

〈特集：第27回生物試料分析科学学会（新潟）教育講演2〉

亜鉛シグナル：個体恒常性の維持に関わる新しい制御機構

原 貴史、高岸 照久、深田 俊幸

Zinc signal: The novel regulatory system for physiological homeostasis

Takafumi Hara, Teruhisa Takagishi and Fukada Toshiyuki

Summary Zinc (Zn) is recognized as an important mineral that is necessary for the regulation of the expression of biological molecules such as growth factors, transcription factors, and enzymes. Zn deficiency induces the dysregulation of Zn homeostasis and affects growth, endocrine functions, and immune responses. As the primary molecular mechanism of Zn homeostasis is zinc transporter family, which regulates zinc levels controlling Zn influx and efflux between extracellular and intracellular compartments. Some studies based on the gene knock-out mice and human genetic analysis have been reported the relationship between zinc transporters and human diseases. Therefore, although the physiological functions of Zn transporters remain to be clarified, Zn transporters would be considered as attractive therapeutic targets. In this review article we describe important physiological roles of Zn transporters and their contributions to human diseases.

Key words: Zinc signal, Zinc transporter, Homeostasis, Disease

I. 緒言

亜鉛が健康維持に重要な必須微量元素として初めて報告されたのは、今から半世紀以上前の「亜鉛欠乏症」の発見に端を発する¹⁾。その後現在に到るまで、亜鉛について様々な研究が展開されてきた。特に最近10年間では、遺伝子改変マウスやヒト遺伝学に基づいた詳細な解析が進み、亜鉛の生体内での役割やヒト疾患との関係において、亜鉛の重要性が改めて注目されている²⁾。

亜鉛は、必須微量ミネラルとして、成長・分

化成熟・免疫応答をはじめ、様々な生理応答の制御に関与している。通常、食事由来のミネラルとして亜鉛を摂取しており、主に腸管から吸収され、2-3gの亜鉛が生体内に存在する。そのうち約60%が骨格筋、30%が骨、5%が皮膚や肝臓に貯蔵されている (Fig. 1)²⁾。また、ヒトの生体内に存在するタンパク質の約10%が、亜鉛と結合することによりその機能を発揮し、様々な生理応答を分子レベルで制御している³⁾。従って、生体内における亜鉛レベルが適切に制御されていることが、生理機能や健康の維持に重要である。実際に、亜鉛欠乏状態が続くと、免

徳島文理大学 薬学部 病態分子薬理学研究室
〒770-8514 徳島市山城町西浜傍示180
TEL: 088-602-8592, FAX: 088-655-3051
Email: fukada@ph.bunri-u.ac.jp

Molecular and Cellular Physiology, Faculty of
Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University.
180 Nishihama Boji, Yamashiro-cho, Tokushima-city,
770-8514, JAPAN

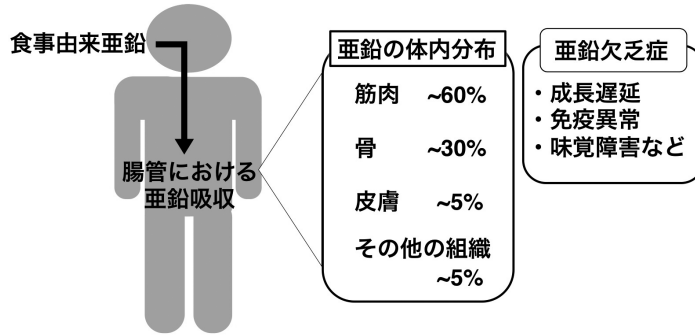


Fig. 1 Zinc storage and distribution in the body.

Food derived zinc is mainly absorbed from the intestine. Approximately 2-3g of total zinc content is distributed to skeletal muscle (60%), bone (30%), skin and other tissues (5% each). Zinc deficiency induces growth retardation, abnormal immune responses, and gustatory disorder.

疫異常、味覚障害さらに成長障害などを生じることが報告されており、亜鉛ホメオスタシスが生命活動の維持に重要であることが認識されている⁴⁾。

上述の通り、生体内における亜鉛ホメオスタシスの維持は、生命活動に必須であるが、その主要な分子メカニズムは、亜鉛トランスポーターファミリーによって制御されている⁵⁾。亜鉛トランスポーターは、文字通り亜鉛を輸送する膜タンパク質であり、亜鉛トランスポーターファミリーには、Solute carrier family 39A (SLC39A) / Zrt- and Irt-like proteins (ZIPs) と、Solute carrier family 30A (SLC30A) / Zinc transporters (ZnTs)が存在する。ZIPsには14種類、ZnTには10種類の分子が存在し、細胞膜やゴルジ体、小胞体 (ER) といった細胞内オルガネラの膜上に局在していることが知られている (Fig. 2)。ZIPsやZnTsはどちらも亜鉛輸送能を有しているが、ZIPsが細胞質の亜鉛濃度を増加させるのに対して、ZnTsは細胞質の亜鉛濃度を減少させる働きがあり、両者が相互に補完し、細胞内の亜鉛ホメオスタシスを維持しているものと考えられている²⁾。

これまでの亜鉛トランスポーターに関する研究では、亜鉛トランスポーターの遺伝子改変マウスやヒト遺伝学に基づいた解析が行われ、発現様式や生理機能解析が進展している (Table 1, 2)⁶⁾。これらの研究から、亜鉛トランスポー

ターが輸送する亜鉛は、「亜鉛シグナル」として細胞内の情報伝達を制御すること、また亜鉛シグナルの異常が、疾患の発症や病態メカニズムに密接に関係することが明らかとなりつつあり、亜鉛シグナルの創薬標的としての可能性が注目されている。

本稿では、亜鉛ホメオスタシスの中心的な役割を担う、亜鉛トランスポーターの生理機能に関して、我々の研究グループの成果を中心に、疾患メカニズムとの関連や創薬標的としての可能性について紹介し、次に現在利用されている代表的な亜鉛の分析・検出方法を概説する。

II. 亜鉛トランスポーターと亜鉛シグナル

これまでに、様々な亜鉛トランスポーターに関して、上述の亜鉛の評価系や、遺伝子改変マウスを用いた解析、さらに遺伝学的解析を駆使しながら、生理機能の解明や新たな疾患メカニズムの解明に迫る有用な研究成果が報告されている。本章では、ZnT及びZIPファミリーの中で、疾患メカニズムとの関連から近年研究の進展が顕著な分子を中心に、我々の研究成果を含めて紹介する。

