

難消化性糖類によるカルシウム吸収促進作用機序の解析

学位論文内容の要旨

日本の食文化において、カルシウム (Ca) は非常に摂取しにくい栄養素の1つである (栄養所要量 600 mg/日、平均摂取量 546 mg/日、平均充足率 91%)。高齢化社会を迎える日本において、Ca 摂取不足は、増加の一途を辿る「骨粗鬆症」の主要因とされ、十分な骨量の維持のためには、Ca 摂取量の増加とともに、その生体利用性を高めることが重要である。本研究は、その Ca 不足を軽減し、骨粗鬆症を予防する機能性食品に関する研究という一面を持つ。

本研究の目的は、難消化性糖類によるカルシウム (Ca) 吸収促進作用機序を解明することである。なかでも Ca 吸収促進作用が強いことが示された難消化性二糖類 difructose anhydride III (DFAIII, di-D-fructo-furanose 1,2':2,3' dianhydride) を中心的な研究素材として使用した。「難消化性」とは、「ヒトの消化酵素に対して抵抗性を有すること」を意味し、摂食された難消化性糖類は、小腸では消化も吸収もされず、大腸に定着する腸内微生物により代謝される。本研究は、ラットを用いた *in vivo* 系による実験を起点に、摘出小腸、培養細胞を用いた実験へと展開し、特に小腸での DFAIII の作用に注目し、研究を実施した。

[1] ラットにおける難消化性糖類による Ca 吸収促進作用

3種の難消化性糖類 DFAIII、fructooligosaccharides、および raffinose を含む飼料 (30 g/kg feed) をラットに摂食させ、Ca 吸収促進作用を評価した。飼料中に非吸収性マーカー Cr_2O_3 を添加し、消化管各部位の内容物および糞中の Ca:Cr 比を算出することにより、難消化性糖類が Ca 吸収を促進する消化管部位を特定した。

3種の難消化性糖類は、Ca 吸収促進作用を示し、なかでも DFAIII は最も強い作用を認めた。DFAIII は小腸と大腸の両方で Ca 吸収を促進した。大腸での DFAIII による Ca 吸収促進作用には、DFAIII の発酵により生成する有機酸の関与が示唆された。小腸では、DFAIII は消化も吸収もされないことから、小腸上皮細胞に直接作用して、Ca 吸収を促進していることが提案された。小腸における DFAIII の直接的な作用は、ラット小腸反転サック法により裏付けられた。

[2] ヒト小腸上皮細胞モデル Caco-2 における DFAIII の Ca 吸収促進作用

小腸における DFAIII による Ca 吸収促進作用の詳細な作用機序を解析するため、培養細胞 Caco-2 を用いた実験系に展開した。2つの Ca 吸収経路、transcellular Ca transport (能動輸送、細胞内経路) と paracellular Ca transport (受動輸送、細胞間経路) への DFAIII によ

る影響を評価した。

Caco-2 細胞刷子縁膜側への DFAlII の添加 (0-100 mmol/L) は、濃度依存的に paracellular Ca transport を高めた。一方、transcellular Ca transport には影響しなかった。また、DFAlII を基底膜側へ添加した場合、paracellular Ca transport 促進作用は非常に弱かった。これらの結果から、DFAlII と Caco-2 細胞刷子縁膜に局在する何らかの分子との相互作用が、paracellular Ca transport 促進に関与することが示された。

[3] DFAlII の paracellular Ca transport 促進作用に関する細胞内シグナリング経路と TJ 構成タンパク質の変化

細胞間吸収経路は、種々の細胞内シグナリングを介し、細胞間接着構造を形成する複合タンパク質 tight junction (TJ) の透過性によって調節されている。そこで、各種のシグナリングブロッカーを用いて、DFAlII による paracellular Ca transport 促進作用に関する細胞内シグナリング経路を解析した。また、TJ 透過性の変化は、TJ 構成タンパク質の変化により引き起こされることから、DFAlII による TJ 構成タンパク質 (occludin、claudin-1、ZO-1、JAM-1、actin filament) の変化を免疫染色法により観察した。

