

# サイトカイン転写制御における細胞内亜鉛シグナルの役割

— 亜鉛ウェーブを介したシグナル伝達機構 —

内田 亮太<sup>1), 2)</sup>, 西田 圭吾<sup>2)</sup>

1) 江南化工株式会社

2) 鈴鹿医療科学大学 大学院薬学研究科 免疫制御学研究室

## 総 説

## サイトカイン転写制御における細胞内亜鉛シグナルの役割

## — 亜鉛ウェーブを介したシグナル伝達機構 —

内田 亮太<sup>1), 2)</sup>, 西田 圭吾<sup>2)</sup>

1) 江南化工株式会社

2) 鈴鹿医療科学大学 大学院薬学研究科 免疫制御学研究室

キーワード： マスト細胞, 樹状細胞, 亜鉛, サイトカイン, 炎症

## 要 旨

亜鉛は必須微量元素の一つであり、生体機能の維持に重要である。従来、亜鉛はタンパク質の構造形成・維持に必要であることが知られていたが、近年亜鉛は細胞内のシグナル伝達に関与していることが明らかとなりつつある。これまでに、マスト細胞において  $Fc\epsilon RI$  刺激によって細胞質内亜鉛濃度が 5~15 分程度で上昇する現象が見出され、この現象は亜鉛ウェーブと名付けられた。亜鉛ウェーブは細胞内亜鉛シグナルの一種であり、サイトカインの転写を促進する役割を担う。また、マスト細胞では  $Fc\epsilon RI$  刺激の他に、Toll 様受容体 4 (TLR4) 刺激や種々のサイトカイン受容体刺激によってもサイトカイン産生が行われるが、TLR4 やサイトカイン受容体のシグナル経路における亜鉛ウェーブの関与については検討されていなかった。そこで、亜鉛ウェーブの制御機構解明の一環として、 $Fc\epsilon RI$  刺激以外のシグナル経路においても亜鉛ウェーブが関与しているのかを検討した。その結果、亜鉛シグナルは  $Fc\epsilon RI$  の他に TLR4 や IL-33 受容体由来のシグナル経路においても存在することが示された。加えて、亜鉛ウェーブはマスト細胞特異的なシグナル経路ではなく樹状細胞においても存在することが示された。これらの結果は、亜鉛ウェーブが様々な細胞におけるサイトカイン転写の制御機構として機能する可能性を提示した。

## 1. はじめに

亜鉛は生命の維持に必要な成分であり、ヒトにおいては鉄に次いで存在量が多い必須微量元素である。亜鉛は様々なタンパク質の構造形成・維持や酵素の活性化に関与しており、不足した場合、免疫不全や成長不全、味覚障害、皮膚炎、生殖機能低下など広範囲に障害が生じることが知られている<sup>(1,2)</sup>。しかし、近年、亜鉛はタンパク質の構造形成維持や酵素の活性化のみならず、細胞応答におけるシグナル伝達を担っていることが明らかとなりつつある<sup>(3-7)</sup>。

マスト細胞は皮下組織や粘膜組織に広く分布する免疫細胞であり、様々な炎症性物質を放出することで生体防御を担っている<sup>(8)</sup>。体内に寄生虫や花粉のようなアレルゲンが侵入すると抗体産生細胞から immunoglobulin E (IgE) 抗体が産生され、産生された IgE 抗体はマスト細胞の細胞膜にある Fc $\epsilon$  受容体 I (Fc $\epsilon$  RI) に結合する。そして、このマスト細胞に結合した IgE 抗体に抗原が結合して架橋が形成されると、脱顆粒やサイトカイン産生を介して炎症反応が起きる。本稿では主にマスト細胞における細胞内亜鉛シグナルの役割と制御機構について、我々の研究室でのこれまでの知見、及び筆者の研究結果について紹介する。

## 2. 細胞内亜鉛シグナルと Fc $\epsilon$ RI 由来シグナル経路における亜鉛ウェーブについて

### 2-1. 亜鉛シグナルとマスト細胞における抗原刺激依存的な細胞質内亜鉛イオンの増加

細胞内シグナル伝達においてカルシウムイオンがセカンドメッセンジャーとして機能することは古くから知られていた。しかし、亜鉛イオンが細胞内のセカンドメッセンジャーとしての役割を担っていることが知られるようになったのは、我々が知る限りでは免疫担当細胞のマスト細胞を用いた 2007 年の山崎らの報告である<sup>(9)</sup>。亜鉛蛍光標識化合物である Newport Green をマウス骨髄由来マスト細胞（以下、マスト細胞）に取り込ませて、細胞質内の

亜鉛イオン由来の蛍光を蛍光顕微鏡により観察すると、抗原刺激依存的に上昇する現象が見られた (Figure 1A and B)。そして、この分単位で起こる細胞質内亜鉛イオン濃度の上昇は「亜鉛ウェーブ」と名付けられた。

