

微量栄養素と機能のめやす

奥田 拓道

(愛媛大学医学部医化学第二*)

Trace Nutrients and Indexes of Healthy Functions

Hiromichi OKUDA

*2nd Department of Medical Biochemistry, School of Medicine, Ehime University,
Ehime 791-0295, Japan*

Summary

I would like to suggest that trace nutrients may be defined to be food components with a variety of healthy functions in addition to nutritional ones and propose that clues for finding these functions may be in history, society and modern medical science. We have done experiments according to this proposal and succeeded in finding new substances with healthy functions. These are insulin like substances such as adenosine, pyroglutamate, lithium, vanadium and minus ion, which stimulate glucose incorporation into fat cells, and anti-cancer substances such as ergosterol and compound X, which inhibit tumor growth without any side effects. We firstly had doubts about the mechanisms of actions of insulin and catecholamines accepted by modern medical science and suggested another mechanisms on these hormones after examining directly biological actions of these hormones without presupposition of signal transductions on the actions of these hormones. The clues for finding the trace nutrients mentioned above were obtained on the way to examining the mechanism of actions of these hormones. Based on these, I suggested the way to find trace nutrients in natural products.

微量栄養素とは、栄養の一次機能だけでなく、二次、三次機能も視野に入れた栄養素であると解釈して、機能のめやすについて考えてみることにした。最近私は、微量栄養素の機能のめやすを発見するヒントは、1) 現代医学の常識 2) 歴史 3) 社会の中にあると考えるようになった。1) は現代医学の常識を疑うことを通じて、ヒントを得ようとするものである。2) は歴史、特に東洋医学の中から新しい機能

* 所在地：松山市鷹子町1174-17 (〒790-0925)

本稿は第17回微量栄養素研究会シンポジウムにおいて行われた特別講演の内容をとりまとめたものである。

を発見しようとする方向である。例えば、陰陽の考え方をヒントに、アデノシン、ピログルタミン酸¹⁾、デセン酸²⁾が、脂肪細胞における脂肪分解を抑制し、グルコースからの脂肪合成を促進するインスリン様物質であることを同定するのである。3)の社会については、糠漬けの糠が、腐敗しないことをヒントに、乳酸菌が生産する抗生物質様ペプチド(バクテリオシン)を発見することなどである。いずれにしても、社会が食品に期待しているのは、現代医学が対応できない難病の予防や治療なのだから、現代医学から少し距離を置く姿勢が必要ではなからうか。今回は、現代医学の常識を疑うことを通じて得られた機能のめやすについて述べることにしたい。

現代医学の常識を疑う

成人糖尿病や癌等の生活習慣病に対する特効薬が出現していないという事実は、これらの疾病に対する現代医学のアプローチに問題があることを推測させる。

成人糖尿病とは、筋肉や脂肪細胞等の標的細胞へのグルコース取り込みに対するインスリン作用が低下した病態である。このインスリン作用を上昇させて、成人糖尿病を治療するには、インスリンのグルコース取り込みの仕組みが明らかにされていなければならない。標的細胞にインスリンが作用すると、小胞膜に存在するグルコース運搬体(Glucose-transporter-4, Glut-4)が細胞膜へ移動し、グルコースの細胞内への取り込みを促進することはよく知られている。問題は、どのような仕組みでGlut-4が移動するかである。現代医学の常識では、インスリンは α 、 β -サブユニットからなる受容体に接合し、チロシンキナーゼを活性化し、PI3-キナーゼの活性が上昇することによって、Glut-4の移動が起こることになっている。PI3-キナーゼを阻害するワートマニンがGlut-4の移動も阻害するというのがその理由である。しかし、ワートマニンはPI3-キナーゼにだけ作用するのではなく、細胞膜上の Na^+/H^+ チャネルも阻害するし、脂肪細胞内の油滴表面に作用して、リパーゼの油滴への接触を促して脂肪分解を促進するといった働きもする。ワートマニンがGlut-4の移動を阻害するからといって、PI3-キナーゼが関与しているとはいえないのである。さらに、より基本的な問題がある。それは、インスリンと受容体の結合は、グルコースの取り込みを指標とする限り、洗ったら取れるゆるい結合であるという点である。Fig. 1を見ていただきたい。インスリンに蛍光色素(FITC)を結合し、flow cytometryで脂肪細胞とFITC-インスリンとの結合をみた成績である。脂肪細胞のみでは蛍光強度の低いところに細胞が集まっている(Fig. 1-a)。脂肪細胞にFITC-インスリンを加えると、蛍光強度の高いところに細胞が移動し、FITC-インスリンが脂肪細胞に結合していることがわかる(Fig. 1-b)。