II-1. SLC30A/ZnTファミリー

SLC30A/ZnTファミリーは、細胞質の亜鉛イオンを細胞外や細胞内オルガネラに輸送するこ

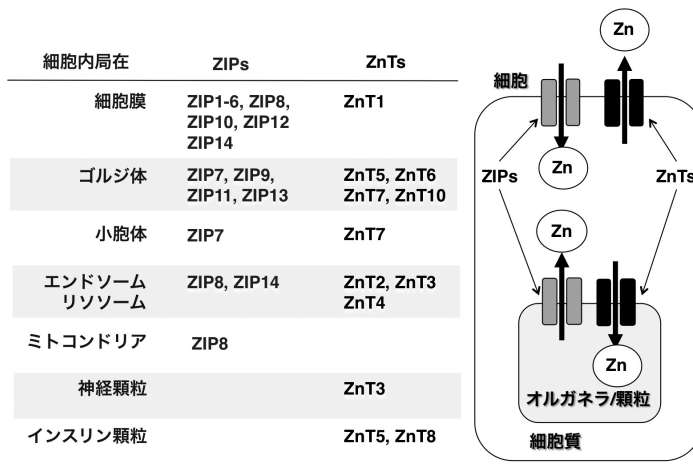


Fig. 2 The expression properties of each ZIPs and ZnTs protein in the cell compartments.

Each ZIPs and ZnTs are individually expressed in plasma membrane, ER, Golgi, mitochondria, neural vesicle, and insulin vesicles. ZIPs, which transport zinc ion from extracellular or organelle compartments to cytosol, increase zinc levels in the cytosol. In contrast, ZnTs, which uptake zinc from cytosol, decrease zinc levels in the cytosol.

Table 1 Physiological properties of SLC30A/ ZnT family.

遺伝子	発現部位	細胞内局在	生理機能と疾患(KOマウス/ヒト疾患)**
<i>Slc30a1/ ZnT1</i>	全身	細胞膜	胎生致死*
<i>Slc39a2/ ZnT2</i>	全身	リソソーム、エンドソーム	低亜鉛母乳**
<i>Slc39a3/ ZnT3</i>	脳	リソソーム、エンドソーム	アルツハイマー様神経変性、記憶障害/*
<i>Slc39a4/ ZnT4</i>	全身	リソソーム、エンドソーム	低亜鉛母乳*
<i>Slc39a5/ ZnT5</i>	全身	インスリン顆粒、ゴルジ体	成長遅延*
<i>Slc39a6/ ZnT6</i>	全身	ゴルジ体	
<i>Slc39a7/ ZnT7</i>	全身	小胞体、ゴルジ体	腸管上皮分化増殖*
<i>Slc39a8/ ZnT8</i>	膵臓	インスリン顆粒	I型II型糖尿病 (インスリン分泌障害)**
<i>Slc39a10/ ZnT10</i>	腸管、肝臓、脳	細胞膜	パーキンソン様症候群**、高マンガ血症**

とで、細胞質の亜鉛濃度を低下させる働きを有する。これまでに、10種類のZnT分子が同定されており、生理機能解析が進んでいる (Table 1)。本項目では、特に疾患との関わりにおいて重要なZnT2, ZnT3, ZnT4, ZnT8, ZnT10について以下に概説する。

i) ZnT2の母乳中亜鉛量における役割

ZnT2機能の遺伝的喪失は母乳中の亜鉛レベルを低下させ、乳児における亜鉛欠乏症と関連症状を引き起こす⁷⁾。これまでに、複数のZnT2

遺伝子多型が報告されており、いずれも亜鉛輸送能が低下している。また、ZnT2遺伝子のうち4箇所で一塩基多型が確認されている。従って、ZnT2の機能喪失をもたらす変異が複数存在していることから、ZnT2変異に起因する低亜鉛含有母乳による乳児の発育障害は、これまでの報告よりも高頻度に生じている可能性が示唆される (Fig. 3A)⁷⁾。

ii) ZnT3の神経疾患における役割

ZnT3-KOマウスは、アルツハイマー様記憶障

Table 2 Physiological properties of SLC39A/ ZIP family.

遺伝子	発現部位	細胞内局在	生理機能と疾患(KOマウス/ヒト疾患)**
<i>Slc39a1/ Zip1</i>	全身	細胞膜	胚発生異常(亜鉛制限による)*
<i>Slc39a2/ Zip2</i>	肝臓、皮膚、卵巣、樹状細胞	細胞膜	胚発生異常(亜鉛制限による)*
<i>Slc39a3/ Zip3</i>	全身	細胞膜	胚発生、T細胞分化の異常(亜鉛制限による)*
<i>Slc39a4/ Zip4</i>	腸管	細胞膜	腸性肢端皮膚炎**、胎性致死*
<i>Slc39a5/ Zip5</i>	腸管、腎臓、脾臓	細胞膜	無症候性高度近視**、腸管・脾臓での亜鉛排泄障害*
<i>Slc39a6/ Zip6</i>	全身	細胞膜	食道がん細胞の増殖転移**
<i>Slc39a7/ Zip7</i>	腸管、皮膚	小胞体 ゴルジ体	腸管上皮分化増殖*
<i>Slc39a8/ Zip8</i>	全身	細胞膜	免疫応答異常、変形性関節炎* 小脳萎縮症**、先天性糖鎖合成異常症(CDG)II型**
<i>Slc39a9/ Zip9</i>	全身	リソソーム、ゴルジ体	乳がん、前立腺がん発現**
<i>Slc39a10/ Zip10</i>	全身、腎臓、B細胞	細胞膜	B細胞、マクロファージ分化と機能* 上皮分化、乳がん増殖**
<i>Slc39a12/ Zip12</i>	脳、肺血管内皮	細胞膜	神経分化、肺高血圧*
<i>Slc39a13/ Zip13</i>	結合組織	ゴルジ体、顆粒膜	結合組織異常、脂肪細胞分化障害* 脊椎手掌異形成型エーラス・ダンロス症候群(EDSSPD3)** (別名: SCD-EDS)
<i>Slc39a14/ Zip14</i>	肝臓、脳骨、軟骨	細胞膜 エンドソーム	糖代謝異常、成長遅延、GPCRシグナル(cAMP-CREB)との相互作用、軟骨細胞分化異常*、パーキン型早発性パーキンソン病、高マンガン血症によるジストニア**

