

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23248020

研究課題名(和文) 亜鉛の味覚障害改善機構及び摂食障害正常化機構の解明

研究課題名(英文) Role of zinc supplementation on improving activity of taste abnormality and anorexia

研究代表者

駒井 三千夫 (KOMAI, MICHIO)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80143022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 29,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの味覚異常の原因の一つに亜鉛酵素の炭酸脱水酵素(CA)の低下があることを明らかにしてきた。この研究では、食餌亜鉛によって味覚異常と食欲不振が回復する機構を探った。摂食障害の正常化機構については、腸粘膜における亜鉛センサーとして亜鉛トランスポーター「ZIP4」あるいはGPR39が関与している可能性もある。検討の結果、CAの活性化は、ZnTを介した何らかの特異的な亜鉛輸送機構により制御されていることが明らかとなった。また、耳下腺唾液中の炭酸脱水酵素(CA)型(Gustin)が味覚異常患者では少なくなっていることを証明した。これらの結果は、臨床適用にとっても極めて有効な成果となった。

研究成果の概要(英文)：We have clarified that carbonic anhydrase, a zinc enzyme, is a key factor to normalize taste abnormality and anorexia. Actually, immunochromatograph measurement of salivary CA 6 (gustin) of the taste abnormal patients showed the lower activity than healthy subjects. After trying to clarify this mechanism, it has been shown that one of the ZnTs transporter may be involved in this mechanism to activate CA and normal taste sensation. These results provided much more adequate and better therapy information for human taste disorder by zinc deficiency.

研究分野：農芸化学、食品科学

キーワード：亜鉛 炭酸脱水酵素(CA) 唾液 CAVI ZnTs ZIP4

## 1. 研究開始当初の背景

亜鉛は多種類の亜鉛酵素や遺伝子の Zinc-finger 構造などの構成成分として多様な生理作用を触媒、調節する必須微量元素である。亜鉛含有タンパク質は、今や 3000 種類以上も同定されているが (*J. Proteome Res.*, **5**, 196-201, 2006、図 1)、亜鉛栄養状態は、次頁の図 2 に示すように各種疾病の発症に深く関与している (*Mutation Res.*, **622**, 84, 2007)。我々はこれまで、ラットでの亜鉛不足状態では味覚異常が起こることを確認し (*J. Nutr.*, 2001 など)、その原因の一つに亜鉛酵素の炭酸脱水酵素 (Carbonic Anhydrase = CA) の低下があることを証明した (*Biomed. Res. Trace Elements*, 2010、など)。これまでに発表されたデータから、亜鉛欠乏時には唾液中の CA VI の分泌濃度が低いこと (島崎ら, 2009; Goto, T. et al., 2000)、味受容膜における CA 活性が低いこと (Goto, T. et al., 2000)、摂食中枢における食欲調節神経ペプチド分泌の変化 (亜鉛不足時の食欲亢進ペプチドの発現低下、食欲抑制ペプチドの発現上昇 = 未発表) などが、我々も含めた国内外の研究で確認されつつある。

## 2. 研究の目的

我々はこれまで、ラットの味覚異常の原因の一つに亜鉛酵素の炭酸脱水酵素 (Carbonic Anhydrase = CA) の低下があることを神経生理学的な手法で証明した。これまでの報告から、亜鉛欠乏時には唾液中の CA VI の分泌濃度が低いこと、味細胞受容膜における CA 活性が低いこと、摂食中枢における食欲調節神経ペプチド分泌の変化、などが予測される。亜鉛補給によってこれらの異常が回復する機構を探る。また、摂食障害の正常化機構の解明については、亜鉛欠乏時の摂食障害は、亜鉛の腹腔内投与では回復しないが、経口投与の場合にのみ回復することを証明した。これには、腸粘膜における亜鉛センサーとして亜鉛トランスポーター「ZIP4 と ZIP5」あるいは GPCR の GPR39 が関与している可能性もある。これらのメカニズムを探り、これを各種味覚異常・食欲異常の改善の実用化に役立てる。

最初の味覚異常に関する研究では、味覚異常は亜鉛投与によって改善できるものの、ヒト臨床の成果では血清亜鉛濃度が高い場合でもその個人によっては亜鉛が不足気味の人が 2~3 割程度みられ、必ずしも血清亜鉛濃度が亜鉛栄養状態の指標とはいえない。そこで、今回亜鉛機能性タンパク質として、二つ目は味覚に深く関係する亜鉛酵素である炭酸脱水酵素 (CA) をターゲットとして、その唾液中への分泌と味細胞膜での発現を、亜鉛栄養状態の違いによる変化をモニターする。もう一つは、この CA 酵素の分泌における味細胞膜および唾液腺における ZIP4/ZIP5 の役割をターゲットとして、CA 酵素の発現

