

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390185

研究課題名（和文） 高次神経活動の制御に係る必須微量元素動態の解明

研究課題名（英文） Elucidation of roles of essential trace metals in higher nervous activity

研究代表者

斎藤 健 (Saito Takeshi)

北海道大学・大学院保健科学研究所・教授

研究者番号：40153811

研究成果の概要（和文）：微量元素の細胞内吸収における金属トランスポータ、メタロシャペロンの役割および神経科学的役割を明らかにしようと試みた。銅と亜鉛は腸管吸収で拮抗し、それに銅のトランスポータ Ctr1 が関与していることが明らかになった。亜鉛と神経系の老化との関連を検討し、老化促進モデルマウス SAMP10 では、老化に伴い大脳皮質における亜鉛およびカテコールアミン合成が低下することが明らかになった。銅結合ポリフェノールは、銅シャペロン CCS を介して PC12 細胞にアポトーシスを誘導することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to elucidate roles of trace elements, metal transporters and metallochaperone in the central nervous system. Our results indicate that reduction of Cu transporter Ctr1 but not MT induction is the primary cause of the inhibition of Cu absorption by excessive intake of Zn. Declines of syntheses of catecholamines and zinc concentrations were observed in the cerebral cortex of SAMP10 with aging. Cu-polyphenol induces apoptosis via CCS-XIAP degradation induced by incorporated Cu in PC12 cells

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2010 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：微量元素、金属イオン膜輸送蛋白、中枢神経系、神経伝達物質、老化

## 1. 研究開始当初の背景

銅、亜鉛などの必須微量元素は、中枢神経系において脳の成長因子や神経伝達物質代謝酵素の補酵素としての役割を担うのみならず、金属イオンとして中枢神経伝達機構にお

ける神経伝達強度の調節や脳機能の根幹をなす学習・記憶能などの発現・保持に重要な役割を演じていることが明らかになってきた。さらに、アルツハイマー病で、有害金属のアルミニウムの蓄積のみならず必須微量

金属の亜鉛・銅、銅結合蛋白および神経伝達物質の代謝異常が起きること、必須微量元素の鉄の脳への過剰蓄積がパーキンソン病の一因と考えられること、脳の老化に伴って変動する脳内必須微量元素が存在することなど、必須微量元素が中枢神経系の構築や機能発現・保持、生理的老化に伴う脳機能の低下、さらには、老化関連疾患の発症、病態にも密接に関与していることが示唆されている。しかしながら、必須微量元素の神経細胞での吸収・排泄、細胞内器官への移行機構など基礎的かつ最も重要な課題の解明はなされていない。近年、必須微量元素を細胞内に取込む各金属に特異的な金属イオン膜輸送蛋白や細胞内の金属の移動、標的蛋白への受け渡しを司るメタロシヤペロンがあいついで同定され、必須微量元素の吸収・細胞内移動・排出の代謝制御機構を、遺伝子レベル、蛋白レベルで解明する研究が可能となり、申請者も含め、この方面からの研究アプローチが増えてきている。しかしながら、現段階においても、その重要性にもかかわらず、中枢神経伝達機構の構築や中枢神経機能の発現・保持における微量元素の神経化学的役割を解明するために必要な基礎的かつ重要な研究は不十分である。これらの背景を踏まえ、いくつかの実験を行い成果を得た。その中で、1. 必須微量元素の生体内吸収における金属、金属イオン膜輸送蛋白およびメタロシヤペロンの相互作用の解明、2. 老化による脳機能の低下に対する微量元素の関与に関する研究、3. 必須微量元素-ポリフェノールの結合による細胞死誘導機構の解明に関する研究で得られた成果について報告する。

## 2. 研究の目的

微量元素とその選択的透過性や細胞内動態および代謝制御機構に関わる金属イオン膜輸送蛋白およびメタロシヤペロンが、微量元素の腸管での選択的吸収、中枢神経伝達機構の構築および脳機能の発現・保持・増進および老化、神経変性疾患に伴う脳機能の低下において果たす役割を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 亜鉛 (Zn) 過剰摂取ラットの腸管における銅 (Cu) 吸収機構

① 実験動物：体重およそ 170g の雄 SD (Sprague-Dawley) ラット (日本クレア株式会社、東京) を Zn5 群、Zn200 群、Zn500 群の 3 群に分け、Zn 濃度の違う飼料を 8 週間与えた。各群のラットに与えた飼料の Zn 濃度を、表に示す。Zn5 群に与えた飼料が標準的な濃度の Zn を含んでおり、この群を対照群とした。各々の飼料に含まれるタンパク質、炭水化物、脂質、ミネラルとビタミン混合物