害を示すことから、ZnT3は主に記憶に関与すると考えられている⁸⁾。ヒトでは、大脳皮質におけるZnT3発現量が、健全な高齢者及び、アルツハイマー病の患者で有意に減少していた。従って、ZnT3を介する亜鉛の輸送が、記憶や認知機能の維持に重要であることが示唆されている (Fig. 3B)⁸⁾。

iii) ZnT4の母乳中亜鉛量における役割

ZnT4機能の遺伝的喪失は、致死ミルク変異マウスと呼ばれ、ZnT4機能喪失型変異マウスは亜鉛含有量が著しく低い乳を生産する (Fig. 3A)⁹⁾。また、ZnT4-KOマウスにおける亜鉛含有量の低下は、ヒトのZnT2遺伝的喪失で認められるものと同様である。これらのマウスの亜鉛低含有乳による、仔が致死に至る表現型は、仔の発育および成長にとって、十分な食事性の亜鉛が不可欠であることを明確に示したものである。

iv) ZnT8の糖尿病における役割

約4万人を対象とするフランスのコホート研

究データを基に、バイオインフォマティクスの解析を行った結果、ZnT8遺伝子がI型およびII型糖尿病と強く関連していることが示唆された¹⁰⁾。膵臓β細胞特異的ZnT8欠損マウス (ZnT8-cKO) の解析では、末梢のインスリンレベルは高く、一方で肝臓におけるインスリンクリアランスが上昇していた。ヒトにおけるZnT8変異のキャリアにおいても、インスリンクリアランスが上昇していた。以上の結果より、ZnT8は、肝臓におけるインスリンクリアランスを制御する、糖尿病の病因遺伝子の一つであることが示唆される (Fig. 3C)¹¹⁾。

v) ZnT10の神経疾患における役割

神経細胞の変性を認める若年発症型ジストニア、成人発症パーキンソンニズム、高マンガン血症、また、慢性肝機能不全及び造血障害の患者が存在する血縁家族の遺伝子解析から、2つのZnT10変異の関連が示唆された¹²⁾。また、ZnT10変異を有し、高マンガン血症を併発する、若年発症型ジストニアや高ビリルビン血症患者での脳MRIイメージ解析から、大脳基底核と小

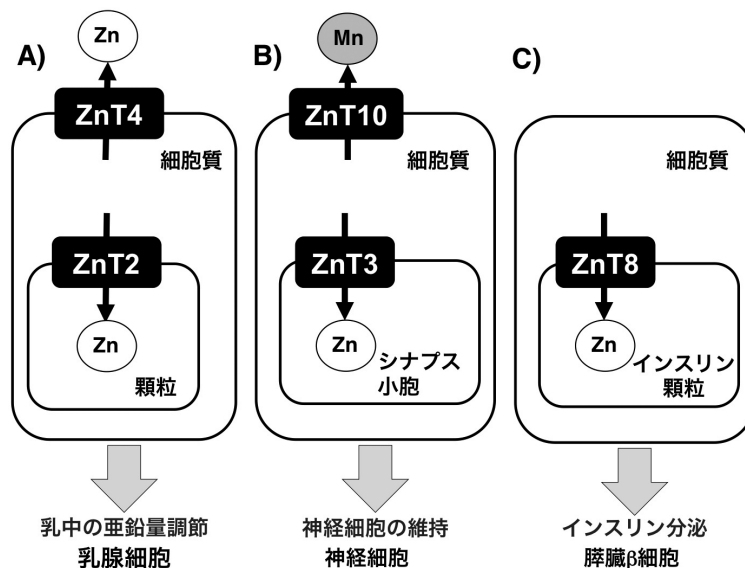


Fig. 3 Physiological functions of ZnTs.

A) ZnT2 expressed in the vesicles uptakes zinc from cytosol in the mammary gland, which modulates proper zinc content in the breast milk. ZnT4 expressed on the plasma membrane also uptakes zinc from cytosol to extracellular compartment. ZnT2 and ZnT4 mutants having lower the zinc transport ability produce low zinc content breast milk.

B) ZnT3 expressed in the synaptic vesicles uptake zinc into the vesicles. When the lack of ZnT3 function, the excess levels of intracellular zinc induce neuronal toxicity. ZnT10 expressed on the plasma membrane transport manganese contributes to the modulation of manganese accumulation in the brain. The loss of function of ZnT10 induces hypermagnesemia which showed accumulation of manganese and Alzheimer-like symptoms.

C) ZnT8 expressed on the insulin vesicles in the pancreatic β cells uptakes zinc into the vesicles which modulate proper insulin secretion from the β cells. Impairment of ZnT8 function increased peripheral insulin levels and insulin clearance in the liver, which induces the diabetes mellitus.

脳にマンガンの蓄積を示す結果が示されており、キレート剤の投与により臨床症状の改善が認められている¹³⁾。従って、ZnT10変異は、マンガンの輸送異常を伴う神経変性疾患と密接に関連し、ZnT10がパーキンソン病や若年性ジストニアに対する新たな治療標的となりうる分子であることが示唆される (Fig. 3B)。

II-2. SLC39A/ZIPファミリー

SLC39A/ZIPファミリーは、細胞外や細胞内オルガネラに存在する亜鉛イオンを細胞質に輸送することで、細胞質の亜鉛濃度を上昇させる働きを有する。これまでに、14種類のZIP分子

が同定されており、ZnTファミリーに比べて、病態メカニズムの解明に繋がる生理機能解析が進んでいると言える (Table 2)。ZIPファミリーの遺伝子改変マウスの解析からは、非常にユニークな表現型が認められ、それぞれのZIP分子が特徴的な生理機能を有していることが明らかとなりつつある。本項目では、我々を含む複数の研究グループにより、比較的研究が先行している、ZIP7, ZIP10, ZIP13, ZIP14について以下に概説する。

i) ZIP7

ZIP7は、ゴルジ体およびERに局在し、細胞内の亜鉛レベルを調節することで、ヒト上皮成長因子受容体ファミリーのHER2やEGFR、インスリン様成長因子受容体 IGF1Rなど、チロシンキナーゼ受容体のシグナル伝達経路を制御している¹⁴⁾。ZIP7は、乳癌細胞に発現していることが報告されており、ZIP7のシグナルが、がん細胞の増殖や転移と関連する可能性が示唆される¹⁵⁾。従って、ZIP7はERストレスの制御を介して、組織の発達や維持などに関与する機能性タンパク質として機能していると考えられる¹⁶⁾。

i-a) ZIP7の腸上皮恒常性における役割

腸管上皮細胞特異的に*Zip7*遺伝子を欠損した腸管特異的*Zip7*KO (*Zip7-cKO*) マウスの解析から¹⁷⁾、腸管上皮前駆細胞におけるERストレスの上昇と、上皮細胞および腸幹細胞の減少が認められた。また、ERストレスの上昇は、アポトーシスの誘導と、腸管の上皮増殖層の喪失を生じ、生後1週間以内に死に至ることが示された。ERストレスが過剰に生じると、異常なタンパク質の形成と蓄積、それに伴うシグナルの活性化が腸管細胞のアポトーシス誘導に繋がるということが報告されている¹⁶⁾。

i-b) ZIP7の皮膚形成における役割

皮膚の異常は、亜鉛欠乏状態で現れる症状の一つとして知られているが²⁾、その分子機構は十分に解明されていなかった。そこで、結合組織特異的*Zip7-cKO*マウスを作製して解析を行ったところ、真皮や毛包の形成異常を示した¹⁸⁾。ヒト間葉系幹細胞において、ZIP7の発現抑制に伴う遺伝子発現プロファイルの変化を解析したところ、ERストレスに対する遺伝子群の上昇と、細胞周期や分化過程に関連する遺伝子群の減少が確認された。実際に、ZIP7発現を抑制した間葉系幹細胞のERでは、タンパク質の品質管理に重要なプロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) の活性が低下したことから、ZIP7がER内の亜鉛レベルの調節とER機能の維持に寄与することが示された (Fig. 4A)¹⁸⁾。

