

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2008~2010

課題番号：20249030

研究課題名(和文) 亜鉛シグナルの分子機構とその免疫などの生体反応における役割

研究課題名(英文) Activation of Zinc signal and its biological significance

研究代表者

平野 俊夫 (HIRANO TOSHIO)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：40136718

研究成果の概要(和文)：

私たちは世界に先駆けて亜鉛が細胞内にてセカンドメッセンジャーとして機能することを示唆して以来研究を続けている。本補助金を用いて1) 細胞内亜鉛シグナルの普遍性の確立、2) 細胞内亜鉛シグナルの分子機構の確立、3) 亜鉛や、亜鉛シグナルの免疫反応や各種生体反応、また、免疫病や各種病気における役割の3つの点で大きな成果が示された。

研究成果の概要(英文)：

We here attempt to investigate intracellular Zn signaling, which is important for cell fate and/or cell activation status determination followed by various diseases and disorders. We mainly have three results, which are obtained by this grant. (I) Investigation of intracellular Zn signals, (II) Molecular basis of Zn signal to analyze Zn-binding sites in the target molecules and their mechanism, and (III) in vivo significances of Zn signal using various Zn-related molecule deficient mice and several disease/disorder models.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	16,500,000	4,950,000	21,450,000
2009年度	15,000,000	4,500,000	19,500,000
2010年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
年度			
年度			
総計	39,000,000	11,700,000	50,700,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：亜鉛、亜鉛トランスポーター、Zip13、STAT3、免疫反応

## 1. 研究開始当初の背景

我々はSTAT3がオーガナイザー領域において活性化され、原腸陥入時の細胞運動を統御することを明らかとした(Dev. Cell, 2002)。次いで、STAT3の標的遺伝子として

亜鉛トランスポーターZip6を同定した(Nature, 2004)。さらに、我々は亜鉛が樹状細胞にてTLR信号の細胞内シグナル分子として機能してその活性化制御に重要であることを示した(Nature Immunol., 2006)。また、

我々は免疫系における亜鉛の役割の存在をマスト細胞の研究でも明らかにし (J. Immunol., 2005)、マスト細胞への Fcε 受容体依存性の細胞外刺激に伴って粗面小胞体付近から遊離亜鉛濃度の上昇が短時間で起こる Zinc wave が生じる事を明らかにした (J. Cell. Biol., 2007)。このような背景で、我々は、1) 細胞内亜鉛シグナルの普遍性を確立すること、2) その分子機構を確立すること、3) 亜鉛や、亜鉛シグナルの免疫反応や各種生体反応、また、免疫病や各種病気における役割を明らかにするとともに、その作用機構を分子のレベルで明らかにすることを決意した。本研究補助金では、以下3つの課題を解明することを目的とした。

1) 細胞内亜鉛シグナルの普遍性を確立すること、2) その分子機構を確立すること、3) 亜鉛や、亜鉛シグナルの免疫反応や各種生体反応、また、免疫病や各種病気における役割を明らかにするとともに、その作用機構を分子のレベルで明らかにする。

## 2. 研究の目的

以下3つの課題を解明することを目的とする。

1) 細胞内亜鉛シグナルの普遍性を確立すること、2) その分子機構を確立すること、3) 亜鉛や、亜鉛シグナルの免疫反応や各種生体反応、また、免疫病や各種病気における役割を明らかにするとともに、その作用機構を分子のレベルで明らかにする。

## 3. 研究の方法

分子生物学的、細胞生物学的手法にて研究を行った。

## 4. 研究成果

1) 細胞内亜鉛シグナルの普遍性の確立  
細胞内亜鉛シグナルには2つの種類があることが明らかとなった。これら2つの亜鉛シグナルは、細胞内に20種類ほど存在する亜鉛トランスポーターに依存する早期亜鉛シグナルと、それらに依存しない後期亜鉛シグナルの2種類である。早期亜鉛シグナルの代表は、マスト細胞にて Fcε 受容体依存性に生じる亜鉛波で刺激後、数分以内に ER 付近から Zn<sup>++</sup> が細胞質に遊離してくる。後期亜鉛シグナルに関しては、今回新たに Zip13 依存性の Bmp/TGFβ 信号信号への関与、Zip14 依存性の G 蛋白結合型受容体活性への関与、Znt5 依存性の PKC 活性化への関与を明らかとすることができた。

