

学内グラント 報告書

平成26年度 学内グラント終了時報告書

亜鉛欠乏に伴う糖代謝と脂肪酸合成による
内臓脂肪蓄積の細胞内分子機構の解明

研究代表者 宮崎 孝（地域医学・医療センター）

緒 言

必須微量栄養素の一つである亜鉛は、生体内で300以上の酵素の活性中心元素としてその活性を調節するとともに、1000種以上のタンパク質の安定性に寄与していることがゲノム解析により予想される。亜鉛は栄養摂取の低下、ストレス、アルコールの摂取等により欠乏することが知られている。その欠乏は脱毛、味覚異常、創傷治癒の遅延、免疫能の低下、インスリンの合成・分泌の低下等、種々の症状・症候を引き起こすことが知られている。倉澤ら¹⁾は住民の健診で、血清亜鉛濃度の測定を行い、亜鉛欠乏者は健診受診者の20%以上であると報告した。このことは多くの日本人が亜鉛欠乏あるいは亜鉛欠乏状態にあり、高齢者の褥瘡、舌痛やうつ状態等、種々の症状発現に亜鉛欠乏が関与している可能性があることを報告している。日本の高齢化率の上昇、若年女性の瘦身願望による栄養不良、ストレスを抱え生活習慣病予備軍の中高年齢者、これらの因子を持つ者は亜鉛欠乏症に注意する必要があることを示している。

2009年より糖尿病や高血圧症、脂質異常症等の生活習慣病、いわゆる代謝症候群の発見を目的に特定健康診査・特定保健指導が行われている。この健診で要支援に該当した者は、生活習慣病予備軍として生活習慣改善のための特定健康指導を受けることになっている。要支援該当者は、保健指導のために地域の保健センターに来訪し特定保健指導を受ける。我々は、要支援と判定された住民の承諾書の得られた希望者の血清亜鉛濃度と血清インスリン濃度を測定したところ、明らかな相関を認めた²⁾。このことは亜鉛摂取量が低下すると膵臓からのインスリン分泌量が低下することを示唆している。膵臓β細胞から分泌されたインスリンは、肝臓での糖新生を抑制しグリコーゲン合成を促進することで血糖値を調節している。肝細胞内でのグリコーゲン量はインスリンリセプターを介し、インスリンシグナル下流のGSK3β (glycogen synthase kinase 3β) の活性低下→GS (glycogen synthase) のリン酸化を抑制することで、グリコーゲン合成を亢進させ血糖値を低下させる。反対にGS酵素の

リン酸化により、その酵素活性が低下する結果、グルコースからのグリコーゲン合成量が低下することで、血糖値を上昇させる。以上のことから、血糖値の調節にインスリン分泌を介して、肝臓がグルコース代謝の一部を担っていることから、亜鉛欠乏状態ラットでの肝臓グリコーゲン代謝を明らかにすることを目的に研究を行った。

材料と方法

体重約100gのSprague Dawley系ラット18匹を使用した。1週間馴化後、各群の体重が均一になるように亜鉛欠乏群 (ZnD: zinc deficiency n=6)、ZnD群は餌摂取量の低下が認められることから、ZnD群と同一カロリーで飼育した対照群 (Pf: pair fed n=6) の3群に分け個別ケージで飼育した。亜鉛添加餌を自由に摂取した場合、各パラメーターの参考のために亜鉛添加餌を自由摂取Free群も行った。亜鉛欠乏餌 (タンパク質20%、炭水化物65.7%、脂質10%、ビタミン1.17%、ミネラル3.13% (亜鉛5μg/100g以下)) による飼育開始4週間後には亜鉛欠乏症の特徴の一つである脱毛が約50%に認められることから、飼育開始から4週間後、イソフルレン麻酔下に血清インスリン濃度と亜鉛濃度を測定するために血液を、インスリン遺伝子の発現量測定のために膵臓を、糖代謝の測定のために肝臓を採取した。採取した血液、臓器は遠心分離した血清と臓器は測定時まで-80度のフリーザーで凍結保存した。試料採取時のPBSによる臓器灌流、および下記に示した試料からのTotal RNAの抽出、cDNAの合成およびPCR反応試薬の調整操作は4℃下で行った。

