

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：32415

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K05915

研究課題名（和文）新規亜鉛欠乏回復モデルの有効性～糖・脂質代謝における亜鉛の機能解析を中心に～

研究課題名（英文）Effectiveness of a new model for recovery from zinc deficiency: Focusing on the role of zinc in glucose and lipid metabolism

研究代表者

有田 安那 (ARITA, Anna)

十文字学園女子大学・国際栄養食文化健康研究所・客員研究員

研究者番号：20518104

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、亜鉛欠乏ラットに特有なcyclic feeding(CF)を同期した新規亜鉛欠乏回復モデルの有効性を検証することを目的として、糖質・脂質代謝に対する亜鉛の生理機能を解析した。CFを同期した亜鉛欠乏ラットに解剖3時間、24時間前に亜鉛溶液を腹腔内投与し、亜鉛無投与群には生理食塩水を投与した。肝臓を標的としたDNAマイクロアレイおよびメタボローム解析を実施した結果、亜鉛が関与する可能性のある糖質・脂質代謝関連分子を検出することができた。本研究により、糖質・脂質代謝における亜鉛の生理機能解析においても、本モデルは一定の有効性があることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CFを同期した亜鉛欠乏回復モデルを適用することで、亜鉛に対する生体応答を群の応答として直接捉えることができ、亜鉛との関連性が指摘されてこなかった脂質代謝関連分子を見出すことができた。培養細胞や特定の遺伝子を欠損させたマウスを用いた従来の手法は、標的分子が定まっている場合に、亜鉛に対する生体応答を詳細に解析する上で極めて有効であるのに対し、本モデルは未知の亜鉛の生理機能の探索やスクリーニングに適していることが示された。本手法によって亜鉛投与後に検出された生体応答から亜鉛の標的分子を絞り込み、従来型の研究手法と組み合わせることで亜鉛の生理機能とその機構の解明に大きく寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the physiological function of zinc on glucose and lipid metabolism to verify the effectiveness of a new zinc deficiency recovery model synchronized with cyclic feeding (CF) specific to zinc-deficient rats. Zinc solution was administered intraperitoneally to the CF-synchronized zinc-deficient rats 3 and 24 hours before dissection, while saline was administered to the control group. As a result of performing liver-targeted DNA microarray and metabolome analysis, we were able to detect glucose and lipid metabolism-related molecules that may be involved with zinc. This study demonstrated that this model has a certain degree of effectiveness in analyzing the physiological function of zinc in glucose and lipid metabolism.

研究分野：栄養生理学、ミネラル

キーワード：亜鉛 cyclic feeding

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究の学術的背景

微量栄養素の生理機能とその機構の解明には、当該栄養素欠乏からの早期の回復過程を時系列的に調べる動物実験が効果的である(欠乏回復モデル)(Shimura et al., Pharma Medica 1985, Arita et al., BBB 2010)。亜鉛においても有効と推察されるが、亜鉛欠乏動物への亜鉛投与後 24 時間以内の経時変化を調べた報告は少ない。その背景として亜鉛欠乏ラットに特有な cyclic feeding (CF) の影響が推察される。亜鉛欠乏ラットは著しい食欲不振を示し、その摂食量は 3 ~ 4 日周期で著しく増減する (CF) (Mills et al., 1969)。亜鉛欠乏ラットの摂食量は、図 1 左のように通常ラットと同等に食べる日と絶食に近い日とを繰り返し、そのリズムは個体毎に異なるため、亜鉛欠乏群には摂食量が著しく異なるラットが常に混在する。ラットを 9~13 時間絶食させると、非絶食群よりも脂肪酸合成系の酵素活性および mRNA 発現は低下し、肝臓重量は 30 ~ 40 % 減少したという報告 (Ikeda et al., 2014) を踏まえ、亜鉛欠乏ラットにおいても CF の影響により体内環境の個体差が拡大している可能性が高い。このことが、亜鉛投与後の生体応答の個体差を拡大させ、亜鉛投与に対する生体応答の検出を困難にするものと推察される。

