

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15262

研究課題名（和文）亜鉛の吸収・動態制御に着目した加齢性疾患の予防法の確立

研究課題名（英文）Analysis of the mechanisms for pathogenesis of the disease caused by age-dependent dysfunction of zinc homeostasis, focusing on the expression regulation of zinc transporters and zinc status.

研究代表者

西藤 有希奈 (Nishito, Yukina)

京都大学・生命科学研究科・特定助教

研究者番号：20867709

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：亜鉛は生体内に不可欠な微量元素であり、高齢者では血清亜鉛値が低下傾向にあり、これに伴い、認知機能の低下や臓器障害が誘発されることが報告されている。一方、その分子機序については不明な部分が多い。本研究では、亜鉛輸送体の発現と亜鉛動態の相関性に着目し解析を行った。培養細胞を用いた解析から、亜鉛吸収に関わるZIP4と排出に関わるZNT1の発現、および、亜鉛動態が相関することを明らかにした。高齢マウスを用いた解析からは、これらの相関性に差を見出すことは出来なかった。一方、老化に伴う亜鉛欠乏に伴い他の金属動態の変化を認めたことから、亜鉛欠乏による金属恒常性の破綻が疾患発症の一端となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血清亜鉛値の実態調査報告によると、日本人の約3割が亜鉛欠乏状況にあることが算出されており、更に、高齢者では約8割が低亜鉛血症を引き起こしていることが報告されている。したがって、高齢化社会を迎えた日本において、亜鉛欠乏は更に深刻な問題となることが予想される。本申請課題では、加齢に伴う低亜鉛血症並びに関連疾患の発症機序を明らかとすると共に、この制御機構を標的とした亜鉛吸収効率促進因子の同定を目指している。加齢に伴う低亜鉛血症および関連疾患の予防・改善法の確立を目指す本研究は、高齢者の健康を維持することに貢献し、社会・国民へ還元できる重要課題である。

研究成果の概要（英文）：Zinc is an essential trace element for various physiological function. The serum concentration of zinc gradually decreases with age, which cause cognition-related diseases and tissues inflammation. However, the molecular mechanisms underlying this is not fully understood. In this study, we examined how age-dependent dysfunction of zinc homeostasis cause several diseases, focusing on the relationship between the expression regulation of zinc transporters and zinc status. We found that the increase expression of zinc importer ZIP4 increased cellular zinc content and the expression of zinc exporter ZNT1 in the culture cell analysis. We cannot detect the differences between these expression changes of zinc transporters and zinc status in the analysis using aged-mouse models, however, we found that the metal homeostasis was disturbed in aged-mouse, which may provide new insights into the mechanism of the pathogenesis of diseases caused by aged-dependent zinc deficiency.

研究分野：生化学

キーワード：亜鉛 輸送体 加齢 ホメオスタシス 発現制御

1. 研究開始当初の背景

必須微量元素である亜鉛は、生体内において、タンパク質の構造維持や、酵素の活性調節、細胞内外のシグナル伝達など、多様な機能を有する。したがって、生体内において、亜鉛が欠乏状態になると、皮膚炎や脱毛、味覚障害など多様な症状の発症に関与する。特に、高齢者では血清亜鉛値が低下傾向にあり、これに伴い、認知機能の低下、大腸炎、肝疾患など全身性の症状が誘発されることが報告されている。加えて、加齢性疾患の多くは亜鉛欠乏による症状に類似することや、亜鉛欠乏により慢性疾患が悪化することが指摘されており、高齢者における亜鉛欠乏の予防・改善は、高齢化社会にある我が国において重要な課題である。この問題への対策としては、亜鉛摂取量を増加させること、および、亜鉛吸収効率を高めることが重要であり、前者に対しては栄養学的な観点から様々な試みがなされている。一方で、後者に対しては、加齢に伴う低亜鉛血症および関連疾患の発症に関与する分子や機序が不明であるため、適切な対策はなされていない。本申請課題では、亜鉛輸送体の発現と亜鉛の動態の相関性に着目し、加齢による亜鉛吸収・動態の破綻機構を解明することを目的とし研究を進めた。更に、この制御機序を標的とした亜鉛吸収効率を促進する亜鉛錯体および低分子化合物を同定し、加齢に伴う低亜鉛血症および亜鉛欠乏に付随する加齢性疾患の予防・改善法を確立することを目標とし研究を進めた。