血清亜鉛濃度は原子吸光法で、血清インスリン濃度は化学発光免疫測定法で測定した。また、膵臓でのインスリン遺伝子の発現量と、肝臓でのGSK3βおよびGSの遺伝子発現をreal-time PCR (iCycler, Bio-Rad Laboratories Inc. Cal USA) で測定した。Total RNAの抽出方法は約50mgの組織と0.5mlのISOGEN (ニッポン・ジーン(株)、東京) でホモジナイズして定法にしたがってクロロホルムとイソプロピルアルコールで抽出、抽出したTotal RNAを70%エタノールで3回洗浄後、遠心濃縮器 (MV-100, トミーメディコ(株)、東京) で乾燥、100μlの超純水に

溶解した。1 μ gのTotal RNAを使ってcDNAを合成 (iQTM cDNA Synthesis kit, Bio-Rad Lab. CA, USA) し、合成した 50 ngのcDNA, プライマーおよびPCR反応試薬 (iQTM SYBR Green Supermix, Bio-Rad Lab.) を使用してPCR反応を行った。インスリン遺伝子発現量測定のパライマーはF: 5'-TCATAGACCATCAGCAAGCAG-3', R: 5'-CTTGGGCTCCCAGAGGAC-3'を、GSK3 β およびGSのパライマーはF: 5'-ATCAAGGCACATCCTT-3', R: 5'-ACGGCTACACAGTGCG-3'とF: 5'-CGTCAGAAAAGCTGTGGATG-3', R: 5'-AGCCATCTTCCAAAATGCAC-3'をそれぞれ使用した。内部標準としてGAPDH'のパライマー F: 5'-AAACCCATCACCATCTTCCA-3', R: 5'-GTGGTTCACACCCATCACAA-3'を使用しPCR反応を行った。PCR反応の温度条件は 94 $^{\circ}$ C 30sec, 60 $^{\circ}$ C 30sec, 74 $^{\circ}$ C 60secで 40 サイクル行った。得られた結果はGAPDHの遺伝子発現量との相対発現量で示した。

統計

統計処理は統計ソフトのKaleida Graphを使用して、分散分析後、Scheffeの検定を行いp値が 0.05 以下を有意差ありとした。

結果

亜鉛欠乏餌投与前および 4 週後の体重の変化を Table 1 に示した。亜鉛欠乏餌で飼育した ZnD 群の体重は亜鉛添加餌投与の Pf 群と同一カロリーで飼育したにもかかわらず有意に低下していた。亜鉛欠乏餌投与 4 週後には、Fig. 1A に示したように、亜鉛欠乏ラットに特徴的な艶のない体毛と脱毛が認められた。

Fig. 2 に示したように血清亜鉛濃度は ZnD 群 (34.5 $\pm$ 4.3 μ g/dl, n=6) で F 群 (104.0 $\pm$ 5.0 μ g/dl), Pf 群 (102.8 $\pm$ 3.6 μ g/dl) と比較して有意に低下した。Fig. 3 に示したように血清中グルコース濃度は ZnD 群で F 群, Pf 群に

比較して有意に上昇していた。

亜鉛がインスリンの合成・分泌に働いていることから血清中濃度を測定したところ、ZnD 群 (n=4) と Pf 群 (n=4) の血清亜鉛濃度は F 群 (n=4) に比較して有意差は認められないが F 群に比較してそれぞれ 35.4%, 33.3% に低下した (Fig. 4)。

