

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660086

研究課題名(和文) バイオアベイラブルな亜鉛量を判定できる新規亜鉛欠乏診断法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the new strategy for accurate diagnosis of zinc deficiency

研究代表者

神戸 大朋 (Taiho, Kambe)

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：血清亜鉛値は亜鉛欠乏の診断に汎用されるが、その値が日内変動すること、炎症時には低値になることなど、しばしばバイオアベイラブルな亜鉛量を正確に反映できない点が問題となる。高齢者は、様々な慢性疾患を患うケースも多いため、超高齢社会を迎えた我が国において、信頼できる亜鉛欠乏診断法を確立する意義は大きい。本研究では、亜鉛欠乏応答性の発現を示す亜鉛トランスポーターを認識する抗体を作成し、亜鉛欠乏を診断に応用することを試みた。さらに、作成した抗体を活用して亜鉛欠乏によって活性を大きく変動させる亜鉛酵素を同定し、同定酵素が新しい亜鉛欠乏診断に応用できる可能性について検討した。

研究成果の概要(英文)： In general, zinc deficiency is diagnosed by evaluation of serum zinc status. However, serum zinc status is altered by daily fluctuation or during inflammation, which may be a problem in the case that the accurate diagnosis is required for elderly people because they often suffer from various chronic diseases. Because, at present, Japan faces super-aged society at present, establishing the new strategy for accurate diagnosis of zinc deficiency is more important than ever.

In this study, I tried to establish such strategy by generating useful monoclonal antibody to detect proteins/enzymes whose expression is changed in response to zinc status. Moreover, I investigated zinc requiring enzyme activity whose activity was changed during zinc deficiency. I generated one antibody, which nicely detects zinc transporter in zinc-deficient dependent pattern, and one enzyme whose activity shows drastic change in response to zinc deficiency.

研究分野：栄養生化学・分子生物学

キーワード：亜鉛欠乏 診断法 健康増進 超高齢社会

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ている栄養問題の一つに亜鉛不足が挙げられる。特に、高齢者においてその傾向が強いことが報告されており、亜鉛不足による味覚機能や免疫機能低下に加え、褥瘡や舌痛、皮膚炎に悩まされることも多い。通常、血清亜鉛の値(通常、上限 110 µg/dL、下限 65 µg/dL とされる)を指標に体内亜鉛状態は判定されるが、血清亜鉛濃度には日内変動があり、午後の測定では午前値より 15~20% 低値になること、また、炎症時にも低値になることなどから、血清亜鉛値では正確に体内のバイオアベイラブルな亜鉛量を反映できない点が大きな問題となっている。特に、高齢者では加齢に応じて様々な慢性疾患を患うケースも多く、正確な測定はさらに困難になる。超高齢社会を迎えた我が国において、健康社会の実現のためにも信頼できる亜鉛欠乏診断法を確立する必要性は高まっており、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

亜鉛は免疫機能や神経機能を始めた諸機能に重要な役割を果たすため、亜鉛欠乏に陥ると数多くの慢性疾患が悪化する。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いるが、体内の亜鉛状態を明確に反映するマーカーを用いた診断法が存在しないため、亜鉛欠乏と判断されず病状を悪化させる例が多発している。本研究によって正確かつ迅速な診断法が確立できれば、国民の健康増進に大きく貢献することが期待される。特に、健康状態と体内亜鉛量が正の相関を示すことが実証されている高齢者においては、亜鉛欠乏を早期に精度良く検出できる簡便な診断法の確立は、社会的にみても非常に大きな成果となる。超高齢社会を迎えた我が国においては、高齢者の医療費が、近年劇的に増加しており、その抑制にも貢献できる可能性があると考え、本研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) 抗体の作成

亜鉛含有酵素である組織非特異的アルカリフォスファターゼ(TNAP)、アンギオテンシン転換酵素、炭酸脱水酵素 IV(CA6)、SV31 や、亜鉛トランスポーター ZIP4、ZIP5、ZnT1、ZnT2、ZnT10 を MBP 融合タンパク質・GST 融合タンパク質と融合させて大腸菌に発現させ、MBP、GST タグを利用してアフィニティー精製した。この際、MBP・GST に融合させた領域は、立体構造を予測したモデルから表面に露出することが予想される領域とした。精製タンパク質を抗原としてマウスに免疫し、モノクローナル抗体を作成した。以下の解析には、樹立したハイブリドーマを用いて取得した腹水を希釈して使用した。

