

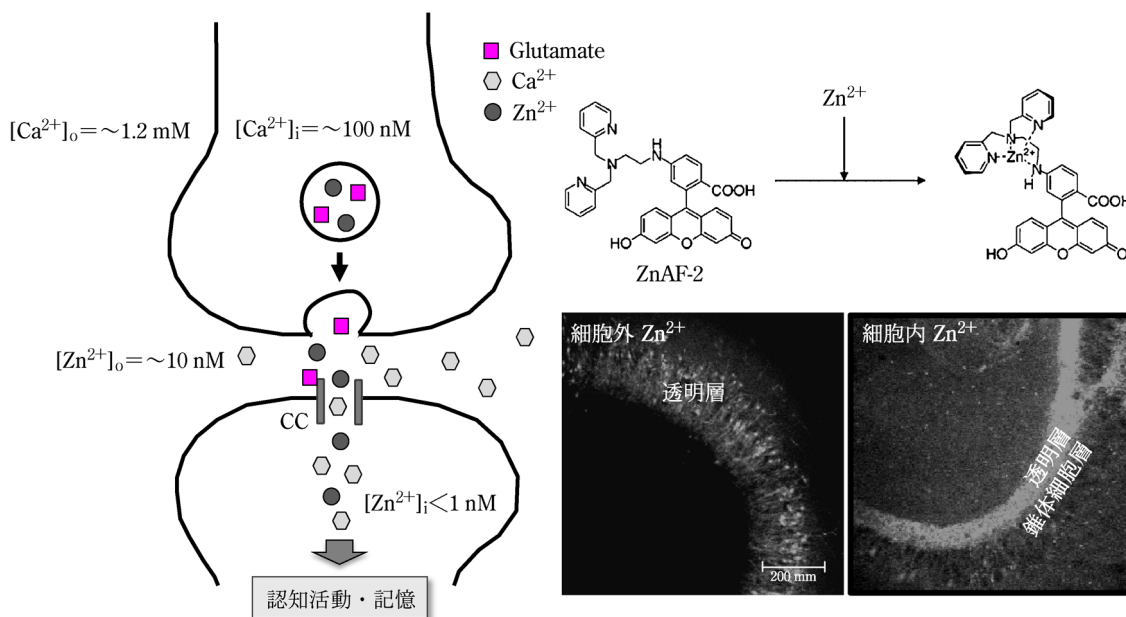
## 亜鉛イオンとカルシウムイオンの動態分析からみた脳機能解析

武田 厚 司

### 1 はじめに

成人のカルシウムと亜鉛の含有量はそれぞれ約 1 kg (体重の 1~2%) と約 2.3 g であり、血漿濃度はそれぞれ 2.5 mM と 15  $\mu$ M である。血漿中ではカルシウムは約 50% が遊離のイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) であるが、亜鉛イオン ( $\text{Zn}^{2+}$ ) の割合は極めて低く、1 nM 以下である。カルシウムと亜鉛は極めて多数のタンパク質との相互作用を介して生体機能に関与し、両金属の生体ホメオスタシスは健康を維持する上で不可欠である。しかし、亜鉛のホメオスタシスは、どのように維持されているのか、その調節ホルモンは知られておらず、カルシウムと比べて不明な点が多い。カルシウムは亜鉛と比べてタンパク質との親和性が低く、定常状態での細胞内 (細胞質)  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は数十 nM~100 nM であり (図 1)、細胞外シグナルにより細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇すると、セカンドメッセンジャーとして機能することは周知の事実である。これに対して、定常状態での細胞質  $\text{Zn}^{2+}$  濃度は 1 nM 以下であり (図 1)、同様に細胞外シグナルにより

