

消化管の上皮細胞間経路を調節する食品成分に関する研究

鈴木 卓弥 (広島大学大学院 生物圏科学研究科)

takuya@hiroshima-u.ac.jp

消化管上皮における細胞間経路の選択的透過性は、カルシウム (Ca) などの栄養素の吸収に必須であるとともに、管腔内異物の侵入を防ぐバリア機能の観点からも極めて重要である。我々は、この細胞間経路の選択的透過性を担うタイトジャンクション (TJ) の機能を調節する食品成分を探索し、食品成分の新たな生理機能を解明するとともに、その作用を基盤とした機能性食品の創出を目指している。本稿では、上皮細胞間経路の Ca 吸収を高めて骨の健康に寄与する難消化性オリゴ糖、上皮細胞の透過性を抑制して生体防御能を増強するポリフェノールについて概説する。

はじめに

消化管上皮細胞を介する物質の輸送経路は、細胞内 (transcellular) および細胞間 (paracellular) 経路に大別される。細胞内経路は、細胞膜上の輸送体やチャンネルを介して栄養素の吸収に寄与する。一方、細胞間経路は、隣接する細胞同士の接着分子により選択的透過性が制御され、カルシウム (Ca) などのミネラル類吸収に役立つとともに、管腔内に大量に存在する腸内細菌や食事由来の抗原に対しては、体内に侵入させないバリア機能を示す (1, 図 1)。この選択的透過性を担う接着分子構造がタイトジャンクション (TJ) である。TJ は、上皮細胞側底膜の刷子縁膜近傍に局在する、巨大なタンパク質複合体であり、occludin や claudin などの膜貫通型タンパク質と ZO (zonula occludens) などの細胞内裏打ちタンパク質から構成される。つまり、これら TJ 構成タンパク質の発現や局在が上皮細胞間の複雑な選択的透過性を達成している。ゆえに、食品成分によりこの TJ 機能を調節することができれば、ある種の栄養素や機能性成分の生体利用性を高める、あるいは疾患の要因となる炎症性異物の体内への侵入を抑制することが可能となる。しかしながら、これまで TJ 機能と食品成分との関わりはあまり知られていなかった。そこで本研究は、この TJ 機能における食品成分の役割を探索しながら、それを利用した機能性食品の開発を目指すことに至った。

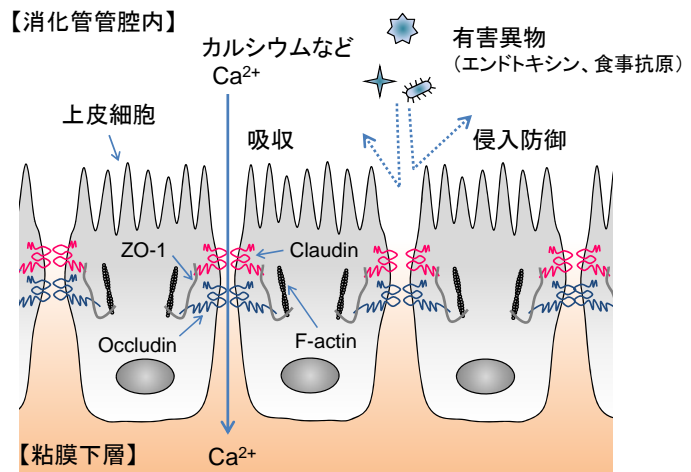


図 1. 消化管上皮の細胞間経路を調節するタイトジャンクション (TJ) 構造

消化管上皮を介した溶質やイオンの通過は、TJ構造により選択的に制御されている。カルシウムなどのミネラル類の一部は、細胞間経路を容易に通過するが、エンドトキシンなどの有害異物はほとんど通過できない。

難消化性オリゴ類による細胞間経路のカルシウム吸収促進作用

ダイフラクトースアンハイドライド III (DFAIII) は、フラクトース 2 分子が環状に結合したユニークな構造を持つ難消化性オリゴ糖である (図 2A)。DFAIII は、チコリなどに含まれるイヌリンを

