

亜鉛トランスポーターの分子機能解明を基軸とした 亜鉛欠乏の予防と亜鉛栄養改善に関する研究

神戸大 朋

京都大学大学院生命科学研究所 准教授

緒 言

飽食の時代をむかえた本邦において懸念される栄養問題の一つに、亜鉛不足が挙げられる。亜鉛は、創傷治癒や味覚、免疫機能の他、記憶に関連した神経機能など、多岐にわたって重要な役割を果たす必須栄養素である。そのため、生活の質（以下QOLと略す）の維持や向上に極めて重要な「食」要素となる。しかしながら、現在、亜鉛欠乏者の数は世界的に増加しており、特に、高齢者に亜鉛欠乏の傾向が強いことが明らかにされている。さらに、亜鉛は成長著しい乳幼児の発育に必須となるため、乳幼児栄養の観点からも不足することは許されない^{1,2)}。したがって、日常の「食」から、亜鉛栄養の改善が可能となれば、健康な社会生活の実現に大きく貢献でき、国や世代を超えた波及効果が期待される。

動物細胞における亜鉛トランスポーター

亜鉛（亜鉛イオン）の生理機能は非常に多岐にわたっており、タンパク質の構造因子や酵素の補因子として、また、細胞内外のシグナル因子として必須の役割を果たす³⁻⁵⁾。亜鉛は、生体内では二価陽イオンとして安定であり、その運搬は細胞膜に発現した種々の亜鉛トランスポーターが担っている。亜鉛トランスポーターは、細胞内や細胞内小器官内の亜鉛濃度を厳密に調節するために不可欠な分子であり、アミノ酸配列の相同性と亜鉛輸送の方向性から、ZIP（Zrt, Irt-like protein）トランスポーターと ZnT（Zn transporter）トランスポーターの二つに大別される⁶⁻⁹⁾（図1）。ZIPトランスポーターは、細胞外、もしくは、細胞小器官内の亜鉛を細胞質へと輸送することで細胞質の亜鉛レベルを増加させる方向に機能する。一方、ZnTトランスポーターは、この逆の向きに亜鉛を輸送するため、細胞質の亜鉛レベルを減少させる方向に機能する。哺乳類においては、ZIPトランスポーターが14種類、ZnTトランスポーターが9種類存在することが明らかにされており、両トランスポーターが協

調的に機能することで、生体内・細胞内の亜鉛ホメオスタシスは厳密に維持される^{1,10)}。

亜鉛ホメオスタシスの制御機構についての研究は、90年代後半から大きく進展したが、筆者らは、当初から本分野の研究に参画し、複数の亜鉛トランスポーターの同定や機能解析を実施してきた¹¹⁻¹³⁾。現在、更なる解析を進めると同時に^{14,15)}、これらを発展させ、亜鉛トランスポーターに着眼した亜鉛栄養改善に関する研究を実施している。

亜鉛吸収に関する基礎研究：消化管における亜鉛トランスポーター ZIP4の発現制御

亜鉛ホメオスタシスの維持において、消化管での吸収過程は最も重要となるが、食品中に含まれる亜鉛の腸管での吸収効率は30%程度と低いというえ、摂取亜鉛量の増加や加齢に伴い減少する。この事実は、亜鉛欠乏を食品科学的観点から予防するためには、単にサプリメントなどの摂取によって亜鉛摂取量を増やすのみならず、吸収効率を上昇させることが、抜本的な解決策となることを意味する。そのため、筆者らは、まず、腸管での亜鉛の吸収機構の解明を目指した。腸管においては、複数の亜鉛トランスポーターが発現しているが、ヒトの先天性亜鉛欠乏症・腸性肢端皮膚炎（*Acrodermatitis enteropathica*）の原因遺伝子として同定されたZIP4が食事由来の亜鉛吸収に中心的役割を果たす分子と考えられた。筆者らは、ZIP4が、亜鉛欠乏時に小腸上皮細胞頂端膜に蓄積する一方で、亜鉛十分時には速やかに分解されること¹⁶⁾、さらに、重度の亜鉛欠乏時には、頂端膜に発現するZIP4が、タンパク質切断によって制御される（ZIP4のプロセッシング制御）ことを明らかにした¹⁷⁾。また、小腸上皮細胞において、亜鉛トランスポーターZIP5が、ZIP4とは全く逆の発現パターンを示すことを明らかにし¹⁵⁾（図2）、両者の発現量のバランスが体内の亜鉛ホメオスタシスの制御に非常に重要であることを示