細胞質  $\text{Zn}^{2+}$  濃度が上昇すると、 $\text{Ca}^{2+}$  のようにセカンドメッセンジャーとして機能することが認識されつつある。すなわち、 $\text{Zn}^{2+}$  は亜鉛結合タンパク質に結合し、シグナリングにより機能すると考えられる。しかし、カルシウム結合タンパク質であるカルモジュリンのようなタンパク質の活性を制御する亜鉛結合タンパク質は知られていない。亜鉛酵素として知られるプロテインキナーゼ C には、その活性化に  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを必要とするサブタイプがあるが、 $\text{Zn}^{2+}$  シグナリングの必要性は認識されていない。 $\text{Ca}^{2+}$  シグナリングの機能解析はその分析技術の発展とともに進んできたが、最近における  $\text{Zn}^{2+}$  シグナリングの機能解析も同様であり、その進展は分析技術に依存する。本稿では、シナプス機能におけるカルシウムチャンネルを介した  $\text{Zn}^{2+}$  シグナリングの生理的役割と病態との関わりについて、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナリングと比較しながら、亜鉛蛍光プローブ ( $\text{ZnAF-2}$  など) を用いた筆者らの研究成果に基づいて概説する。



神経細胞内外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度と  $\text{Zn}^{2+}$  濃度は定常時である。シナプス興奮時のカルシウムチャンネル(CC)を介したクロストークはシナプス後神経とシナプス前神経で起こる (左図)。 $\text{Zn}^{2+}$  蛍光プローブである  $\text{ZnAF-2}$  (右図上) による定常時細胞内外の濃度は亜鉛作動性苔状線維が存在する透明層で高い (右図下)。

図 1 亜鉛作動性シナプスにおける  $\text{Zn}^{2+}$  のカルシウムチャンネルを介した  $\text{Ca}^{2+}$  とのクロストーク (左) と海馬 CA3 における細胞外と細胞内の  $\text{ZnAF-2}$  蛍光

## 2 亜鉛は脳内へ輸送され海馬などに高く集積する

消化管（主に小腸上部）から吸収された亜鉛は血漿中では大部分がアルブミン等のタンパク質に結合し、1~2%程度がヒスチジン等のアミノ酸あるいは低分子物質と結合する。 $Zn^{2+}$ は血液脳関門を介して脳内に移行する。血液脳関門を形成する血管内皮細胞に発現する亜鉛トランスポーター等を介して $Zn^{2+}$ は脳細胞外液に移行する。また、 $Zn^{2+}$ は脈絡叢上<sup>みやくらうそう</sup>衣細胞に取り込まれ、血液脳脊髄液関門を介して脳脊髄液に移行する。 $Zn^{2+}$ の脳内移行のメカニズムは明らかにされていないが、 $^{65}ZnCl_2$ を用いた実験では、 $^{65}Zn$ は静注後約6日後に最も多く取り込まれ、その後ゆっくりと減少する（生物学的半減期：ラットの脳では16~42日）。大脳皮質では多数の皮質領域を結ぶネットワークが思考や記憶などの高次機能を営む。その内側面にある海馬は記憶と関係し、ストレス応答に重要な役割を担う。 $^{65}Zn$ は大脳皮質、海馬、扁桃<sup>へんとうたい</sup>体に高く集積するが、この集積は学習・記憶ならびに情動行動などの精神活動と関係すると考えられる。また、歯状回における $^{65}Zn$ の高い集積性は神経新生と関係すると考えられる。これらはバイオイメージングアナライザーによる解析結果である。

実験動物に慢性的に亜鉛欠乏食を与えると、脳細胞外亜鉛濃度は通常食群と比べて低下する。また、海馬の亜鉛濃度も低下する。脳の成長期（授乳期など）に亜鉛欠乏食で一定期間飼育すると、脳の成長に必要な亜鉛供給が不足するため、脳機能の発達は障害される。また、脳機能を維持するために亜鉛の脳内移行は成長後も必要である（成人における1日あたりの亜鉛摂取量として約10 mgが推奨されている）。