2. 研究の目的

本研究では、加齢に伴う低亜鉛血症および関連疾患発症の予防法を確立するため、亜鉛の吸収に関わる亜鉛輸送体の発現と体内の亜鉛動態の相関性に着目し解析を進めた。まず初めに、細胞レベルで、消化管における亜鉛輸送体の発現と亜鉛動態との相関性を明らかとし、亜鉛吸収調節機構の詳細な機構について解析を進めた。続いて、老齢マウスを用いた解析から、亜鉛輸送体の発現と体内の亜鉛動態、および、亜鉛欠乏に伴う諸症状との関連性について解析を行った。更に、近年の研究から、亜鉛は亜鉛以外の金属の代謝と関連する可能性が考えられることから、他の金属元素の動態にも着目し解析を進めた。

3. 研究の方法

(1) 消化管上皮細胞における亜鉛輸送体の発現の相関性に関する解析

ドキシサイクリン(DOX)という薬剤依存的に目的の遺伝子の発現誘導が可能となる Flp-In T-Rex システムを組み込んだ MDCK 細胞を用いて、頂端膜に局在する ZIP4 の発現を DOX 依存的に誘導可能な細胞株を樹立した。この細胞を極性分化させるため、Transwell plate を使用し、長期培養した。細胞表面の ZIP4 および ZNT1 の検出には、細胞膜非透過性のビオチン化試薬である EZ-Link, a Sulfo-NHS-SS-Biotin reagent を用い、頂端膜側および側底膜側からビオチン化試薬を処理した。細胞抽出液中よりビオチン化されたタンパク質をアビジンが固定化されたゲルを用いて精製した後、回収したサンプル中から抗 ZNT1 抗体を用いてウェスタンブロット法により、側底膜の ZNT1 の発現について検討を行なった。

(2) 亜鉛輸送体の発現と細胞内亜鉛量の相関性に関する解析

上述の DOX によって ZIP4 発現が誘導可能な株を用いて解析を行なった。細胞を播種した後、DOX を 24 時間添加し、ZIP4 の発現を誘導した。DOX 未処理または処理をした細胞を EDTA 入りの PBS で 3 回洗浄した後、細胞を 1ml の超純水を用いて回収した。この際、超純水 1ml 辺りの細胞量を計測した。180°C に熱したサンプルに、ドラフト内で、硝酸、過塩素酸、過酸化水素を加えることで、灰化処理を行い、有機物を除去した。灰化処理を行なったサンプルを 5% の硝酸に溶かした後、誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) を用いて、金属量を測定した。

(3) 老齢マウスを用いた体内亜鉛動態と疾患との関連性に関する解析

12 および 72 週齢の C57BL/6 マウスにおいて、認知機能を確認するため、新規物体認識試験を行った。次に、各マウスから、血液、腸、脳、肝臓、腎臓、便を摘出した。ICP-MS にて、各臓器中の金属量を比較解析した。病態の進行度を確認するため、ドライケミストリーを用いた各種パラメーター評価や組織切片の HE 染色の検討を行った。更に、各組織から膜タンパク質を回収し、ウェスタンブロット法を用いて、亜鉛の取り込みや排出に関与する輸送体の発現の差異について検討を行った。

4. 研究成果

(1) 消化管上皮細胞における亜鉛輸送体の発現の相関性に関する解析

はじめに、消化管における亜鉛吸収機構の詳細な機序を明らかにすることを目的とし研究を進めた。消化管においては頂端膜に局在する ZIP4 が亜鉛の取り込みに重要な役割を果たすこと、また、側底膜に局在する ZNT1 が血液中への亜鉛の供給において重要な役割を果たすことが明らかとなっている。一方で、これら輸送体の発現の相関性、並びに、亜鉛動態と