(2) 作成した抗体の有用性評価

樹立したモノクローナル抗体の有用性評価のために、各タンパク質を過剰発現させた培養細胞を作成した。全細胞抽出液、あるいは、細胞膜画分を調製し、Western blot 法にて特異性を評価した。また、実際の亜鉛欠乏状態において、各タンパク質の発現が変化するかどうかを解析するため、ラットを、亜鉛十分食(33.7 mg/kg)、低亜鉛食(4.1 mg/kg)、及び亜鉛欠乏食(2.2 mg/kg)で一定期間飼育し。血漿、及び小腸を含む組織を摘出した。膜画分の回収では、Multi-beads shocker(Yasui Kikai)を用いて各組織を破碎後、膜タンパク質画分を調製した。

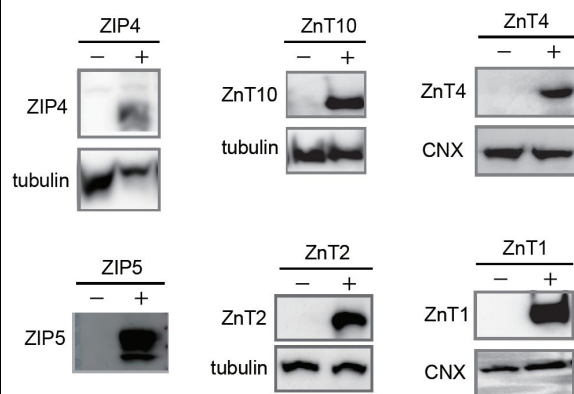
(3) 亜鉛含有酵素の活性測定

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。それぞれの反応の特異性を確認する際には、各酵素の特異的阻害剤を添加した後、同様の反応を実施した。

4. 研究成果

(1) 樹立したモノクローナル抗体が正確に標的タンパク質を評価できることを確認するため、各タンパク質遺伝子を導入した培養細胞を樹立し、Western blot 法にて特異性を評価した。その結果、ZIP4、ZIP5、ZnT1、ZnT2、ZnT10 については、これらタンパク質を感度良く認識できる抗体の樹立に成功した(図 1)。他のタンパク質に対する抗体については、現在、引き続き解析を実施している。

図 1. 作成したモノクローナル抗体の特異性の評価。



それぞれ、ZnT2、ZnT4、ZnT1、ZnT10、ZIP4、ZIP5 を過剰発現する細胞より調製した抽出液を使用して Western blot 解析を実施した。

そこで、続いて亜鉛欠乏食を給餌したラットから調製した膜画分をサンプルにして亜鉛欠乏レベルを判定できる抗体のスクリーニングを実施した。その結果、亜鉛トランスポーター ZIP4 の発現が亜鉛欠乏レベルを反

映して鋭敏に上昇することを明らかとなった(図2)。ZIP4を発現する血球系細胞を見出すことができれば、亜鉛欠乏を正確に反映できる診断が可能になることが期待されるため、現在、細胞の同定を進めている。

また、亜鉛含有酵素含む他の抗体においては、亜鉛欠乏レベルを鋭敏に検出できなかったため、これら抗体を用いて診断ELISA系の構築などはできなかった。

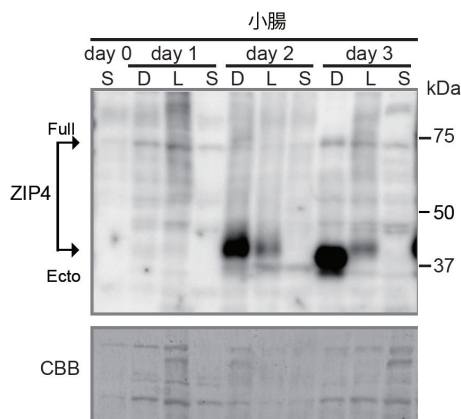


図2. 亜鉛欠乏に応じたラット消化管におけるZIP4の発現様式. S. 亜鉛十分食、L.低亜鉛食、D. 亜鉛欠乏食で0~3日間飼育したラット小腸におけるZIP4の発現。Fullは全長のZIP4、EctoはプロセシングされたZIP4を示す。

