

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

令和3年4月9日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 徳島文理大学 薬学部 病態分子薬理学
職 名 教授
研究代表者 深田 俊幸

下記のとおり令和2年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号:18010)

1. 共同研究課題名	骨格筋の形成と萎縮における亜鉛シグナルの役割解明 -亜鉛シグナルの制御による創薬と再生医療を目指して-			
2. 共同研究目的	本研究は、「亜鉛シグナルが骨格筋においてどのような役割を演じているのか」について解明し、亜鉛シグナルの制御による創薬と再生医療を研究するものである。2020年度採択課題では、亜鉛トランスポーターZIP13とZIP14を介する亜鉛シグナルの筋形成における相反する役割に着目し、骨格筋の形成と再生における亜鉛シグナルの分子機序を解明することを目的として共同研究を開始した。具体的には、各分子のプロモーター下流にGFP配列をノックインしたマウスと患者由来iPS細胞を用いて、各亜鉛トランスポーターの骨格筋における役割を解析した。			
3. 共同研究期間	令和2年4月1日 ~ 令和3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) 深田 俊幸	徳島文理大学薬学部 病態分子薬理学研究室	職名:教授 学位:博士(医学) 取得年月日:1998.3	研究の総括と指導	
(分担研究者) 原 貴史	徳島文理大学薬学部 病態分子薬理学研究室	職名:講師 学位:博士(薬学) 取得年月日:2009.3	骨格筋の分化と機能の解析	
葛原 隆	徳島文理大学薬学部 生化学教室	職名:教授 学位:博士(薬学) 取得年月日:2004.9	iPS細胞関連実験	
庄司 正樹	徳島文理大学薬学部 生化学教室	職名:講師 学位:博士(薬学) 取得年月日:2012.3	iPS細胞関連実験	
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	氏名	藤谷 与士夫

※ 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

ZIP13 の亜鉛シグナルの役割の解明

ZIP13 の亜鉛シグナルがどのように骨格筋の恒常性に関わるのか、その役割と分子機序は未解明である。そこで、*Zip13* 遺伝子をノックダウン(*Zip13*-KD)したマウス筋芽細胞株 C2C12 と、EDSSPD3 患者に由来する線維芽細胞から樹立した iPS 細胞株を用いて、骨格筋細胞の分化と機能における ZIP13 の亜鉛シグナルの作用点を同定する。具体的には、上述の細胞株に筋分化誘導系を適用し、*Zip13* の機能喪失で生じる遺伝子発現の変化を解析する。さらに、*EGFP-IRES-CreERT2* 遺伝子カセットを *Zip13* プロモーター下流にノックイン(KI)した *Zip13*-GFP-KI マウスを作成し、当該マウスと *td-Tomato*-KI マウスを交配して、*Zip13*-GFP/*Tomato*-KI マウスを作成する。本マウスを細胞系譜解析することで、骨格筋形成における ZIP13 発現細胞の発生から分化までの系譜を解明する。

Zip13 遺伝子 floxed (*Zip13^{flax}*) マウスを *MyoD*-Cre マウスと交配して作成した骨格筋特異的 *Zip13* 欠損マウス (*Zip13^{MyoD}-cKO*) の個体レベルの表現型を解析して、骨格筋における ZIP13 の生理的役割を精査する。具体的には、*Zip13^{MyoD}-cKO* マウスを貴研究所の設備である呼吸代謝モニタリングシステムや自発運動量測定装置、摂食飲水行動解析システムを用いて精査し、ZIP13 の亜鉛シグナルを介した脂肪-骨格筋間の相互関連を究明する。同時に、*Zip13^{MyoD}-cKO* マウスの糖代謝とエネルギー代謝(酸素消費量や locomoter activity : 活動量)を評価する。

ZIP14 の亜鉛シグナルの役割の解明

申請者は、ZIP14 の亜鉛シグナルが骨格筋の萎縮をもたらして、がん悪液質の発症に関わることを見出した。この結果は、骨格筋の萎縮における ZIP14 の促進的な役割を示すものであるが、その詳細な分子機序は不明である。そこで、*Zip14* 遺伝子を誘導的に発現する HEK293 細胞株を適用して、ZIP14 の発現上昇で生じる遺伝子発現の変化を RNA-sequence で解析する。さらに上記の細胞に Zn^{2+} -conditional proteomics 法を適用して、筋萎縮に関わる ZIP14 の亜鉛シグナル伝達経路を構成する分子群を同定する。さらに、*EGFP-IRES-CreERT2* 遺伝子カセットを *Zip14* プロモーター下流に挿入した *Zip14*-GFP-KI マウスを用いて、骨格筋の萎縮過程における ZIP14 発現細胞の役割とその運命系譜について解明する。

