

分泌型亜鉛要求性酵素活性化機構の  
分子機序に関する解析

藤本 重行



# 目次

要旨	2
略語	4
序論	5
結果	
第1章	
TNAP 活性化に關与する細胞質から早期分泌経路内への 亜鉛送達機構の解析	10
第2章	
TNAP 活性化に必要な亜鉛トランスポーターの機能モチーフ に關する解析	22
総括	43
実験材料と方法	44
引用文献	51
謝辞	58

## 要旨

分泌型亜鉛要求性酵素は早期分泌経路で亜鉛を獲得し活性化すると考えられている。早期分泌経路への亜鉛輸送は 2 つの亜鉛トランスポーター複合体 (ZnT5-ZnT6 ヘテロダイマー (ZnT5-ZnT6) 及び ZnT7 ホモダイマー (ZnT7)) が担っており、これらは分泌型亜鉛要求性酵素の活性化に重要な働きを有していることが推察される。しかしながら、細胞内亜鉛が亜鉛トランスポーターを介してどのような動態制御を受け各酵素に受け渡されるのかについての詳細な分子機序の解析はほとんど行われていない。そこで、分泌型亜鉛要求性酵素である組織非特異的アルカリホスファターゼ (tissue non-specific alkaline phosphatase, TNAP) をモデル酵素として使用し、その活性化の分子機序についての解析を実施した。

第 1 章では、TNAP の活性化に必要と考えられる細胞質内亜鉛の早期分泌経路への送達機構について解析した。細胞質内亜鉛濃度を正常に保つために働く ZnT1、メタロチオネイン (MT)、ZnT4 の 3 重欠損ニワトリ DT40 細胞 ( $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$  細胞) を用いて、細胞質内亜鉛レベルを変化させた際の TNAP 活性に及ぼす影響について解析した。その結果、 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$  細胞は野生株細胞と比較して細胞質内亜鉛レベルが有意に上昇したにも関わらず、TNAP 活性が著しく低下していた。 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$  細胞にヒト ZnT1 (hZnT1)、マウス MT-1 (mMt-1)、hZnT4 をそれぞれ発現させると、TNAP 活性はある程度回復し、これら全てを発現させると野生株細胞と同等のレベルにまで回復した。又、 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$  細胞に亜鉛輸送活性を欠いた hZnT1 及び hZnT4 の変異体を発現させると、TNAP 活性は回復しなかった。更に、 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$  細胞における ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 の機能を解析し、TNAP 活性の低下は両トランスポーターの機能障害が原因ではないことも示された。これらの結果から、ZnT1、MT、ZnT4 は細胞質内亜鉛を ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 に効率よく受け渡す機構の一端を担うことで、TNAP 活性化に関与することが明らかとなった。

第 2 章では、早期分泌経路内腔における ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 を介した TNAP 活性化機構について解析した。ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 に内在する TNAP 活性化に必要な機能モチーフを探索した結果、早期分泌経路内腔に位置すると予想されるルミナルループ (luminal loop, LL) 領域に、ZnT5、ZnT7 やそれらのオーソログ分子のみに保存された複数のアミノ酸残基を見出した。hZnT5 のアラニン置換体を作製し、これらアミノ酸残基の TNAP 活性化に対する機能を精査した結果、2 つ目の LL (LL2) の Pro-Pro 配列 (PP モチーフ) をアラニンに置換した変異体 (PP-AA 変異体) が、細胞質から早期分泌経路内腔への亜鉛輸送活性を正常に保つにも関わらず、TNAP を十分に活性化できないことが判明した。PP-AA 変異体を発現させた細胞においては、アポ型 TNAP の発現が増加しており、PP-AA 変異により低下した TNAP 活性は亜鉛を添加することで濃度依存的に回復した。

ZnT5-ZnT6 や ZnT7 の立体構造モデルより、LL2 が亜鉛輸送活性に必須である膜貫通領域の亜鉛結合サイトの早期分泌経路内腔側上部に位置することが予想されたことから、PP モチーフは、ZnT5-ZnT6 や ZnT7 による内腔側への亜鉛輸送の過程で重要な空間配置を占め、TNAP に効率的に亜鉛を受け渡すために機能していることが推察された。

本研究により、早期分泌経路における TNAP 活性化には、細胞質及び早期分泌経路内腔において、単に亜鉛濃度に依存した受動的な亜鉛の受け渡しではなく、亜鉛トランスポーターを介した厳密な制御機構が働いていることが強く示唆された。

## 略語

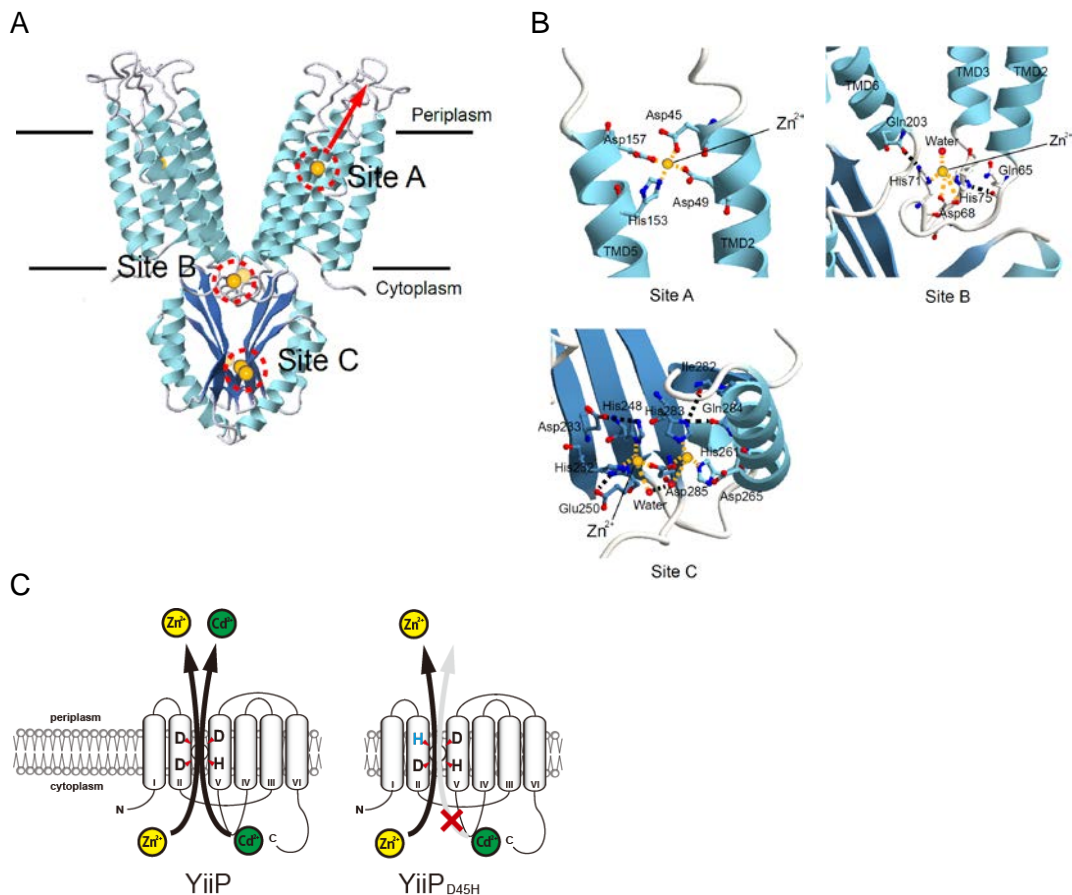
ALP	alkaline phosphatase
BPB	bromophenol blue
CNX	calnexin
CS	chicken serum
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ESP	early secretory pathway
FCS	fetal calf serum
GPI	glycosylphosphatidylinositol
HA	haemagglutinin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HRP	horseradish peroxidase
LL	luminal loop
MT	metallothionein
mMt-1	mouse metallothionein 1
PVDF	polyvinylidene difluoride
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SD	standard deviation
SDS	sodium dodecyl sulfate
TGN	<i>trans</i> -Golgi network
TNAP	tissue non-specific alkaline phosphatase
WGA	wheat germ agglutinin
ZIP	Zrt, Irt-like protein
ZnT	Zinc transporter