機構を明らかにすることである。なぜならば、数多くある亜鉛酵素のうち CA は唯一味受容と関係していることが明白な酵素だからである。

ラットでは唾液中に分泌される CA 量と舌上皮の味受容膜における CA 活性発現が、どのように亜鉛栄養状態に変化するのかわかりにくく、ヒトでの亜鉛欠乏症を判定する上でより簡単に検出できる方法、たとえば唾液中に分泌される CA タンパク質の簡易検出法などを確立して、より良い亜鉛欠乏指標を探ることが目的の一つである。もう一つは、消化管亜鉛センサー介在性シグナルの検出である。

## 3. 研究の方法

### (1) ラット及びヒトでの炭酸脱水酵素活性に関する検討:

我々は、亜鉛欠乏性味覚障害の原因の一つに亜鉛酵素である炭酸脱水酵素 (Carbonic anhydrase: 以下 CA) 活性の低下があることを示してきた。そこで本研究では、ラットに程度の異なる亜鉛欠乏食を給餌し、味覚障害の発症を行動学的に追跡し、亜鉛欠乏性味覚障害のより有効な生理指標を検討することを目的とした。

SD 系雄ラット 4 週齢を、亜鉛含量の異なる実験食 (欠乏食 2 ppm、ペアフェッド対照群 33 ppm、低亜鉛群 4 ppm、亜鉛十分群 33 ppm) と精製水にて 2、4、6、8 週間それぞれ飼育した。実験 2. 実験 1 と同様、SD 系雄ラット 4 週齢を、同じ 4 群に分け、6 週間飼育した。

### (2) ヒト唾液での炭酸脱水酵素アイソザイム活性に関する検討:

耳下腺唾液中 37kDa 亜鉛結合タンパク質である炭酸脱水酵素 (CA) 型 (Gustin) が味覚機能に関与するとの報告に基づき、唾液を検体とした CA 抗体によるイムノクロマト測定値と血清亜鉛値との関連について検討した。

### (3) 炭酸脱水酵素の活性化機構に関する検討:

CA の活性化には分泌経路に局在する ZnT4、ZnT5、ZnT6、ZnT7 の 4 つの亜鉛トランスポーターが重要な役割を果たす。これら 4 つの ZnT を全て欠失させた細胞株に発現させた CA の活性化機構について検討した。

## 4. 研究成果

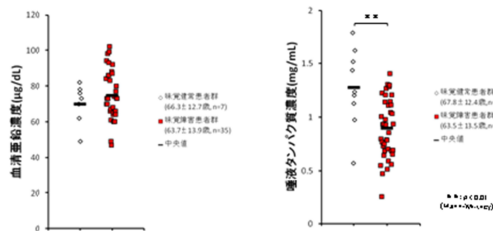
### (1) ラット及びヒトでの炭酸脱水酵素活性に関する検討:

PF 群に比べて Zn-Def 群で、塩酸キニーネ選択率は 8 週目まで有意に増加し、味受容能低下が示唆された。血漿亜鉛濃度は 2 週目、唾液分泌量は 8 週目、顎下腺中 CA 活性は 6 週目から、PF 群に比べて Zn-Def 群で有意に低下した。また、塩酸キニーネ選択率と血漿亜鉛濃度、塩酸キニーネ選択率と唾液分泌量の

間には有意な相関が認められないのに対し、塩酸キニーネ選択率と顎下腺中 CA 活性の間には有意な負の相関が認められた。実験 2、PF 群に比べて Zn-Def 群で、塩酸キニーネ選択率は 9 日目頃から上昇し、味受容能低下が示唆された。唾液中 CA 活性は、PF 群に比べて Zn-Def 群で 5 週目から有意に低下した。特に、塩酸キニーネ選択率が 50% 以上の、味受容能低下が認められた Zn-Def 群の 2 個体においては、唾液中 CA 活性が著しく低下しており、その低下時期は他の個体より早期であった。

以上の結果より、亜鉛欠乏性味覚障害を呈するラットの生理指標として、顎下腺中 CA 活性が有効であることが示された。さらに、血液より採取が容易である唾液中 CA 活性も、顎下腺中 CA 活性同様に、味覚障害の生理指標として有効である可能性が示された。その応用としてヒト唾液中タンパク質濃度を測定したところ想定通りの結果が得られ(図 1)、今後の炭酸脱水酵素の研究に展開できることになった。

