

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16346

研究課題名(和文) 発生過程における銅代謝機序の解明と銅栄養状態が脳組織に及ぼす後天的影響の評価

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms of copper metabolism during the development and evaluation of acquired effects of copper nutritional status on brain tissue

研究代表者

田中 佑樹 (Tanaka, Yu-ki)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：50824041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：胎仔期から新生仔期の動物の肝臓には成体に比べて銅が過剰蓄積していることが知られている。本研究では、ラット新生仔において肝臓中の銅濃度が生後2週から5週にかけて1/10程度に減少することを明らかにした。また化学形態別分析により成長とともに肝臓の銅メタロチオネインが減少する一方で、血清中の銅セルロプラスミンが増加することも明らかになった。肝臓における銅シャペロンAtox1の発現量が新生仔期に低いことが、肝臓からの銅排泄を抑制している可能性が示唆された。抗酸化タンパク質であるAtox1を含め、銅関連タンパク質の発現量は胎児期の低酸素環境下において成体と大きく異なる可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

銅は生体必須元素であり、生物の発生、発達に欠かすことはできない。一方、過剰な銅は生体内でフェントン反応を触媒し、活性酸素種の生成に寄与する。新生仔期に肝臓に過剰蓄積している銅はメタロチオネインに結合した毒性の低い形態で貯蔵されているものの、潜在的には銅が多量に存在しているため、正常な解毒代謝機構が破綻した場合や、栄養としての銅負荷が過剰になった場合には個体への影響が懸念される。本研究の成果によって、新生仔(児)期の特異的な銅代謝状態が明らかにされ、発生や発達に有害な影響を及ぼす可能性のある銅の適切な栄養状態を確保することの重要性が示された。

研究成果の概要(英文)：It is known that copper is highly accumulated in the liver of animals during the fetal to neonatal period compared to that of adult animals. In this study, we found that the copper concentration in the liver of rat neonates decreased to about 1/10 from 2 to 5 weeks of age. Speciation analysis by liquid chromatography hyphenated ICP-mass spectrometry revealed that copper bound to metallothionein in the liver decreased, while copper bound to ceruloplasmin in the serum increased. It was suggested that low expression of the copper chaperone Atox1 in the liver during the neonatal period suppressed copper excretion from the liver. As well as the antioxidant protein Atox1, the expression levels of copper-related proteins can be influenced by the hypoxic conditions during the fetal period, and affect the unique copper metabolism in neonates.

研究分野：分析化学

キーワード：銅代謝 新生児 化学形態別分析 メタロチオネイン 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

銅は生体内に約 80 mg 存在する必須微量栄養素である。生体内で銅は+1 価 ( $\text{Cu}^+$ ) と+2 価 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) の酸化状態を取る。銅を含む酵素の 90% は、この酸化還元反応を利用した抗酸化能や電子伝達能を持つもので、生体にとって重要な様々な反応を銅という金属元素が担っている。一方、銅が遊離したイオンとして存在する場合には、その酸化還元能力によって、Fenton/Haber-Weiss 反応を通じて、活性酸素 (ROS) の一種であるヒドロキシラジカルを生成する。銅の欠乏・過剰による生体影響を最小限に抑えるため、細胞では過剰な銅をメタロチオネイン (MT) と結合した毒性の低い形態で貯蔵し、銅トランスポーターの発現調節を介して、吸収、排泄の調節も行われている。

過剰な銅によって発生する ROS は神経細胞障害を招き、アルツハイマー病発症に関与するなど、生体にとっては好ましくない状態である。しかし、新生仔期の動物においては成体と比べて銅の過剰な蓄積が見られる。例として、ラット肝臓中の銅濃度は、出生時に既に成体よりも高濃度で、1 週～2 週齢で出生時の 2 倍に達することが知られている。本研究では、銅濃度に加え、化学形態、組織内分布、遺伝子発現量などのデータを取得し、新生仔の銅代謝の変動機序を解明し、過剰な銅によって生じる疾病の予防に資する成果を目指す。

## 2. 研究の目的

本研究では新生仔に見られるダイナミックな銅代謝の変化が「生理的な要因で受動的に起きるのか、新生仔の成長のための能動的戦略なのか」という学術的問いを設定し、新生仔の特異的な銅代謝の発生メカニズムを明らかにすることを目的とした。さらに新生仔期の銅の栄養状態の違いが成長に伴って個体に及ぼす影響を評価した。従来の研究では臓器単位の元素濃度による議論が主流であったが、細胞内の銅利用は多岐に渡るため、化学形態や空間分布といった情報、他元素との関連も把握する必要がある。それらの”統合的元素情報”にタンパク質や遺伝子の発現量などの生化学情報を組み合わせることで議論にブレイクスルーを与えられると考えた (図 1)。

