

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06646

研究課題名(和文) 亜鉛輸送体ZIP8の変異による全身性低マンガン血症発症機構の解明とその応用

研究課題名(英文) Studies on of mechanism of hypomanganemia caused by the mutation of zinc transporter ZIP8

研究代表者

藤代 瞳 (Fujishiro, Hitomi)

徳島文理大学・薬学部・講師

研究者番号：10389182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウス近位尿細管S1, S2, S3領域由来不死化細胞を用いて、trans-wellを用いてMn輸送を調べた結果、S3細胞の管腔側からの取り込みが高いことが分かった。近位尿細管のS3領域にはZIP8の発現が高く、S3領域のapical側からのZIP8の再吸収が生体内のMn調節を行う可能性を見出した。先天性の低Mn血症を示した患者の持つZIP8変異がMn輸送に与える影響をDT40細胞への各単一アミノ酸変異細胞を作製して解析した結果、ヒトZIP8の335, 340の変異はTrans Membrane Domain (TMD) 5に位置しており、ZIP8のMn輸送に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ZIP8の変異と疾患との関係が報告され、Mn輸送体としてZIP8が必須であることが明らかになった。ZIP8は胆汁中あるいは腎臓の原尿中に排泄されたMnを一部回収するシステムに寄与し、全身のMn恒常性維持に重要な役割を果たしている可能性が提唱されている。しかし、ZIP8変異によるMn代謝異常症発症のメカニズムはまだ詳細には明らかになっていない。この機構を解明することは、生体で必須である金属であるMnの恒常性の調節機構の解明へと繋がる。

研究成果の概要(英文)：By using immortalized cells derived from the S1, S2, and S3 regions of mouse proximal tubule, we examined Mn transport using trans-well and found that uptake from the apical side of S3 cells was high. We found that the S3 region of the proximal tubule showed high expression of ZIP8, and the reabsorption of Mn via ZIP8 from the apical side of the S3 region may regulate Mn in vivo.

We analyzed the effect of ZIP8 mutations on Mn transport in patients with congenital Hypomanganeseemia by generating DT40 cells stably expressing wild-type hZIP8 and a single mutation of four amino acids of ZIP8. The uptake rate of Mn was as low as that in ZIP8 cells. These results suggest that the 335 and 340 mutations in hZIP8 are located in the trans membrane domain5 and play an important role in the transport of Mn.

研究分野：環境毒性学

キーワード：マンガン 変異 亜鉛輸送体 輸送 ZIP8 SNP 金属

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで細胞内にカドミウム (Cd) やマンガン (Mn) がどのようにして取り込まれるかその輸送体を探索し、輸送機構および毒性発現機構について解析を行ってきた。近年 Cd の腎臓近位尿細管におけるダイナミックな輸送機構を尿細管部位特異的な細胞系を用いて解析し、新しいモデルを提唱した (Fujishiro et al., *Metalomics*, 2012)。これまで Cd や Mn の輸送体として Fe 輸送体の DMT1, Zn 輸送体の ZIP8 および ZIP14 に注目して研究を行ってきた。近年、ZIP8 の変異と様々な疾患との関連が報告されたため、その変異と Mn の輸送および動態について培養細胞を用いて分子レベルで解析し、生体内 Mn 調節の全貌を明らかにしたいと考えた。GWAS による SNP 解析により、ヒトにおいて ZIP8 の変異との関係が報告されている疾患は、低 Mn 血症、高血圧、脂質代謝異常、統合失調症などが挙げられる。しかし、ZIP8 の変異が血液中の Mn 濃度をどのように調節しているかの機構は明らかにされていなかった。Mn の輸送体として ZIP8、ZIP14、DMT1 など複数の金属輸送体が知られているものの、必須微量元素であるにも関わらず、Mn の生体内濃度の調節機構は解明されていなかった。

