

令和元年6月21日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01927

研究課題名(和文) ムギネ酸前駆体による哺乳類の腸管鉄吸収の分子機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of intestinal iron absorption in mammals by mugineic acid precursor

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：イネ科植物における土壌中の鉄吸収に重要なムギネ酸の前駆体であるニコチアナミン(NA)は、すべての植物体内における鉄のキレーターとして鉄輸送を担っており、植物性食物に豊富に含まれる。本研究では哺乳動物の小腸においても植物と同様にNAによる鉄錯体の吸収・輸送機構が存在するという企図に基づき、遺伝子解析や細胞輸送活性実験により空腸上皮細胞に存在するアミノ酸トランスポーターがNAによる鉄錯体を輸送することを見出した。鉄のみは主に十二指腸でNA鉄錯体はアミノ酸トランスポーターが存在する近位空腸でと小腸での吸収場所が異なる。この発見から、哺乳動物における全く新しい鉄輸送の分子機構のさらなる解明を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物性キレート化合物の鉄錯体トランスポーターが同定できれば、これまでの鉄輸送遺伝子1種類の鉄吸収機構だけでは説明できない疑問の解明により、学術的な突破口を開くことになる。我々がこれまで成果を挙げてきたイネ科植物のムギネ酸類鉄錯体トランスポーター研究やヒトでの微量元素研究を足がかりに、哺乳動物の腸からの鉄錯体吸収とその後の体内輸送の分子機構をトランスポーターの分子レベルの基質認識に基づいて理解し、応用研究に発展できる。

研究成果の概要(英文)：Nicotianamine (NA), a precursor of mugineic acid important for soil iron absorption in grasses, is responsible for iron transport as a chelator of iron in all plant bodies and is abundantly contained in vegetable foods. In this study, the amino acid transporter PAT1 present in the epithelial cells of small intestine is transporter of NA-Fe(II) complex by genetic analysis and cell transport activity experiment. When mice were orally administered with NA-59Fe(II), the highest iron content was found at the proximal jejunum of the intestine, the location where PAT1 was primarily expressed. In contrast, iron content was not prominent in the duodenum, the location where the divalent metal transporter SLC11A2 (DMT1) is expressed and absorbs free Fe(II). From these findings, we aim to further elucidate the molecular mechanism of a new iron transport in mammals.

研究分野：生化学

キーワード：鉄 ムギネ酸 ニコチアナミン 植物性食物 小腸 錯体 トランスポーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 鉄はヒトの体に最も豊富に含まれる重金属元素であり、酸化還元酵素の中心金属として重要な役割を担っている。それにも関わらず、世界の栄養障害で最も多いものが鉄欠乏症である。特に、日本人を含むアジアの人々は、鉄の 85 % 以上を植物性食物から摂取しており、植物に含まれる鉄の吸収は必要不可欠である。

(2) ヒトにおける鉄吸収は主に十二指腸で行われるが、それに関わるトランスポーターが同定され、植物性食物と動物性食物での各々異なった機構が報告されている。申請者らが注目しているニコチアナミンは、ムギネ酸類の前駆体であり、植物生体内において二価鉄の輸送を担っているが、土壌からの鉄吸収には関与しない。豆類(キヌサヤ 77 mg/乾物 100g)に最も多く、ソバ、イネ、クコ、カボチャ、ナス、トマトなど広く植物界に分布している。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哺乳動物の腸での吸収メカニズムは未解明であり、この点に注目した。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、さらにそれらに特異的な鉄錯体のトランスポーターが存在すると考えた。

2. 研究の目的

(1) 小腸における植物性食物からの鉄吸収の分子機構研究が多く報告されている。本研究では、哺乳動物の小腸においても植物と同様にニコチアナミンによる鉄錯体の吸収・輸送機構が存在するという企図によるこれまでの研究結果に基づき、関連するトランスポーターを同定することによって、哺乳動物における全く新しい鉄輸送の分子機構を解明することを目指す。

(2) 研究代表者らがこれまで成果を挙げてきたイネ科植物のムギネ酸類鉄錯体トランスポーター研究やヒトでの微量元素研究を足がかりに、哺乳動物の腸からの鉄錯体吸収とその後の体内輸送の分子機構をトランスポーターの分子レベルの基質認識に基づいて理解し、応用研究に発展させる足がかりとする。

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およびその鉄錯体の検出：ニコチアナミンの定量分析を LC-MS で、高精度定性分析をオービトラップ MS で行い、鉄濃度は誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) またはアイソトープ ^{59}Fe を用いて測定し、食物と腸管などの組織での植物内在性キレート化合物の検出を行った。

