

平成28年度 プロジェクト研究費研究実績報告書

平成29年5月8日

代表者 有田 安那

研究課題名	Cyclic feeding を同期した亜鉛欠乏回復モデルによる肝臓亜鉛濃度と遺伝子発現の時系列的応答関係の解析
研究期間	平成28年4月1日 ~ 平成29年3月31日
共同研究者	山崎 優子
1. 今年度の研究概要	
<p>微量栄養素の作用解明には当該栄養素欠乏の解消にともなう時系列的な応答を解析する動物実験が奏功するが(Arita et al., B.B.B. 2010)、亜鉛の場合は追試に耐える堅牢な知見は乏しい。申請者らは、その原因が亜鉛欠乏ラットの摂食増減(cyclic feeding :CF)の位相差にあると推定し、亜鉛欠乏ラットのCFの位相差を同期した亜鉛欠乏回復モデルを構築し、新たな知見を獲得してきた。</p> <p>平成27年度の本研究費では、亜鉛投与後の肝臓の亜鉛代謝関連遺伝子発現の変動を時系列的に調べ、肝臓 <i>Mt1a</i>, <i>Znt1</i>, <i>Znt2</i>, <i>Zip10</i> mRNA 発現は亜鉛投与3時間後に変動することを明らかにした。これらの遺伝子は金属応答性配列(MRE)を持ち、亜鉛依存的に転写調節される可能性が高いにも関わらず、亜鉛投与3~24時間後において肝臓亜鉛濃度は変動しなかった。遺伝子発現の変動に先立ち、亜鉛投与後3時間以内に肝臓亜鉛濃度が一過性に上昇する可能性が推察される。</p> <p>そこで、本プロジェクトでは、CFを同期した亜鉛欠乏回復モデルを用いて、亜鉛投与に対するラット肝臓の遺伝子発現の変動および肝臓中の亜鉛濃度を時系列的に解析し、肝臓中の亜鉛濃度の上昇と遺伝子発現の時系列的対応関係を明らかにすることを試みた。</p> <p>【実施内容】</p> <p>初体重90gのWistar系雄性ラットに亜鉛無添加食餌と超純水を与えて3週間飼育し、亜鉛欠乏(ZD)群とした(n=35)。CFを同期するため亜鉛投与6日前に22時間以上24時間未満の絶食を行った。ZD群を5群(n=7)に分け、解剖30分前、1、3、6時間前に硫酸亜鉛溶液を腹腔内投与し、亜鉛非投与群(0時間群)には生理食塩水を投与した。ラットは所定の時刻に断頭採血後、すみやかに肝臓を摘出し、以下の項目について亜鉛投与後の時系列的解析を行った。動物実験は、本学動物実験委員会の承認を得て実施した。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・肝臓亜鉛代謝関連遺伝子発現 ・血中および肝臓中亜鉛濃度の変動 ・Mt1, Znt1 タンパク質の免疫組織化学的染色(外部委託) 	

2. 研究の成果

3 週間の亜鉛欠乏食飼育後、ラットは著しい食欲不振や、脱毛、皮膚炎、下痢などの亜鉛欠乏症状を呈した。CF は亜鉛無添加食飼育 3 日後から見受けられたが、絶食により個体間の CF は同期され、群として明瞭な摂食量の増減が確認された。

血清亜鉛濃度は、亜鉛投与後 30 分後に著しく上昇し、3 時間後まで維持された。肝臓 *Mt1*、*Znt1*、*Znt2* mRNA 発現は、亜鉛投与 1 時間後に上昇傾向を示し、3 時間後に有意に上昇した。*Zip10* mRNA 発現は投与 3 時間後に低下した。これらの遺伝子発現の変動には、亜鉛投与後、少なくとも 3 時間を要することが明らかになった。さらに、亜鉛投与 3、6 時間後の肝臓 MT1、ZnT1 タンパク質発現を免疫組織化学的染色で調べたところ、亜鉛非投与群に対して、亜鉛投与 3、6 時間後において MT1、ZnT1 タンパク質発現の亢進が認められ、遺伝子発現の挙動と一致した。一方、肝臓中亜鉛濃度は投与 30 分後にわずかに上昇傾向を示したが、有意な変動は認められなかった。

本実験条件では、亜鉛投与後の肝臓中亜鉛濃度の変動と肝臓亜鉛代謝関連遺伝子発現の時系列的応答関係を見出すことはできなかった。本プロジェクトでは、肝臓亜鉛濃度を肝細胞全体の亜鉛濃度として評価したが、MRE を介した遺伝子発現の調節には、亜鉛と転写因子 MTF-1 の核内移行が必須であることを踏まえると、亜鉛投与後の核内亜鉛濃度を測定する重要性は高い。今後は、亜鉛投与後の肝細胞の核内亜鉛濃度の変動についても着目し、さらに詳細な検討を加えていきたい。

3. 研究成果の公表実績・予定（年月日、方法）

【実績】

- ・第 62 回日本栄養改善学会学術総会（平成 28 年 9 月）：口頭発表 1 演題

【予定】

- ・本研究費で得られた成果に加え、核内亜鉛濃度の変動等のデータが揃い次第、英文学術雑誌に原著論文として発表する予定である。（平成 30 年以降）

平成 28 年度(2016 年) 研究概要

研究所・部門	
研究課題名	Cyclic feedingを同期した亜鉛欠乏回復モデルによる肝臓亜鉛濃度と遺伝子発現の時系列的応答関係の解析
研究代表者	有田 安那
研究期間	平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日
共同研究者	山崎 優子

1. 研究成果取組状況

(1) 国内外の学会発表

状況	発表者, 発表課題, 学会誌名, 発表年月日, 発表場所	招待講演
発表済	野原早加, 永園好恵, 羽田美優, 浅田芽衣花, 舘花春佳, 倉若美咲樹, 端田寛子, 山崎優子, 佐々木菜穂, 有田安那, 志村二三夫 「Cyclic feedingを同期した亜鉛欠乏回復モデルによる肝臓亜鉛代謝 関連遺伝子発現の時系列的応答」 第 62 回日本栄養改善学会学術総会, 平成 28 年 9 月, 青森	
発表予定		

(2) 雑誌論文(学内紀要含む)

状況	発表者, 発表課題, 学会誌名, 発表年月日, 発表場所	査読有無
投稿済		
投稿予定	Anna Arita, Hiroko Hashida, Naho Sasaki, Yuko Yamazaki, Keiko Hamaguchi, and Fumio Shimura. Food-deprivation synchronized cyclic feeding of zinc deficient rats. (仮題) J. Nutr. 平成 30 年度以降	

(3) 図書等の出版

状況	発表者, 発表課題, 学会誌名, 発表年月日, 発表場所
出版済	
出版予定	

(4) シンポジウム・講演会等の開催

状況	主催者名・協賛社名等, 講演(発表タイトル), 実施年月日, 実施場所
開催済	
開催予定	

(5) 本研究に関連して本学経費以外に支援を得た補助金など

年度	機関・財団名, 事業名, 課題名