2. 研究の目的

2015 年に亜鉛輸送体 ZIP8 の遺伝子 *SLC39A8* の複数の個所に変異を持つ小児が、全身性の低 Mn 血症を起こし、重篤な症状を示すことが報告された。しかし、その機構は全くわかっていない。患者への Mn 投与の結果から、ZIP8 の変異は Mn の吸収障害ではなく、排泄促進に関与する可能性が示された。そこで、ヒトで観察されたのと同様の複数の ZIP8 変異体を発現させた細胞株を樹立し、Mn 輸送能の変化、Mn 酵素の活性変化を検討する。さらに、Mn の排泄が行われる可能性のある腎臓の近位尿細管、および、肝臓の胆管のそれぞれの上皮細胞に、変異 ZIP8 を発現させて Mn 輸送能 (再吸収効率) の変化を検討することで、低 Mn 血症の発症機構の解明をめざす。ZIP8 による体内 Mn 動態の制御機構を明らかにすることは、パーキンソン病などの Mn 代謝異常が関連する他の疾患の機構の解明にもつながると期待できる。

3. 研究の方法

近位尿細管由来細胞の実験：マウス腎臓近位尿細管 S1, S2, S3 由来不死化細胞を使用した。カップ培養：Thin Cert Cell Culture insert に S1, S2, S3 細胞を播種し、単層形成後、管腔側および血管側からの Mn の取り込み効率を調べた。細胞内への金属の取り込みおよび排泄： $[^{109}\text{Cd}]\text{-CdCl}_2$, $[^{54}\text{Mn}]\text{-MnCl}_2$ のアイソトープをトレーサーとして用い、 γ カウンターにより測定した。

変異体発現細胞実験：DT40 細胞 (ニワトリ B 細胞由来細胞) を使用した。ニワトリの ZIP8 を欠損した ZIP8 DT40 細胞にヒト ZIP8 の野生型および変異遺伝子導入し安定に発現している細胞を作製した。Mn、Cd 取り込み効率はアイソトープをトレーサーとして測定した。

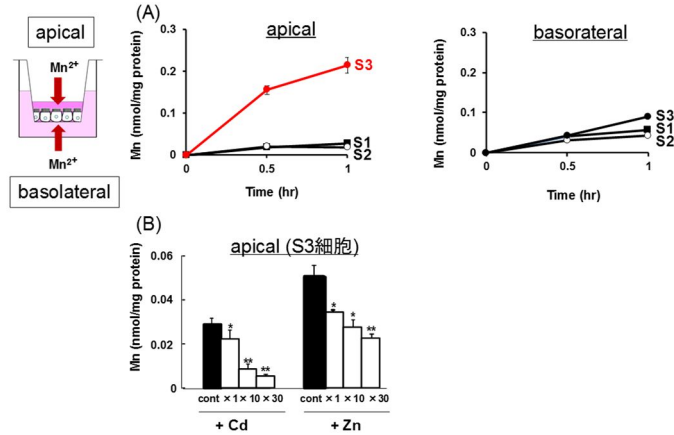
4. 研究成果

(1) 腎臓近位尿細管における ZIP8 の役割

Mn の体内での調節機構を明らかにするために、私たちは腎臓近位尿細管における Mn 再吸収機構における亜鉛輸送体 ZIP8 の役割を解析した。腎臓の近位尿細管は糸球体に近いほうから S1, S2, S3 の 3 つの領域に分かれておりその輸送や性質は異なることが知られている。そこで、近位尿細管の各領域由来の不死化細胞 (S1, S2, S3 細胞) における Mn 輸送効率について解析した。trans-well を用いたカップ培養法により、生体と同じように尿細管の管腔側と血管側のそれぞれの方向からの金属の取り込みおよび排泄を測定可能な系を使用し、S1, S2, S3 細胞にける Mn 取

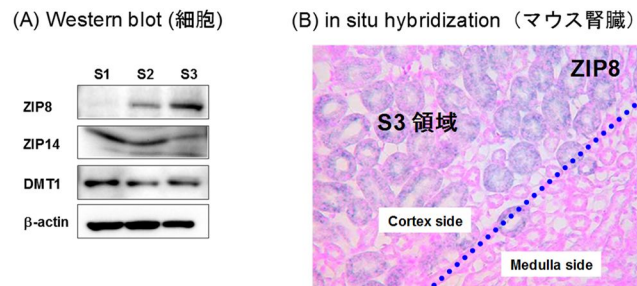
り込み効率を調べた結果、S1、S2細胞に比べて、S3細胞における管腔側からのMnの取り込み効率が高いことが分かった(図1A)。さらにS3細胞の管腔側からのMnの取り込みに対して、mol比で1, 10, 30倍のCdおよびZnを同時に加えた際に、Mnの取り込みをCdおよびZnが阻害した(図1B)。私たちは、これまでに細胞レ