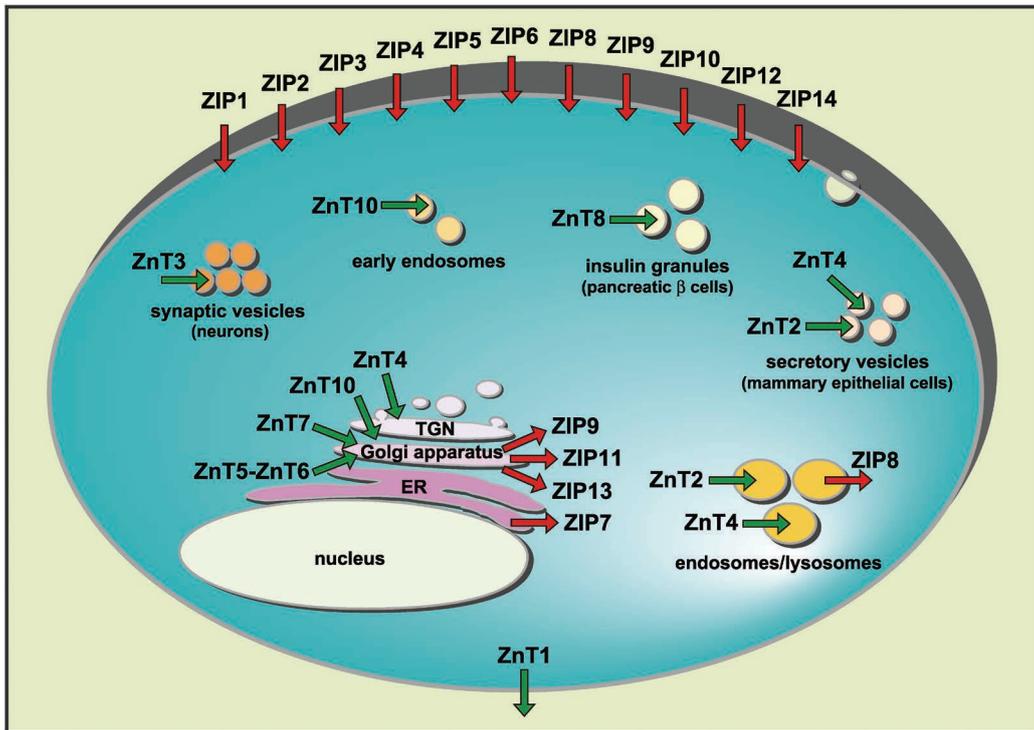


図1 ZIPとZnTトランスポートの細胞内局在と亜鉛輸送の方向性

ZIPトランスポーター（赤矢印）は、細胞質内の亜鉛を増加させる向きに、ZnTトランスポーター（緑矢印）は、細胞質内の亜鉛を減少させる向きに機能する。本図には、それぞれのZIP・ZnTトランスポーターの主たる細胞内局在部位を示している。多くの亜鉛トランスポーターは、亜鉛濃度やサイトカイン等の刺激によって局在部位を大きく変化させるため、この図は、ある一局面を示すものとなっている。

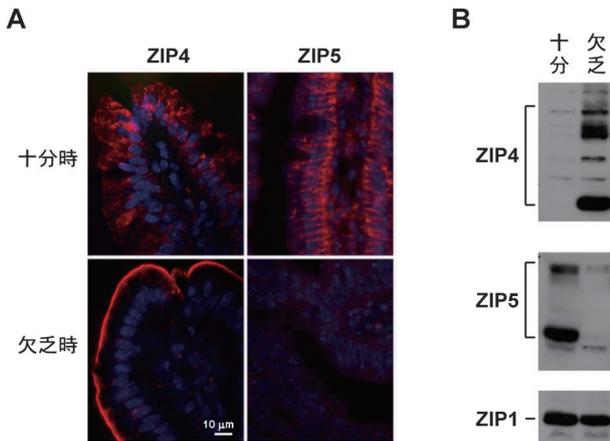


図2 ZIP4とZIP5の亜鉛濃度に依存した発現制御

A. 小腸上皮細胞に発現するZIP4とZIP5は、食事に含まれる亜鉛の量によって、全く逆の細胞内局在を示す。ZIP4は、亜鉛欠乏に応じてapical（頂端）膜に蓄積し、ZIP5は、亜鉛十分時にbasolateral（側底膜）側に蓄積する。青：DAPI染色による核、赤：ZIP4、あるいはZIP5の局在。B. 小腸上皮細胞から調整した膜画分におけるZIP4とZIP5の発現量。ZIP1の発現には、亜鉛量に応じた変化が認められない。（文献16より改変）

