

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20380072

研究課題名（和文） 食欲調節を制御する食餌亜鉛シグナルの機構解析

研究課題名（英文） Clarification of dietary zinc signal transduction through the intestine to the appetite control region of brain.

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

研究成果の概要（和文）：

亜鉛欠乏食を与えた後の変化で最初に観察されるのは、食塩嗜好の増大のほかに食欲低下である。食欲を短期のうちに低下させる亜鉛欠乏食シグナルの解明は、国民の健康増進にとって重要である。本研究では、食餌亜鉛欠乏食給餌によって、食欲調節に重要な視床下部摂食調節ペプチドのmRNA発現量が変動することを見出した（摂食促進ペプチド発現が低下、摂食抑制ペプチド発現が上昇）。この作用は、ニューロペプチドY（NPY）やオレキシンを介している情報伝達変化によることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Food intake control is a very important factor to keep us healthy condition. We investigated the role of dietary zinc in food intake regulation using rats during early-stage zinc deficiency without decreasing zinc concentrations in plasma and tissues. We found that zinc stimulated food intake after oral but not intraperitoneal administration in Sprague-Dawley rats fed zinc-deficient diet for 3 days. The mRNA expression of neuropeptide Y (NPY) and orexin in the hypothalamus significantly increased 3 hrs after oral but not intraperitoneal administration of zinc. Orally administered zinc may stimulate food intake via orexigenic peptides coupled to the afferent vagus nerve in rats after short-term treatment with a zinc-deficient diet.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	12,000,000	3,600,000	15,600,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食欲調節、食餌亜鉛、食欲調節ペプチド、亜鉛シグナル、亜鉛トランスポーター、マイクロダイアリシス、ラット

1. 研究開始当初の背景

亜鉛は亜鉛酵素や遺伝子 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。亜鉛欠乏食を与えて最初に観察される現象は食欲低下であるが、この発現機構は未だ明らかではない。申請者らは、飼育直後の3日目で亜鉛欠乏食給餌ラットの摂食量が低下し (*J. Nutr.*, **131**, 305-310, 2001)、予備検討により視床下部の摂食調節ペプチドの mRNA 量の変動することを見出した。また、この時に食塩水を異常に欲求することも発見した。ただし、食塩の嗜好は3~4日目以降から継続して続くが、摂食量の変化は、減ってからまた増えてまた減るといったような cosine カーブを描くことが知られている (*Br. J. Nutr.*, **73**, 711-722, 1995 & *J. Nutr.*, **130**, 1493S-1499S, 2000)。

国内外の研究：日本国内の研究では、亜鉛欠乏時のラットの摂食量の cyclic pattern が、玉木らによって報告されてきているが (*Br. J. Nutr.*, **73**, 711-722, 1995)、どのようなメカニズムによって摂食量が減ったり増えたりするかについては、まだ解明されてきていない。国内においては、申請者が当研究室から京大に移った大日向氏らと一緒に取り組み始めている状況にある。外国においては、種々の斬新な研究が発表されてきている (*J. Nutr.*, **132**, 2763-2768, 2002, *Nature*, **443**, 289-295, 2006)。しかし、今回の申請課題と類似する研究はまだ見受けられない。

これまでの申請者らの予備研究から、食餌亜鉛シグナルが食欲を調節しているのではないかと予測された。米国の最近の論文は、亜鉛は細胞内セカンドメッセンジャーであるとの報告もある (*J. Cell Biol.*, **177**, 637-645, 2007)。このため、当申請課題を着想し推進することになった。今後の研究成果は、現在の飽食・過食の時代に突入している状況から、『食欲調節』(食欲が正常に調節されていること)が身体の健康状態の維持に重要であるとの立場から、この申請課題による成果が出た後には、国民の健康増進のための大きな知的資源として発展させていけるものと確信している。

2. 研究の目的

亜鉛は、多彩な生理作用を触媒・調節する必須微量元素である。潜在性亜鉛欠乏は日本人に比較的多く認められ、精神性食欲不振症に対して、亜鉛が有効であることが報告されている。近年、中枢神経系において種々の摂食調節ペプチドが食欲調節に重要な役割を果たすことが明らかとなっているが、亜鉛欠乏の摂食調節異常において、脳内摂食調節系がどのように変動しているのかは明らかではない。そこで、特に視床下部の摂食調節ペプチドに着目し、亜