図1. S1, S2, S3細胞の管腔側、血管側からのMn取り込み効率



ベルにおいてもZIP8の発現は、S1, S2細胞に比べて、S3細胞において最も高いこと、またマウスの腎臓におけるin situ hybridizationの結果から、マウスの腎臓のS3領域にZIP8の発現が高いことを報告している(図2A, B, Fujishiro et al., J. Toxicol. Sci. 2019)。今回得られた結果と合わせて考えると、S3細胞において

図2. 近位尿細管S3領域におけるZIP8の発現



高発現しているZIP8がMnの管腔側からの再吸収に関与していることを示唆している。つまり、原尿中に排泄されたMnは近位尿細管のS3領域において再吸収される可能性があり、この機構が全身のMn

量を調節するのに重要である可能性が示唆された。

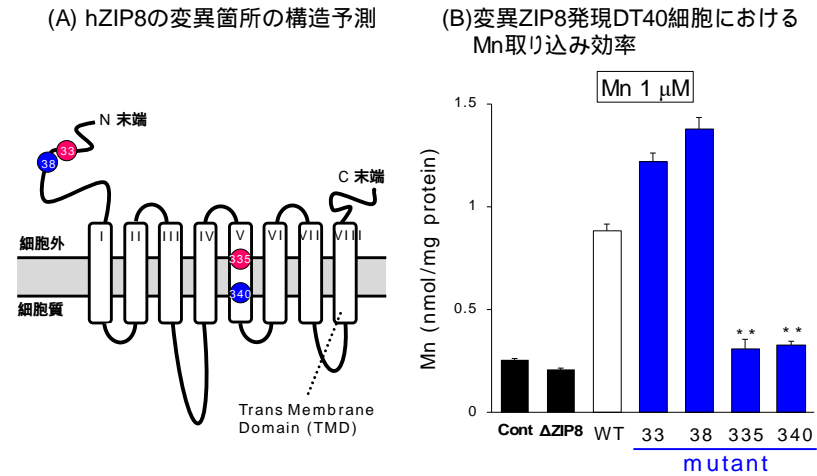
今後、他のMn排泄経路である胆汁へのMn排泄経路におけるZIP8の役割の解析も必要である。胆管におけるZIP8の役割については、胆管由来の細胞を用いて、胆汁中に排泄されたMnの胆管上皮細胞への再吸収へのZIP8の関与について検討しようと計画していた。しかし、コロナウイルス感染拡大の影響があり、学部学生との実験計画が行えない期間が長かったため実施できなかったため、今後の検討課としたい。

(2) 臨床で見られた低Mn血症を示す患者のZIP8変異によるMn輸送への影響

先天性の低Mn血症を示した患者では、ZIP8のVal33MetとSer335Thrの二重変異、別の患者ではGly38ArgとIle340Asnの二重変異が見られた。そこで、それぞれのアミノ酸の変異がMn輸送に及ぼす影響を解析した。ΔZIP8細胞に野生型hZIP8、あるいはこの4つのアミノ酸それぞれの単一変異ZIP8を安定的に発現する細胞を作製し、Mn輸送への影響を検討した。その結果、野生株hZIP8発現細胞ではΔZIP8細胞よりMnの取り込みが著しく増加した。しかし、(Ser335Thr)あるいは(Ile340Asn)発現細胞におけるMnの取込みはΔZIP8細胞と同じレベルの低い値であった。一方、(Val33Met)あるいは(Gly38Arg)発現細胞は野生型hZIP8発現細胞より高いMn取り込み効率を示すことが明らかになった(図3B, 投稿準備中)。ZIP8の立体構造は明らかになっていないが、近年報告された細菌のZIP4の3次元構造に基づき、ZIP8のTrans Membrane Domain (TMD)の構造のトポロジカルモデルを予測した。その結果、このモデ

ルにおける Val33 および Gly38 は N 末端細胞外ドメインに、Ser335 および Ile340 は、従来の疎水性プロットによる予測とは異なり、TMD5 に位置すること

図3. hZIP8の構造予測とhZIP8変異によるMn取り込み効率への影響



が予測された (図 3 A, Fujishiro et al., BPB)。TMD4 および TMD5 は ZIP4 でも Zn 輸送に重要であるため、ZIP8 の TMD5 の変異 (Ser335 あるいは Ile340) は Mn の輸送能に重要な影響を及ぼすことが示唆された。一方、N 末端側の変異は Mn 輸送以外の機能に与与する可能性が考えられた。

