

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660114

研究課題名(和文)脂質ラフトへの局在性がカロテノイドの機能を決定する

研究課題名(英文)Localization of carotenoids in lipid rafts determines their physiological functions

研究代表者

寺尾 純二(TERA0, Junji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：60093275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：カロテノイドの細胞内の存在位置と抗酸化機能発現の関係を知らるために、カロテノイドの脂質ラフトへの局在性を明らかにすることを目的とした。用いたカロテノイドはβ-カロテン、ルテイン、リコペンである。超遠心分離法ではいずれのカロテノイドともに繊維芽細胞脂質ラフト画分に分布したが、脂質ラフトに局在することを証明することはできなかった。極性アレン型カロテノイドであるフコチサンチンとネオキササンチンはβ-カロテンと同様に繊維芽細胞の一重項酸素酸化反応を抑制することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to demonstrate the localization of carotenoids in lipid rafts of cellular membranes in order to know the relationship between the cellular distribution of carotenoids and their in vivo antioxidant activity. The compounds used were β-carotene, lutein and lycopene. We found that all carotenoids distributed in the lipid raft fractions in the separation of fibroblast cells by ultracentrifugation method. However, we could not demonstrate that carotenoids are specifically localized in lipid rafts. Allene-type carotenoids, fucaxanthin and neoxanthin were found to suppress singlet oxygen-oxygenation of fibroblast cells as similarly to beta-carotene.

研究分野：農学

キーワード：カロテノイド 脂質ラフト 抗酸化作用 酸化ストレス 一重項酸素 β-カロテン ルテイン リコペン

1. 研究開始当初の背景

細胞膜は細胞外からの刺激を受容し、細胞内へ情報として伝達するための「場」である。1972年、均一なリン脂質二重層から成る流動モザイクモデルが Singer と Nicholson により細胞膜モデルとして提唱され現在に至っている。しかし近年、細胞膜上にはスフィンゴ脂質とコレステロールに富むマイクロドメインが形成されており、この領域(カベオラを含む広義での脂質ラフト)こそが、さまざまな情報伝達に関わる細胞膜上のプラットフォームであることが認識されるようになった。一方、ヒト体内には20種類ほどの食事由来カロテノイドが蓄積するが、臓器分布はカロテノイドの種類により大きく異なる。例えば、カロテンは皮膚、ルテインは網膜、リコペンが精巣に蓄積しやすい。細胞では、カロテノイドはその脂溶性のために細胞膜に主に分布すると考えられているが、各々のカロテノイド化合物の脂質ラフトへの局在性は不明である。われわれは一重項酸素消去に基づくカロテノイドの抗酸化活性評価の研究を展開し、皮膚光老化メカニズムに細胞膜コレステロールの過酸化反応が関与すること、皮膚に蓄積するカロテンは一重項酸素消去活性を発揮することにより皮膚光老化を抑えることをマウスモデル実験で実証した¹⁾²⁾。さらに、細胞膜コレステロールの過酸化反応が引き金となる脂質ラフトの変化が、細胞内情報伝達系を活性化して、シワ形成に関わるコラーゲン分解酵素群(MMPs)の遺伝子発現を誘導すると予想した³⁾。実際にMMPsの発現は脂質ラフトに局在するGタンパクの活性化を初発段階として、その下流であるMAPキナーゼ活性化およびAP-1転写因子の活性化を介することが知られている。したがって、脂質ラフトに局在する食品抗酸化物質は脂質ラフトを酸化ストレスから保護することにより、細胞内情報伝達を調節するとわれわれは着想した。この着想を実証するために、培養細胞の細胞膜上の脂質ラフトへのカロテノイドの局在性とそれらの抗酸化活性および情報伝達系への作用を解明したいと考えた。

2. 研究の目的

脂質ラフトとは、コレステロールとスフィンゴ脂質に富む細胞膜中のマイクロドメインであり、細胞外から細胞内への情報伝達のプラットフォームとして注目されている。脂溶性に富むカロテノイドは生体膜脂質二重層に分布することから、脂質ラフトへの局在性を介してその特性に影響を与えることにより、細胞内情報伝達を調節する可能性がある。生体内に蓄積する約20種類の食事由来カロテノイドは、各々の構造特性に基づいて脂質ラフトに局在し、さまざまな情報伝達系の最上流を調節するという「脂質ラフト仮説」をわれわれは提唱する。本研究はその仮説を実証することを目的として、代表的な食事由来カロテノイドである