2) 細胞内亜鉛シグナルの分子機構の確立  
早期亜鉛シグナルの代表、亜鉛波の発生分子機構に関して様々な阻害剤を用いた解析から、ある1つのカルシウムチャンネルが、

亜鉛波の発生に関与していることが判明した。一方、後期亜鉛シグナルのターゲット分子としては、Snail、PDE、PKC、さらに、STAT3 を同定することができた。これらに関しては Zn フィンガー等の亜鉛結合部位を持つものと持たないものがあり、亜鉛の結合の有無と分子の活性化に関して詳細な解析を現在も続けている。

3) 亜鉛や、亜鉛シグナルの免疫反応や各種生体反応、また、免疫病や各種病気における役割

亜鉛の免疫反応への関与とその分子機構は、亜鉛投与マウスでの自己免疫疾患の抑制の分子機構の解析で証明した。亜鉛は STAT3 分子に直接結合して構造変化を引き起こすこと、構造が変化した STAT3 は JAK キナーゼにてリン酸化されないことを証明した。その結果、STAT3 依存性に出現する自己免疫疾患の病因ヘルパーT細胞、Th17 細胞が誘導されないことが判明した。また、マスト細胞が持つ脱顆粒の放出にて誘導される過敏性反応が亜鉛をキレートすることで抑制されることが判明した。また、各種亜鉛トランスポーターノックアウトマウスの作製および解析から少なくとも2つの亜鉛トランスポーター Zip13 と Zip14 が骨の形成の恒常性に関与していることが判明した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 23 件)

1. Keigo NISHIDA, Toshiyuki FUKADA, Satoru YAMASAKI, Masaaki MURAKAMI, and Toshio HIRANO. Zinc in Allergy, Autoimmune, and Hard and Connective Tissue Diseases. Zinc in Human Health, in press, 2011, 査読有
2. Toshiyuki Fukada, Satoru Yamasaki, Keigo Nishida, Masaaki Murakami, and Toshio Hirano. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases. Journal of Biological Inorganic Chemistry, in press, 2011, 査読無
3. Hojyo, S., T. Fukada, S. Shimoda, W. Ohashi, B-H. Bin, H. Koseki, T. Hirano. The Zinc Transporter SLC39A14/ZIP14 Controls G-Protein Coupled Receptor-Mediated Signaling Required for Systemic Growth. PLoS ONE 6(3): e18059, 2011, 査読有
4. 平野俊夫, 村上正晃 題 60 回藤原セミナー「亜鉛シグナルと細胞機能」を開催して 亜鉛栄養治療 1(2):A27, 2011, 査読無
5. Toshio Hirano. Interleukin 6 in autoimmune and inflammatory diseases. Proceedings of the Japan Academy, Ser. B, Physical and Biological Sciences 86(7): 717-730. 2010, 査読有
6. Kitabayashi C., T. Fukada, M. Kanamoto, W. Ohashi, S. Hojyo, T. Atsumi, N. Ueda,

