

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462324

研究課題名(和文) 亜鉛シグナルは運動器の構造と機能をどのように制御するのか？

研究課題名(英文) How does zinc signal control development and function of musculoskeletal organs?

研究代表者

深田 俊幸 (Fukada, Toshiyuki)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：70373363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：亜鉛の欠乏は骨軟骨代謝に異常をもたらすが、なぜ亜鉛恒常性の破綻が支障をもたらすのか、その機序は解明されていない。申請者は、亜鉛トランスポーターZIP13の骨軟骨形成での役割と生化学的特徴を示した。さらに、病原性変異型ZIP13がプロテアソーム系で分解されることを報告した。これらの結果は、当該疾患発症の分子基盤を示すものである。

一方、ZIP13の近縁分子であるZIP7も骨軟骨制御に関与することを見出したが、その機序は相互に異なっており、亜鉛シグナルの特異性が示された。今後の解析により、亜鉛シグナルがどのように運動器の形成と機能に関わっているのか、その一端が明らかにされるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：We have revealed the role of zinc transporter ZIP13 in musculoskeletal organs, and molecular features of ZIP13 protein. We also found that proteasome pathways readily degrade the pathogenic ZIP13 mutants, showing the molecular basis of ZIP13-mediated regulation of musculoskeletal organs such as bone and cartilage.

We also assessed the role of ZIP7, a closest molecular relative of ZIP13, revealing that ZIP7 is also required for development of bone and cartilage, however, the molecular mechanisms were distinct between ZIP7 and ZIP13, indicating that each zinc signal possesses the specificity to control unique pathways and/or phenomena. Further research on these zinc transporters as molecular models will uncover the biological significance of zinc signaling, especially for the molecular mechanisms by which how each zinc signal contributes to regulate the development and functions of musculoskeletal organs.

研究分野：分子生物学

キーワード：シグナル伝達 亜鉛 トランスポーター 運動器 骨軟骨 結合組織

1. 研究開始当初の背景

申請者は、研究開始当初において、亜鉛がシグナル因子(亜鉛シグナル)として機能し、その異常が骨や筋肉の病気の原因になることを報告した。一方、亜鉛シグナルの作用機序は十分に解明されておらず、その追求を通して運動器科学に新しいパラダイムを構築すべく、本研究を開始した。以下に、これまでの研究内容を記す。

亜鉛シグナルの骨軟骨形成への関与

亜鉛シグナルの意義を調べるために、役割が不明であった亜鉛トランスポーターZIP13の遺伝子欠損(KO)マウスを解析した。その結果、ZIP13が骨・筋肉・皮膚の形成に必須であり、ZIP13の機能喪失が骨や筋肉の形成異常および早老症の特徴を伴う病気をもたらすこと、ZIP13の亜鉛シグナルがBMP/TGF-の情報伝達に関わることを見出した。これらの結果によって、ZIP13を介する亜鉛の恒常性が骨軟骨形成に重要であること、亜鉛が細胞内でシグナル因子(亜鉛シグナル)として機能することが示唆された(図書1-2)。

亜鉛シグナルは運動器の形成と機能に必要である

亜鉛シグナルの特異性を検証するために、生理的な役割が不明であった亜鉛トランスポーターZIP14のKO(*Zip14-KO*)マウスを作製して解析した。その結果、*Zip14-KO*マウスは歩行障害を呈すること、ZIP14が骨軟骨分化に必要であること、ZIP14の亜鉛シグナルがGPCRの情報伝達を制御することを見出した。

これらの研究結果は、亜鉛シグナルが運動器の形成と機能に重要であること、亜鉛シグナルには亜鉛トランスポーターごとに作用点や機序が異なることを示している。申請者は、亜鉛シグナルの選択的な作用機構を亜鉛シグナル機軸と命名し、生命機能の新たな制御機構として提唱した。

上述の成果は、亜鉛シグナル機構の整形外科領域の研究対象としての重要性を示唆するものであるが、亜鉛シグナルと運動器との関連については多くの未解決問題が残されていた。そこで、申請者は以下の命題解決を主眼に据えて、亜鉛シグナルの運動器の恒常性や病気における役割解明を目指すことを目標とした。