膵臓でのインスリン mRNA 発現量は ZnD 群で F 群, Pf 群と比較して有意に低下していた (Fig. 5)。

肝臓での糖代謝を明らかにするために、インスリンシグナルの下流にある GSK3 β の mRNA 発現量を測定したところ、ZnD 群で Pf 群と比較して有意に低下していた (Fig. 6)。同時に GSK3 β の下流にある GS の遺伝子発現量は ZnD 群で有意に低下していた (Fig. 7)。

考察

ヒトにおける亜鉛欠乏症の報告は Prasad が報告³⁾して 50 年以上経過した。亜鉛欠乏症の特徴は下痢や脱毛、皮膚炎等様々な症状が出現することが知られている。亜鉛欠乏症は遺伝子異常による先天的なものと、栄養障害などによる後天的なものがあり、遺伝子異常の発生頻度は約 1/50 万人であるのに対し、栄養障害によるものは、世界に約 20 億人いると推定されている。日本では高木ら⁴⁾が高カロリー輸液による亜鉛欠乏症を報告している。亜鉛が添加されていない高カロリー輸液を行うと、血清亜鉛値は数週間で正常の 1/2 に低下する。手術、火傷や低栄養では血清亜鉛値の低下速度は高まることから、臨床的に

Table 1. Changes of rat body weight

Groups	実験前(g)	4週後(g)
Free	171.2 $\pm$ 4.0	300.0 $\pm$ 11.5
Pf	171.2 $\pm$ 4.5	225.0 $\pm$ 5.9
ZnD	172.7 $\pm$ 4.6	169.7 $\pm$ 4.8



Fig. 1. The ZnD rat (A) and Pf rat (B) at 4 weeks after zinc deficient diet intake or zinc contained diet intake were indicated. The arrow was indicated typical alopecia area on of zinc-deficient rat rump.

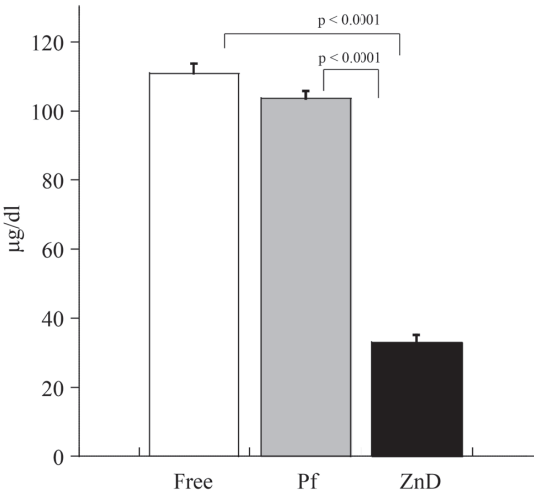


Fig. 2. Serum zinc levels are expressed.

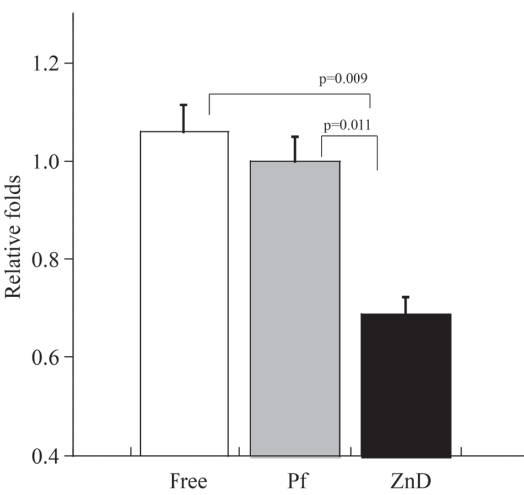


Fig. 5. Expression of insulin mRNA in the rat pancreas.

