

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05727

研究課題名(和文)植物由来鉄キレーター・ムギネ酸前駆体による哺乳類における鉄吸収機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of iron absorption mechanism in mammals by plant-derived iron chelator, the precursor of mugineic acids

研究代表者

村田 佳子(Murata, Yoshiko)

公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・統合生体分子機能研究部・特任研究員

研究者番号：60256047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：この研究課題において、植物生体内に存在するムギネ酸前駆体ニコチアナミン(NA)が鉄錯体として空腸からアミノ酸トランスポーター-proton coupled amino acid transporter 1 (PAT1)を介して吸収されることを示した。また、マウス投与実験において、鉄のみ投与よりNA鉄錯体投与したマウスの腎臓、脾臓で鉄濃度がより高かった。この研究の結果により、既存の遊離の鉄の十二指腸での吸収とは異なる、空腸での新たなNA-鉄錯体としての鉄の吸収メカニズムがあることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物性食物に含まれるニコチアナミンによる鉄の動態に関する輸送体やその代謝経路を解明し、哺乳動物における新しい鉄輸送分子機構の全容を明らかにすることは学術的に意義がある。また、ヒトでも鉄欠乏症は最も一般的な栄養障害の一つであるが、同時に臓器に過剰の鉄が蓄積すると重篤な症状や合併症が生じるため、体内での適切な鉄排出も重要である。これらの成果を基盤として、鉄欠乏症および鉄過剰症の対策・治療への応用研究への展開に社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：In this research project, it was shown that the mugineic acid precursor, nicotianamine (NA) present in a plant is absorbed as an iron complex from the jejunum via the amino acid transporter proton coupled amino acid transporter 1 (PAT1). In addition, in the mouse administration experiment, the iron concentration was higher in the kidney and spleen of the mice to which the NA iron complex was administered than to the iron alone administration. The results of this study revealed that there is an absorption mechanism of iron as a new NA-iron complex in the jejunum, which is different from the existing absorption of free iron in the duodenum.

研究分野：生化学

キーワード：鉄 細胞 ニコチアナミン 小腸 トランスポーター 植物性食物 アフリカツメガエル卵母細胞 Caco-2細胞 Feアイソトープ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトにおける鉄吸収は主に小腸上部で行われるが、それに関わるトランスポーターがいくつか同定され、植物性食物と動物性食物での各々異なった鉄吸収機構が報告されている。日本人を含むアジア人は主に植物性食物からの非ヘム鉄を摂取しており、世界保健機構 (WHO) によって栄養不足症例の中で鉄欠乏症が一番多く、子供や妊婦での重篤な症状が報告されている。

(2) これまで植物でのムギネ酸類のトランスポーターや合成を研究してきた我々が今回注目したニコチアナミンは、植物生体内において2価鉄の輸送を担っており、広く植物性食物に含まれている。植物において鉄吸収機構が重要であるように、哺乳動物においても食品に由来するニコチアナミン等の植物内在性キレート化合物が重要な役割を果たし、それらに特異的な吸収機構が存在すると考える。国内外において、未だ報告のないニコチアナミンを含む植物内在性キレート化合物および鉄錯体のトランスポーターが同定できると、哺乳動物の小腸での新たな吸収メカニズムを明確にすることが出来る。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、植物内在性キレート化合物であるニコチアナミン鉄錯体の小腸内での代謝や輸送するタンパク質を哺乳動物の腸上皮細胞において同定することを通じて、哺乳動物におけるキレート型鉄輸送機構鉄を解明することを目的とする。

(2) 哺乳動物の小腸での新たな鉄錯体吸収メカニズムを明確にすることができれば、これを突破口にして、鉄吸収の促進方法を提唱することができる。ニコチアナミンを添加することにより、マウスに鉄のみ投与するより、鉄の吸収効果を比較して、鉄欠乏症および鉄過剰症の対策・治療の応用研究に展開する。

3. 研究の方法

(1) マウス組織および細胞内のニコチアナミン (NA) およびその鉄錯体の検出: NA の定量分析は FMOC 誘導体後 LC-MS で行った (図1)。細胞やマウス組織の鉄濃度は ⁵⁹Fe アイソトープを用いて定量した。