FITC-インスリンを結合した脂肪細胞を25℃や4℃のHanks緩衝液で1回だけ洗うと、結合したFITC-インスリンは脂肪細胞から離れる(Fig. 1-c, d)。このとき、 ^3H -2-deoxyglucose (^3H -2DG)を用いてその取り込みを調べてみると、脂肪細胞にFITC-インスリンを結合させると ^3H -2DGの取り込みが増し、1回洗いでその効果は消失し、洗った後の脂肪細胞にFITC-インスリンを加えると再び取り込みは増すのである(Fig. 2)³⁾。この成績は、グルコースの取り込みに関わるインスリンと受容体の結合は1回洗いで取れるようなゆるい結合しかしていないことを示すものである。一方、チロシンキナーゼやPI3-キナーゼの活性化に関わる受容体は、低温の緩衝液で10回洗ってもインスリンが解離しない強い結

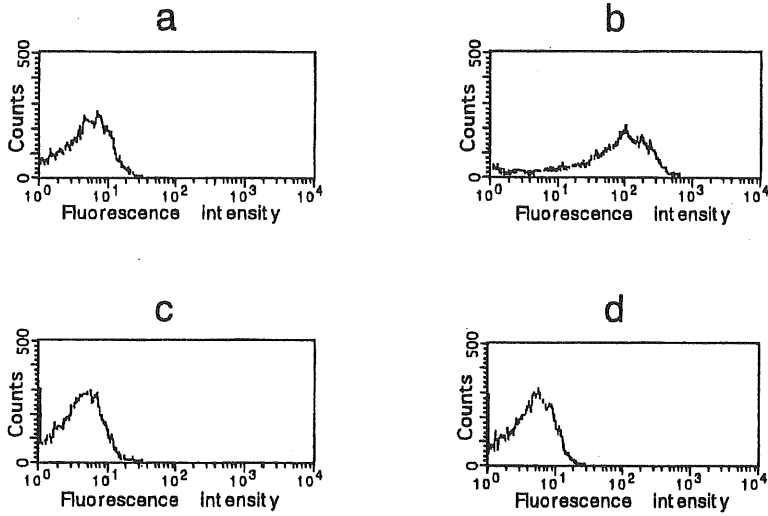


Fig. 1 FITC-insulin binding to rat adipocytes quantified by flow cytometry.
a. Control. b. FITC-insulin. c. FITC-insulin and washing at 25°C. d. FITC-insulin and washing at 4°C.

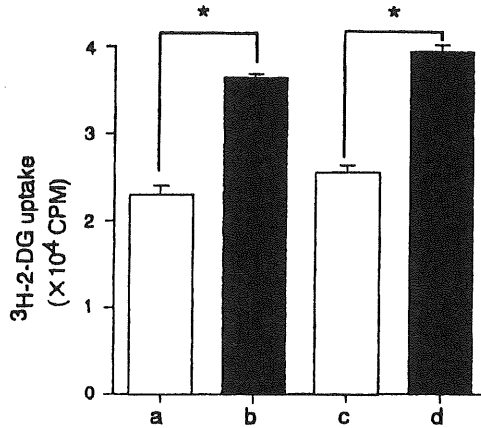


Fig. 2 Effect of washing on ³H-2DG uptake by rat adipocytes.
Adipocytes were incubated for 10 min with (b) or without (a) FITC-insulin (100 nM). Other adipocytes were incubated with FITC-insulin (100 nM), washed with Hank's-BSA buffer at 25°C and then incubated for 10 min with (d) or without (c) FITC-insulin (100 nM). Each point represents the mean ± SEM of six separate assays. *<0.01.