- I. Azuma, H. Hirota, M. Murakami, and T. Hirano. Zinc suppresses Th17 development via inhibition of STAT3 activation. *Int. Immunol.* 22(5): 375-386, 2010, 査読有
7. 西田圭吾, 平野俊夫 第3章 サイトカインによる炎症と抗炎症制御「亜鉛による免疫制御-アレルギー応答における亜鉛/亜鉛トランスポーターの役割」サイトカインによる免疫制御と疾患 28(12):126(1934)-133(1941), 2010. 実験医学増刊号(株)羊土社, 査読無
8. Nishida K\*, A. Hasegawa\*, S. Nakae, K. Oboki, H. Saito, S. Yamasaki, and T. Hirano. (\*equal contribution) Zinc transporter Znt5/Slc30a5 is required for the mast cell-mediated delayed-type allergic reaction but not the immediate-type reaction. *J. Exp. Med.* 206:1351-1364, 2009, 査読有
9. Baba, Y., K. Nishida, Y. Fujii, T. Hirano, M. Hikida, T. Kurosaki. Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses. *Nat. Immunol.* Jan; 9(1):81-8, 2008, 査読有
10. Yamasaki, S., M. Takase-Utsugi, E. Ishikawa, M. Sakuma, K. Nishida, T. Saito, O. Kanagawa. Selective impairment of Fc {varepsilon}RI-mediated allergic reaction in Gads-deficient mice. *Int. Immunol.* in press, 2008, 査読有
11. Fukada T., N. Civic\*, T. Furuichi\*, S. Shimoda, K. Mishima, H. Higashiyama, Y. Idaira, Y. Asada, H. Kitamura, S. Yamasaki, S. Hojyo, M. Nakayama, O. Ohara, H. Koseki, H. G. dos Santos, L. Bonafe, R. Ha-Vinh, A. Zankl, S. Unger, M. E. Kraenzlin, J. S. Beckmann, I. Saito, C. Rivolta, S. Ikegawa, A. Superti-Furga and T. Hirano. (\*equal contribution). The Zinc Transporter SLC39A13/ZIP13 is Required for Connective Tissue Development; Its Involvement in BMP/TGF-beta Signaling Pathways. *PLoS ONE* 3 (11): e3642, 2008, 査読有
12. 村上正晃、ことばのカルテ「亜鉛と免疫」 *Medical Tribune*, 411(10):51, 2008. (株)メデイカルトリビューン発行, 査読無
13. 村上正晃, 平野俊夫 特集 生体微量元素: 恒常性維持・疾患との関係を紐解く「亜鉛の細胞内シグナル伝達における役割」細胞工学 27(3): 237-241, 2008. (株)秀潤社発行, 査読無
14. Hirano T., M. Murakami, T. Fukada, K. Nishida, S. Yamasaki, and T. Suzuki. Roles of Zinc and Zinc signaling in immunity: Zinc is an intracellular signaling molecule. *Ad. Immunol.* 97: 149-176, 2008, 査読有
15. Murakami, M., and T. Hirano. Intracellular Zinc homeostasis and Zinc signaling. *Cancer Science* 99:1515-22, 2008, 査読無  
[学会発表] (計 44件)
1. C. Kitabayashi, T. Fukada, M. Kanamoto, N. Ueda, W. Ohashi, S. Hojyo, I. Azuma, H. Hirota, M. Murakami and T. Hirano. International Symposium "Towards Comprehensive Understanding of Immune Dynamism", "Zinc Prevents Th17 Cell-Mediated Autoimmune Disease by Directly Inhibiting STAT3", Senri Hankyu Hotel & Osaka University, Osaka, March 1-2, 2011.
2. 平野俊夫「亜鉛シグナルと免疫・アレルギー・炎症」第26回日本小児がん学会学術集会 於 大阪国際会議場H. 22. 12. 18
3. 平野俊夫「亜鉛シグナルと免疫・アレルギー・炎症(Zinc signaling in immunity, allergy and inflammation)」JDDW2010-第52回日本消化器病学会大会 於 パシフィコ横浜H. 22. 10. 13
4. Toshio Hirano, M. Murakami, T. Fukada, K. Nishida, S. Yamasaki and S. Hojyo. The 60<sup>th</sup> Fujihara Seminar Zinc Signaling and Cellular Functions, "Zinc is an intracellular signaling molecule: early and late signal", Osaka International Convention Center, October 29-31, 2010.
5. Masaaki Murakami, Chika Kitabayashi, Toshiyuki Fukada, Minoru Kanamoto, Wakana Ohashi, Shintaro Hojyo, Toru Atsumi, Naoko Ueda, Ichiro Azuma, Hiroshi Hirota, and Toshio Hirano. The 60<sup>th</sup> Fujihara Seminar Zinc Signaling and Cellular Functions, "Zinc and Th17-mediated autoimmune diseases", Osaka International Convention Center, October 29-31, 2010.
6. Masaaki Murakami, Chika Kitabayashi, Toshiyuki Fukada, Minoru Kanamoto, Wakana Ohashi, Shintaro Hojyo, Toru Atsumi, Naoko Ueda, Ichiro Azuma, Hiroshi Hirota, and Toshio Hirano. The 60<sup>th</sup> Fujihara Seminar Zinc Signaling and Cellular Functions, "Zinc and CD4+ T cell-mediated autoimmune diseases", Osaka International Convention Center, October 29-31, 2010.
7. Arisa Moroi, Daisuke Kamimura, Kokichi Katsunuma, Yukihisa Sawa, Toshio Hirano<sup>1</sup>, and Masaaki Murakami. The 60<sup>th</sup> Fujihara Seminar Zinc Signaling and Cellular Functions, "Regulation of T cell Activation via a Metal