- 1) 亜鉛シグナルの特異性の解明
- 2) 亜鉛シグナルの制御機序の解明
- 3) 亜鉛シグナルの運動器疾患における意義

2. 研究の目的

本研究は、骨・軟骨・筋肉など運動器における亜鉛シグナルの役割を明らかにするものである。上記した研究背景から、「亜鉛シグナルが運動器にどのような役割を演じているのか」について、(1) 遺伝子欠損マウスの

解析、(2) 亜鉛トランスポーターの構造解析、(3) 亜鉛トランスポーター結合分子の同定から、亜鉛シグナル機構の解明を試みた。以下に実験内容を記す。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子欠損マウスの解析

骨軟骨形成における亜鉛シグナルの特異性を解明するために、骨軟骨疾患関連分子であるZIP13と分子遺伝学的に最も近縁である亜鉛トランスポーターZIP7の遺伝子欠損マウスを作製して解析した。

(2) 亜鉛トランスポーターの構造解析

新規エーラス・ダンロス症候群患者から同定された病原性変異型ZIP13(G64D型, ΔFLA型)について、生化学的な特徴を解析した。

(3) 亜鉛トランスポーター結合分子の同定

Yeast two hybrid systemを用いて、亜鉛トランスポーター結合分子を単離し、その役割を解析した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子欠損マウスの解析

ZIP13と分子遺伝学的に最も近縁であり、運動器における役割が不明であった亜鉛トランスポーターZIP7に注目し、ZIP7の遺伝子欠損マウスを解析した。ZIP7は骨芽細胞、軟骨細胞、線維芽細胞にも発現するが、それらの細胞における役割は明らかではなかった。そこで、まず*Collagen 1-Cre*トランスジェニックマウスを用いて間葉系細胞特異的にZIP7を遺伝子欠損するマウス(*Zip7-cKO/Col1-cre*マウス)を作製して解析した。その結果、当該マウスには成長遅延・真皮薄弱化、骨量低下等の*Zip13-KO*マウスに類似する異常が現れた。間葉系幹細胞からZIP7をノックダウン(*Zip7-KD*)して検討した結果、*Zip7-KD*間葉系幹細胞は細胞増殖能が低下し、骨芽細胞や軟骨細胞および線維芽細胞への分化誘導に支障を呈した。また、ZIP7が欠損された細胞では小胞体内に亜鉛が過剰に蓄積し、小胞体に局在するタンパク質ジスルフィド異性化酵素(protein disulfide isomerase, PDI)が不活性化することが示された。さらに、PDIの不活性化によって小胞体ストレスが過剰に高まり、*Zip7-KD*間葉系幹細胞が維持できなくなることが明らかになった。以上の結果は、小胞体に局在するZIP7は間葉系幹細胞の維持に必要であり、皮膚や骨軟骨の形成に必須であること、さらに近縁分子であるZIP13とは異なる機能を有していることが判明した(雑誌論文1)。

一方、ZIP7は腸管上皮細胞にも発現しており、ZIP7を腸管特異的に欠損すると腸粘膜構造が維持できないことを見出した。ZIP7を欠損した細胞では、小胞体ストレスが異常に高

まり、腸管上皮細胞が死滅して腸粘膜構造が崩壊することが明らかになった。以上の結果は、ZIP7は腸管上皮細胞の増殖制御にも必要であり、腸粘膜の維持に必須であることが明らかになった(雑誌論文 3,6)。

(2) 亜鉛トランスポーターの構造解析

新規エーラス・ダンロス症候群(脊椎手掌異形成型エーラス・ダンロス症候群, OMIM 612350) の患者で同定された病原性変異型 ZIP13 蛋白質(G64D 型, ΔFLA 型)の特徴を解析し、病原性変異型 ZIP13 蛋白質がプロテアソーム系で迅速に分解されること、プロテアソーム系阻害剤の処理がそれらの蛋白質量と細胞内の亜鉛恒常性を正常化することを報告した。これらの結果は、脊椎手掌異形成型エーラス・ダンロス症候群の発症の分子基盤を示唆するものであり、他の要因に基づく運動器疾患の機序にも新たな理解を与えるものと思われる(雑誌論文 15, 17)。