フラクシルトランスフェラーゼ処理することにより調製される。我々は、この DFAIII が消化管における上皮細胞間経路の Ca 吸収を促進し、骨の健康に寄与することを見出した。

DFAIII をラットに摂食させると、小腸と大腸の両方で Ca 吸収を強く促進した (2, 3, 図 2B)。この DFAIII による Ca 吸収促進作用は、フラクトオリゴ糖やラフィノースよりも強かった。DFAIII による大腸での Ca 吸収促進作用は、腸内細菌による発酵産物の有機酸を介したものであり、発酵性の難消化性糖類に由来から知られている作用であった。一方、小腸では DFAIII は消化も吸収もされないことから、DFAIII そのものが消化管上皮細胞を刺激し、Ca 吸収を促進していることが示唆され、難消化性オリゴ糖に新たな機能が提案された。さらに、ラット小腸、およびヒト消化管上皮細胞 Caco-2 を用いた Ca 吸収試験により、DFAIII は上皮細胞に直接的に作用して、細胞内経路ではなく、細胞間経路の Ca 吸収を促進することが証明された (4, 5, 図 2C)。DFAIII による直接作用の分子メカニズムを特定するため、Caco-2 細胞において、TJ タンパク質とその局在に重要な細胞骨格アクチンを観察したところ、

DFAIII を作用させた細胞では、claudin-1 の局在変化、さらにアクチン細胞骨格の収縮変化が確認された (6)。

小括すると、DFAIII は小腸と大腸の両方で Ca 吸収を促進する。大腸での作用は、腸内細菌による発酵を介して発現するが、小腸では DFAIII が上皮細胞に直接作用するという、新たな作用機序で引き起こされる。DFAIII による直接作用の分子メカニズムとして、上皮細胞の TJ タンパク質 claudin-1 の局在と細胞骨格アクチンの収縮を変化させ、細胞間経路の Ca 吸収を促進していることが解明された。

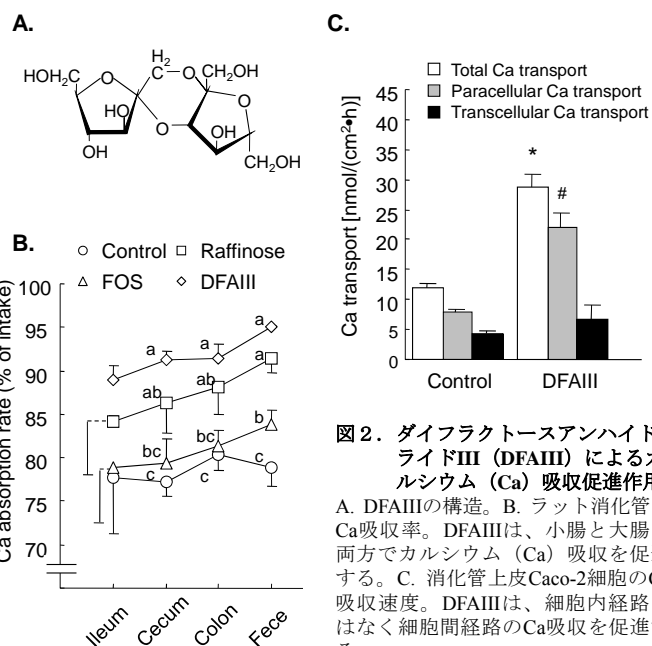


図 2. ダイフラクトースアンハイドライドIII (DFAIII) によるカルシウム (Ca) 吸収促進作用
A. DFAIIIの構造。B. ラット消化管のCa吸収率。DFAIIIは、小腸と大腸の両方でカルシウム (Ca) 吸収を促進する。C. 消化管上皮Caco-2細胞のCa吸収速度。DFAIIIは、細胞内経路ではなく細胞間経路のCa吸収を促進する。