鉛欠乏時の摂食調節異常の発症機構について検討した。

3. 研究の方法

本研究では、食欲調節における食餌中亜鉛シグナルの役割を明らかにするため、初年度に先ず、3日間の亜鉛欠乏食による摂食量低下とその時の亜鉛栄養状態の確認を行い、亜鉛欠乏食シグナルによる食欲低下時の視床下部食欲調節ペプチド mRNA 発現の変化を測定した。次に、亜鉛欠乏食で飼育3日後に (i. e., 摂食量低下時に) 亜鉛を経口的に摂取させた時の摂食量回復の機構を探った。すなわち、亜鉛によってその摂食促進シグナルが出ているかどうかと、その中枢へのシグナルが迷走神経を介しているか否かを検討した。さらに、この『亜鉛シグナル』が消化管経路で現れることを、迷走神経(消化管から脳への求心性神経介在)切除術の条件下で証明し、最終的にはそのシグナルの伝達様式を明らかにしようとした。

平成20年度(亜鉛欠乏食シグナルによる食欲低下時の視床下部食欲調節ペプチド mRNA 発現の変化)：

(1) 亜鉛欠乏食による摂食量低下の確認とその時の亜鉛栄養状態の確認

実験動物：SD系雄ラット、4週齢を使用した。

実験食(群)：亜鉛添加食群と亜鉛欠乏食群は自由摂食させ、PF群は亜鉛欠乏食群が摂取した量と同量の亜鉛添加飼料を1日遅れで与えた。

亜鉛欠乏ラットは3~4日周期の摂食サイクルを示すことが報告されている。亜鉛欠乏飼料による飼育後、摂食量は2日目で減少し始め、その翌日(3日目または翌々日)には減少のピークを示す(最も減少する)。そして、減少ピークの翌日(4日目または翌々日)には増加する。本研究では、この3点で解剖に供した。

血液成分の分析、血液・組織中の亜鉛濃度の測定を行った。

(2) 視床下部、副睾丸周囲脂肪、小腸上部における遺伝子発現変化の測定

各組織における摂食調節やエネルギー代謝に関連する神経ペプチド、ホルモン等の遺伝子発現変化を、定量RT-PCRにより測定した。

- Total RNA の抽出
 - 逆転写反応による Total RNA からの cDNA の合成
 - 定量 RT-PCR に用いるプライマーの設計
 - 定量 RT-PCR による遺伝子発現変化の測定
- 以下に測定する遺伝子名とその略称を簡条書きにする。：() 内が略称

摂食促進ペプチド (Orexigenic neuropeptides) とその受容体:

Neuropeptide Y (NPY)、Agouti-Related Peptide (AgRP)、Orexin、Melanin-Concentrating Hormone (MCH)、Galanin (Galanin)、Ghrelin、Ghrelin receptor (Ghr1 R)

摂食抑制ペプチド (Anorexigenic neuropeptides) とその受容体:

Pro-opio Melanocortin (POMC)、Cocaine-Amphetamine Regulated Transcript (CART)、Corticotropin-Releasing Hormone (CRH)、Neurotensin (NT)、Cholecystokinin (CCK)、Oxytocin (OT)。

アディポサイトカイン (Adipocytokine) とその受容体:

Leptin、Adiponectin (Adip)、Leptin receptor

(3) 亜鉛欠乏食給餌 3 日目の経口的亜鉛摂取時の摂食量回復の機構の解明:

摂食調節における亜鉛の役割を明らかにするために、亜鉛欠乏食から添加食に変えて消化管からの亜鉛シグナルを与える回復実験を行った。

迷走神経は、消化管から中枢神経系への情報伝達を担う神経だが、外科手術により迷走神経切除ラットを作出し、亜鉛による摂食促進シグナルが消化管からどのような情報伝達経路を介して脳に伝達されるのかを検討した (*Brain Res.*, **816**, 424-30, 1999 などに関連実験あり)。すなわち、麻酔下で SD 系雄ラットを開腹し、迷走神経求心路を切除する手術を施し、これを Vagotomy 群とした。

