

助成番号 0847

古細菌膜脂質による脂溶性物質のヒト体内吸収促進作用

菅原 達也¹, 平田 孝¹, 左子 芳彦¹, 松原 主典²¹京都大学大学院農学研究科, ²広島大学大学院教育学研究科

概要 古細菌は生物誕生初期に生じたと考えられている生物群で、死海や火山など極めて過酷な環境に生育可能であることが知られている。本研究は、古細菌特有成分の新たな機能性を探索することを目的とし、高熱環境に生息する古細菌由来膜脂質のヒト体内への脂溶性物質吸収に与える影響を評価した。海底熱水噴出孔に生息する好熱性古細菌である *Aeropyrum camini* と *Aeropyrum pernix* K1 株の細胞膜画分から、クロロホルム-メタノールを用いて膜脂質を抽出した。脂質組成は二次元 TLC を用いて確認した。*Aeropyrum camini* 及び *Aeropyrum pernix* K1 株の膜脂質組成は、主成分はアーキチジルグルコシルイノシトール (AGI) とアーキチジルイノシトール (AI) であった。得られた古細菌由来膜脂質を用い、コレステロール、カロテノイド (アスタキサンチンとフコキサンチン)、コエンザイム Q₁₀ をミセル化して培地に可溶化した。12 穴プレート上で約 3 週間培養し、小腸上皮様に分化させたヒト大腸ガン由来 Caco-2 細胞と、正常ヒト皮膚細胞の三次元モデルである EPI-200 細胞に、これらのミセルを含んだ培地を添加した。24 時間培養後、細胞内に取り込まれたコレステロール、カロテノイド、コエンザイム Q₁₀ 量をそれぞれ定量し、対照としてリゾホスファチジルコリン (リゾ PC) を用いたミセルのものと比較した。Caco-2 細胞を用いた消化管吸収モデル実験で、古細菌由来膜脂質を用いたミセルは、リゾ PC を用いたものと比べ、小腸上皮細胞への脂溶性物質の吸収量を約 1.7~4.8 倍上昇させた。以上の結果から、好熱性古細菌 *Aeropyrum* 属膜脂質には、小腸上皮からの脂溶性物質吸収を促進する作用を有することが示唆された。

1. 研究目的

古細菌とは、1977 年に Woese らによって提案された新しい生物群で、真正細菌や真核細胞生物と共に、生物界の三つのドメインを構成している¹⁾。古細菌は、火山や深海など、生物が生息することは難しい極限環境から多くの種が単離されており、古細菌が有する極限環境への適応機構は、遺伝子資源として大いに期待されている。しかし、古細菌特有成分の利用に関する研究は一部に留まっている。古細菌には特有の形質がいくつか存在することが明らかとなっており、とくに細胞膜を構成する膜脂質の構造は、古細菌を特徴付けるものとして知られている。古細菌膜脂質は、他の生物群に属する生物の膜脂質と以下の三つの点で大きく異なっている。(1) 側鎖がグリセロール骨格とエーテル結合している。(2) 側鎖は、脂肪酸ではなくイソプレノイド鎖で構成されている。(3) 極性基がグリセロール骨格の *sn*-1 位に結合している。

近年、わが国では食生活の欧米化や生活の近代化にともない、糖尿病・高脂血症・高血圧の患者数も年々増加している。現代の日本における肥満は、運動不足によるエネルギー消費不足と共に、トリアシルグリセロールやコレステロールといった動物性脂肪の摂取過多が大きな原因と考えられている。そのため、動物性脂肪の消化管からの吸収を抑制する物質の探索が続けられている。一方、脂溶性物質の吸収を促進する物質の研究も進められており、脂溶性薬剤を経口摂取する際の担体としての応用も求められている。さらに、脂溶性物質の吸収を促進する物質は、脂溶性ビタミンやコエンザイム Q₁₀ などのサプリメントの担体として使用することも期待できる。したがって、脂溶性物質の吸収を制御する物質の探索は医学的、食品機能学的に重要であると考えられる。