従って、ZIP7により維持される亜鉛ホメオスタシスは、ERストレスを制御し、腸管上皮の増殖や皮膚形成に関与すること、またZIP7は、ER機能の不全に起因するヒトの疾患の治療に

応用可能であることが示唆される。

ii) ZIP10

ZIP10は、後述のZIP14と同様に細胞膜に局在し、細胞表面の亜鉛インポーターとして機能する¹⁹⁾。ZIP10は、ZIP6と複合体を形成することで機能し²⁰⁾、乳癌細胞および腎癌細胞におけるグリコーゲン合成酵素キナーゼ (GSK-3) 等を制御し、上皮間葉転換 (EMT) を制御する^{20), 21)}。免疫応答との関連では、マクロファージ特異的*Zip10*遺伝子欠損マウスの解析から、敗血症モデルにおける死亡率の減少と、マクロファージの減少が報告されている²²⁾。また、後述の通りB細胞の分化成熟における役割^{19), 23)}、皮膚形成に対する役割がそれぞれ報告されている。

ii-a) ZIP10のBリンパ球の分化成熟における役割

亜鉛の欠乏は、リンパ球減少症や細胞性・体液性免疫の減弱をもたらすが^{2), 4)} その分子メカニズムについては殆ど知られていなかった。免疫細胞におけるZIP10の発現を解析すると、特にプロB細胞における発現が認められた^{19), 23)}。B細胞特異的*Zip10-KO*マウス (*Zip10-cKO*) の解析からは、プロB細胞における*Zip10*欠損が、カスパーゼ活性と、アポトーシスの増加をもたらすことが示された。さらに、B細胞において、ZIP10がCD45を介してB細胞受容体 (BCR) シグナルを抑制し、細胞増殖を調節することが明らかとなった。一方、B細胞におけるZIP 10の欠損は、BCRシグナルの異常な活性化が惹起され、細胞増殖と抗体産生能の低下をもたらすことを示した (Fig. 5A)。

サイトカイン刺激は、JAK-STATシグナルを介してプロB細胞を制御することが知られている。すなわち、これらの知見は、ZIP10がB細胞のホメオスタシスおよび機能に不可欠であり、「JAK - STAT-ZIP10-Znシグナル伝達軸」の存在とその重要性を示唆するものである^{19), 23)}。

ii-b) ZIP10の表皮の形成と維持における役割

ZIP10は表皮形成に必須であることが報告されている²⁴⁾。そこで、上皮組織特異的*Zip10-cKO*マウスを作製して、解析を行ったところ、重層上皮形成の異常と毛包の減少を認めた。さらに、表皮の恒常性維持に重要であり、分子内に亜鉛結合部位を含むことが知られているp63

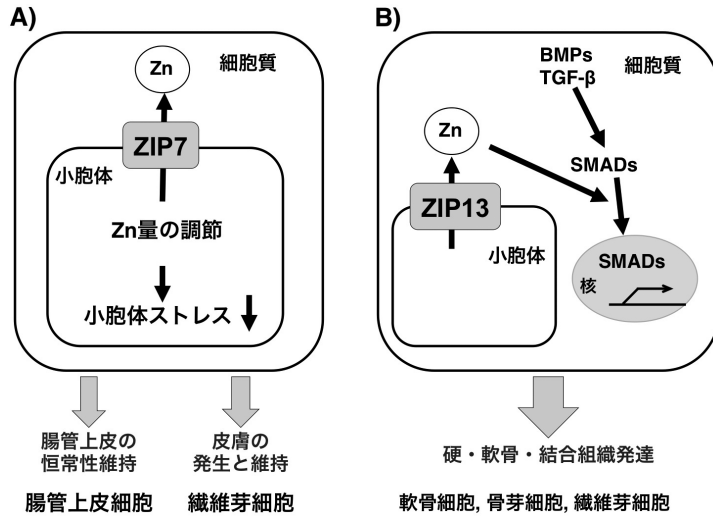


Fig. 4 Physiological function of ZIP7 and ZIP13.

A) ZIP7 which expressed on the ER and regulates zinc content in the intestine, modulates the turnover cycle of epithelial intestinal cells.
 B) ZIP13 regulates the development of hard, cartilage, and connective tissues. ZIP13-mediated Zn modulates BMP/TGF- β -induced SMAD translocation into the nucleus.

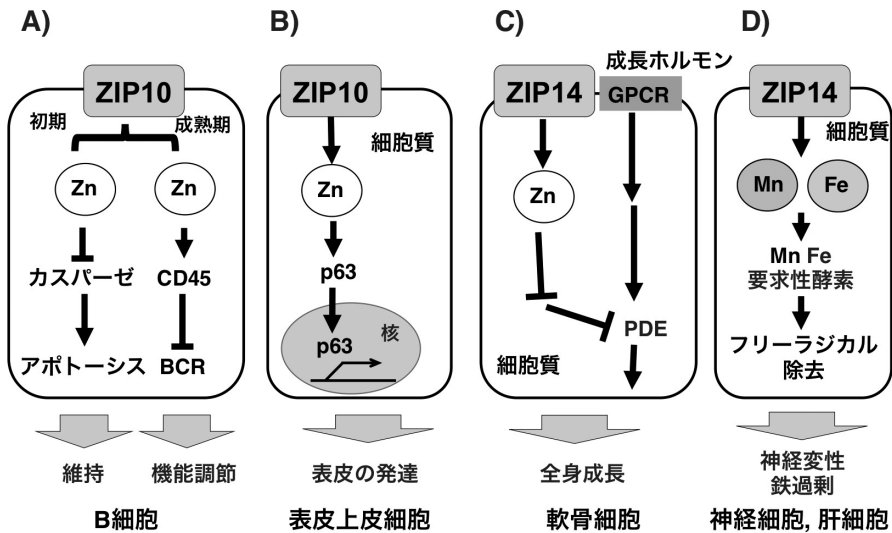


Fig. 5 Physiological function of ZIP10.

