

機関番号：34419

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009年度～2010年度

課題番号：21780127

研究課題名（和文）モノアシルグリセロールの腸管における吸収代謝動態の解明

研究課題名（英文） Estimation of the absorption and metabolic mechanism of monoacylglycerols in the small intestine

研究代表者

室田 佳恵子 (MUROTA KAEKO)

近畿大学・理工学部・講師

研究者番号：40294681

研究成果の概要（和文）：

食事性脂質の消化産物の小腸細胞における動態を明らかにするため、細胞質輸送体の一つである脂肪酸結合タンパク質に対するモノアシルグリセロール（MG）および脂肪酸の結合を評価した。その結果脂肪酸の炭素鎖長が重要であることが確認されたが、MGについては競合性が弱く結合性の特徴は明確でなかった。加えて、脂肪酸輸送担体の一つであるCD36を発現させた小腸モデル培養細胞株を樹立し、実験動物においては異なる脂質を投与したときのリンパ液における脂質構成を評価することが可能となった。

研究成果の概要（英文）：

In this study, *in vitro* binding assay, cell culture study, and *in vivo* rat study were performed. In *in vitro* study, the binding abilities of monoacylglycerols (MGs) and free fatty acids to intestinal fatty-acid binding proteins (FABPs) were examined. The result has indicated that the carbon chain length of free fatty acids is a key factor to determine the binding ability, whereas MGs' binding was not clear. In the cell culture study, the stable Caco-2 cell line expressing CD36 membrane protein was established. Furthermore, the lymphatic transport of various dietary lipids was estimated using thoracic-lymph cannulated rats.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：食品科学

キーワード：

## 1. 研究開始当初の背景

食事性の脂質は主に長鎖脂肪酸のトリグリセリド (TG) からなるが、これらは消化管

内で胃リパーゼや膵リパーゼによる加水分解を受けた後、消化産物である長鎖脂肪酸とグリセロール骨格の2位に長鎖脂肪酸が結合したモノアシルグリセロール (2-MG) とし

て小腸で吸収される。一般的な油脂の吸収過程にみられる腸管細胞内での TG 再構成は、小腸管腔より吸収された長鎖脂肪酸と 2-MG が細胞内でモノアシルグリセロール-アシルトランスフェラーゼ (MGAT) によりジアシルグリセロールへと変換されることにより開始される。このとき 2-MG が存在しなければ、グルコースからグルコース-6-リン酸を経て生じるグリセロール-3-リン酸を利用するグリセロリン酸経路を利用した TG の合成が行われるが、本来この経路の TG 再構成への寄与は小さい。近年では健康効果を期待したさまざまな機能性油脂が市場に出回っているが、それらはいずれも長鎖脂肪酸を結合した 2-MG を腸管細胞内に存在させないことを意図して製品化されたものである。すなわち、長鎖脂肪酸結合 2-MG が存在しなければ、食事より脂質を摂取しても小腸吸収上皮細胞 (腸管細胞) 内で TG に再構成されにくく、体内で貯蔵されるよりむしろエネルギーに変換されやすい構造特性を持つ。すなわち、2-MG は食事由来脂質の吸収を制御する上で鍵となる分子である。

TG の 3 分の 1 は 2-MG として吸収されているが、内因性外因性のリン脂質においても、小腸におけるさまざまなフォスホオリパーゼの作用の結果、一部が MG (この場合 1-MG の確率が高い) へと変換される可能性があり、消化吸收過程の最後には MG の形で腸管内に存在し得る。MG には界面活性作用があるため、胆汁酸塩と協調して他の脂溶性分子の水溶性を高め腸管における吸収性の向上にも寄与している。

さらに、近年シグナル分子としての脂質 (脂質メディエーター) について多くの研究成果が報告されているが、2-MG についても内因性カンナビノイドとしての作用が注目されている。生体には MG を分解する酵素であるモノアシルグリセロールリパーゼ (MGL) が発現しており、MGL ノックアウトマウスを用いた研究から、MGL が MG の量を制御してそのシグナル機能を調節している可能性がある。

このように、MG は多方面から非常に興味深い分子であるが、その吸収機構などについての研究はほとんど見られない。申請者は海外研究協力者である Professor Judith Storch (Rutgers University, 米国) と共同で脂肪酸と 2-MG の腸管細胞における吸収機構について研究を行っており、これまでに 2-MG の吸収に関与する膜タンパク質が存在すること、そのタンパク質は長鎖脂肪酸の輸送担体と共通である可能性が高いことを明らかにした (K. Murota and J. Storch, *J. Nutr.* (2005) 135: 1626-1630)。また、脂質が細胞内代謝を受ける過程では、細胞質液中で脂質を輸送するタンパク質が必要である。

