

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658112

研究課題名(和文) 亜鉛欠乏予防に効果ある食品因子の探索とその効果の実証

研究課題名(英文) A study on food component(s) enhancing zinc absorption for preventing zinc deficiency

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：亜鉛は様々な生体機能を担う必須栄養素であるため、その欠乏は身体機能に大きな影響を与える。従って、亜鉛を十分摂取してその予防に努めることが重要となるが、亜鉛の吸収効率は約30%と低く、その実現は容易ではない。本研究では、消化管において亜鉛吸収に機能する亜鉛トランスポーターZIP4の発現を増加させる食品因子を見出し、亜鉛吸収効率を改善させる基盤を確立することを試みた。大豆抽出物がZIP4発現促進活性を有することを見出し、活性因子の一つとしてソヤサポニンと同定した。これら大豆抽出物は、細胞膜のZIP4発現を増加させ、細胞内への亜鉛取り込み量を増加させたため、亜鉛吸収促進因子としての効果が期待された。

研究成果の概要(英文)：Zinc is an essential nutrient for human health. Recently, people with marginal zinc deficiency have been detected. Thus, strategies for increasing zinc absorption is important, because its efficiency is estimated to be about 30%. In the intestinal epithelial cells, zinc transporter ZIP4 functions as an essential molecule for zinc absorption. Exogenous expression of ZIP4 results in zinc uptake into the cells, suggesting that food factor(s) increasing ZIP4 expression should be a potential enhancer of zinc absorption. In this study, we screened for suitable food components with the ability to increase the abundance of this zinc transporter. Soybean extracts were identified and their effect was attributed to specifically decreased endocytosis of ZIP4 triggered by zinc, and soyasaponin was identified as an active component that increased both ZIP4 protein abundance and zinc levels from one extract. Our results suggest that soybean extracts may be useful to improve zinc absorption in humans.

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：亜鉛欠乏 高齢者 亜鉛トランスポーター ZIP4 大豆抽出物 消化管吸収 食品因子 ソヤサポニン

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、健全な高齢化社会の実現のために効果的な予防法の確立が望まれている¹⁾。亜鉛不足により、味覚機能や免疫機能が低下することはよく知られるが、高齢者では、さらに褥瘡や舌痛、皮膚炎に悩まされることも多い。超高齢社会を迎えた我が国において、亜鉛欠乏の蔓延が懸念される所以となっている。亜鉛欠乏を予防するには、亜鉛吸収量を増加させることが最も効果的であることは自明であるが、亜鉛の吸収効率は30%程度であり、食品中に含まれる全ての亜鉛が吸収されているわけではない。この事実は、単に亜鉛摂取量を増やすよりも亜鉛吸収効率を高める方が、亜鉛吸収量を増加させるには有効であることを示している。食品中に含まれる亜鉛吸収促進因子を同定し、亜鉛を効率的に摂取できる食事を提唱することは極めて意義ある研究であると考え、本研究を開始するに至った。

2. 研究の目的

2002年に先天性亜鉛欠乏症・腸性肢端皮膚炎 (*Acrodermatitis enteropathica*) の原因遺伝子として同定された亜鉛トランスポーター・ZIP4は、小腸上皮細胞からの亜鉛吸収過程に必須の役割を果たす輸送体タンパク質である。研究代表者は、ZIP4の発現制御機構を解析する過程において、小腸上皮細胞のZIP4の発現を完全に模倣する培養細胞株を発見した。さらにZIP4を特異的に認識する抗体を作成し、ZIP4の発現に影響を与える食品因子の高感度スクリーニング系を構築している。本研究では、本スクリーニング系を駆使して、ZIP4発現促進活性を有する食品因子を同定し、亜鉛欠乏予防に効果があることを実証することを目的に実施した。

3. 研究の方法

(1) 様々な食材・食品から酸・アルカリ抽出、エタノール抽出画分を調整する。これら因子を *in vitro* スクリーニング用に単層培養した培養細胞の培養液に終濃度 0.1% となるように添加し、24 時間培養する。細胞を回収して抽出液を調製し、ウェスタンブロット法にて ZIP4 の発現量を定量することで、ZIP4 の発現を促進させるサンプルを選別した。