DFAlII を作用させた Caco-2 細胞において、actin filament および claudin-1 の変化が認められたが、各種のシグナリングブロッカーは、DFAlII による paracellular transport 促進作用に影響しなかった。これらの結果から、DFAlII は、細胞内シグナリングを介さず、Caco-2 細胞刷子縁膜の性質や状態の変化を引き起こし、claudin-1、actin filament の変化を介して、paracellular Ca transport を促進していることが示唆された。

[4] DFAlII による Caco-2 細胞膜の流動性、水分子浸透性への影響

DFAlII により変化した claudin-1 は、TJ 透過性に中心的役割を担う細胞膜貫通型タンパク質である。よって、その機能は細胞膜の性質に影響されると考えられる。そこで、Caco-2 細胞膜の性質として、膜流動性と水分子浸透性に着目し、DFAlII による影響を解析した。細胞膜流動性プローブを用いた蛍光偏光解消法では、DFAlII による Caco-2 細胞膜流動性の変化は認められなかった。一方、laurdan (6-dodecanoyl-2-dimethylaminonaphthalene) を用いた水分子浸透性の評価により、DFAlII が Caco-2 細胞膜の水分子浸透性を低下させている傾向が認められた。溶液中の糖類は、水分子と相互作用し、クラスターを形成する (水和特性) ことから、DFAlII による paracellular Ca transport 促進作用に、DFAlII の持つ水和特性が重要である可能性が提案された。

[5] 難消化性糖類による細胞間吸収経路促進作用と、その水和特性・構造との相関関係の解析

種々の難消化性糖類、polyethylene glycol による細胞間吸収経路促進作用と、これら物質の持つ水和特性を評価し、それらの相関関係を解析した。水和特性を表す $^{17}\text{O}-T_1$ 緩和時間 (NMR により測定) と細胞間吸収経路の指標である TER に強い正の相関が認められた。難消化性糖類は、その水和特性により、刷子縁膜あるいは TJ 周囲の水分子を構造化し、膜脂質分子や TJ タンパク質に変化を引き起こし、paracellular transport を促進することが提案された。

総括すると、DFAIII は小腸と大腸の両方で Ca 吸収を促進した。大腸では DFAIII の発酵により生成した有機酸を介して Ca 吸収を高めるのに対し、小腸では DFAIII が上皮細胞に直接的に作用して、paracellular Ca transport を促進した。小腸での DFAIII による直接作用は、TJ 構成分子である claudin-1、actin filament の変化を介しており、DFAIII の有する水和特性がその作用に関与する可能性が提案された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	原	博
副査	教授	川端	潤
副査	教授	松井和	博
副査	講師	石塚	敏

学位論文題名

難消化性糖類によるカルシウム吸収促進作用機序の解析

本論文は、148 頁からなる和論文であり、図 36 と表 29 を含み、参考論文 10 編が添えられている。

本論文の研究目的は、難消化性糖類によるカルシウム (Ca) 吸収促進作用機序を解明することである。なかでも、Ca 吸収促進作用が強いことが示された難消化性二糖類 difructose anhydride III (DFAI_{III}, di-D-fructo-furanose 1,2':2,3' dianhydride) を中心的な研究素材として使用している。「難消化性」とは、「ヒトの消化酵素に対して抵抗性を有すること」を意味し、摂食された難消化性糖類は、小腸では消化も吸収もされず、大腸に定着する腸内微生物により代謝される。本論文は、特に小腸での DFAI_{III} の作用に注目し、ラットを用いた *in vivo* 系による実験を起点に、摘出小腸、培養細胞を用いた実験へと展開し、次のような知見を得ている。

