

研究テーマ： nanoFRET-SNOM による非殺生型機能性評価システム	
研究代表者： 生命環境学部 生命科学科 准教授 吉野 智之	連絡先： yoshino@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者：	
【研究概要】 モデル細胞として、マウス小腸上皮細胞(Intestinal Epithelioid cells line No.6, IEC-6)を使用し、アスコルビン酸(AsA)やアスコルビン酸の細胞透過性を上げた誘導体であるアスコルビン酸-2-グルコシド(AA-2G)の食成分を添加し、IEC-6 の変化を原子間力顕微鏡(AFM)で液中観察を行った。これと平行して、AA-2G などの食成分の IEC-6 を介しての透過量を HPLC を用いて測定した。AA-2G の透過量と IEC-6 の硬さとの比較したところ、透過量に応じた硬さ変化が認められ、新たな評価系構築の可能性が示された。	

【研究内容・成果】

1. 透過実験

フィルタの上にマウス小腸上皮細胞(IEC-6)を単層に培養した上部に、アスコルビン酸-2-グルコシド(AA-2G)を添加し、細胞を介して下部への透過量および上部の残存量を図 1-1 に示す。この透過速度は自由拡散(図 1-1 の○)より遅かった。IEC-6 を播種したフィルタでは時間の経過とともに上部の濃度が下がり、下部は、AA-2G 添加後 6 時間までは濃度が上がった。さらに、下部は 9 時間後では下がった。これは、総量も減少したことにより、IEC-6 による消費のためではないかと考えられる。

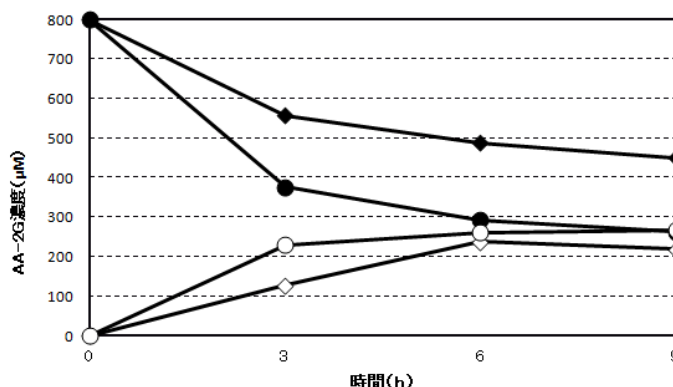


図 1-1. AA-2G の透過量

◆ & ◇ : 細胞を播種した AA-2G, ● & ○ : 細胞を播種してない AA-2G,
◆ & ● : 細胞上部, ◇ & ○ : 細胞下部. AA-2G 800μM 添加.

2. AFM によるフォースカーブ測定

アスコルビン酸-2-グルコシド(AA-2G)添加 3 時間後の IEC-6 のフォースカーブ測定結果をそれぞれ図 3-1 に示す。添加 3 時間後は、約 600 nm からたわみ量が大きくなっていた。約 500 nm あたりで、プローブの行きと返りに差ができていた。接触後の近似式は $y = -15.823x + 8721, R^2 = 0.9399$ となった。添加 6 時間後の近似式は $y = -0.0013x + 0.5986, R^2 = 0.9512$ 、添加 9 時間後の近似式は $y = -0.0015x + 0.2382, R^2 = 0.856$ となった。

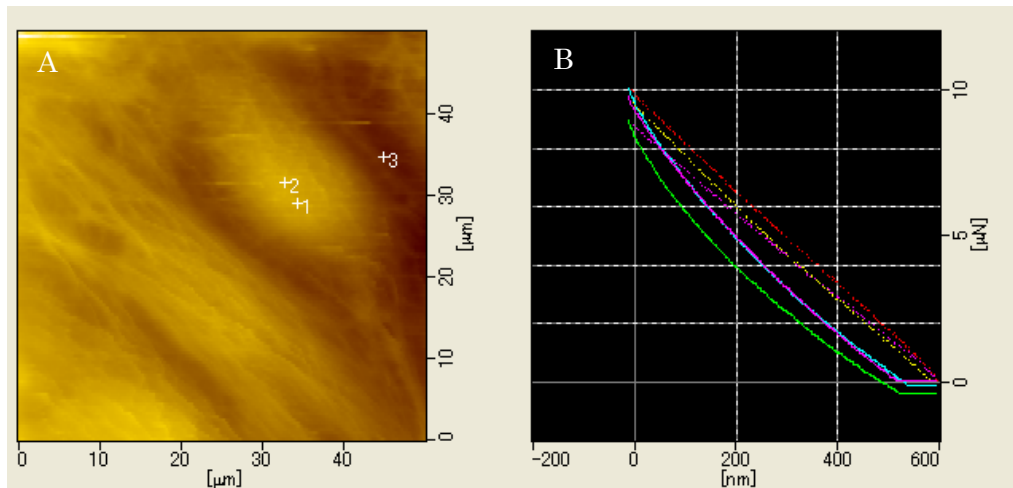


図 2-1 IEC-6 (AA-2G 添加 3 時間後) の液中 AFM 像

A) AFM 形状像, B) フォースカーブ. 画像中の 1, 2, 3 点でフォースカーブを測定した.
 上限 600 nm, 下限 -10.0 nm, Z=0 nm での力: 9809.421 nN.

HPLC の結果、IEC-6 に対して、AA-2G は 6 時間後から 9 時間後で総量が減少し、IEC-6 が消費した可能性があることがわかった。無添加が 9 時間後ではほぼ同じ濃度になっていることは自由拡散によるものであると考えられる。無添加と比較すると、IEC-6 単層シートを挟むことによって透過速度が減少し、IEC-6 が AA-2G の透過を制御していると考えられる。

フォースカーブ測定の無添加の IEC-6 で測定された力の AFM プローブと IEC-6 の接触後の近似式の傾きとを比較した結果、AA 添加の IEC-6 の傾きは大きくなった(データ省略)。このことから、AA により IEC-6 が硬くなっていることがわかった。同様に、AA-2G を添加した IEC-6 も無添加と比較すると、接触後の近似式の傾きが大きくなっていて(データ省略)。よって、IEC-6 に AA-2G が取り込まれ、IEC-6 が硬くなっていると考えられる。AA および AA-2G の添加 3 時間後では IEC-6 が硬直していることがわかった。しかしながら、AA-2G の添加 6 時間後の IEC-6 は、添加 3 時間と比較すると、近似式の傾きが小さくなっていて。また、添加 9 時間後の IEC-6 は添加 6 時間後とほぼ同じ傾きになったことから、添加 6 時間以降は細胞が柔らかくなると考えられる。

以上から IEC-6 が食成分を透過(吸収・排出)させている間は硬直し、透過後は IEC-6 が弛緩する。この細胞の硬さ変化は食成分の透過と相関があると考えられる。この評価系は、細胞培養の時間の短縮、試薬などの減量化ができ、細胞の表面や界面において生じる現象の解析の省力化に繋がると予測される AFM を利用した新たな評価系構築の可能性が示された。

【直接的効果】

食成分の有する機能性について、分子・細胞間相互作用をたんぱく質レベルで科学的に解明できる新たな評価系構築ができるとことが示唆された。

【波及的効果】

新たな機能性評価系を構築されることにより得られる成果は、生命科学の基礎研究のみならず、予防医学の確立による国民の医療・健康増進、さらには地域農業振興や食品関連産業の発展にも多大の寄与をされると考えられる。

