

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04501

研究課題名(和文)食品由来の新規亜鉛吸収促進因子の探索およびその応用性の検討

研究課題名(英文)Studies on a feed for improving zinc nutrition by the use of zinc transporters

研究代表者

神戸 大朋 (Kambe, Taiho)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：90303875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：亜鉛欠乏を予防するために消化管からの亜鉛吸収に機能する亜鉛輸送体ZIP4とZNT1の発現を増強させる新規食品因子の探索を実施した。香辛料を中心に、ZIP4の発現を増強させる新規抽出物を見出し、これら抽出物のいくつかがヒトZIP4の発現を増強させることを確認した。一方でZNT1の発現を増強させる抽出物は見出すことができなかった。見出した抽出物の活性評価を実施したところ、体内亜鉛レベルを鋭敏かつ正確に反映するマーカーが必要であることが判明したため、ラット血漿を用いて有用なマーカーの探索を実施し、その結果、血漿中のいくつかの酵素が体内亜鉛レベルを正確に反映するマーカーとなりうることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Adequate zinc intake is indispensable to maintain health, because zinc plays critical roles in a variety of physiological processes. In the small intestine, zinc transporters ZIP4 and ZNT1 play essential roles for zinc absorption, and thus food components with the activity of increasing ZIP4 or ZNT1 expression would be a potential enhancer of zinc absorption. We here found extracts prepared from several spices have the activity to increase the abundance of both human and mouse ZIP4. Unfortunately, we found no extracts to increase ZNT1 expression. We found it difficult to evaluate whether or not food extracts have positive effects on zinc absorption in rats, because of low sensitivity to measure zinc absorption rates through ZIP4 and ZNT1. We found several enzymes activities nicely correlated with zinc levels in the diets, even in the case of low zinc diets. The activities would be useful as a marker for evaluation of zinc absorption rates.

研究分野：栄養生化学

キーワード：亜鉛欠乏 改善 トランスポーター Zip4 大豆抽出物 ソヤサポニンBb 高齢者 亜鉛要求性酵素 栄養改善

1. 研究開始当初の背景

飽食の時代にある我が国において懸念される栄養問題の一つに、亜鉛不足が挙げられる。亜鉛不足により、味覚や免疫機能が低下することはよく知られるが、高齢者では、さらに褥瘡や舌痛、皮膚炎に悩まされることも多い。最新の統計によると、潜在的な軽度の亜鉛欠乏者は日本国民の実に3割に及ぶと試算されており、特に、高齢者においてその傾向が強いことから、超高齢社会に突入した我が国において、亜鉛欠乏による生活の質(以下 QOL)の低下は大いに懸念されるところとなっている。実際、ヨーロッパで実施された疫学調査 ZincAge Project (亜鉛と老化との関連に関する調査)では、血清亜鉛値が高い高齢者が健康であることが証明されており、さらに、臨床の現場においても、「寝たきりの高齢者に頻発する褥瘡が亜鉛補充によって改善すること」、「高齢者の手術の際、手術前に血清亜鉛値を高めておくことが、術中の負担や術後の健康回復に大きく貢献すること」など、高齢者の健康維持に亜鉛が有効であることを支持する結果が相次いで報告されていることから、亜鉛欠乏の予防のために、早急な対策が求められる。

一般的に、亜鉛欠乏の予防は、サプリメントの摂取によって亜鉛摂取量を増やすことで対処できると考えられがちであるが、消化管での亜鉛吸収効率は 30%程度と低い上、摂取亜鉛量の増加に伴い吸収効率は減少する。これは、単に亜鉛摂取量を増やすだけでは、亜鉛吸収量の増加に結びつかないことを意味する。また、亜鉛の吸収効率は加齢と共に低下するため、高齢者の亜鉛欠乏に対する抜本的な解決のためには、吸収効率を上昇させる何らかの手法を確立することが必要となる。これまで、数多くのグループによって、亜鉛の吸収効率を改善させる因子の探索が行われてきたが、実験系がマウスやラットを用いた大がかりなものだったため、多種類のサンプルを幅広く解析することが不可能であった。それ故、これまで大きな進展は見られなかったが、2002年に、ヒトの先天性亜鉛欠乏症・腸性肢端皮膚炎 (Acrodermatitis enteropathica)の原因遺伝子として、小腸上皮において亜鉛吸収を担う亜鉛輸送タンパク質(亜鉛トランスポーター)ZIP4が同定されたことにより、この状況は一変した。すなわち、「ZIP4の発現量を増やすことによって、亜鉛吸収効率を上昇させる」という新たな切り口のもと、ZIP4発現促進因子(=亜鉛吸収促進因子)の探索という細胞レベルでの解析が可能となった。

