

亜鉛マーカー酵素を利用した迅速な亜鉛欠乏診断法の開発

京都大学大学院 生命科学研究科

准教授 神戸 大朋

はじめに

我が国は飽食の時代にあるにもかかわらず、必須微量栄養素“亜鉛”の不足が重大な栄養問題となる可能性が懸念されている^(1, 2)。亜鉛欠乏の傾向は高齢者において顕著であり、亜鉛欠乏に陥ると、味覚機能や免疫機能低下に加え、褥瘡や舌痛、皮膚炎など様々な症状が現れる^(3, 4)。実際、ヨーロッパで実施された疫学調査・ZincAge project（健康・老化と亜鉛との関連に関する研究）では、高齢者の健康状態と体内亜鉛量が正の相関を示すことが、実証されている⁽⁵⁾。また、最新の調査結果によると、日本は、先進国で唯一15～25%の国民が亜鉛欠乏と判定される国として報告されており⁽⁶⁾、且つ、その大半が高齢者と試算されている。そのため、超高齢社会を迎えた我が国において、血液検査など簡便な方法によって亜鉛欠乏を正確かつ迅速に診断できる手法を確立する必要性が高まっている⁽⁷⁾。しかしながら、現在、亜鉛欠乏症の診断に使用されている血清亜鉛値は、生体内亜鉛の真のバイオアベイラビリティを反映しない場合があるため、生体内亜鉛状態を正確に評価することが可能となる診断法を確立する意義は大きい。そこで、本研究では、有用な亜鉛欠乏マーカー酵素を同定し、迅速な亜鉛欠乏診断法の開発へ繋げることを目的とする。

結 果

亜鉛欠乏によって活性が低下する亜鉛要求性酵素としてALPが知られる。我々は、ALPと同様に亜鉛欠乏で活性を消失する亜鉛酵素として、炭酸脱水酵素IVとAutotaxinの2種類をすでに見出しており⁽⁸⁾、これら酵素は有用な亜鉛欠乏診断マーカーとなり得る可能性を持つ。本研究では、これらの酵素以外にマーカー酵素として使用できる可能性がある酵素が残されていないか検討を行うため、まず、より簡便な測定法である比色法による測定が可能となる亜鉛酵素を探索した。次に、新たに見出された酵素の、亜鉛に対する反応の鋭敏さや活性化機構について解析し、これまでに見つかっているものと比較検討を実施した。さらに、それらの有用性も評価した。

1) 簡便な比色法で測定可能なマーカー酵素の探索と性状解析

亜鉛欠乏診断マーカーとしての用途を考えた場合、比色法による簡便な測定が可能であることが望ましい。このような観点から、比色法で測定が可能な複数の亜鉛酵素に焦点を当て、解析を行った。解析の結果、発色基質pNP-TMPを加水分解するENPP、さらに、AMPを加水分

解し、加水分解されたリン酸機をマラカイトグリーン試薬で比色可能なNT5Eの2種類の酵素活性が、亜鉛欠乏において有意に低下することを見出した(図1)。この活性減少は、炭酸脱水酵素IVやAutotaxinよりも鋭敏であった。そこでENPP及びNT5Eに関して、ALPの活性化と比較しながら解析を進めた。

これまでに、ALPのアイソザイムである組織非特異的アルカリフォスファターゼ(TNAP)の活性化には、亜鉛トランスポーター複合体(ZNT5-ZNT6複合体とZNT7複合体)が必要であることを示していたため^(9,10)、まず、ENPPとNT5Eの活性化経路がTNAPの活性化経路と同じであるかどうか

について解析を行った。TNAPを活性化することができない亜鉛トランスポーター欠損細胞株(ZNT5, ZNT6, ZNT7 三重欠損株: TKO株)⁽¹¹⁾にENPPとNT5Eを発現させ、解析した結果、NT5E活性はTKO株で消失したため、TNAP同様にZNT5-ZNT6複合体とZNT7複合体を介して行われることが判明した(図2)。一方、ENPPの活性は、TKO株においても低下しなかったため、他の亜鉛トランスポーターを介して亜鉛が供給されていることが考えられた。

2) ラット血漿を用いた診断マーカーとしての有用性の評価

次に、ラット個体を用いて、ENPP、NT5Eの活性が亜鉛欠乏診断マーカーとして使用可能であるかどうかについて検討した。ラットを亜鉛欠乏食(4.0mg/kg)、あるいは、亜鉛十分食(33.7mg/kg)で10日間飼育し、それぞれの血漿中の酵素活性を測定した結果、ENPP、NT5Eのどちらの活性も、亜鉛欠乏食で有意に減少することを確認した。亜鉛欠乏への感受性の観点から、TNAPの活性減少と比較したところ、NT5EはTNAPと同程度の活性低下傾向を示したが、ENPP活性はTNAPよりもさらに大きな活性減少が認められた(図3)。