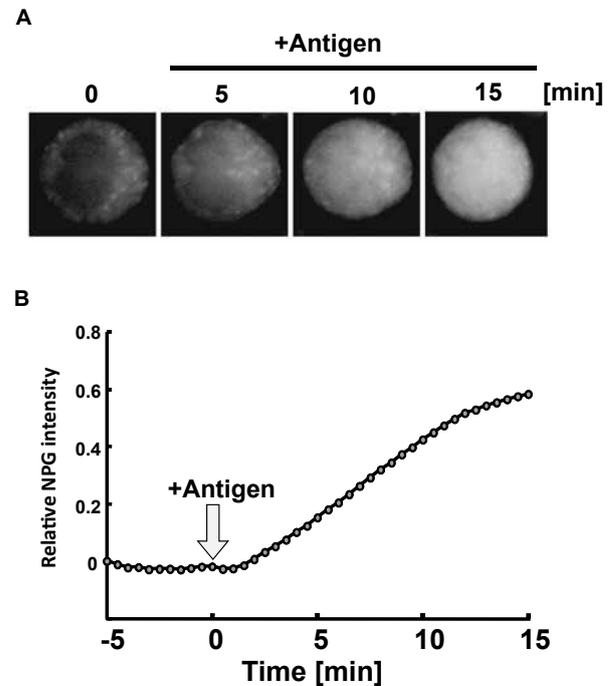


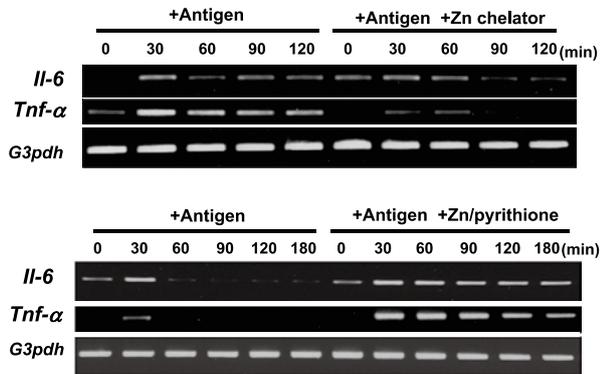
Figure 1 抗原刺激により細胞質内亜鉛イオン濃度が増加する (A) マスト細胞に亜鉛蛍光標識化合物である Newport Green を取り込ませ、蛍光顕微鏡により観察した結果を示した。(B) Newport Green 由来の蛍光強度の相対値をグラフ化した。(文献9より引用、一部改変)

### 2-2. 亜鉛ウェーブのマスト細胞における役割

マスト細胞における亜鉛ウェーブの役割を検討するために、抗原刺激の際に亜鉛を捕捉する亜鉛キレーターである *N, N, N', N'*-tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN) を添加し、炎症性サイトカインである interleukin-6 (IL-6) 及び tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の mRNA の転写率を RT-PCR によって調べた。その結果、亜鉛キレーターの添加により、亜鉛の働きを抑えることで、コントロールに比べて転写時間が短縮されることが確認された。また、抗原刺激と同時に亜鉛イオンを亜鉛イオン透過薬である pyrithione により導入すると、IL-6 及び *Tnf- $\alpha$*  の転写時間が延長した。これらの結果から、亜鉛ウェーブはサイトカインの産生に関わるシグナル伝達を促進的に制御する役割を持つ可能性が示唆された<sup>(9)</sup> (Figure 2)。

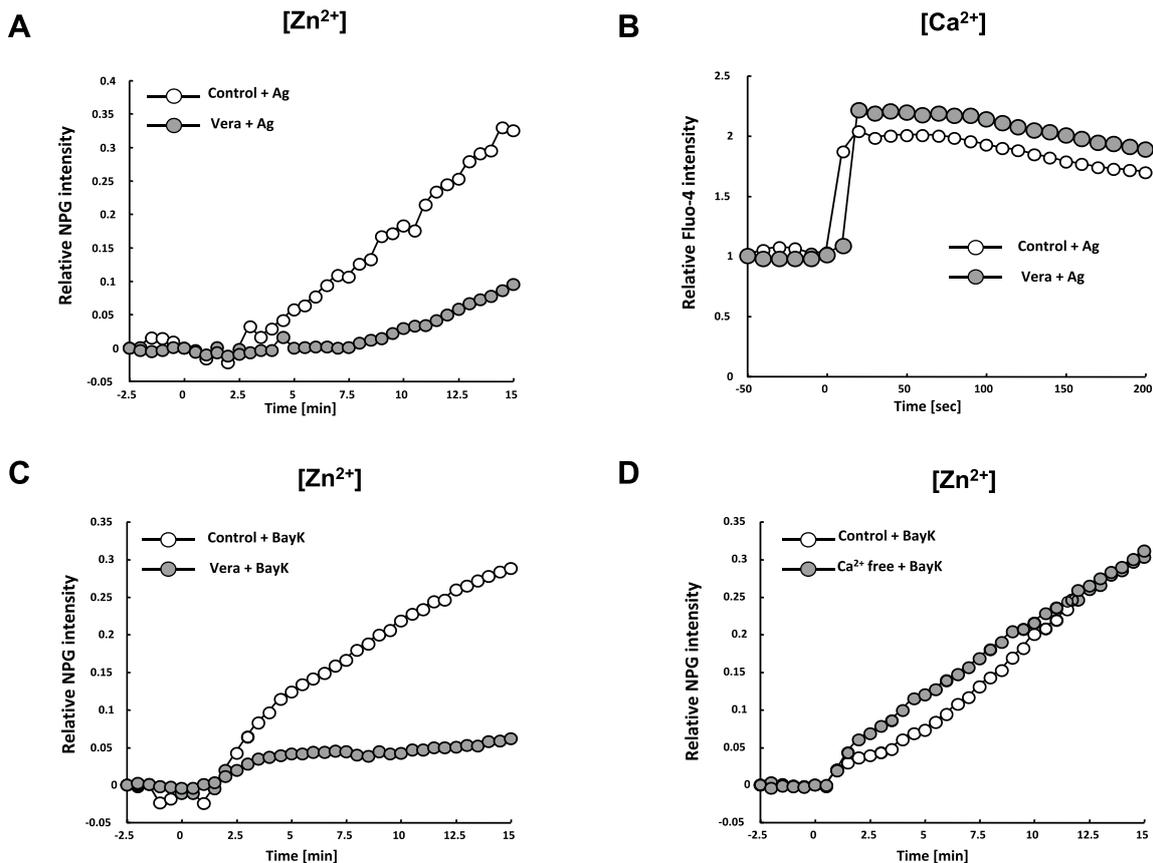
### 2-3. 亜鉛ウェーブの制御分子

亜鉛ウェーブの機構を明らかとする目的で、亜鉛ウェーブがマスト細胞のどの領域から生じているのかを検討した。



**Figure 2 亜鉛はサイトカイン転写を促す役割を持つ**  
 抗原刺激誘導性のサイトカイン転写活性化における亜鉛キレーターの影響及び亜鉛イオン、亜鉛イオン透過薬の添加による影響を RT-PCR によって調べた結果を示した。G3pdh は内部コントロールである。(文献 9 より引用、一部改変)

