

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350973

研究課題名(和文) 哺乳動物における植物内在性物質・ニコチアミンによる鉄輸送の分子機構解明

研究課題名(英文) Effects of iron chelator nicotianamine from plant food on iron absorption in intestine

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・その他部局等・研究員

研究者番号：60256047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物性食物、とくに豆類に多く含まれるニコチアミン(NA)は、生体内で生合成され、鉄と錯体を形成し、植物にとって生体内の鉄輸送に重要な役割を担う低分子有機化合物である。本研究では、哺乳動物が植物内在性鉄キレート化合物NAを摂取した際に、NAが小腸での鉄吸収にどのように影響するかを検討した。マウス投与実験により、NAが小腸で取り込まれた後、特定の組織、特に筋肉への鉄輸送に關与していることが示唆された。また、小腸上皮モデル細胞であるcaco-2細胞単層での鉄取り込み実験から、NAを鉄と同時に加えることにより、濃度依存的に細胞内の鉄排出量が増加していた。

研究成果の概要(英文)：Nicotianamine (NA) plays an important role as an iron chelator for transporting iron inside the plant. Plant foods such as beans and broccoli contain a large amount of NA. For elucidating the effects of NA upon iron absorption in human, we carried out in vitro assays for examining the uptake of NA and its 59Fe complex using caco-2 monolayer cells, which were widely used as a model for human intestinal absorption. The results revealed the NA-dependent increase of iron efflux, further suggesting that the Fe-NA complex transports iron to the basal side (the blood vessel side) via caco-2 cells. For in vivo assays showed that oral Fe-NA administrations to mice enhance the iron content of lung and stomach after two hours, and skeleton muscle after five hours. The difference in iron concentrations between iron only and Fe-NA complex by oral administration was significant in the mouse tissues, further suggesting that NA is implicated in iron trafficking in the human intestine.

研究分野：生化学

キーワード：鉄 ニコチアミン 植物性食物 キレート化合物 小腸

1. 研究開始当初の背景

(1) 鉄は、生体系において酸素運搬に必須であるのみならず、デオキシリボ核酸の合成等に必要酸化還元酵素の活性中心金属として重要な役割を担っている。一方、鉄は水に難溶性である三価として存在することが多く、そのため、生物は効率的に鉄を取り込む機構を発達させてきた。すべての生物種の鉄取り込み機構は、キレート型と還元型の2種に大別することができる。

(2) 我々の研究所は、これまでイネ科植物がファイトシデロフォアとして土壤に分泌しているムギネ酸類やその金属錯体の構造決定ならびに生合成を報告し、ムギネ酸類と三価鉄の錯体として取り込む機構を研究してきた。トウモロコシ由来のムギネ酸鉄錯体トランスポーターZmYS1が同定され(Curie C. *et al.*, (2001) *Nature*, 409, 346-349)、その同族体として、我々はオオムギから新規のムギネ酸鉄錯体トランスポーターであるHvYS1を同定し、その局在と鉄錯体選択的輸送活性を明らかにした(Murata Y., *et al.*, (2006) *Plant J.* 46, 563-572)。また、HvYS1に比べ、ZmYS1は金属およびファイトシデロフォア(ムギネ酸類とその前駆体、ニコチアミンも輸送)の特異性が低いので、これら2種トランスポーターについてキメラタンパク質を作成し、輸送選択性に関与する部位が6番目の膜外ループであることを突き止めた(Harada E., *et al.*, (2007) *FEBS Lett.* 581, 4298-4302)。また、我々は安定供給が困難であったムギネ酸類の効率的化学合成法を開発し(Namba K., *et al.*, (2007) *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, 7060-7063)、さらに蛍光標識基を導入したムギネ酸を合成することによって、トランスポーターを発現させたアフリカツメガエル卵母細胞へ標識体の取り込みを可視化することに成功した(Namba K., *et al.*, (2010) *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 9956-9959)。

(3) これまでの研究活動に基づき、我々はニコチアミンやムギネ酸類などの、植物生体内の鉄輸送を担うファイトシデロフォアがヒトを含む哺乳動物に食物として吸収される場合に必要鉄輸送の分子機構の解明を企図するに至った。最近、異なる生物種が産生するキレート化合物が、哺乳動物の鉄輸送に関与していることがわかってきた。我々は、植物内部の鉄輸送に必須なニコチアミンが哺乳動物の体内に取り込まれることによって細胞間の鉄輸送に関与すること、さらに、この鉄輸送が哺乳動物における未知の吸収・輸送機構の解明につながるの仮説を立てた。

2. 研究の目的

(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。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、植物に含有される鉄の吸収は必要不可欠である。近年、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盛んになっている。本研究で着目したムギネ酸同族体であるニコチアミンは、植物における鉄のキレーターとして、生理的に重要な生体内の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ニコチアミンによる鉄錯体の吸収・輸送機構が存在するという仮定に基づき、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した。