(2) 本スクリーニング用細胞株には、亜鉛濃度に応じて発現が上昇するメタロチオネインプロモーター制御のもとで分泌型アルカリフォスファターゼの発現を変化させる形質を導入している。(1)で ZIP4 の発現を促進させたサンプルについては、アルカリフォスファターゼの活性を測定し、ZIP4 の発現上昇に付随して、細胞内亜鉛濃度が増加していることを確認した。ZIP4 発現促進活性と細胞内

亜鉛量の増加が共に認められる因子を絞り込んだ。

(3) 中圧カラム等を用いたクロマトグラフィーによって、活性サンプル(粗抽出物)から、活性因子の単離・同定を試みた。上述の *in vitro* スクリーニング系を用いて ZIP4 発現促進活性を認める分画を選別していき、HPLC カラムを用いてさらに精製を進めた。この操作を繰り返して単一成分まで精製できた画分については、NMR 解析を依頼して構造決定した。

4. 研究成果

(1) 先に樹立した培養細胞を用いた *in vitro* スクリーニング系を用いて、様々な食材や食品からの抽出物をスクリーニングした結果、幾つかの大豆抽出物に ZIP4 の発現を促進させる活性を見出した。ZIP4 の発現増加に応じて、細胞内の亜鉛含量が増えるかどうかについて確認するため、アルカリフォスファターゼ活性を測定した結果、大豆抽出物は濃度依存的にアルカリフォスファターゼ活性を増加させることが判明した。さらに、亜鉛濃度の上昇に応じて発現が上昇するメタロチオネインの発現を Real time RT-PCR 法を用いて検討したところ、大豆抽出物により、その発現が増加することが確認できた。従って、この抽出物中には、ZIP4 発現を促進させ、細胞内亜鉛量を増加させる活性を有する因子が含まれることが判明した。

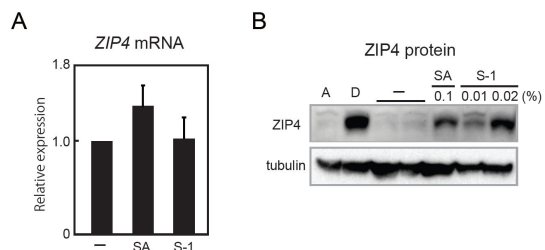


図1 大豆抽出物 (SA) やその精製物 (S-1) は ZIP4 の mRNA の発現には影響を与えないが (A)、タンパク質の発現は増加させる (B)。

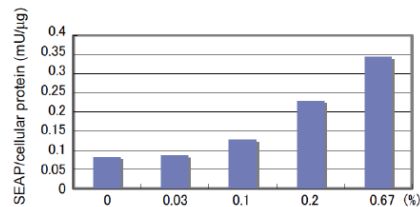


図2 大豆抽出物 (SA) は、濃度依存的に分泌型アルカリフォスファターゼの活性 (=細胞内亜鉛量) を増加させる。

(2) 亜鉛欠乏時に増加する ZIP4 の発現は、(i). ZIP4 遺伝子の転写促進、(ii). ZIP4 mRNA の安定化、(iii). ZIP4 タンパク質分解の抑

制、であることが知られる。そこで、大豆抽出物が、これらどの段階に作用して、ZIP4の発現を促進させているのかについて解析した。Real time RT-PCR法を用いてZIP4のmRNAに対する効果を検証したところ、その発現量には大きな影響を与えなかった。そこでZIP4タンパク質の分解に与える影響を解析したところ、大豆抽出物は、ZIP4の分解を抑制することが判明した。さらに解析を進めた結果、大豆抽出物は細胞膜上に発現したZIP4のエンドサイトーシスを抑制することで、その細胞内での分解を抑制していることが明らかとなった。この大豆抽出物のエンドサイトーシスや分解の抑制が細胞内でのgeneralな現象でないことを確認するために、クラスリンや脂質ラフトを介したエンドサイトーシス経路に及ぼす影響について解析した。それぞれの経路のマーカ分子にトランスフェリンとコレラ毒素Bサブユニットを用いて比較解析したところ、大豆抽出物はどちらの分子のエンドサイトーシスに対しても大きな影響を与えないことが確認できた。従って、大豆抽出物は、細胞膜に発現したZIP4のエンドサイトーシスを特異的に抑制することで、その発現を高めていることが明らかとなった。