2. 研究の目的

研究代表者は、「亜鉛の吸収は小腸上皮細胞に発現する亜鉛トランスポーターZIP4を介して行われる」ことを示し、「培養細胞

を用いたスクリーニング系を構築し、ZIP4の発現を増加させる食品因子として大豆サポニンと同定」することに成功していた。そこで本研究では、大豆サポニンとは異なる作用機序で ZIP4 発現促進活性を有する食品因子を同定することを目指した。また、消化管からの亜鉛吸収においては、ZIP4が消化管上皮細胞に取り込んだ亜鉛を血流中に放出する働きを担う ZNT1 が重要である。この ZNT1 の発現を増加させる食品因子の探索も同時に実施し、ZIP4 と ZNT1 の相乗効果で亜鉛欠乏を予防することも目的とした。さらに、それら因子や大豆サポニンの亜鉛吸収促進効果について動物個体レベルで検証し、亜鉛欠乏に対する有用性を実証することとし、合わせて個体レベルでの亜鉛欠乏の予防効果を正確に判定できる血液マーカーの探索・同定を目指した。

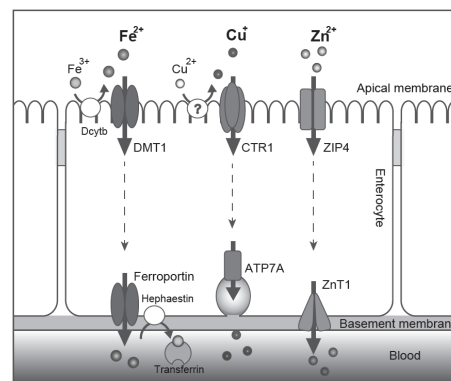


図1. 消化管上皮細胞における金属輸送。亜鉛の輸送には頂端膜に発現する ZIP4 と側底膜に発現する ZNT1 が機能する。

3. 研究の方法

ZIP4 発現促進活性を有する新規食品因子の探索と同定

ZIP4 発現促進活性を有する新規の食品因子探索のためのサンプルを調製し、研究代表者が確立したスクリーニングシステムを用いて、ZIP4 の発現を増加させる新規食品抽出物・因子を探索した。さらにこれまでの解析では、マウス ZIP4 に対する効果を検証してきたが、新たにヒト ZIP4 に対する効果を検証できる細胞株が樹立できたため、ヒト ZIP4 に対する効果も検証した。また、同抽出物・因子については、ZNT1 発現細胞を用いた類似のスクリーニング系で評価した。ZIP4 の発現促進活性を有することが確認できた抽出物については、細胞内への亜鉛輸送増加のマーカーとなるメタロチオネインの発現を解析し、実際に亜鉛量が増加していることを確認した。また、中圧カラムクロマトグラフィーや分取 TLC、HPLC などにかけて ZIP4 発現促進活性を示す化合物を単離した。単離化合物については、NMR や MS など各種機器分析に供し、活性化合物の構造を決定した。

ラットにおける ZIP4 発現の亜鉛応答性に関する解析

亜鉛欠乏食 (2.2 mg/kg)、低亜鉛食 (4.1 mg/kg) 及び、亜鉛十分食 (33.7 mg/kg) でラットを飼育し、十二指腸・空腸 (それぞれ、胃の幽門部より 0.5~1.5 cm、5.5~6.5 cm の部分) を摘出し、Multi-beads shocker を用いて破碎後、細胞膜画分を調製した。調整した膜画分をウェスタンブロットに供し、抗 ZIP4 モノクローナル抗体を用いて検出した。また、低亜鉛食ラットにおける血漿中の酵素の解析では、ラットを亜鉛欠乏食 (4~8 mg/kg) 及び亜鉛十分食 (33.7 mg/kg) で 10 日間飼育した。消化管上皮細胞あるいは血漿における亜鉛要求性酵素アルカリフォスファターゼ (ALP) の活性測定はを以下の方法で行った。膜画分 2 µg、あるいは 血漿 2 µL を 96-well plate に分注し、各ウェルに各酵素の基質を含む反応液を 100 µL ずつ添加して室温で 10 分間反応させた。反応終了後、各基質の発色に合わせて吸光度を測定した。

