

准教授
神戸大朋
共同研究者
宮前友作

1995 年京都大学農学部食品工学科卒業
1998 年同大学院農学研究科博士後期課程中退
1998 年京都大学大学院農学研究科助手
1999 年同大学大学院生命科学研究所助手
2008 年同大学大学院生命科学研究所准教授
現在にいたる

母乳栄養児の亜鉛欠乏に対して予防効果を示す食品因子の探索とその効果の検証

[要約]

亜鉛は必須微量栄養素として我々の健康に重要な役割を果たしているが、日々著しく成長する乳児の健全な発育のためには特に多量の亜鉛が必要となる。そのため、母乳中に含まれる亜鉛は、乳児の健全な発育に必須であり、母乳中の亜鉛が不足すると、乳児は重篤な皮膚炎の他、下痢や脱毛を発症し、成長が著しく阻害される。近年、乳児の亜鉛不足は、その後の成長に悪影響を与える可能性が示されており、乳児亜鉛欠乏の予防に対しては、早急に対策を立てることが望まれている。母乳中への亜鉛輸送には、亜鉛トランスポーター-ZnT2 が重要な役割を果たすため、本研究では、ZnT2 の発現を増加し母乳中亜鉛含量を増加させる食品因子の探索を試みた。また、低亜鉛母乳の原因となりうる ZnT2 遺伝子の SNPs の同定、さらに同定した SNPs に対して効果を有する食品因子の探索系の構築を試みた。

[目的]

亜鉛は、様々なタンパク質の構造因子、酵素の補因子、細胞内外のシグナル調節因子として機能する必須微量栄養素である。最近のプロテオーム解析からヒトゲノムにコードされたタンパク質の 10% が亜鉛欠乏モチーフを有することが試算されており、この事実は、亜鉛が極めて多様な生理機能を発揮することを端的に表している(1)。したがって、亜鉛は生命活動に重要なファクターとなることは疑いのない事実となるが、特に、日々著しく成長する乳児の健全な発育のためには特に多量の亜鉛が必要となる(2)。母乳中の亜鉛含量は、乳児の発育にあわせて変化することが知られており、初乳には母親の血清に比べ 5-8 倍量という極めて多量の亜鉛が存在する。母乳中の亜鉛量は徐々に低下し、成乳では母親の血清と同レベルにまで低下する。この授乳初期の多

量の亜鉛は、乳児の発育に必要となる亜鉛を十分に供給するための生体応答と考えられ、この母乳中亜鉛量の変動と乳児の発育のバランスが崩れた場合、乳児は必然的に亜鉛欠乏の危険に曝されることとなる。我々は、近年、低亜鉛母乳が原因で重篤な皮膚炎（一過性乳児亜鉛欠乏症 *Transient neonatal zinc deficiency*: TNZD）を発症する乳児を相次いで見出しており、TNZD の発症が *ZnT2* 遺伝子の変異によって引き起こされることを明らかにしてきた。これまでに、5 種類の遺伝子変異を見出しているが(3-5)、複合ヘテロ接合体変異の一例を除き、残りの全てが *ZnT2* 遺伝子のヘテロ接合体変異で発症していた。生化学的な解析の結果、これらヘテロ接合体変異による母乳中の亜鉛量の減少は、ドミナントネガティブ効果ではなく、ハプロ不全の様式（片方のアリルは正常であるため活性は有するが、その活性だけでは不十分）で、起こっている可能性が極めて高いことを示した(6)。本結果は、母乳中の亜鉛が低値になる危険性は、母親の僅かな亜鉛摂取不足や健康状態の悪化などにより影響を受けることを示唆していると考ええる。本研究では、食品成分から *ZnT2* の発現を増加させる因子（= 母乳中亜鉛含量を増やす因子）を同定することを目的とし、*ZnT2* 発現増強因子探索スクリーニング系を用いて食品抽出物を評価すると同時に、低亜鉛母乳の原因となる一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism; SNPs）の探索、及び、同定した SNP 変異に対する食品因子の効果を評価する系を確立して研究を実施した。

[方法]