本研究は、古細菌の新たな利用法を探索し、未利用資源の有効活用に結び付けることを目的とし、特徴的な構

造を持つ膜脂質に着目した。古細菌膜脂質の基本骨格は真核細胞生物膜脂質であるホスファチジルコリンと類似しているが、側鎖がグリセロール骨格とエーテル結合しているため、ホスホリパーゼ A₂ の作用を受けないことが予想される。さらに特徴的な極性基を有することも知られており、そのため小腸上皮表面と相互作用する可能性も考えられる。そこで本研究は、古細菌膜脂質が消化管からの脂溶性物質吸収に与える影響を評価した。

2. 研究方法

2.1 古細菌膜脂質の抽出と分析方法

Aeropyrum pernix または *Aeropyrum camini* 細胞膜画分 1 ml に対し、PBS 10 ml を加え、30 秒間超音波破砕した。得られたホモジネート 0.8 ml にクロロホルム-メタノール混液 (2 : 1) 3 ml を加え 20 秒間攪拌した。2,500 rpm (1350×g)、4°C で 10 分間遠心後下層を回収し、残った上層に再びクロロホルムを加え、同様の操作でさらに二度抽出した。回収した溶液を合わせて、エバポレーターを用いて溶媒を除去した。得られた総脂質を少量のクロロホルム-メタノール混液 (2 : 1) に溶解させて回収した後、窒素ガスを吹き付けて溶媒を除去し、総脂質重量を求めた。得られた脂質はクロロホルム-メタノール混液 (2 : 1) 3 ml に溶解させ、窒素ガス封入後、-30°C で保存した。

TLC 分析は Morii らの方法に若干の変更を加え行った²⁾。シリカゲル薄層プレート (25HPTLC Plates 10 × 10 silica gel 60, MERCK) に総脂質を供した後、クロロホルム-メタノール-7 M アンモニア水混液 (60 : 35 : 8) で一次展開し、さらにクロロホルム-メタノール-酢酸-水混液 (80 : 25 : 10 : 5) を用いて二次展開させた。展開後のプレートを硫酸銅発色試薬 (0.5% 硫酸銅水溶液 (w/v) 360 ml に 33% 酢酸水溶液 (v/v) 20 ml とリン酸 20 ml を加え、最後に硫酸 2 ml を穏やかに混合して調製) に浸し、乾燥後、ホットプレート上で加熱して、すべての脂質成分を検出した。また、Dragendorff's reagent spray solution (Merck) によりコリン残基、Molybdenum Blue Spray Reagent 1.3% (Sigma) によりリン残基、アンスロン試薬により糖残基、ニンヒドリンスプレー (和光純薬) によりアミノ基をそれぞれ検出した。

2.2 Caco-2 細胞を用いた評価³⁾

Caco-2 細胞は 10 cm ディッシュを用いて、10% FBS と 0.1 mmol/L 非必須アミノ酸、100 units/ml ペニシリンと

100 μg/ml ストレプトマイシンを含む DMEM 中で、5% CO₂、37°C を保ち培養した。継代操作は、80% コンフルエントに達した段階でトリプシン処理により行った。passage 48 ~ 70 の範囲の細胞を試験に用いた。12 穴プレート上に 2.0 × 10⁵ cells/well で細胞を播き、1~2 日おきに培地を交換して 21~24 日間培養することで分化させた。試験に用いる 24 時間前に培地を無血清の DMEM に変えた。

10 ml 共栓試験管に、メタノールに溶解させたタウロコール酸ナトリウム (終濃度 5 mM)、オレイン酸 (終濃度 500 μM)、1-モノオレイン (終濃度 300 μM) と脂溶性物質 (コレステロールやカロテノイド)、さらにリン脂質としてリゾ PC または古細菌膜脂質のクロロホルム-メタノール溶液を加えて混合した後、窒素ガスで溶媒を除去した。0.7% BSA を含む無血清 DMEM 培地を適量加え、Vortex ミキサーで攪拌しミセル化させた。