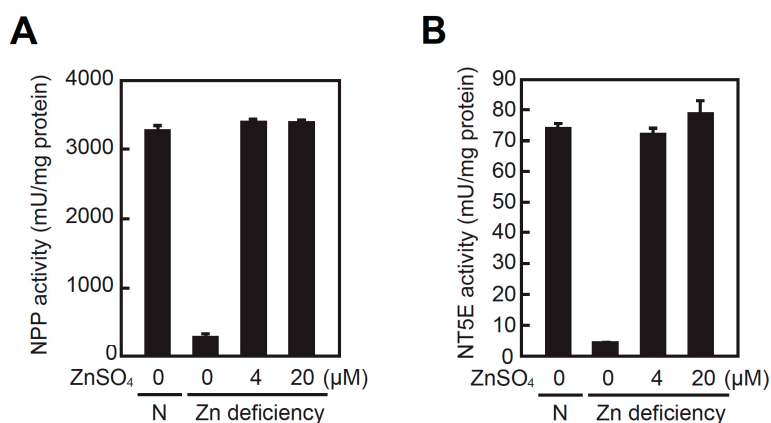


図1. ENPP (A) とNT5E (B) の活性は、亜鉛欠乏で低下する

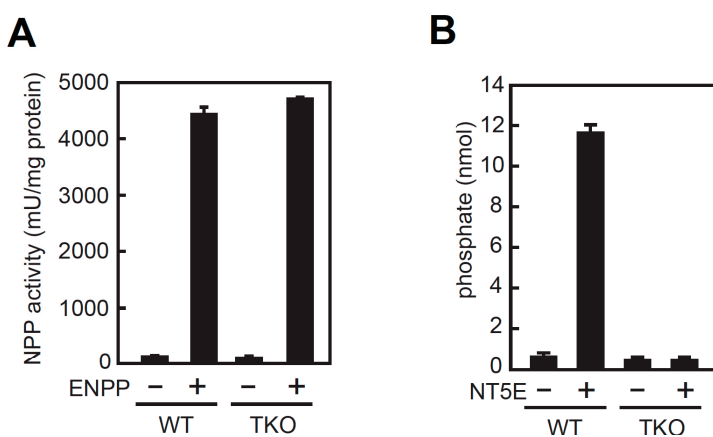


図2. ENPP (A) とNT5E (B) の活性は、亜鉛トランスポーター三重欠損株欠損細胞株 (TKO 株) で低下する。

続いて、血漿に過剰量の亜鉛を加えて（終濃度として $100\mu\text{M}$ になるように添加）1日インキュベートし、血漿中に分泌された亜鉛酵素の活性が、亜鉛の再添加により回復するかどうか解析したところ、回復は認められなかった。すなわち、血漿中の酵素活性は、亜鉛酵素の生合成時の体内亜鉛レベルを反映することが示唆された。以上の結果より、ENPPは、TNAPより優れた亜鉛欠乏マーカー酵素である可能性が示唆された。