腸管細胞には細胞質に種々の脂質結合タンパクが存在するが、そのうち遊離脂肪酸を結合するものとして I-FABP と L-FABP が知られている。I-FABP は遊離脂肪酸のみを結合することが知られているが、L-FABP は基質特異性が低く、MG が結合し得ることがこれまでに報告されている (J. Storch, *Mol Cell Biochem.* (1993) 123: 45-53)。しかしその結合については検討があまり進んでいない。以上のように、MG の腸管吸収に重要な役割を果たしていると考えられる細胞膜上および細胞質における輸送担体は、その存在が示唆されるものの同定には至っていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、MG の小腸における吸収代謝動態を明らかにすることである。主要な脂質消化産物である脂肪酸は腸管細胞に取り込まれる際一部は細胞膜上のタンパク質を介すること、さらに細胞に入れば細胞質に存在するタンパク質に結合して輸送されることがわかっている。MG においても同様の経路が存在すると考えられることから、吸収機構の詳細を明らかにするために、細胞膜および細胞質輸送担体を同定することが重要である。

また、腸管細胞に取り込まれた後、脂肪酸と MG は TG へと再構成されカイロミクロンの形でリンパ液に入る。そこで、摂取した脂肪酸や MG の種類により、カイロミクロン合成にいたる細胞内代謝がどのように変動するのかについて、培養細胞や実験動物を用いて明らかにすることも合わせて目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) MG 蛍光アナログの調製とそれを用いたタンパク質との結合実験

腸管細胞の細胞質に存在する遊離脂肪酸結合タンパク質である I-FABP と L-FABP に対する脂肪酸および 2-MG の結合性評価を行った。本研究では脂肪酸蛍光アナログを用いた競合アッセイを用いた。蛍光アナログとしては、汎用されている BOCIPY FL C16 および *cis-parinaric acid* (CPA) を使い、FABP との結合によって得られる蛍光の強度が脂質の添加により軽減されるかどうか (クエンチング) を比較した。FABP タンパク質については Prof. J. Storch (Rutgers Univ.) から提供されたものを用いた。

結合性を評価する脂質消化産物としては、遊離脂肪酸のうち、オレイン酸 (C18:1)、カプリン酸 (C10:0)、アラキドン酸 (C20:4) を、MG として上記脂肪酸を 1 位あるいは 2 位に有するものを用いた。モノオレインにつ

いては市販されているが、他の2脂肪酸分子種については、研究協力者である渡辺嘉博士（大阪市立工業研究所）が合成したものをを用いた。

## (2) CD36 発現 Caco-2 細胞株の樹立

ヒト腸管細胞の培養モデルとして汎用されている Caco-2 細胞は、結腸がん由来であることから正常細胞と比較してさまざまな違いがみられる。本研究では、正常細胞に発現している脂肪酸の膜輸送担体の一つである CD36 遺伝子を導入した安定株を樹立した。株樹立は研究協力者である高橋信之助教（京都大学大学院農学研究科）によって行われた。得られた安定株を導入前の Caco-2 と比較した。

## (3) 実験動物を用いた脂質の腸管吸収とリンパ輸送の評価

Wistar/ST ラット（雄性）を用いて胸管リンパ管（腸管リンパが集合し血液へ流入する部位）にカニューレを施した。このリンパカニューレラットの胃あるいは十二指腸に脂質投与用チューブを留置し、術後一晩回復させた。遊離脂肪酸、長鎖脂肪酸トリグリセリド、中鎖脂肪酸トリグリセリド、リン脂質を乳化して投与した後、リンパへのカイロミクロンの流入量や脂肪酸組成を比較した。

## 4. 研究成果

### (1) MG に対する細胞膜および細胞質輸送担体の探索

これまでの研究（Murota and Storch 2005）により、MG の膜輸送担体は脂肪酸輸送担体と共通であることが予想される。また、細胞質においては L-FABP が MG を結合することを強く示唆する報告（Storch 1993）がなされているが、その結合様式の詳細や、1-MG、2-MG といった異性体に対する結合力の差など、明らかにされていないことも多い。そこで、本研究ではこれら MG の腸管吸収に関わると考えられている分子との相互作用の詳細を明らかにすることを目指した。

これまでに細胞への MG 取り込み動態を解析するために用いたヒト結腸がん由来 Caco-2 細胞には、脂肪酸の膜輸送担体として、FATP4 および FABPm が発現しているとの報告がある。そこで当初は FATP4 に対する RNAi を用いた発現抑制を試みた。しかし、Caco-2 細胞への siRNA の導入が成功せず、現時点はアッセイ可能な細胞は得られていない。そこで、研究協力者である高橋信之助

教（京都大学）とともに、ベクター導入による遺伝子導入安定株の樹立を行った。最初に導入する遺伝子として、脂肪酸輸送担体の一つであり、Caco-2 細胞に発現していないことが知られる CD36 を発現させた。CD36 は腸管細胞においてカイロミクロン合成にも寄与する可能性が指摘されている。その結果、GFP を共発現させることで CD36 が細胞膜に局在していることを確認し、安定株の樹立に成功した。できたことにより、今後引き続き、この安定株と導入前の Caco-2 細胞における脂肪酸の取り込み速度やカイロミクロン合成能について評価を行い、MG の細胞取り込みにおける CD36 の寄与を評価する予定である。