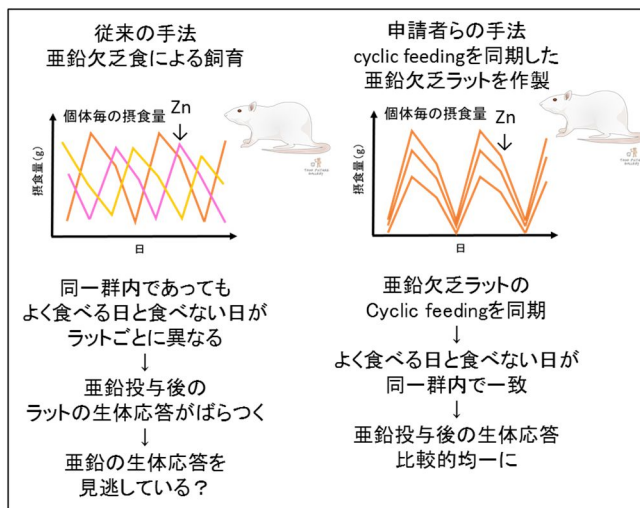


図 1 cyclic feeding の同期により亜鉛投与後の生体応答は明瞭化する

(2) 研究課題の核心をなす学術的「問い」

我々は、亜鉛欠乏ラットの CF の位相を同期し体内環境のバラつきを低減化することで亜鉛に対する生体応答が群の応答として検出できるのではないかと推察し、亜鉛欠乏ラットの CF を同期させ亜鉛欠乏からの回復過程を解析するモデルを考案・検討した。本モデルをもとに、CF の影響を強く受ける「摂食量」におよぼす亜鉛の効果を中心に調べた結果、亜鉛の腹腔内投与後の群の応答として、統計的に有意な血清亜鉛濃度の上昇 (3 時間)、摂食量の増加 (10 ~ 12 時間)、血清中性脂肪濃度の上昇 (24 時間) 等の新規知見を得た (投稿準備中) (図 2)。このことは、従来型の亜鉛欠乏回復モデルは、亜鉛投与後の生体応答を検出しにくい可能性が高いこと、特に摂食の影響を強く受ける「代謝」におよぼす亜鉛の機能においては再度精査の必要があることを強く示唆している。

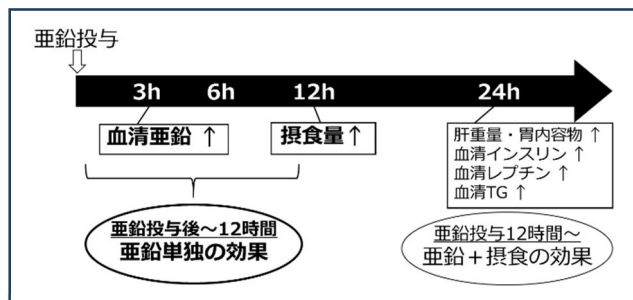


図 2 CF を同期した亜鉛欠乏ラットの亜鉛投与後の生体応答

2. 研究の目的

本研究では、CF の影響を強く受けることが推察される「糖質・脂質代謝」におよぼす亜鉛の作用を時系列的・網羅的に解析し、糖質・脂質代謝におよぼす亜鉛の生理機能を解析する。従来型の手法との比較を通して、亜鉛の生理機能解析における本モデルの有効性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 研究方法の概要

本研究でおこなう実験の概要を図 3 に示す。実験 1 では、代謝の中心臓器である肝臓における亜鉛投与後の遺伝子発現と代謝産物を時系列的かつ網羅的に解析する。2 つの実験結果から亜鉛投与後に亢進または抑制される代謝反応を絞り、ターゲットを選定する。実験 2 では、亜鉛投与に反応した代謝関連酵素の遺伝子発現を測定し、実験 1 の整合性を検証した。

(2) 動物実験

初体重 50~55 g の Wistar 系雄ラットを体重約 90g となるまで予備飼育し、次の条件で 3 週間飼育した。亜鉛欠乏 (ZD) 群: 亜鉛無添加食餌 (亜鉛含有量 1.1 ppm) 自由摂取。Pair-fed (PF) 群: 亜鉛添加食餌を亜鉛欠乏群の摂食量 (g) に制限して給餌。各実験群の飲料水は全飼育期間を通して超純水を自由飲水させた。CF を同期する目的で亜鉛欠乏群に適切なタイミングで食餌制限を導入した。各給餌条件にて 3 週間の飼育後、亜鉛欠乏群のラットを 3 群に分け、それぞれ ZD 群 (n=11)、ZD3h 群 (n=11)、ZD24h 群 (n=11) とした。ZD3h 群、ZD24h 群には、解剖 3 時間前または 24 時間前に硫酸亜鉛溶液を腹腔内投与した。投与液は、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ を静脈注射用生理食塩水に溶解して 500 μg Zn/ml の溶液とし、1 mg Zn/kg 体重の用量で投与した。亜鉛無投与群 (ZD 群、PF 群; n=9) には静脈注射用生理食塩水を投与した。亜鉛無投与群 (ZD 群および PF 群) は、整合性を検証する際の比較対照として詳しく解析した。摂食量は、あらかじめ秤量しておいた食餌をケージに入れ、所定の時間後の残餌量から算出した。