3. 研究の方法

(1) 食物中および細胞内のニコチアミンおよびその鉄錯体の検出：植物内在性化合物のニコチアミンはAgilent社のアミノ酸分析キットでFmoc標識化後、Triple Quadrupole LCMS-8030(Shimadzu)(島津)を用いて定量分析を行った。鉄濃度は誘導結合プラズマ発光分光分析装置(ICP-AES)で測定し、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(村田佳子・山垣亮担当)。

(2) 植物内在性キレート化合物のマウスでの取り込み実験：ニコチアミンやムギネ酸などの植物内在性キレート化合物が、ヒト十二指腸からの鉄吸収を促進することが予想されるが、どのような形態で鉄が吸収されるか明らかになっていない。マウスを17時間絶食後、NAのみ、NA-Fe(II)錯体、2価鉄のみ投与群において各々3 mM(0.1 mL)経口投与した。投与後0, 1, 2, 5時間の各群(5匹ずつ)の血清および各組織別の鉄、銅、亜鉛の濃度を硝酸処理後ICP-AES(Thermo Jarrell Ash Corporation)により測定し、比較検討した(村田佳子・難波康祐担当)。

(3) 小腸吸収モデル細胞(caco-2細胞)での鉄取り込み実験：輸送機構を検証するために、小腸モデルcaco-2細胞をmillicellセルカルチャーインサートのメンブレンフィルター付き細胞培養プレートに培養・分化させてapical側(腸管腔側)に合成したニコチアミンやムギネ酸類およびその鉄錯体を添加して、反応後basolateral側(血管側)への輸送の有無をMS分析やアイソトープ鉄を計測することにより調べた。⁵⁹Feを含んだ2価鉄100 μMにNA、0, 100, 200 μMを加えて、1時間反応させて錯体形成し、caco-2細胞のapical側に添加して、1時間インキュベーション後、細胞内およびbasal側の培地の⁵⁹Feをカウントして鉄を定量した。また、最初にcaco-2細胞のapical側に鉄のみを添加し、1時間インキュベーションした後、apical側の鉄を除き、NAを0, 100, 500 μMと各々添加して1時間後に、細胞内およびbasal側の培地の⁵⁹Feをカウントした。(村田佳子・山垣亮・木村寛之担当)

(4) 植物キレート化合物トランスポーターの探索：腸での吸収が確認できた基質については、そのトランスポーター遺伝子を同定する。植物においてニコチアナミン・ムギネ酸類鉄錯体を輸送するオリゴペプチドトランスポーターは Solute Carrier (SLC) family の SLC15 に属しており、そのうち腸上皮に発現している PEPT1 を最初の候補として、アフリカツメガエルの卵母細胞に発現させて、キレート化合物の輸送活性を測定する。候補遺伝子が外れた際には、他の腸に発現している SLC family タンパク質から検索した。(村田佳子・高橋俊雄担当)。

4. 研究成果

(1) 植物内在性キレート化合物のマウスでの取り込み実験：マウス投与実験により、ニコチアナミン-鉄錯体投与群の方が、鉄のみの投与群より投与2時間後で鉄濃度の増加が肺、胃に認められたが、これらの組織では鉄と同様に銅、亜鉛も増加していた。一方、鉄濃度のみ増加していた組織は筋肉で投与5時間後に増加が認められた(図1)。この結果はニコチアナミンが小腸で取り込まれた後、特定の組織への鉄輸送に参与していることが示唆された。

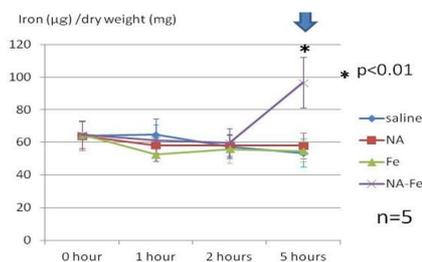


図1 ニコチアナミン鉄錯体を投与したマウスは投与5時間後大腿筋の鉄濃度が増加していた。

(2) 小腸吸収モデル細胞(caco-2細胞)での鉄取り込み実験：⁵⁹Feを含んだ2価鉄100 µMを1時間反応させた結果、細胞内に投与

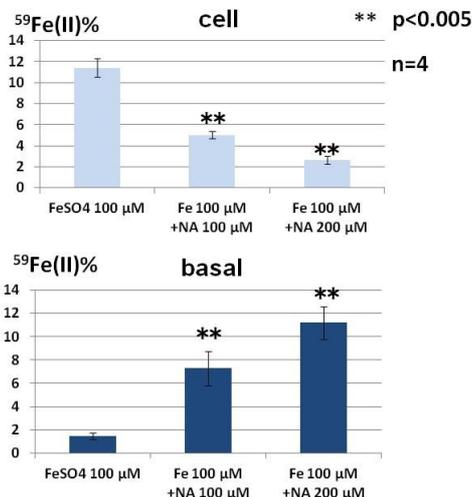


図2 caco2細胞では、添加するニコチアナミンの濃度依存的に鉄の排出量が増加する。

量の約12%の鉄が取り込まれていた。ニコチアナミンを鉄と同時に加えることにより、濃度依存的に細胞内の鉄濃度は減少し、それに対応して basal 側の鉄排出量が増加していた(図2)。