合である。おそらく疎水結合であろう。インスリンと受容体の結合には、洗っても取れないものの他に、イオン結合などの洗っても取れる結合も存在するはずである。現代医学のインスリン受容体と称するものは、チロシンキナーゼやPI3-キナーゼ活性化の受容体であることは確かであるが、グルコース取り込みに関わる受容体であるかどうかは疑問なのである。

私は、昭和63年から脂肪細胞におけるカテコールアミンの脂肪分解促進機序の解明に取り組んできた。現代医学ではカテコールアミンは脂肪細胞上の β -受容体(β_1 , β_2 , β_3)に結合し、G-タンパクを介して、アデニルシクラーゼを活性化し、生じたサイクリックAMPがA-キナーゼを活性化、このA-キナーゼによってリパーゼがリン酸化され、活性化されることによって脂肪分解が促進すると信じられている。事実、脂肪細胞をNorepinephrineやIsoproterenolと1時間、37℃でincubateすると、脂肪酸の遊離が高まり、ForskolinやジブチルサイクリックAMP(DBcAMP)、サイクリックAMPを分解するホスホジエステラーゼの阻害剤であるTheophyllineも脂肪分解を促進することが、上述の現代医学の理論を支える根拠になっている。ところが、Fig. 3に示すように、Norepinephrine, Isoproterenol, Forskolin, DBcAMP, Theophyllineとincubateしても脂肪細胞のリパーゼ(HSL)は全く活性化されていないのである。さらに、脂肪細胞から調製した油滴にリパーゼを加えた無細胞系にサイクリックAMP(cAMP)やcyclic AMP-dependent protein kinase(PKA)を添加すると、リパーゼ(HSL)や油滴表面のタンパク(perilipin)がリン酸化されるが(Fig. 4)、この時、脂肪分解は促進しないのである(Fig. 5)。一方、Norepinephrineをこの系に加えると、HSLやperilipinのリン酸化とは無関係に脂肪分解が促進する(Fig. 5)。このような成績は、カテコールアミンの作用がサイクリックAMP、リパーゼの活性化、タン

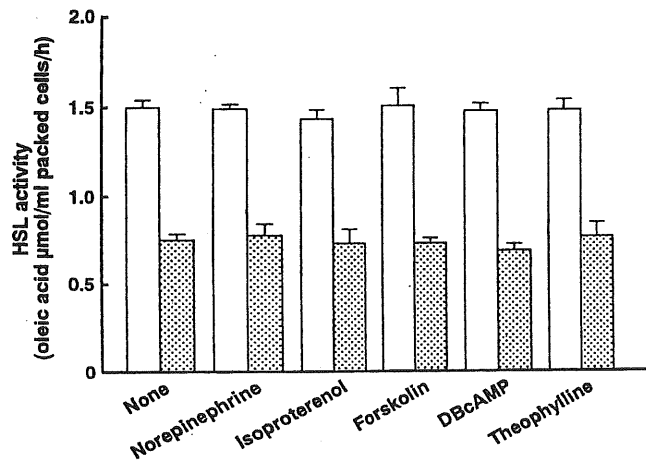


Fig. 3 Effects of various lipolytic agents on HSL activity in rat fat cells.