## 序論

亜鉛は生体内に約 2 g と必須微量元素のなかで鉄に次いで多く存在し、タンパク質の構造維持、補因子、シグナル因子として多彩な機能を発揮することで生命活動の維持に機能している[1,2]。又、近年のプロテオーム解析により約 3000 種ものタンパク質に亜鉛結合モチーフの存在が示唆されていることからその重要性が伺える[3,4]。このように生体内に広く分布する亜鉛は酸化還元反応を受けず、二価の陽イオンとして化学的に非常に安定な形態で存在している[5]。従って、鉄や銅といった膜輸送過程に酸化還元を伴う必須微量元素と異なり、亜鉛の動態制御には時空間的な発現制御を受けた亜鉛トランスポーターの働きが直接的に寄与するものと考えられている[6-8]。

哺乳動物において、亜鉛トランスポーターは細胞質内の亜鉛を細胞外又は細胞内小器官へ輸送する Zn transporter (ZnT)/solute carrier 30A (SLC30A) family と、その逆方向に亜鉛を輸送する Zrt, Irt-like protein (ZIP)/SLC39A family に大別される[9]。これら亜鉛トランスポーターは細胞質内の遊離亜鉛イオンの分布をピコモルオーダーで厳密に制御しており、細胞内の亜鉛ホメオスタシスを維持している[10-13]。このように精巧な機能を有する亜鉛トランスポーターの分子機能の解析には立体構造の理解が重要となるが、現在にいたるまで高等生物の亜鉛トランスポーターの完全な立体構造は明らかにされていない。しかし、ZnT に関して大腸菌ホモログである YiiP の立体構造が解明されたことにより、それを鋳型としたモデル構築と生化学的解析による機能解析が飛躍的に進んでいる。

YiiP は N 末端及び C 末端を細胞質側に配した 6 回膜貫通型の構造 (CDF ドメイン) をプロトマーとし、ホモダイマーを形成することで生理機能を発揮する (Fig. 0-1A) [14]。ZnT も YiiP と同様の配向を有すると考えられ、N 末端及び C 末端を細胞質側に露出させ、ホモダイマーを形成すると考えられる[15,16] (ZnT5 は例外的に CDF ドメインに長大な N 末端が結合した 15 回膜貫通型の構造をとると考えられ、ZnT6 とヘテロダイマーを形成する[17-19])。YiiP の第 1、2、4、5 膜貫通領域は密に重なり合い膜貫通領域内に存在する亜鉛結合サイトを包み込むような束状の構造をとっている。一方で第 3、6 膜貫通領域はダイマーの軸付近に位置し、ダイマー形成の安定化に寄与している。YiiP が基質を輸送する際は、ペリプラズムに存在するプロトン駆動力として 6 つの膜貫通領域がダイナミックに動き、膜貫通領域の亜鉛結合サイト周辺のキャビティ並びに疎水・親水領域が緻密に制御されることで基質がペリプラズムへと輸送される[20-22]。ZnT は基質輸送形式についても多くの解析がなされており、プロトンの濃度勾配を駆動力とした 2 次性能動輸送型の  $H^+/Zn^{2+}$  アンチポーターであることが明らかとなっている[20,22,23-29]。



**Figure 0-1. YiiP の立体構造と基質輸送形式**

(A) CueMol2 を用いて YiiP (PDB ID code 3H90)ホモダイマーの立体構造を画像化した。黄色は亜鉛、赤矢印は亜鉛が輸送される方向を示す。SiteA, B, Cは亜鉛結合サイトを示す。膜貫通領域に存在する SiteA は基質認識及び輸送に必須のモチーフである。SiteB, C に結合した亜鉛はダイマー形成を安定化させるために必要であると考えられている。

(B) 各亜鉛結合サイトの結合様式を示す。

(C) Site A の亜鉛結合サイトを構成するアミノ酸残基と基質選択性との関係性の模式図。

ZnT による基質輸送には、第 2、5 膜貫通領域のアスパラギン酸残基(D)とヒスチジン残基(H)から構成される亜鉛結合サイト(HD-HD モチーフ)が必須の役割を果たすことが知られている(Figs. 0-1,0-2)。一方、YiiP の基質結合サイトは第 2 膜貫通領域のヒスチジン残基がアスパラギン酸残基に置換された DD-HD モチーフであり、ZnT と比較して基質選択性が低く、カドミウムも輸送することが明らかとなっている(Fig. 0-1C)。このことは、YiiP の DD-HD モチーフを HD-HD モチーフに変異させた YiiP<sub>D45H</sub> を用いた解析から、HD-HD モチーフに対するカドミウムの結合親和性の低下に起因することが示されている[27]。DD-HD、HD-HD の両モチーフに対する亜鉛の親和性並びに輸送活性に有意差は認められないことも明らかとなっている[27]。ZnT family の中にはこのモチーフが保存されていないものも存在し、ZnT10 の基質結合サイトは第 2 膜貫通領域のヒスチ



ジン残基がアスパラギン残基に置換された ND-HD モチーフであり、選択的なマンガン輸送活性を獲得している[30-32]。HD-HD モチーフを非極性アミノ酸に置換した変異体では基質輸送能が完全に消失することも示されており、このモチーフは基質選択性を規定するのみならず、基質輸送活性に必須であることも明らかとなっている[26,29]。実際、ZnT6はこの亜鉛結合サイトを構成する2つのヒスチジン残基が疎水性アミノ酸であるロイシン残基とフェニルアラニン残基に置換されており、亜鉛輸送活性をもたない(Fig. 0-2)。すなわち、ZnT5-ZnT6の亜鉛輸送はZnT5が担うことが明らかとなっている[19]。