[1] ラットにおける難消化性糖類による Ca 吸収促進作用

3 種の難消化性糖類 DFAI_{III}、fructooligosaccharides、および raffinose を含む飼料をラットに摂食させ、正味の、および各消化管部位での Ca 吸収促進作用を評価した。3 種の難消化性糖類は、Ca 吸収促進作用を示した。なかでも DFAI_{III} は最も強い作用を示し、その作用は小腸と大腸の両方で発現した。また、DFAI_{III} の Ca 吸収促進作用は、小腸反転サック法でも確認された。これらの結果より、DFAI_{III} は、大腸では発酵を介して、小腸では粘膜細胞に直接的に作用して、Ca 吸収を促進する。

[2] ヒト小腸上皮細胞モデル Caco-2 における DFAI_{III} の Ca 吸収促進作用

小腸における DFAI_{III} による Ca 吸収促進作用の詳細な作用機序を解析するため、培養細胞 Caco-2 を用いた実験系に展開した。2 つの Ca 吸収経路、transcellular Ca transport (能動輸送、細胞内経路) と paracellular Ca transport (受動輸送、細胞間経路) への DFAI_{III} による影響を評価した。DFAI_{III} は、paracellular Ca transport を促進したが、

transcellular Ca transport には影響しなかった。また、基底膜側への DFALIII の添加による作用は、非常に弱かった。これらの結果から、DFALIII は Caco-2 細胞刷子縁膜に局在する何らかの分子との相互作用し、paracellular Ca transport を促進する。

[3] DFALIII の paracellular Ca transport 促進作用に関する細胞内シグナリング経路と TJ 構成タンパク質の変化

細胞間吸収経路は、種々の細胞内シグナリングを介し、複合タンパク質 tight junction (TJ) によって調節されている。そこで、DFALIII による paracellular Ca transport 促進作用に関する TJ 構成タンパク質 (occludin、claudin-1、ZO-1、JAM-1、actin filament) の変化、細胞内シグナリング経路を解析した。DFALIII を作用させた Caco-2 細胞において、actin filament および claudin-1 の変化が認められた。しかしながら、各種の細胞内シグナリングブロッカーは、DFALIII の作用に影響しなかった。これらの結果より、DFALIII は細胞内シグナリングを介さず、Caco-2 細胞刷子縁膜の性質や状態の変化を引き起こし、claudin-1、actin filament の変化を介して、paracellular Ca transport を促進している。

[4] DFALIII による Caco-2 細胞膜の流動性、水分子浸透性への影響

DFALIII による paracellular Ca transport 促進作用に関する刷子縁膜の変化を調べるため、DFALIII による膜流動性と水分子浸透性への影響を解析した。DFALIII は、細胞膜の流動性に影響しなかったが、膜の水分子浸透性を低下させる傾向が認められた。溶液中の糖類は、水分子と相互作用し、クラスターを形成する (水和特性) ことから、DFALIII による paracellular Ca transport 促進作用に、DFALIII の持つ水和特性が重要である可能性がある。

[5] 難消化性糖類による細胞間吸収経路促進作用と、その水和特性・構造との相関関係の解析

種々の難消化性糖類、polyethylene glycol による細胞間吸収経路促進作用と、これら物質の持つ水和特性を評価し、それらの相関関係を解析した。水和特性を表す $^{17}\text{O}-T_1$ 緩和時間 (NMR により測定) と細胞間吸収経路の指標である TER に強い正の相関が認められた。難消化性糖類は、その水和特性により、刷子縁膜あるいは TJ 周囲の水分子を構造化し、膜脂質分子や TJ タンパク質に変化を引き起こし、paracellular transport を促進する。

本論文は、難消化性糖類が小腸上皮細胞に直接的に作用し、糖類が持つ水和特性により、細胞機能を調節するという独創的な作用機序を明らかにした。本研究により得られた知見は、今後も解析が進むと考えられる難消化性糖類の研究に、新たな見方と展開を提案するものであり、高く評価できる。

よって、審査員一同は、鈴木卓弥が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。