A) ZIP10 regulates B cells proliferation via the regulation of caspase, and function through the modulation of CD45-mediated BCR signal.
 B) ZIP10 regulate skin development and hair follicle formation via ZIP10-Zn-p63 pathway.
 C) ZIP14 signal interfere with the growth hormone receptor signal that is one of the typical GPCR signal pathway. ZIP14 signal regulates the systemic growth.
 D) ZIP14 not only transport Zn but also manganese and iron ion. Manganese and iron suggested to act as the activators of enzymes eliminating free radicals. Dysfunction of ZIP14 showed high manganemia concomitant with the child onset Parkinsonism.

タンパク質の機能とZIP10が関連していることが明らかにされた。すなわち、ZIP10を介する亜鉛シグナルがp63タンパク質の機能を制御することで、表皮の発生や維持に重要な役割を担っていることが示された (Fig. 5B)²⁴⁾。

以上より、表皮と毛包に局在するZIP10が新たな治療標的となることを示唆するものである。

iii) ZIP13

ZIP13は、上述のZIP7と同様に、主に細胞内オルガネラに局在し、細胞質亜鉛を上昇させる亜鉛のインポーターである。ZIP13のシグナル伝達経路として、骨形成因子 (BMP) /腫瘍細胞増殖因子 β (TGF- β) を介した転写因子 Smadの核への局在に関与していることが報告されている²⁵⁾。ZIP13の生理機能については、Zip13-KOマウスならびに機能喪失型ZIP13のキャリアにおいて、骨、歯、結合組織の発達および全身成長に対する障害が認められている (Fig. 4B)²⁶⁾。また、エネルギー代謝との関係では、Zip13-KOマウスでは、白色脂肪のベージュ脂肪細胞への変換が促進されており、機能喪失型ZIP13のキャリアでは、白色脂肪細胞の萎縮が認められている。従って、ZIP13がエネルギー代謝にも重要な役割を担っていることが示唆されている²⁷⁾。ZIP13の変異により生じる病態メカニズムを以下に紹介する。

iii-a) ZIP13の病原性変異タンパク質の同定と分子機構

ZIPファミリーメンバーに関連する遺伝病が最初に同定されたのは、2002年のZIP4変異による先天性の亜鉛欠乏症から生じる腸性肢端皮膚炎 (acrodermatitis enteropathica: AE) である²⁸⁾。その後2008年に、Zip13-KOマウスの解析から、ZIP13欠損により結合組織の発生や成長に異常が生じることが発見された²⁹⁾。さらに興味深いことに、ヒト遺伝性疾患である脊椎手掌異形成型Ehlers-Danlos症候群 (Ehlers-Danlos syndrome spondylodysplastic type 3; EDSSPD3³⁰⁾, (別名: SCD-EDS)) において、変異型ZIP13が病態の一端を担う可能性が示された²⁶⁾。EDSSPD3はZIP13遺伝子のホモ接合型機能喪失変異に起因し、ZIP13タンパク質の一塩基多型 (SNP) と、3アミノ酸欠損型変異により生じることが同定

された²⁹⁾。変異型ZIP13タンパク質は不安定なため、ユビキチン-プロテアソーム経路によって容易に分解され、亜鉛恒常性の破綻を招くことが示唆されている²⁹⁾。

以上のことから、ZIP13はヒト疾患と密接に関与する病態関連遺伝子であり、より詳細な分子メカニズムの解明と共に治療に向けた研究へと展開が期待される。

iv) ZIP14

ZIP14は、原形質膜およびエンドソームに局在し、小腸、肝臓、脾臓および心臓に発現している^{31),32)}。またZIP14は、結腸癌、直腸癌、肝細胞癌など様々ながん組織において高発現している³³⁾。ZIP14は、ホスホジエステラーゼ (PDE) 活性を抑制し、Gタンパク質共役型受容体シグナルのシグナル伝達を調節することが報告されている (Fig. 5C)³²⁾。Zip14-KOマウスの解析からは、代謝性内毒素血症、炎症応答、腸バリア機能、ならびにグルコース代謝やERストレスへの関与が示唆されている³⁴⁾。さらに、以下に示す様に、ZIP14は鉄やマンガンを輸送する金属イオン輸送体としても機能し、疾患メカニズムを制御することが報告されている (Fig. 5D)^{35)~37)}。

iv-a) ZIP14の鉄代謝異常症における役割

鉄は細胞内の重要な代謝プロセスに重要であるが、過剰な鉄は、細胞に毒性を示す。遺伝性ヘモクロマトーシスなどの鉄過剰症では、肝硬変、糖尿病、心不全のリスクが上昇する³⁸⁾。Zip14-KOマウスの解析では、肝細胞において、鉄の取り込み減少が認められ、Zip14-KOマウスを遺伝性ヘモクロマトーシスのモデルに適用したところ、ZIP14の欠損により、肝臓における鉄の過剰蓄積が大幅に減少し、肝細胞における鉄沈着を抑制できる可能性が示された。これらの知見は、ZIP14が肝細胞への非結合鉄の取り込みに必要であることを示唆している (Fig. 5D)³⁸⁾。

iv-b) ZIP14の高マンガ血症とアルツハイマー様脳症における役割

ZIP14は、亜鉛及び鉄に加えて、マンガンを輸送することが報告されている^{36),39)}。ヒトにおいて、ZIP14のMn輸送能が低下すると、小児期の脳神経の変性もしくは高マンガ血症を伴う

パーキンソン様ジストニアと同様の症状を引き起こすことが報告されている (Fig. 5D)⁴⁰⁾。Zip14-KOマウスの解析からは、肝臓におけるマンガンの減少と、抹消血、脳、骨におけるマンガンの上昇が認められ、運動障害を伴うことが示されている⁴¹⁾。

上記の知見から、ZIP14と疾患メカニズムとの密接な関わりが明らかとなったことから、ZIP14が疾患治療標的として有用であると考えられる。しかしながら、依然として脳やがん細胞におけるZIP14の分子メカニズムには不明な点が多く、詳細な解析から新たな分子ネットワークや病態メカニズムとの関係の解明が期待される。

Ⅲ. 亜鉛の検出法の概要

生物由来試料や生体内の亜鉛量を評価するための様々な測定法が、亜鉛や亜鉛トランスポーターの生理学的な役割、また病態メカニズムとの関係を解明するための評価ツールの一つとして開発され、臨床領域と基礎研究領域の双方で利用されている。

Ⅲ-1. 臨床領域における亜鉛測定法

血清や尿中亜鉛値の測定などを目的として、原子吸光法や用手法による測定が実施されている。しかし、これらの測定法の課題として、特別な測定装置を必要とすることや、比較的多量のサンプルが必要なこと、また操作手順が煩雑なことなどが挙げられており、臨床における亜鉛値の測定が十分に普及していない理由の一つとなっている⁴²⁾。