(2) (1)で樹立した抗体の有用性を検討する過程で、膜結合型の亜鉛要求性酵素の酵素活性との比較検討を行ったところ、TNAPの亜鉛欠乏依存的な活性変化より鋭敏に活性を減少させる酵素を見出した。Western blotによって検出したタンパク質の発現レベルとの比較から、上記の作出抗体により検出される亜鉛トランスポーターや亜鉛酵素の発現変動よりも本酵素の活性変動の方が、鋭敏であることを確認した(図3)。

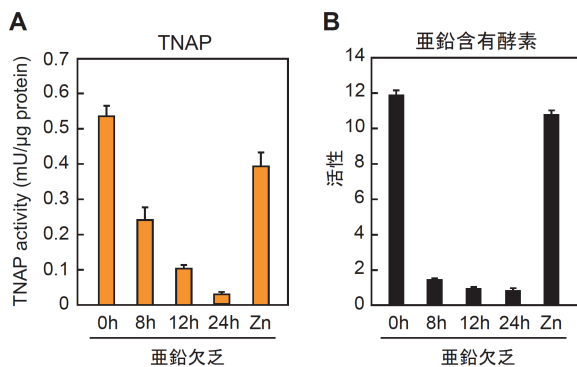


図3. 培養細胞において亜鉛欠乏で活性が大きく減少する亜鉛含有酵素の例. 見出した酵素の活性は、TNAP活性よりも亜鉛欠乏に対して鋭敏に反応する。Zn: 24時間亜鉛欠乏で培養後、4μM ZnSO₄添加の培養液で4時間培養。

この酵素活性が、個体においても亜鉛欠乏レベルを反映できるかどうか解析した結果、血漿中のALPよりも鋭敏に活性が減少することを認めた(図4、ALP活性の減少経過のみ表示)。本酵素の活性は、これまで亜鉛欠乏を比較的再現良く反映することが知られていたALPよりも鋭敏に活性消失するため、本酵素の活性を用いれば、バイオアベイラブルな亜鉛量を判定できる新規亜鉛欠乏診断法を確立できる可能性が考えられた。

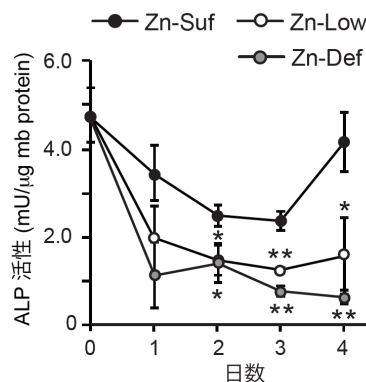


図4. 亜鉛欠乏に応じたラット血漿中のALP活性. 図2と同じ条件で飼育したラット血漿中のALP活性。ALPの活性は、亜鉛欠乏のレベルに応じて鋭敏に減少する。

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 24 件)

1. Itsumura N, Kibihara Y, Fukue K, Miyata A, Fukushima K, Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Nishito Y, Ishida R, Narita H, Kodama H, Kambe T
“Novel mutations in SLC30A2 involved in the pathogenesis of transient neonatal zinc deficiency” *Pediatr Res.*, in press
2. Kambe T, Takeda T, Nishito Y
“Activation of zinc-requiring ectoenzymes by ZnT transporters during the secretory process: Biochemical and molecular aspects” *Arch Biochem Biophys.*, in press
3. Kimura T, Kambe T
“The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters: an Overview and Perspective” *Int J Mol Sci.*, 17, 336, 2016
4. Yamada D, Saiki S, Furuya N, Ishikawa KI, Imamichi Y, Kambe T, Fujimura T, Ueno T, Koike M, Sumiyoshi K, Hattori N
“Ethambutol neutralizes lysosomes and causes lysosomal zinc accumulation” *Biochem Biophys Res Commun.*, 471, 109–116, 2016