のような食品構成は、Zn 濃度を除いて同一であった。摂取量は、ラット各群で同量にした。8 週間後、エーテル麻酔下でラットの大動脈分岐から血液を採取して、と殺後小腸と肝臓、腎臓を摘出し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。なお、ラットの飼育および実験は、北海道大学大学院歯学研究科動物実験に関する指針に則って行った。

### ② 微量元素濃度の測定

小腸、肝臓、血漿、腎臓の各 1~2g を、金属測定用硝酸を用いて湿式灰化後 50ml にメスアップして試料とし、誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS SPQ6500, セイコー電子社製) により測定した。

### ③ 金属イオン膜輸送蛋白およびメタロシヤペロン等の蛋白発現量の測定

金属イオン膜輸送蛋白およびメタロシヤペロン等の蛋白発現量の測定には、western blotting 法を用いた。

### ④メタロチオネインの蛋白発現量の測定

小腸中のメタロチオネインの蛋白発現量は、試料をゲル濾過後、各フラクションの亜鉛および銅濃度を測定することで推定した。

(2) 老化促進ラットにおける脳内微量元素及びカテコールアミン代謝の変動

① 実験動物：加齢に伴い、脳萎縮と記憶・学習障害を呈する老化促進マウス SAMP10 および対照マウス (SAMR1) を 12 ヶ月齢まで飼育し、エーテル麻酔下、脳を摘出し、8 分割した。大脳皮質を試料として用いた。

### ②大脳皮質中のカテコールアミン濃度の測定

カテコールアミンの測定は、HPLC-ECD 法を用いて測定した。

### ③微量元素濃度の測定

大脳皮質を、金属測定用硝酸を用いて湿式灰化後メスアップして試料とし、誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS SPQ6500, セイコー電子社製) により測定した。

### ④カテコールアミン代謝酵素等の蛋白発現量の測定

測定には、western blotting 法を用いた。

(3) 銅、ポリフェノールおよび銅結合ポリフェノールによる神経細胞死の機構解明

①細胞：細胞は、神経細胞のモデル細胞である PC12 細胞を用いた。銅、生姜科ウコン由来のポリフェノールおよび銅-ポリフェノール (1:1) を最終濃度 0 から  $100\mu\text{M}$  添加し、24 時間培養後、細胞を採取し試料とした。

### ②細胞死の測定

ネクローシスの測定

ネクローシスは、サイトゾール中に放出される乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性により測定した。アポトーシスは、DNA 断片化の測定キットを用いて測定した。

③アポトーシス関連蛋白の測定  
アポトーシス関連蛋白の定量には、western blotting 法を用いた。

④銅濃度の測定  
細胞中の銅濃度は、誘導結合プラズマ質量分析装置を用いて測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 亜鉛 (Zn) 過剰摂取ラットの腸管における銅 (Cu) 吸収機構

① Zn 過剰摂取ラットの小腸・肝臓・血漿・腎臓の金属濃度  
小腸の Zn 濃度の対照群と比較して Zn200 群では増加したが、有意差は認められなかった。一方 Zn500 群では明らかな増加を示し、対照群および Zn200 群と Zn500 群の間に有意な差が認められた ( $p < 0.01$ )。肝臓の Zn 濃度は、対照群と Zn200 群間に有意差は認められなかった一方、Zn500 群では対照群および Zn200 群との間に有意な差が認められた ( $p < 0.01$ )。血漿の Zn 濃度では、対照群と Zn500 群の間、Zn200 群と Zn500 群の間に有意な差が認められた ( $p < 0.01$ )。腎臓の Zn 濃度は、対照群と Zn200 群では変化なかったが、Zn500 群で  $178.3 \mu\text{g/gw.w.} (\pm 5.4)$  と増加がみられ、対照群および Zn200 群との間に有意な差が認められた ( $p < 0.01$ )。

② Zn 過剰摂取ラットの小腸・肝臓・血漿・腎臓の Cu 濃度  
小腸の Cu 濃度の平均値は、対照群と比較して Zn200 群および Zn500 群で減少しており、対照群と Zn500 群の間には有意差が認められた ( $p < 0.01$ )。肝臓の Cu 濃度は、対照群と比較して Zn200 群で大きく減少し、Zn500 群ではさらに減少しており、対照群と Zn200 群、対照群と Zn500 群の間に有意な差が認められた ( $p < 0.01$ )。血漿の Cu 濃度は、対照群に対して Zn200 群で激減し、Zn500 群でさらに減少しており、対照群と Zn200 群の間、対照群と Zn500 群間に有意な差を認めた ( $p < 0.01$ )。腎臓では Zn200 群、Zn500 群の Cu 濃度が減少したが、各群の間に有意な差は認めなかった。

