

99. 亜鉛欠乏食による病態発症における Sirt1 の役割

内匠 正太

鹿児島女子短期大学 生活科学科 食物栄養学専攻

Key words : 亜鉛, Sirt1, 亜鉛欠乏

緒言

亜鉛は必須微量元素の一つであるが、近年、日本人の食生活の変化に伴う亜鉛摂取不足が指摘され、亜鉛欠乏が問題となっている。必須微量元素である亜鉛は 300 種以上の酵素の活性中心として存在し、2,000 種以上のタンパク質と転写因子の安定性に寄与しており、亜鉛の欠乏は、味覚障害、免疫機能の低下、成長障害、酸化ストレスの亢進だけでなく、活動性の低下やうつ状態を呈するなど、様々な健康障害を引き起こすことが知られている。近年、加齢に關与するとして着目されている長寿遺伝子 *Sirt1* も、亜鉛が配位する Zn フィンガードメインを構造内に有しており、実際に Zn フィンガードメイン内の亜鉛が *Sirt1* の構造の安定化及び活性に重要であることが報告されている¹⁾。このことから、亜鉛の不適切な摂取が *Sirt1* の発現や活性異常をきたし、様々な疾患に關与することが示唆されるが、食餌中の亜鉛が *Sirt1* に及ぼす影響については未だ検討されていない。そこで本研究では、近年、寿命などの多様なシグナリングの制御に關与することが報告されている NAD 依存性脱アセチル化酵素である *Sirt1* が、亜鉛欠乏による病態発症にどの様に關与するか解析することを目的とする。

方法

1. モデル動物のデザイン

体重 190~200 g の Sprague-Dawley 系ラット 4 週令、雄（各群 6 匹）に亜鉛欠乏食（亜鉛含量 0%）、亜鉛亜欠乏食（亜鉛含量 0.005%）、亜鉛標準食（亜鉛含量 0.01%）を毎日等量ずつ 6 週間与え、3 日間毎に体重測定を行った。6 週間後に腹部大動脈から採血を行い、血清中の亜鉛及び銅値を測定した。また、肝臓を摘出した後、RNA later に浸漬して RNA 抽出まで -80℃ で凍結保存した。

2. Real-Time RT-PCR

摘出した肝臓から Sepasol-RNA I Super G（ナカライテスク）を用いて Total RNA 抽出を行い、抽出した Total RNA 100 ng から cDNA の調製を行った。調製した cDNA を StepOne リアルタイム PCR（Applied Biosystems）を用い、*Sirt1* の下流にあるとされる遺伝子に着目し解析を行った。解析遺伝子は、酸化ストレスが亜鉛欠乏により誘発されることから、DNA 損傷により誘発される *p21* 及びその下流にある *cyclin D1*。また、肝臓の *Sirt1* が糖代謝に深く關与することから、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（*PEPCK*）、グルコース-6-ホスファターゼ（*G6Pase*）、及びグリコーゲン合成酵素（*GS*）の遺伝子発現解析を行った。内部標準遺伝子としては *Gapdh* を使用した。

結果

1. 各実験群の体重への影響

各実験群の実験開始前と解剖前の体重の変化を表 1 に示した。実験開始 40 日後には亜鉛欠乏食群で、亜鉛亜欠乏食及び亜鉛標準食群に比べて顕著な体重増加の抑制が認められた。

表1. 各実験群の体重変化

Groups	実験前	実験後
0%	209.7 ± 4.6	232.0 ± 3.8**
0.01%	206.8 ± 6.6	331.5 ± 8.6
0.01%	211.0 ± 3.0	338.9 ± 8.4

Asterisk: **p < 0.01 (Tukey-Kramer test) .

2. 各実験群の血清中の亜鉛/銅値

亜鉛欠乏食、亜鉛亜欠乏食群では6週間後の血清中亜鉛値が亜鉛標準食ラットよりも有意に低下し、血清中銅値は亜鉛欠乏食群で有意に増加した(図1A、B)。これは、腸管での栄養素の吸収による影響で、腸管において亜鉛と銅の拮抗作用が崩れたために生じた影響と考えられた。