(3) 亜鉛トランスポーター結合分子の同定

亜鉛トランスポーター ZIP13 を高発現させた細胞株や線維芽細胞を用いて、ZIP13 に結合する分子を単離した。抗 ZIP13 抗体で免疫沈降された蛋白質は、MALDI-TOFMS 網羅的質量分析によって同定した。その結果、病原性変異型 ZIP13 蛋白質には VCP/Cdc48/p97 が会合し、病原性変異型 ZIP13 蛋白質の分解を推進している様相が明らかになった。これらの結果は、上記(2)の結果と合わせて脊椎手掌異形成型エーラス・ダンロス症候群の新たな治療法開発の可能性を示唆するものである(雑誌論文 15, 17)。

上述の成果は、整形外科領域における亜鉛シグナル機軸の重要性を示唆するものであり、亜鉛シグナルが運動器の形成と維持に深く関わっていることを示すものである。骨軟骨や歯牙の形成における亜鉛シグナルの理解が深まってきた一方で、運動器の組織として重要な骨格筋と腱における役割はまだ解明されていない。次の新たな目標として、骨格筋と腱における亜鉛シグナルの役割解明と、亜鉛トランスポーターの制御方法の開発を掲げ、関連疾患の理解と創薬研究に努めたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 19 件)

- Bin BH, J. Bhin, J. Seo, SY. Kim, E. Lee, K. Park, DH. Choi, T. Takagishi, T. Hara, D. Hwang, H. Koseki, Y. Asada, S. Shimoda, K. Mishima, ***T. Fukada**. Requirement of zinc transporter SLC39A7/ZIP7 for dermal development to fine-tune endoplasmic reticulum function by regulating protein disulfide isomerase. *Journal of Investigative Dermatology* in press (*corresponding author) DOI: 10.1016/j.jid.2017.03.031
- Teranishi M, M. Takaishi, K. Nakajima, M. Ikeda, Y. Higashi, S. Shimoda, Y. Asada, A. Hijikata, O. Ohara, Y. Hiraki, S. Mizuno, **T. Fukada**, T. Furukawa, N. Wakamatsu, S. Sano. Critical involvement of ZEB2 in collagen fibrillogenesis: the molecular similarity between Mowat-Wilson syndrome and Ehlers-Danlos syndrome. *Scientific Reports* 7: 46565, 2017 DOI: 10.1038/srep46565
- Ohashi W, K. Hase, ***T. Fukada**. Emerging role of zinc homeostasis by zinc transporter ZIP7 in intestinal homeostatic self-renewal. *Inflammation and Cell Signaling* 4: e1509, 2017 (*corresponding author) DOI: 10.14800/ics.1509
- Hara T, TA. Takeda, T. Takagishi, K. Fukue, T. Kambe, ***T. Fukada**. Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *Journal of Physiological Sciences* 67: 283-301, 2017 (*corresponding author) DOI: 10.1007/s12576-017-0521-4
- Bin BH, J. Bhin, NH. Kim, SH. Lee, HS. Jung, J. Seo, DK. Kim, D. Hwang, **T. Fukada**, AY. Lee, TR. Lee, EG. Cho. An acrodermatitis enteropathica-associated Zn transporter, ZIP4, regulates human epidermal homeostasis. *Journal of Investigative Dermatology* 137: 874-883, 2016 DOI: 10.1016/j.jid.2016.11.028
- Ohashi, W., S. Kimura, T. Iwanaga, Y. Furusawa, T. Irié, H. Izumi, T. Watanabe, A. Hijikata, **T. Hara**, O. Ohara, H. Koseki, T. Sato, S. Robine, H. Mori, Y. Hattori, H. Watarai, K. Mishima, H. Ohno, K. Hase, and ***T. Fukada**. Zinc transporter SLC39A7/ZIP7 promotes intestinal epithelial self-renewal by resolving ER stress. *PLOS Genetics* 12: e1006349, 2016 (*corresponding author) DOI: org/10.1371/journal.pgen.1006349
- Yasuda, T., **T. Fukada**, K. Nishida, M. Nakayama, M. Matsuda, I. Miura, S. Fukuda, K. Kabashima, S. Nakaoka, M. Kubo, H. Ohno, T. Hasegawa, O. Ohara, H. Koseki, S. Wakana, and H. Yoshida. Jak1 tyrosine kinase hyperactivation induces stepwise progressive pruritic dermatitis. *Journal of Clinical Investigation* 126: 2064-2076, 2016 DOI: 10.1172/JCI82887
- Idaira, Y., T. Munemasa, **T. Fukada**, S. Shimoda, and Y. Asada. Role of zinc transporter ZIP13 in degenerative changes in periodontal ligament and alveolar bone. *Journal of Hard Tissue Biology* 25: 49-56, 2016 DOI: 10.2485/jhtb.25.49
- Hojyo, S. ***T. Fukada**. Role of zinc signaling in the immune system. *Journal of Immunology Research* Article ID 6762343, 2016 (*corresponding author) DOI: 10.1155/2016/6762343