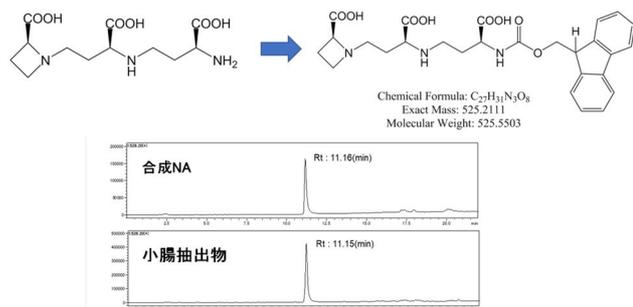


図1. 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル (FMOC) 誘導体化を用いたNAの定量分析。MS (ポジティブイオンモード) を選択イオンモニタリングモードで測定し、m/z 526.2 [NA-FMOC + H]⁺で観測、合成NAと小腸抽出物のMSクロマトグラムは同じ保持時間 (Rt) 11.15 minに検出された。

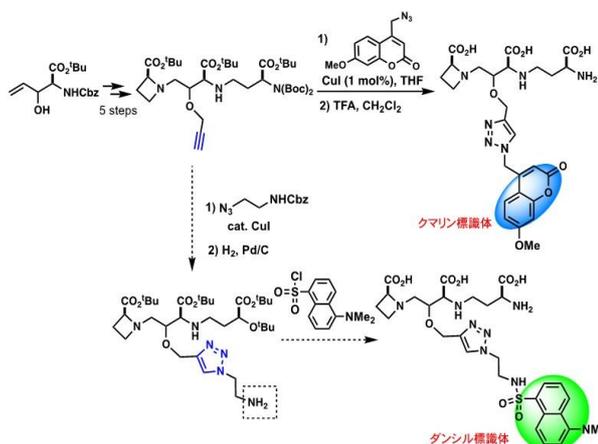


図2 ニコチアナミン標識体の作成方法

(2) NA 標識体合成と取り込み実験: 分担者難波はクマリン標識 NA の合成に成功している。また、ダンシル標識シデロフォアが生きた細菌に取り込まれる様子を可視化することにも成功した。これらの知見を基に、ダンシル標識 NA を合成し、NA の細胞への取り込みを観察した (図2)。

(3) トランスポーターの探索: 本研究において小腸での吸収に関わる SLC (Solute carrier) ファミリーの中から、プロトン共役型アミノ酸トランスポーター (PAT1, SLC36A1) が NA-Fe(II) 錯体の輸送体の候補に挙げられた。アフリカツメガエル卵母細胞に候補遺伝子の cRNA をインジェクションし、輸送活性を測定することによって同定した。次に小腸上皮の基底側にある NA および鉄錯体の排出トランスポーターも同様に同定を試みた。最終的に、Caco-2 細胞やトランスポーターを過剰発現させた細胞での取り込みおよび排出活性を評価した。

(4) マウスでの NA 鉄錯体投与による鉄吸収効果: マウスにアイソトープ ⁵⁹Fe または NA-⁵⁹Fe 錯体を投与して、血液および各組織のガンマカウントを行い、鉄吸収の量や速度を比較する。また、血中のヘモグロビンやヘマトクリット値を測定し、回復度を比較した。

4. 研究成果

(1) マウス組織および細胞内のニコチアナミン (NA) およびその鉄錯体の検出: 細胞および小腸内での NA の定量は NA の FMOC 誘導化後、オービトラップ LCMS で測定する系を確立した。細胞やマウスに投与後の鉄はアイソトープ ^{59}Fe を用いて京都薬科大学で測定した。マウスに NA- ^{59}Fe 錯体を投与して、30 分後の小腸各部位の鉄濃度を比較し、近位空腸で最も鉄濃度が高かった。また、NA の定量を行った結果、鉄と同様に近位空腸で最も NA 濃度が高かった。鉄錯体の検出はセルロース薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて検出する方法を確立した。その結果、フリーの鉄は原点に留まるが、NA-鉄錯体になると展開される ($R_f=0.67$) ことがわかり、細胞内で NA は鉄錯体として検出された (図 3)。

