

亜鉛トランスポーターZIP13の脂肪褐色化での役割

群馬大学生体調節研究所 分子糖代謝制御分野
福中 彩子

1. はじめに

欧米型の肥満を伴う2型糖尿病患者数は日本人においても増加の一途をたどっており、その病態の解明と、新規治療薬の開発は急務である。肥満の病態形成に重要な役割を果たす脂肪細胞には、エネルギーを貯蔵する白色脂肪細胞と、エネルギーを消費する褐色脂肪細胞がある。最近、白色脂肪組織中に寒冷刺激などにより誘導される褐色脂肪の特徴を持つベージュ脂肪細胞が発見され、この細胞の増加（脂肪細胞の褐色化）で全身の糖代謝やインスリン感受性が改善することが示唆されている。そのため、肥満・糖尿病対策の観点から、ベージュ脂肪細胞の理解と制御方法の開発が注目されている。このような背景と、既存のインスリン感受性改善薬には固有の副作用があることから、褐色化亢進を利用した新たなインスリン感受性改善薬の開発はきわめて有効であると考えられている。

申請者は、亜鉛トランスポーター*Zip13*のノックアウトマウス(*Zip13*-KOマウス)やZIP13の機能喪失型変異を保持するエーラス・ダンロス症候群患者では脂肪萎縮が見られることから(参考論文1)、脂肪組織におけるZIP13の役割の解析を進めてきた。その結果、*Zip13*-KOマウスでは、白色脂肪組織でベージュ脂肪細胞の顕著な増加・エネルギー消費量の亢進・高脂肪食誘導性の肥満に抵抗性を示すことを見いだした。そこで、*Zip13*-KOマウス脂肪組織の褐色化が脂肪細胞自律的におきているか*ex vivo*培養法によって検討した結果、褐色脂肪細胞のマーカー遺伝子の発現が*Zip13*-KOマウス由来の細胞で顕著に上昇することが判明した。さらに、細胞株を用いてZIP13をノックダウンした場合に、褐色化の亢進が見られることから、ZIP13が脂肪細胞の褐色化を抑制する方向に働くことが示唆された(発表論文1,2)。本申請課題では、ZIP13による脂肪細胞の運命決定機序を解明することにより、肥満や生活習慣病の理解に貢献することを目標とした。

2. 方法

(1)細胞質内亜鉛量測定

ZIP13(野生体もしくはZIP13の亜鉛輸送に重要だと考えられる膜貫通領域内のヒスチジン残基やアスパラギン酸残基をアラニン残基に置換した変異体)を発現するレトロウイルスをC3H10T1/2細胞に感染させ、細胞質内の亜鉛量をMT1(メタロチオネイン)の発現を指標に観察した(参考文献2,3)。

(2)免疫沈降

ZIP13は2量体を形成し、亜鉛を輸送することが知られている。そこで(1)で同定した亜鉛輸送能欠失変異体(変異体)がホモフィリックな結合様式を示すか観察した。HEK293細胞にHAタグとMycタグをそれぞれC末に付加したZIP13(野生体もしくは変異体)を発現するプラスミドを導入し、その細胞抽出液を用いて抗HA抗体と抗Myc抗体で免疫沈降を行った。その後ウエスタンブロットを施行し、結合様式を観察した。

(3)免疫染色

ZIP13はゴルジ体に局在することが報告されていることから(1)で同定した変異体がゴルジ体に局在するか観察した。前駆脂肪細胞にZIP13-HA(野生体もしくは変異体)を発現させた細胞を用いて、抗HA抗体と抗GM130抗体(ゴルジ体マーカー)で免疫染色を行った(参考文献2,3)。

3. 結果 研究成果

申請者は、細胞・個体レベルでZIP13が脂肪細胞の褐色化抑制に働くことを見いだし、本研究では、その分子メカニズムを明らかにする。

(1)ZIP13の亜鉛輸送能が褐色化に重要なのか？

ZIP13はZIPファミリーに属し、そのファミリー間で保存された膜貫通領域内のヒスチジン残基は亜鉛の輸送に必要であることが示唆されている。そこで亜鉛の輸送が褐色化抑制に必要なものであるか調べた。ZIP13の膜貫通領域内のヒスチジン残基をアラニンに置換した変異体を作成した。作成した変異体は細胞内局在やホモフィリックな結合は野生体と同様であるが、亜鉛輸送能は低下していることが判明した。また変異体を*Zip13*-KO細胞に導入しても褐色化抑制が出来ないことから、ZIP13の亜鉛輸送能が褐色化抑制に必要なことが明らかとなった。この際、培地中に過剰量の亜鉛を添加しても褐色化は抑制で