Name	TMD II		TMD V	
YiiP	42	ALVDSLVDIGASLTNLLVVRYSL 64	145	QAVRADMLHYQSDVVM 159
ZnT1	40	DSFHMLSIVLALVVALVAERFAR 62	243	LNMRGVFLHVLGDAL 257
ZnT2	103	DAAHLLTFASMLISLFSLWMSS 125	215	PSVRAAFIIVIGDFM 229
ZnT3	105	DAAHLLADVGSMGSLFSLWLST 127	230	TSVRAAFVHVLGDL 244
ZnT4	143	DALHMLTDLSAIILTLLALWLSS 165	269	LAVRAAFVHALGDLV 283
ZnT5	448	DGFHMLFDCSALVMGLFAALMSR 470	587	ANMRGVFLHVLADTL 601
ZnT6	63	YTYITIFDLFSLMTCLISYVWTL 85	193	IFLPRMNFVLIIDLA 207
ZnT7	67	DSFHMFDDSTAILAGLAASVISK 89	232	QILQGVFLHILADTL 246
ZnT8	103	DAAHLLIDLTSFLLSLFSLWLSS 125	212	ASVRAAFVHALGDLF 226
ZnT10	40	DSFNMLSGLISLVCVGLSAGYIAR 62	236	LNIRGVLLHVMGDAL 250

Figure 0-2. YiiP と ZnT の第 2, 5 膜貫通領域(ZnT5 は第 11, 14 膜貫通領域)のアミノ酸配列の比較

膜貫通領域に存在する基質結合サイトは主にアスパラギン酸残基(赤)とヒスチジン残基(青)で構成される。ZnT は HD-HD モチーフを有しており、選択的亜鉛輸送機構を獲得している。一方、YiiP では DD-HD モチーフであり、亜鉛だけでなくカドミウムも輸送する。ZnT6 はこのサイトを構成するアミノ酸残基が一部疎水性アミノ酸残基(黒枠)に置換されており、亜鉛輸送活性を持たない。ZnT10 はアスパラギン残基(緑)が含む ND-HD モチーフを有しており、マンガン輸送活性を獲得している。

ZnT には膜貫通領域以外に C 末端にも亜鉛結合モチーフが存在する[33]。C 末端は膜貫通領域と比べるとアミノ酸配列の相同性は高くないものの、ZnT ホモログで高度に保存されたメタルシャペロン様の構造を有している。特に YiiP ではダイマー形成を安定化させるために必要なモチーフであると考えられており、亜鉛濃度に応じてダイマーの立体構造を制御することで、亜鉛濃度センサーの働きも有していると考えられている[14,20,33,34]。又、YiiP には保存されていないものの、ZnT には第 4, 5 膜貫通領域 (ZnT5 では第 13, 14 膜貫通領域)に挟まれた細胞質側のループ領域にヒスチジンに富んだアミノ酸配列(ヒスチジンリッチ領域)が存在し、基質認識及び輸送を制御していると考えられている[18,25,35-37]。

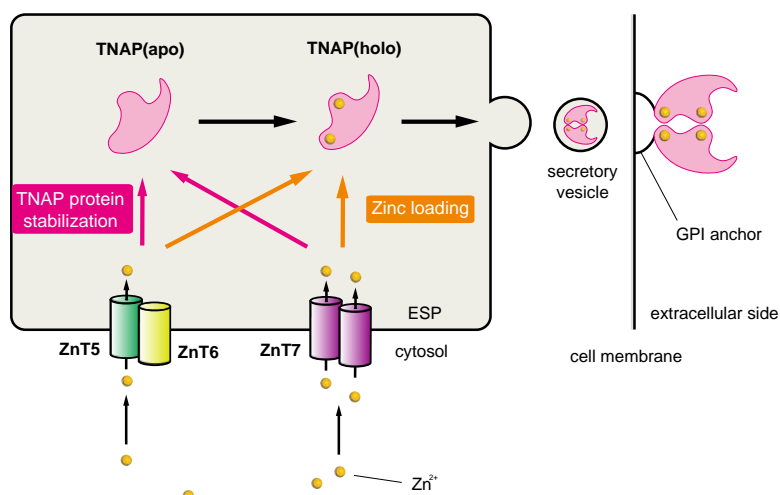
亜鉛を活性中心にもつ亜鉛酵素(亜鉛要求性酵素)は約 300 種存在すると言われており、生命活動に必須の役割を果たしている。これらの酵素の中でも、分泌型亜鉛要求性酵素には、疾患と深く関わるアンギオテンシン変換酵素(ACE)、マ

トリックスメタロプロテアーゼ(MMP)、炭酸脱水酵素(CA)、アルカリホスファターゼ(ALP)、スーパーオキシドディスムターゼ 3 (SOD3)のような医学的観点から重要な酵素が多数存在する[1,38-43]。従って、これら酵素の活性化機構の解明は非常に有意義であるが、現在にいたるまでそれらの解析はほとんど行われていない。分泌型亜鉛要求性酵素は早期分泌経路で活性化されると考えられるため、早期分泌経路に局在する 2 つの亜鉛トランスポーター複合体(ZnT5-ZnT6 ヘテロダイマー(ZnT5-ZnT6)及び ZnT7 ホモダイマー(ZnT7))は分泌型亜鉛要求性酵素の生合成過程に密接に関わっていると推察される。このような背景をもとに、本研究室ではこれまでに ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 と分泌型亜鉛要求性酵素である組織非特異的アルカリホスファターゼ(TNAP)との関連性について解析を進めてきた。TNAP はアポ型タンパクとして翻訳され、早期分泌経路で糖鎖修飾並びに亜鉛の獲得を経てホロ型 (活性型)となる[44]。活性型となった TNAP はダイマーを形成して小胞輸送により細胞表面に移行し、GPI アンカーを介して細胞膜で生理機能を発揮する[45]。TNAP 遺伝子は低ホスファターゼ症の原因遺伝子であり、変異により骨形成に異常をきたすことが知られている[46]。

TNAP の活性化機構の解析には、モデル細胞としてニワトリ B リンパ球由来の DT40 細胞が用いられてきた。DT40 細胞は遺伝子組み換え効率が非常に高く、目的遺伝子を容易に欠損させることが可能である。又、高等生物由来の細胞でありヒトのカウンターパート遺伝子を発現させることでヒト ZnT (hZnT)の機能を網羅的に解析することができる[47,48]。これまでの研究により、ZnT5、ZnT6、ZnT7 の三重欠損 DT40 細胞(ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>細胞) (ニワトリの ZnT5 遺伝子は性染色体上にあるため、本研究で用いる DT40 細胞では ZnT5 の対立遺伝子が 1 つしか存在しない)で TNAP 活性が完全に消失すること、ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>細胞に hZnT5 及び hZnT6、又は hZnT7 を発現させることにより、TNAP 活性が回復することが示された[19]。さらに、ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 は亜鉛輸送以外に TNAP タンパク質の安定化作用を有することも明らかにされた(Fig. 0-3) [18,49]。これらのことから、TNAP の活性化には ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 を介する 2 段階の活性化機構が存在することが予想された。しかし、ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 によって輸送された亜鉛がどのようにして TNAP に受け渡されるのかについての分子機序の解析は全く行われていなかった。又、哺乳動物では 30 以上ものタンパク質が細胞内亜鉛ホメオスタシスの制御に寄与しているとされるが[13]、TNAP 活性化において、ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 以外の亜鉛代謝関連分子が関与する可能性についての検討もほとんど行われていなかった。そこで本研究では、細胞質内の亜鉛が ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 を介して TNAP へ受け渡されるまでの動態制御機構について新たな知見を得ることを目的に、細胞質内亜鉛ホメオスタシス制御因子と TNAP 活性の関係についての解析、並びに早期分泌経路を構成する小胞内