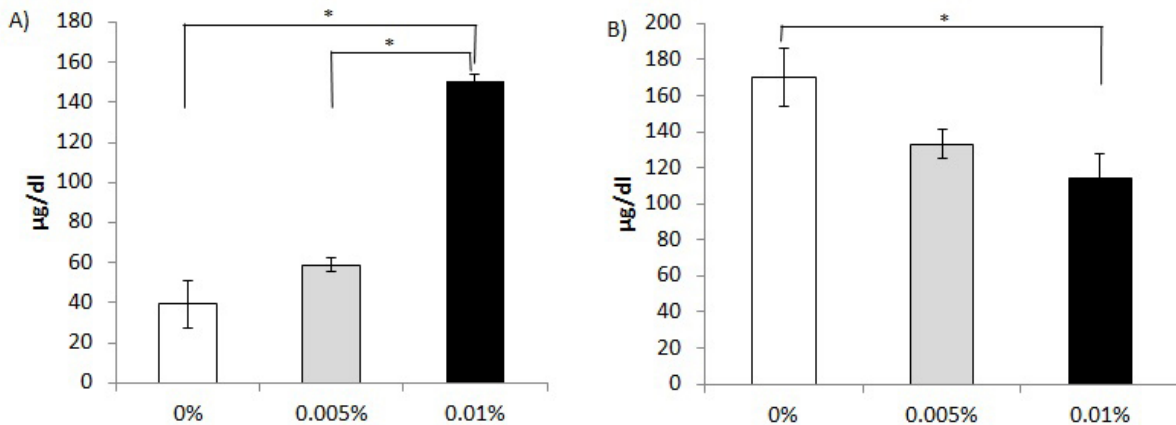


図1. 各実験群における血清中亜鉛/銅値

(A) 血清中亜鉛値、(B) 血清中銅値。Error bar: SE (N = 4/groups). Asterisk: *P < 0.05 (Tukey-Kramer test).

3. 各実験群の肝臓中の遺伝子発現量

亜鉛標準食群に比べ亜鉛欠乏食群で *Sirt1* の有意な発現抑制が認められ、*Cyclin D1*、*PEPCK* 及び *GS* においても亜鉛欠乏食群での有意な発現抑制が認められた(図2)。

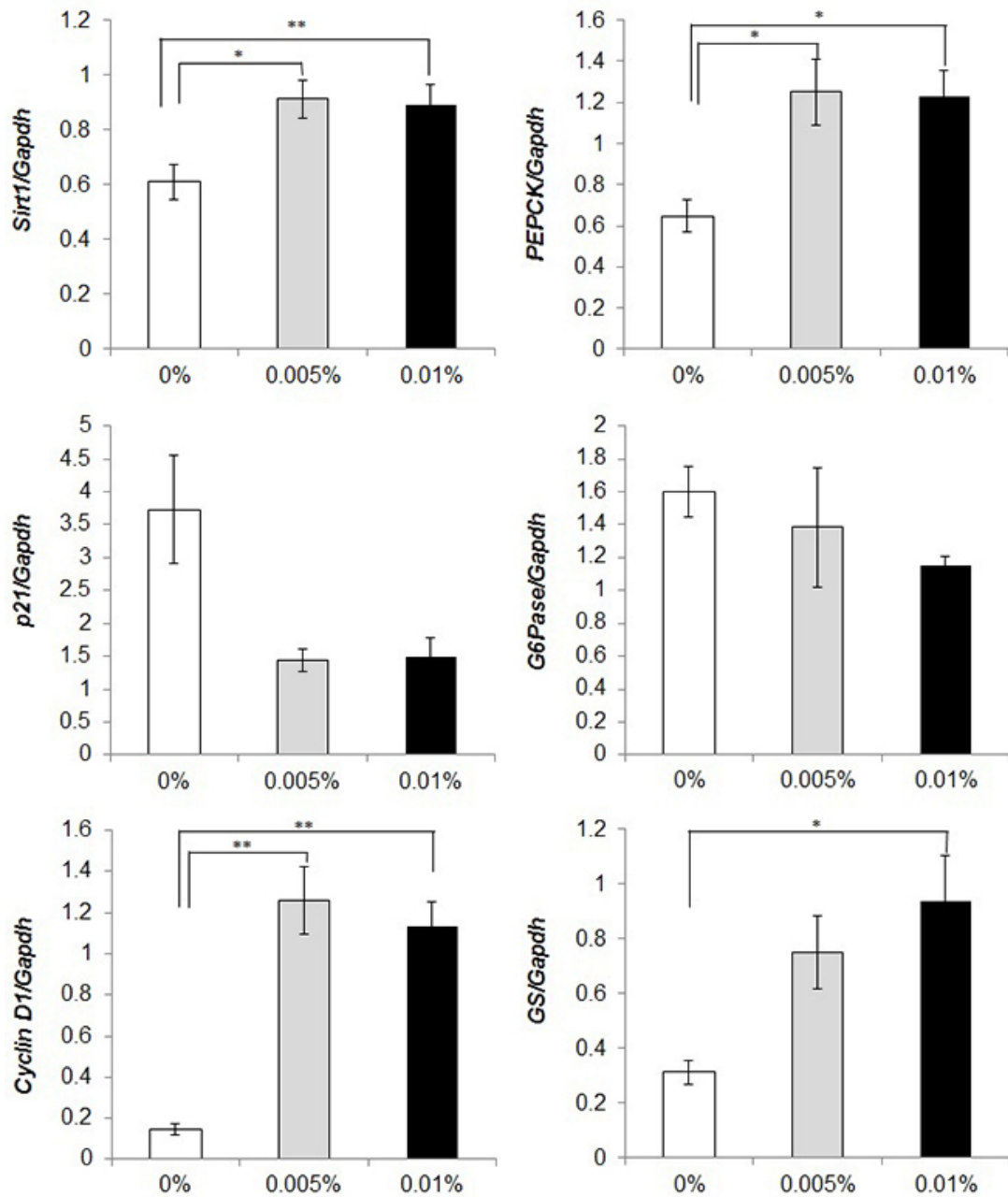


図2. 肝臓における遺伝子発現

Error bar: SE (N = 6/groups). Asterisks: *P < 0.05, **P < 0.01 (Tukey-Kramer test).