12 穴プレート上で分化させた Caco-2 細胞に対し、ミセル化した脂溶性物質を含む無血清培地 1 ml を添加した。37°C、5% CO₂ 条件下で一定時間培養後、培地を取り除き、10 mM タウロコール酸ナトリウムを含む PBS で細胞を洗浄した後、細胞を回収した。得られた細胞をホモジナイズし、クロロホルム-メタノール混液 (2 : 1) を用いて脂質を抽出した。コレステロールは、コレステロール E-テスト (Wako) を用い、カロテノイドは HPLC により濃度を測定した³⁾。なお、細胞中に取り込まれたコレステロールの濃度は、内因性コレステロール濃度を差し引くことによって求めた。

2.3 ヒト表皮三次元モデルを用いた評価

ヒト表皮三次元モデルである EPI-200 細胞は MatTek 社から購入した。24 穴プレートに Maintenance Medium を 500 μl 加え、その上に細胞培養カップを静置して、培地を 1 日おきに交換し、37°C、5% CO₂ 下で 1 週間培養して試験に用いた。

アスタキサンチン及びコエンザイム Q₁₀ のミセル化は、前述と同様の方法で行った。24 穴プレート上に静置した EPI-200 細胞に対し、ミセル化した脂溶性物質を含む PBS 400 μl を添加した。基底側には 0.7% BSA を含む PBS を 500 μl 加え、37°C、5% CO₂ 環境下で 24 時間培養した。培地を取り除き、10 mM タウロコール酸含有 PBS で細胞を洗浄した後、細胞と基底側 PBS を回収した。回収した細胞のホモジネートにジクロロメタン-メタノール混液 (2 : 1)

を加え、脂質を抽出した。得られた抽出物を HPLC に供した⁴⁾。

3. 研究結果

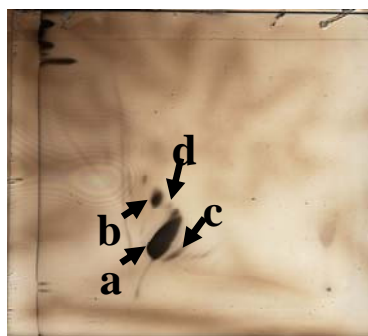
3.1 古細菌膜脂質の分析

A. pernix 膜脂質について、Morii らの報告とほぼ同様の TLC 分析結果が得られた (Fig. 1)。 *A. camini* 膜脂質についても *A. pernix* のものとほぼ同様であった。 *A. pernix*

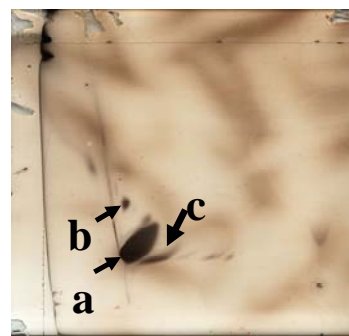
膜脂質から *A. camini* 膜脂質中には検出されない脂質も検出された (Fig. 1(A), d)。古細菌膜脂質から得られた主要なスポット a と b は、リン残基と糖残基の特異発色も示し、c は糖残基の発色のみ検出された (Fig. 1(B)および(C))。また、コリン残基及びアミノ基の発色は *A. pernix*、*A. camini* どちらも示されなかった。以上の結果から、スポット a がアーキチジルグルコシルイノシトール (AGI)、スポット b がアーキチジルイノシトール (AI) と同定された (Fig. 2)²⁾。