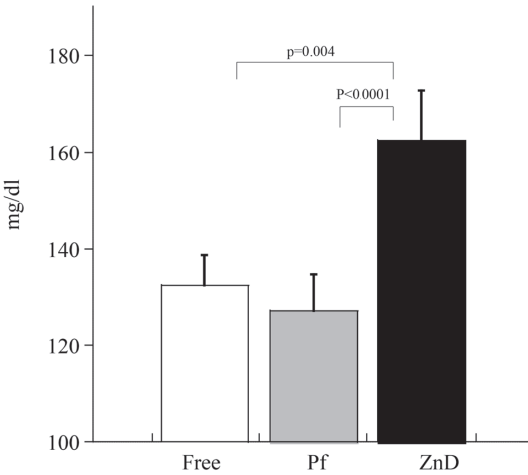


Fig. 3. Serum glucose levels.

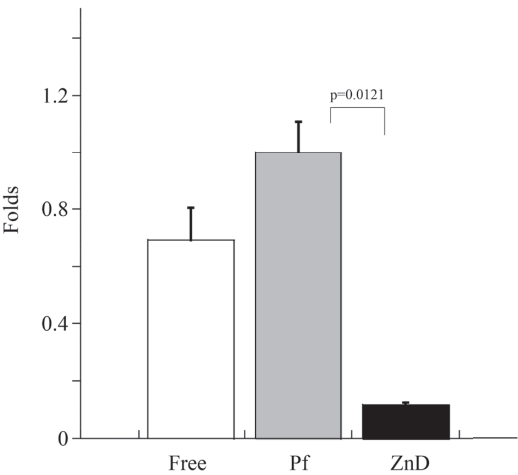


Fig. 6. Expression of GSK3β mRNA in the rat liver.

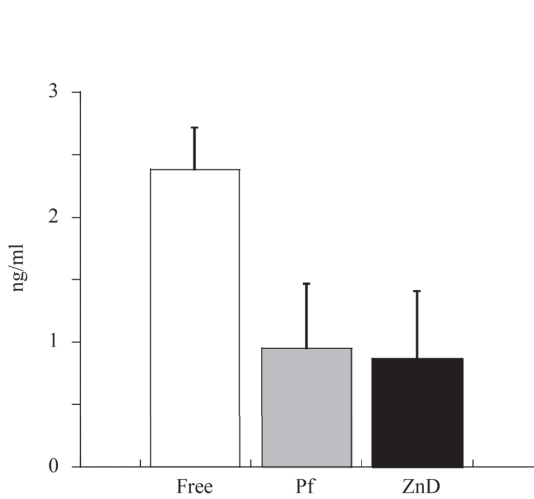


Fig. 4. Serum insulin levels.

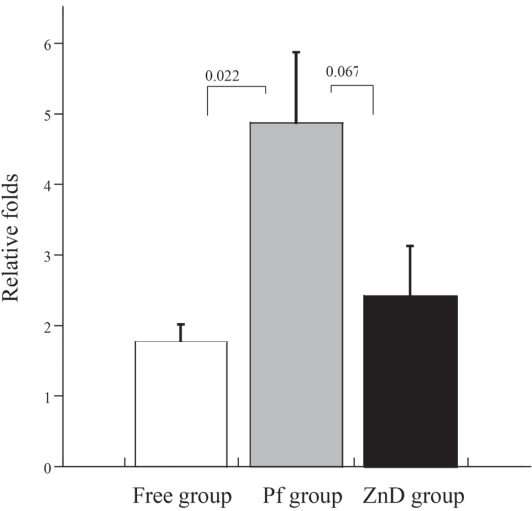


Fig. 7. Expression of GS gene in the rat liver.