す結果を提示した。さらに、出芽酵母において細胞外から細胞内への亜鉛取り込みに機能する亜鉛トランスポーターのオーソログであるZIP1, ZIP2, ZIP3が、哺乳類の亜鉛吸収においては必須とはならないことを、これら遺伝子の三重欠損マウスを用いた解析にて明示し¹⁸⁾、哺乳動物の消化管からの亜鉛吸収においては、ZIP4が鍵となる分子であることを実証した。

“ZIP4-targeting”による、食品からの亜鉛吸収促進因子の探索と同定

上述の研究結果より、「ZIP4発現促進活性を持つ食品の摂取→腸管でのZIP4の発現促進→亜鉛の吸収効率上昇→亜鉛欠乏を予防」という亜鉛栄養改善に向けたストラテジーを考案した。そこで、亜鉛吸収促進因子の探索系として、ZIP4タンパク質を分子標的とし（ZIP4-targeting）、ZIP4の発現を促進する（＝亜鉛依存的分解を抑制する）食品因子を探索する*in vitro*スクリーニング系を構築した。本系は、腸管上皮細胞と匹敵する鋭敏な感度で亜鉛依存的にZIP4を発現する培養細胞¹⁷⁾と、ZIP4モノクローナル抗体を活用して直接ZIP4タンパク