の関連性については明らかとなっていない。そこで、DOX という薬剤依存的に目的の遺伝子の発現誘導が可能となる Flp-In T-Rex システムを組み込んだ MDCK 細胞を用いて、ZIP4 の発現を DOX の添加依存的に誘導可能な細胞株を樹立し、頂端膜上の ZIP4 の発現を変化させた際の、側底膜側の ZNT1 の発現について解析した。MDCK 細胞を長期培養し、極性分化させた後、DOX を添加し頂端膜上の ZIP4 の発現を誘導させた。その後、細胞非透過型ビオチン化試薬を用いて、細胞表面ビオチン化アッセイによる解析を行った結果、頂端膜上の ZIP4 を誘導させると側底膜上の ZNT1 の発現が上昇することが明らかとなった。この結果は、消化管上皮細胞では頂端膜側から側底膜側へ、亜鉛を厳密かつ効率的にベクトリアル輸送できることを示しており、亜鉛吸収機構の理解に重要な成果だと考えている。今後は、頂端膜上の ZIP4 によって取り込まれた亜鉛がどの様にして側底膜上の ZNT1 へと受け渡されるかなど詳細な解析を進めていきたいと考えている。

(2) 亜鉛輸送体の発現と細胞内亜鉛量の相関性に関する解析

亜鉛輸送体の発現と細胞内の亜鉛動態が相関するかについて、ICP-MS を用いて解析した。MDCK 細胞を播種した後、DOX を 24 時間添加し、ZIP4 の発現を誘導した。灰化处理を行った後、ICP-MS を用いて、細胞内の金属量を測定した結果、ZIP4 の発現誘導により細胞内の亜鉛量が増加することを認めた。同時に、ウェスタンブロット法を用いた解析からも、ZIP4 の発現上昇に伴い、細胞内の遊離亜鉛と結合し亜鉛に応答し発現が上昇するメタロチオネイン、および、ZNT1 の発現が上昇することを確認した。以上の結果から、亜鉛輸送体の発現と細胞内の亜鉛動態が相関することを実験的に実証することが出来た。今後は、この輸送体の発現と亜鉛動態の相関性について個体レベルでも詳細な解析を行っていきたいと考えている。

(3) 老齢マウスを用いた体内亜鉛動態と疾患との関連性に関する解析

12 および 72 週齢の C57BL/6 マウスにおいて、新規物体認識試験を行った結果、72 週齢の老齢マウスにおいて、認知機能が実際に低下していることを確認した。そこで、各種組織を摘出し、ICP-MS にて、組織内金属量を比較解析した。その結果、若齢マウスと比較して老齢マウスにおいて、血漿中および小腸上部での亜鉛量が実際に低下していることを確認した。そこで、小腸上部から膜タンパク質を回収し、亜鉛輸送体の発現を確認した。特に、血液中へと亜鉛を排出する ZNT1 の発現に関しては、マウスでの発現を特異的に認識出来る抗体が確立されていなかったため、抗体の選別を含めた解析を進めた。その結果、本解析では、老齢マウスにおいて輸送体の発現において顕著な差異は検出できなかった。今後は、亜鉛十分食や亜鉛欠乏食を与えたマウスやラットなどを用いて、輸送体の発現変化と亜鉛動態との相関性などについて、詳細な解析を進めていきたいと考えている。