- Transporter”, Osaka International Convention Center, October 29–31, 2010.
8. Shohei Kobayashi, Hisashi Koga, Takahiro Nagase, Ryota Othubo, Toru Atsumi, Arisa Moroi<sup>1</sup>, Osamu Ohara, Masaaki Murakami<sup>1</sup> and Toshio Hirano. The 60<sup>th</sup> Fujihara Seminar Zinc Signaling and Cellular Functions, “An attempt to identify molecules, which intracellular localizations are regulated by Zinc.”, Osaka International Convention Center, October 29–31, 2010.
  9. Hideki Ogura, Masaya Harada, Eri Sanda, Yuko Okuyama, Daisuke Kamimura, Masaaki Murakami, and Toshio Hirano. The 60<sup>th</sup> Fujihara Seminar Zinc Signaling and Cellular Functions, “A zinc finger motif containing protein regulates the activation of the IL-6 amplifier, which is a critical for the development of an autoimmune arthritis.”, Osaka International Convention Center, Osaka, October 29–31, 2010.
  10. Chika Kitabayashi\*, Toshiyuki Fukada\*, Minoru Kanamoto, Wakana Ohashi, Shintaro Hojyo, Toru Atsumi, Naoko Ueda, Ichiro Azuma, Hiroshi Hirota, Masaaki Murakami\*, and Toshio Hirano. Zinc-mediated STAT3 suppression is involved in inhibition of autoimmune disease development via regulating Th17 differentiation. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology (第14回国際免疫学会議), Kobe, Japan, August 22–27, 2010.
  11. 平野俊夫 “Zinc signaling in bone and immunity” 第7回Bone Biology Forum (BBF) 於 静岡県裾野市 富士教育研修所, H. 22. 8. 21
  12. 平野俊夫 特別講演「Zinc is an intracellular signaling molecule.」日本薬学会第20回「金属の関与する生体関連反応シンポジウム」於 徳島文理大学国際会議場, H. 22. 6. 25
  13. 深田俊幸、北條慎太郎、北林千佳、大橋若奈、村上正晃、平野俊夫「亜鉛と亜鉛トランスポーター：サイトカイン／増殖因子の情報伝達と病態形成への関与 (Zinc and its transporters: Their roles in intracellular signaling and diseases)」第75回インターフェロン・サイトカイン学会・学術集会 於 北九州国際会議場(北九州市) H. 22. 6. 26
  14. 平野俊夫 特別講演「亜鉛と免疫・炎症・アレルギー：亜鉛はシグナル伝達因子である」第26回日本DDS (Drug Delivery System)学会 於 大阪国際交流センター, H. 22. 6. 17
  15. Toshio Hirano. JSI symposium at IMMUNOLOGY 2010, “Regulation of immune response by cytokine and zinc signaling”, Bethesda, USA, May 8, 2010.
  16. 平野俊夫「亜鉛と免疫・アレルギー・炎症：亜鉛はシグナル伝達分子である」第109回日本皮膚科学会 於 大阪国際会議場H. 22. 4. 17