Fat cells were incubated with 1 μ M norepinephrine, 1 μ M isoproterenol, 10 μ M forskolin, 1 mM DBcAMP or 1 mM theophylline at 37℃ for 1 h. After incubation, each reaction mixture was centrifuged to separate the medium and fat cells, and the HSL activity was estimated using either trioleoylglycerol (□) or cholesteryloate (▨) as the substrate. Each column represents the mean \pm SE of four separate experiments.

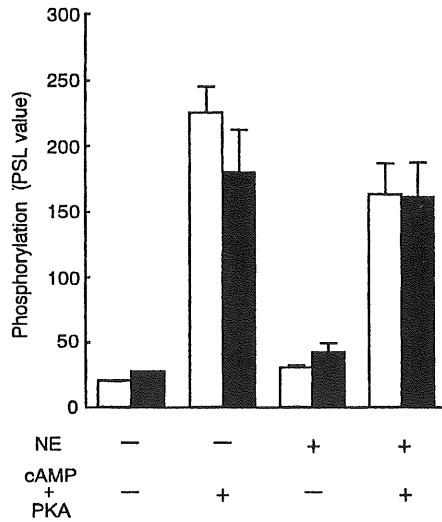


Fig. 4 Phosphorylation of HSL and perillipin in the cell-free system.

A mixture of lipid droplets and HSL was incubated at 37 °C for 10 min with [γ - 32 P] ATP (1 nM) in the presence or absence of norepinephrine (NE), cyclic AMP (cAMP) and cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA) as indicated. Incorporations of 32 P into HSL (□) and perillipin (■) were determined after SDS-PAGE by autoradiography, quantitated by scanning BAS 3000. Each value was the mean \pm SE of four separate experiments.

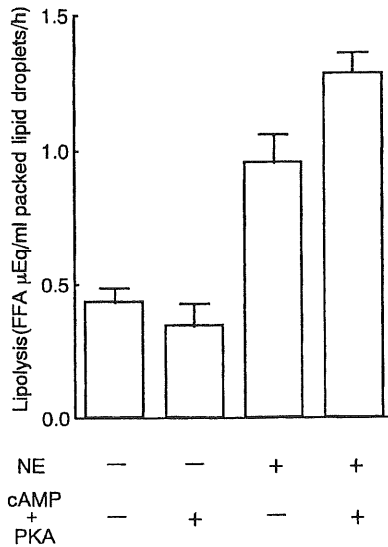


Fig. 5 Lipolysis of the cell-free with buffer A system in the presence or absence of norepinephrine, cyclic AMP and cyclic AMP-dependent protein kinase.

A mixture of lipid droplets and HSL in buffer A (100 mM Tris-HCl, pH7.0, 2 mM EDTA, 2 mM dithioerythritol, 10 mM MgCl₂) was incubated at 37 °C for 1h with ATP (1 nM) in the presence or absence of norepinephrine (NE), cyclic AMP (cAMP) and cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA) as indicated. Each value was the mean \pm SE of four separate experiments.

バクのリン酸化などを介してはいないことを示すものである。カテコールアミンは、脂肪細胞内の油滴表面に作用し、その性状を変えることでリパーゼと油滴との接触を高めて脂肪分解を促進するのである。油滴をホモジナイズや超音波処理で破壊するとホルモンの作用は消失する。細胞をすりつぶすことから始まった20世紀の生化学は、すりつぶしたら壊れる細胞の構造（油滴）がホルモン作用に関わっていたことに気付かなかったのである。