一方、同様に麻酔下で開腹し、迷走神経を切除しない群を Sham 手術群とした。術後 3 日間の回復期間を経た後、3 日間亜鉛欠乏食を与え、硫酸亜鉛溶液 (3 mg/kg) を経口または腹腔内投与し、摂食量を測定した。また、亜鉛の経口投与によって視床下部における NPY 等の摂食促進ペプチドの発現量が増加するか否かを、定量 RT-PCR により測定した。さらに、亜鉛の摂食促進作用が、迷走神経切除により阻害されるか否かを調べた。

平成 21 年度 (各種食欲調節ペプチドのアンタゴニストの投与による亜鉛摂食促進機構の解明)

(1) どの摂食促進ペプチドが亜鉛経口投与によって分泌されているかを、各種アンタゴニストを用いて検討した。具体的は、NPY_r アンタゴニストやオレキシン_r アンタゴニストを脳室内投与し、その際に亜鉛を経口投与して摂食促進作用がなお有するか否かを検討した。

(2) 亜鉛以外の二価の陽イオン投与によって、摂食量が回復するの否かを調べた。亜鉛欠乏食シグナルが消化管から入って 4 日目

には食塩の異常な欲求の上昇が認められたため、亜鉛の消化管を介したシグナルが、他の陽イオンとくに 2 価イオンへ影響を及ぼしながら働いている可能性も考えられた。このため、亜鉛との拮抗との観点から、代表的な 2 価陽イオンを与えた場合に摂食量の回復が起きるか否かを調べた。これによって、亜鉛シグナルが 2 価陽イオンのシグナルとしてではなく、亜鉛シグナルとして作用していることが証明できる。

(亜鉛欠乏食摂取時の摂食量の cyclic pattern の機構解明)

亜鉛欠乏食は、一旦摂食量を下げたからすぐに上昇してまた下がるというサイクリックパターンを取ることは周知の事実である。一旦下がる機構は上述の検討である程度解決されるが、サイクリックパターンが何故生ずるのかについては、より難しい問題となる。この機構を探るために、脳で受け取るシグナルの解析を行った。すなわち、リアルタイムで血液を採取して、カテコールアミン類などの神経伝達物質をモニターすることで、メカニズム解明を試みた (マイクロダイアリシス装置による解析)。

平成 22 年度

(腸管からの亜鉛吸収過程と中枢における亜鉛シグナル認識機構の解明)

(1) 亜鉛の吸収の際の トランスポーター (ZIP4 / ZIP5) が、亜鉛栄養状態によって変わるか否かについて検討した。

(2) 亜鉛欠乏食を与えると 3 日目から生ずる食欲低下リズムの機構を探るために、グレリン発現量の関係から検討した。

(3) 視床下部領域における摂食促進作用を有するノルエピネフリン (NE) 分泌の関係から検討した。

(4) スーパーメックス行動解析装置により、摂食量の増減と行動量変化との関係の観測を行った。

4. 研究成果

20 年度:

亜鉛欠乏食を与えた後の変化で最初に観察されたのは、食塩嗜好の増大のほかに食欲低下であった。摂食量の低下は亜鉛欠乏食給餌の 3 日目に現れ、その後上昇と低下が繰り返す、いわゆるサイクリックパターンを示すことが知られている。後者の発現機構はまだ明らかになっていないが、3 日目の摂食量の急激な低下 (食欲低下) については、平成 20 年度の検討により、3 日間の亜鉛欠乏食飼育により摂食量が激減することを確認するとともに、食欲調節に重要な視床下部摂食調節ペプチドの mRNA 発現量が変動することを見

出した（摂食促進ペプチド発現が低下、摂食抑制ペプチド発現が上昇）。

さらに、亜鉛欠乏食給餌ラット3日目の時点での亜鉛投与による摂食量回復の作用機構に着目した結果、亜鉛（塩化亜鉛溶液）経口投与の1時間後より摂食量の有意な増加が認められた。しかし、亜鉛の腹腔内投与の場合にはこの増加は認められなかった。また、亜鉛の経口投与によって視床下部のNPY、オレキシンなどの摂食促進ペプチド mRNA 発現量の増大と、摂食抑制ペプチド mRNA 発現量（POMC）の低下が認められた。さらに、消化器臓器から脳への内臓神経（迷走神経）切断ラットでは、亜鉛経口投与による摂食量の増加が認められなかった。以上の結果から、亜鉛の経口投与により消化管から脳（中枢）に亜鉛による摂食促進シグナルが伝達されているものと推察された。