腔(以降は早期分泌経路内腔と表記)における ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 の機能解析を実施した。

第 1 章では、TNAP 活性化に必要と考えられる細胞質内亜鉛の早期分泌経路への送達機構を解析するために、細胞質内亜鉛ホメオスタシス制御因子である ZnT1、メタロチオネイン(MT)、ZnT4 の機能と TNAP 活性との関係性を評価した。その結果、TNAP の完全な活性化には、これらの因子による細胞質内亜鉛の緻密な動態制御が関与し、ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 に効率よく亜鉛を受け渡す機構の一端を担っていることを明らかとした。第 2 章では、早期分泌経路内腔における ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 を介した TNAP 活性化機構を詳細に解析するために、これら亜鉛トランスポーターの TNAP 活性化に重要な機能を有するアミノ酸残基を同定した。同定したアミノ酸残基の機能解析を行った結果、2 つ目のルミナルループに存在する PP モチーフが早期分泌経路内腔で TNAP へ効率的に亜鉛を受け渡すために機能することを示した。以上の結果により、TNAP の活性化には、細胞質並びに早期分泌経路内腔で亜鉛濃度に依存した受動的な亜鉛の受け渡しではなく、厳密に制御された分子機序が存在することを明らかとした。



**Figure 0-3.** これまでに明らかとなっている TNAP 活性化機構の模式図

TNAP タンパクは 2 つの亜鉛トランスポーター複合体(ZnT5-ZnT6 及び ZnT7)によって安定化され、これらトランスポーターによって輸送された亜鉛を早期分泌経路内で獲得し活性型となる。(ESP; early secretory pathway)

## 第 1 章

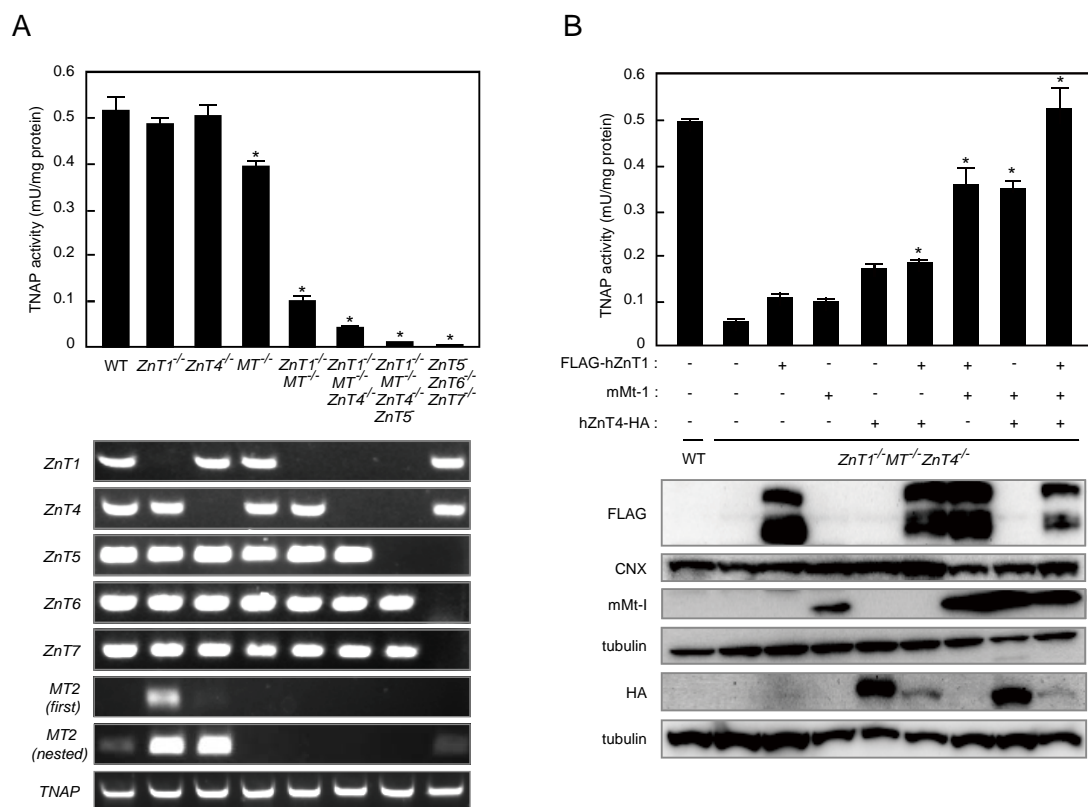
### TNAP 活性化に関与する細胞質から早期分泌経路内への亜鉛送達機構の解析

細胞質内の亜鉛代謝には多くのタンパク質が関与するが、それらがどのように TNAP の活性化に寄与するのかについての解析はこれまで全く行われていなかった。細胞質内亜鉛ホメオスタシス制御因子のうち、細胞質内亜鉛を減少させる向きに輸送する ZnT1 及び ZnT4 と、細胞質内亜鉛をキレートすることで亜鉛ホメオスタシスを制御するメタロチオネイン(MT)を欠損させた三重欠損 DT40 細胞(*ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞)は、野生株細胞と比較して細胞質内亜鉛レベルが顕著に上昇し、亜鉛耐性が低下する[15]。そして、*ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞で低下した亜鉛耐性は hZnT1、mMt-1、hZnT4 を発現させることにより有意に回復する[15]。このことから DT40 細胞において、ZnT1、MT、ZnT4 は細胞内亜鉛レベルを至適濃度に維持することで細胞の生育に重要な機能を有していることが明らかとなっている。本章では、TNAP 活性化に必要であると考えられる細胞質内亜鉛の早期分泌経路への送達機構を解析するために、*ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞における TNAP 活性を評価することとした。

## 結果

### 1-1. ZnT1、MT、ZnT4 は TNAP の完全な活性化に必要である

ZnT1、MT、ZnT4 と TNAP 活性との関係を検証するために、それぞれ単独又は複数欠損させた各細胞株における TNAP 活性を測定した。ZnT1、MT 又は ZnT4 の単独欠損株のうち、TNAP 活性に影響が現れたのは *MT*<sup>-/-</sup>細胞のみであり、TNAP 活性のわずかな低下が認められた(Fig. 1-1A)。続いて *ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>細胞における TNAP 活性を測定したところ、TNAP 活性の有意な低下が認められた(Fig. 1-1A)。さらに、細胞質内亜鉛レベルの劇的な上昇が認められた *ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞の TNAP 活性は、野生株細胞と比較して 10%程度にまで減少していることが明らかとなった(Fig. 1-1A)。この低下した TNAP 活性は、hZnT1、mMt-1、hZnT4 をそれぞれ単独発現させることでわずかながら回復し、これらのうち 2 つを共発現させることで有意な回復を示し、3 つ全てを発現させると野生株細胞と同等のレベルにまで回復することが明らかとなった(Fig. 1-1B)。これらの結果から、ZnT1、MT、ZnT4 はそれぞれが単独で TNAP 活性を増加させる働きを有し、相加的に TNAP の活性化に寄与することが明らかとなった。