いくつかの細胞小器官を蛍光標識して共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、亜鉛イオンを検出する Newport Green のシグナルが小胞体 (endoplasmic reticulum; ER) マーカーと一致していることが明らかとなり、このことから亜鉛ウェーブは小胞体から生じていることが示唆された。次に、亜鉛ウェーブの制御分子を探索するために細胞内亜鉛イオンの濃度調節に関与しているチャンネルやトランスポーターを検討した。これら候補分子の中で、L 型カルシウムチャンネル (L-type calcium channel; LTCC) の遮断薬であるベラパミルで前処理した場合、抗原刺激による亜鉛ウェーブが抑制されることが明らかとなった (Figure 3A)。また、この際にカルシウムイオン濃度への影響は見られず (Figure 3B)、マスト細胞において LTCC はカルシウムシグナルへの影響がほとんど無いことが示唆された。さらに、LTCC の刺激薬である (s) - (-) -BayK8644



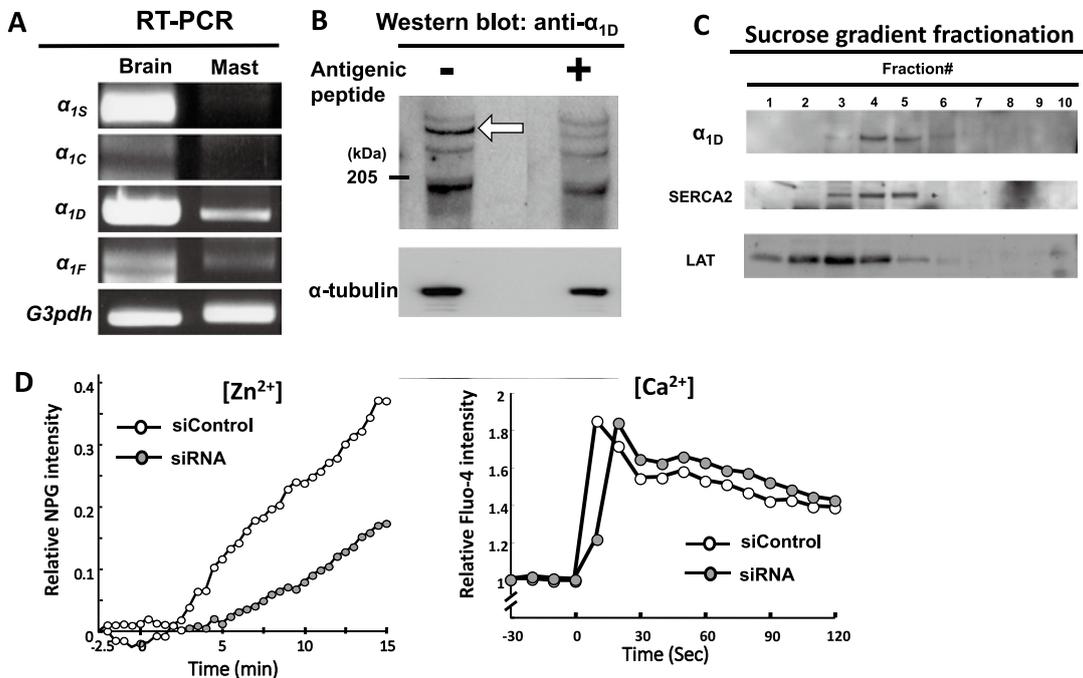
**Figure 3 亜鉛ウェーブの制御分子は LTCC である**  
 (A) 抗原刺激 (Antigen: Ag) 後の細胞質内亜鉛イオン濃度について、LTCC 遮断薬であるベラパミルで前処理した場合の影響を調べた結果である。グラフは、Newport Green の相対蛍光強度を表す。(B) ベラパミル処理による抗原刺激依存性カルシウムイオン濃度上昇への影響を調べた。データは Fluo-4 の相対蛍光強度を表す。(C) LTCC 刺激薬である (s) - (-) -BayK8644 で処理した際の細胞質内亜鉛イオン濃度の変化を示した。(D) カルシウムイオン不含 Tyrode 緩衝液中のマスト細胞を (s) - (-) -BayK8644 で処理したときの細胞質内亜鉛イオン濃度の変化を示した。図中の NPG, Vera, BayK はそれぞれ Newport Green, ベラパミル, (s) - (-) -BayK8644 を表す。(文献 10 より引用、一部改変)

単独の添加によって、亜鉛ウェーブが観察されたが、遮断薬の前処理により刺激薬の効果は消失した (Figure 3C)。刺激薬による亜鉛ウェーブの誘導は細胞外のカルシウムイオンを除去した反応液中でも観察され (Figure 3D)、これらの結果から LTCC が亜鉛ウェーブを直接誘導するチャネルであることが示された。LTCC は、膜内外を連絡する穴であるポアを形成する  $\alpha_1$  サブユニットと  $\beta$ ,  $\alpha_2$  などのアクセサリーサブユニットから構成されている。RT-PCR 及びウエスタンブロットを行った結果、マスト細胞においては 4 種類の  $\alpha_1$  サブユニットのうち  $\alpha_{1D}$  が優位に発現していることが明らかとなった (Figure 4A and B)。さらに、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内の局在を検討したところ、 $\alpha_{1D}$  のシグナルは ER マーカーのシグナルと一致しており、また、スクロース密度勾配による分画においても  $\alpha_{1D}$  は細胞膜ではなく、ER タンパク質の局在する分画に多く存在していた (Figure 4C)。このことから、亜鉛ウェーブは  $\alpha_{1D}$  を介した制御が行われている可能性が考えられた。そこで、 $\alpha_{1D}$  を siRNA でノックダウンし、発

現を抑制したマスト細胞を用いて亜鉛ウェーブを抗原刺激で惹起すると、カルシウムイオンの上昇は正常に起こったが、亜鉛イオンの上昇は低下していた (Figure 4D)。これらの結果から、亜鉛ウェーブの制御分子は小胞体膜上の LTCC であることが強く示唆された<sup>(10)</sup>。

