

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成31年4月10日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 立命館大学生命科学部生命医科学科  
職 名 教授  
研究代表者 白壁 恭子

下記のとおり平成30年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 17020 )

1. 共同研究課題名	亜鉛トランスポーターのプロセッシングを介した炎症反応制御機構の解明		
2. 共同研究目的	生命維持に必須の微量元素である亜鉛は、タンパク質の構造維持に寄与するだけでなく、セカンドメッセンジャーとしてシグナル伝達にも関わる。我々は、炎症反応時のマクロファージにおいて、亜鉛トランスポーター-ZIP6 のプロセッシングと細胞内亜鉛濃度の変化が同時に起こることを既に明らかにしている。そこで本研究では、ZIP6 のプロセッシングが亜鉛シグナルの起点となる可能性を検証することを目的とする。本研究には様々な生活習慣病の基盤となる炎症反応の理解を深めるという意義がある。		
3. 共同研究期間	平成30年 4月 1日 ~ 平成31年 3月31日		
4. 共同研究組織			
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担
(研究代表者) 白壁 恭子	立命館大学生命科学部	教授	研究の計画および遂行
(分担研究者) 大村 卓也	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科	大学院生	細胞内亜鉛濃度測定に関わる実験・解析
5. 群馬大学生体調節研究所の共同研究担当教員	分野名	分子糖代謝制御分野	氏 名 福中 彩子

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

## 6. 共同研究計画

申請代表者は、炎症反応時のマクロファージからプロセッシングを介して放出されるタンパク質をスクリーニングすることで、亜鉛トランスポーター-ZIP6 を同定した。亜鉛が免疫反応に必要であることは古くから知られているので、炎症反応と亜鉛との関係についてさらに解析を進めてみたところ、マクロファージ細胞内の亜鉛濃度が炎症反応時に変化することを示唆する結果を得ている。そこで本研究ではZIP6のプロセッシングがマクロファージでの亜鉛シグナルの起点となる可能性を検証する。

まず ZIP6 のプロセッシングで生じる2つのタンパク質のうち、膜に残る C 末側のタンパク質を大量精製し、その N 末端アミノ酸配列をエドマン法で決定することで、ZIP6 のプロセッシング切断部位を同定する。切断部位情報をもとに細胞外領域を欠失した ZIP6 変異体を発現するプラスミドを構築する。野生型と細胞外領域欠失の ZIP6 をそれぞれ強制発現させた細胞の抽出液を非還元状態でアクリルアミドゲル電気泳動することで、これらの二量体形成能を検証し、プロセッシングにより ZIP6 が二量体から単量体へと変換する可能性を検証する。野生型と細胞外領域欠失の ZIP6 をそれぞれ強制発現した細胞の細胞内亜鉛濃度を、FRET センサーと細胞内メッセンジャー測定装置を用いて測定し、プロセッシングにより ZIP6 の亜鉛輸送能が上昇するか低下するか明らかにする。またプロセッシング切断部位にアミノ酸置換を導入したプロセッシング耐性 ZIP6 を作製し、マクロファージ細胞に強制発現したときに炎症性サイトカインの放出量が変化するか検討することで、ZIP6 のプロセッシングを起点とした亜鉛シグナルが炎症反応の惹起に寄与する可能性を検証する。

## 7. 共同研究の成果

細胞内亜鉛濃度と強く相関する MT-1 遺伝子の発現量を調べた所、グラム陰性菌の細胞壁成分でマクロファージ細胞を刺激すると、1時間後に減少する傾向があることがわかった。この結果は炎症反応時に起こる ZIP6 のプロセッシングが細胞内亜鉛濃度の低下につながっている可能性を示唆していた。そこで ZIP6 のプロセッシング部位を同定するために、C 末側のタンパク質の大量精製を試みたが、アミノ酸配列決定に必要な量を得ることはできなかった。これまで一回膜貫通型のタンパク質についてはアミノ酸配列決定に必要な量を得ることができていたが、ZIP6 のような複数回膜貫通型のタンパク質を大量に調整するためには、より多くのタンパク質を発現できるような系を構築する必要があると考えている。次に非還元状態でのアクリルアミドゲル電気泳動を行い、ZIP6 が二量体を形成しているか検討したところ、二量体よりも多い数の ZIP6 分子が複合体を形成していることを示唆する結果を得た。現在この複合体形成がプロセッシングの有無によって変化するか明らかにするために実験を進めている。プロセッシング部位の同定は予想通りに進まなかったが、ZIP6 が大きな複合体を形成するという新しい情報を得ることができた。

## 8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

① 本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文  
該当しません

②この共同研究に基づくとの記載のある論文  
該当しません