血清亜鉛濃度は味覚障害の指標とはなっていない!  
(唾液中のタンパク質濃度は良い指標となる)



相澤正浩1, 佐藤しづ子2, 島崎伸子3, 富田 寛4, 後藤知子1, 白川仁1, 駒井三千夫1:  
(未発表)2015年(1東北大・院農・駒井研, 2院畜・笹野研, 3若手医大, 4日富田医院、との共同研究)

### 図 1 血清亜鉛濃度は味覚障害の指標とはなっていない!

#### (2) ヒト唾液での炭酸脱水酵素アイソザイム活性に関する検討:

耳下腺唾液中 37kDa 亜鉛結合タンパク質である炭酸脱水酵素 (CA) 型 (Gustin) が味覚機能に関与するとの報告に基づき、唾液を検体とした CA 抗体によるイムノクロマト測定値と血清亜鉛値との関連について検討した。

味覚障害患者 31 名( 富田耳鼻咽喉科提供 )を対象に、サンプルを耳下腺唾液とし、濾紙ディスク法による味覚閾値、血清亜鉛値を測定した。各々唾液サンプルと抗体感作金コロイド溶液と混合し、それぞれ発色確認後、イムノクロマトリーダにて測定した。

味覚障害者の発色反応を計測したイムノクロマト測定値 (mABS) と血清亜鉛値との間には、有意な正の相関 (  $R=0.398$ ,  $P<0.05$  ) が認められた(図 2)。すなわち、唾液サンプル中に CA が少ない場合は発色反応が薄くなり、味覚障害の可能性のあることになる。CA の味覚機能へ関与についての駒井らによ

る一連の報告があることから、耳下腺唾液中亜鉛結合タンパク質の測定は、亜鉛欠乏性味覚障害の診断の根拠になりうるものと考えられる。

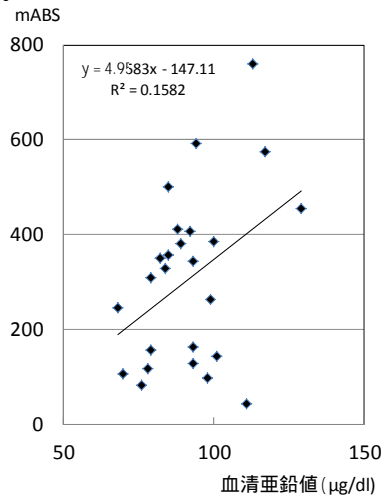


図 2 . イムノクロマト値と血清亜鉛値の相関性

#### (3) 炭酸脱水酵素の活性化に関する検討:

CA の活性化機構を調べるために、分泌経路に局在する ZnT4、ZnT5、ZnT6、ZnT7 の 4 つの亜鉛トランスポーターの ZnT を全て欠失させた細胞株を用いて検討した。その結果、発

現させた CA の活性は、それぞれの ZnT の野生型を発現させると回復したが、亜鉛輸送活性を消失させた変異体を発現させても回復させることはできなかった。さらに、この変異体発現株に大過剰の亜鉛を加えて培養しても、CA 活性を回復させることができなかった。これらの結果から、CA の活性化には、ZnT によって CA 近傍の亜鉛濃度が高まった結果起こる受動的な機構ではなく、ZnT を介した何らかの特異的な機構により制御されていることが明らかとなった。今後展開すべき焦点が分かったので、新たな進展が可能となった。

#### 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 6 件 )

Kambe, T., Hashimoto, A., Fujimoto, S.: Current understanding of ZIP and ZnT4 zinc transporters in human health and diseases. Cell. Mol. Life Sci., 71 巻, 3281-3295, 2014 ( 査読有 )

DOI: 10.1007/s00018-014-1617-0

Fujimoto, S., Itsumura, N., Tsuji, T., Kambe, T., et al.: Cooperative functions of ZnT1, metallothionein and ZnT4 in the cytoplasm are required for full activation of TNAP in the early secretory pathway. PLOS ONE, 8, e77445

(1-12), 2013. (査読有)

DOI:10.1371/journal.pone.0077445

島崎伸子、富田 寛、山森徹雄、ほか 5 名  
「唾液中亜鉛結合タンパク質を用いた味覚  
障害スクリーニング法」、日本味と匂学会誌、  
20 巻、345-346, 2013. (査読有)

DOI: なし。

後藤知子、住友将洋、白川 仁、駒井三千夫  
「亜鉛欠乏食給餌ラットにおける摂食お  
よび自発行動量の解析」、日本味と匂学会誌、  
20 巻、343-344, 2013. (査読有)