(A) Detection of total lipids

A. pernix

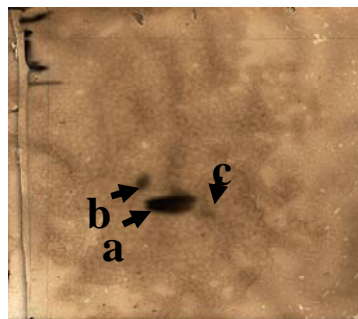


A. camini

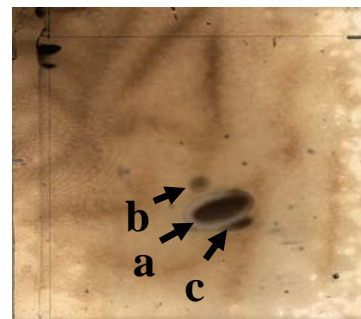


(B) Detection of glycolipids

A. pernix



A. camini



(C) Detection of phospholipids

A. pernix



A. camini



Fig.1. TLC of membrane lipids extracted from *A. pernix* and *A. camini*

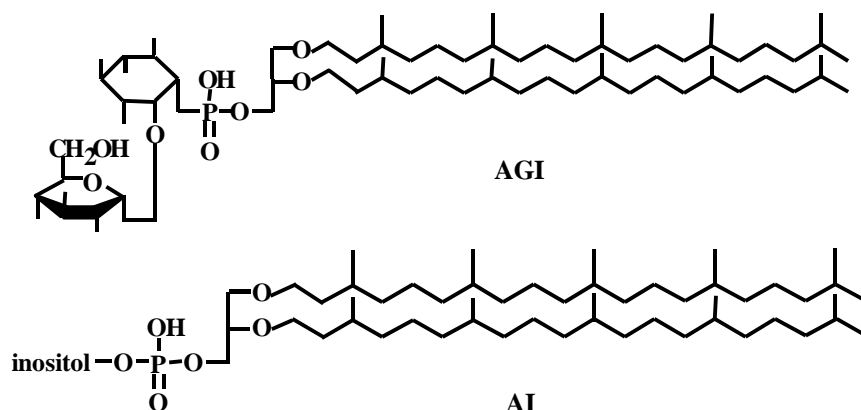


Fig. 2. Proposed structures of archaetidyl(glucosyl)inositol (AGI) and archaetidylinositol (AI)

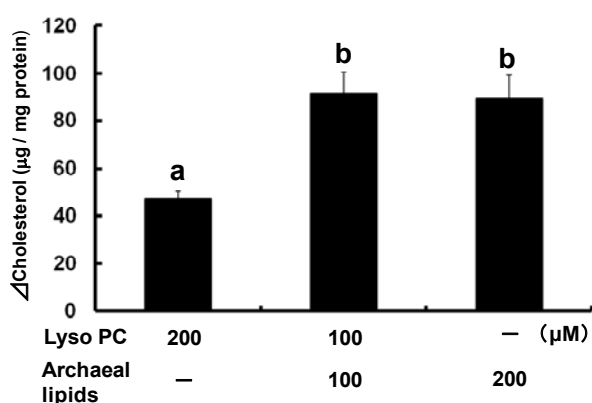


Fig. 3. Effect of archaean membrane lipids from *A. pernix* on cholesterol absorption in differentiated Caco-2 cells

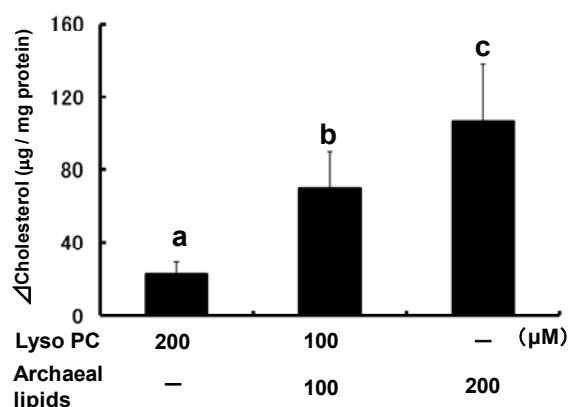


Fig. 4. Effect of archaean membrane lipids from *A. camini* on cholesterol absorption in differentiated Caco-2 cells

3. 2 消化管上皮細胞における脂溶性物質の吸収に与える古細菌膜脂質の影響

リゾPCと*A. pernix*膜脂質を1:1の割合で用いた場合、リゾPCのみを用いたものと比べ、24時間後のコレステロール吸収量は約2倍に増加し、*A. pernix*膜脂質のみを用いた場合も同様に約2倍に増加した(Fig. 3)。一方、リゾPCと*A. camini*膜脂質を1:1の割合で用いた場合には約3倍に増加し、*A. camini*膜脂質のみを用いてミセル化した場合は、約5倍に増加した(Fig. 4)。