4. 研究成果

(解析 I) ZIP4 発現増強活性を有する食品因子の同定

ZIP4 の発現増強活性を有する食品抽出物を探索した結果、各種香辛料に高い活性が見出され、シナモンやキャラウェイ、カーダモン、花椒、桂皮、ターメリックの抽出物に活性を見出した (図 2)。また、ユッカサポニンやキラヤサポニンにも活性があることを見出した。Sep-Pak カラム・中圧カラムクロマトグラフィー・TLC 展開により、活性化化合物の単離を試みたが、活性因子を単離するまでには至らなかった。単一化合物までの精製に成功した画分が得られた場合には、NMR や MS などに供し、その構造を決定する予定である。

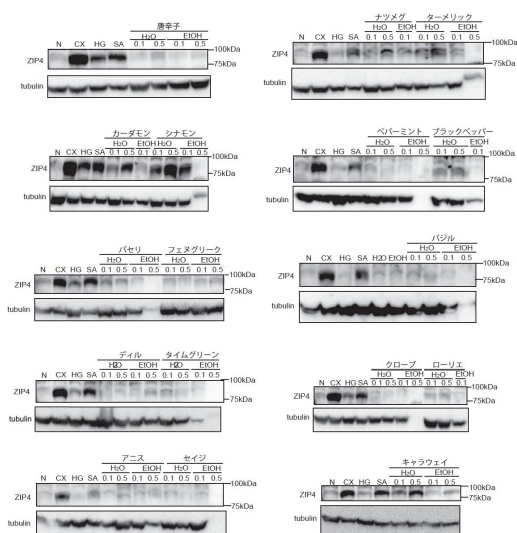


図 2. ZIP4 発現増強活性を有する香辛料抽出物を探索した結果の一部。

一方、ソヤサポニン Bb で活性が見出されたことから、他のサポニン類の活性についても評価した。サポニンの中には活性を有するものも存在したが、すべてのサポニンに活性が認められることはなかった。したがって、活性には両親媒性を有する他に何らかの構造が必要であることが予想されたが、その構造に関して知見を得るには至らなかった。

また、この解析と並行して、消化管上皮細胞側底膜に局在する ZNT1 の発現を促進させるような食品成分を探索したが、強い活性を有する抽出物の同定には至らなかった。なお、本解析は、ZNT1 に対する極めて特異的な抗体の作成に成功したことにより、実施できることとなった。

(解析 II) 食品因子の亜鉛吸収効率改善効果の検出方法に関する解析

ソヤサポニンの ZIP4 発現増強効果が確認されたため、ラットを用いて亜鉛吸収促進効果について検討した。ラットの各群を 0.3%ソイヘルス SA 含有食群とコントロール群の二つに分けて解析を行った。亜鉛欠乏による成長抑制の改善効果の他、亜鉛吸収効率改善や、血清亜鉛値、アルカリフォスファターゼなどの血清中の亜鉛代謝マーカー分子の活性を測定したが、いずれの解析においても明確な効果にみとめることができなかった。一方、ラットを亜鉛欠乏食 (2.2 mg/kg)、低亜鉛食 (4.1 mg/kg) 及び亜鉛十分食 (33.7 mg/kg) で飼育した場合には、消化管の ZIP4 の発現変動は、鋭敏に変化した (図 3)。中度・軽度の亜鉛欠乏では、明確な差を見出すことができなかった。