ポリフェノール類による細胞間経路の透過性抑制作用

ポリフェノール類とは、分子内にフェノール性水酸基を複数もつ化合物の総称であり、植物の二次代謝物として植物界に広く分布し、野菜や果実、茶類などに含まれる。その種類は数千種類以上に及ぶと言われ、また近年、それらが持つ多様な生理機能が注目されている。我々は、ポリフェノール類、特にタマネギに多く含まれるケルセチン (図 3A) に、強い消化管バリア機能増強作用があることを見出し、その分子メカニズムを解明した。

ケルセチンをラットに摂食させると、小腸と大腸での細胞間透過マーカの透過速度が低下し、TJ バリア機能が高まった (7-11)。ケルセチンは、消化管上皮細胞 Caco-2 でも同様の作用を示し (図 3B)、そのバリア機能増強作用は、TJ タンパク質 ZO-2、occludin、claudin-1、claudin-4 の TJ への局在促進によることが示された (7, 9, 図 3C)。また、ケルセチンによる occludin の局在促進と occludin のリン酸化がほぼ同時に起こることが示され、MALDI-TOF 解析により、occludin のリン酸化部位として 403、404 番目のスレオニン (T403、T404) が新規に同定された (12)。さらに、これらリン

酸化の機能を解析したところ、T403、T404 をアラニンに変異した occludin 変異体は、TJ への局在が遅延した。これら結果から、T403 と T404 のリン酸化は、ケルセチンによる TJ バリア機能増強作用に重要な役割を持つことが示されたとともに、occludin 機能の新たな調節メカニズムが明らかとなった。また、シグナルブロッカー、キナーゼアッセイなどを組み合わせた実験により、ケルセチンによる一連の作用は、ケルセチンが上皮細胞内でプロテインキナーゼ C δ (PKC δ) 活性を直接的に抑制することにより発揮されることも示された (7, 9)。最後に、実験的大腸炎マウスを用いて、ケルセチンの病態軽減作用を評価した。大腸炎マウスは、大腸バリア機能の損傷と重篤な大腸炎を引き起こしたが、ケルセチンの摂取は、これら病態を部分的に軽減した。

小括すると、ポリフェノール類のケルセチンは、消化管上皮のバリア機能を増強する。この作用には、TJ タンパク質の局在やリン酸化の変化により引き起こされる。また、ケルセチンによる一連の作用は、PKC δ 活性の抑制により発現することが明らかとなった。よって、ケルセチンは消化管のバリア機能を保護・増強する新たな機能性食品への応用が期待できる。

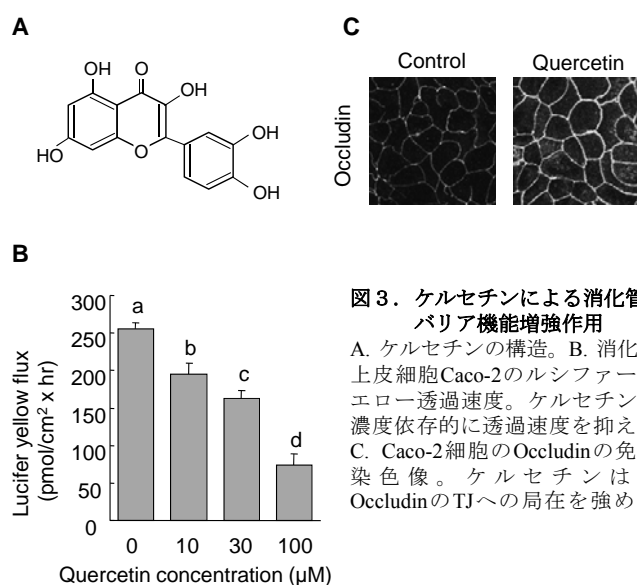


図3. ケルセチンによる消化管バリア機能増強作用
A. ケルセチンの構造。B. 消化管上皮細胞Caco-2のルシファーイエロー透過速度。ケルセチンは濃度依存的に透過速度を抑える。C. Caco-2細胞のOccludinの免疫染色像。ケルセチンは、OccludinのTJへの局在を強める。