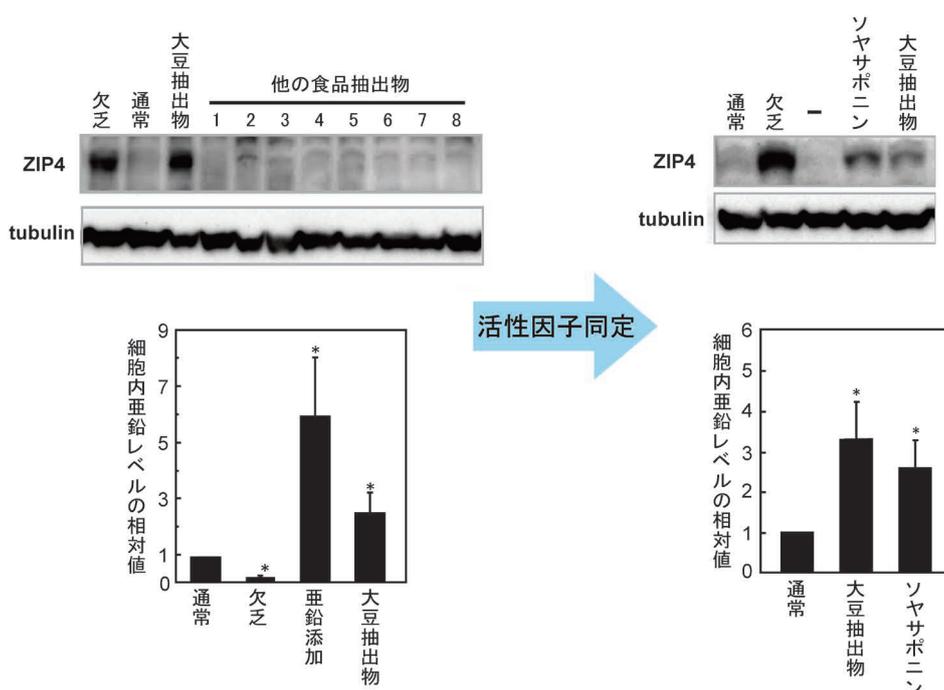


図3 亜鉛欠乏を予防する効果が期待されるZIP4発現促進因子の同定

大豆抽出物には、ZIP4の発現と細胞内亜鉛レベルを増加させる活性が含まれており、そこから単離同定したソヤサポニンBbは、同様の活性を有している。

質の発現を評価できるスクリーニング系となっており、即効性の亜鉛吸収促進効果を持つ因子の同定が可能となる。本系を用いて、これまでに、多種類の食材・食品（穀物、海産物、発酵食品、コーヒー豆、乳製品など約500種類）から調製した抽出物のスクリーニングを実施した結果、大豆抽出物中に強いZIP4発現促進活性、ならびに亜鉛取り込み活性があることを見出し、さらに、この大豆抽出物からソヤサポニンBbを活性因子として単離同定することにも成功した（図3）。ソヤサポニンBbによるZIP4発現促進効果は、ZIP4特異的なエンドサイトーシスの抑制による分解抑制効果であり、結果、細胞膜に局在するZIP4の発現量が増加する。これに付随して、細胞内への亜鉛取り込み量が増加することも確認しており、ソヤサポニンBbについては、特に亜鉛吸収促進効果が期待される。また、キラヤやユッカ抽出物などにも強いZIP4発現促進活性があることもみとめているため、現在解析を進めている。

乳幼児亜鉛栄養に関する基礎研究・応用研究

亜鉛は、高齢者の健康に密接に関連する必須栄養素であるとともに、成長著しい乳幼児の成長にも不可欠である。出生直後の乳児においてはその要求性が最も高く

なり、これに合わせるように、初乳に含まれる亜鉛濃度は母体血清中の亜鉛濃度の5~8倍にも達している¹⁾。そのため、低亜鉛母乳を分泌する母親に授乳された母乳哺育児は、亜鉛不足に陥り、重篤な皮膚炎などを呈する乳児亜鉛欠乏症（*Transient Neonatal Zinc deficiency, TNZD*）^{1,2)}を発症する。また、近年増加している早期産児においては、正常産児に比べると、成長と母乳中亜鉛量との間にアンバランスを生じやすく、軽度の低亜鉛母乳であっても亜鉛欠乏に陥りやすい。乳幼児期の亜鉛栄養の不足は、発育不全のみならず、将来の健康をも妨げる要因になるため、母乳中亜鉛の減少を予防する意義は大きい。筆者らは、まず、*TNZD*に関連した亜鉛トランスポーターを明確に示すため、重篤な亜鉛欠乏状態に陥った母乳哺育児の日本人母親（4名）のゲノムDNAの解析を行い、それぞれの患者において、亜鉛トランスポーター *ZnT2* 遺伝子の新規変異を同定した（図4）。これまでに報告されている *ZnT2* 変異体を含め計7例の変異体の解析を実施し、十分量の亜鉛を母乳中へ分泌するためには、*ZnT2*の完全な亜鉛輸送活性が必要不可欠であることを実証している¹⁹⁾。さらに、*ZnT2* 遺伝子に見出される一塩基変異多型（SNP）が *ZnT2* の機能に及ぼす影響について解析し、その結果をもとにして低亜鉛母

ZnT2

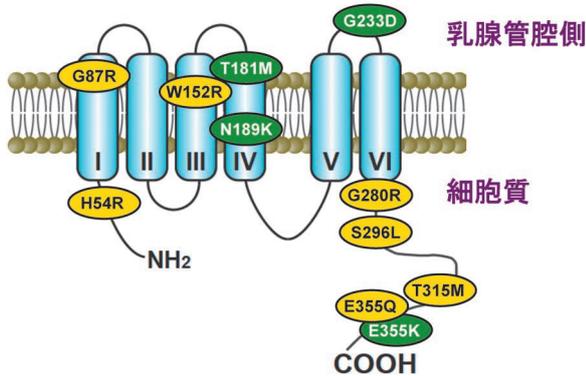


図4 乳児亜鉛欠乏を引き起こす低亜鉛母乳の原因として同定されたZnT2遺伝子の変異

ZnT2タンパク質の予想されるトポロジー図。黄色の楕円は、低亜鉛母乳を引き起こすとして同定されたZnT2遺伝子の変異を示す。また、緑色の楕円は、筆者らがZnT2遺伝子のSNPsを解析した結果、亜鉛輸送活性を消失し、低亜鉛母乳を引き起こす確率が高いと判定されたSNP（ミスセンス変異）を示す。