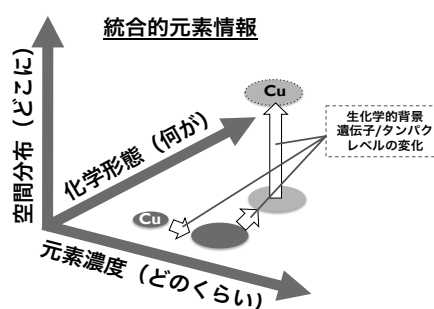


図 1 統合的元素情報によるアプローチ

## 3. 研究の方法

主として、以下の(1)-(3)の項目を、研究期間内に実施した。

### (1) ラット組織中の銅濃度、化学形態、空間分布の解析

0、1、2 週齢のラット新生仔と 5 週齢の成体ラットから肝臓、腎臓、血液を採取した。ICP 質量分析計 (ICP-MS) および液体クロマトグラフ ICP-MS (LC-ICP-MS) を用いて、各臓器中の銅濃度および化学形態の経時変化を分析した。3 週齢の新生仔ラットに銅 ( $\text{Cu}^{2+}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ ) を 3 週間飲水摂取させ、脳組織中の銅の分布をレーザーアブレーション ICP-MS (LA-ICP-MS) で分析した。

### (2) ラット肝臓における遺伝子発現量の解析

0、1、2 週齢のラット新生仔と 5 週齢の成体ラットから採取した肝臓から mRNA を抽出し、銅代謝関連タンパク質の遺伝子発現量を real-time PCR 法によって解析した。

### (3) 培養細胞を用いた酸化ストレス下、低酸素下での銅代謝変動の解析

哺乳類培養細胞 (HepG2、PC12) を過酸化水素曝露下または低酸素下 ( $\text{O}_2$  濃度: 3%) で培養し、細胞内可溶性画分における銅の化学形態の変化を LC-ICP-MS によって解析し、銅代謝関連タンパク質の遺伝子発現量を real-time PCR 法によって解析した。

## 4. 研究成果

(1) ラット肝臓中の銅濃度は生後 2 週まで高いレベルが維持されており、その後、成長と共に銅蓄積が解消することが明らかとなった。対照的に血清や腎臓では新生仔期の銅濃度が低く、成長とともに濃度が高くなった。肝臓において鉄は生後 1 週、亜鉛は生後 2 週で濃度が低下し、金属元素間で新生仔における代謝変動の時期に差異が見られた。さらに、LC-ICP-MS による化

学形態別分析によって肝臓内の過剰な銅が MT として存在し、肝臓での銅蓄積の解消に伴って血清中のセルロプラスミン銅が増加することが明らかになった、(図 2)。

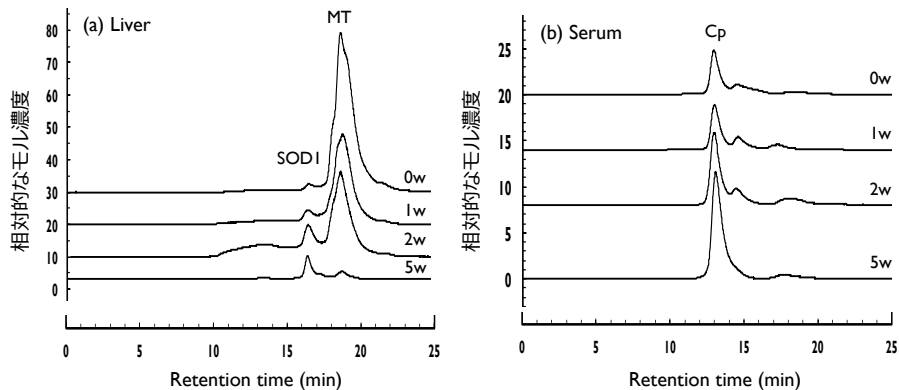


図 2 成長に伴う銅の化学形態の変化 (a)肝臓、(b)血清 (SOD1; Superoxide dismutase, MT; Metallothionein, Cp; Ceruloplasmin)

LA-ICP-MS による元素の空間分布解析の結果、銅を飲水摂取させたラットでは水道水を与えたラットに比べて、脳皮質、海馬における銅含有量が特に多くなった。本手法によって、過剰な銅の摂取が脳組織のどこに影響を及ぼすかを推定することが可能になった (図 3)。

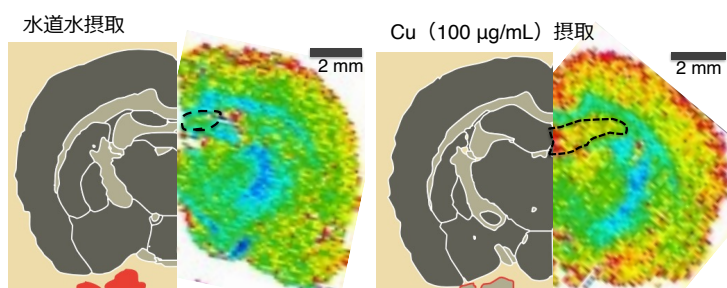


図 3 ラット脳組織における銅の空間分布 (青から赤にかけて銅濃度が増加することを示している、点線は海馬)