## 3 シナプス興奮時には $Zn^{2+}$ はカルシウムチャンネルを介して $Ca^{2+}$ とクロストークする

神経終末に活動電位が伝わると、電位依存性カルシウムチャンネルを介した細胞内 $Ca^{2+}$ シグナリングにより、シナプス小胞内の神経伝達物質は開口放出される。神経伝達物質はシナプス後神経ならびにシナプス前神経の受容体と結合し、その情報を細胞内に伝達する。 $Ca^{2+}$ を流入させる受容体とチャンネルを介した、ならびに細胞内カルシウムストアを介した $Ca^{2+}$ シグナリングはシナプス機能に不可欠である。一方、グルタミン酸作動性神経にはシナプス小胞内に亜鉛を高濃度で含むもの（亜鉛作動性神経）があり、神経活動に伴いグルタミン酸とともに $Zn^{2+}$ はシナプス間隙に放出される（図1）。亜鉛蛍光プローブと共焦点レーザー顕微鏡などを用い、 $Zn^{2+}$ 動態とその生理的意義が明らかになりつつある。グルタミン酸受容体サブタイプである $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-

methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) 受容体が活性化されると、 $Zn^{2+}$ はカルシウムチャンネルを介して速やかにシナプス後神経に取込まれる（図1）。 $Zn^{2+}$ はカルシウム透過型AMPA受容体のチャンネルを介して細胞内に流入する。*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体や電位依存性カルシウムチャンネルを介しても細胞内に流入するが、これらに対しては $Ca^{2+}$ チャンネルブロッカーとしても作用する。また、 $Zn^{2+}$ はシナプス前神経にも電位依存性カルシウムチャンネルなどを介して取り込まれ、細胞内 $Ca^{2+}$ シグナリングを介したグルタミン酸開口放出において負のフィードバックに関与する。すなわち、 $Zn^{2+}$ はカルシウムチャンネルを介して $Ca^{2+}$ シグナルとクロストークし、グルタミン酸シグナルを介したシナプス興奮を調節すると考えられる。

## 4 脳細胞外液 $Zn^{2+}$ 濃度は神経活動と密接に関係する

インビボマイクロダイアリシス法により、海馬細胞外において $Zn^{2+}$ 濃度を増加させると、定常状態ならびにグルタミン酸作動性神経興奮時の細胞外グルタミン酸濃度が減少する。その一方で、海馬細胞外 $Zn^{2+}$ 濃度の増加は $\gamma$ -amino butyric acid (GABA)濃度を増加させる。 $Zn^{2+}$ はGABAトランスポーター( $GAT4; K_i, 3 \mu M$ )を阻害する。 $GAT4$ は亜鉛作動性シナプスが存在する海馬CA1やCA3で発現しており、 $Zn^{2+}$ による $GAT4$ 阻害は細胞外GABA濃度を上昇させるため、グルタミン酸興奮毒性の抑制に関与すると考えられる。また、 $Zn^{2+}$ はGABA作動性神経に存在するAMPA/kainate受容体活性化を増強することから、GABA放出に促進的に働くと考えられる。

一方、海馬スライス調製に伴いTimm's染色で検出されるシナプス小胞内亜鉛が減少することが報告されている。これに関係してか、CA1 long-term potentiation (LTP)における $Zn^{2+}$ の作用は*in vitro*と*in vivo*で異なる。*in vitro*では $5 \mu M ZnCl_2$ をスライス外液に添加するとLTPは増強される一方で、インビボでは $0.1 \mu M ZnCl_2$ で記録部位を灌流すると減弱される。 $Zn^{2+}$ の作用解析は*in vivo*で行うことが重要であると考えられる。定常時脳細胞外 $Zn^{2+}$ 濃度は約10 nMと推定されているが（図1）、この濃度が10倍程度に増加して一定期間維持されると、LTPは減弱することになる。しかし、亜鉛作動性シナプスにおいて学習・記憶時（LTP誘導時）には、シナプス間隙 $Zn^{2+}$ 濃度はごく短時間マイクロモル濃度に達するとも考えられる。