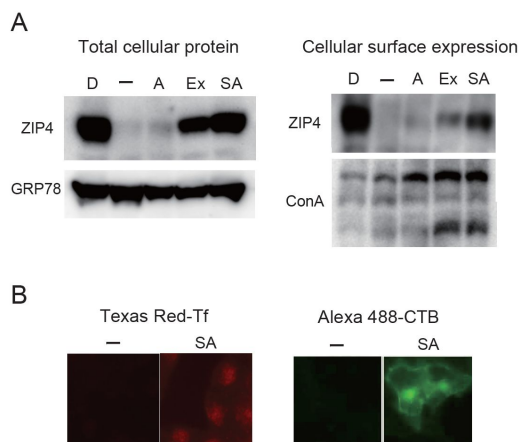


図3 大豆抽出物は、細胞膜に発現するZIP4の量を増加させる(A)。大豆抽出物は、トランスフェリンやコレラ毒素Bサブユニットのエンドサイトーシスには影響を与えないため(B)。ZIP4特異的な効果であることがわかる。

(3) 見出した大豆抽出物から活性因子を単離同定することを試みた。中圧カラムや高速液体などの各種クロマトグラフィーを用いて粗大豆抽出物から活性因子の単離を試みたところ、幾つかの画分において単一化合物を精製することに成功した。NMRやIRなどを用いた各種機器分析にてその構造を決定したところ、その一つが大豆サポニンにあることを明らかにすることができた。大豆サポニンは、ZIP4の細胞膜上での発現を増加させ、細胞内の亜鉛量も増加させることができることを確認し、ZIP4発現を促進させる活性因子であることを実証した。

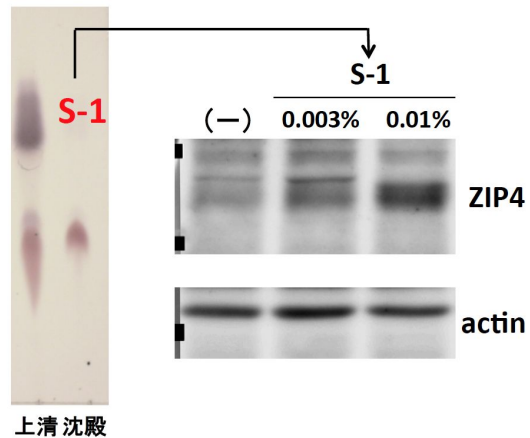


図4 大豆抽出物からの活性化合物の精製。(左)TLCにより、右側精製物(沈殿画分)が単一であることを確認した結果。(右)精製画分にもZIP4発現促進活性があることを確認した結果。

亜鉛欠乏が、最近増加傾向にあることは、上述したとおりであるが、最近、免疫機能や神経機能を増加させるためにも亜鉛摂取が推奨されている。特に、亜鉛サプリメントが加齢黄斑変性の予防に効果を有することが実証されて以来、亜鉛栄養の改善は、単に亜鉛欠乏を防ぐためだけでなく、積極的に進めていくべき課題となっている。加齢黄斑変性は、欧米での中途失明の第一の原因であり、超高齢社会を迎えた日本においては今後、劇的に患者数が増加すると予想される。本研究成果の意義は今後さらに大きくなるかと予想される。

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 20 件)

1. 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
2. Fujimoto S, Itsumura N, Tsuji T, Anan Y, Tsuji N, Ogra Y, Kimura T, Miyamae Y, Masuda S, Nagao M and Kambe T, "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, 2013
3. Ohtera A, Miyamae Y, Nakai N, Kawachi A, Kawada K, Han J, Isoda H, Neffati M, Akita