以上のことから、亜鉛欠乏食給餌ラットにおける摂食量の回復過程には、腸管からの亜鉛吸収、迷走神経による消化器から脳への情報伝達、視床下部における摂食促進系ペプチド（NPY、オレキシンなど）発現の活性化、などが関与しているものと推察された。

21年度：

先ず、亜鉛以外の二価の陽イオン投与によっては摂食量が回復するの否かを明らかにする目的で、亜鉛以外の他の2価陽イオンミネラルであるカルシウム、マグネシウム、鉄、銅、の影響の解析を行ったところ、亜鉛を与えた場合のように摂食量増加を引き起こすことは認められなかった。このことよって、摂食量増加は亜鉛の特異的なシグナルであることが確認された。

さらに、NPY レセプターアンタゴニストおよび orexin レセプターアンタゴニストの前処理によって、それぞれ亜鉛投与による摂食促進作用が観察されなくなった。この作用は、NPYやorexinを介している情報伝達であることが明らかとなった。これらの結果は亜鉛投与により視床下部のNPY、orexinの mRNA 発現量が増加するという結果とも一致した。

以上の結果より、亜鉛欠乏ラットにおける、亜鉛の経口投与による摂食量の回復過程には、腸管からの亜鉛吸収、迷走神経による情報伝達、視床下部摂食促進系（NPY、orexin）の活性化が関与しているものと考えられた。これらの成果は、今後の研究の進展に大きく寄与した。

マイクロダイアリスの検討結果から、この装置が生理的な状態で動かせることを確認し、リアルタイムのサンプリングによる神経伝達物質を分析できることを確認できた。また、メカニズムの解明のための脳室内等への拮抗体の微量注入の技術をマスターすることができ、次年度の研究成果に結び付ける

ことができた。

22年度：

亜鉛含有タンパク質は種々の生理機能を有し、今や3000種類以上も同定されている。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（Goto, T., et al., 2000; 島崎ら, 2009）、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）、などが、我々も含めた国内外の研究で確認されつつある。平成22年度の研究では、さらに以下の今後の研究に有用な知見を得た。

(1) 亜鉛欠乏食を与えると3日目から生ずる食欲低下リズムを探るために検討したところ、血漿中活性型グレリン濃度は、実験食開始1~7日目で亜鉛欠乏食給餌群で継続して高値の傾向を示し、周期的な変動は認められなかった。したがって、摂食量が低下した亜鉛欠乏食給餌ラットも空腹感を感じていることが示唆された。

(2) マイクロダイアリス装置によるリアルタイム解析により、視床下部のLH（外側野）、VMH（腹内側核）において、摂食促進作用を有するノルエピネフリン（NE）のKCl刺激による放出量は、亜鉛欠乏食給餌群において低下傾向がみられた。したがって、亜鉛欠乏食給餌後速やかに、LH、VMHでのNE量が低下する可能性が示唆された。

(3) スーパーメックス行動解析装置により、亜鉛欠乏食給餌による摂食量の低下は、自発行動量低下によって生ずるものではないことが示唆された。

なお、小腸上皮細胞における亜鉛トランスポーターZIP4/ZIP5の発現量変化は、京都大学の神戸大朋博士と共同研究で開始し、亜鉛欠乏時と充足時の比較を行った。しかし、この情報は未発表のため、ここでは割愛させて頂いた。

以上の研究によって、食餌亜鉛シグナルが食欲調節に及ぼす影響についての種々の知見が得られ、ヒトでの摂食調節異常の発症予防に、今後有効に活用できる可能性を示すことができた。

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 8 件)