インスリンの作用機所を疑うところから新しい機能が見えてくる

インスリンの標的細胞である脂肪細胞や筋肉細胞は、血管の外に存在し、周囲は細胞間質液で満たされている。血液とは異なり、この細胞間質液のpHは、7.4から6.8まで変動する⁴⁾。血液に比べて緩衝作用が弱いのは、ヘモグロビンが存在しないからである。ところで、細胞間質液のpHが7.4から低下すると、インスリンの作用は著しく阻害される。ラット下肢のひらめ筋を種々のpHのHanks緩衝液と15分incubateし、2-deoxy-glucoseの取り込みを調べてみると、pHが7.4から7.2に低下すると約50%、7.0になると100%インスリンの作用が阻害される (Fig. 6)。また、緩衝液のNa⁺をCholine⁺に置き換えると、pH7.4でもインスリンによる2-deoxy glucoseの取り込み促進は全く見られない (Fig. 7)。しかし、specific binding法を用いたインスリンと受容体の結合は、pH7.0やcholine⁺との置換によってむしろ増加する (Fig. 7)。specific binding法で同定されるインスリン受容体は、チロシンキナーゼやPI3-キナーゼ活性化の受容体ではあっても、グルコース取り込みに関わる受容体ではないことが、ここでも証明されたのである。Fig. 7の成績でHanks緩衝液のNa⁺をcholine⁺に変えるとインスリンの作用が消失した事実は

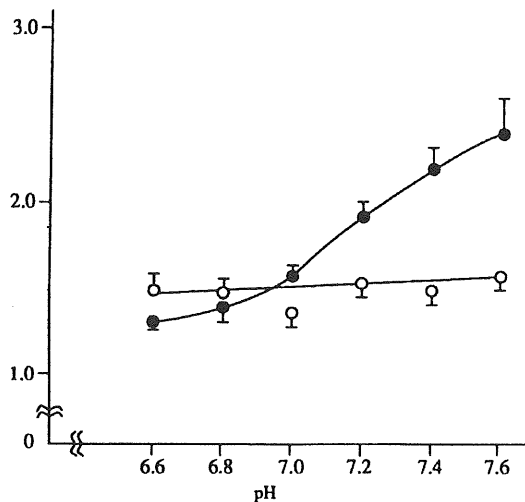


Fig. 6 pH-dependence of basal and insulin-stimulated 2-deoxy-D-glucose uptakes by rat soleus muscle.

Rat soleus muscle was incubated in Hanks buffer solution at different pH values in the absence (○) or presence (●) of 10 nM insulin for 15 min. Then 2-deoxy-D-glucose uptake was initiated by adding radioactive tracer. Bars show standard errors of means (n=6-10).

重要である。pHの成績と併せて考えると、インスリンのグルコース取り込み作用に、 Na^+/H^+ チャネルが関与していることを推測されるからである。事実、このチャネルの阻害剤として知られる5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride (EIPA) は、インスリンによる2-DGの脂肪細胞への取り込みを阻害する (Fig. 8)。 Na^+/H^+ チャネルは、細胞外の Na^+ を細胞内へ、細胞質の H^+ を細胞外へ排出するチャネルであるが、 Na^+ の代わりに Li^+ も基質になることができる。Hanks緩衝液の Na^+ を Li^+ に置換すると、インスリンが存在しなくても2-DGの取り込みが高まる (Fig. 8)。 Na^+ よりも Li^+ が原子半径が小さいのでチャネルも通りやすく、このようなことが起こるのであろう。もちろん Li^+ はチロシキナーゼを活性化

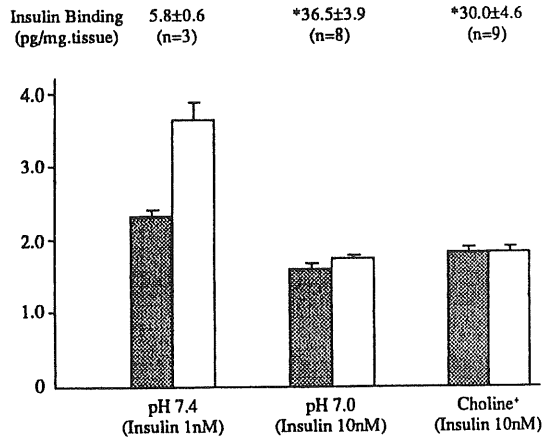


Fig. 7 Relationship of insulin binding, and basal and insulin-induced 2-deoxy-glucose uptake by soleus muscle. Hatched columns show basal uptakes and open columns show insulin-stimulated uptakes.