- T, Maejima K, Masuda S, Kambe T, Mori N, Irie K, and Nagao M, "Identification of 6-octadecynoic acid from a methanol extract of *Marrubium vulgare* L. as a peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist", *Biochem Biophys Res Commun*, 440, 204–209, 2013
4. Kambe T, "Regulation of zinc transport", *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, Edited by V. Culotta and R.A. Scott. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 301-309, 2013
 5. Itsumura N, Inamo Y, Okazaki F, Teranishi F, Narita H, Kambe T* and Kodama H, "Compound heterozygous mutations in SLC30A2/ZnT2 results in low milk zinc concentrations: a novel mechanism for zinc deficiency in a breast-fed infant", *PLoS One*, 8, e64045, 2013
 6. 神戸大朋, 「有害物質の膜輸送とトランスポーター」, 毒性の科学-分子・細胞から人間集団まで, 熊谷嘉人, 姫野誠一郎, 渡辺知保 編, 東京大学出版会, 24-27, 2014
 7. 神戸大朋, 「ZnT 亜鉛トランスポーターの早期分泌経路における役割」, *Biomed. Res. Trace Elements-日本微量元素学会誌*, 24, 110-116,
 8. 神戸大朋, 「亜鉛代謝の必須分子として機能する亜鉛トランスポーター」, *日本衛生学雑誌*, 68, 92-102, 2013
 9. 神戸大朋, 「消化管における亜鉛吸収のメカニズム」, 亜鉛の機能と健康 - 新たにわかった多彩な機能, 日本栄養・食糧学会監修, 駒井三千夫・神戸大朋 責任編集, 建帛社, 151-168, 2013
 10. Taniguchi M, Fukunaka A, Hagihara M, Watanabe K, Kamino S, Kambe T, Enomoto S, and Hiromura M, "Essential role of the zinc transporter ZIP9/SLC39A9 in regulating the activations of Akt and Erk in B-cell receptor signaling pathway in DT40 cells", *PLoS One*, 8, e58022, 2013
 11. Kambe T, "Molecular Architecture and Function of ZnT transporters" *Current Topics in Membranes-Metal Transporters*, 69, 199–220, 2012, S. Lutsenko & J. M. Argüello (Eds.), Elsevier Inc.: Academic Press
 12. Fujita K, Okamura M, Nishimoto S, Kurihara T, Momma K, Miyamae Y, Kambe T, Nagao M, Narita H, and Masuda S, "Establishment of a monitoring system to detect inhibition of mRNA processing", *Biosci Biotechnol Biochem*. 76, 1248-1251, 2012
 13. 橋本彩子、神戸大朋, 「亜鉛吸収を向上させる食品因子の探索-亜鉛栄養研究の現状と今後の展望を含めて-」, *日本醸造協会誌*, 107, 836-841, 2012
 14. Fukunaka A, Kurokawa Y, Teranishi F, Sekler I, Oda K, Ackland M. L, Faundez V, Hiromura M, Masuda S, Nagao M, Enomoto S and Kambe T, "Tissue non-specific alkaline phosphatase is activated via a two-step mechanism by zinc transport complexes in the early secretory pathway", *J. Biol. Chem.*, 286, 16363-16373, 2011
 15. Fukada T and Kambe T, "Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis", *Metalomics*, 3, 662-674, 2011
 16. Kambe T, "An Overview of a Wide Range of Functions of ZnT and Zip Zinc Transporters in the Secretory Pathway", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 1036-1043, 2011
 17. Aihara Y, Fujiwara N, Yamazaki T, Kambe T, Nagao M, Hirose Y, and Masuda S. "Enhancing recombinant protein production in human cell lines with a constitutive transport element and mRNA export proteins", *J Biotechnol.*, 153, 86-91, 2011
 18. 橋本彩子、辻徳治、逸村直也、神戸大朋, 「消化管における必須微量金属の吸収-トランスポーターによる制御機構-」, *Trace Nutrients Research-微量栄養素研究-*, 28, 89-94, 2011
 19. 神戸大朋, 「早期分泌経路における亜鉛酵素の活性化機構 -ZnT 複合体による 2-step mechanism を介した TNAP の活性化-」, *Biomed. Res. Trace Elements-日本微量元素学会誌*, 22, 66-72, 2011
 20. 神戸大朋,

「生体機能における亜鉛トランスポーターの重要性,-亜鉛トランスポーターをめぐる最近の知見-,亜鉛栄養治療, 1, 54-64, 2011

〔学会発表〕(計 25 件)

1. 神戸大朋

亜鉛トランスポーターの機能：亜鉛欠乏症の観点から

日本農芸化学会 2014 年度大会

2014 年 3 月 30 日 東京

2. Taiho Kambe

Zinc deficiency and dermatitis: From the standpoint of zinc transporter functions

The 91st Annual Meeting of the Physiological Society of Japan

Mar. 16, 2014 鹿児島

3. Taiho Kambe

Zinc transporters and Aging: Closing Remarks
X ISTERH CONFERENCE, TRACE ELEMENT RESEARCH, ON HEALTH AND DISEASES