フコキサンチン添加後のCaco-2細胞内からは全てフコキサンチノールが検出され、フコキサンチンは検出されなかったため、フコキサンチノール量を吸収量として算出した。リゾPCと古細菌膜脂質(*A. camini*)を1:1の割合で用

いてミセル化した場合、リゾPCを用いた場合と比べ、細胞内へのフコキサンチン吸収量が約2倍増加した(Fig. 5)。

古細菌膜脂質のみを用いた場合も同様に約2倍増加した。アスタキサンチンの吸収量も古細菌膜脂質(*A. camini*)を用いてミセル化した場合にはリゾPCを用いてミセル化したときに比べて約2倍増加した(Fig. 6)。

3. 3 ヒト表皮三次元モデルにおける脂溶性物質の吸収に与える古細菌膜脂質の影響

EPI-200細胞に対して、古細菌膜脂質を用いてミセル化したアスタキサンチンを含む培地を添加したところ、リゾPCミセルを用いたときに比べ、吸収量は有意に抑制された(Fig. 7)。コエンザイムQ₁₀を含む培地を添加した場合にも、ほぼ同様の結果となった(Fig. 8)。

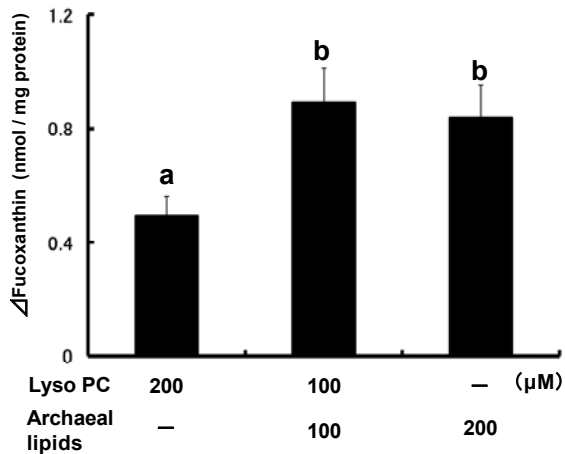


Fig. 5. Effect of archaeal membrane lipids from *A. camini* on fucoxanthin absorption in differentiated Caco-2 cells

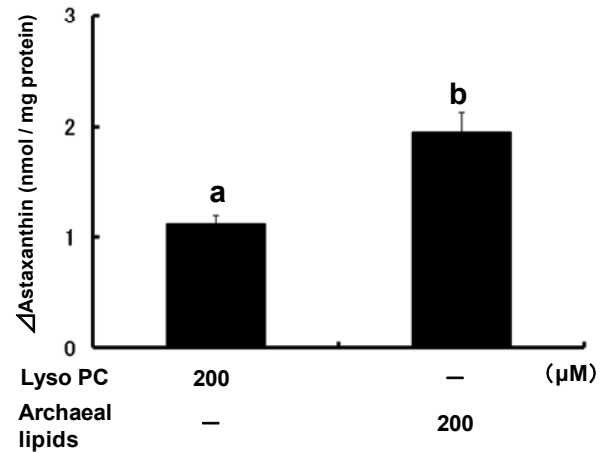


Fig. 6. Effect of archaeal membrane lipids from *A. camini* on astaxanthin absorption in differentiated Caco-2 cells

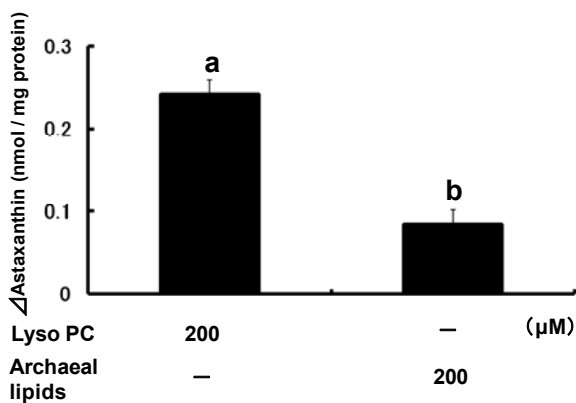


Fig. 7. Effect of archaeal membrane lipids from *A. camini* on astaxanthin absorption in EPI-200 cells