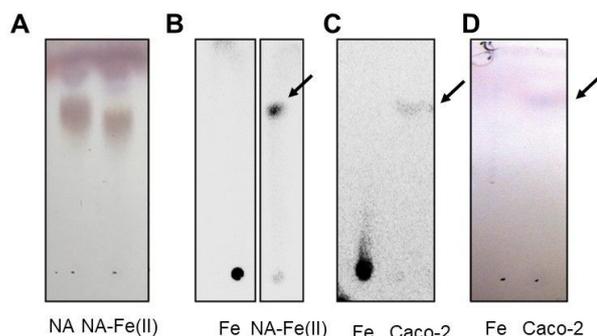


図 3. TLC による NA- $^{59}\text{Fe}(\text{II})$ 錯体検出: (A) ニンヒドリン染色(アミン検出): 1 mM アスコルビン酸を含む合成 NA(16.5 mM, 0.5 μL)および NA-Fe(II)(NA / Fe = 1,1,16.5 mM,0.5 μL)を検出。(B) 1 μL の 3.3 mM ^{59}Fe および NA- $^{59}\text{Fe}(\text{II})$ を TLC のオートラジオグラフィーで検出。(C, D) Caco-2 細胞において 1 mM NA- $^{59}\text{Fe}(\text{II})$ の投与後 30 分で抽出、TLC で検出。 ^{59}Fe は TLC のオートラジオグラフィーで検出(C)。NA はニンヒドリン染色で検出 (D)。NA-Fe(II)($R_f = 0.67$)に対応するバンドを矢印で示す。展開溶媒 MeCN:H₂O:AcOH = 1:1:0.2。

(2) NA 標識体合成と取り込み実験: NA の腸内への取り込みを観察するために、研究分担者はダンシル標識 NA を合成し、標識体を MS と NMR で、その鉄錯体を MS で生成を確認した。NA 鉄錯体を吸収するトランスポーターとして同定したアミノ酸トランスポーター PAT1 や トウモロコシでの NA 鉄錯体輸送トランスポーター ZmYS1 を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞にダンシル標識 NA 鉄錯体を 30 分反応後、凍結切片を作成して顕微鏡観察し、卵母細胞内部にダンシル基の蛍光を確認した。

(3) トランスポーターの探索: 小腸での吸収に関わる SLC (Solute carrier) ファミリーの中から、オリゴペプチド、アミノ酸などのトランスポーターを中心にスクリーニングし、プロトン共役型アミノ酸トランスポーター (PAT1, SLC36A1) が NA-Fe(II) 錯体の輸送活性を有することを、アフリカツメガエル卵母細胞 (oocytes) に PAT1 を発現させて確認した。形質膜マーカーであるカルシウム ATPase (PMCA) と PAT1 抗体の二重染色により、形質膜に PAT1 の発現を確認した oocytes を用いて、NA-Fe(II) 錯体の濃度依存的輸送活性を測定し、 $K_m = 49.4 \mu\text{M}$ の活性を示した (図 4)。また、小腸上皮の基底側にある NA 鉄錯体の排出トランスポーターを同定するため、その候補遺伝子を NA 鉄錯体投与したマウス小腸および Caco-2 細胞の定量 PCR や次世代シーケンサーのトランスクリプトーム解析によりアミノ酸排出トランスポーターに絞り込んだ。

(4) マウスでの NA 鉄錯体投与による鉄吸収: NA- $^{59}\text{Fe}(\text{II})$ または $^{59}\text{Fe}(\text{II})$ の経口投与後 30 分の小腸での各部位での鉄の濃度を測定した。その結果遊離鉄投与では二価金属トランスポーター (DMT1) によって十二指腸で吸収されるが、NA 鉄錯体は近位空腸に発現しているアミノ酸トランスポーター (PAT1) により吸収されており、吸収場所が異なることを明らかにした (図 5)。