5. 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 (*Corresponding author)
“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
6. Ohtera A, Miyamae Y, Yoshida K, Maejima K, Akita T, Kakizuka A, Irie K, Masuda S, Kambe T, Nagao M
“Identification of a New Type of Covalent PPAR γ Agonist using a Ligand-linking Strategy”
ACS Chem Biol., 10, 2794–2804, 2015
7. 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
8. Kumar L, Michalczyk A, McKay J, Ford D, Kambe T, Hudek L, Varigos G, Taylor P. E and Ackland M. L
“Altered expression of two zinc transporters, SLC30A5 and SLC30A6, underlies a mammary gland disorder of reduced zinc secretion into milk”
Genes and Nutrition, 10:487, 2015
9. 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
10. 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
11. Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, and Isumura N
“The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism”
Physiol Rev., 95, 749–784, 2015
12. Gotoh A, Katoh T, Sugiyama Y, Kurihara S, Honda Y, Sakurama H, Kambe T, Ashida H, Kitaoka M, Yamamoto K, and Katayama T,
“Novel substrate specificities of two lacto-N-biosidases towards β -linked galacto-N-biose-containing oligosaccharides of globo H, Gb5, and GA1”
Carbohydr Res., 408, 18–24, 2015
13. Katano H, Okamoto N, Takakuwa M, Taira S, Kambe T and Takahashi M
“Simple and Rapid Separation of Soyasaponin Bb from a Soy Extract”
Analytical Sciences, 31, 85-89, 2015
14. Park SL, Won SY, Song JH, Kambe T, Nagao M, Kim WJ, and Moon SK
“EPO gene expression promotes proliferation, migration and invasion via the p38MAPK/AP-1/MMP-9 pathway by p21WAF1 expression in vascular smooth muscle cells” *Cell Signal*, 27, 470-478, 2015
15. Kaneko M, Noguchi T, Ikegami S, Sakurai T, Kakita A, Toyoshima Y, Kambe T, Yamada M, Inden M, Hara H, Takahashi H and Hozumi I
“Zinc Transporters (ZnT3 and 6) Are Downregulated in the Spinal Cords of Patients with Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis”
J Neurosci Res. 93, 370-379, 2015
16. Bin BH, Hojyo S, Hosaka T, Bhin J, Kano H, Miyai T, Ikeda M, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Cho EG, Fukue K, Kambe T, Ohashi W, Kim KH, Seo J, Choi DH, Nam YJ, Hwang D. Fukunaka A, Fujitani Y, Yokoyama S, Superti-Furga A, Ikegawa S, Lee TR, and Fukada T
“Molecular pathogenesis of Spondylocheirodysplastic Ehlers-Danlos syndrome caused by mutant ZIP13 proteins”,
EMBO Mol Med. pii: e201303809, 2014
17. Kambe T, Hashimoto A and Fujimoto S
“Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases”
Cell. Mol. Life. Sci., 71, 3281-3295, 2014
18. Kambe T
“Methods to Evaluate Zinc Transport into and out of the Secretory and Endosomal-Lysosomal Compartments in DT40 Cells”
Methods Enzymol. 534, 77-92, 2014
19. 橋本彩子、神戸大朋
「亜鉛トランスポーターZIP4 を標的とした亜鉛栄養の改善」
亜鉛栄養治療 in press

20. 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
21. 神戸大朋、宮崎志保
「分泌経路で成熟する亜鉛要求性酵素活性化の分子機構」
日本応用酵素協会誌, 49, 9-15, 2014
22. 神戸大朋
「亜鉛栄養と亜鉛トランスポーター」
ビタミン, 88, 560-564, 2014
23. 辻徳治、神戸大朋
「亜鉛トランスポーターの特徴と生理機能 - ZIP, ZnT トランスポーターと細胞機能・疾患との関連性 -」
生体の科学, 65, 370-378, 2014
24. 橋本彩子、神戸大朋
「食品と亜鉛-健康を保つための亜鉛摂取」
Functional Food, 25, 48-51, 2014

〔学会発表〕(計 18 件)