4. 各遺伝子発現と *Sirt1* との相関関係

亜鉛欠乏食による *Sirt1* の有意な発現抑制が認められたことから、*Sirt1* の遺伝子発現と各遺伝子との相関分析を行った。その結果、*PEPCK* ($r = 0.808$, $p < 0.0001$) と *GS* ($r = 0.882$, $p < 0.0001$) が極めて高い正の相関を示すことが明らかとなった(図3)。一方、亜鉛欠乏食群で有意な発現抑制が認められた *cyclin D1* の *Sirt1* との相関性は、*PEPCK* や *GS* に比べると低い、正の相関を示した ($r = 0.679$, $p = 0.0029$)。

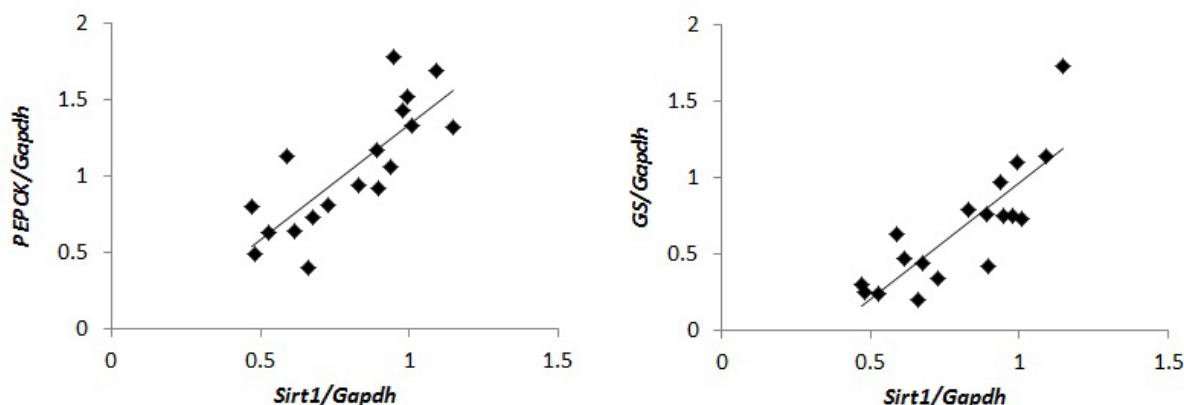


図3. *Sirt1* 遺伝子の発現と高い相関性が認められた遺伝子 (N = 6/groups).

考 察

今回用いた動物実験モデルでは、体重変化や血清中の亜鉛値の低下から、亜鉛欠乏状態にあると確認された。遺伝子発現解析より、亜鉛欠乏食群の肝臓では、亜鉛標準食群に比べ *Sirt1* 遺伝子の有意な発現抑制が認められた。一方、亜鉛亜食群と亜鉛標準食群の間に有意差は認められなかった。また、亜鉛添加量の異なる食餌を与えたラット肝臓中の遺伝子発現の相関分析を行った結果、*Sirt1* と *PEPCK*、*GS* が高い相関性を示すことが明らかとなった。このことから、亜鉛欠乏時に *Sirt1* が糖代謝を制御するこれらの遺伝子の発現に関与していることが示唆された。また、有意差は認められなかったものの、亜鉛欠乏食群で *p21* の発現誘導と同時に *cyclin D1* の発現抑制が認められたことから、亜鉛欠乏による G1/S 期移行の障害が示唆された。*Sirt1* は *PEPCK* の発現を制御する転写因子の一つである forkhead box O1 (FoxO1) の活性化にも関与することから²⁾、*Sirt1* の発現抑制が *PEPCK* の発現抑制に関与している可能性が考えられるが、実際に *Sirt1* のタンパク発現量や *Sirt1* の活性が亜鉛欠乏状態でどのように変化するか更なる解析が必要である。

本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Chen L, Feng Y, Zhou Y, Zhu W, Shen X, Chen K, Jiang H, Liu D. Dual role of Zn²⁺ in maintaining structural integrity and suppressing deacetylase activity of SIRT1. *J Inorg Biochem.* 2010;104:180-185. doi:10.1016/j.jinorgbio.2009.10.021.
- 2) Imai S, Guarente L. Ten years of NAD-dependent SIR2 family deacetylases: implications for metabolic diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2010;31:212-220. doi:10.1016/j.tips.2010.02.003.