③ Zn 過剰摂取ラットにおける Cu トランスポーター Ctr1 および 2 価金属トランスポーター DCT1 の変動  
各々対照群の計測値を 100% とし、比較値 ( $\pm$  SE) として示した。

小腸の Ctr1 は、対照群と比較して Zn200 群、Zn500 群共に減少し、対照群と Zn500 群の間に有意な差が認められた ( $p < 0.05$ )。小腸の DCT1 は、有意な変動はみられなかった。

④ Zn 過剰摂取ラットにおける Cu シャペロン CCS および SOD1 の変動  
小腸の CCS は、対照群と比較すると Zn200 群、Zn500 群共に蛋白発現量の増加がみられ、対照群と Zn500 群の間に有意な差が認められた

( $p < 0.05$ )。肝臓の CCS は、対照群と比較して Zn200 群、Zn500 群共に増加がみられ、対照群と Zn500 群の間に有意な差が認められた ( $p < 0.05$ )。小腸の SOD1 は、対照群と比較して Zn200 群で増加し Zn500 群で減少しており、Zn200 群と Zn500 群の間に有意な差が認められた。

⑤ Zn 過剰摂取ラットにおける小腸中の MT の動態

高分子タンパクに結合する Zn は、対照群と比較して Zn を過剰に摂取させた Zn200 群、Zn500 群で濃度依存性に増加した。MT に結合した Zn は、対照群と Zn200 群ではみられず、Zn500 群でのみ認められた。高分子タンパクと結合した Cu は、対照群と比較して Zn 過剰摂取の Zn200 群と Zn500 群で減少していた。MT に結合した Cu は Zn500 群でのみみられた。

(2) 老化促進ラットにおける脳内微量元素及びカテコールアミン代謝の変動

① 大脳皮質中のカテコールアミン濃度  
老化促進を示す、SAMP10 の 12 ヶ月齢の大脳皮質中のドーパミン濃度は、対照群 SAMR1 に比較して有意に低値を示した。同様に、12 ヶ月齢の大脳皮質中ノルエピネフリン濃度も SAMR1 に比較して、SAMP10 で有意な低下が認められた。一方、カテコールアミンの代謝産物である。しかし、ドーパミンの代謝産物メタネフリンおよびノルエピネフリンの代謝産物 MHPG は、SAMP10 と SAMR1 間に有意な差は認められなかった。

② 大脳皮質中の微量元素濃度  
12 ヶ月齢の大脳皮質中亜鉛濃度および銅濃度は SAMR1 に比較して、SAMP10 で有意な低値が認められた。

③ カテコールアミン合成酵素等の蛋白発現量の測定  
12 ヶ月齢の SAMP10 の大脳皮質中カテコールアミン合成酵素であるチロシンヒドロキシラーゼおよびドーパミン・ベータ・ヒドロキシラーゼの蛋白量には、対照群と比較して有意な差は認められなかった。しかしリン酸化された (活性化) チロシンヒドロキシラーゼの蛋白発現量は、対照群と比較して、有意な低値を示した。

(3) 銅、ポリフェノールおよび銅結合ポリフェノールによる神経細胞死の機構解明  
ポリフェノールが PC12 細胞に強くネクローシスを誘導した。一方、アポトーシスは、銅結合ポリフェノールが最も強く誘導した。同じ濃度では、銅単独添加の細胞死誘導は本研究で用いた濃度では最も弱かった。

次に銅、ポリフェノールのおよび銅結合ポリフェノールによるアポトーシス誘導経路を検討した。ミトコンドリアを介したアポトーシスの有無を調べるために、ミトコンドリ

アからのチトクローム *c* の放出量を測定した。その結果、銅およびポリフェノール単独添加で、対照群（無添加群）に比較して有意なチトクローム *c* のリリースが認められた。一方、銅結合ポリフェノールは、有意なリリースの変動を示さなかった。

次に、プロテアソーム阻害を介したアポトーシス誘導経路が関与するかどうかを明らかにするために、ポリフェノール、銅及び銅結合ポリフェノール添加により誘導されるユビキチン化タンパク量の変動を測定した。ポリフェノール単独添加のみで、コントロールと比較して有意なユビキチン化蛋白の上昇がみられた。