**Figure 1-1. ZnT1、MT、ZnT4 は TNAP の完全な活性化に必要である**

(A) ZnT1、MT、ZnT4 を欠損させた DT40 細胞の TNAP 活性を測定した。各遺伝子のノックアウトは RT-PCR により確認した。(n = 3、error bars = ± SD、\*P < 0.01 vs. 野生株細胞(WT))

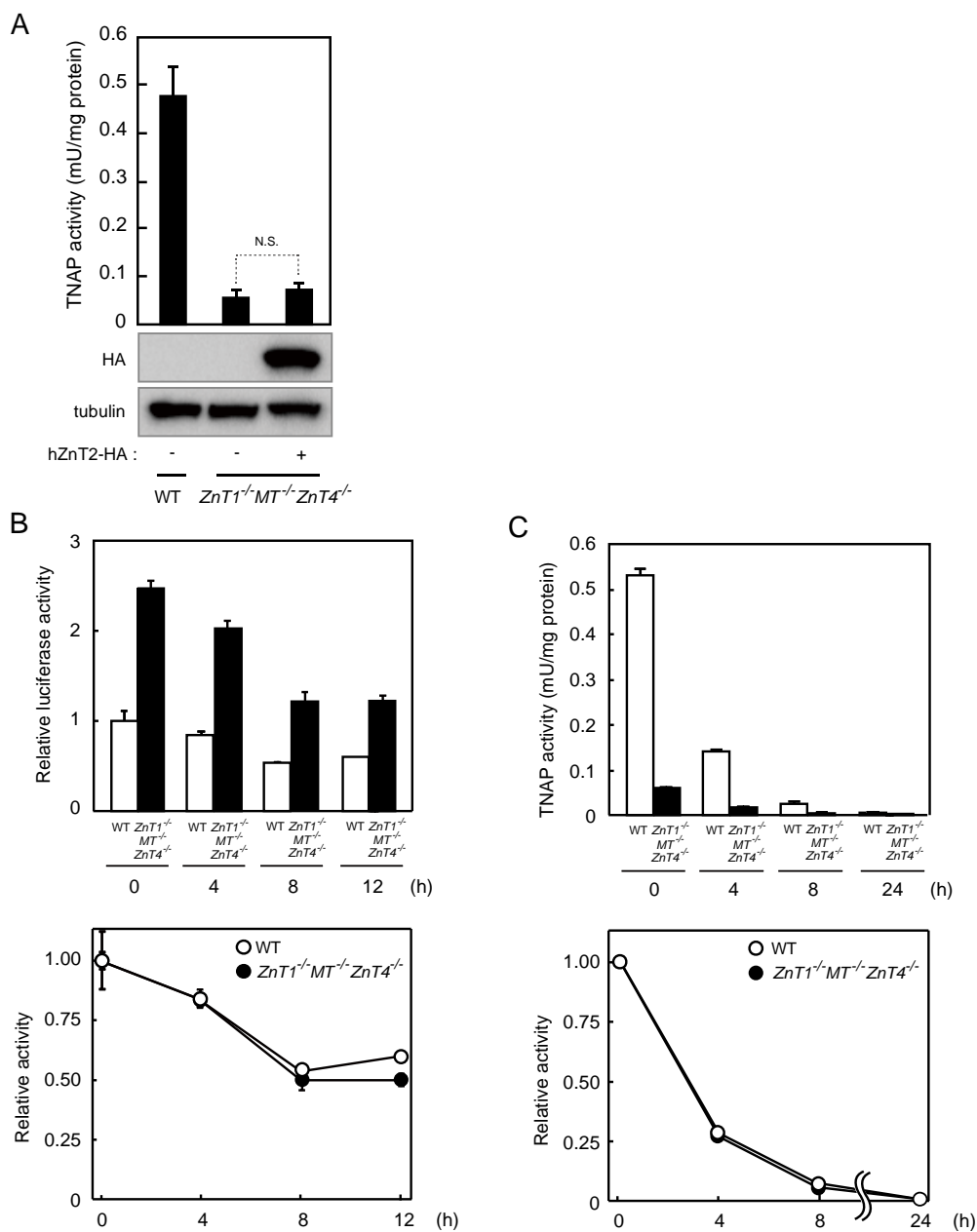
(B) ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞に FLAG-hZnT1、mMt-1、hZnT4-HA を発現させた細胞の TNAP 活性を測定した。タンパク質の発現はイムノブロット解析により確認した。(n = 3、error bars = ± SD、\*P < 0.01 vs. ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞)

ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞の TNAP 活性低下の原因について詳細な解析を進めるために、以下の仮説を考えた。1) ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞で細胞質内亜鉛レベルが急増したことに起因して TNAP 活性が低下した。2) ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞において、TNAP 活性化に必須の働きを有する ZnT5-ZnT6、ZnT7 の機能に障害が生じた。3) ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞の分泌機能に障害が生じたために分泌型酵素である TNAP の活性が低下した。これら 3 つの仮説を検証するために、以下の実験を行った。

## 1-2. $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 細胞の TNAP 活性の低下は細胞質内亜鉛レベルの上昇に起因するのではない

野生株細胞と比較して  $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 細胞における細胞質内亜鉛レベルが顕著に上昇していることと TNAP 活性が低下していることとの関係性を検証するために、 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 細胞の細胞質内亜鉛レベルを減少させた際の TNAP 活性を測定することとした。

細胞質内亜鉛を小胞内に封入することで細胞質内亜鉛レベルを減少させる働きを有する hZnT2 は  $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 細胞に発現させることで細胞質内亜鉛を著明に減少させ、亜鉛耐性を野生株細胞と同程度まで回復させることが知られている[15,51,52]。従って、hZnT2により  $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 細胞で低下した TNAP 活性も回復させる可能性が考えられた。そこで  $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 細胞に hZnT2 を発現させた細胞株の TNAP 活性を測定したところ、予想に反して TNAP 活性は回復しなかった(Fig. 1-2A)。次に、 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 細胞を亜鉛欠乏培地で培養した際の経時的な細胞質内亜鉛レベル並びに TNAP 活性を評価したところ、 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 細胞の細胞質内亜鉛レベルを野生株細胞と同等にまで減少させることには成功したものの、TNAP 活性は回復しなかった(Figs. 1-2B,C)。これらの結果から、 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 細胞の TNAP 活性の減少は、単に細胞質内亜鉛レベルの変化によるものではないことが強く示唆された。又、亜鉛欠乏培地で培養した野生株細胞及び  $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 細胞の細胞質内亜鉛レベル及び TNAP 活性の減少率を比較したところ、両者でほとんど差は認められなかった(Figs. 1-2B,C)。このことから、 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 細胞において、細胞質内亜鉛レベルは上昇しているものの、亜鉛欠乏条件下における細胞質内の亜鉛代謝は野生株細胞と同等に機能していることも明らかとなった。