・食材・食品抽出物からの *ZnT2* 発現促進因子の探索

ZnT2 プロモーター（推定される転写開始点上流 1.0kb を含む）の下流に分泌型ルシフェラーゼ遺伝子（*Cypridina Luciferase*, Thermo SCIENTIFIC）を接続したプラスミドを導入した HC11 細胞の培養液に、様々な食材・食品より抽出した抽出画分を終濃度 0.1% となるように添加し、24 時間培養した。培養液中に分泌されたルシフェラーゼ活性を測定（*Pierce Cypridina Glow Assay Kit* (Thermo SCIENTIFIC) を使用）した。また、同様に処理した細胞から調整した全細胞抽出液をウェスタンブロットに供して *ZnT2* の発現量を定量した。

・アミノ酸を置換させる SNPs が *ZnT2* の機能に与える影響に関する解析

SNPs データベースからアミノ酸を置換させる SNPs をランダムに選択し、two-step PCR 法を用いて、それら SNPs に相当するように変化させた *ZnT2* を発現するプラスミドを構築した。作成したプラスミドを亜鉛トランスポーター *ZnT1* と *ZnT4*、及びメタロチオネインを欠失させた株（*ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}*）に導入した後、蛍光亜鉛指示薬 *Zinpyr-1* を用いて亜鉛染色し、Flow cytometry を用いて亜鉛輸送活性に対する影響を評価した(4)。

[結果]

食材・食品抽出物からの *ZnT2* 発現促進因子の探索

ZnT2 プロモーターの下流に分泌型ルシフェラーゼ遺伝子を接続したプラスミドを構築し、マウ

ス乳腺上皮細胞HC11細胞に導入した。本細胞の培養液に様々な食品抽出物を添加し、ZnT2の発現を増加させるかどうか評価した(図1)。100種類ほどのサンプルについて数回ずつ解析を実施したが、これまでのところ、ルシフェラーゼ活性の値を劇的に増加させる抽出物を見出すことに成功していない。本解析については引き続き実施する予定である。また、食品抽出物が *ZnT2* 遺伝子の転写を増加させるだけでなく、ZnT2タンパク質の発現に及ぼす影響も考えられるため、ZnT2特異的なモノクローナル抗体を用いてZnT2タンパク質の発現に及ぼす効果について解析した(図2)。こちらについては、いくつかの抽出物でZnT2タンパク質の発現を増加させているような結果が得られているため、さらに解析を進めて抽出物よりZnT2の発現に関わる活性因子を精製し、その同定に結びつけたいと考えている。

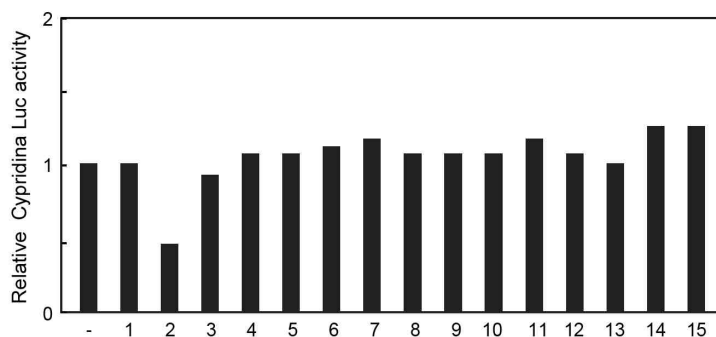


図1. ルシフェラーゼ活性を指標にした *ZnT2* 遺伝子転写活性を増強させる食品因子のスクリーニング
ZnT2 レポーターコンストラクトを導入したHC11細胞の培養液に食品抽出物を添加し、培養液中に分泌されたルシフェラーゼの値を示した結果の一例