## 2-4. 亜鉛ウェーブの標的

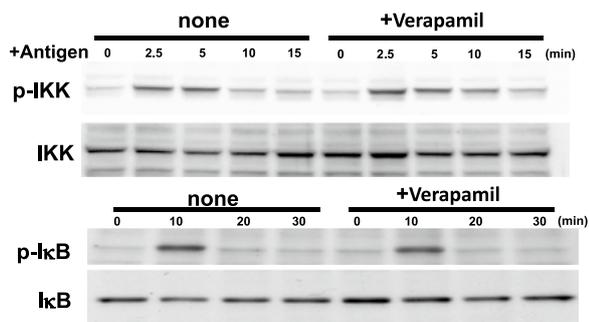
上述の結果から、亜鉛ウェーブのターゲット分子は IL-6 や TNF- $\alpha$  といった炎症性サイトカインの転写に関与している可能性が考えられた。そのため、それらの主要な転写因子である nuclear factor- $\kappa$  B (NF- $\kappa$  B) に着目した。NF- $\kappa$  B は Inhibitor  $\kappa$  B (I $\kappa$  B) と結合している状態ではその活性が抑制されているが、細胞に刺激が入ることにより、I $\kappa$  B キナーゼ (IKK) が活性化し、I $\kappa$  B がリン酸化を経た後、分解されることによって NF- $\kappa$  B が活性化し、核へ移行する。そこで、亜鉛ウェーブの NF- $\kappa$  B の上流因子への影響、NF- $\kappa$  B の核移行への影響及び NF- $\kappa$  B



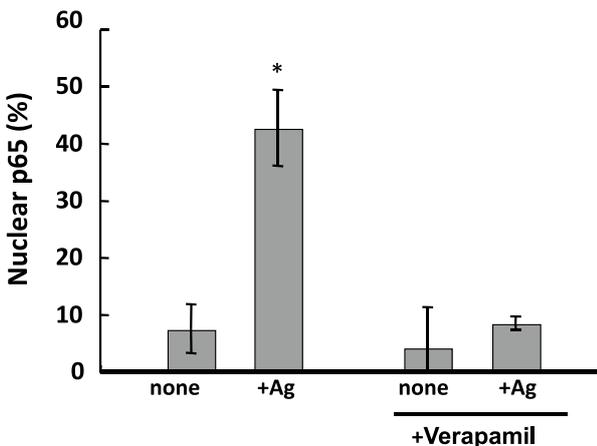
**Figure 4** LTCC の  $\alpha_{1D}$  サブユニットが亜鉛ウェーブの制御に関与している

(A) マスト細胞及び脳組織における LTCC ファミリーメンバーの  $\alpha_1$  サブユニットをコードする mRNA, 及び *G3pdh* の RT-PCR の結果を示している。(B) マスト細胞中の  $\alpha_{1D}$  についてのウエスタンブロットの結果を示した。antigenic peptide + は特異性を確認するために抗  $\alpha_{1D}$  抗体を抗原性ペプチドと共にブレインキュベートした場合の結果である。矢印のバンドが  $\alpha_{1D}$  と推定される。(C) マスト細胞から得られた除核後上清を超速心分離により不連続スクロース勾配で分画した。次いで、収集した画分を SDS-PAGE によって分離し、タンパク質分布を  $\alpha_{1D}$ , SERCA2 (小胞体マーカー), 及び LAT (細胞膜マーカー) に対する抗体を用いて検出した。(D) 左のグラフは抗原刺激時の細胞質内亜鉛イオン濃度をコントロール及び  $\alpha_{1D}$  siRNA 処理マスト細胞で比較した。右のグラフは Fc $\epsilon$ RI 刺激時の細胞内カルシウムイオン濃度を、コントロール及び  $\alpha_{1D}$  siRNA 処理マスト細胞において比較した。(文献 10 より引用、一部改変)

と DNA の結合活性への影響の 3 点について検討した。まず、LTCC 遮断薬で処理したマスト細胞における NF- $\kappa$ B の上流制御因子 (IKK 及び I $\kappa$ B) の活性化への影響をウエスタンブロットで観察すると、コントロールとの差はみられず、亜鉛ウェーブは NF- $\kappa$ B の上流制御因子には影響を与えないことが示された (Figure 5)。次に、マスト細胞の抗原刺激による、NF- $\kappa$ B の核への局在化に対する LTCC 遮断薬の影響を調べてみると、コントロールに比べて LTCC 遮断薬で処理した細胞では NF- $\kappa$ B が核に局在している細胞の割合が低下しており (Figure 6)、亜鉛ウェーブは NF- $\kappa$ B の核への局在を促す働きがあることが示唆された。さらに、NF- $\kappa$ B が核に局在する機序を明らかにするために、亜鉛ウェーブによる NF- $\kappa$ B の核



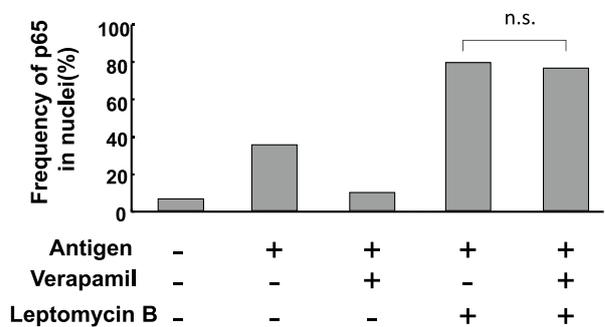
**Figure 5** 亜鉛ウェーブは IKK と I $\kappa$ B の活性化に影響しない  
抗原刺激の際の IKK $\alpha/\beta$  のリン酸化及び I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化と脱リン酸化への亜鉛ウェーブの影響について、LTCC 遮断薬 (ベラパミル) を用いて調べたウエスタンブロットの結果を示した。(文献 10 より引用、一部改変)



**Figure 6** NF- $\kappa$ B の核内への蓄積は亜鉛ウェーブによって増加する

抗原刺激後、抗 NF- $\kappa$ B 抗体及び DAPI を用いて染色して、NF- $\kappa$ B (p65) が核に局在する細胞の頻度を計算してグラフ化した。\* p < 0.05, Student の t 検定。(文献 10 より引用、一部改変)