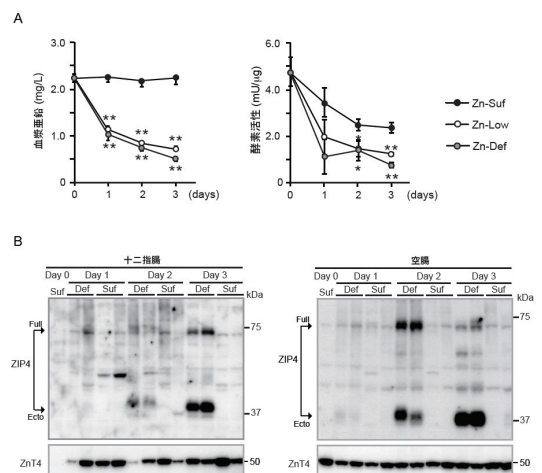


図 3. ZIP4 の発現変動より血清亜鉛値の低下が鋭敏な応答を示す。

A. 血漿中の亜鉛濃度 (左) と ALP 活性 (右)。B. 消化管における亜鉛欠乏依存的な ZIP4 の発現。左: 十二指腸、右: 空腸。

この原因として、ZIP4 の発現の変動が中度・軽度の亜鉛欠乏では、鋭敏でないこと

が考えられ、さらなる解析を進めるには、亜鉛欠乏や亜鉛吸収効率改善を評価する新たな亜鉛代謝マーカーの同定が必要となると考えられた。そこで、より鋭敏な反応を示す酵素を探索した。ラットを様々な亜鉛欠乏食(4~8 mg/kg)及び亜鉛十分食(33.7 mg/kg)で10日間飼育し、その時の血漿中の酵素を測定し、亜鉛欠乏に鋭敏に変動するマーカーを探索した結果、2つの酵素の活性が中度の亜鉛欠乏でも鋭敏に活性低下することを見出した(図4)。

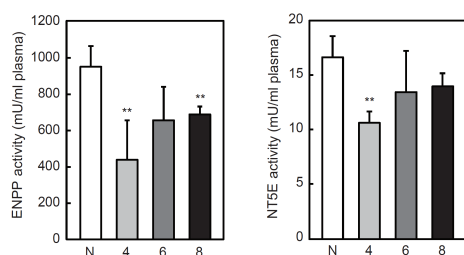


図4. 中程度の亜鉛欠乏で活性を低下させる血漿中の亜鉛酵素。ENPP 活性(左)と NT5E 活性(右)。N: 33.7 mg/kg 亜鉛食で、4、6、8 は 4~8 mg/kg 亜鉛食で飼育したラットの血漿。

これら酵素の活性減少をみとめた時点で亜鉛欠乏症の皮膚所見は現れていないことから、本減少は、亜鉛欠乏の極めて早い段階で起こっていることが示唆された。これらのことを考慮すると、見出した酵素を亜鉛欠乏マーカーとして利用することでソヤサボニンの効果が検証できると考えられ、現在、解析を進めている。超高齢社会を迎え、高齢者を中心に国民の20~30%が亜鉛欠乏に陥っている亜鉛欠乏大国日本において、亜鉛欠乏を予防し、健康寿命を伸張させる意義は大きい。本研究の最終目標は、見出した亜鉛吸収促進活性を持つ食材を複数組合せることによる「亜鉛欠乏予防食」の提案である。今回の課題においてその実現は達成できなかったが、本研究を継続させ、実際に高齢者の健康増進に役立てていきたいと考えている。

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 21 件)

Nishito Y and Kambe T*

“Absorption mechanisms of iron, copper, and zinc: An overview” *J Nutr Sci Vitaminol.*, 64, 1-7, 2018, doi: 10.3177/jnsv.64.1

Kambe T*, Matsunaga M and Takeda T

“Understanding the Contribution of Zinc Transporters in the Function of the Early Secretory Pathway” *Int J Mol Sci.*, 18, 2179,

2017, doi: 10.3390/ijms18102179

Golan Y, Kambe T* and Assaraf YG*

“The role of the zinc transporter SLC30A2/ZnT2 in transient neonatal zinc deficiency” *Metallomics*, 9, 1352-1366, 2017, doi: 10.1039/c7mt00162b

Hara T[#], Takeda T[#], Takagishi T, Fukue K, Kambe T* and Fukada T*

“Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis” *J Physiol Sci*, 67, 283-301, 2017, doi: 10.1007/s12576-017-0521-4

神戸大朋

「母乳栄養と亜鉛：亜鉛トランスポーターの変異により引き起こされる乳児亜鉛欠乏症」*生化学*, 89, 881-884, 2017

西藤有希奈、神戸大朋

「消化管での微量金属の吸収調節機構 -鉄、銅、亜鉛の吸収に関わる分子-」*消化と吸収*, 39, 122-127, 2017

Tsuji T, Kurokawa Y, Chiche J, Pouyssegur J, Sato H, Fukuzawa H, Nagao M, and Kambe T*