1. Taiho Kambe
Zinc Signaling: Conclusion
The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan
2016年3月22日 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)
2. 神戸大朋
亜鉛トランスポーターの機能と 亜鉛バイオリロジー
【理科大総合研究院バイオオルガノメタリクス研究部門】 研究交流集会
2016年3月27日東京理科大学(東京・東京)
3. Taiho Kambe
Zinc Signaling and Zinc Homeostasis: Conclusion
BMB2015
2015年12月1日 神戸ポートアイランド(神戸・兵庫)
4. Taiho Kambe
How are zinc-requiring ectoenzymes activated by zinc transporters in the secretory pathway?
The 65th Conference of Japan Society of Coordination Chemistry
2015年9月21日 奈良女子大学(奈良・奈良)
5. Taiho Kambe
How are zinc-requiring enzymes activated by zinc transporters in the early secretory pathway?

8th FAOPS Congress in Bangkok
2015年11月24日 バンコク(タイ)

6. Taiho Kambe
Activation Mechanism of Zinc-Dependent Ectoenzymes by ZnT Zinc Transporters
Gordon Research Conference, Cell Biology of Metals
2015年7月28日 バーモント州マウントスノー(アメリカ)

7. 神戸大朋
亜鉛動態におけるメタロチオネインの役割
第42回日本毒性学会学術年会
2015年6月30日 ポルテ金沢(金沢・石川)

8. Taiho Kambe
Zinc transporters and zinc deficiency of infants and children
12th Asian Congress of Nutrition (12th ACN)
2015年5月17日 パシフィコ横浜(横浜・神奈川)

9. Taiho Kambe, Ayako Hashimoto
The roles of zinc transporters in zinc absorption and zinc physiology
12th Asian Congress of Nutrition (12th ACN)
2015年5月17日 パシフィコ横浜(横浜・神奈川)

10. 神戸大朋
亜鉛トランスポーター 亜鉛恒常性を制御するしくみ
<第29回日本医学会総会サテライトシンポジウム> 近畿亜鉛栄養治療研究会5周年記念・公開講座
2015年4月10日 京都センチュリーホテル(京都・京都)

11. Taiho Kambe
A wide range of cellular functions of zinc transporters in the secretory pathway
The 120th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists
The 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan
2015年3月21日 神戸国際会議場(神戸・兵庫)

12. Taiho Kambe
How are zinc-requiring enzymes activated by zinc transporters in the early secretory pathway?
AsBIC7, 7th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference
2014年12月4日 Gold Coast(オーストラリア)

13. Taiho Kambe
How do zinc transporters play their specific roles

in cellular and physiological processes?
第 87 回日本生化学会
2014 年 10 月 17 日 京都国際会議場 (京都・京都)

14. Taiho Kambe
The coordinated functions of ZnT transporters in the activation of zinc-requiring enzymes
The 4th International Society of Zinc Biology Meeting
2014 年 9 月 15 日 Asilomar (アメリカ)

15. 神戸大朋
分泌経路において機能する亜鉛トランスポーター
第 25 回日本微量元素学会学術集会
2014 年 7 月 3 日 岡山大学 (岡山・岡山)

16. 神戸大朋
分泌経路の機能維持を担う亜鉛トランスポーター
第 9 回トランスポーター研究会年会
2014 年 6 月 15 日 名古屋市立大学 (名古屋・愛知)

17. 神戸大朋
亜鉛栄養と亜鉛トランスポーター
日本ビタミン学会第 66 回大会
2014 年 6 月 14 日 姫路商工会議所 (姫路・兵庫)

18. 神戸大朋、黍原祥恵、逸村直也、成田宏史、児玉浩子
乳児亜鉛欠乏予防基盤確立のための ZnT2 遺伝子一塩基多型の影響評価
第 68 回日本栄養・食糧学会大会
2014 年 5 月 31 日 酪農学園大学 (札幌・北海道)

〔図書〕(計 1 件)
Fukada T, Kambe T (eds).
Zinc Signals in Cellular Functions and Disorders
Tokyo: Springer, 2014

〔産業財産権〕
出願状況 (計 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 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〕
<http://www.seitaijoho.lif.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
神戸 大朋 (TAIHO Kambe)
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
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：