次に、細胞質輸送タンパク質との結合実験を行った。I-FABP と L-FABP における MG の結合については、Prof. J. Storch (Rutgers Univ.) による報告以後検討があまり進んでいない。その原因の一つは、過去の研究において結合基質として利用していた蛍光アナログが既に入手不可能となってしまったことにある。そこで本研究では、FABP に結合することがわかっている脂肪酸の蛍光アナログに対する競合アッセイを用い、蛍光発光のクエンチングを指標とした結合評価を行った。はじめに、脂肪酸の蛍光アナログとして汎用されている BODIPY FL C16 を用い、本基質に対する競合アッセイを行った。その結果、脂肪酸の中ではオレイン酸 (C18:1) の結合能が最も高く、アラキドン酸 (C20:4) ではそれに準ずる強さが観察された。一方で、炭素鎖の短いカプリン酸 (C10:0) は L-FABP には殆ど結合しなかった。さらに MG について検討したところ、競合による蛍光クエンチングが観察されなかったが、オレイン酸とアラキドン酸の MG においてはむしろ蛍光が増強する傾向がみられた。これは、L-FABP における脂肪酸結合部位の性質が影響したものと考えられた。L-FABP には遊離脂肪酸が2分子結合できるが、MG はそのうちの1つに（あるいは双方にまたがって）結合する可能性が高い。そのため、用いた蛍光アナログ (BODIPY FL C16) が分子サイズとして大き過ぎるために競合が示されなかったと考えられた。

そこで、次に cis-parinaric acid (CPA) を使用した評価系の確立を目指した。研究代表者が所属を異動したために BODIPY FL C16 使用時に用いた蛍光測定装置が利用できなくなったため、CPA については紫外可視分光光度計を併用してその結合評価を試みた。その結果、L-FABP および I-FABP に結合した CPA はオレイン酸と競合し置換されることがわかったが、MG については弱い活性が示唆されるものの明確ではなかった。使用する濃度等の検討、測定装置の手配、ならびに現

在研究協力者である渡辺嘉博士（大阪市工業研究所）らのグループで合成しているエーテル型 MG などを用いた再実験を行う必要がある。海外研究協力者である Prof. J. Storch (Rutgers Univ. 米国) のグループにより、オレイン酸含有 MG が L-FABP のどの部位に結合するかが最近示された（未発表データ）ため、今後、競合可能な分子種を明らかにすることで、結合性の詳細を明らかにすることが期待できる。

## (2) *in vivo*における脂質の腸管吸収代謝動態評価

実際の腸内において、腸管細胞内に九州された脂質がいかなる経路を経て代謝され体内へと運ばれるのかというイベントを明らかにするために、リンパカニキュレーションラットを用いた吸収実験を行った。遊離脂肪酸のみを投与した場合には、TG として投与した場合に比べて、2-MG が存在しないことによりリンパ液中に出現する TG 量が少ないことが示された。また、構成脂質が長鎖脂肪酸である TG (LCT) と中鎖脂肪酸である TG (MCT) を投与した場合には、LCT 投与時にリンパ中 TG が有意に多かった一方、MCT の構成脂肪酸である中鎖脂肪酸がリンパ液から検出され、リンパ液へ輸送されにくい中鎖脂肪酸も一部は TG の構成因子としてリンパ液への輸送されることが示された。さらに、含有脂肪酸比が類似した TG あるいはリン脂質を投与すると、いずれにおいてもリンパ液中にカイロミクロンが出現し、そのタイミング等に明確な違いはみられなかった。このことから、リン脂質として摂取した脂肪酸においてもカイロミクロン合成に利用されることが示された。このときの分子種解析は現時点では不十分であるが、今後の研究が進展することにより、リン脂質の栄養素としての価値が再評価される可能性がある。以上のように、食事性脂質の構成が変化することでリンパ液中に出現する TG 量やカイロミクロン量に影響がみられることが確認された。今後は、本研究期間内には実施できなかった MG のみの投与（動物投与に十分な量が確保できなかったため）を合わせて行うことで、MG の腸管吸収代謝動態を明らかにしていきたい。

## 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 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔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〕

なし（ホームページ作成を予定）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

室田 佳恵子 (MUROTA KAEKO)

近畿大学・理工学部・講師

研究者番号：40294681

### (2) 研究協力者

高橋 信之 (TAKAHASHI NOBUYUKI)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：50370135

渡辺 嘉 (WATANABE YOMI)

大阪市立工業研究所・研究員

研究者番号：60416310

海外研究協力者

Judith STORCH (米国)

Rutgers University, Department of Nutritional Sciences, Professor