移行への影響について検討した。NF- $\kappa$ B は輸送タンパク質を介して核の内外を移動している。そこで、核内への移行過程のみを見るために Leptomycin B によって核外への輸送を阻害した。そして、LTCC 遮断薬で処理したマスト細胞において、抗原刺激後に NF- $\kappa$ B が核内に局在する細胞の割合を調べてコントロールと比較した。その結果、両者に差はみられず、亜鉛ウェーブは NF- $\kappa$ B の核内移行には影響していないことが示唆された (Figure 7)。このことから、亜鉛ウェーブは核内移行後のイベントに影響していることが考えられた。



**Figure 7** 抗原刺激による NF- $\kappa$ B の核局在化において、亜鉛ウェーブは核移行の過程には関与していない

マスト細胞をベラパミルで処理し、抗原刺激した際に、エクスポーチン阻害剤である Leptomycin B で処理することによる影響を調べた結果を示した。n.s.: 有意差なし。Student の t 検定。(文献 10 より引用、一部改変)

*In vitro* の実験系で、亜鉛が NF- $\kappa$ B と DNA の親和性に関与することが報告されている<sup>(11)</sup>。そこで、亜鉛ウェーブの NF- $\kappa$ B と DNA の親和性への影響について ELISA によって調べた。その結果、コントロールでは NF- $\kappa$ B と DNA の親和性が抗原刺激依存的に上昇していたが、LTCC 遮断薬で処理した場合、抗原刺激による NF- $\kappa$ B と DNA の親和性の上昇が見られず、抗原刺激と同時に亜鉛イオン透過薬により亜鉛イオンを導入することでこの遮断薬の効果は消失した (Figure 8A)。また、この結果と一致して、LTCC 遮断薬によってサイトカイン産生が低下し、亜鉛イオン透過薬による亜鉛イオンの導入によって回復することが示された (Figure 8B)。これらの結果から亜鉛ウェーブは NF- $\kappa$ B と DNA の親和性を高めることでサイトカインの転写を促進的に制御していることが示唆された。以上の結果をまとめた亜鉛シグナル制御経路の図を Figure 9 に示した。

### 3. Toll 様受容体 4 および IL-33 受容体由来のシグナル経路における亜鉛ウェーブの制御機構

上述のように亜鉛ウェーブは FcεRI 由来のシグナル経路におけるサイトカインの転写調節に関与していることが示されている。しかし、マスト細胞のサイトカイン産生は FcεRI のみならず LPS をリガンドとする Toll 様受容体 4 (TLR4) やサイトカイン受容体などの刺激によっても行わ

れる。そこで、亜鉛ウェーブは TLR4 や IL-33 受容体由来のシグナル経路に関与しているのかを検討した。まず、TLR4 及び IL-33 受容体の刺激に反応して細胞質内亜鉛イオンの濃度が変化するかを調べた。細胞質内亜鉛イオン濃度の変化は、Newport Green を用いて、フローサイトメーターによって測定した。Figure 10A に示すように、FcεRI 刺激 15 分後においてマスト細胞における細胞質内亜鉛イオン濃度の上昇が確認できた。そして、LTCC 遮断薬であるニカルジピンはこの上昇を有意に抑制した。

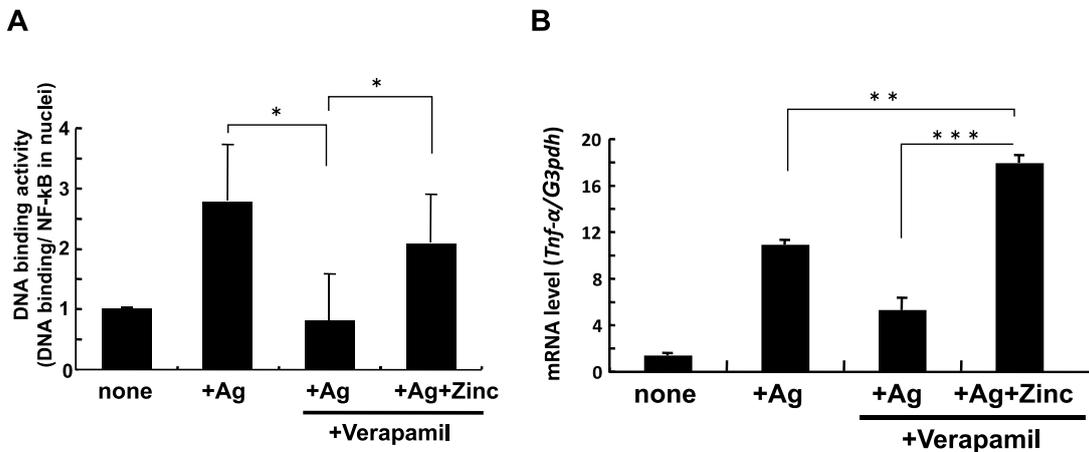


Figure 8 亜鉛ウェーブは NF-κB の DNA との結合能を高めている (A) ELISA によって固相化した標的 DNA に結合した NF-κB の割合を算出した。(B) RT-PCR によって *Tnf-α* の mRNA の定量を行った。Ag: Antigen. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, Bonferroni の補正を使用した Student の t 検定。(文献 10 より引用、一部改変)

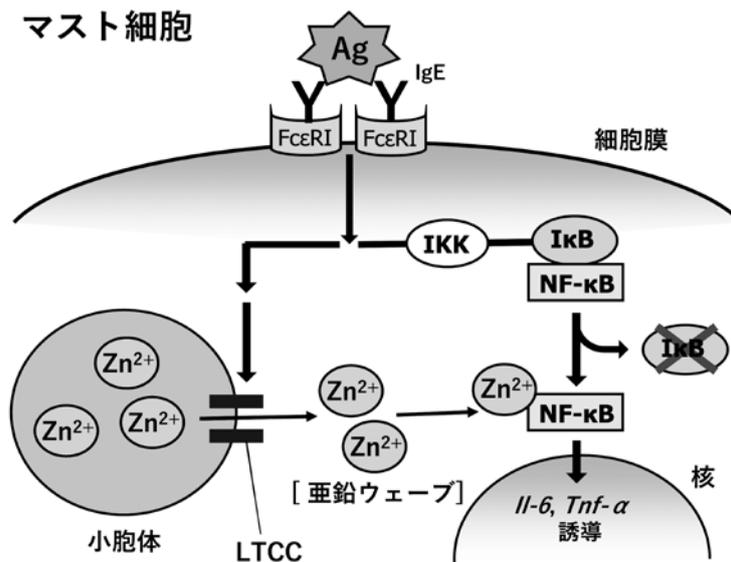


Figure 9 マスト細胞における亜鉛ウェーブのシグナル経路 FcεRI に結合した状態の IgE に抗原 (Ag: Antigen) が結合することで FcεRI からシグナルが開始される。また、サイトカイン転写因子である NF-κB は IKK を介した経路によって活性化することが知られている。亜鉛ウェーブによって放出された亜鉛は NF-κB に結合することで NF-κB の転写活性を増強させていると考えられている。(文献 12 より引用、一部改変)