また、先に鉄を取り込ませて1時間後にニコチアナミンを添加すると、同時に添加した場合よりも、細胞から basal 側に輸送される鉄量が減少したが、やはりニコチアナミンの濃度依存的に鉄が排出されていた(図3)。以上の結果から、ニコチアナミンまたはニコチアナミン鉄錯体が細胞内に取り込まれ、basal 側の血管に鉄を輸送する効果があると考えられた。

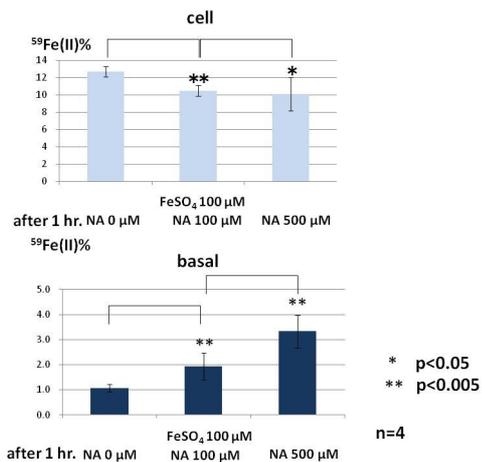


図3 caco2細胞では、鉄添加1時間後にニコチアナミンを添加すると、同時に添加した場合よりも、細胞からbasal側に輸送される鉄量が減少したが、やはりニコチアナミンの濃度依存的に鉄が排出されていた。

(3) 植物キレート化合物トランスポーターの探索：ヒト小腸に発現しているプロトン駆動型オリゴペプチドトランスポーターPEPT1をアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させて、ニコチアナミンの輸送活性を測定した。その結果、ポジティブコントロールの Glycylsarcosin は活性が見られたが、ニコチアナミンおよびその鉄錯体には活性が見られなかった(図4)。

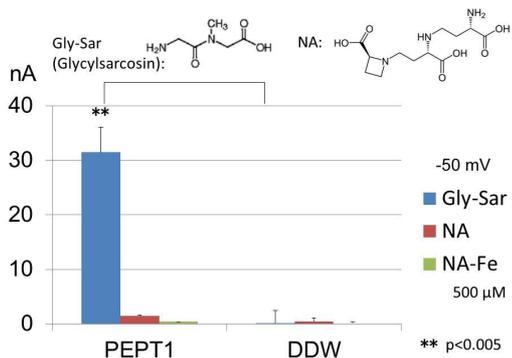


図4 アフリカツメガエル卵母細胞にPEPT1を発現させて、ニコチアナミンおよびその鉄錯体の輸送活性を測定したが、活性は見られなかった。

トランスポーターを同定するために、caco-2細胞を Millicell カルチャープレートに培養し、そのアピカル側の培地にアスコルビン酸(1 mM)のみ、NA(1 mM)添加、NA(1 mM) + Fe(0.2

mM)添加、Fe(0.2 mM)添加の4群を各々投与後、37度CO₂インキュベーターで72時間培養した細胞を回収して各々RNAを抽出した。このRNAをもとに次世代シーケンサーMiseqや定量PCR解析を行い、NAやNA+Feを添加することにより、RNA量の変動が大きな遺伝子を検出した。このうち、小腸に発現している数種類のSLCファミリー遺伝子を見出し、アフリカツメガエル卵母細胞にタンパク質を発現させて、トランスポーター活性を測定し同定を試みている。

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6件)

下記の雑誌論文はすべて査読有り。

(1) 2'-Deoxymugineic acid promotes growth of rice (*Oryza sativa* L.) by orchestrating iron and nitrate uptake processes under high pH conditions. Araki, R.; Kousaka K., Namba K., Murata Y., Murata J. *Plant. J.* 81, 233-246 (2015).

(2) Transgenic petunia with the iron(III)-phytosiderophore transporter gene acquires tolerance to iron deficiency in alkaline environments. Murata Y., Itoh Y., Iwashita T., Namba K. *PLoS One*, 10(3), e0120227 (2015).