DOI: なし。

島崎伸子、富田 寛、石橋寛二、ほか 4 名：  
「唾液中亜鉛結合タンパク質（炭酸脱水酵素  
VI 型）検出イムノクロマト法の基礎的検討」  
日本味と匂学会誌、18 巻、485-486, 2011. (査  
読有) DOI: なし。

後藤知子、鮫島次郎、白川仁、駒井三千夫：  
「食餌中亜鉛が 2 型糖尿病モデル GK ラットの  
摂食量とインスリン分泌に及ぼす影響」、  
日本味と匂学会誌、18 巻、325-326、2011  
(査読有) DOI: なし。

〔学会発表〕(計 7 件)

相澤正浩、後藤知子、白川仁、島崎伸子、  
駒井三千夫：「ヒト唾液における炭酸脱水酵  
素活性の解析」、日本味と匂学会第 48 回大会、  
平成 26 年 10 月 2 日、静岡市清水区。

駒井三千夫：「微量栄養素と健康」、第 68  
回日本栄養・食糧学会大会 教育講演、平成  
26 年 6 月 1 日) 北海道江別市。

駒井三千夫：「微量栄養素の新規機能の解  
明に関する研究」、第 68 回日本栄養・食糧学  
会大会学会賞受賞講演、平成 26 年 5 月 30 日、  
北海道札幌市中央区。

西村沙奈恵、後藤知子、白川仁、駒井三千  
夫：「妊娠期における亜鉛欠乏が成熟後のラ  
ットの糖代謝に及ぼす影響」、第 24 回日本微  
量元素学会学術集会、平成 25 年 6 月 29 日、  
大阪府吹田市

大沼由佳、後藤知子、白川仁、駒井三千  
夫：「亜鉛欠乏食給餌ラットにおける味覚障  
害の生理指標解析」、第 23 回日本微量元素学  
会、平成 24 年 7 月 6 日、東京都新宿区。

駒井三千夫、後藤知子、大日向耕作、白川  
仁：「低亜鉛栄養状態と味覚・摂食調節異常」、  
第 23 回日本微量元素学会、平成 24 年 7 月 5  
日、東京都新宿区。

大沼由佳、後藤知子、白川仁、駒井三千夫：  
「亜鉛欠乏性味覚障害ラットの生理指標解  
析」、第 66 回日本栄養・食糧学会大会 (仙  
台、平成 24 年 5 月 19 日、仙台市青葉区。

〔図書〕(計 4 件)

駒井三千夫、神戸大朋 責任編集：「亜鉛  
の機能と健康」、1-239 頁、建帛社刊、平成  
25 年 5 月 20 日。ISBN987-4-7679-6171-2

駒井三千夫：「序章：亜鉛の多彩な生理機  
能」、1-17 頁、「第 4 章：亜鉛の味覚・食欲調  
節機能」、109 - 130 頁、(駒井・神戸責任編集

「亜鉛の機能と健康」、建帛社刊、平成 25  
年 5 月 20 日。ISBN987-4-7679-6171-2 (分担  
執筆 2 章分)

神戸大朋：「第 6 章：消化管における亜鉛  
吸収のメカニズム」、151-168 頁、「終章：今  
後の展望」、223 - 233 頁、(駒井・神戸責任編  
集「亜鉛の機能と健康」、建帛社刊、平成 25  
年 5 月 20 日。ISBN987-4-7679-6171-2 (分担  
執筆 2 章分)

駒井三千夫：「亜鉛 その必須性と解毒機  
能を含めた多機能性」、日本食品衛生協会発  
行「食品中の微量元素」、9 - 23 頁、平成 25  
年 4 月 1 日。ISBN987-4-88925-057-2

〔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：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

駒井 三千夫 (KOMAI, MICHIO)

(東北大学・大学院農学研究科・教授)

研究者番号：80143022

(2) 研究分担者

・後藤 知子 (GOTO, TOMOKO)

(東北大学・大学院農学研究科・助教)

研究者番号：00342783

・島崎伸子 (Shimazaki, Nobuko)

(岩手医科大学・歯学部・研究員)

研究者番号：30337258

・白川 仁 (SHIRAKAWA, HITOSHI)

(東北大学・大学院農学研究科・准教授)

研究者番号：40206280

・磯野邦夫 (Isono, Kunio)

(東北大学・大学院農学研究科・その他)

研究者番号：70124550

・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

(3)連携研究者  
なし。

( )  
研究者番号：