10. Hojyo, S. ***T. Fukada**. Zinc transporters and signaling in physiology and pathogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 611, 43-50, 2016. (*corresponding author)
DOI: 10.1016/j.abb.2016.06.020
11. Hirose, T., T. Ogura, K. Tanaka, J. Minaguchi, T. Yamauchi, **T. Fukada**, Y. Koyama, and K. Takehana. Comparative study of dermal components and plasma TGF- β 1 levels in Slc39a13/Zip13-KO mice. *Journal of Veterinary Medical Science* 77, 1385-1389, 2015 DOI: 10.1292/jvms.15-0015
12. Jenkitkasemwong, S., C-Y Wang, R. Coffey, W. Zhang, A. Chan, T. Biel, J-S. Kim, S. Hojyo, **T. Fukada**, and M. Knutson. SLC39A14 Is Required for the Development of Hepatocellular Iron Overload in Murine Models of Hereditary Hemochromatosis. *Cell Metabolism* 22:138-150, 2015 DOI:10.1016/j.cmet.2015.05.002
13. Jorge-Nebert, LF., M. Galvez-Peralta, JL. Figueroa, M. Somarathna, S. Hojyo, **T. Fukada**, and DW. Nebert. Comparing Gene Expression during Cadmium Uptake and Distribution: Untreated vs Oral Cd-Treated Wild-Type and ZIP14 Knockout Mice. *Toxicological Sciences* 143:26-35, 2015 DOI: 10.1093/toxsci/kfu204
14. Hojyo S, Miyai T, ***Fukada T**. B-cell receptor strength and zinc signaling: Unraveling the role of zinc transporter ZIP10 in humoral immunity. *Receptor and Clinical Investigation* 2: e387; 2015 (*corresponding author)
DOI: 10.14800/rci.387
15. Bin, BH., S. Hojyo, and ***Fukada T**. Spondylocheirodysplastic Ehlers-Danlos syndrome (SCD-EDS) and the mutant zinc transporter ZIP13. *Rare Diseases* 2: e974982; 2014 (*corresponding author)
DOI: 10.4161/21675511.2014.974982
16. Hojyo, S., T. Miyai, H. Fujishiro, M. Kawamura, T. Yasuda, A. Hijikata, BH. Bin, T. Irié, J. Tanaka, T. Atsumi, M. Murakami, M. Nakayama, O. Ohara, S. Himeno, H. Yoshida, H. Koseki, T. Ikawa, K. Mishima, and ***T. Fukada**. Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 controls humoral immunity by modulating B cell receptor signal strength. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:11786-91, 2014 (*corresponding author)
