

平成 29 年度「杉山産業化学研究所研究助成」報告書

研究題目：亜鉛の抗炎症効果についての分子基盤確立

京都大学大学院生命科学研究科 神戸大朋

ATP は細胞内でのエネルギーの基本通貨として機能するが、酸化ストレスや物理的な損傷などによって容易に細胞外へ放出される。この細胞外 ATP 及び ADP は、細胞表面の P2X 及び P2Y 受容体を活性化し、炎症やアレルギーなどのシグナルを細胞内へ伝達する。一方、分解産物であるアデノシンは P1 受容体を活性化することで、P2X や P2Y 受容体に拮抗する抗炎症などのシグナルを誘発する。したがって、ATP→ADP→AMP→アデノシンの加水分解を制御する代謝系は、生体にとって非常に重要である。最近、細胞外アデニンヌクレオチドの加水分解に関わる ENPP、TNAP、CD73 など複数の酵素の結晶構造が明らかにされ、活性中心に亜鉛を配位することが報告された。このことから、細胞外アデニンヌクレオチド代謝は、亜鉛栄養状態と密接に関わると予想することができるが、このような観点からの解析結果はこれまで全く報告されていない。本研究は、細胞外アデニンヌクレオチド代謝において亜鉛が重要な役割を果たすことを実証し、抗炎症の観点から有用な知見を明示することを目指して実施した。

方法と結果

1). ENPP、TNAP、CD73 活性の亜鉛に対する応答性

種々のヒト培養細胞を通常培養液、亜鉛欠乏培養液、または、亜鉛欠乏培養液に亜鉛を再添加した培養液にて 24 時間培養後、ENPP、TNAP、CD73 活性を測定した。その結果、いずれの酵素活性も亜鉛欠乏時のみ、劇的に活性が減少することが判明した (図 1 A)。さらに、この現象を個体レベルで確認するために、ラットを通常食、及び亜鉛欠乏食で一定期間飼育し、各酵素活性を測定したところ、亜鉛欠乏食ラットの ENPP、NT5E、TNAP の活性が著しく低下した。また、この活性低下は、亜鉛十分食の摂取により速やかに回復することを確認した。さらに、この過程をより詳細に解析するため、ATP 加水分解により生じる ADP、AMP、アデノシン、及び残存する ATP の量を液体クロマトグラフィーにて定量した結果、細胞 (図 1 B) およびラット血漿において、亜鉛欠乏状態では細胞外 ATP の分解とアデノシンの産生が著しく弱まっていることを明らかにした。これらの結果から、細胞及び個体レベルの両方において、亜鉛欠乏によって、ENPP、TNAP、CD73 活性が低下することが明示された。即ち、亜鉛欠乏状態が、細胞外アデニンヌクレオチド代謝に大きく影響を与えることによって、炎症を悪化させることが示唆された。

2). ENPP、TNAP、CD73 活性を制御する亜鉛トランスポーターに関する解析

ニワトリ DT40 細胞において樹立した種々の亜鉛トランスポーター欠損株に ENPP、TNAP、CD73 を過剰発現させ、各酵素の活性化に関わる亜鉛トランスポーターの同定を試みた。結果、TNAP と CD73 は、ZNT5-ZNT6 ヘテロ複合体と ZNT7 ホモ複合体により輸送された亜鉛によって活性化されることが判明した (図 1 C)。一方、ENPP については、その活性を低下させる亜鉛トランスポーター欠損株を見出すことができず、ENPP の活性に必要な亜鉛輸送経路を同定することはできなかった。現在、CRISPER/Cas9 を使用して、ヒト培養細胞株において各種亜鉛トランスポーターを欠損させた細胞株を樹立しており、ニワトリ細胞で観察された現象がヒト細胞においても保存されていることを確認したいと考えている。

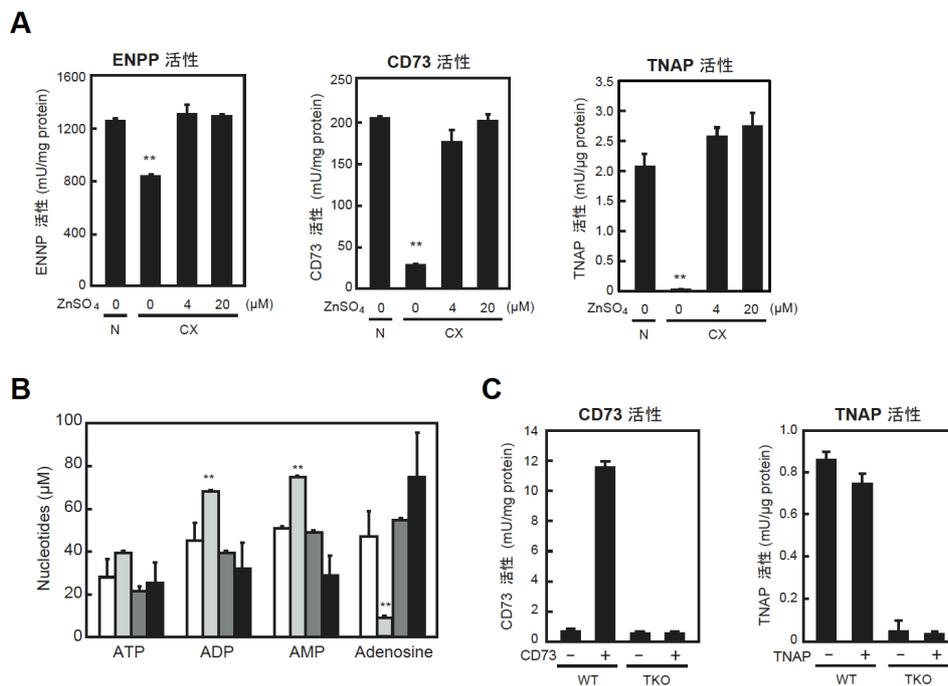


図 1. 亜鉛栄養状態は ENPP、TNAP、CD73 活性の活性を低下させることで細胞外アデニンヌクレオチド代謝に大きく影響する。A. 種々のヒト培養細胞株を通常培地 (N)、亜鉛欠乏培地 (CX)、亜鉛欠乏培地に 4 あるいは 20μM の亜鉛を再添加した時の ENPP、TNAP、CD73 活性の変化。B. 同じ条件で培養した時の細胞外 ATP 加水分解活性を、ATP・ADP・AMP・アデノシンを直接定量することで評価した結果。C. CD73 と TNAP の活性が、ZNT5-ZNT6 ヘテロ複合体と ZNT7 ホモ複合体を欠損させた細胞 (TKO) で消失することを示す結果。

考察

本研究結果は、細胞外アデニンヌクレオチド代謝経路における亜鉛の重要性を明確に示しており、亜鉛欠乏と炎症の増悪化とを分子レベルで結びつける重要な成果となっている。これまでに、先天性亜鉛欠乏症である腸性肢端皮膚炎患者や重度の亜鉛欠乏患者に重篤な皮膚炎が発症することが知られていたが、本成果によってこの発症の分子機序の一部が説明可能となる。即ち、本成果は、亜鉛欠乏と炎症の増悪化とを分子レベルで説明付ける成果として意義あるものとする。本代謝経路に関わる分子は、医薬品開発の標的分子として高いポテンシャルを有しているため、今後は、これらの改善など、本成果を元に応用研究へ展開したいと考えている。