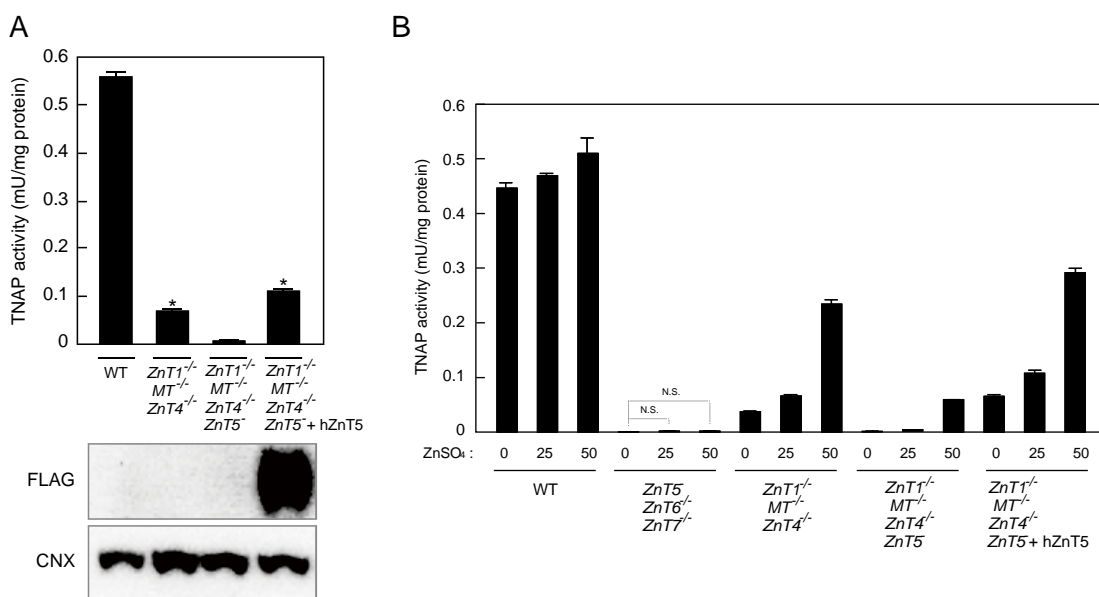
**Figure 1-2. *ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞の細胞質内亜鉛レベルを低下させても TNAP 活性は回復しない**

(A) hZnT2-HA を発現させた *ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞の TNAP 活性は *ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞と同等であった。hZnT2-HA の発現はイムノブロット解析により確認した。(n = 3、error bars = ± SD、N.S.: not significant)

(B, C) 亜鉛欠乏培地で生育させた野生株細胞(WT)及び *ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞の細胞質内亜鉛レベル並びに TNAP 活性の経時変化(上図)とその変化率(下図)。細胞内亜鉛レベルの評価には 5 つの MRE を配したマウス Mt-1 プロモーターを有する Firefly ルシフェラーゼ発現プラスミドを用い、細胞質内亜鉛レベルに応答するルシフェラーゼ活性を測定した。(n = 3、error bars = ± SD)

### 1-3. *ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞の内在性 ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 の機能は障害されていない

*ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞の内在性 ZnT5-ZnT6 の機能を評価するために、ZnT5 を欠損させた細胞株(*ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>*ZnT5*<sup>-/-</sup>細胞)を樹立し TNAP 活性を測定したところ、*ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞に残存していた TNAP 活性はほぼ完全に消失した(Fig. 1-3A)。消失した活性は、hZnT5 を発現させることにより *ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞と同等のレベルにまで回復した(Fig. 1-3A)。このことから、*ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞の残存する TNAP 活性は、早期分泌経路に局在する亜鉛トランスポーターに依存することが確認された。*ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞を亜鉛添加培地で生育させることで TNAP 活性が回復するかを検討したところ、亜鉛濃度依存的な TNAP 活性の回復が認められた(Fig. 1-3B)。さらに、*ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>*ZnT5*<sup>-/-</sup>細胞や、*ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>*ZnT5*<sup>-/-</sup>細胞に hZnT5 を発現させた細胞株においても亜鉛添加により TNAP 活性が回復した(Fig. 1-3B)。一方、*ZnT5*<sup>-/-</sup>*ZnT6*<sup>-/-</sup>*ZnT7*<sup>-/-</sup>細胞は 50 μM の硫酸亜鉛存在下で TNAP 活性が全く回復しなかった(Fig. 1-3B)。この対照的な結果から、*ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞の内在性 ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 は TNAP を活性化する機能を保持していることが明らかとなった。



**Figure 1-3. *ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞の内在性 ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 は TNAP 活性化能を保持している**

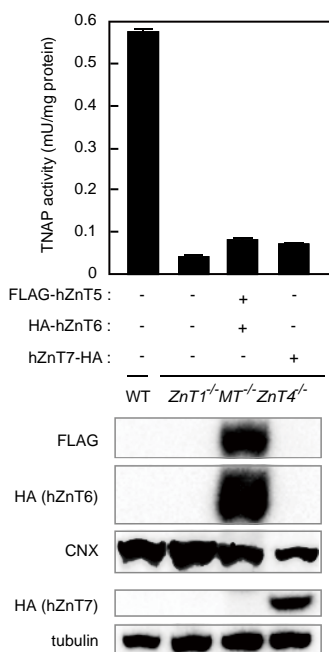
(A) *ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>*ZnT5*<sup>-/-</sup>細胞では TNAP 活性が完全に消失しており、FLAG-hZnT5 を発現させると *ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞と同等のレベルにまで回復した。hZnT5 の発現は免疫ブロット解析により確認した。(n = 3、error bars = ± SD、\*P < 0.01 vs. *ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>*ZnT5*<sup>-/-</sup>細胞)

(B)各細胞株を硫酸亜鉛(0、25、50 μM)存在下 40 時間培養し TNAP 活性を測定した。*ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞、*ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>*ZnT5*<sup>-/-</sup>細胞、*ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>*ZnT5*<sup>-/-</sup>細胞に FLAG-hZnT5 を発現させた細胞では、亜鉛添加により TNAP 活性が回復した。*ZnT5*<sup>-/-</sup>*ZnT6*<sup>-/-</sup>*ZnT7*<sup>-/-</sup>細胞では亜鉛添加による TNAP 活性の回復は認められなかった。(n = 3、error bars = ± SD、N.S.: not significant)



#### 1-4. *ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞で ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 は TNAP を完全には活性化できない

1-3 において *ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞の内在性 ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 は TNAP 活性化能を保持していることが示されたが、野生株細胞と同等には機能していない可能性も考えられた。そこで、*ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞に hZnT5 及び hZnT6、又は hZnT7 を発現させた細胞株を樹立し、TNAP 活性が回復するかを検証した。その結果、これらの細胞株の TNAP 活性は *ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞と同等であり回復は認められなかった(Fig. 1-4)。*ZnT5*<sup>-/-</sup>*ZnT6*<sup>-/-</sup>*ZnT7*<sup>-/-</sup>細胞に hZnT5 及び hZnT6、又は hZnT7 を発現させた際は TNAP 活性が有意に回復することから(Fig. 2-1A 参照)、*ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞では ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 が TNAP 活性化能を保持していても十分に機能することができないことが明らかとなった。