乳を産するリスクを前もって予測できる基盤を確立した。

また、母乳中への亜鉛輸送に必須の役割を果たすZnT2の発現量を増加させることで、低亜鉛母乳の亜鉛量を回復させることができると考えられたため、ZnT2の亜鉛輸送活性を高める食品因子を同定するための独自のスクリーニング系を、上述のZIP4と同様の手法を用いて構築した。これまでに、弱いながらも複数の活性候補因子を見出すことに成功している。これらの成果は、乳幼児の亜鉛栄養改善に大いに寄与するものであり、将来社会を担う乳幼児の健康の実現に貢献することが期待される。

おわりに

健康維持に亜鉛が有効であることを支持する結果は、高齢者はもちろん、あらゆる世代において報告されており、体内亜鉛量を高めることは、QOLの向上に必要不可欠である。しかしながら、近年、亜鉛摂取量の不足に加え、亜鉛吸収阻害因子を含む食品の過剰な摂取、投薬治療による吸収抑制や排出量の増大など、亜鉛吸収不全を生み出す要因は増加しており、このような食生活は、今後ますます深まると予想される。日常の「食」から亜鉛栄養の改善が可能となれば、その成果は、国を越え、あらゆる世代の健康増進に貢献する波及効果が期待され

る。超高齢社会を迎えた本邦を含む各国の人々の健康の実現につなげるため、本成果を、早急に社会に還元できるよう益々研究に邁進したい。

謝 辞

この度は、大変栄誉ある三島海雲学術賞を授与して頂き、理事長はじめ公益財団法人三島海雲記念財団関係者の方々、選考委員の先生方、また本賞にご推薦頂きました日本農芸化学会会長の清水誠先生に厚くお礼申し上げます。また、学生時代に研究をご指導頂きました京都大学名誉教授佐々木隆造先生に心より感謝申し上げます。故岩井裕子先生には金属研究の面白さをご指導頂きました。お礼申し上げますとともに、ご冥福をお祈りいたします。また、カンザス大学Glen K. Andrews教授にはZIP4に関する研究を、ミズーリ大学Michael J. Petris准教授には銅輸送体ATP7Aに関する研究をご指導頂きました。ここに深謝いたします。本研究の実施にあたり、ご指導・ご協力頂きました先生方、研究を共にした卒業生・在学生に深く感謝いたします。

文 献

- 1) T. Kambe, et al: *Physiol. Rev.*, **95**: 749-784, 2015.
- 2) T. Kambe, et al: *Cell Mol. Life Sci.*, **71**, 3281-3295, 2014.
- 3) T. Kambe: *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry* (V. Culotta and R. A. Scott, eds.), pp. 301-309, John Wiley & Sons, Ltd., 2013.
- 4) T. Kambe, et al: *Zinc Signals in Cellular Functions and Disorders* (T. Fukada and T. Kambe, eds.), pp. 27-53, Springer, Tokyo, 2014.
- 5) T. Kambe: *Methods Enzymol.*, **534**, 77-92, 2014.
- 6) T. Kambe, et al: *Cell Mol. Life Sci.*, **61**, 49-68, 2004.
- 7) T. Fukada, T. Kambe: *Metallomics*, **3**, 662-674, 2011.
- 8) T. Kambe: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1036-1043, 2011.
- 9) T. Kambe: *Curr. Top Membr.*, **69**, 199-220, 2012.
- 10) T. Kambe, et al: *Genesis*, **46**, 214-228, 2008.
- 11) T. Kambe, et al: *J. Biol. Chem.*, **277**, 19049-19055, 2002.
- 12) T. Suzuki, et al: *J. Biol. Chem.*, **280**, 637-643, 2005.
- 13) T. Suzuki, et al: *J. Biol. Chem.*, **280**, 30956-30962, 2005.
- 14) A. Fukunaka, et al: *J. Biol. Chem.*, **284**, 30798-30806, 2009.
- 15) A. Fukunaka, et al: *J. Biol. Chem.*, **286**, 16363-16373, 2011.
- 16) B. P. Weaver, et al: *Biol. Chem.*, **388**, 1301-1312, 2007.
- 17) T. Kambe, et al: *Mol. Cell Biol.*, **29**, 129-139, 2009.
- 18) T. Kambe, et al: *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **294**, R1474-1481, 2008.
- 19) N. Itsumura, et al: *PLoS ONE*, **8**, e64045, 2013.