カロテン、ルテイン、リコペンを選択し、マウス繊維芽細胞の細胞膜における脂質ラフトへの局在性と膜脂質過酸化反応抑制および下流の情報伝達系としてのMAPキナーゼ系への影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 各カロテノイドの脂質ラフトへの局在性を決定する。

膜フィルターを用いたリポソーム作製装置を用いて、一枚膜リポソームモデルを作成した。ラフトモデルはphosphatidylcholine (PC) およびcholesterol (Ch) で構成するが、非ラフトモデルはPCのみとする。両リポソーム懸濁液に各カロテノイドを添加し、一定時間反応後、超遠心分離法によりリポソーム膜を分離して、リポソーム膜に結合したカロテノイドをHPLCで定量した(Shirai et al⁴⁾)の方法に従ってリポソーム膜を作成した。

培養細胞としてマウス繊維芽細胞NIH-3T3を用い、各カロテノイドを添加して24時間培養した。培養後、細胞を超音波破碎して得たホモジネートからカロテノイドを抽出しHPLC分析した(Kotake-Nara et al⁵⁾)の方法に準じてカロテノイドを分析した。

において培養後の細胞を洗浄後、界面活性剤を用いて細胞溶解液を得た。さらに市販のOptiprepを用いた密度勾配超遠心法によりラフト画分と非ラフト画分を分離した。各々の画分からカロテノイドを抽出し、同様のHPLC分析に供した。各画分のカロテノイド濃度からラフトへの局在性を評価した(ラフトの分離手法はNakamura et al⁶⁾)の方法に従った。

において培養後の細胞をMethyl β -cyclodextrin(M β CD)処理によりラフト破壊させた後に、と同様にラフト画分および非ラフト画分を分離しカロテノイドを抽出・分析した。M β CD処理と非処理のカロテノイドの濃度変化からラフトへの局在性を確認した(M β CD処理の手法は既報⁷⁾)を参考にした)。

(2) 過酸化コレステロール(Ch-OOH)によるMAP-キナーゼ系の活性化に対するカロテノイドの影響を明らかにする。カロテノイドを添加したマウス繊維芽細胞NIH-3T3に過酸化コレステロールを添加し、1時間培養後のMAP-キナーゼ(JNK, ERK1/2およびP38)のリン酸化をWestern Blotで測定した。カロテノイド添加の有無による影響を評価した(実験手法はNakamura et al⁶⁾)を参考にした)。

(3) 青色発光ダイオード(LED)照射マウス繊維芽細胞の光増感酸化反応に対す

るカロテノイドの効果を明らかにする。PCとChで構成される多重層リポソームを作成し、同時にカロテンあるいは極性アレン型カロテノイドである fucoxanthin (FX), neoxanthin (NX) を添加した。このリポソームモデルを、4で光増感剤ヘマトポルフィリン (HP) とともに4時間青色LED照射することにより発生したPC-過酸化物 (PC-hydroperoxide) をTLCで定量した。マウス繊維芽細胞に上記のカロテノイドを添加後、同様にHP存在下で青色LED照射し、発生する活性酸素種を蛍光試薬DCFHで測定した。

得られた青色LED暴露細胞について、コラーゲン分解酵素MMP-9のタンパク質発現量をWestern Blotで測定した

4. 研究成果

(1) 一枚膜リポソームによるラフトモデルを作成して、各カロテノイドを添加し、各カロテノイドのリポソームへの取り込みを確認したところ、ルテインはPCとCholで構成される脂質ラフトモデル膜にとりこまれやすいことが示された。

(2) カロテノイドを添加して培養後の細胞を洗浄後、密度勾配遠心法によりラフト画分と非ラフト画分を分離した。その結果、ラフト画分に各カロテノイドが局在するパターンが得られたが、培養後の細胞をMβCDでラフト破壊させてもそのパターンに変化はみられなかった(図1)。

したがって、コレステロールに富む脂質ラフトにカロテノイドが局在することを証明することはできなかった。なお、マウス繊維芽細胞への取り込み量はカロテンが他のカロテノイドに比べて多いことが示された。

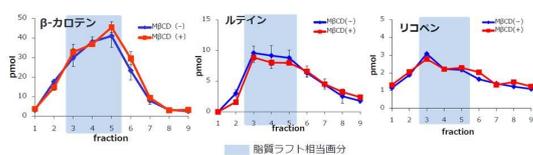


図-1 マウス繊維芽細胞におけるカロテノイドの細胞内分布

(3) コレステロール(Ch)あるいは過酸化コレステロール(Ch-OOH)を50μMで1時間処理したマウス繊維芽細胞について、MAPKリン酸化を検討したところ、Ch-OOH処理においてp-38のリン酸化が上昇する傾向が示された。これはp38-MAPKを介してMMP-9が活性化することを反映したものと考えられた。しかし、Ch-OOHによるp38リン酸化上昇をカロテンは抑制しなかった、したがって、カロテンの作用部位は細胞内情報伝達系のMAPK