DOI: 10.1073/pnas.1323557111
17. Bin BH., S. Hojyo, T. Hosaka, J. Bhin, H. Kano, T. Miyai, M. Ikeda, T. Kimura-Someya Mikako Shirouzu, EG Cho, K. Fukue, T. Kambe, W. Ohashi, KH Kim, J. Seo, DH. Choi, YJ Nam, D. Hwang, A. Fukunaka, Y. Fujitani, S. Yokoyama, A. Superti-Furga, S. Ikegawa, TR Lee, and ***T. Fukada**. Molecular pathogenic basis of Spondylocheirodysplastic Ehlers-Danlos syndrome caused by mutant ZIP13 proteins. *EMBO Molecular Medicine* 6: 1028-1042, 2014 (*corresponding author)
DOI: 10.15252/emmm.201303809
18. Miyai, T., S. Hojyo, T. Ikawa, M. Kawamura, T. Irié, H. Ogura, A. Hijikata, BH. Bin, T. Yasuda, H. Kitamura, M. Nakayama, O. Ohara, H. Yoshida, H. Koseki, K. Mishima, and ***T. Fukada**. Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 facilitates antiapoptotic signaling during early B-cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:11780-85, 2014 (*corresponding author)
DOI: 10.1073/pnas.1323549111
19. Munemasa, T., Y. Idaira, **T. Fukada**, S. Shimoda, and Y. Asada. Histological Analysis of Dentinogenesis Imperfecta in Slc39a13/Zip13 Knockout Mice. *Journal of Hard Tissue Biology* 23: 163-168, 2014
DOI: 10.2485/jhtb.23.163
- [学会発表](計25件)
1. 深田俊幸(座長および企画) Zinc homeostasis and signaling in health and disease, 第94回日本生理学会大会シンポジウム, 浜松 2017年3月28日
 2. 深田俊幸. 亜鉛シグナル: 個体恒常性の維持に関わる新しい制御機構, 教育講演, 第27回生物試料分析科学会年次集会, 新潟 2017年2月11日
 3. 深田俊幸. なぜ亜鉛が必要なのか?: “亜鉛シグナル”研究からのアプローチ, 教育講演, 日本歯科人間ドック学会第19回学術大会, 徳島 2016年12月17日
 4. 深田俊幸. Molecular and Physiological Basis of Zinc Signaling in vivo and in vitro BMB2016, 第39回日本分子生物学会年会, 横浜 2016年12月1日
 5. 深田俊幸. 亜鉛の役割: この10年で分かったこと、次の10年で解明したいこと, 特別講演, 亜鉛栄養治療研究会 中国・四国支部総会, 広島 2016年7月9日
 6. 深田俊幸. 亜鉛シグナリング: 生体恒常性と病気への関与 第136回日本薬学会シンポジウム「免疫制御による疾病予防・治療の最前線」, 横浜 2016年3月28日
 7. Toshiyuki Fukada. "Zinc signaling": An emerging player for epithelial tissue homeostasis. The 5th Bizan Immunology Symposium: BISUT 5, 徳島 2016年3年4