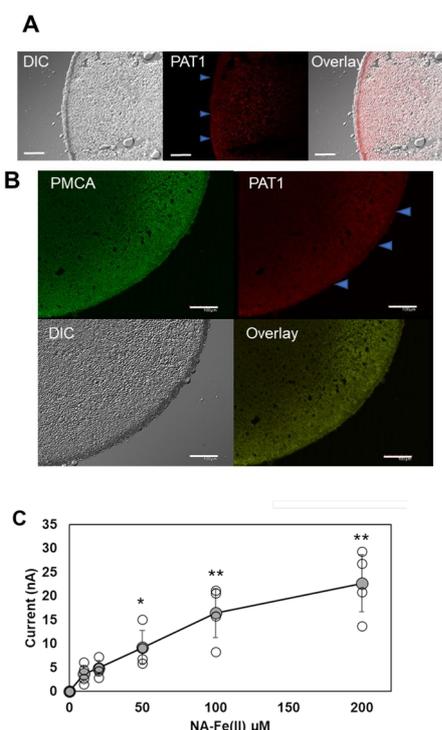


図 4. アフリカツメガエル卵母細胞におけるヒト PAT1 の発現と NA-鉄錯体の輸送活性: ヒト PAT1cRNA を注入した卵母細胞で抗体染色によって検出された (赤色) (A)。原形質膜マーカー Ca²⁺ ATPase (PMCA) (緑色) による同時免疫染色を行い、局在が同じ (overlay 黄色) であった (B)。スケールバーは 100 μm 。その細胞を用いて NA-鉄錯体の輸送活性を濃度別に測定した (C)。

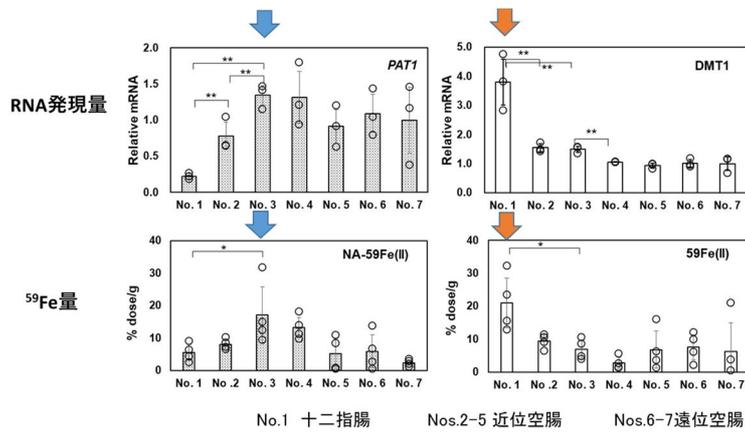


図5. マウス腸のさまざまなセクションにおけるPAT1およびDMT1の相対的発現と鉄含有量：マウスの小腸は、十二指腸 (No. 1)、近位空腸 (No. 2-5)、遠位空腸 (No. 6-7) および回腸 (No. 8-10) に定義された10のセクション (No. 1-10) に分割した。PAT1とDMT1のmRNAレベルとNA-59Fe(II)または59Fe(II)の経口投与30分後の59Fe放射性鉄濃度の取り込み量を比較した (n = 4, * P < 0.05)。

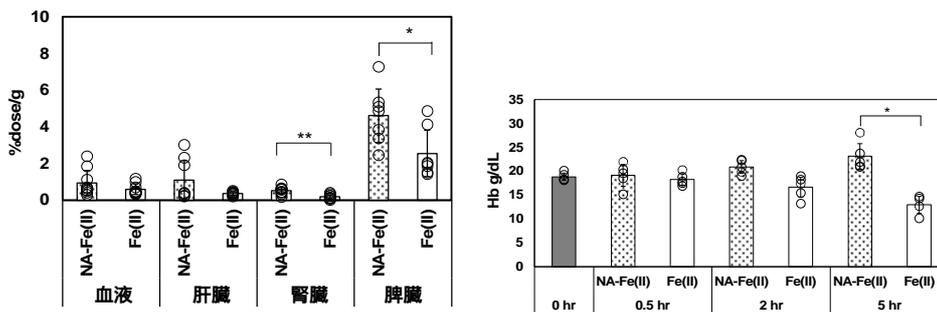


図6. マウスにおけるNAの鉄吸収効果：NA鉄錯体と鉄投与の投与5時間後における血液、肝臓、腎臓、脾臓の⁵⁹Fe取り込み量とヘモグロビン値の比較 (n = 7-9, *P < 0.05, **P < 0.01)。

マウスに同濃度の⁵⁹FeをNA錯体とフリーで各々経口投与した。投与5時間後においてNA鉄錯体の方が腎臓、脾臓で有意に鉄の取り込み量が多かった。また鉄のみ投与ではヘモグロビン値が時間とともに低下したがNA鉄錯体は安定していた(図6)。