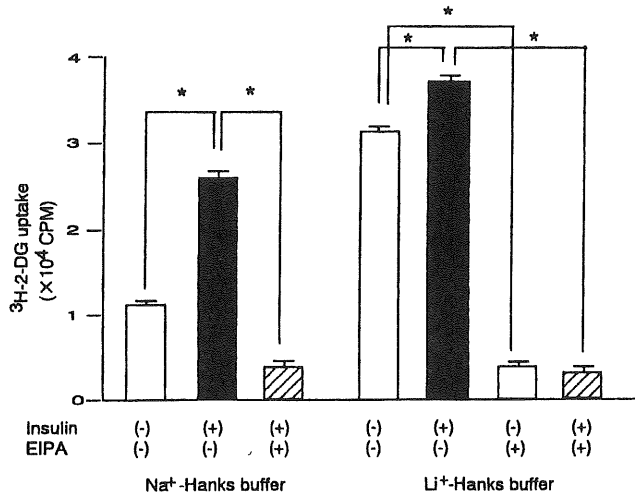


Fig. 8 Effect of Li^+ on ^3H -2-DG uptake in rat adipocytes. Adipocytes were incubated in Hank's buffer or in Na^+ (-) Li^+ (+) Hank's buffer with or without insulin (1 nM) or EIPA (1 mM). Na^+ (-) Li^+ (+) Hank's buffer was prepared by replacing the Na^+ in the buffer with Li^+ . Each point represents the mean \pm SEM of six separate assays. * <0.01 .

することはない。チロシンキナーゼを活性化することなく、2-DGの細胞内への取り込みを促進することが知られているバナジウムも、Fig. 9に示すように、FIPAによって、その作用が阻害され、 Na^+/H^+ チャネルを介していることが分かる。インスリンは、 Na^+/H^+ チャネルを活性化することで、Glut-4の細胞膜への移動を促進し、グルコースの取り込みを促進していると考えられるが (Fig. 10)、この時、細胞を取りまく間質液のpHが低下していると、 H^+ 濃度が細胞外で高くなり、細胞内から H^+ が排出されにくく、インスリンのグルコース取り込み作用は低下する。堀内昇博士 (坂出, 四国) は、マイナスイオン発生装置を考案され、II型糖尿病の治療に成果を上げている。マイナスイオン (e^-) は、 H^+ に電子を与えて、水素原子にする ($\text{H}^+ + e^- \rightarrow \text{H}$) ことによって、 H^+ を低下させ、pHを上昇させる。

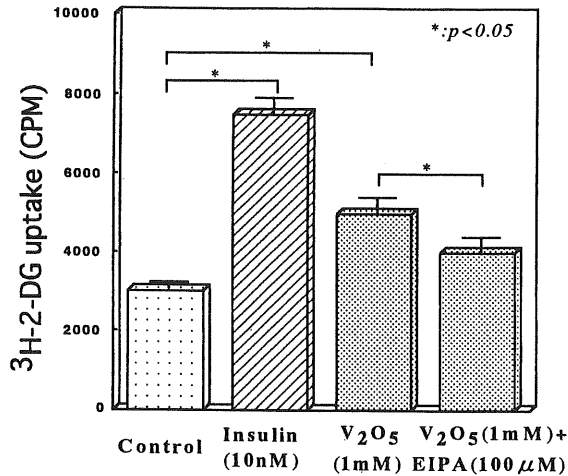


Fig. 9 Effect of EIPA on Vanadium pentoxide-induced ^3H -2-DG uptake in rat adipocytes.

