phytoceramide-1-phosphate in cabbage leaves. *FEBS J.*, 280, 3797-3809 (2013)

2. T. Kida, A. Itoh, A. Kimura, H. Matsuoka, H. Imai, K. Kogure, A. Tokumura and T. Tanaka. Distribution of glycosylinositol phosphoceramide-specific phospholipase D activity in plants. *J. Biochem.*, 161, 187-195 (2017) doi:10.1093/jb/mvw060
3. H.E. Carter, R.H. Gigg, J.H. Law, T. Nakayama, and E. Weber
Biochemistry of the sphingolipides. XI. Structure of phytoglycolipide.
J. Biol. Chem., 233(1958) 1309-1314. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)49332-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)49332-5)
4. J.E. Markham, J. Li, E.B. Cahoon, J.G. Jaworski, Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 22684-22694.
5. R. Yesmin Hasi, D. Majima, K. Morito, H. Ali, K. Kogure, M. Nanjundan, J. Hayashi, R. Kawakami, K. Kanemaru, T. Tanaka. Isolation of glycosylinositol phosphoceramide and phytoceramide 1-phosphate in plants and their chemical stabilities. *J. Chromatogr.B*, 1152 (2020) 122213, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122213>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hasi Rumana Yesmin, Majima Dai, Morito Katsuya, Ali Hanif, Kogure Kentaro, Nanjundan Meera, Hayashi Junji, Kawakami Ryushi, Kanemaru Kaori, Tanaka Tamotsu	4. 巻 1152
2. 論文標題 Isolation of glycosylinositol phosphoceramide and phytoceramide 1-phosphate in plants and their chemical stabilities	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography B	6. 最初と最後の頁 122213 ~ 122213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jchromb.2020.122213	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ali Hanif, Yamashita Ryouhei, Morishige Jun ichi, Morito Katsuya, Kakiuchi Naoya, Hayashi Junji, Aihara Mutsumi, Kawakami Ryushi, Tsuchiya Koichiro, Tanaka Tamotsu	4. 巻 56
2. 論文標題 Mass Spectrometric Analysis of Sphingomyelin with N Hydroxy Fatty Acyl Residue in Mouse Tissues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lipids	6. 最初と最後の頁 181 ~ 188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lipd.12285	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Rumana Yesmin Hasi, Makoto Miyagi, Katsuya Morito, Toshiki Ishikawa, Maki Kawai-Yamada, Hiroyuki Imai, Tatsuya Fukuta Kentaro Kogure Kaori Kanemaru, Junji Hayashi, Ryushi Kawakami and Tamotsu Tanaka	4. 巻 166
2. 論文標題 Glycosylinositol phosphoceramide-specific phospholipase D activity catalyzes transphosphatidylolation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Biochem.	6. 最初と最後の頁 441-448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Rumana Yesmin Hasi, Makoto Miyagi, Takashi Kida, Tatsuya Fukuta, Kentaro Kogure, Tamotsu Tanaka	4. 巻 65
2. 論文標題 Quantitative analysis of glycosylinositol phosphoceramide and phytoceramide 1-phosphate in vegetables	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J.Nuti.Sci.Vitaminol.	6. 最初と最後の頁 S1-S5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Rumana Yesmin Hasi, Dai Majima, Katsuya Morito, Hanif Ali, Kentaro Kogure, Junji Hayashi, Ryushi Kawakami, Kaori Kanemaru, Meera Nanjundan, Toshiki Ishikawa, Hiroyuki, Imai and Tamotsu Tanaka
2. 発表標題 Development of methods for isolation of glycosylinositol phosphoceramide and phytoceramide 1-phosphate from plant tissues.
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Rumana Yesmin Hasi, Dai Majima, Katsuya Morito, Hanif Ali, Kentaro Kogure, Junji Hayashi, Ryushi Kawakami, Kaori Kanemaru, Meera Nanjundan and Tamotsu Tanaka
2. 発表標題 Methods for isolation of glycosylinositol phosphoceramide and phytoceramide 1-phosphate from plant tissues.
3. 学会等名 第93回日本生化学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Rumana Yesmin Hasi, Yoshimichi Takai, Hanif Ali, Kentaro Kogure, Junji Hayashi, Ryushi Kawakami, Mutsumi Aihara, Kaori Kanemaru and Tamotsu Tanaka
2. 発表標題 Isolation of glycosylinositol phosphoceramide and phytoceramide 1-phosphate from cabbage leaves and their chemical stabilities
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度中四国支部大会（第57回講演会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森戸克弥、島田明菜、宮崎徹、清水量多、高橋尚子、東桃代、下澤伸行、福田達也、小暮健太郎、田中保
2. 発表標題 ヒト血漿の主要なセラミド及びセラミド1-リン酸分子種の動物細胞への取り込みと作用
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井博之、田中保、石川寿樹、川合真紀
2. 発表標題 LC-MS/MSによるフィトセラミド1-リン酸分子種の定量解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中保、森戸克弥、Rumana Yesmin Hasi、林順司、川上竜巳、金丸芳、若山睦、近藤千恵子、福田達也、小暮健太郎
2. 発表標題 食品素材に含まれるセラミドの簡便な定量方法
3. 学会等名 日本脂質栄養学会第28回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中保、Rumana Yesmin Hasi ¹ 、森戸克弥、小暮健太郎、林順司、川上竜巳、金丸芳、今井博行、石川寿樹
2. 発表標題 グリコシルイノシトール ホスホセラミドの単離法の開発
3. 学会等名 第12回セラミド研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rumana Yesmin Hasi, Naohiro Imura, Toshiki Ishikawa, Hiroyuki Imai, Yoshimichi Takai, Hanif Ali, Mutsumi Aihara, Junji Hayashi, Ryushi Kawakami, Kaori Kanemaru, Tamotsu Tanaka
2. 発表標題 Production of phytoceramide 1- phosphate and inositol glycan by glycosylinositol phosphoceramide specific phospholipase D activity in plants
3. 学会等名 第63回日本生化学 中国・四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rumana Yesmin Hasi, Naohiro Imura, Toshiki Ishikawa, Hiroyuki Imai, Yashimichi Takai, Hanif Ali, Mutsumi Aihara, Junji Hayashi, Ryushi Kawakami, Kaori Kanemaru, and Tamotsu Tanaka
2. 発表標題 Production of phytoceramide 1-phosphate and inositol glycan by glycosylinositol phosphoceramide specific phospholipase D in plants
3. 学会等名 第94回日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中保
2. 発表標題 植物スフィンゴ脂質およびその代謝酵素の産業的利用
3. 学会等名 2021年度 第3回 脂質駆動学術産業創生研究部会講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 セラミドの製造方法	発明者 田中保 高井誠道	権利者 徳島大学
産業財産権の種類、番号 特許、2021-144229	出願年 2021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
---------	---------