きないことから、ZIP13 から輸送される亜鉛が脂肪細胞の褐色化抑制を調節するのに必要であると示唆された。生体内において亜鉛はタンパク質と結合しないフリーの状態ではほとんど存在しないことから、ZIP13 と結合する分子が亜鉛の輸送を介して褐色化抑制の制御に関わることが示唆された。

(2) ZIP13 と結合する分子の探索

(1)で示唆された標的分子を探索するために、yeast two hybrid 法を行い、ZIP13 と結合する分子を選定することにした。その際、yeast two hybrid 法において ZIP13 のどの領域を bait として用いるか検討を行った。前述のように ZIP13 は ZIP ファミリーに属し、膜貫通領域 3 番目と 4 番目の細胞質側に面した領域(Int-L2)は ZIP ファミリー間で特異性が見られる。そこでこの領域を欠失させた変異体を作成し、*Zip13*-KO 細胞に導入したところ、褐色化抑制が出来ないことから、この領域が ZIP13 褐色化抑制に大事であることが判明した。次に Int-L2 領域と結合するタンパク質をスクリーニングするため、ヒト繊維芽細胞 cDNA ライブラリーを用いて yeast two hybrid 法により選定した。スクリーニングで得られた標的分子の候補に関して、ZIP13 と結合することを免疫沈降法により確認した。また、標的分子を前駆脂肪細胞株でノックダウン(過剰発現)して、褐色化の影響を精査した。現在、影響を与えた候補分子に関して、*Zip13*-KO 細胞に過剰発現(ノックダウン)してその効果を検討しているところである。

4. 考察 まとめ

従来から、脂肪細胞の機能における亜鉛の関与は想定されていたが、ベージュ脂肪細胞の分化や活性化における亜鉛の役割は全く報告されていない。ZIP13はゴルジ体から細胞質への亜鉛の輸送に関与することから、上記の結果は、ZIP13を介したオルガネラから細胞質への亜鉛の流れが脂肪細胞の褐色化を制御するという全く新規のメカニズムがマウスおよびヒトにおいて保存されていることを意味する。ZIP13 による脂肪細胞褐色化抑制機構の解明は、これまでにない新しい抗肥満治療薬に繋がる可能性や、将来の臨床応用を見据えたトランスレーショナルリサーチに繋がる可能性を有する。今後ZIP13 を介する亜鉛がどのように褐色化抑制を行うかその機構の全貌を明らかにするために、現在スクリーニングから得られた分子に関して精力的に研究を行っているところである。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御援助を賜りましたアステラス病態代謝研究会に厚く御礼申し上げます。

5. 発表論文、参考文献

発表論文

1. **Fukunaka A**, Fukada T, Bhin J, Suzuki L, Tsuzuki T, Takamine Y, Bin BH, Yoshihara T, Ichinoseki-Skine N, Naito H, Miyatsuka T, Takamiya, S, Sasaki T, Inagaki T, Kitamura T, Kajimura S, Watada H, Fujitani Y. Zinc transporter ZIP13 Suppresses Beige Adipocyte Kajimura S, Watada H, Fujitani Y. Zinc transporter ZIP13 Suppresses Beige Adipocyte Biogenesis and energy expenditure by regulating C/EBP- β expression. *PLoS Genet.* 13(8): e1006950. (2017)
2. **Fukunaka A (corresponding author)**, Fujitani Y. Role of zinc homeostasis in the pathogenesis of diabetes and obesity. *Int. J Mol Sci.* (2018) in press

参考論文

1. Fukada T, Civic N, Furuichi T, Shimoda S, Mishima K, et al. (2008) The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective tissue development; its involvement in BMP/TGF-beta signaling pathways. *PLoS One* 3: e3642.
2. Bin BH, Fukada T, Hosaka T, Yamasaki S, Ohashi W, et al. (2011) Biochemical characterization of human ZIP13 protein: a homo-dimerized zinc transporter involved in the spondylocheiro dysplastic Ehlers-Danlos syndrome. *J Biol Chem* 286: 40255-40265.
3. Bin BH, Hojyo S, Hosaka T, Bhin J, Kano H, et al. (2014) Molecular pathogenesis of spondylocheiroidysplastic Ehlers-Danlos syndrome caused by mutant ZIP13 proteins. *EMBO Mol Med* 6: 1028-1042.