  17. 平野俊夫特別講演「亜鉛と免疫・炎症・アレルギー：亜鉛はシグナル伝達分子である (Zinc signaling in immunity, allergy and inflammation)」日本薬学会第130年会 於 岡山コンベンションセンター、岡山大学、就実大学他H. 22. 3. 29
  18. 三田恵理、小椋英樹、熱海徹、村上正晃、平野俊夫, Metallothionein I/II分子によるCD4+T細胞依存性の自己免疫疾患の抑制機序, 第39回日本免疫学会総会・学術集会 於 大阪国際会議場, H. 21. 12. 2–4
  19. Chika Kitabayashi, Toshiyuki Fukada, Minoru Kanamoto, Naoko Ueda, Wakana Ohashi, Shintaro Hojyo, Ichiro Azuma, Hiroshi Hirota, Masaaki Murakami and Toshio Hirano. Zinc prevents Th17 cell-mediated autoimmune disease by directly inhibiting STAT3. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 於 大阪国際会議場, H. 21. 12. 2–4
  20. 平野俊夫「亜鉛と免疫・アレルギー・炎症：亜鉛はシグナル伝達分子である」第415回日本皮膚科学会大阪地方会第16回小林浩記念講演 於 朝日生命ホール(大阪府) H. 21. 10. 3
  21. 平野俊夫, 「亜鉛と免疫・アレルギー炎症：亜鉛は細胞内シグナル伝達因子である」, 第33回皮膚科免疫セミナー 於 品川プリンスホテルメインタワーH. 21. 3. 9
  22. 平野俊夫, 「シグナル分子としての亜鉛」, 2009年日本農芸化学会大会シンポジウム「亜鉛バイオロジーの新展開」於 福岡国際会議場H. 21. 3. 29
  23. Chika Kitabayashi, Minoru Kanamoto, Toshiyuki Fukada, Masaaki Murakami and Toshio Hirano. Zinc suppresses Th17-mediated autoimmune diseases via inhibition of STAT3 activation. 第38回日本免疫学会総会・学術集会 於 国立京都国際会館, H. 20. 12. 1–3.
  24. 平野俊夫, 第29回日本炎症・再生医学会-教育講演I 於 都市センターホテル(東京都) 「亜鉛と免疫・発生・炎症」H. 20. 7. 9
  25. Hirano T.. Roles of zinc and its transporters in immunity and connective tissues. RCAI-JSI International Symposium on Immunology. Yokohama, Japan. June 26–27, 2008.
  26. Hirano T..<sup>5th</sup> The International

Investigative Dermatology 2008,  
Luncheon Seminar (第五回国際研究皮膚科学会議)・ランチョンセミナー(協和発酵工業(株))「Roles of zinc and its transporters in immunity and connective tissues」, Kyoto International Conference Center (国立京都国際会館), Kyoto, Japan, May 17, 2008.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平野 俊夫 (HIRANO TOSHIO)  
大阪大学・生命機能研究科・教授  
研究者番号：40136718

### (2) 研究分担者

村上 正晃 (MURAKAMI MASA AKI)  
大阪大学・生命機能研究科・准教授  
研究者番号：00250514

上村 大輔 (KAMIMURA DAISUKE)  
大阪大学・生命機能研究科・助教  
研究者番号：20391922  
(H20 から研究分担者として参画)

福島 徹 (FUKUSHIMA TORU)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：60447977  
(H20 まで研究分担者として参画)

### (3) 連携研究者

深田 俊幸 (FUKADA TOSHIYUKI)  
理化学研究所・免疫アレルギー総合科学  
研究センター・上級研究員  
研究者番号：70373363