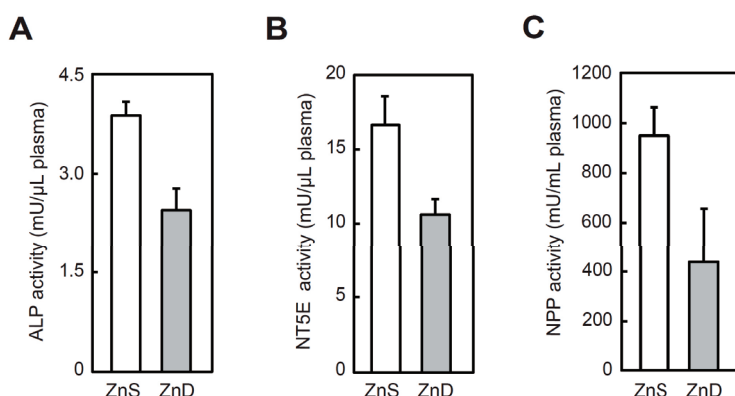


図3. ALP (A)、NT5E (B) とENPP (C) の活性は、亜鉛欠乏食で飼育したラットの血漿で低下するが、ENPPの活性が最も大きく減少する。

考 察

亜鉛欠乏によってALPよりも鋭敏に活性を消失する亜鉛酵素は、亜鉛欠乏診断マーカーとして高いポテンシャルを有している。本研究では、これまでに亜鉛欠乏により活性低下を認めている炭酸脱水酵素IVやAutotaxinより、さらに鋭敏に活性を減少させる2種類の酵素ENPPとNT5Eを見出した。両酵素の亜鉛による活性化の制御機構を解析した結果、NT5EはTNAPと同じくZNT5-ZNT6複合体とZNT7複合体を介した経路で活性化されるが、一方、ENPPは別経路で活性化されることが明らかとなった。また、亜鉛欠乏食を給餌したラットの血漿においては、NT5EとTNAPの亜鉛欠乏に対する感受性は同程度であったが、ENPP活性はこれらよりも鋭敏であった。以上の結果より、ENPPは生体内亜鉛のバイオアベイラビリティを反映する酵素となる可能性があると考えられた。現在、ENPPの亜鉛欠乏に対する応答をさらに詳細に解析しており、ENPPの診断マーカーとしての有用性を明らかにしていきたいと考えている。

要 約

我が国では、“亜鉛”の不足が重大な栄養問題として懸念されている。最新の調査結果によると、日本は、先進国で唯一15～25%の国民が亜鉛欠乏と判定される国として報告されており、且つ、その大半が高齢者と試算されている。超高齢社会を迎えた我が国においては、血液検査などによって亜鉛欠乏を正確かつ迅速に診断できる手法を確立する必要性が高まっており、生体内亜鉛のバイオアベイラビリティを反映する診断法を確立する意義は大きい。本研究では、有用な亜鉛欠乏マーカー酵素として2種類の酵素ENPPとNT5Eを見出し、その

可能性について解析を行った。結果、ENPPが亜鉛欠乏に応じて非常に鋭敏に活性を低下させることを見出した。ENPPは診断マーカーとして用いることで、迅速な亜鉛欠乏診断法の開発へ繋がる可能性が考えられた。

文 献

1. Prasad AS. Zinc deficiency. *BMJ* 326: 409–410, 2003
2. Hambidge M. Human zinc deficiency. *The Journal of nutrition* 130: 1344S–1349S, 2000.
3. Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A. and Itsumura N. The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiological Reviews* 95: 749–784, 2015
4. Hara T, Takeda T, Takagishi T, Fukue K, Kambe T. and Fukada T. Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *Journal of Physiological Sciences* 67: 283–301, 2017
5. Haase H, Mocchegiani E, and Rink L. Correlation between zinc status and immune function in the elderly. *Biogerontology*. 7: 421-428, 2006
6. Kumssa DB, Joy EJ, Ander EL, Watts MJ, Young SD, Walker S, and Broadley MR. Dietary calcium and zinc deficiency risks are decreasing but remain prevalent. *Sci Rep*. 5: 10974, 2015
7. Yasuda H, and Tsutsui T. Infants and elderlies are susceptible to zinc deficiency. *Sci Rep*. 6: 21850, 2016
8. Tsuji T, Kurokawa Y, Chiche J, Pouyssegur J, Sato H, Fukuzawa H, Nagao M, and Kambe T. Dissecting the Process of Activation of Cancer-promoting Zinc-requiring Ectoenzymes by Zinc Metalation Mediated by ZNT Transporters. *J. Biol. Chem.* 292: 2159–2173, 2017
9. Fukunaka A, Suzuki T, Kurokawa Y, Yamazaki T, Fujiwara N, Ishihara K, Migaki H, Okumura K, Masuda S, Yamaguchi-Iwai Y, Nagao M, and Kambe T. Demonstration and characterization of the heterodimerization of ZnT5 and ZnT6 in the early secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 284: 30798–30806, 2009
10. Fukunaka A, Kurokawa Y, Teranishi F, Sekler I, Oda K, Ackland ML, Faundez V, Hiromura M, Masuda S, Nagao M, Enomoto S, and Kambe T. Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase Is Activated via a Two-step Mechanism by Zinc Transport Complexes in the Early Secretory Pathway. *J. Biol. Chem.* 286: 16363–16373, 2011
11. Suzuki T, Ishihara K, Migaki H, Nagao M, Yamaguchi-Iwai Y, and Kambe T. Two different zinc transport complexes of cation diffusion facilitator proteins localized in the secretory pathway operate to activate alkaline phosphatases in vertebrate cells. *J. Biol. Chem.* 280: 30956–30962, 2005