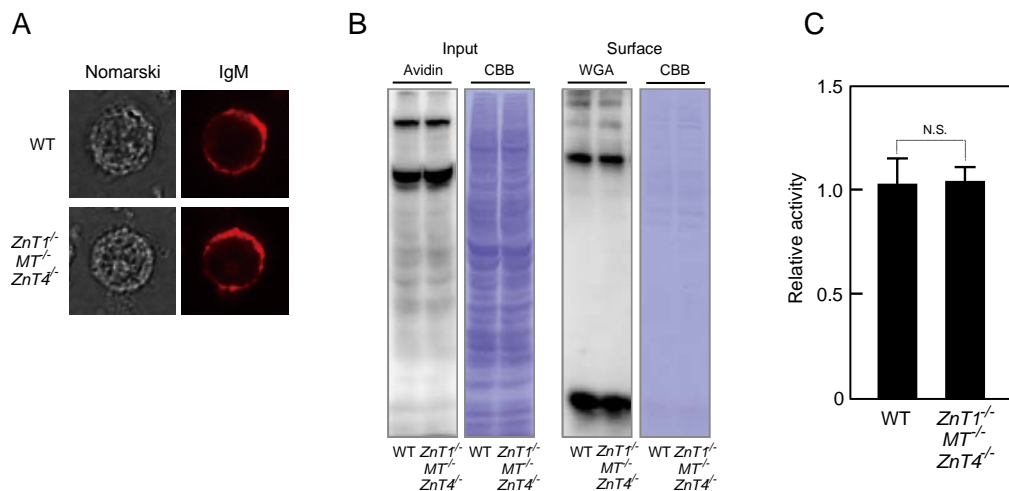


**Figure 1-4. hZnT5-hZnT6 又は hZnT7 を発現させても *ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞で低下した TNAP は回復しない**

*ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞に FLAG-hZnT5 及び HA-hZnT6、又は hZnT7-HA を発現させた細胞株の TNAP 活性は *ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞と同等であり TNAP 活性の回復は認められなかった。各 ZnT の発現は免疫ブロット解析により確認した。(n = 3, error bars = ± SD)

### 1-5. *ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞の分泌機能は保持されている

*ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞の分泌機能を評価するために、細胞膜に局在するタンパク質の発現レベルを野生株細胞と比較した。まず、細胞膜上に局在する IgM を免疫染色したところ、野生株細胞と *ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞で染色結果に差異は認められなかった(Fig. 1-5A)。次に細胞表面ビオチン化アッセイにより細胞のビオチン化効率並びに細胞膜上の糖化タンパク質を検出したが、こちらも差異は認められなかった(Fig. 1-5B)。さらに、分泌型ルシフェラーゼである *Cypridina* ルシフェラーゼを野生株細胞と *ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞にトランジェントで発現させ活性を比較したところ、両細胞株間で有意差は認められなかった(Fig. 1-5C)。これらの結果から、*ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞の分泌機能は野生株細胞と同等であることが示され、分泌機能の異常により TNAP の活性が低下しているわけではないことが明らかとなった。



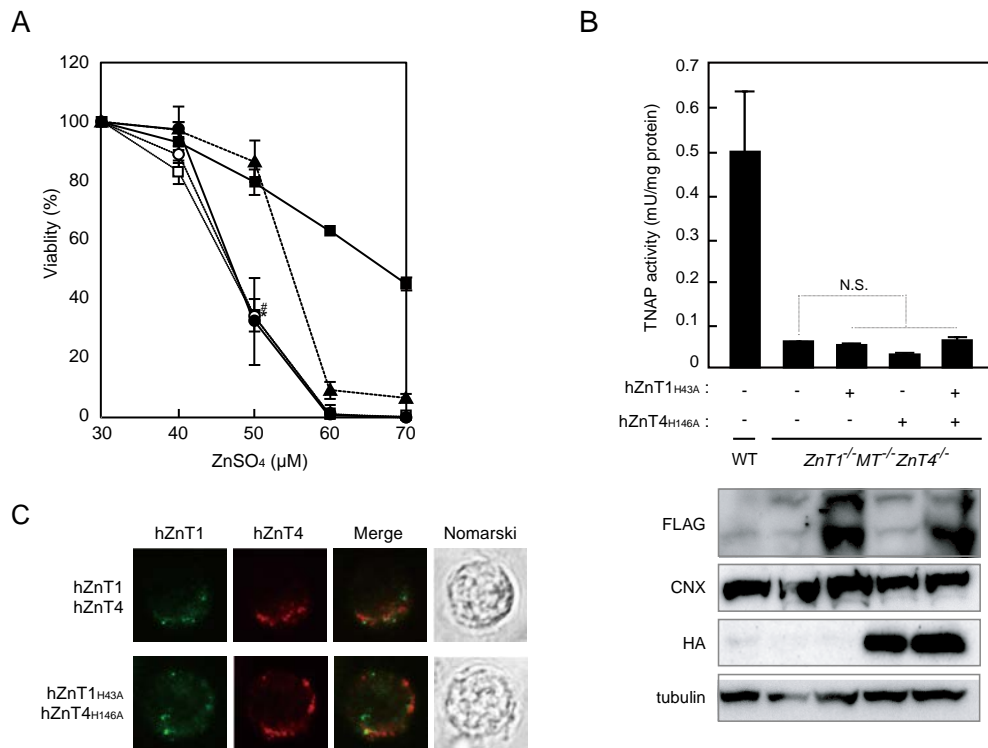
**Figure 1-5. *ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞の分泌機能は野生株細胞と同等に機能している**

(A) 野生株細胞(WT)と *ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞に対して細胞膜に局在する IgM を免疫染色により観察した。  
 (B) WT と *ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞に対して細胞表面ビオチン化アッセイを実施した。左はビオチン化効率、右は細胞表面の糖化タンパク質の検出結果を示す。  
 (C) WT と *ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞に分泌型ルシフェラーゼである *Cypridina* ルシフェラーゼをトランジェントで発現させたところ、その活性に有意差は認められなかった。(n = 3、error bars = ± SD、N.S.: not significant)

上述した3つの仮説に対する検証実験を行った結果、 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 細胞のTNAP活性の低下は細胞質内の亜鉛レベルの上昇、ZnT5-ZnT6及びZnT7の機能障害、分泌機能の異常が原因ではないことが明らかとなった。ZnT1及びZnT4は $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 細胞のTNAP活性を回復させることが出来たのに対し、ZnT2はTNAP活性を回復させなかった(Figs. 1-1B,1-2A)。このことから、細胞質内において、ZnT2では代償できないZnT1及びZnT4による亜鉛輸送がTNAPの活性化に必要であることが示唆された。そこで、ZnT1及びZnT4の亜鉛輸送活性とTNAP活性との関係について解析した。