以上の結果から、近位空腸のアミノ酸トランスポーター(PAT1)によりNA鉄錯体が主に吸収され、既知の二価金属トランスポーター(DMT1)によって遊離Fe(II)が吸収される十二指腸とは吸収場所が異なることが示唆された。これらの結果は*J. Biol. Chem.*に受理され、さらにEditor's Pickに選ばれた。哺乳動物における鉄の植物由来のキレート錯体を介した小腸の異なる部位での新しい鉄吸収機構が見いだされた(図7)。今後はNA鉄錯体の排出トランスポーターの同定と輸送経路を明らかにし、鉄欠乏症、鉄過剰症への応用を検討する。

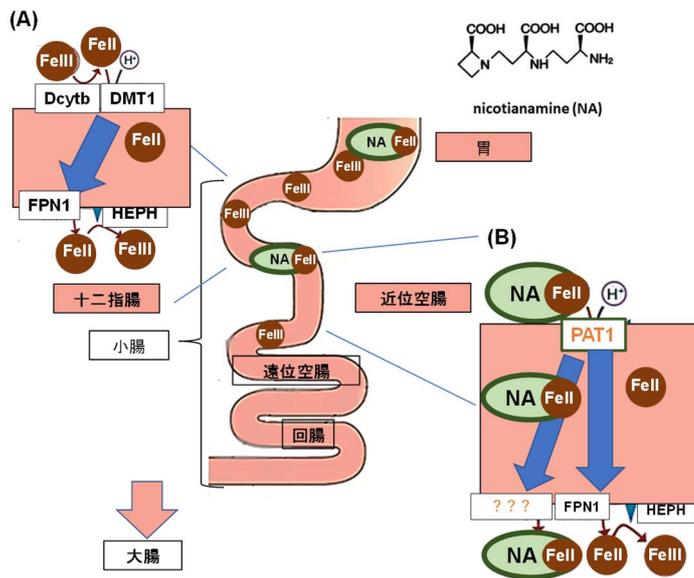


図7. 哺乳類の鉄吸収メカニズムの提唱：植物性食品から摂取された鉄は、十二指腸チトクロームB(Dcytb)によって十二指腸で鉄に還元され、二価金属輸送体1(DMT1)によって吸収される(A)。ニコチアミン(NA)-Fe(II)錯体は、近位空腸のアミノ酸トランスポータープロトン結合アミノ酸トランスポーター1(PAT1)によって吸収されることを示した(B)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Murata Yoshiko, Yoshida Masami, Sakamoto Naho, Morimoto Shiho, Watanabe Takehiro, Namba Kosuke	4. 巻 296
2. 論文標題 Iron uptake mediated by the plant-derived chelator nicotianamine in the small intestine	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100195 (1~12)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.015861	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村田佳子、屋木祐亮、木村寛之、吉田雅美、渡辺健宏、難波康祐
2. 発表標題 植物由来のキレート化合物、ニコチアナミンによるマウスでの鉄吸収効果
3. 学会等名 第30回日本微量元素学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田佳子、吉田雅美、渡辺健宏、難波康祐
2. 発表標題 植物性キレート化合物ニコチアナミンによる小腸での鉄吸収
3. 学会等名 第92回日本生化学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田佳子
2. 発表標題 イネ科植物の根から分泌されるムギネ酸の研究展開
3. 学会等名 植物化学研究会・農薬バイオサイエンス研究会共催シンポジウム「植物科学シンポジウム」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 茅野公佳、堤 大洋、小笠千恵、村田佳子、Karanjit Sangita、難波 康祐
2. 発表標題 植物体内の鉄輸送機構解明に向けたニコチアナミンプロープの開発研究
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

野菜に含まれる成分ニコチアナミンによる小腸での鉄の取り込み機構 J. Biol. Chem.に掲載
http://www.sunbor.or.jp/topics/file/topics_2021_01.pdf
 イネ科植物の根から分泌されるムギネ酸の合成類縁体による環境に優しい次世代肥料の開発
http://www.sunbor.or.jp/topics/file/topics_2021_02.pdf
 公益財団法人サントリー生命科学財団・研究事業
<http://www.sunbor.or.jp/>

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	難波 康祐 (Namba Kosuke) (50414123)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授 (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------