(2) トランスポーターの同定：腸またはその上皮細胞での SLC ファミリーホモログ検索や小腸モデル細胞である *caco-2* 細胞にニコチアナミンや鉄錯体を投与して鉄の定量や遺伝子を次世代シーケンサーにより比較し、トランスポーターを探索した。候補遺伝子はアフリカツメガエル卵母細胞に発現させてニコチアナミン鉄錯体の輸送を電気生理活性および ^{59}Fe 取り込み活性により、検証した。

(3) 動物投与実験による小腸での鉄吸収の比較：ニコチアナミンおよび鉄錯体を投与したマウスの十二指腸上皮や血漿中のニコチアナミンの定量や、小腸を十二指腸、空腸、回腸など部位に分けて、鉄のみまたはニコチアナミンと鉄同時投与後 30 分における鉄の濃度と遺伝子解析を行った。

4. 研究成果

(1) 小腸吸収モデル細胞、*caco-2* 細胞でのアッセイ：*caco-2* 細胞を 1 層にするために Millicell24 ウェルセルカルチャープレートに培養し、そのアピカル側の培地にニコチアナミン鉄錯体 (NA- ^{59}Fe (II)) (NA:Fe=10:1; NA1 mM + ^{59}Fe 0.1 mM) または ^{59}Fe 0.1 mM を pH を変えて各々添加し、37 度 CO_2 インキュベーターで 1 時間培養した。細胞または基底側の緩衝液を回収して各々アイソトープをカウントした結果、pH 6.0 の酸性で鉄も NA-鉄錯体も輸送活性が高かった(図 1)。このことは小腸で鉄を輸送することが知られている 2 価鉄トランスポーター hDMT1 と同様に NA-鉄錯体のトランスポーターもプロトン駆動輸送体であることが示唆された。また、NA-Fe(II) 投与のほうが鉄のみより細胞中の鉄濃度は低かったが(図 1a)、基底側(血管側)への輸送量は増加していた(図 1b)。このことは NA-鉄錯体のほうが細胞に留まらずに、血中に鉄が輸送されやすいことを示唆している。

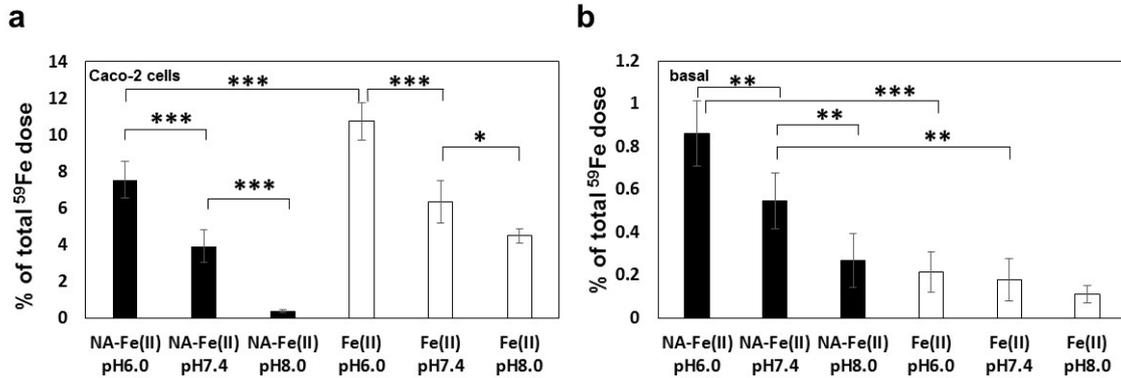


図1 Caco-2細胞での⁵⁹Fe投与実験：NA-⁵⁹Fe(II)（黒）および⁵⁹Fe(II)（白）を投与した(a)細胞内および(b)基底側バッファの⁵⁹Feカウントの投与量に対する割合。(n = 4 *P < 0.05, **P < 0.005, ***P < 0.001)

(2) トランスポーターの同定：前は植物のニコチアナミン鉄錯体がオリゴペプチドトランスポーターファミリーに属していたので、小腸上皮に発現しているオリゴペプチドトランスポーターhPEPT1の輸送活性をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させて測定したが、活性が見られなかった。今回、小腸のなかでも空腸上皮に存在するアミノ酸トランスポーターhPAT1の輸送活性を同様に測定したところ、ニコチアナミン(NA)はコントロールのプロリン(Pro)同様に活性があり(図2 a, b)、ニコチアナミン鉄錯体(NA-Fe(II))(図2 a, c)はさらに高い活性を示した。