7. 共同研究の成果

ZIP13 の亜鉛シグナルの役割の解明

Zip13-KD C2C12 細胞において、糖の取り込み能の低下が確認された。EDSSPD3 患者に由来する線維芽細胞から樹立した iPS 細胞株から分化させた骨格筋細胞で精査した結果、患者由来 iPS 細胞株から分化させた骨格筋細胞においても糖取り込み能の低下を確認した。そこで、これらの細胞における糖輸送体 GLUT4 の発現を精査した結果、両者において *Glut4* 遺伝子の顕著な減少が確認された。すなわち、ZIP13 は GLUT4 の発現を介して、骨格筋細胞の糖代謝に関与する可能性が示唆された。*Zip13*-KD C2C12 細胞を用いてインスリン誘導性の糖取り込み能を検討した結果、*Zip13*-KD C2C12 細胞では対照細胞と比較して糖取り込み能が優位に低下した。インスリン刺激を介する応答性の低下が示唆されたため、*Zip13^{MyoD}-cKO* マウスを用いてインスリン抵抗性を解析した。その結果、*Zip13^{MyoD}-cKO* マウスでは、インスリンに対する応答の顕著な低下が確認された。さらに、本マウスを用いて活動量と酸素消費量を解析した結果、*Zip13^{MyoD}-cKO* マウスの活動量と酸素消費量の顕著な低下を確認した。すなわち、*Zip13^{MyoD}-cKO* マウスの糖代謝とエネルギー代謝の低下が示唆された。

一方、*Zip13*-GFP-KI マウスと *td-Tomato*-KI マウスを交配することにより、*Zip13*-GFP/*Tomato*-KI マウスを作成した。今後、本マウスを用いて骨格筋形成における ZIP13 発現細胞の系譜を解明する。

ZIP14 の亜鉛シグナルの役割の解明

Zip14-GFP-KI マウスを作成し、この *Zip14*-GFP-KI マウスに由来する細胞を用いて GFP の発現状況を精査した。具体的には、ZIP14 を高発現することが知られている肝臓由来の初代培養肝細胞における GFP の発現状況を FACS で解析した。その結果、*Zip14*-GFP-KI マウス由来の肝細胞では、GFP 陽性の細胞集団が確認された。現在、*Zip14*-GFP-KI マウスと *td-Tomato*-KI マウスを交配して *Zip14*-GFP/*Tomato*-KI マウスを作成している。*Zip14*-GFP/*Tomato*-KI マウスについては、筋萎縮における ZIP14 発現細胞の特徴と、ZIP14 発現細胞の運命系譜の解析に適用する。

ZIP14 を介する亜鉛シグナルの機序を解明するために、AIZin-2 試薬を用いた Zn^{2+} -conditional proteomics 法で薬剤誘導性 ZIP14 発現細胞を処理し、ZIP14 の発現誘導に依存した細胞内の蛍光発色を検出した。さらに、薬剤誘導性 ZIP14 発現細胞を適用して、ZIP14 の発現に依存した亜鉛導入を確認するとともに、ZIP14 を介した亜鉛導入による細胞増殖抑制作用を確認した。薬剤誘導性 ZIP14 発現細胞を用いることにより、ZIP14 に依存した亜鉛の過剰導入による細胞増殖障害作用を指標にした ZIP14 阻害剤のスクリーニング系の構築が可能になると考える。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況及び本研究所担当教員との共同研究に関する情報交換（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部提出して下さい。）

①本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文

該当なし

②この共同研究に基づくとの記載のある論文

該当なし

③学会発表を行った主なもの3件以内(学会名、開催日、演題)

発表者: 深田俊幸

第 43 回日本分子生物学会年会 (2020 年 12 月 3 日)

Zinc transporters in skeletal muscle physiology and pathophysiology

発表者: 大橋拓人(大学院生: 深田研究室所属)

第 59 回日本薬学会中四国支部会 (2020 年 12 月 7 日～2021 年 1 月 6 日)

骨格筋初期分化段階における亜鉛トランスポーター-ZIP13 の役割解明:iPS 細胞を適用した検討

発表者: 大橋拓人(大学院生: 深田研究室所属)

第 31 回日本微量元素学会学術集会 (2020 年 11 月 27・28 日)

骨格筋形成初期における ZIP13 の役割解明:iPS 細胞を用いた検討

④本研究所担当教員と申請代表者との共同研究に関する情報交換の状況(主なやり取りを箇条書き)

ZIP13 web meeting(群馬大学共同研究会議)

実施日: 令和 2 年 8 月 7 日:

本研究の進捗と方針に関する議論と情報交換を行なった。

ZIP13 web meeting(群馬大学共同研究会議)

実施日: 令和 2 年 8 月 7 日:

本研究の進捗と方針に関する議論と情報交換を行なった。