続いて、各組織における亜鉛量を比較解析したところ、脳、肝臓、腎臓などにおいて、亜鉛量が低下していることを認めた。興味深いことに、これらの組織においては、鉄や銅などの亜鉛以外の金属が蓄積していることが明らかとなった。近年の研究から、亜鉛は他の金属元素と相互作用する可能性が示唆されていることから、これらの現象は、老化による亜鉛欠乏により他の金属の代謝が変化する可能性を示唆する結果であると考えている。鉄や銅などは過剰量では様々な障害を引き起こす可能性が示唆されている。そのため、今後は、組織切片の HE 染色など用いた解析を行うことにより、各臓器における亜鉛以外の金属量の変化と病態の進行度合いの相関性に着目しながら解析を進めていきたいと考えている。特に、亜鉛輸送体の中には、亜鉛以外の金属の代謝の制御にも関与する輸送体が存在することが報告されているため、これらの輸送体に着目しながら、亜鉛欠乏による金属恒常性の破綻という観点から解析を進めていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Nishito Yukina, Hashimoto Ayako, Kambe Taiho | 4. 巻 687 |
| 2. 論文標題 Simple in vitro method to evaluate ZIP zinc transport ability through zinc transporter 1 and metallothionein expression measurements | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Methods in Enzymology | 6. 最初と最後の頁 207 ~ 239 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.mie.2023.04.017 | 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 - |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Nagamatsu Shino, Nishito Yukina, Yuasa Hana, Yamamoto Nao, Komori Taiki, Suzuki Takuya, Yasui Hiroyuki, Kambe Taiho | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Sophisticated expression responses of ZNT1 and MT in response to changes in the expression of ZIPs | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 7334 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-10925-2 | 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12件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 ○西藤有希奈, 安井裕之, 神戸大朋 |
| 2. 発表標題 細胞内におけるマンガンと亜鉛代謝の相関性に関する解析 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 ○西藤有希奈 |
| 2. 発表標題 亜鉛輸送体の発現制御を基軸とした亜鉛代謝維持機構の理解 |
| 3. 学会等名 第35回バイオメディカル分析科学シンポジウム（BMAS2023） |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 ○Yukina Nishito, Shino Nagamatsu, Hiroyuki Yasui, Taiho Kambe |
| 2. 発表標題 Sophisticate responses of ZNT1 and MT to alteration of ZIP protein expression |
| 3. 学会等名 ICTEM conference 2022 (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年～2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 ○西藤有希奈、神戸大朋 |
| 2. 発表標題 亜鉛輸送体の発現制御を介した細胞内亜鉛代謝制御機構についての解析 |
| 3. 学会等名 第16回トランスポーター研究会 |
| 4. 発表年 2022年～2023年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 ○西藤有希奈、山本奈央、上村柔毅、神戸大朋 |
| 2. 発表標題 マンガンによる細胞内亜鉛代謝の攪乱 |
| 3. 学会等名 第33回 日本微量元素学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年～2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 ○Yukina Nishito, Yoshiki Kamimura, Nao Yamamoto, Hitomi Fujishiro, Hiroyuki Yau, Taiho Kambe |
| 2. 発表標題 「Manganese disturbs the cellular zinc homeostasis」 |
| 3. 学会等名 The 10th asian biological inorganic chemistry conference (asbic10), (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年～2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 ○後藤那月、西藤有希奈、神戸大朋 |
| 2. 発表標題 亜鉛濃度変化に伴う亜鉛トランスポーター-ZNT1 の発現調節機構 |
| 3. 学会等名 第24回 日本亜鉛栄養治療研究会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年～2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 ○上村柔毅、西藤有希奈、神戸大朋 |
| 2. 発表標題 亜鉛ホメオスタシスとマンガンホメオスタシスのクロストーク |
| 3. 学会等名 第24回 日本亜鉛栄養治療研究会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年～2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 ○上宇宿帆香、西藤有希奈、嶋田佳子、安井 裕之 |
| 2. 発表標題 老化に伴う金属代謝異常に起因する神経変性疾患の病態発症・進行の分子メカニズムの解明 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第142年会 |
| 4. 発表年 2021年～2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 ○葛原寛子、嶋田佳子、西藤有希奈、安井裕之 |
| 2. 発表標題 潰瘍性大腸炎の年齢に依存した発症頻度と亜鉛動態との関連性評価 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第142年会 |
| 4. 発表年 2021年～2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 ○西藤有希奈、長松詩野、神戸大朋 |
| 2. 発表標題 ZIP輸送体が輸送した金属の差異により細胞亜鉛代謝が攪乱する |
| 3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ10 |
| 4. 発表年 2021年～2022年 |

〔図書〕 計1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 |
|---------|---------|
| | |