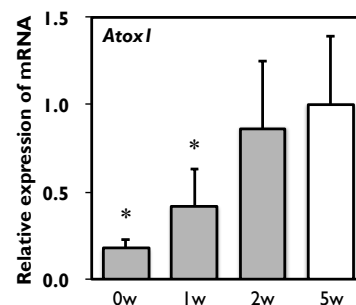


図 4 ラット肝臓中の Atox1 遺伝子発現量

(2) 銅代謝関連遺伝子のうち、MT は化学形態別分析の結果を反映するように新生仔ラットで高値を示した。肝臓における銅排泄トランスポーター Atp7b の遺伝子発現量は生後 1 週で増加したが、Atp7b への銅輸送を担う銅シャペロン Atox1 の発現量は肝臓での銅蓄積が解消する生後 2 週から増加に転じた (図 4)。Atox1 は抗酸化能を有するタンパク質であるため、新生仔の銅蓄積を解消する要因として酸化ストレスの増加が関与する可能性が示唆された。

(3) HepG2 細胞に過酸化水素を 24 時間曝露すると、曝露濃度依存的に MT からの銅、亜鉛の脱離が観察された。また、銅に比べて、亜鉛の方が脱離の程度が大きかった。この点はラット新生仔の肝臓中で生後 5 週の間には亜鉛、銅の順で含有量が低下する結果と調和的であった。一方で、スーパーオキシドディスムターゼ 1 (SOD1) に結合する銅の量は増加しなかった。今回の曝露時間では SOD1 のタンパク質発現量十分に増加せず、MT から脱離した銅、亜鉛は細胞外に放出したと考えられる。

細胞を大気圧下 ( $O_2$  濃度: 20%) と低酸素下 ( $O_2$  濃度: 3%) で培養したところ、新生仔期の体内環境を模していると仮定した低酸素条件の方が、MT 結合の銅、亜鉛が減少し、SOD1 結合の銅、亜鉛の量には差が見られなかった。一方、MT の遺伝子発現量は低酸素下で増加した。これは新生仔ラットにおいて MT 遺伝子が高発現している結果と調和的であった。しかし、MT 結合の銅、亜鉛が減少したことから、ラット新生仔においては低酸素に加えて、肝臓組織への銅の供給が高まることで、銅 MT としての高蓄積が生じている可能性が示唆された。Atox1 の遺伝子発現量は低酸素下の培養細胞において有意な変化が見られず、新生仔ラットで観察された低発現の状態 (図 4) は培養細胞の実験条件においては再現されなかった。

以上の結果より、本研究では新生仔の特異な銅代謝変動の機序を明らかにした。また、銅に限らず生体必須ミネラルの栄養状態や代謝状態の違いを定量的かつ多角的に評価することのできる”統合的要素情報”取得のための技術基盤を構築することができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yasumitsu Ogra, Yu-ki Tanaka, and Noriyuki Suzuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Recent advances in copper analyses by inorganic mass spectrometry	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Clin. Biochem. Nutr.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbrn.21-170	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yu-ki Tanaka, Risako Iida, Shohei Takada, Tetsuo Kubota, Michiko Yamanaka, Naoki Sugiyama, Yolande Abdelnour and Yasumitsu Ogra	4. 巻 21
2. 論文標題 Quantitative elemental analysis of a single cell using inductively coupled plasma-mass spectrometry in fast time-resolved analysis mode	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 3266-3272
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.202000358	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tanaka Yu-ki, Ogra Yasumitsu	4. 巻 11
2. 論文標題 Evaluation of copper metabolism in neonatal rats by speciation analysis using liquid chromatography hyphenated to ICP mass spectrometry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Metallomics	6. 最初と最後の頁 1679 ~ 1686
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c9mt00158a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yu-ki Tanaka, Yoshiaki Futamii, Yasunori Fukumotoi, Noriyuki. Suzuki, Yasumitsu Ogra,	4. 巻 3
2. 論文標題 Role of Metallothionein in Transcriptional Regulation by Metal-Responsive Element-Binding Transcription Factor 1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 22 ~ 27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpbreports.3.1_22	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 田中佑樹、小椋康光	4. 巻 11
2. 論文標題 微量元素と腎・各論1 銅と腎	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 腎臓内科	6. 最初と最後の頁 128 ~ 135
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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yu-ki Tanaka, Yasumitsu Ogra
2. 発表標題 Evaluation of copper metabolism in neonatal rat based on speciation analysis by LC-ICP-MS
3. 学会等名 7th International Symposium on Metallomics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中佑樹、二見叔亮、松橋研武、福本泰典、鈴木紀行、小椋康光
2. 発表標題 メタロチオネインによる重金属依存性転写因子の活性調節機構の解明
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 田中佑樹、小椋康光
2. 発表標題 化学形態別分析に基づくラット新生仔の銅代謝機序の解明
3. 学会等名 第5回レギュラトリーサイエンスフォーラム
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------