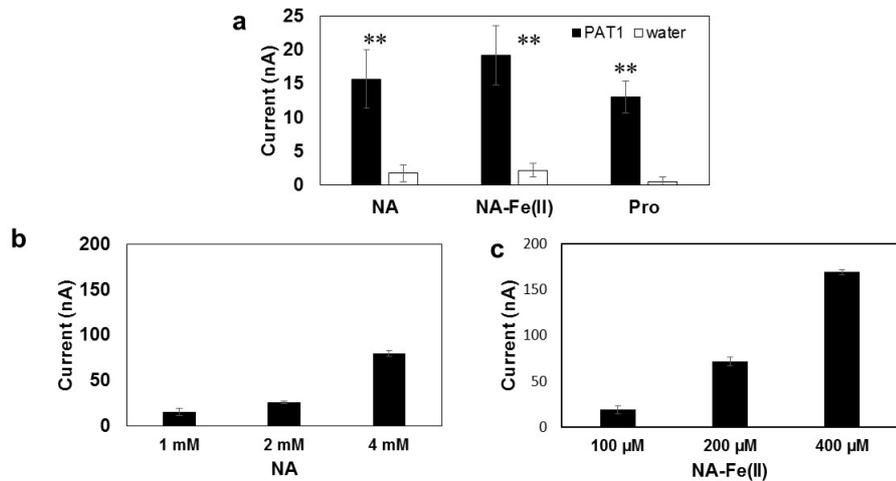


図2 アミノ酸トランスポーターhPAT1を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞におけるNAおよびNA-Fe(II)の輸送活性：(a) hPAT1を発現させた卵母細胞（黒）と水injection（白、コントロール）の1mM NA (n=7), 100 μM NA-Fe(II) (1 mM NA:100 μM Fe) (n = 6)または1 mM proline (n = 7)の輸送活性, **P < 0.01. (b) NA (1, 2, and 4 mM) (n = 3-7) (c) NA-Fe(II) (100, 200, and 400 μM) (n = 3-6)の輸送活性。

(3) マウス投与実験：マウスにNA 1mg (3.3 mM)/1 ml を経口投与し、投与後の10分、20分、30分後の十二指腸上皮のNA(図3 a)と投与後0.5, 1, 2, 5時間後の血漿中のNA(図3 b)をF-MOC標識化してLC-MSで分析した。その結果、十二指腸は投与10分後が最大で約180 μM、血漿は投与1時間後約8 μMのNAを検出した。この結果、経口投与したNAが小腸から血中に吸収され、2時間後以降減少し、各臓器に移動または排出されると考えられた。アイソトープ⁵⁹-Feを用いて、鉄のみおよび鉄とNAを同時に投与したマウスにおいて、小腸の各部位や他の臓器の鉄取り込み量を比較することにより、NAが鉄吸収にどのように影響するかについて検討した。硫酸第二鉄(3.3 mM; 2% Fe-⁵⁹硫酸塩含有)およびNA(33 mM)との混合物を1mMアスコルビン酸添加したPBS(pH 7.4)溶液を作成し、各マウスに本溶液0.1 mLを胃ゾンデで経口投与し、投与30分、2時間、5時間後の各臓器の鉄吸収を測定した(n=5)。また投与30分後に小腸を十二指腸、近位空腸、遠位空腸などの10の部位に分割し、内腔洗浄後、それらのアイソトープ鉄吸収と鉄関連遺伝子の解析を行った。その結果、⁵⁹Feのみは2価鉄トランスポーターDMT1が局在する十二指腸で、NA添加⁵⁹Feはアミノ酸トランスポーターPAT1など

が局在する近位空腸で最も多く検出され、吸収場所が異なることが示唆された。以上の結果から、マウスに鉄とNAを同時に投与すると、近位空腸で鉄が吸収されると考えられた。

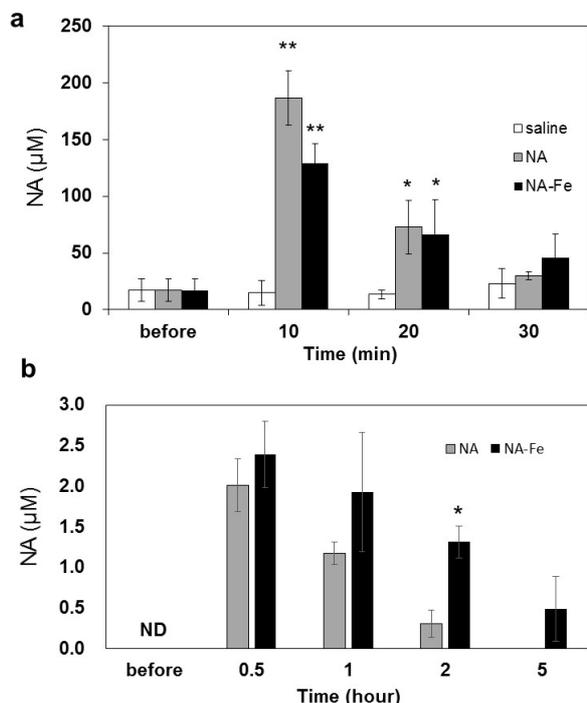


図3 マウスにニコチアナミン (NA) またはNA-Fe(II)錯体 (33 mM in 0.1 ml of saline buffer)を投与した(a) 十二指腸上皮と(b)血漿のニコチアナミンの定量 (n = 3). ND means not detected. *P < 0.05, **P < 0.001.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