(3) Phytosiderophores revisited: 2'-deoxy mugineic acid mediated iron uptake triggers nitrogen assimilation in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. Araki R., Namba K., Murata Y., Murata J. *Plant Signal. Behav.* 10:6, e1031940 (2015).

(4) 天然キレート剤、ムギネ酸類の実用的合成法が拓く新たな可能性、村田 純、荒木良一、村田佳子、難波康祐 バイオサイエンスとインダストリー、2015, vol.73 (6).

(5) 総説:実践的合成研究を基盤としたイネ科植物の鉄イオン取り込み機構に関する研究、難波康祐、ファルマシア, 50, 305-309 (2014).

(6) 総説:ムギネ酸類の実用的合成と機能解明プローブへの展開、難波康祐、月刊ファインケミカル, 43, 15-22 (2014).

[学会発表](計14件)

村田佳子[†]、森本、山垣、渡辺、佐治、木村 ; 「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効果」第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 2015.12-1-4 神戸

荒木[†]、向坂、難波、村田 佳子、村田 純 ;

「合成デオキシムギネ酸添加によるイネのアルカリ耐性付与と硝酸同化への影響」日本土壤肥料学会、2015.9.10 京都

向山[†]、竹内、村田佳子、渡辺、中山、吉田、山垣、難波 ; 「イネ科植物の鉄輸送阻害剤の設計と合成」日本薬学会第135年会、2015.3.25-28 兵庫

招待講演：難波康祐[†] ; 「イネ科植物の鉄イオン取り込み機構に関する有機化学的研究」日本農芸化学会大会、2015.3.12 岡山

招待講演：Kosuke Namba[†] ; Organic Chemistry Research on Iron Acquisition in Gramineous Plants. *The 3rd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products*, 2014. 10. 28, Osaka, Japan

Murata[†], Morimoto, Yamagaki, Watanabe, Namba, Kimura; Effects of iron chelator from plant food on iron absorption in human. 17th ISINIP (International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants) Gatersleben /Quedlinburg, 2014.7.6-10, Germany

村田佳子[†]、森本、山垣、渡辺、難波、木村 ; 「イネ科植物の土壌からの鉄吸収機構と植物性食物によるヒトでの鉄吸収に及ぼす影響」第25回日本微量元素学会学術集会、2014.7.3-4、岡山

招待講演：難波[†] ; 「実践的合成研究を基盤とした新規土壌改良素材および蛍光素材の開発」新規素材探索研究会、2014.6.6 横浜

招待講演：難波[†] ; 「イネ科植物の鉄イオン取り込み機構に学ぶものづくり戦略」第3回CSJ化学フェスタ2013, ナノ機能への挑戦-材料, 素子, バイオ, そして未来-, 2013.10.21, 東京

Murata[†], Morimoto, Yamagaki, Watanabe, Kimura; Effects of iron chelator from plant food upon iron absorption in human. Xth ISTERH (Trace Element Research on Health and Diseases) 2013.9.18-22, Tokyo, Japan

村田佳子[†]、森本、山垣、渡辺、木村 ; 「腸管上皮モデル細胞における鉄吸収に関する植物内在性キレート化合物の影響」第86回日本生化学会大会、2013.9.11-13 横浜

招待講演：「Organic Chemistry Research on Iron Acquisition in Gramineous Plants」Kosuke Namba, *The First Asian Conference for "MONODUKURI" Strategy by Synthetic Organic Chemistry*, 2013.7.17-19 Okinawa, Japan

村田佳子[†]、森本、山垣、渡辺、木村 ; 「植

物性食物に含有する鉄キレート化合物によるヒトでの鉄吸収効果」第24回日本微量元素学会学術集会、2013.6.29-30 大阪

招待講演：難波[†]；「実践的合成研究を基盤としたイネ科植物の鉄イオン取り込み機構に関する研究」有機合成化学講習会，2013.6.19-20 東京

〔その他〕

ホームページ

www.sunbor.or.jp/

6. 研究組織

(1) 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・主席研究員

研究者番号：60256047

(2) 研究分担者

難波 康祐 (NAMBA KOSUKE)

北海道大学・理学研究科・准教授

徳島大学・薬学部・教授(H25年5月から)

研究者番号：50414123

(3) 連携研究者

木村 寛之 (KIMURA HIROYUKI)

京都大学・放射線同位元素総合センター・助教

京都薬科大学・代謝分析学分野・准教授(H27年4月から)

研究者番号：50437240

山垣 亮 (YAMAGAKI TOHRU)

公益財団法人サントリー生物有機科学研究所・主席研究員

研究者番号：40313209

高橋 俊雄 (TAKAHASHI TOSHIO)

公益財団法人サントリー生物有機科学研究所・研究員

研究者番号：20390792