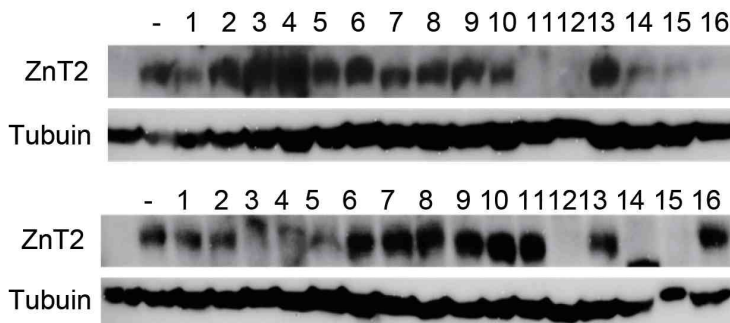


図2. ZnT2 タンパク質発現を増加させる食品因子のスクリーニング
HC11細胞の培養液に食品抽出物を添加した後、全細胞抽出液をウェスタンブロットに供して解析した結果の一例

ZnT2 遺伝子 SNPs により生じるアミノ酸置換に対しても効果を発揮する食品因子同定の試み

ZnT2 遺伝子には、多数のSNPsが見出されることが知られる(7)。SNPsがタンパク質の機能に

様々な影響を与えることが示されているため、これら *ZnT2* 遺伝子に見出されるSNPsが *ZnT2* の亜鉛輸送活性に大きく影響を与える可能性が考えられる。そこで、各SNPsにより生じたアミノ酸置換が *ZnT2* の亜鉛輸送活性に及ぼす影響について解析し、食品因子探索系に应用することを試みた。SNPsデータベースからアミノ酸を置換させるSNPsをランダムに選択し、その亜鉛輸送活性を評価した結果、複数のSNPsにおいて亜鉛輸送活性の低下が認められた(図3)。これらSNP変異体の亜鉛輸送活性低下は、*ZnT2* タンパク質の安定性の低下に起因する可能性が高く、*ZnT2* タンパク質を安定化させる食品因子は、母乳中亜鉛量を回復させることが可能であると考えられる。そこで、同定したSNP変異体のタンパク質安定性を回復させ、亜鉛輸送活性を評価できる解析系を構築した。本系は、*ZnT2* の亜鉛輸送活性を測定可能な細胞株 (*ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{+/+}*) に各変異体を安定発現させ、*ZnT2* タンパク質の発現量変化をウェスタンブロットで、亜鉛輸送活性を蛍光亜鉛指示薬 Zinpyr-1 を用いた Flow cytometry にて評価する系となっている。現在、本系を用いて各食品抽出物の効果について評価している。

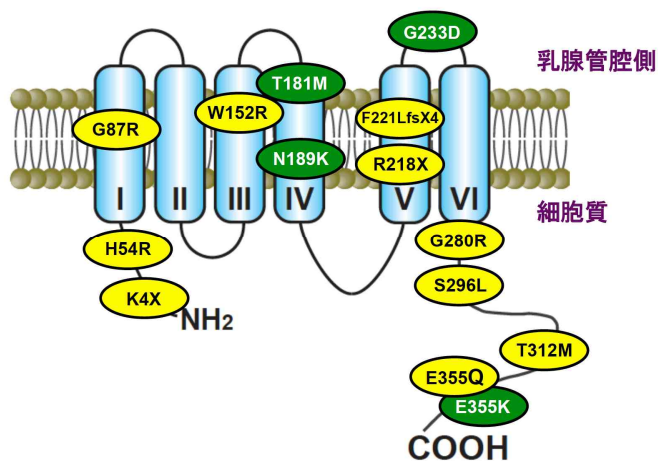


図3. *ZnT2* タンパク質の予想されるトポロジーの図と、これまでに見出されている *TN2D* の発症に関与することが知られているアミノ酸変異(黄色)の位置と本解析で *TN2D* 発症に関与することが予想されたSNP変異(緑色)の位置。H54R、G87R、F221LfsX4以外の変異は、日本人の *TN2D* を発症した乳児の母親から同定された変異。緑色で示した4つのSNPが *ZnT2* のタンパク質の安定性を低下させ、亜鉛輸送活性を低下させる。

[考察]