Harada E, Sugase K, Namba K, Murata Y. The helical propensity of the extracellular loop is responsible for the substrate specificity of Fe(III)-phytosiderophore transporters. *FEBS Lett.* **590** (24):4617-4627. doi: 10.1002/1873 - 3468.12482. (2016). 査読有り

Hayashi T., Osawa A., Watanabe T., Murata Y., Nakayama A., Namba K. Development of 1,3a,6a-Triazapentalene-labeled Enterobactin as a Fluorescence Quenching Sensor of Iron Ion. *Tetrahedron Letters*, **58**, 1961-1964 (2017). 査読有り

Namba K, Murata Y. Organic Chemistry Research on the Mechanistic Elucidation of Iron Acquisition in Barley. *Biol Pharm Bull.* **41**(10):1502-1507 (2018). doi: 10.1248/bpb.b18-00070. 査読有り

〔学会発表〕(計 7件)

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効果。村田佳子、吉田雅美、渡辺健宏、難波康祐 第40回日本分子生物学会年会 2018年11月28-30日(横浜)

Iron absorption in small intestine mediated by a plant-derived chelator nicotianamine. Yoshiko Murata, Masami Yoshida, Takehiro Watanabe, Kosuke Namba 19th International Symposium on Iron Nutrition and Interaction in Plants (ISINIP): 2018年7月9-13日台湾、中央研究院 (the Academia Sinica) Taipei

植物性食物由来のキレート化合物、ニコチアナミンによる小腸での鉄吸収 村田佳子、吉田雅美、渡辺健宏、難波康祐 第29回日本微量元素学会、名古屋大学大学院医学研究科 2018年7月7,8日

Effects of iron chelator from plant food for iron absorption in the intestine. Yoshiko Murata, Masami Yoshida, Takehiro Watanabe, Kosuke Namba, Hideo Saji, Hiroyuki Kimura 2017年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio (第90回日本生化学会大会・第40回日本分子生物学会年会他合同) 2017年12月6-9日 (神戸ポートアイランド)

小腸での植物性食物由来の鉄キレート化合物による鉄吸収 村田佳子、吉田雅美、渡辺健宏、難波康祐、佐治英郎、木村寛之 第28回日本微量元素学会学術集会 2017年7月29,30日(仙台)

植物性食物由来の鉄キレート化合物による小腸での鉄吸収効果 村田佳子、吉田雅美、

渡辺健宏、難波康祐、佐治英郎、木村寛之 第 27 回日本微量元素学会学術集会 2016 年 7 月 30,31 日 (京都)
新小腸の鉄吸収における植物性食物内の鉄キレート化合物の影響 村田佳子、本田 文、吉田雅美、渡辺健宏、難波康祐、佐治英郎、木村寛之 第 89 回日本生化学会大会 2016 年 9 月 25-27 日 (仙台)

〔図書〕(計 1 件)

村田佳子 第 20 章ムギネ酸 p133-140、化学のとびら 64 天然物の化学 II 自然からの贈り物 上村大輔編 東京化学同人(2018)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：新規な複素環含有アミノ酸化合物及びその用途

発明者：難波康祐、村田佳子

権利者：国立大学法人徳島大学

種類：特許

番号：PCT/JP2016/082374

出願年：2016

国内外の別：国際

名称：新規な複素環含有アミノ酸化合物及びその用途

発明者：難波康祐、村田佳子

権利者：国立大学法人徳島大学、愛知製鋼株式会社

種類：特許

番号：特願 2017-550268

出願年：2017

国内外の別：国際

取得状況 (計 1 件)

名称：新規な複素環含有アミノ酸化合物及びその用途

発明者：難波康祐、村田佳子

権利者：国立大学法人徳島大学、愛知製鋼株式会社

種類：特許

番号：第 6 3 4 7 3 9 6 号

取得年：2018 年 6 月 8 日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

www.sunbor.or.jp

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：難波 康祐

ローマ字氏名：NAMBA, kosuke

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部 (薬学部)

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：5 0 4 1 4 1 2 3

(2)研究協力者

研究協力者氏名：高橋 俊雄

ローマ字氏名：Takahashi, toshio

研究協力者氏名：渡辺 健宏

ローマ字氏名：Watanabe, takehiro