“Dissecting the process of activation of cancer-promoting zinc-requiring ectoenzymes by zinc metalation mediated by ZnT transporters” *J. Biol. Chem.*, 292, 2159-2173, 2017, doi: 10.1074/jbc.M116.763946

Fujimoto S, Tsuji T, Fujiwara T, Takeda T, Merriman C, Fukunaka A, Nishito Y, Fu D, Hoch E, Sekler I, Fukue K, Miyamae Y, Masuda S, Nagao M and Kambe T*

“The PP-motif in luminal loop 2 of ZnT transporters plays a pivotal role in TNAP activation” *Biochem. J.*, 473, 2611-2621, 2016, doi: 10.1042/BCJ20160324

Nishito Y, Tsuji N, Fujishiro H, Takeda T, Yamazaki T, Teranishi F, Okazaki F, Matsunaga A, Tuschl K, Rao R, Kono S, Miyajima H, Narita H, Himeno S and Kambe T*

“Direct Comparison of Manganese Detoxification/Efflux Proteins and Molecular Characterization of ZnT10 Protein as a Manganese Transporter” *J. Biol. Chem.*, 291, 14773-14787, 2016, doi: 10.1074/jbc.M116.728014

Golan Y[#], Itsumura N[#], Glaser F, Berman B, Kambe T* and Assaraf YG*

“Molecular Basis of Transient Neonatal Zinc Deficiency: Novel ZnT2 Mutations Disrupting Zinc Binding and Permeation” *J. Biol. Chem.*, 291, 13546-13559, 2016, doi: 10.1074/jbc.M116.732693

神戸大朋

「亜鉛トランスポーター研究から見た亜鉛バイオロジー」
JAACTニュースレター, 26, 4-15, 2016

Itsumura N, Kibihara Y, Fukue K, Miyata A, Fukushima K, Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Nishito Y, Ishida R, Narita H, Kodama H and Kambe T*
“Novel mutations in *SLC30A2* involved in the pathogenesis of transient neonatal zinc deficiency” *Pediatr Res.*, 80, 586-594, 2016, doi: 10.1038/pr.2016.108

Kambe T*, Takeda T and Nishito Y
“Activation of zinc-requiring ectoenzymes by ZnT transporters during the secretory process: Biochemical and molecular aspects”
Arch Biochem Biophys., 611, 37-42, 2016, doi: 10.1016/j.abb.2016.03.035

Kimura T* and Kambe T*
“The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters: an Overview and Perspective”
Int J Mol Sci., 17, 336, 2016,
doi: 10.3390/ijms17030336

神戸大朋

「亜鉛トランスポーターを標的にした亜鉛栄養改善」 日本臨牀, 74, 1234-1238, 2016

辻徳治、神戸大朋

「分泌型亜鉛要求性酵素の亜鉛獲得・活性化メカニズム」 内分泌・糖尿病・代謝内科, 43, 115-120, 2016

Hashimoto A, Nakagawa M, Tsujimura N, Miyazaki S, Kizu K, Goto T, Komatsu Y, Matsunaga A, Shirakawa H, Narita H, Kambe T* and Komai M*
“Properties of Zip4 accumulation during zinc deficiency and its usefulness to evaluate zinc status: A study of the effects of zinc deficiency during lactation” *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 310, R459-R468, 2016, doi: 10.1152/ajpregu.00439.2015

Hashimoto A, Ohkura K, Takahashi M, Kizu K, Narita H, Enomoto S, Miyamae Y, Masuda S, Nagao M, Irie K, Ohigashi H, Andrews G. K and Kambe T*
“Soybean extracts increase cell surface ZIP4 abundance and cellular zinc levels: a potential novel strategy to enhance zinc absorption by ZIP4-targeting” *Biochem. J.*, 472, 183-93, 2015, doi: 10.1042/BJ20150862

Hashimoto A, and Kambe T*
“Mg, Zn and Cu transport proteins: A brief

overview from physiological and molecular perspectives”
J Nutr Sci Vitaminol., 61, S116 - S118, 2015, doi: 10.3177/jnsv.61.S116