スライス実験などに用いられる脳細胞外液（人工脳脊髄液）には二価カチオンとして $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ は含まれている。しかし、 $Zn^{2+}$ は含まれていない。20 nM  $Zn^{2+}$ を添加した細胞外液中で1時間脳スライスを処理すると、グルタミン酸作動性神経の興奮性が低下することが

ら、10 nM 程度の  $Zn^{2+}$  を実験で使用する脳細胞外液に添加する必要があると考えられる。また、インビトロでの正確な神経活動解析のため、 $Cu^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$  の必要性についても検討することが望まれる。

## 5 $Zn^{2+}$ シグナリングはシナプス可塑性、学習・記憶に関与する

記憶の分子基盤であるシナプス可塑性は海馬で盛んに研究されている。海馬三シナプスである貫通線維シナプス、<sup>たけ</sup>苔状線維シナプス、シャーフアー側枝シナプスはいずれも亜鉛作動性神経を含む。苔状線維はすべてが、シャーフアー側枝は約 50 % が亜鉛作動性であり、貫通線維はほとんどシナプス小胞に亜鉛を含まず、内側貫通線維は亜鉛非作動性である。苔状線維シナプスが存在する透明層では、細胞外ならびに細胞質 ZnAF-2 ( $K_d = 2.7$  nM) 蛍光が強く観察される (図 1)。亜鉛作動性シナプスの細胞内外の  $Zn^{2+}$  レベルは亜鉛非作動性シナプスと比べて高いと考えられる。

シナプス可塑性として知られる長期増強 (LTP) と長期抑圧 (long-term depression: LTD) はシナプス伝達効率をそれぞれ上昇と低下させるが、この正反対の現象は、NMDA 受容体依存性のシャーフアー側枝シナプスではシナプス後神経 (CA1 錐体細胞) の NMDA 受容体を介した  $Ca^{2+}$  流入が鍵となる。すなわち、シナプス興奮に伴う  $Ca^{2+}$  シグナリングレベル (上昇濃度) により LTP か LTD が決定される。

細胞膜透過型  $Zn^{2+}$  蛍光プローブである ZnAF-2DA は細胞内に取込まれると、脱アセチル化され細胞膜不透過型 ZnAF-2 となり、細胞内で  $Zn^{2+}$  をキレートする。この性質を利用し、ZnAF-2DA を海馬 CA1 や歯状回に局所投与すると、投与部位での  $Zn^{2+}$  の作用は ZnAF-2 との結合により阻害される (ZnAF-2 蛍光測定により作用部位とキレート能を評価することができる)。その結果、LTP は減弱し、物体認識が障害される。海馬 CA1 と歯状回ではそれぞれ CA1 錐体細胞内  $Zn^{2+}$  シグナリングと顆粒細胞内  $Zn^{2+}$  シグナリングが LTP を介して物体認識に関与する。すなわち、亜鉛作動性シャーフアー側枝シナプスでは神経終末から放出される  $Zn^{2+}$  は CA1 錐体細胞内で認知活動のためにシグナリングに利用され、亜鉛非作動性内側貫通線維シナプスでは歯状回顆粒細胞内ストア (実態は明らかでない) から放出される  $Zn^{2+}$  がシグナリングに利用される。

シナプス小胞に亜鉛を輸送する Zn トランスポーターである ZnT3 を欠損したマウスでは、Timm's 染色でシナプス小胞亜鉛は検出されない。ZnT3 欠損マウスの学習・記憶能は低下しており、記憶形成に ZnT3 が関与する。ZnT3 のタンパク質発現とシナプス小胞亜鉛濃度との間には正の相関性があり、ZnT3 発現は老化に伴い低下する。さらに、アルツハイマー病患者の脳では ZnT3