次にアポトーシス阻害蛋白である XIAP に対する影響を検討した。XIAP 量は、銅、ポリフェノールおよび銅結合ポリフェノール全ての添加 (50 $\mu$ M) により低下を示した。特に、銅結合ポリフェノールで著しい低下が認められた。細胞内銅濃度は、銅結合ポリフェノール添加で著しい上昇が認められた。さらに、銅結合ポリフェノール添加のみで、銅メタロシャペロンである CCS の有意な低下が認められた。

#### 結論

(1) 亜鉛 (Zn) 過剰摂取ラットの腸管における銅 (Cu) 吸収機構

Zn 過剰摂取による Cu 吸収阻害機構として、① Zn の過剰摂取が中等度では、まず Ctr1 量が減少して体内への Cu 吸収が低下すると同時に、Cu 欠乏の指標である小腸細胞中の CCS が増加を示す。② Zn の過剰摂取が大きくなると、Ctr1 の減少と CCS の増加はさらに進み、加えて過剰な金属と結合する MT が小腸中に誘導され Cu と結合して、その結果、生体内の銅濃度の著しい低下を示す。以上の二つの過程で引き起こされることが強く示唆された。この研究成果は、これまで明らかにされていなかった亜鉛による銅の吸収阻害の作用機序を明らかにしたことにより、今後の微量元素による疾病の予防あるいは治療の際の摂取方法の改善に役立つ基礎的かつ重要な知見である。

(2) 老化促進ラットにおける脳内微量元素及びカテコールアミン代謝の変動

老化促進マウス SAMP10 の大脳皮質中の亜鉛、銅濃度は加齢により、低下することが明らかになった。さらに、神経伝達物質ドーパミン、エピネフリンも加齢に伴い低値を示すが、その代謝産物は変動していないことから、カテコールアミンの低下は分解の促進ではなく合成系に異常が生じている可能生が高いことが示された。SAMP10 の大脳皮質中のカテコールアミン合成酵素であるチロシンヒドロキシラーゼとドーパミン・ベータ・ヒドロ

キシラーゼの蛋白発現量は、対照群と比較して有意な変動を示さなかったが、リン酸化チロシンヒドロキシラーゼ量は、有意に低下しており、SAMP10 のドーパミンの低下は、合成酵素の活性化機構の異常が関与していることが示唆された。これらの成果は、老化に伴う記憶・学習機能低下や神経伝達機能の低下を予防あるいは改善のための一つのターゲットおよび必須微量元素の摂取による老化予防の可能性を示唆した点で重要である。

(3) 銅、ポリフェノールおよび銅結合ポリフェノールによる神経細胞死の機構解明  
本研究により、PC12 細胞において、銅混合は銅あるいはポリフェノール単独添加と比較してより強くアポトーシスを誘導することが明らかになった。さらに銅、ポリフェノールおよび銅結合ポリフェノール添加によるアポトーシス誘導経路はそれぞれ異なっていることが明らかになった。

すなわち、銅単独添加で誘導されるアポトーシスには、ミトコンドリアからのチトクローム *c* の放出を介した経路が主に関与し、ポリフェノール単独添加で誘導されるアポトーシスには、プロテオソーム活性阻害によるユビキチン蛋白の蓄積およびミトコンドリアからのチトクローム *c* の放出を介した経路が主に関与し、さらに、銅結合ポリフェノール添加によるアポトーシス誘導機構には、細胞内の銅濃度の上昇による CCS-XIAP の分解を介した経路が強く関与することが示唆された。

これらの知見は、金属および金属-ポリフェノールによって PC12 細胞にアポトーシスを引き起こすこととその機構を明らかにしたことで、金属-ポリフェノールが中枢神経細胞にアポトーシスを引き起こす可能性とその作用機序を示すことができた。さらに、金属とポリフェノールのサプリメントの混合摂取時の相互作用の一端が明らかになり、今後の適正摂取量の設定の根拠となる知見である。また、XIAP 蛋白の亢進で不死性を獲得しているいくつかのがんの治療に、金属結合ポリフェノールの有効性を示す知見である。

#### 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 7 件)

① Sato S., Mukai Y and Saito T.: Quercetin intake during lactation modulates the AMP-activated protein kinase pathway in the livers of adult male rat offspring programmed by maternal protein restriction. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012 in press (査読有)