Kambe T*, Fukue K, Ishida R, and Miyazaki S
“Overview of inherited zinc deficiency in infants and children” *J Nutr Sci Vitaminol.*, 61, S44 - S46, 2015, doi: 10.3177/jnsv.61.S44

② Kambe T*, Tsuji T, Hashimoto A, and Itsumura N
“The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism”
Physiol Rev., 95, 749-784, 2015, doi: 10.1152/physrev.00035.2014

〔学会発表〕(計 12 件)

神戸大朋

「哺乳類亜鉛トランスポーターの発現制御と生理機能」
日本農芸化学会 2018 年度大会
日本農芸化学会学術活動強化委員会企画シンポジウム (招待講演)
2018 年 3 月 16 日 (名古屋)

神戸大朋

「亜鉛欠乏の予防と亜鉛栄養の改善に向けたアプローチ」
メディカルジャパン 2018 大阪 (招待講演)
2018 年 2 月 22 日 (大阪)

神戸大朋

「香辛料を用いた亜鉛欠乏予防因子の探索」
第 26 回スパイス&ハーブ研究成果セミナー (招待講演)
2018 年 2 月 7 日 (東京)

神戸大朋

「亜鉛要求性酵素のメタレーションに関わる亜鉛トランスポーターとその制御機構」
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017
2017 年 12 月 6 日 (神戸)

神戸大朋

「細胞内の亜鉛代謝と亜鉛要求性酵素の活性化」
第 28 回日本微量元素学会学術集会
2017 年 7 月 30 日 (仙台)

神戸大朋

「知って得する! 微量ミネラルの世界」
日本農芸化学会 関西支部講演会 第 500 回記念市民フォーラム (招待講演)
2017 年 7 月 30 日 (大阪)

神戸大朋
「亜鉛レベルに応じた亜鉛トランスポーターの発現制御」
日本毒性学会生体金属部会主催「メタルバイオサイエンス研究会 2017」(招待講演)
2017年10月13日(岡山)

Taiho Kambe
“Zinc-requiring ectoenzyme activation by ZnT transporters”
International Society for the ISZB meeting, in collaboration with Zinc-Net (COST Action TD1304)
2017年6月20日(キプロス)

Taiho Kambe
“Zinc-requiring ectoenzyme activation by ZnT transporters”
第94回日本生理学会大会
2017年3月28日(浜松)

神戸大朋
「哺乳類亜鉛トランスポーターの発現制御と生理機能」
日本農芸化学会 2017年度大会
2017年3月19日(京都)

Taiho Kambe
“Zinc-requiring ectoenzyme activation by ZnT transporters”
第39回日本分子生物学会年会
2016年12月01日(横浜)

神戸大朋
「低亜鉛母乳による一過性乳児亜鉛欠乏症、と亜鉛トランスポーター-ZnT2」
第27回日本微量元素学会学術集会
2017年7月31日(京都)

Taiho Kambe
“Zinc transporter-targeting strategy for enhancing zinc absorption”
第93回日本生理学会大会
2016年3月22日(札幌)

〔図書〕(計 4 件)

Fukada T* and Kambe T*
“Editorial: Welcome to the World of Zinc Signaling” *Int J Mol Sci.*, 19, 785, 2018
doi: 10.3390/ijms19030785

Kambe T*, Nishito Y and Fukue K
“Zinc transporters in health and disease”
Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals
J.F. Collins (ed): Elsevier, 283-291, 2016

Kambe T*, Fukada T*, Toyokuni S
“Editorial: The cutting age of zinc biology”

Arch Biochem Biophys., 611, 1-2, 2016
doi: 10.1016/j.abb.2016.09.006

深田俊幸、神戸大朋
「なぜ亜鉛は生命に必要なのか? 亜鉛生物学の潮流と今後の課題について」
細胞工学, 34, 310-316, 2015

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.seitaijoho.lif.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神戸 大朋 (KAMBE, Taiho)
京都大学大学院生命科学研究科・准教授
研究者番号: 90303875

(2) 研究分担者

宮前 友策 (MIYAMAE, Yusaku)
京都大学大学院生命科学研究科・助教
研究者番号: 30610240

(4) 研究協力者

なし