

<研究課題>高齢者の健康増進を意図した亜鉛欠乏予防食の創成

研究代表者 京都大学大学院生命科学研究科 准教授 神戸大朋

【まとめ】

近年、高齢者において、亜鉛欠乏者が増加していることが明らかにされており、亜鉛欠乏を未然に防ぐことが重要となっている。本研究では、消化管からの亜鉛吸収に必須の役割を果たす亜鉛トランスポーターZIP4の発現を増加させる大豆サポニンの効果を詳細に検討し、さらに、新たな活性因子の探索を実施した。また、活性因子の有用性を評価するために、ラットを用いた解析系を確立するための基礎研究を実施した。

1. 研究の目的

亜鉛は、創傷治療や味覚・免疫機能などに重要な役割を果たす必須栄養素である。最近、様々な疫学調査の結果から、血清亜鉛値が低い高齢者は、感染症発症率の上昇や活動量の低下、認知症の発症などのリスクが増加し、健康な生活に支障をきたすことが示されている。超高齢社会を迎えた日本においては、亜鉛欠乏を呈する患者の数が年々増加しており、早急に対処すべき栄養問題となっている。一般的に、亜鉛欠乏は、サプリメントの摂取によって改善できると考えられがちであるが、消化管での亜鉛吸収効率は30%程度と低い上、摂取亜鉛量の増加や加齢に伴いその吸収率は低下する。従って、抜本的な解決のためには、亜鉛吸収効率を上昇させる何らか

の手法を確立することが必要となる。そこで、本研究では、食事由来の亜鉛の吸収に必須の役割を果たす亜鉛トランスポーターZIP4に着目し、その発現促進因子を探索する。これまでに、申請者は、ある種の大豆サポニンに促進活性があることを見出しているため、今回は、この効果についてさらに検証すると共に、更なる促進効果を持つ食品因子の探索を実施した。同時に、見出した結果を *in vivo* で検証するために、ラットにおける ZIP4 発現の亜鉛応答性について詳細に解析した。

本研究によって得られる成果は、高齢者の亜鉛欠乏予防を解消するために有益な情報を提供できるため、健康増進に貢献する、社会的に大きな意義を持つものと考えられる。

2. 研究の方法・経過

(解析1) 新規 ZIP4 発現促進因子の同定

サポニンを含有することが知られる豆類、茶、香辛料などを粉碎し、メタノール、酢酸エチル、酸・アルカリを用いて抽出画分を調整した。これら抽出物を終濃度0.1%になるようにスクリーニング用 Hepa 細胞に添加して24時間培養し、その後、全細胞抽出液を調製して、ウェスタンブロット法にて ZIP4 の発現量を定量した。同時に、メタロチオネインの発現量の変化を指標にして、細胞内亜鉛量の変化について解析した。

(解析 2) ヒト ZIP4 に対する効果の検証

大豆サポニンのヒトZIP4発現促進活性評価には、培養液に各サンプルを加えて24時間培養した細胞抽出液を、ウェスタンブロット法にて定量することで実施した。細胞表面ビオチン化アッセイでは、EZ-Link, a Sulfo-NHS-SS-Biotin reagent (細胞膜非透過性のビオチン化試薬) を使用して、細胞外に発現するタンパク質をビオチン標識した。ストレプトアビジン固定化ビーズを用いて、ビオチン化されたタンパク質を精製し、ウェスタンブロット法に供してヒトZIP4の量を検出・定量した。

(解析 3) ラット消化管における ZIP4 の発現様式に関する解析

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) でラットを一定期間飼育した。十二指腸・空腸 (それぞれ、胃の幽門部より 0.5~1.5 cm、5.5~6.5 cm の部分) を摘出し、Multi-beads shocker (Yasui Kikai, Osaka, Japan) を用いて破碎後、膜タンパク質画分を調製した。調整した膜画分における ZIP4 の発現レベルについて抗 ZIP4 モノクローナル抗体を用いた immunoblot にて検討した。抗 ZIP4 モノクローナル抗体は、マウス ZIP4 のアミノ末端領域を抗原にマウスを免疫して作成したハイブリドーマを用いて取得した腹水を 600 倍に希釈して使用した。

3. 研究の成果

(解析 1) マウス Hepa を用いて、サポニン含有することが知られる豆類、茶、香辛料

などにおいて、ZIP4 発現促進活性がみとめられるかどうかについて検討した。その結果、ユッカなどいくつかの抽出物に ZIP4 の発現を高める活性を認め (図 1)、この活性に付随して、細胞内亜鉛量の増加の目安となるメタロチオネインの発現を高める活性もみとめた。したがって、これら抽出物には、新規の活性因子の存在が示唆された。現在その精製を進めるべく、各種機器解析を実施している。

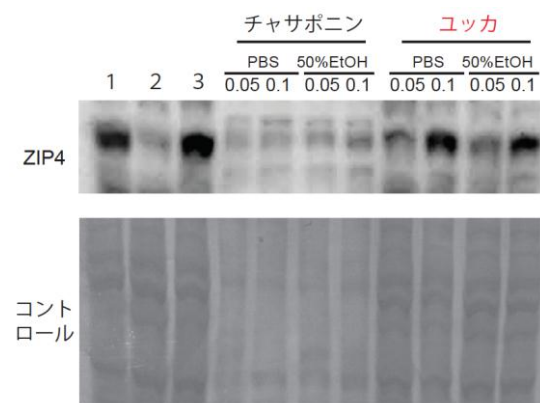


図 1. スクリーニング結果の一例.

lane 1. 亜鉛欠乏条件、lane 2. 亜鉛十分条件、lane 3. 大豆サポニン添加.