同様に、30 分間の TLR4 及び IL-33 受容体刺激においても亜鉛イオン濃度の上昇が見られ、ニカルジピン処理によって有意に抑制された (Figure 10B and C)。これらの結果は、TLR4 およびサイトカイン受容体刺激によって亜鉛ウェーブが誘導されることを示している。次に、TLR4 及び IL-33 受容体刺激で見られる亜鉛ウェーブについて、Fc ε RI 刺激で見られる亜鉛ウェーブと同様にサイトカイン転写及び産生に関与しているかを調べた。マスト細胞をニカルジピン処理することで、TLR4 及び IL-33 受容体依存性の IL-6 産生がそれぞれ用量依存的に抑制された (Figure 11A and B)。このことから、IL-6 の産生過程において LTCC が関与していることが示された。また、亜鉛キ

レーターを用いてマスト細胞のサイトカイン産生における亜鉛の関与を調べた。その結果、TLR4 及び IL-33 受容体依存性 IL-6 産生は、TPEN 処理されたマスト細胞において有意に抑制され、この過程において亜鉛が必要であることが示された (Figure 11A and B)。これらの結果は、亜鉛ウェーブがマスト細胞における TLR4 及び IL-33 受容体依存性のサイトカイン産生にそれぞれ関与することを示している<sup>(12)</sup>。さらに、TLR4 及び IL-33 受容体依存性の *IL-6* の転写に亜鉛ウェーブが関与しているかを定量 RT-PCR により調べた。その結果、ニカルジピン処理及び TPEN 処理により *IL-6* の転写率が有意に抑制され、Fc ε RI 依存性亜鉛ウェーブと同様の結果が確認された (Figure 11C and D)。

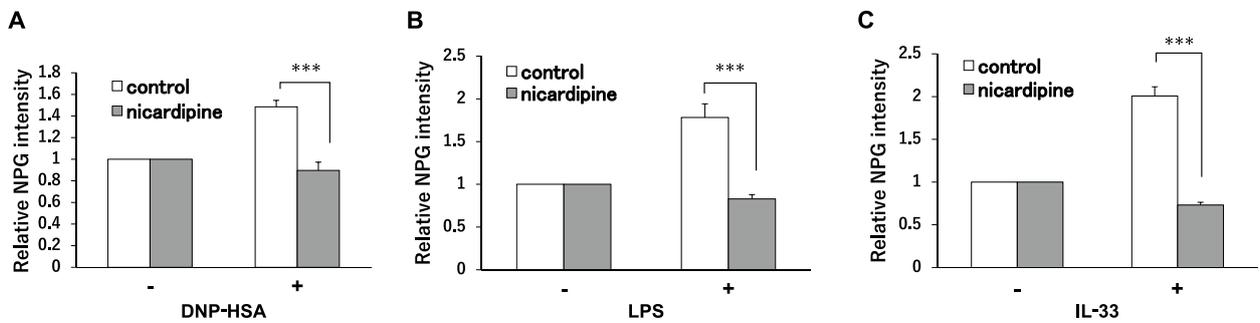


Figure 10 Fc ε RI、TLR4 及び IL-33 受容体刺激により亜鉛ウェーブが誘導される

抗原刺激の 15 分後 (A)、LPS 刺激の 30 分 (B) 及び IL-33 刺激の 30 分後 (C) の細胞質内亜鉛イオン濃度を、Newport Green を用いて調べた。また、ニカルジピンで前処理した場合においても同様に行った。データは、Newport Green の相対蛍光強度を表す。\*\*\* p < 0.001、Student の t 検定。(文献 12 より引用、一部改変)