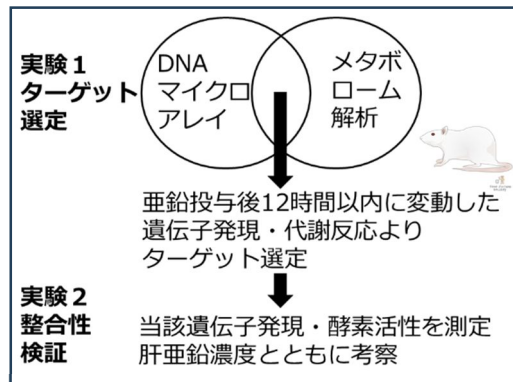


図3 本研究でおこなう実験の概要

(3) 解剖および各評価指標の測定方法

血清亜鉛濃度の日内変動を考慮し、解剖は午前 9 時~11 時までの間に実施した。断頭・採血の後、肝臓を摘出し、湿重量を測定した。次いで、臓器を切り分け、メタボローム解析用、亜鉛濃度測定用は速やかにドライアイス上で凍結し、遺伝子解析用は RNA later に浸漬後、-80 で保存した。血液は血清分離の後-80 で保存した。DNA マイクロアレイは、各検体から total RNA を抽出後、同一群内で 3 匹ずつプールし、各群 n=3 とし、Clariom S Assay, Rat (Thermo Fisher Scientific) を用いて実施した。DNA マイクロアレイの測定は、Thermo Fisher Scientific 社に依頼した。メタボローム解析においては、DNA マイクロアレイと同様の組み合わせとなるよう凍結検体をプールし、各群 n=3 とし、ヒューマンメタボロームテクノロジーズ社に測定を依頼した。整合性の検証では、遺伝子発現を real-time RT-PCR 法により解析した。血清および肝臓中の亜鉛濃度はメタロジェニクス社の亜鉛測定キットで測定した。

4. 研究成果

亜鉛欠乏群に適切なタイミングで食事制限を導入し、亜鉛欠乏群内の CF が同期されたことを確認した。肝臓を標的とした DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析を行った結果、亜鉛投与に反応すると推定される糖質・脂質代謝に関連する遺伝子発現の変動が見受けられた。このうち、ZD 群に対して ZD3h 群、ZD24h 群において発現量比に変動が認められた遺伝子は、表皮型脂肪酸結合タンパク質など全 8 種類であった。real-time RT-PCR により再現性を確認した結果、DNA マイクロアレイと概ね同等の結果が得られた。ZD3h 群では、特に亜鉛代謝関連遺伝子の発現変動が顕著であったが、亜鉛投与に反応したと推察される遺伝子も見受けられた。一方、ZD24h 群では脂質代謝関連遺伝子の変動が顕著に見られ、コレステロールや脂肪酸合成に関する遺伝子発現が亢進し、酸化や糖新生に関わる遺伝子発現は抑制された。

一方、メタボローム解析の結果、ZD 群に対して 24h 群において DNA マイクロアレイの結果を支持する糖代謝に関連した代謝物質の変動が認められた。今後は、両試験法にて絞りこまれた候補分子について再現性の確認を進める予定である。

本研究を通して、亜鉛が関与する可能性のある糖質・脂質代謝関連分子を検出することができた。このことは、糖質・脂質代謝における亜鉛の生理機能解析における本モデルの有効性を支持するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	佐々木 菜穂 (SASAKI Naho) (10571466)	十文字学園女子大学・人間生活学部・准教授 (32415)	
研究分担者	山崎 優子 (YAMAZAKI Yuko) (70518117)	十文字学園女子大学・人間生活学部・准教授 (32415)	

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