(解析 2) 上述した新規活性化因子の探索を含め、我々はこれまでの解析ではマウス Hepa 細胞を用いて実施してきており、したがって、その活性促進効果もマウス ZIP4 に対して評価した結果となっていた。マウス ZIP4 とヒト ZIP4 は、どちらも消化管からの亜鉛吸収に必須の分子であることが知られているが、両者の分子全体のアミノ酸配列の相同性は 70%程度と低い上、ソヤサポニンが相互作用すると予想される細胞外領域では、この値は、さらに低下して約 60%となる。そのため、

ZIP4 を標的とした本解析では、内在性にヒト ZIP4 を発現するヒト培養細胞を見出し、その株を用いて評価されることが望まれていた。しかしながら、CaCo2 細胞など消化管上皮モデル細胞として汎用されるヒト培養細胞においてヒト ZIP4 の発現を検出することはできず、大豆サポニンのヒト ZIP4 に対する活性評価における制限となっていた。今回、様々なヒト培養細胞株において ZIP4 の発現を再検索した結果、ヒト膵がん AsPC1 細胞がヒト ZIP4 を発現することを見出した。AsPC1 における ZIP4 の亜鉛欠乏誘導性の発現増加は、マウス Hepa 細胞に比べると顕著ではないが、大豆サポニンの効果を検討した結果、マウス ZIP4 の場合と同様、ヒト ZIP4 の発現も亜鉛欠乏依存的に増加させることを確認した (図 2)。現在、上記解析で見出した抽出物が AsPC1 細胞に発現するヒト ZIP4 の発現を増強する活性があるかどうかについて検討中である。

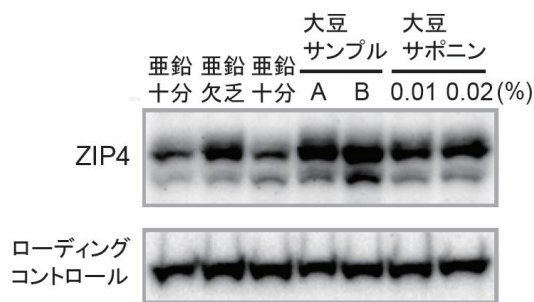


図 2. 大豆サポニンは AsPC1 細胞において発現するヒト ZIP4 発現を促進する。

(解析 3) 大豆サポニンの ZIP4 発現促進効果と亜鉛吸収促進活性について *in vivo* で検証するために、亜鉛量の異なる飼料でラットを飼育し、消化管での ZIP4 発現様式について

検討した。マウスにおいては、消化管での ZIP4 の発現の検出のため、亜鉛欠乏食で 6 日間程度の飼育が必要であった、ラット小腸においては、2 日目でプロセッシングされた (ZIP4 の細胞外領域が除去された) ZIP4 が極めて強く検出されることが判明した。この結果は、ラットにおいては、消化管での ZIP4 の発現が、亜鉛レベルにおいて非常に鋭敏に反応していることを明示している。

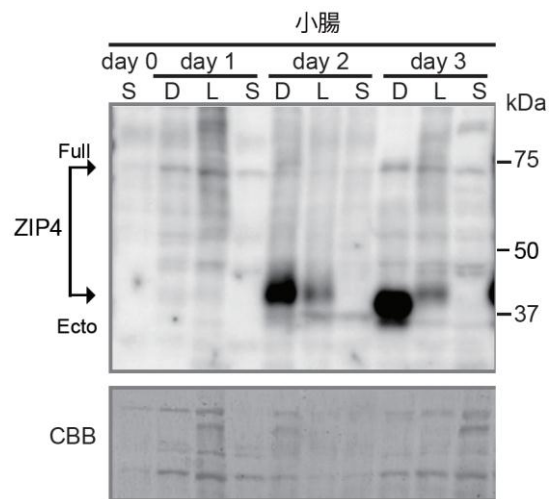


図 3. 亜鉛欠乏に応じたラット消化管における ZIP4 の発現様式。

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 はプロセッシングされた ZIP4 を示す。

4. 今後の課題

本研究において、新たに ZIP4 発現活性を有することを見出したユッカなどから活性因子を同定し、構造活性相関に関する研究を進めると同時に、さらに強力に ZIP4 発現を促進する活性の同定、特定した複数因子を組み合わせる相乗的な効果が認められるかなど検

討することが重要と考えている。また、今回、AsPC1を見出し、AsPC1を用いてヒトZIP4発現促進活性を評価できる系を確立した意義は非常に大きく、大豆サポニンに見出されるZIP4発現促進効果が、マウスZIP4のみならずヒトZIP4に対しても確認することができた。これまでZIP4のアミノ酸配列の相同性の低さは、異種間におけるZIP4発現促進活性の有効性を評価するに当たり、潜在的な問題となっていたが、AsPC1、及び、ラットを用いて有用性が確認できた活性因子は、ヒトZIP4に対しても同様の効果を発揮すると考えることができるようになった。したがって、今後は、ラットZIP4に対する各活性因子の効果を詳しく検証し、その有効性を確認することが重要と考える。

亜鉛欠乏に陥ると、味覚障害や免疫機能低下、創傷治癒力の低下によって“Quality of Life”は大きく低下する。適切な食事からその予防・治療に努めることは極めて大切であるため、亜鉛吸収促進因子を同定することの意義は大きい。本研究から得られた成果を日々の食事にフィードバックさせることで、近年増加している高齢者の亜鉛欠乏の予防に結びつけたいと考えている。

5. 研究結果の公表方法

研究結果の一部については、下記論文、及び、学会にて発表した。また、残りのデータについても英文科学誌に投稿予定である。

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., in press

学会発表

- 1). 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)
- 2). 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)
- 3). Taiho Kambe “The roles of zinc transporters in zinc absorption and zinc physiology” (12th Asian Congress of Nutrition)

論文発表