おわりに

本研究は、消化管上皮細胞における栄養素の吸収、異物の侵入防御の役割を担う TJ 機能を調節する食品成分を見出し、その分子作用機序を明らかとした。DFAIII における成果は、既に産学連携事業による商品化に結実し、人々の健康維持に貢献している。ケルセチンについては、ヒト試験での評価も含め、具体的な実用化にはさらなる研究が必要である。今後も、科学的な視点を持ちながら、食品成分の新たな生理機能を探索するとともに、基礎研究を基盤とした機能性食品の創出に取り組んでいきたい。

謝辞

本研究を行うにあたり、北海道大学大学院農学研究科の原博教授には懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました。米国テネシー大学ヘルスサイエンスセンターの Radhakrishna K Rao 教授には、特に TJ 機能の解析法について、博士研究員として親切なご指導とご支援を頂きました。北海道大学、テネシー大学、広島大学でお世話になりました皆様、また本研究を推進するに当たりご協力を賜りましたすべての皆様に心より感謝申し上げます。

日本農学進歩賞の受賞にあたっては、広島大学大学院生物圏科学研究科から推薦を賜りました。谷口幸三研究科長をはじめ、関係の先生方に心より感謝申し上げます。

引用文献

- (1) Suzuki T (2012) Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci.* in press.
- (2) Suzuki T, Hara H, Kasai T, Tomita F. (1998) Effects of difructose anhydride III on calcium absorption in small and large intestines of rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 837-841.
- (3) Saito K, Hira T, Suzuki T, Hara H, Yokota A, Tomita F. Effects of DFA IV in rats: calcium absorption and metabolism of DFA IV by intestinal microorganisms. (1999) *Biosci Biotechnol Biochem* 63: 655-661.
- (4) Suzuki T, Hara H. (2004) Various non-digestible saccharides increase intracellular calcium ion concentration in rat small-intestinal enterocytes. *Br J Nutr.* 92: 751-755.
- (5) Suzuki T, Hara H. (2004) Various nondigestible saccharides open a paracellular calcium transport pathway with the induction of intracellular calcium signaling in human intestinal Caco-2 cells. *J Nutr* 134: 1935-1941.
- (6) Suzuki T, Hara H. (2006) Diffructose anhydride III and sodium caprate activate paracellular transport via different intracellular events in Caco-2 cells. *Life Sci* 79: 401-10.
- (7) Suzuki T, Hara H. (2009) Quercetin enhances intestinal barrier function through the assembly of zonula occludens-2, occludin, and claudin-1 and the expression of claudin-4 in Caco-2 cells. *J Nutr* 139: 965-974.
- (8) Suzuki T, Tanabe S, Hara H. (2010) Kaempferol enhances intestinal barrier function through the cytoskeletal association and expression of tight junction proteins in Caco-2 cells. *J Nutr* 141: 87-94.
- (9) Suzuki T, Hara H. (2011) Role of Flavonoids in intestinal tight junction regulation. *J Nutr Biochem* 22: 401-408.
- (10) Noda S, Tanabe S, Suzuki T. (2012) Differential effects of flavonoids on barrier integrity in human intestinal Caco-2 cells. *J Agric Food Chem* 60: 4628-4633.
- (11) Suzuki T. (2011) Regulation of intestinal barrier function by dietary flavonoids. In handbook on flavonoids: dietary sources, properties and health benefits. Nova Scientific Publishers, Inc. New York, 461-476.
- (12) Suzuki T, Elias BC, Seth A, Shen L, Turner JR, Giorgianni F, Desiderio D, Guntaka R, Rao R. (2009) PKC ϵ regulates occludin phosphorylation and epithelial tight junction integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 61-6.

Studies on regulation of intestinal paracellular pathways by food factors

Takuya Suzuki (Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University)

takuya@hiroshima-u.ac.jp