以下の下流ではなく、その上流にあることが明らかになった。すなわち、カロテンの抗酸化活性(一重項酸素除去活性)による細胞膜の脂質ラフト中のCh酸化抑制が重要であることが確認された。

(4) カロテン、ルテイン、リコペンの脂質ラフトへの局在性を証明できなかったため、当初の研究目的には含まれなかったが、機能が最近注目されているアレン型カロテノイドであるFXとNXの抗酸化活性とMMP発現に対する作用を同じマウス繊維芽細胞を用いて検討することにした。青色発光LEDとHPを用いて一重項酸素を発生する光増感酸化反応(Type II)を惹起させると、DCFH法で測定される細胞の活性酸素生成量が増加した。カロテンと同様にFXあるいはNXの細胞への添加は活性酸素生成量増加を抑制したことから、抗酸化活性を發揮したことが明らかである(図2)。これはリポソーム系でも同じ結果が得られた。

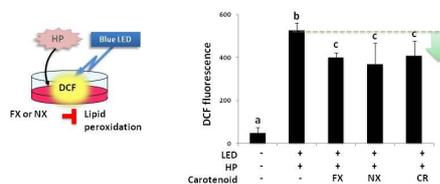


図-2 マウス繊維芽細胞のLED照射による活性酸素の生成とカロテノイドによる抑制 (CR:β-カロテン)

一方、FXおよびNXは、抗酸化活性とは無関係にそれ自身がMMP発現を増大させる傾向がみられた。これはカロテンとは異なる様相を示したものである。FX, NXのようなアレン型カロテノイドの機能性については未だ不明な点が多く残されていることから、さらに検討する必要があると考えられた。

結論として、今回の研究ではカロテノイドが細胞膜の脂質ラフトに局在することを証明することはできなかった。ここで用いた超遠心分離法ではなく、顕微鏡解析等の別手法を用いる必要があると思われ、証明は今後の課題として残された。

<引用文献>

- 1) Minami et al. *J. Nutr. Biochem.* 2009;20: 389-398.
- 2) Terao et al. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2011;48:57-62.
- 3) Nakamura et al. *Chem. Phys. Lipids* 2013;174: 17-23.
- 4) Shirai et al. *J. Agr. Food Chem.* 2001: 49:5602-5608
- 5) Kotake-Nara and Nagao, *Biosci. Biochem. Biotech.* 2012;76:875-82
- 6) Nakamura et al. *Chem. Phys. Lipids* 2013;174:17-23

7) Wisniewska and Subczynski *Free Radic. Biol. Med.* 2006;41:1257-1265

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2件)

Nakamura T, Noma A., Terao J. Location of α -tocopherol and α -tocotrienol to heterogeneous cell membranes and inhibition of production of peroxidized cholesterol in mouse fibroblasts. *SpringerPlus* 査読有 Vol. 3, 2014, 550

DOI: 10.1186/2193-1801-3-550

Terao J. Cholesterol hydroperoxides and their degradation mechanism. *Subcellular Biochemistry*. 査読有 Vol.77, 2014, 83-91.

DOI: 10.1007/928-94-007-7920-4_7

[学会発表](計3件)

Iwanaka A., Soga M., Kotake-Nara E., Nagao A., Mukai R., Takahashi A., Terao J. Effect of fucoxanthin and neoxanthin on blue light-emitting diode-irradiated photosensitized oxidation in liposomal membranes and mouse fibroblast cells. The 6th International Conference on Food Factors.

2015年11月24日、Seoul KOREA, Coex.

岩中麻美、曾我真美子、小竹(奈良)英一、長尾昭彦、寺尾純二 LED照射リポソーム膜モデルとマウス繊維芽細胞の光増感酸化反応に対するフコキサンチン・ネオキサンチンの作用解明 日本農芸化学会 2015年度中四国・西日本支部合同大会 2015年9月18日 愛媛大学 愛媛県・松山市

曾我真美子、野間絢子、中村俊之、長尾昭彦、小竹英一、寺尾純二 マウス繊維芽細胞におけるカロテン・ルテインの膜ドメイン局在性の解析 2014年度日本ビタミン学会大会 2014年6月13日兵庫県・姫路市 兵庫県立大学

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺尾 純二 (TERAO, JUNJI)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：60093275