乳幼児の先天性亜鉛欠乏症には2つのタイプがあり、消化管からの亜鉛吸収不全が原因となる腸性肢端皮膚炎 (*Acrodermatitis enteropathica*) と、本研究で焦点を当てている一過性乳児亜鉛欠乏症 (*TN2D*) に分類される。*TN2D* に関しては、症例数や分子機序解析例の不足から、その発生率や発症リスクに関する詳細は不明であったが、最近の研究から、潜在的な *TN2D* 患者数はこれまでの予想よりも多い可能性があることを示唆され、母乳栄養児の皮膚炎では、亜鉛欠乏に対

して注意を払う必要があると考えられる。特に、我が国では、約5割の乳児が完全母乳で成育し、また高齢出産の増加により体内亜鉛プールの形成が十分でなく亜鉛欠乏に陥りやすい早産児の出生数が増加しているという現状がある。最近、乳幼児の亜鉛欠乏と自閉症スペクトラム障害発症に相関性が認められる可能性があるという報告や(8)、亜鉛欠乏母乳で哺育されたラットにおいては成体になってから亜鉛代謝が見かけ上正常に回復した場合においても、通常母乳で哺育された場合に比べ血漿中糖濃度は高くなることも観察されたている(9)。このように、乳児期の亜鉛状態が、将来の健康にまで影響を及ぼすことが示唆されている。食品成分により亜鉛トランスポーターの発現を変化させる例として、我々は消化管からの亜鉛吸収に機能する亜鉛トランスポーターZIP4 の発現を増強させ、亜鉛取り込み活性を増大させる因子を同定することに成功しており(10)、ZnT2 に対しても同様の活性を有する食品因子が見いだせると考えている。

授乳期の亜鉛摂取に万全の対策を施すためには、母親の摂取する食を通して母乳中亜鉛量を充実させることにより乳児を亜鉛欠乏の危険性から回避させ、健やかな健康に結びつける意義は大きい。今後も引く続き解析を続けていくことが重要であり、得られた成果を実生活に還元していきたいと考えている。

謝辞

本研究を実施するにあたり、ご援助賜りましたサッポロ生物科学振興財団に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Kambe, T., Tsuji, T., Hashimoto, A., and Itsumura, N. (2015) The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiol Rev* **95**, 749-784
2. Kambe, T., Fukue, K., Ishida, R., and Miyazaki, S. (2015) Overview of Inherited Zinc Deficiency in Infants and Children. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **61 Suppl**, S44-46
3. Itsumura, N., Inamo, Y., Okazaki, F., Teranishi, F., Narita, H., Kambe, T., and Kodama, H. (2013) 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
4. Itsumura, N., Kibihara, Y., Fukue, K., Miyata, A., Fukushima, K., Tamagawa -Mineoka, R., Katoh, N., Nishito, Y., Ishida, R., Narita, H., Kodama, H., and Kambe, T. (2016) Novel mutations in SLC30A2 involved in the pathogenesis of transient neonatal zinc deficiency. *Pediatr Res* **80**, 586-594
5. 小原隆史, 小松なぎさ, 逸村直也, 神戸大朋, 武藤雄一郎, 西原卓宏, 平井克樹, 右田昌宏. (2016) 母体ZnT2遺伝子変異に基づく低亜鉛母乳による亜鉛欠乏性皮膚炎. *日本小児科学会雑誌* **120**, 1649-1656

6. Golan, Y., Itsumura, N., Glaser, F., Berman, B., Kambe, T., and Assaraf, Y. G. (2016) Molecular Basis of Transient Neonatal Zinc Deficiency: NOVEL ZnT2 MUTATIONS DISRUPTING ZINC BINDING AND PERMEATION. *J Biol Chem* **291**, 13546-13559
7. Alam, S., Hennigar, S. R., Gallagher, C., Soybel, D. I., and Kelleher, S. L. (2015) Exome Sequencing of SLC30A2 Identifies Novel Loss - and Gain-of-Function Variants Associated with Breast Cell Dysfunction. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **20**, 159-172
8. Yasuda, H., Yoshida, K., Yasuda, Y., and Tsutsui, T. (2011) Infantile zinc deficiency: association with autism spectrum disorders. *Sci Rep* **1**, 129
9. 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. (2016) 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**, R459-468
10. 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. (2015) 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**, 183-193