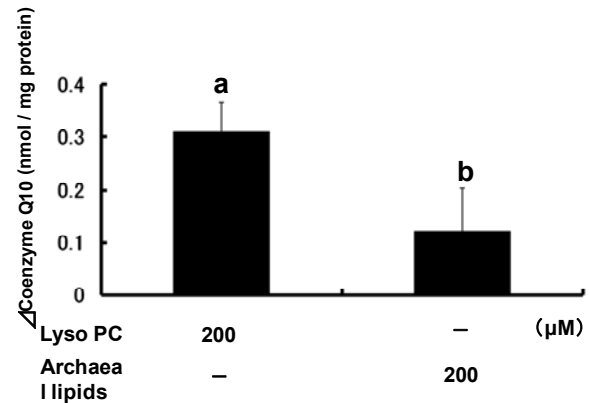


Fig. 8. Effect of archaeal membrane lipids from *A. camini* on coenzyme Q10 absorption in EPI-200 cells

4. 考 察

古細菌膜脂質を構成するエーテル型脂質は、ホスファチジルコリンなどのエステル型脂質に比べ高温環境下で安定であることが示されている⁵⁾。脂溶性物質の単純拡散による吸収では、小腸上皮においてミセルと上皮表面が接触し、ミセル内の脂溶性物質が単量体として細胞内に移行する。リゾ PC を含むミセルが、ホスファチジルコリン (PC) を含むミセルに比べ脂溶性物質の吸収を促進する機構は、リゾ PC を含むミセルが PC を含むものよりも不安定であり、上皮表面と接触した際に脂溶性物質が細胞内へより移行しやすい状況を作るためと考えられている³⁾。本研究では、古細菌膜脂質がリゾ PC よりも強い吸収促進作用を示した。その機構としては、古細菌膜脂質の極性基と小腸上皮表面との相互作用が考えられる。近年、小

腸上皮表面では Scavenger receptor class B type I や CD36 といったスカベンジャー受容体が発現して、低濃度において脂溶性物質の能動的な吸収に関与していることが明らかにされており^{6,7)}、スカベンジャーレセプターは陰性電荷を帯びた物質や細菌のリポ多糖などを認識するといわれている。本研究で使用した *Aeropyrum* 属膜脂質は極性基として主にグルコシルイノシトール基とイノシトール基を持つため、スカベンジャーレセプターと膜脂質極性基が親和性を示し、ミセルが小腸表面に長く保持されるために吸収が促進される可能性も考えられた。さらに小腸上皮細胞の管腔側表面には他にも多くのレセプター分子が発現している。Mannose 6-phosphate receptor (MPR) は、insulin growth factor (IGF) receptor の一種として見つかったタンパク質であるが、マンノース 6 リン酸やリポ多糖のリ

ン酸部位を認識することが知られている⁸⁾。MRPはCaco-2細胞において基底側に比べ管腔側で3倍~4倍発現量が高く、管腔内の微生物に対する免疫機構の一部として機能していると考えられている。MRPのリガンド認識部位はまだ明らかではないが、マンノース6リン酸の陰性電荷を認識するといわれている。したがって、グルコシルイノシトール基がリン残基との結合によって、極性の偏りが電荷を生じさせ、MRPがその電荷を認識しているのかもしれない。

古細菌膜脂質を用いたミセルは、リゾ PC を用いたものに比べ正常皮膚三次元モデル EPI-200 細胞の脂溶性物質吸収を抑制した。本実験で用いた EPI-200 細胞は正常ヒト皮膚三次元モデルであり、細胞は表皮構造を形成しているが、最外層に位置する角質細胞は死細胞であり、レセプター分子は発現していないか、機能していないものと考えられる。そのため、表皮表面からの細胞内への脂溶性物質の移行はミセルの物理的性質に依存すると推測され、リゾ PC を用いたミセルが古細菌膜脂質を用いたミセルよりも高い脂溶性物質吸収作用を示したものと考えられた。