他方、2005年に対外診断用医薬品の製造販売承認を受けたアキュラスオートZn (シノテスト社) は、生化学自動分析装置による測定に対応した亜鉛測定用試薬であり、既存法である原子吸光法による測定と高い相関性を維持していることが報告されている⁴³⁾。今後は、より簡便で正確性の高い測定方法が開発されることで、亜鉛や亜鉛値に関する臨床情報の蓄積がより一層促進することが期待される。

Ⅲ-2. 基礎研究領域における亜鉛測定法

血清や尿中の亜鉛値に加えて、組織や細胞内における亜鉛値の評価を目的とした様々な測定法が開発されている。

直接的な亜鉛量の測定法として、原始吸光法、誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS)、さらに放射性同位元素⁶⁵Znなどが用いられている。

間接的な亜鉛量の測定法として、亜鉛と錯体を形成することで特定の波長の蛍光を発する比色定量試薬が開発されている。Zinquin (同人化学社)、FluoZin-3AM, Newport Green (Thermo Scientific社)、Zn-AF2 (五陵化薬社) は、膜透過性を有し、細胞内で亜鉛と錯体を形成することで蛍光を発する化合物であり、蛍光強度から半定量的に細胞内亜鉛量を評価することが可能である^{44), 45)}。また、オルガネラ移行タンパク質と亜鉛結合能を有する蛍光タンパク質の融合タンパク質のcDNA配列がコードされたプラスミドDNAである*pER-eZinCh* (Addgene社) は、細胞内に導入後にER特異的な亜鉛量の変化を検出できるツールとして報告されている⁴⁶⁾。

後述の亜鉛トランスポーターに関する研究においても、目的に応じて本項目で紹介した手法がそれぞれ利用されており、細胞内や細胞内オルガネラの亜鉛レベルから、亜鉛や亜鉛トランスポーターの生理機能と病態メカニズムとの関連を解明するための重要なツールとなっている。

Ⅳ. まとめ

これまでの亜鉛トランスポーターに関する研究から、それぞれの亜鉛トランスポーターが、特徴的な発現様式を示し、種々の生理応答を制御することが示され、上述の通り、ヒト疾患の発症や病態メカニズムと密接に関係していることが報告されつつある (Fig. 6)。しかしながら、亜鉛トランスポーターの機能を制御する低分子化合物はこれまでに報告されておらず、創薬シーズとしての新規化合物の同定がさらなる亜鉛トランスポーターの研究に必要不可欠と考える。また、亜鉛シグナルの直接的に標的分子についても、不明な点が多く輸送された亜鉛との相互作用や亜鉛トランスポーターそのものとの相互作用する分子など様々な観点からの解析が必要であろう。

最後に、亜鉛研究に関する学会について紹介致します。国内学会としては、亜鉛栄養治療研究会 (Japanese Society for Zinc Nutritional

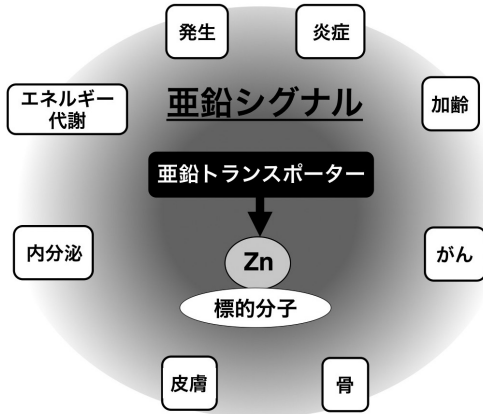


Fig. 6 Summary of Zn signal axis in physiological and pathophysiological processes.

Zinc transporter mediated signal pathways “Zinc signal” regulates various physiological processes. Those cellular processes might be linked to the disease mechanisms. Therefore, although it still remains unclear about precise molecular mechanisms of zinc signal, it would become promising therapeutic targets.

Therapy: JZNT) により、年に2回の学術集会が開催され、基礎から臨床まで「亜鉛」に関わる幅広い研究に関する情報交換が行われています。国際学会としては、国際亜鉛生物学会 (International Society for Zinc Biology: ISZB) が、隔年で学術集会を開催しており、2019年は京都 (大会長: 徳島文理大学薬学部 深田俊幸) での開催を予定しております。亜鉛研究のさらなる発展のために、様々な分野からのご参加をお待ちしております。

文献

- 1) Prasad AS, Miale A, Farid Z, Sandstead HH, Schuler AR: Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism, and hypogonadism. *J Lab Clin Med*, 61: 537-49, 1963.
- 2) Hara T, Takeda TA, Takagishi T, Fukue K, Kambe T, Fukada T. Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *J Physiol Sci*, 67: 283-301, 2017.
- 3) Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A: Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res*, 5: 196-201, 2006.

- 4) Takagishi T, Hara T, Fukada T: Recent Advances in the Role of SLC39A/ZIP Zinc Transporters In Vivo. *Int J Mol Sci*, 18: 2708, 2017.
- 5) Fukada T, Yamasaki S, Nishida K, Murakami M, Hirano T: Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. *J Biol Inorg Chem*, 16: 1123-34, 2011.
- 6) Hojo S, Fukada T: Roles of Zinc Signaling in the Immune System. *J. Immunol. Res.*, 2016: 6762343, 2016.
- 7) Itsumura N, Kibihara Y, Fukue K, Miyata A, Fukushima K, Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Nishito Y, Ishida R, Narita H, Kodama H, Kambe T: Novel mutations in SLC30A2 involved in the pathogenesis of transient neonatal zinc deficiency. *Pediatr Res*, 80: 586-594, 2016.
- 8) Hildebrand MS, Phillips AM, Mullen SA, Adlard PA, Hardies K, Damiano JA, Wimmer V, Bellows ST, McMahon JM, Burgess R, Hendrickx R, Weckhuysen S, Suls A, De Jonghe P, Scheffer IE, Petrou S, Berkovic SF, Reid CA: Loss of synaptic Zn²⁺ transporter function increases risk of febrile seizures. *Sci Rep*, 5: 17816, 2015.
- 9) Huang L, Gitschier J: A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse. *Nat Genet*, 17: 292-297, 1997.
- 10) Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshezhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*, 445: 881-885, 2007.
- 11) Tamaki M, Fujitani Y, Hara A, Uchida T, Tamura Y, Takeno K, Kawaguchi M, Watanabe T, Ogihara T, Fukunaka A, Shimizu T, Mita T, Kanazawa A, Imaizumi MO, Abe T, Kiyonari H, Hojo S, Fukada T, Kawachi T, Nagamatsu S, Hirano T, Kawamori R, Watada H. The diabetes-susceptible gene SLC30A8/ZnT8 regulates hepatic insulin clearance: *J Clin Invest*, 123: 4513-4524, 2013.
- 12) Quadri M, Federico A, Zhao T, Breedveld GJ, Battisti C, Delnooz C, Severijnen L-A, Di Toro Mammarella L, Mignarri A, Monti L, Sanna A, Lu P, Punzo F, Cossu G, Willemsen R, Rasi F, Oostra BA, van de Warrenburg BP, Bonifati V. Mutations in SLC30A10 cause parkinsonism and dystonia with hypermanganesemia, polycythemia, and chronic liver disease: *Am J Hum Genet*, 90: 467-477, 2012.
- 13) Stamelou M, Tuschl K, Chong WK, Burroughs AK,