Nov. 19, 2013 東京

4. 神戸大朋

石川県立大学腸内細菌共生機構学講座 開設記念シンポジウム

Molecular mechanism of intestinal absorption of essential trace metals

Oct. 4, 2013 金沢

5. 神戸大朋

消化管からの亜鉛吸収を促進する亜鉛トランスポーターを標的にした亜鉛栄養改善
JAACT 福井大会

2013 年 7 月 19 日 福井

6. 神戸大朋

分泌経路に局在する亜鉛トランスポーターの機能に関する分子遺伝学的研究

第 24 回日本微量元素学会学術集会

平成 25 年 6 月 30 日 大阪

7. 神戸大朋

亜鉛欠乏予防と発酵食品

第 99 回 醸造調味食品セミナー

2013 年 7 月 17 日 東京

8. Taiho Kambe

Future direction of Zinc Biology in Signaling, Homeostasis and Diseases: Closing Remarks

The 86th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society 2013

Sep. 11, 2013 横浜

9. Shigeyuki Fujimoto, Naoya Isumura, Tokuji Tsuji and Taiho Kambe

Cooperative functions of ZnT1, metallothionein and ZnT4 in the cytoplasm are required for full

activation of tissue non-specific alkaline phosphatase in the early secretory pathway

Gordon Research Conference

7 月 28 日~8 月 2 日 米国(ロードアイランド)

10. 神戸大朋

細胞内の亜鉛輸送機構 -trafficking, transfer, mobilization

日本薬学会第 133 年会

2013 年 3 月 30 日 横浜

11. 神戸大朋

亜鉛バイオロジーを彩る亜鉛トランスポーターの科学

第 4 回岡山大 & 理研ジョイントシンポジウム

2012 年 6 月 25 日 岡山

12. 神戸大朋

亜鉛要求性酵素アルカリフォスファターゼ活性化の分子機構

第 23 回日本微量元素学会リサーチシンポジウム

2012 年 7 月 5 日 東京

13. 神戸大朋

基礎研究から見た亜鉛バイオロジー

第 23 回日本微量元素学会 教育セミナー

2012 年 7 月 5 日 東京

14. 神戸大朋

消化管における亜鉛吸収のメカニズム

第 1 回最先端有機光機能材料シンポジウム

2012 年 9 月 5 日 長野

15. 神戸大朋

味噌による亜鉛欠乏予防の可能性

みそ健康セミナー

2012 年 11 月 21 日 東京

16. Taiho Kambe

Evidence for facilitated transfer mechanism of cytosolic zinc to zinc transporters for expressing biological activity of zinc

The 85th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society

2012 年 12 月 14 日 福岡

17. 神戸大朋

消化管における亜鉛吸収のメカニズム

第 66 回日本栄養・食糧学会大会シンポジウム

2012 年 5 月 20 日 仙台

18. 神戸大朋

亜鉛バイオロジーをめぐる最近の話題-亜鉛トランスポーター研究を中心に

福山大学グリーンサイエンス研究センター 第 2 回公開講演会「食環境と健康」

2012 年 1 月 6 日福山

19. 神戸大朋

分泌経路の恒常性維持に機能する亜鉛トランスポーターの同定と解析
第26回 JAACT シンポジウム
2012年1月23日 東京

20. 神戸大朋

早期分泌経路における亜鉛トランスポーターの役割
第84回日本生化学会大会
2011年9月21日 京都

21. 神戸大朋

早期分泌経路における亜鉛要求性酵素の活性化機構
22回日本微量元素学会
2011年7月1日 京都

22. 神戸大朋

ニワトリ DT40 細胞を活用した金属輸送体研究の新たな展開
フォーラム 2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー
2011年10月27日 金沢..

23. Taiho Kambe

Mechanism for the activation of zinc-requiring enzymes by ZnT transporters in the early secretory pathway
International Society of Zinc Biology
Jan. 16, 2012 Australia (Melbourne)

24. Taiho Kambe

Mechanism for the activation of zinc-requiring enzymes by zinc transport complexes in the early secretory pathway
The 5th International Conference on Metals and Genetics, ICMG2011
Sep. 5, 2011 Kobe

25. 神戸大朋

亜鉛と亜鉛トランスポーター
メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 2011
2011年12月8日 名古屋

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔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
なし

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：