8. 深田俊幸. 亜鉛シグナリング 第6回福岡薬理・生理系研究会, 福岡 2015年12月24日
9. Toshiyuki Fukada. Zinc signaling: Overview 第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会合同大会「Zinc Signal Workshop」, 神戸 2015年12月1日
10. 深田俊幸. 亜鉛シグナリング: その生体恒常性と疾患における意義 第55回日本臨床化学会年次学術集会 ランチョンセミナー, 大阪 2015年10月31日
11. Toshiyuki Fukada. Zinc signaling in physiology and pathogenesis The 5th International Symposium on Metallomics: Metallomics-2015, 北京 2015年9月10日
12. 深田俊幸. 亜鉛はなぜ必要なのか?: 健康と病気に関わる亜鉛トランスポーターと亜鉛シグナル 衛生薬学・環境トキシコロジー若手研究者の会 フォーラム2015 プレシンポジウム, 神戸 2015年9月16日
13. 深田俊幸. 亜鉛シグナリング 生命機能と病態形成に関わる新しい制御機構 第158回日本獣医学会・微生物学分科会(免疫)シンポジウム, 青森 2015年9月7日
14. Toshiyuki Fukada. Zinc signaling: An emerging regulatory system in health and disease 第25回 金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 長崎 2015年5月31日
15. 深田俊幸. 細胞内亜鉛シグナル 第29回日本医学会総会サテライトシンポジウム「亜鉛と医学」, 京都 2015年4月10日
16. 深田俊幸. 新たな技術・概念が切り拓くメタロミクス研究—金属の関わる生命現象のパラダイムシフトを目指して— 日本薬学会第135年会シンポジウム, 神戸 2015年3月27日
17. 深田俊幸(座長および企画). 亜鉛シグナルの生命科学: 細胞機能と病態形成を司る新しい制御機構 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第92回日本生理学会大会合同大会 シンポジウム, 神戸 2015年3月21日
18. 深田俊幸. 日本抗加齢医学会講習会「亜鉛の基礎知識」, 東京 2015年1月11日
19. 深田俊幸(座長および企画). 亜鉛シグナルから理解する細胞機能と病態形成 第87回日本生化学会大会 シンポジウム, 京都 2014年10月17日
20. 深田俊幸. 亜鉛による情報伝達: 健康と病気への関与 第56回歯科基礎医学会学術大会・総会 シンポジウム, 福岡 2014年9月26日
21. Toshiyuki Fukada (座長および企画). Zinc transporters; from structure to function International Society for Zinc Biology 2014 Symposium, Asilomar, California 2014年9月15日
22. Toshiyuki Fukada (座長および企画). Zinc signaling in health and diseases International Society for Zinc Biology 2014 Symposium, Asilomar, California 2014年9月14日
23. Toshiyuki Fukada (座長). Special invited opening talks, International Society for Zinc Biology 2014 Symposium, Asilomar, California 2014年9月14日
24. 深田俊幸, 宮井智浩, 北條慎太郎, 美島健二. 亜鉛シグナル: B細胞の恒常性を司る新しい制御機構 心血管膜輸送研究会 2014, 岡崎 2014年9月5日
25. 深田俊幸. 亜鉛シグナル: 生体恒常性を統御する新しい情報伝達機構 第87回日本内分泌学会学術総会 教育講演, 福岡 2014年4月26日
- 〔図書〕(計2件)
1. ***Fukada, T** (*corresponding author) Genetic study of zinc transporters and zinc signaling, edited by J. Collins. *Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals*, ELSEVIER London, 293-303, 2017 DOI:10.1016/B978-0-12-802168-2.00024-5
2. ***Fukada, T**, Hojyo, S., and Bin, B.H. (*corresponding author), Zinc signal in growth control and bone diseases, edited by **Fukada T**, and T. Kambe (編集者). *Zinc Signals in Cellular Functions and Disorders*, Springer, Tokyo, 249-267, 2014 DOI:10.1007/978-4-431-55114-0
- 〔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〕

プレスリリース 1

（2016 年 10 月 14 日：徳島文理大学・慶
應義塾大学・富山大学・理化学研究所）
亜鉛が腸粘膜の増殖を制御する分子機構
の一端を解明

<http://p.bunri-u.ac.jp/image/pdf/pr20161014.pdf>

プレスリリース 2

（2014 年 7 月 29 日：理化学研究所）
亜鉛による獲得免疫応答を制御するメカ
ニズムを解明 “ 亜鉛トランスポーター
「ZIP10」による B 細胞の機能の制御 ”

http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140729_2/

プレスリリース 3

（2014 年 7 月 29 日：理化学研究所）
亜鉛は B 細胞の生存・維持に重要
“ 亜鉛代謝異常に起因する免疫疾患のメ
カニズムの一端を解明 ”

http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140729_1/

研究室ホームページ

<http://p.bunri-u.ac.jp/lab22/>

6．研究組織

(1)研究代表者

深田俊幸 (Fukada Toshiyuki)
徳島文理大学薬学部・教授
研究者番号：70373363

(2)連携研究者

木村徹 (Kimura Toru)
杏林大学 医学部・講師
研究者番号：30433725