低栄養、ストレス、非経口的な栄養管理を長期間行わなければならない場合、医師、看護師や医療関係者は十分注意する必要がある。

今回の結果から、亜鉛欠乏餌投与4週後にラットの脱毛が認められ、この脱毛の原因は亜鉛欠乏状態の指標と考えられること、血清亜鉛値が34 µg/dlまで低下していることから、今回使用したラットは亜鉛欠乏状態にあると推定される。また、ZnD群の体重増加の停止の原因には、Pf群と同一カロリーで飼育したにも関わらず成長停止が認められ、IGF等の成長因子低下と関連する報告⁵⁾もある。亜鉛欠乏ラットで認められた成長停止はヒトの亜鉛欠乏症を初めて報告³⁾したPrasadヒトの亜鉛欠乏症の症状とも一致する。また、実験中のラットの観察から、活動性の低下も認められ亜鉛が鬱などの精神症状の発症とも関連する可能性が示唆された。このような種々の症状や症候は生体内での亜鉛の多様な役割を反映しているものと考えられる。

インスリンと亜鉛との関連はインスリン発見当初から知られており、膵臓のβ細胞から分泌されるインスリン顆粒は6分子のインスリンと2原子の亜鉛で構成されており、亜鉛の欠乏はインスリン顆粒の生成に必須である。また、顆粒内への亜鉛の輸送に関連する亜鉛輸送タンパクの異常でもインスリン合成が低下するとの報告⁶⁾もあり、インスリン顆粒の生成に亜鉛が強く関連していることが示唆されている。

この実験結果で亜鉛欠乏ラットでの膵臓でのインスリン遺伝子発現量の低下が明らかになったことから、亜鉛欠乏状態ではインスリン顆粒の生成低下と、インスリン顆粒に取り込まれるインスリンタンパクも低下していることを示唆する結果となった。亜鉛は種々の酵素や転写因子にも関与することから、インスリン遺伝子の発現に亜鉛含有転写因子が存在している可能性も否定できないことから、また、亜鉛転写因子のSLC30A8/ZnT8を介した膵臓でのインスリン分解とも関連するのかもしれない。いずれにしても亜鉛輸送タンパクや亜鉛含有転写因子の役割を解明することで、生活習慣病の糖尿病などの予防に繋がる可能性がある。

血糖値はインスリン分泌量で調節されるが、血清中インスリンの濃度はZnD群とPf群の間で差がほとんど認められないことから (Fig. 5)、Fig. 3に示したZnD群の血清中グルコース濃度の増加は、インスリンリセプター下流のシグナルが関与している可能性があると推測できる。そのことから、膵臓におけるグリコーゲン代謝に注目し、グリコーゲン代謝を介したグリコーゲン合成酵素活性を調節しているGSK3βとGSの遺伝子発現量を測定した。ZnD群でGSK3βの遺伝子発現量はPf群の約20%以下に低下していたことから、GSK3βの下流にあるGSのリン酸化が抑制される結果、GS活性が亢進していることが明らかとなった。従って、亜鉛欠乏状態ではグリコーゲン合成が刺激されているにもかかわらず血糖値が増加し

ている可能性が示唆している。このことは亜鉛の欠乏は膵細胞内のグリコーゲンの過剰な蓄積を引き起こす可能性を示している。亜鉛欠乏とグリコーゲン代謝についての報告は少ないことから、正確なことは不明であるが、今後これらシグナル分子のタンパク質の検出を行う予定である。

最後に、亜鉛の種々の働きの中で、膵臓インスリン遺伝子発現と膵臓グリコーゲン代謝関連酵素の遺伝子発現量について研究を行った。その結果、亜鉛の欠乏状態ではインスリン、GSK3βおよびGSの遺伝子発現量が低下することで膵臓でのインスリン合成の低下や膵臓でのグリコーゲン合成の亢進が明らかになった。今回の研究で、生体における亜鉛の多彩な作用の一部としての亜鉛と糖代謝についてその一部が明らかになったが、今後は亜鉛転写因子や亜鉛タンパクを介した内臓脂肪蓄積症候群である生活習慣病の糖尿病、脳血管疾患や癌の成長・転移における亜鉛の役割についての解明を進めてゆく予定である。