- Mills PB, Bhatia KP, Clayton PT: Dystonia with brain manganese accumulation resulting from SLC30A10 mutations: a new treatable disorder. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc*, 27: 1317-1322, 2012.
- 14) Taylor KM, Hiscox S, Nicholson RI, Hogstrand C, Kille P: Protein kinase CK2 triggers cytosolic zinc signaling pathways by phosphorylation of zinc channel ZIP7. *Sci Signal*, 5: ra11, 2012.
 - 15) Hogstrand C, Kille P, Nicholson RI, Taylor KM: Zinc transporters and cancer: a potential role for ZIP7 as a hub for tyrosine kinase activation. *Trends Mol Med*, 15: 101-111, 2009.
 - 16) Heijmans J, van Lidth de Jeude JF, Koo B-K, Rosekrans SL, Wielenga MCB, van de Wetering M, Ferrante M, Lee AS, Onderwater JJM, Paton JC, Paton AW, Mommaas AM, Kodach LL, Hardwick JC, Hommes DW, Clevers H, Muncan V, van den Brink GR: ER stress causes rapid loss of intestinal epithelial stemness through activation of the unfolded protein response. *Cell Rep*, 3: 1128-1139, 2013.
 - 17) Ohashi W, Kimura S, Iwanaga T, Furusawa Y, Irié T, Izumi H, Watanabe T, Hijikata A, Hara T, Ohara O, Koseki H, Sato T, Robine S, Mori H, Hattori Y, Watarai H, Mishima K, Ohno H, Hase K, Fukada T: Zinc Transporter SLC39A7/ZIP7 Promotes Intestinal Epithelial Self-Renewal by Resolving ER Stress. *PLoS Genet*, 12: e1006349, 2016.
 - 18) Bin BH, Bhin J, Seo J, Kim SY, Lee E, Park K, Choi DH, Takagishi T, Hara T, Hwang D, Koseki H, Asada Y, Shimoda S, Mishima K, Fukada T: Requirement of Zinc Transporter SLC39A7/ZIP7 for Dermal Development to Fine-Tune Endoplasmic Reticulum Function by Regulating Protein Disulfide Isomerase. *J Invest Dermatol*, 137: 1682-1691, 2017.
 - 19) Miyai T, Hojyo S, Ikawa T, Kawamura M, Irié T, Ogura H, Hijikata A, Bin B-H, Yasuda T, Kitamura H, Nakayama M, Ohara O, Yoshida H, Koseki H, Mishima K, Fukada T: Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 facilitates antiapoptotic signaling during early B-cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 11780-11785, 2014.
 - 20) Taylor KM, Muraina IA, Brethour D, Schmitt-Ulms G, Nimmanon T, Ziliotto S, Kille P, Hogstrand C: Zinc transporter ZIP10 forms a heteromer with ZIP6 which regulates embryonic development and cell migration. *Biochem J*, 473: 2531-44, 2016.
 - 21) Pal D, Sharma U, Singh SK, Prasad R: Association between ZIP10 gene expression and tumor aggressiveness in renal cell carcinoma *Gene*, 552: 195-198, 2014.
 - 22) Gao H, Zhao L, Wang H, Xie E, Wang X, Wu Q, Yu Y, He X, Ji H, Rink L, Min J, Wang F: Metal transporter Slc39a10 regulates susceptibility to inflammatory stimuli by controlling macrophage survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: 12940-12945, 2017.
 - 23) Hojyo S, Miyai T, Fujishiro H, Kawamura M, Yasuda T, Hijikata A, Bin B-H, Irié T, Tanaka J, Atsumi T, Murakami M, Nakayama M, Ohara O, Himeno S, Yoshida H, Koseki H, Ikawa T, Mishima K, Fukada T: Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 controls humoral immunity by modulating B-cell receptor signal strength. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 11786-11791, 2014.
 - 24) Bin BH, Bhin J, Takaishi M, Toyoshima KE, Kawamata S, Ito K, Hara T, Watanabe T, Irie T, Takagishi T, Lee SH, Jung HS, Rho S, Seo J, Choi DH, Hwang D, Koseki H, Ohara O, Sano S, Tsuji T, Mishima K, Fukada T: Requirement of zinc transporter ZIP10 for epidermal development: Implication of the ZIP10-p63 axis in epithelial homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: 12243-12248, 2017.
 - 25) Fukada T, Civic N, Furuichi T, Shimoda S, Mishima K, Higashiyama H, Idaira Y, Asada Y, Kitamura H, Yamasaki S, Hojyo S, Nakayama M, Ohara O, Koseki H, Dos Santos HG, Bonafe L, Ha-Vinh R, Zankl A, Unger S, Kraenzlin ME, Beckmann JS, Saito I, Rivolta C, Ikegawa S, Superti-Furga A, Hirano T: The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective tissue development; its involvement in BMP/TGF-beta signaling pathways. *PLoS One*, 3: e3642, 2008.
 - 26) Bin B-H, Fukada T, Hosaka T, Yamasaki S, Ohashi W, Hojyo S, Miyai T, Nishida K, Yokoyama S, Hirano T: Biochemical characterization of human ZIP13 protein: a homo-dimerized zinc transporter involved in the spondylocheiro dysplastic Ehlers-Danlos syndrome. *J Biol Chem*, 286: 40255-40265, 2011.
 - 27) Fukunaka A, Fukada T, Bhin J, Suzuki L, Tsuzuki T, Takamine Y, Bin BH, Yoshihara T, Ichinoseki-Sekine N, Naito H, Miyatsuka T, Takamiya S, Sasaki T, Inagaki T, Kitamura T, Kajimura S, Watada H, Fujitani Y: Zinc transporter ZIP13 suppresses beige adipocyte biogenesis and energy expenditure by regulating C/EBP-beta expression. *PLoS Genet*, 13: e1006950, 2017.
 - 28) Bin BH, Bhin J, Kim NH, Lee SH, Jung HS, Seo J, Kim DK, Hwang D, Fukada T, Lee AY, Lee TR, Cho EG: An Acrodermatitis Enteropathica-Associated Zn Transporter, ZIP4, Regulates Human Epidermal Homeostasis. *J Invest Dermatol*, 137: 874-883, 2017.