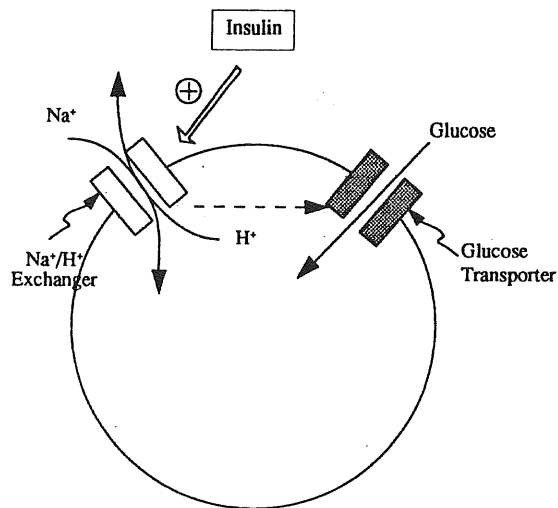


Fig. 10 Schematic model of relation of Na^+/H^+ exchange and glucose transport.

マイナスイオンの照射で、細胞間質液 pH が上昇し、インスリンによる Na^+/H^+ チャネルの活性化がスムーズに起こり、このホルモンによる細胞への血糖の取り込みが促進するのである。インスリンの作用機序を疑うことから、 Li^+ 、バナジウム、マイナスイオンの機能性が見えてきたのである。

構造を見落とした現代医学

20世紀の分子細胞生物学の出発は、19世紀末、Buchnerが酵母菌をすりつぶし、分子によってアルコール発酵が起こるのを発見したことだった。以後、分子への理解は進んだものの、すりつぶしたら壊れる構造を無視することになった。ホルモンの作用は分子で説明できるとしたシグナルトランスダクション全盛の時代を迎えたのである。 β_3 受容体は、サイクリック AMP やリパーゼのリン酸化の受容体ではあっても、脂肪分解のそれではなかった。脂肪分解に関わるカテコールアミンの受容体は、すりつぶしたら壊れる油滴だったのである。ホルモンの作用機序の研究に、受容体の同定法や構造を見落とすといった点に、難点があるように思えるが、このような視点から抗癌剤について考えてみよう。5-フルオロウラシル、シスプラチン、アドリアマイシン等の抗癌剤は、DNAの合成や複製を阻害することによって作用する。しかし、DNAの合成や複製は正常細胞にも起こる現象なのだから、当然のことながら、下痢、脱毛、白血球減少などの副作用が発現する。DNAを含めて、分子に関しては、これまで、癌特有のものは発見されていない。癌にしか見られないものは、接触阻害の欠落等機能である。正常細胞同士が接触すれば細胞分裂が停止するが、癌細胞同士が接触しても、分裂は停止せず、盛り上がって増殖する。この接触阻害という機能は、細胞膜の構造に由来する。正常細胞と癌細胞の膜の間には、分子としては量的な違いしかないが、機能としては質的な差が存在するのである。したがって、癌細胞の機能を標的にした抗癌剤は、癌細胞だけを殺し、副作用のないものである可能性がある。最近、我々は、アガリクス茸の脂質画分の中に、癌細胞だけを殺し、副作用の全くない抗癌物質を見出した。一つはエルゴステロールであり、他はマンニトールを含む画分に存在し、未だ構造決定に至っていないので、compound X と名付けている。この compound X は、担癌動物の宿主の免疫能を高めるとともに、癌細胞周辺の血管新生を阻害することが明らかになったのである。免疫能や血管新生は、構造に裏打ちされた機能である。宿主と癌の関係の中で構造に基づく機能に注目することによって、副作用のない新しい抗癌剤の発見が可能になるのではなからうか。

文 献

- 1) Takaku, T., Kameda, K., Matsuura, Y., Sekiya, K. and Okuda H. (1990) *Planta Medica* 56 : 27-30
- 2) 木村善行, 奥田拓道 (1999) *J. Trad. Med.* 15 : 342-343
- 3) Kameda, K., Sumida, M., Tsujita, T. and Okuda H. (1999) *J. Clin. Biochem. Nutr.* 27 : 55-67
- 4) 久保 周 (1987) *愛媛医学* 6 : 70-77