5. 今後の課題

本研究により、好熱性古細菌 *Aeropyrum* 属膜脂質には、消化管における脂溶性物質吸収を促進する作用があることが示唆された。本研究で比較対象として用いたリゾ PC は、消化管内に豊富に含まれる PC よりも小腸上皮における脂溶性物質吸収を促進することが知られているが、本研究で示された古細菌膜脂質吸収促進作用はそのリゾ PC の作用を上回るものであり、古細菌膜脂質は消化管における脂溶性物質吸収を促進するための担体としての利用が期待される。今後はさらに生体での作用を検討する必要がある。また、正常皮膚三次元モデル EPI-200 を用いた

試験において、古細菌膜脂質を用いたミセルはリゾ PC を用いたものと比べ脂溶性物質の吸収を有意に抑制した。したがって、本研究で強く示唆された小腸上皮における吸収促進作用の機構として、古細菌膜脂質の極性基と小腸上皮表面との相互作用が考えられる。今後は古細菌膜脂質を成分ごとに分離し評価することや、別の極性基を持つ脂質をミセル素材として用いて評価を行う必要がある。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、助成賜りました財団法人ソルト・サイエンス研究財団に厚くお礼申し上げます。

文 献

1. Woose, C. R., Kandler, O., and Wheelis, M. R. (1990) *Proc. Natl Acad Sci. U.S.A.* 87, 4576-4579
2. Morii, H., Yagi, H., Akutsu, H., Nomura, N., Sako, Y., and Koga, Y. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1436, 426-436
3. Sugawara, T., Kushiro, M., Zhang, H., Nara, E., Ono, H., and Nagao, A. (2001) *J. Nutr.* 131, 2921-2927.
4. Tang, P. H., Miles, M. V., Degrauw, A., Hershey, A., and Pesce, A. (2001) *Clin. Chem.* 47, 256-265
5. Batenjary, M. M., O'Leary, T. J., Levin, I. W., and Mason, J. T. (1997) *Biophys. J.* 72, 1695-1700
6. Cai, L., Eckardt, E. R. M., Shi, W., Zhao, Z., Nasser, M., Villiers, W. J. S., and Westhuyzen, D. R. (2004) *J. Lipid Res.* 45, 253-262
7. Bennekum, A., Werder, M., Thuahnai, S. T., Han, C. H., Duong, P., Williams, D. L., Wettstein, P., Schulthess, G., Phillips, M. C., and Hauser, H. (2005) *Biochemistry* 44, 4517-4525
8. Kornfeld, K. (1992) *Annu. Rev. Biochem.* 61, 307-330

No. 0847

Enhancement of Intestinal Absorption of Lipophilic Compounds by Archaeal Membrane Lipids

Tatsuya Sugawara¹, Takashi Hirata¹, Yoshihiko Sako¹, Kiminori Matsubara²

¹Graduate school of Agriculture, Kyoto University, ²Graduate school of Education, Hiroshima University

Summary

The third domain of life, now commonly referred to as the archaea, is a surprising collection of biochemical motifs, some resembling those of prokaryotes and eukaryotes and others resembling neither. The identification of unique archaeal motifs and functions has revolutionized scientific views of life's adaptability. In this study, we evaluated the effect of archaeal membrane lipids on intestinal absorption of lipophilic compounds for utilization of unique archaeal components. Membrane lipids were prepared from the aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum camini* and *Aeropyrum pernix* K1. The two dimensional TLC showed a simple composition of the membrane lipids and major lipids were archaetidyl(glucosyl)inositol and archaetidylinositol. We investigated the absorption of cholesterol, carotenoids (fucoxanthin and astaxanthin), and coenzyme Q10 in mixed micelles containing archaeal lipids by differentiated Caco-2 cells, which is a useful model for studying the absorption of dietary compounds by intestinal cells. The cellular uptake of these lipophilic compounds from mixed micelles containing archaeal membrane lipids was 1.7 - 4.8 times higher than from mixed micelles containing only lysophosphatidylcholine (lysoPC). These results strongly suggested that archaeal membrane lipids enhance the intestinal absorption of the lipophilic compounds.