発現は対照群と比べて低下している。ZnT3 発現は亜鉛作動性シナプスにおける  $Zn^{2+}$  シグナリングに必要であり、学習・記憶と密接に関係する。亜鉛非作動性シナプスにおいても  $Zn^{2+}$  シグナリングが必要であるが、いずれのシナプスにおいても  $Zn^{2+}$  に依存した系、あるいは  $Ca^{2+}$  シグナリング系に焦点をあてた今後の作用メカニズム解析が望まれる。

## 6 過剰なグルタミン酸作動性神経活動を介した $Zn^{2+}$ シグナリングは学習・記憶を障害する

細胞外グルタミン酸濃度はグルタミン酸トランスポーターにより厳密に制御されている。すなわち、定常時シナプス間隙のグルタミン酸濃度は約 2  $\mu$ M であり、シナプス興奮時には 10 mM にまで達すると推定されている。脳虚血、脳外傷、てんかんなどの急性神経疾患からアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病などの慢性神経疾患に至まで、神経細胞死の共通機序の一つとしてグルタミン酸興奮毒性が知られている。細胞外での過剰なグルタミン酸はシスチン/グルタミン酸交換輸送体の抑制を介して神経細胞に酸化的ストレスを与える。グルタミン酸受容体の過剰興奮は細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を増加させ、神経細胞死を惹起する。カルシウム透過型 AMPA 受容体、NMDA 受容体と電位依存性カルシウムチャンネルを介する細胞外からの流入と、代謝型グルタミン酸受容体を介したイノシトール三リン酸 ( $IP_3$ ) による細胞内カルシウムストアからの放出の二つの系で  $Ca^{2+}$  濃度は増加する。長い間神経細胞死は  $Ca^{2+}$  毒性によると信じられてきたが、その後、 $Zn^{2+}$  毒性が注目されるようになった。神経細胞死は  $Zn^{2+}$  毒性の軽減により回避できたからである。亜鉛作動性神経終末から放出される  $Zn^{2+}$  はカルシウムチャンネルを通過することができ (図 1)、グルタミン酸受容体の過剰興奮は細胞内  $Zn^{2+}$  濃度を過剰に増加させる。この増加にカルシウム透過型 AMPA 受容体が大きく関与するとの報告がある。

脳虚血時に細胞外  $K^+$  濃度は約 75 mM (定常時は 3.5 ~ 5 mM) に達するとの報告がある。神経細胞内  $K^+$  濃度は約 140 mM であり、神経細胞死により、細胞外  $K^+$  濃度は容易に上昇する。この上昇は非特異的な脱分極刺激となり、神経細胞を興奮させる。海馬 CA1 では高  $K^+$  誘発性のグルタミン酸放出により、その後の物体認識記憶は障害されるが、この障害に神経終末からの  $Zn^{2+}$  放出と細胞外  $Zn^{2+}$  の CA1 錐体細胞内への流入が関与する。同様な障害は海馬歯状回でも観察され、高  $K^+$  誘発性のグルタミン酸放出は細胞外  $Zn^{2+}$  の顆粒細胞内への過剰流入を惹起し、物体認識記憶を障害する。亜鉛作動性シナプス、亜鉛非作動性シナプスいずれにおいても過剰なグルタミン酸シグナルは細胞外  $Zn^{2+}$  動態