謝 辞

本研究は地域医学・医療センター内で実施した。実施に当たり当センター内の大野洋一助教授に多くの助言を頂いた。この場をお借りして感謝申し上げます。今回の学内グラント助成および成果発表の機会が得られたことに別所正美学長、医学研究センター長 松下祥教授に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 倉澤隆平, 久堀周治郎, 奥泉博康. 亜鉛基礎研究の最前線と亜鉛欠乏症の臨床. *Biomed Res Trace Elements* 2010;21:1-12.
- 2) 宮崎 孝, 大野洋一, 佐藤真喜子, 柴崎智美, 荒木隆一郎, 鈴木洋通. 特定健康診査・特定保健指導の要積極的支援者の血清亜鉛とインスリンについて. *埼玉医科大学雑誌* 2013;39:146-8.
- 3) Prasad AS. Impact of the discovery of human zinc deficiency on health. *J Trace Elem Med Biol* 2014;28(4):357-63.
- 4) Takagi Y, Okada A, Itakura T, Satani M, Manabe H, Kasahara N. Zinc deficiency during intravenous hyperalimentation. A clinical analysis of eleven cases. *Med J Osaka Univ* 1977;28:67-76.
- 5) Alves CX, Vale SH, Dantas MM, Maia AA, Franca MC, Marchini JS, Leite LD, Brandao-Neto J. Positive effects of zinc supplementation on growth, GH, IGF1, and IGFBP3 in eutrophic children. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2012;25(9-10):881-7.
- 6) Lefebvre B, Vandewalle B, Balavoine AS, Queniat G, Moerman E, Vantighem MC, Le Bacquer O, Gmyr V, Pawlowski V, Kerr-Conte J, Pattou F. Regulation and functional effects of ZNT8 in human pancreatic islets. *J Endocrinol* 2012 Aug;214(2):225-32.

研究成果リスト

学会発表

- 1) 宮崎 孝, 木戸遵將, 大野洋一, 佐藤真喜子, 高橋幸子, 野寺 誠, 荒木隆一郎, 柴崎智美, 鈴木洋通. 特定健診における積極的指導対象者の 75 g 経口糖負荷試験 (OGTT) 時の血清亜鉛と同一について, 第 85 回日本衛生学会総会, 2015 年 3 月 28 日, 和歌山
- 2) 宮崎 孝, 大野洋一, 佐藤真喜子, 高橋幸子, 荒木隆一郎, 柴崎智美, 鈴木洋通. 特定検診・特定保健指導対象者の OGTT 前後の血中亜鉛とインスリン濃度について, 第 73 回日本公衆衛生学会総会, 2014 年 11 月 7 日, 宇都宮
- 3) 下垣里河, 宮崎 孝, 佐藤真喜子, 高橋幸子, 荒木隆一郎, 宮嶋由佳, 野寺 誠, 柴崎智美, 大野洋一, 竹中恒夫, 鈴木洋通. 亜鉛欠乏ラット肝臓で

の p-GS と p-GSK3 β のタンパク発現について, 第 31 回日本微量栄養素学会, 2014 年 6 月 大阪

- 4) 宮崎 孝, 下垣里河, 野寺 誠, 大野洋一, 竹中恒夫, 佐藤真喜子, 高橋幸子, 荒木隆一郎, 柴崎智美, 鈴木洋通. 亜鉛欠乏ラットの血清インスリン濃度と GSK3 β と GS を介した血糖値の上昇について, 第 84 回日本衛生学会学術総会, 2014 年 5 月, 岡山
- 5) 宮崎 孝, 大野洋一, 野寺 誠, 木戸尊將, 柳澤裕之, 竹中恒夫, 佐藤真喜子, 高橋幸子, 柴崎智美, 鈴木洋通. 亜鉛欠乏ラットにおける活動性の低下と海馬でのセロトニン合成酵素の遺伝子発現, 第 87 回日本産業衛生学会, 2014 年 5 月, 岡山

特許出願等

該当しない