- 29) Bin B-H, Hojyo S, Hosaka T, Bhin J, Kano H, Miyai T, Ikeda M, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Cho E-G, Fukue K, Kambe T, Ohashi W, Kim K-H, Seo J, Choi D-H, Nam Y-J, Hwang D, Fukunaka A, Fujitani Y, Yokoyama S, Superti-Furga A, Ikegawa S, Lee TR, Fukada T: Molecular pathogenesis of spondylocheiro-dysplastic Ehlers-Danlos syndrome caused by mutant ZIP13 proteins. *EMBO Mol Med*, 6: 1028-1042, 2014.
- 30) Malfait F, Francomano C, Byers P, Belmont J, Berglund B, Black J, Bloom L, Bowen JM, Brady AF, Burrows NP, Castori M, Cohen H, Colombi M, Demirdas S, De Backer J, De Paepe A, Fournel-Gigleux S, Frank M, Ghali N, Giunta C, Grahame R, Hakim A, Jeunemaitre X, Johnson D, Juul-Kristensen B, Kapferer-Seebacher I, Kazkaz H, Kosho T, Lavallee ME, Levy H, Mendoza-Londono R, Pepin M, Pope FM, Reinstein E, Robert L, Rohrbach M, Sanders L, Sobey GJ, Van Damme T, Vandersteen A, van Mourik C, Voermans N, Wheelton N, Zschocke J, Tinkle B: The 2017 international classification of the Ehlers-Danlos syndromes. *Am. J. Med. Genet. C Semin Med Genet*, 175: 8-26, 2017.
- 31) Taylor KM, Morgan HE, Johnson A, Nicholson RI: Structure-function analysis of a novel member of the LIV-1 subfamily of zinc transporters, ZIP14. *FEBS Lett*, 579: 427-432, 2005.
- 32) Hojyo S, Fukada T, Shimoda S, Ohashi W, Bin B-H, Koseki H, Hirano T: The zinc transporter SLC39A14/ZIP14 controls G-protein coupled receptor-mediated signaling required for systemic growth. *PLoS One*, 6: e18059, 2011.
- 33) Xu X-M, Wang C-G, Zhu Y-D, Chen W-H, Shao S-L, Jiang F-N, Liao Q-D: Decreased expression of SLC39A14 is associated with tumor aggressiveness and biochemical recurrence of human prostate cancer. *Oncotargets Ther*, 9: 4197-4205, 2016.
- 34) Kim M-H, Aydemir TB, Kim J, Cousins RJ: Hepatic ZIP14-mediated zinc transport is required for adaptation to endoplasmic reticulum stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: E5805-E5814, 2017.
- 35) Jenkitkasemwong S, Wang CY, Coffey R, Zhang W, Chan A, Biel T, Kim JS, Hojyo S, Fukada T, Knutson MD: SLC39A14 Is Required for the Development of Hepatocellular Iron Overload in Murine Models of Hereditary Hemochromatosis. *Cell Metab*, 22: 138-50, 2015.
- 36) Xin Y, Gao H, Wang J, Qiang Y, Imam MU, Li Y, Wang J, Zhang R, Zhang H, Yu Y, Wang H, Luo H, Shi C, Xu Y, Hojyo S, Fukada T, Min J, Wang F: Manganese transporter Slc39a14 deficiency revealed its key role in maintaining manganese homeostasis in mice. *Cell Discov*, 3: 17025, 2017.
- 37) Tuschl K, Clayton PT, Gospe SM, Gulab S, Ibrahim S, Singhi P, Aulakh R, Ribeiro RT, Barsottini OG, Zaki MS, Del Rosario ML, Dyack S, Price V, Rideout A, Gordon K, Wevers RA, Chong WKK, Mills PB: Syndrome of hepatic cirrhosis, dystonia, polycythemia, and hypermanganesemia caused by mutations in SLC30A10, a manganese transporter in man. *Am J Hum Genet*, 90: 457-466, 2012.
- 38) Pietrangelo A: Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology*, 139: 393-408, 2010.
- 39) Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H, Knutson MD, Cousins RJ: Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 13612-7, 2006.
- 40) Tuschl K, Meyer E, Valdivia LE, Zhao N, Dadswell C, Abdul-Sada A, Hung CY, Simpson MA, Chong WK, Jacques TS, Woltjer RL, Eaton S, Gregory A, Sanford L, Kara E, Houlden H, Cuno SM, Prokisch H, Valletta L, Tiranti V, Younis R, Maher ER, Spencer J, Straatman-Iwanowska A, Gissen P, Selim LA, Pintos-Morell G, Coroleu-Lletget W, Mohammad SS, Yoganathan S, Dale RC, Thomas M, Rihel J, Bodamer OA, Enns CA, Hayflick SJ, Clayton PT, Mills PB, Kurian MA, Wilson SW: Mutations in SLC39A14 disrupt manganese homeostasis and cause childhood-onset parkinsonism-dystonia. *Nat Commun*, 7: 11601, 2016.
- 41) Jenkitkasemwong S, Akinyode A, Paulus E, Weiskirchen R, Hojyo S, Fukada T, Giraldo G, Schrier J, Garcia A, Janus C, Giasson B, Knutson MD: SLC39A14 deficiency alters manganese homeostasis and excretion resulting in brain manganese accumulation and motor deficits in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. In press.
- 42) 一般社団法人 日本臨床栄養学会編; 児玉浩子他: 亜鉛欠乏症の治療指針2016. 2017.
- 43) Higurashi K. "ACCURAS AUTO Zn", *Colorimetric reagent for zinc. Biomed Res Trace Elem*, 26: 7-9, 2015.
- 44) Karim MR, Petering DH: Newport Green, a fluorescent sensor of weakly bound cellular Zn(2+): competition with proteome for Zn(2). *Met. Integr. Biometal Sci.*, 8: 201-210, 2016.
- 45) Figueroa JAL, Vignesh KS, Deepe GS, Caruso J: Selectivity and specificity of small molecule fluorescent dyes/probes used for the detection of Zn2+ and Ca2+

- in cells. *Met Integr Biometal Sci*, 6: 301-315, 2014.
- 46) Chabosseau P, Tuncay E, Meur G, Bellomo EA, Hessesels A, Hughes S, Johnson PRV, Bugliani M, Marchetti P, Turan B, Lyon AR, Merckx M, Rutter GA. Mitochondrial and ER-targeted eCALWY probes reveal high levels of free Zn²⁺. *ACS Chem Biol*, 9: 2111-2120, 2014.