近年、さらに ZIP8 の SNP と多くの疾患との関与が報告されている。これらの疾患と Mn 輸送能との関係が報告されている例もあるが、ZIP8 の変異が多くの疾患を引き起こす原因についてはまだ未解明である。しかし、ZIP8 の Mn 輸送体としての役割はさらに注目される。ZIP8 の Mn 輸送には Trans Membrane Domain 5 の重要性が示唆されており、さらに解析を行い、また全身での Mn 調節機構における ZIP8 を介した腎臓近位尿細管における Mn 再吸収の役割について明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Fujishiro Hitomi, Hamao Satoko, Isawa Misaki, Himeno Seiichiro	4. 巻 44
2. 論文標題 Segment-specific and direction-dependent transport of cadmium and manganese in immortalized S1, S2, and S3 cells derived from mouse kidney proximal tubules	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 611-619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.44.611	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujishiro Hitomi, Himeno Seiichiro	4. 巻 6
2. 論文標題 Gene expression profiles of immortalized S1, S2, and S3 cells derived from each segment of mouse kidney proximal tubules	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 117-123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/fts.6.117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujishiro Hitomi, Yamamoto Hazuki, Otera Nobuki, Oka Nanae, Jinno Mei, Himeno Seiichiro	4. 巻 8
2. 論文標題 In Vitro Evaluation of the Effects of Cadmium on Endocytic Uptakes of Proteins into Cultured Proximal Tubule Epithelial Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxics	6. 最初と最後の頁 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxics8020024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Himeno Seiichiro, Sumi Daigo, Fujishiro Hitomi	4. 巻 35
2. 論文標題 Toxicometallomics of Cadmium, Manganese and Arsenic with Special Reference to the Roles of Metal Transporters	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxicological Research	6. 最初と最後の頁 311-317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5487/TR.2019.35.4.311	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 藤代 瞳、姫野誠一郎	4. 巻 90(3)
2. 論文標題 生体内カドミウム・マンガン輸送における亜鉛輸送体ZIP8の役割.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 340-347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 藤代 瞳、姫野誠一郎	4. 巻 54(7)
2. 論文標題 カドミウムとマンガンの生体内輸送における亜鉛輸送体の役割.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 680-682.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 藤代瞳、角野心晴、松川岳久、横山和仁、姫野誠一郎.
2. 発表標題 LA-ICP-MSを用いた腎臓中カドミウム集積部位の解析とKim-1発現部位との比較
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増富由姫、大寺信輝、岡奈々恵、神野芽衣、藤代瞳、姫野誠一郎
2. 発表標題 低濃度のカドミウム曝露に鋭敏に応答する近位尿細管細胞バイオマーカーの探索
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hitomi Fujishiro, Seiichiro Himeno
2. 発表標題 Analysis of various renal injury biomarkers using in vitro evaluation system.
3. 学会等名 ICT2019(第15回国際毒性学会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩佐 由貴美, 藤代 瞳, 姫野 誠一郎
2. 発表標題 近位尿細管由来培養細胞のカドミウム感受性の種差とその要因.
3. 学会等名 フォーラム2019: 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hitomi Fujishiro, Taiho Kambe, Seiichiro Himeno
2. 発表標題 The effects of single mutations in human ZIP8 on the transport abilities for manganese and cadmium
3. 学会等名 6th Meeting of International Society for Zinc Biology. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤代瞳、宮崎寿和、姫野誠一郎、神戸大朋
2. 発表標題 DT40細胞を用いた亜鉛輸送体ZIP8の単一変異によるマンガン輸送への影響
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤代瞳
2. 発表標題 155マンガン代謝異常症の原因となる亜鉛輸送体ZIP8変異によるマンガン輸送能の変化
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hitomi Fujishiro
2. 発表標題 ZIP8 mutations and manganese metabolic disorder.
3. 学会等名 フォーラム2018：衛生薬学・環境トキシコロジー（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Himeno, S., Fujishiro, H.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 15
3. 書名 "Roles of Metal Transporters in Cellular Cadmium Transport in Mammals" in "Cadmium Toxicity - New Aspects in Human Disease, Rice Contamination, and Cytotoxicity"	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------