- ②Sun Y, Takahashi K, Saito T, Hosokawa T, Kurasaki M: Diethyl phthalate enhances apoptosis induced by serum deprivation in PC12 cells. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2012 in press (査読有)
- ③ Kitamura M, Sikder Md.T, Saito T, Kurasaki M: Study on toxicity of boron detected in Toyohira river water Using PC12 Cells. Biomed Res Trace Elements 23 (1): 24-32, 2012 (査読有)
- ④Kato E., Yamane S., Nomura R., Matsumoto K, Tashima K., Horie S., Saito T., Fujino H., Murayama T.: Dysfunction of neurogenic VIP-mediated relaxation in mouse distal colon with dextran sulfate sodium-induced colitis. Pharmacological Research, 65: 204-212, 2012 (査読有)
- ⑤ Seki S, Aoki M, Hosokawa T, Saito T, Masuma R, Komori M, Kurasaki M: Bisphenol-A suppresses neurite extension due to inhibition of phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in PC12 cells. Chemico-Biological Interactions, 194: 23-30, 2011 (査読有)
- ⑥ Tada E., Toyomura K., Nakamura H., Sasaki H., Saito T., Kaneko M., Okuma Y., Murayama T.: Activation of ceramidase and ceramide kinase by vanadate via a tyrosine kinase-mediated pathway. Journal of Pharmacological Sciences, 114(4): 420-432, 2010 (査読有).
- ⑦ Kido, M., Yustiawati, Syawal, MS, Sulastrri, Hosokawa, T., Tanaka, S., Saito, T., Iwakuma, T., Kurasaki, M.: Comparison of general water quality of rivers in Indonesia and Japan. Environmental Monitoring and Assessment, 156: 317-329, 2009 (査読有).

[学会発表] (計 13 件)

- ①宮島美貴: 加齢及び老化に伴う大脳皮質内での抗酸化酵素 Prx の回路異常, 第 82 回日本衛生学会. 2012. 3. 25, (京都大学, 京都)
- ②西村亮: 銅取り込みによる CCS-XIAP 分解を介した銅混合クルクミンのアポトーシス増強作用, 第 82 回日本衛生学会. 2012. 3. 25, (京都大学, 京都)
- ③Nishimura R et al.: Curcumin and copper binding curcumin induced apoptosis in PC12 cells via mitochondrial pathways. 3rd International Symposium on Trace Elements & Health May 24-27, 2011 - Murcia, Spain.
- ④Miyajima M et al.: Elucidation of the role of zinc, zinc-enzyme and tetrahydrobiopterin in the alteration of catecholamine metabolism in the cerebral

cortex with aging in senescence - accelerated mouse. 3rd International Symposium on Trace Elements & Health May 24-27, 2011 Murcia, Spain.

⑤Kihara, Y et al.: Mechanism of toxicity on human vascular endothelial cells by humic acid obtained from tropical peatland.

3rd International Symposium on Trace Elements & Health May 24-27, 2011 - Murcia, Spain.

⑥Tanaka M. et al.: Effects of humic acid on eNOS activities in human umbilical vein endothelial cells. 3rd International Workshop on "Wild Fire and Carbon Management in Peat-Forest in Indonesia", Palangka Raya, September Indonesia (2011)

⑦西村亮: PC12 細胞におけるクルクミンの細胞死誘導に対する銅の制御機構, 第 81 回日本衛生学会, 2011. 3. 26, (昭和大学, 東京)

⑧宮島美貴: 老化促進モデルマウス SAMP10 の脳内 BH4 代謝とその合成酵素の変動, 第 81 回日本衛生学会, 2011. 3. 26, (昭和大学, 東京)

⑨宮島美貴: 母親ラットに対する低蛋白食が出生後のラットの成長に及ぼす影響について, 第 81 回日本衛生学会, 2011. 3. 26, (昭和大学, 東京)

⑩齋藤 健: 老化促進モデルマウス SAMP10 の脳内テトラヒドロバイオプテリン (BH4) 代謝の変動, 第 21 回日本微量元素学会, 2010 年 7 月 3 日, (京都大学, 京都)

⑪西村亮: 各種ウコン中のクルクミノイドおよび微量元素含有量の分析と関連性の検討 第 80 回日本衛生学会, 2010. 5. 10, (仙台国際センター, 仙台)

⑫蓑島萌未: 老化促進モデルマウス (SAMP10) の加齢に伴う脳内カテコールアミン代謝の変動機構の解明. 第 20 回日本微量元素学会. 東京, 2009. 7, (京王プラザホテル, 東京)

⑬佐藤睦将: クルクミン・銅および同時添加により引き起こされる細胞死とその機構. 第 20 回日本微量元素学会. 東京, 2009. 7, (京王プラザホテル, 東京)

[図書] (計 1 件)

齋藤 健 他、講談社サイエンティフィック、公衆衛生学 社会・環境と健康 第 3 版 村松 幸、中山健夫 編 2011pp136 - pp143

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]