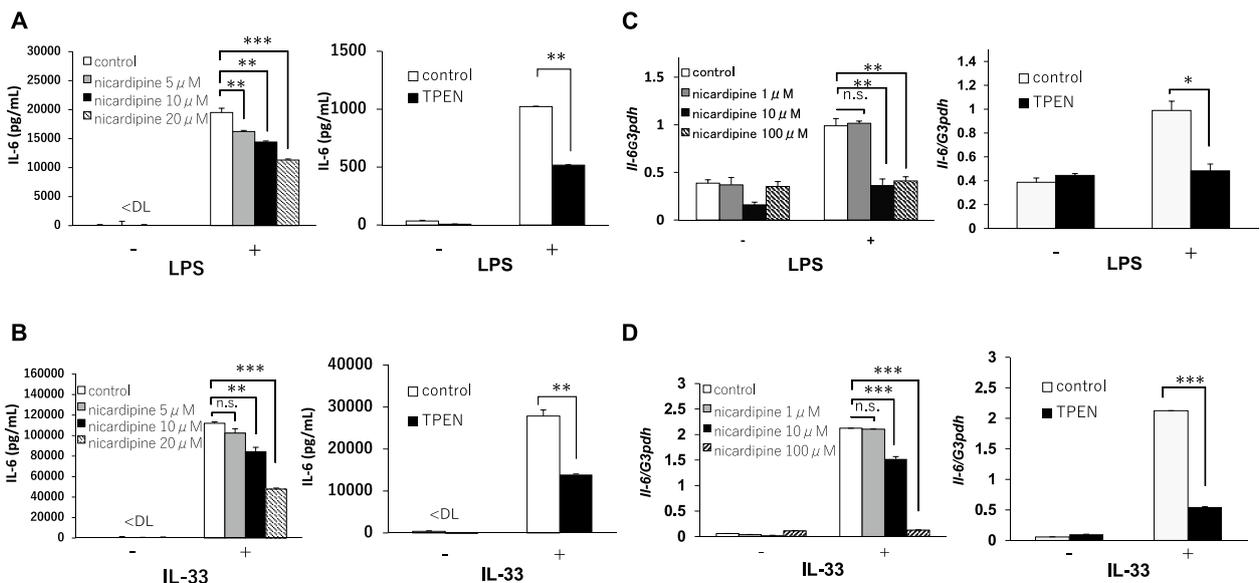


Figure 11 TLR4 及び IL-33 受容体刺激誘導性 IL-6 産生に亜鉛ウェーブが関与している

LPS で 6 時間 (A) 及び IL-33 で 12 時間 (B) それぞれインキュベートし、IL-6 の産生量を ELISA によって測定した。また、ニカルジピン及び TPEN で処理した場合も同様に行った。(C) (D) は RT-PCR によって刺激 1 時間後の *IL-6* の転写率を測定した結果である。\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, Tukey の検定, Student の t 検定。検出限界以下, <DL, below detection limit。(文献 12 より引用、一部改変)

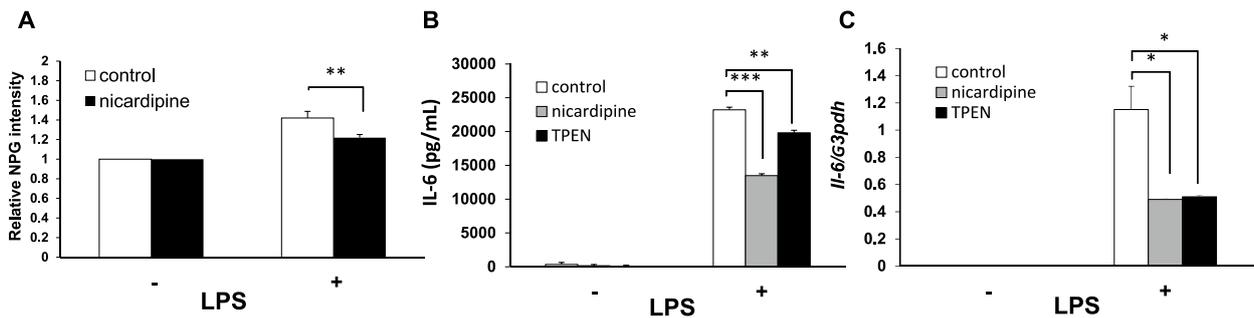


Figure 12 樹状細胞においても亜鉛ウェーブによるサイトカイン転写制御が行われている

(A) LPSで2時間刺激後の細胞質内亜鉛イオン濃度を、ニカルジピンで前処理した場合及び無処理の場合において調べた。データは、Newport Greenの相対蛍光強度を示している。(B) ニカルジピンまたはTPENによる前処理を行った場合及び無処理の場合での、LPS刺激の3時間後のIL-6産生量をELISAによって測定した。(C) ニカルジピンまたはTPEN前処理及び無処理の場合での、LPS刺激の3時間後のIL-6転写率を、定量的RT-PCRによって決定した。  
\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , Tukeyの検定, Studentのt検定。(文献12より引用, 一部改変)

#### 4. マスト細胞以外における亜鉛ウェーブの存在

マスト細胞で観察される亜鉛ウェーブはTLR4やIL-33受容体由来のシグナル経路にも関与していることが示された。TLRやサイトカイン受容体はマスト細胞以外にも様々な細胞に発現しているため、サイトカインを産生し、これらの受容体を発現している細胞においても亜鉛ウェーブの関与する経路が存在している可能性が考えられた。そこで、自然免疫を担当しておりTLR4を発現しているマウス骨髄由来樹状細胞(以下、樹状細胞)において亜鉛ウェーブの関与する経路が存在しているのかを調べた。Figure 12Aに示すように、LPSは樹状細胞において2時間後に亜鉛ウェーブを誘発し、Newport Greenシグナルの上昇は、ニカルジピン処理によって有意に抑制された(Figure 12A)。この結果と一致して、LPS誘導性IL-6産生もニカルジピン及びTPEN処理によって抑制され、IL-6転写や産生においてもニカルジピン及びTPEN処理によって抑制されることが確認された(Figure 12B and C)。これらの結果から、亜鉛ウェーブはマスト細胞だけではなく樹状細胞においても誘導され、サイトカイン産生に関与していることが示唆された<sup>(12)</sup>。

次に、サイトカインが生体内で誘導されるマウス敗血症モデルを用いて、*in vivo*でのニカルジピンによるサイトカイン産生の抑制効果を調べた。マウスに生理食塩水またはニカルジピン(50 mg/kg)を3日間連続して腹腔内注射し、3日目に生理食塩水またはニカルジピンによる最後の注射後、LPS(0.5 mg/kg)を注射した。血清

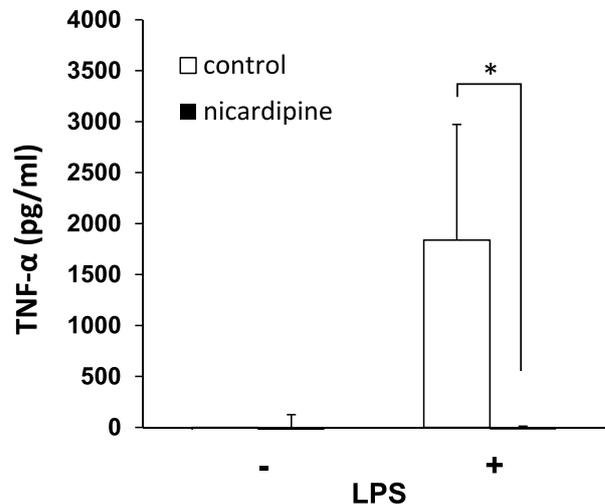


Figure 13 敗血症モデルにおいてニカルジピンはTNF- $\alpha$ の産生を抑制する

コントロールまたはニカルジピン投与マウスにLPSを腹腔内投与し、1時間後の血清中TNF- $\alpha$ 濃度を測定した。 $* p < 0.05$ , Studentのt検定。(文献12より引用, 一部改変)