1. 駒井三千夫、後藤知子、大日向耕作、白川仁:「味覚機能への亜鉛酵素「炭酸脱水酵素」の寄与」、*Biomed. Res. Trace Elements*, **21**, 38-42, 2010. 査読有
2. 辻村夏来、後藤知子、白川仁、駒井三千夫:「ラットの授乳期の低亜鉛栄養状態が成熟後の味嗜好調節系に及ぼす影響」、*日本味と匂学会誌*, **17**, 333-334, 2010. 査読有
3. 駒井三千夫、後藤知子、大日向耕作、白川仁:「味覚などの多くの機能に重要な亜鉛「炭酸水の刺激味を感じるときに必要な亜鉛酵素:炭酸脱水酵素や食餌亜鉛シグナルの話」、ソフト・ドリンク技術資料 No. 161, p.p. 231-245, 2010 年第 2 号. 査読無
4. Ohinata K., Shirakawa H., Goto T., Komai, M. (9 人中 9 番目), et al.: Orally administered zinc stimulates food intake via vagal stimulation in rats *J. Nutr.* **139**, 611-616, 2009. 査読有
5. 後藤知子、白川仁、駒井三千夫:「食餌中亜鉛がラットの味覚感受性と食塩嗜好に及ぼす影響」、*日本味と匂学会誌*, **16**, 267-268, 2009. 査読有
6. 駒井三千夫 (4 人中 4 番目): 授乳期の母ラットの低亜鉛状態が仔ラットの成熟後の食塩嗜好に及ぼす影響, *日本味と匂学会誌*, **15**, 307-308, 2008. 査読有
7. Goto T., Komai M. (4 人中 2 番目), et al.: Decreased expression of carbonic anhydrase isozyme II, rather than of isozyme VI, in submandibular glands in long-term zinc-deficient rats. *Br. J. Nutr.*, **99**, 248-253, 2008. 査読有
8. 後藤知子、駒井三千夫:「食塩嗜好と味覚」、*日本海水学会誌*, 62, 3-8, 2008. 査読有

[学会発表] (計 11 件)

1. Komai M, Ohinata K, Takemoto M, Kawanago M, Fushimi S, Shirakawa H, Goto T, Asakawa A: Orally administered zinc increases food intake via vagus nerve signal transduction in SD rats. 第 60 回藤原セミナー Zinc signal and cellular functions, (大阪、2010 年 10 月)
2. Michio Komai: Zinc is an essential element to keep various body functions normal. in Branch Conference of International Conference: "New Challenges for University Education and Health Research in a Globalized World: Sharing International Experiences and Responses", (台北医学大学創立 50 周年記念国際会議、公衆衛生栄養学院招待講演、台湾、2010 年 5 月 31 日)
3. 駒井三千夫:「疾病防御と微量元素の役割」、

食品科学工学会東北支部大会市民フォーラム (八戸、2009 年 12 月 5 日、)

4. 駒井三千夫、後藤知子・白川仁・大日向耕作、味覚機能への亜鉛酵素「炭酸脱水酵素」の寄与、第 20 回日本微量元素学会シンポジウム (東京、2009 年、7 月 2~3 日)
5. 駒井三千夫、後藤知子・白川仁・大日向耕作、特別講演:「亜鉛の多機能性 一味受容に必須な亜鉛酵素および摂食調節亜鉛シグナル」、日本食生活学会第 38 回大会 (郡山、2009 年 5 月 16 日)
6. 駒井三千夫:「亜鉛欠乏と生体 - 亜鉛の栄養素としての側面 - 」2009 年日本農芸化学会大会 シンポジウム (福岡、3 月 29 日)
7. 駒井三千夫・後藤知子・白川仁・大日向耕作: 食餌中亜鉛がラットの摂食調節に及ぼす影響、第 1 回メタロミクス研究フォーラム(東京、2008 年 11 月 28~29 日)
8. 駒井三千夫・後藤知子・白川仁・大日向耕作、必須微量元素:亜鉛の多機能性と安全性, フォーラム 2008: 衛生薬学・環境トキシコロジー(熊本、10 月 18 日)
9. Michio Komai, Masami Takemoto, Kousaku Ohinata, Makoto Kawanago, Akihiro Asakawa, Tomoko Goto, Hitoshi Shirakawa: Role of Dietary Zinc Signal in Food Intake Regulation of the Rats. 15th ISOT (International Symposium on Olfaction and Taste), (アメリカ合衆国、2008 年 7 月 21~26 日)
10. 駒井三千夫・竹本雅美・大日向耕作・川中子誠・浅川明弘・後藤知子・白川仁: ラットの摂食調節における食餌亜鉛シグナルの役割 第 19 回日本微量元素学会(2008 年 7 月、東京)
11. 駒井三千夫・竹本雅美・大日向耕作・川中子誠・浅川明弘・後藤知子・白川仁: 摂食調節における亜鉛の役割に関する研究, 第 62 回日本栄養・食糧学会大会(2008 年 5 月、坂戸)

[図書] (計 0 件)

[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：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等：

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/eiyo/top-j.html>

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

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

(3) 連携研究者

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