を変え、細胞内  $Zn^{2+}$  ホメオスタシスを崩壊し、シナプス可塑性の障害を介して海馬依存性の記憶を障害する。

## 7 おわりに

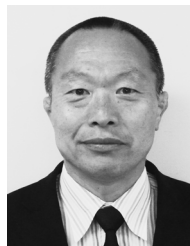
定常時の細胞質  $Zn^{2+}$  濃度は  $Ca^{2+}$  と比べると 100 倍以上低い (図 1)。  $Zn^{2+}$  は  $Ca^{2+}$  より細胞毒性が高いため、神経細胞はその定常レベルをきわめて低く保つ一方で、シナプス活動時には細胞内  $Zn^{2+}$  シグナルをうまく利用している。しかし、シナプス過剰興奮時には細胞内  $Zn^{2+}$  シグナルは  $Ca^{2+}$  シグナルと同様に神経毒となる。脳機能を理解し脳疾患を予防する上で、シナプス  $Zn^{2+}$  の動態制御機構の解明は一つの課題であるが、その解明には  $Zn^{2+}$  の分析手法のさらなる発展が必要である。また、  $Cu^{2+}$ 、  $Fe^{3+}$  などの微量金属もシナプス機能ならびに病態と密接に関係することから、蛍光プローブなど分析手法の開発が強く望まれる。

## 文 献

- 1) A. Takeda : *Brain Res. Rev.*, **34**, 137 (2000).
- 2) T. Hirano, K. Kikuchi, Y. Urano, T. Nagano : *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 6555 (2002).
- 3) C. J. Frederickson, J. Y. Koh, A. I. Bush : *Nat. Rev. Neurosci.*, **6**, 449 (2005).
- 4) C. J. Frederickson, L. J. Giblin, A. Krezel, D. J. McAdoo, R. N. Muelle, Y. Zeng, R. V. Balaji, R. Masalha, R. B.

Thompson, C. A. Fierke, J.M. Sarvey, M. Valdenebro, D. S. Prough, M. H. Zornow : *Exp. Neurol.*, **198**, 285-293 (2006).

- 5) R. A. Colvin, A. I. Bush, I. Volitakis, C. P. Fontaine, D. Thomas, K. Kikuchi, W. R. Holmes : *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **294**, C726-742 (2008).
- 6) A. S. Nakashima, R. H. Dyck : *Brain Res. Rev.*, **59**, 347-373 (2009).
- 7) A. Takeda, H. Tamano : *Brain Res. Rev.*, **62**, 33 (2009).
- 8) A. Takeda : *Mol. Neurobiol.*, **44**, 166 (2011).
- 9) S. L. Sensi, P. Paoletti, J. Y. Koh, E. Aizenman, A. I. Bush, M. Hershfinkel : *J. Neurosci.*, **31**, 16076 (2011).
- 10) A. Takeda, H. Tamano : *Metalomics*, **4**, 614 (2012).
- 11) B. Szweczyk : *Front Aging Neurosci.*, **5**, 33 (2013).
- 12) A. Takeda, M. Nakamura, H. Fujii, H. Tamano : *Metalomics*, **5**, 417 (2013).
- 13) A. Takeda, H. Tamano : *Front Aging Neurosci.*, **6**, 26 (2014).
- 14) A. Takeda, H. Tamano : *BioMetals*, **29**, 177 (2016).
- 15) A. Takeda, H. Tamano : *Mol. Neurobiol.*, in press.



武田厚司 (Atsushi TAKEDA)

静岡県立大学 (〒 422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1)。静岡薬科大学大学院薬学研究科修士課程修了。薬学博士。《現在の研究テーマ》亜鉛から見た記憶の制御とアルツハイマー病の克服。《主な著書》“亜鉛の機能と健康” (分担執筆) (建邦社)。《趣味》テニス。

## 原 稿 募 集

トピックス欄の原稿を募集しています

内容：読者の関心をひくような新しい分析化学・分析技術の研究を短くまとめたもの。

執筆上の注意：1) 1000 字以内 (図は 1 枚 500 字に換算) とする。2) 新分析法の説明には簡単な原理図などを積極的に採り入れる。3) 中心となる文献は原則として 2 年以内のものとし、出所を明記する。

なお、執筆者自身の文献を主として紹介する

ことは御遠慮ください。又、二重投稿は避けてください。

◇採用の可否は編集委員会にご一任ください。原稿の送付および問い合わせは下記へお願いします。

〒141-0031 東京都品川区西五反田 1-26-2

五反田サンハイツ 304 号

(公社)日本分析化学会「ぶんせき」編集委員会

〔電話：03-3490-3537〕