中のサイトカインの濃度はELISAで測定した。Figure 13に示すように、LPS注射1時間後のTNF- $\alpha$ の血清レベルは、ニカルジピン投与マウスにおいて有意に抑制された。この結果は、亜鉛ウェーブが*in vivo*においてもLPS誘導性サイトカイン産生制御に役割を果たす可能性を示唆した。また、生体内にはマスト細胞以外にマクロファージなどのサイトカイン産生細胞が存在しており、今回の結果は複数種のサイトカイン産生細胞においてLTCCを介したサイトカイン産生調節機構が存在する可能性を提示した。

## 5. おわりに

本稿では細胞内亜鉛シグナルの一種である亜鉛ウェーブについてこれまで明らかとなっている知見を述べた。従来、亜鉛ウェーブは  $Fc\epsilon RI$  由来のシグナル経路においてサイトカインの転写調節に関与していることが示されていた。これに加えて、筆者らの研究結果より、マスト細胞において TLR やサイトカイン受容体由来のシグナル経路においても関与していることが示された。また、マスト細胞の他にも自然免疫を担当する樹状細胞に存在していることも確認できた。これらの結果は、亜鉛ウェーブの経路が様々な細胞におけるシグナル経路に関与している可能性を示唆し、亜鉛ウェーブを介するシグナル経路の解明につながるものといえる。今後さらに解明が進み、亜鉛ウェーブの経路を介した炎症性疾患の人為的制御などへの応用も期待したい。

## 6. 参考文献

- (1) Prasad AS. Discovery of human zinc deficiency: impact on human health. *Nutrition*. 2001; 17: 685-687.
- (2) Hambidge M. Human zinc deficiency. *J Nutr*. 2000; 130: 1344S-1349S.
- (3) Hirano T, Murakami M, Fukada T, Nishida K, Yamasaki S, Suzuki T. Roles of zinc and zinc signaling in immunity: zinc as an intracellular signaling molecule. *Adv Immunol*. 2008; 97: 149-176.
- (4) Fukada T, Yamasaki S, Nishida K, Murakami M, Hirano T. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. *J Biol Inorg Chem*. 2011; 16: 1123-1134.
- (5) Nishida K, Uchida R. Regulatory mechanism of mast cell activation by zinc signaling. *Yakugaku Zasshi*. 2017; 137: 495-501.
- (6) Nishida K, Uchida R. Role of zinc signaling in the regulation of mast cell-, basophil-, and T cell-mediated allergic responses. *J Immunol Res*. 2018; 5749120.
- (7) Nishida K, Yamasaki S. Zinc signaling by "Zinc wave". In :zinc signals in cellular functions and disorders. (Fukada T and Kambe T. eds), Springer, 89-109, 2014.
- (8) Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol.*; 6: 135-142.
- (9) Yamasaki S, Sakata-Sogawa K, Hasegawa A, Suzuki T, Kabu K, Sato E, et al. Zinc is a novel intracellular second messenger. *J Cell Biol*. 2007; 177: 637-645.
- (10) Yamasaki S, Hasegawa A, Hojyo S, Ohashi W, Fukada T, Nishida K, et al. A novel role of the L-type calcium channel  $\alpha 1D$  subunit as a gatekeeper for intracellular zinc signaling: zinc wave. *PLoS One*. 2012; 7: e39654.
- (11) Zabel U, Schreck R, Baeuerle PA. DNA binding of purified transcription factor NF-kappa B. Affinity, specificity,  $Zn^{2+}$  dependence, and differential half-site recognition. *J Biol Chem*. 1991; 266: 252-260.
- (12) Uchida R, Xiang H, Arai H, Kitamura H, Nishida K. L-type calcium channel-mediated zinc wave is involved in the regulation of IL-6 by stimulating non-IgE with LPS and IL-33 in mast cells and dendritic cells. *Biol Pharm Bull*. 2019; 42: 87-93.

# **Role of intracellular zinc signal in cytokine transcription regulation**

—Signal transduction mechanism via Zinc wave—

Ryota UCHIDA<sup>1), 2)</sup>, Keigo NISHIDA<sup>2)</sup>

1) Konan Chemical Manufacturing Co., Ltd ,

2) Laboratory of Immune Regulation, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,  
Suzuka University of Medical Science

**Key words:** mast cells, dendritic cells, zinc, cytokines, inflammation

---

## **Abstract**

Zinc is one of the essential trace elements that plays a significant role in maintaining normal biological functions. Zinc has been known to be required for the formation and maintenance of protein structures. In recent years, it has become clear that it is also involved in intracellular signal transduction.

Cytoplasmic zinc concentration was found to rapidly rise following the stimulation of FcεRI in mast cells. This phenomenon, termed “Zinc wave”, is an important player in intracellular zinc signaling and has been shown to positively regulate cytokine gene transcription. Cytokine induction also occurs through Toll-like receptor 4 (TLR4) and various cytokine receptors in mast cells, but whether Zinc wave is involved in these signaling pathways has not been investigated.

To further our understanding of the mechanism of Zinc wave signaling, we examined whether Zinc wave is also involved in non-FcεRI-mediated signaling pathways. Our results showed that Zinc wave is also triggered in response to TLR4 and IL-33 receptor stimulation. In addition, we observed Zinc wave phenomenon in dendritic cells, which suggests that Zinc wave is involved in the regulation of cytokine induction in a variety of immune cells.

略 歴

---

**内田 亮太** (博士 [薬学]) 江南化工株式会社 研究員

学 歴 :

平成27年 鈴鹿医療科学大学 薬学部 薬学科 卒業

31年 鈴鹿医療科学大学 大学院薬学研究科 医療薬学専攻 博士課程 修了

職 歴 :

平成31年 江南化工株式会社 研究員

受賞歴 :

平成27年 第62回日本薬学会東海支部総会 優秀発表賞

30年 第6回メタロミクス研究フォーラム 実行委員長特別賞

学会活動 :

日本薬学会 (正会員)

主な研究内容 :

- (1) 細胞内亜鉛シグナルに関する研究
- (2) ヒトエグザ抽出物に関する研究