#### 1-6. TNAPの完全な活性化にはZnT1及びZnT4による亜鉛輸送が必要である

ZnT1及びZnT4に対して、膜貫通領域の亜鉛結合サイトのヒスチジン残基をアラニン置換したhZnT1<sub>H43A</sub>、hZnT4<sub>H146A</sub>を作製した(Fig. 0-2 参照) [26,27]。これらの変異体は亜鉛輸送活性が消失しているために $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 細胞に発現させた際に亜鉛耐性が回復しなかった(Fig. 1-6A)。 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 細胞にhZnT1<sub>H43A</sub>又はhZnT4<sub>H146A</sub>を発現させた細胞株におけるTNAP活性を測定したところ、これらの変異体はTNAP活性化のために機能しないことが明らかとなった(Fig. 1-6B)。 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 細胞においてhZnT1及びhZnT4並びにこれらの変異体の細胞内局在を観察したところ、細胞質内に点在しており、hZnT1及びhZnT4並びにこれらの変異体はそれぞれ異なる局在を示した(Fig. 1-6C)。これらの結果から、TNAPの活性化にはZnT1及びZnT4がそれぞれ特定の細胞内コンパートメントへ亜鉛を輸送する必要があることが強く示唆された。



**Figure 1-6. TNAP の完全な活性化には ZnT1、ZnT4 による特定の細胞内コンパートメントへの亜鉛輸送が必要である**

(A) 硫酸亜鉛(30、40、50、60、70 μM)存在下で 72 時間培養した各細胞株の生存率(30 μM の硫酸亜鉛存在下で培養した際の生存率を 100 % として算出)を示す。ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞に FLAG-hZnT1 又は hZnT4-HA を発現させた細胞株は ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞に比べて亜鉛耐性が回復した。一方、FLAG-hZnT1<sub>H43A</sub> 又は hZnT4<sub>H146A</sub>-HA を発現させた ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞では亜鉛耐性は回復しなかった。(●: ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞; ■: FLAG-hZnT1 発現 ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞、▲: hZnT4-HA 発現 ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞、○: FLAG-hZnT1<sub>H43A</sub> 発現 ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞、□: hZnT4<sub>H146A</sub>-HA 発現 ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞) (n = 3、error bars = ± SD、\*P < 0.01 vs. FLAG-hZnT1 発現 ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞、#P < 0.01 vs. hZnT4-HA 発現 ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞)

(B) hZnT<sub>H43A</sub>-HA 又は hZnT4<sub>H146A</sub>-HA を ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞に発現させても TNAP 活性は回復しなかった。各タンパク質の発現は免疫ブロット解析により確認した。(n = 3、error bars = ± SD、N.S.: not significant)

(C) ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞に発現させた FLAG-hZnT1 及び hZnT4-HA 並びにそれらの変異体をタグに対する抗体を用いた免疫染色により観察した。

## 考察

分泌型亜鉛要求性酵素である TNAP は早期分泌経路内で亜鉛を獲得し活性化する。しかしながら、早期分泌経路に送達される亜鉛が細胞質内でどのような動態制御を受けているのかについての詳細な解析は全く行われていなかった。本章ではこの命題に対し、遺伝子の相同組み換え効率が高く、高等動物細胞のモデルとして有用であるニワトリ DT40 細胞を用いて、遺伝子欠損、及びカウンターパート遺伝子の発現の手法を用いた解析を実施した。そして、TNAP の完全な活性化には、細胞質内亜鉛ホメオスタシス制御因子の ZnT1、MT、ZnT4 が細胞質内亜鉛の動態を緻密に制御し ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 へ効率よく亜鉛を送達する機構の一端を担う必要があることを明らかにした(Fig. 1-7)。

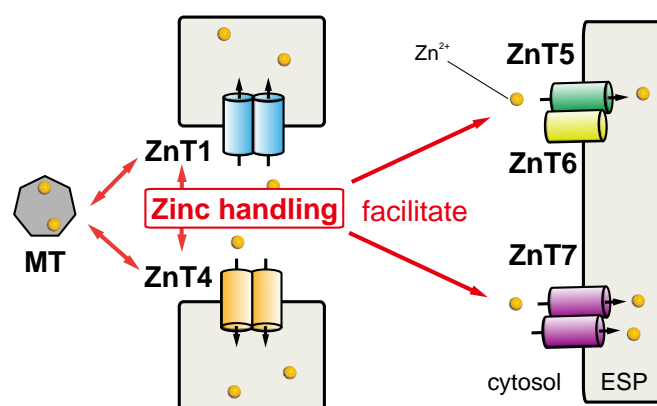


Figure 1-7. TNAP 活性化に関与すると考えられる細胞質内亜鉛の動態制御と早期分泌経路への亜鉛送達機構の概念図

ZnT1、MT、ZnT4 は細胞質内亜鉛濃度を一定のレベルに保つために働くという点で共通しているが、それぞれの細胞内局在や機能は異なっている。ZnT1 は主に細胞膜に局在し、細胞質内の過剰な亜鉛を細胞外へ排出する働きを有している[52,53]。又、細胞質内小器官にも局在し細胞内の亜鉛分布を制御することも知られている[49,54,55]。MT は細胞質内にある遊離亜鉛をキレートすることで、細胞質内の遊離亜鉛レベルを至適濃度で維持する働きがある[56]。ZnT4 は細胞質から細胞内コンパートメントへの亜鉛輸送に機能している[35,57,58]。このように異なる機能を有する ZnT1、MT、ZnT4 が細胞質内亜鉛の分布をどのように制御し、TNAP 活性化に寄与するのであろうか。

ZnT1、MT、ZnT4 遺伝子を欠損させた細胞株の TNAP 活性を比較すると、これらの遺伝子を欠損させるにつれて TNAP 活性は漸減した。そして、ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞にカウンターパート遺伝子を発現させる度に TNAP 活性は回復した(Fig. 1-1)。このことから、ZnT、MT、ZnT4 はそれぞれ単独で TNAP 活性化に寄与するものと考えられた。ZnT1 及び ZnT4 の細胞内局在を観察したと

ころ、本解析では共に細胞質内に点在する様子が観察され、双方異なる局在を示した(Fig. 1-6C)。又、ZnT1 と ZnT4 の亜鉛輸送活性を消失させた変異体を用いた解析により、これらの分子による TNAP 活性化への寄与には亜鉛輸送が必要であることが明らかとなった(Fig. 1-6B)。一方、ZnT4 と同じく細胞質内の亜鉛を細胞内コンパートメントに亜鉛を輸送する ZnT2 は  $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$  細胞において TNAP 活性化能を示さなかった(Fig. 1-2A)。これらの結果から、TNAP の活性化には ZnT1 と ZnT4 が細胞質内の亜鉛をそれぞれ特定の細胞内コンパートメントへ輸送する必要があることが強く示唆された。

ZnT1 及び ZnT4 によって細胞内コンパートメントへ輸送された亜鉛が分泌経路に局在する ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 に受け渡されるためには、いったん細胞質を介して早期分泌経路へ送達される必要がある。細胞内コンパートメントから細胞質への亜鉛輸送には、ZnT と逆方向に亜鉛を輸送する ZIP やイオンチャネルの介在が予想される[59-61]。DT40 細胞での TNAP の活性化に対するこれら輸送体の関与は明らかではないものの、ヒト線維芽細胞においては、ZIP13 が細胞内コンパートメントから細胞質へ亜鉛を放出することで、TNAP の活性化に寄与していることが報告されている[62]。従って、DT40 細胞においても TNAP 活性化には細胞内コンパートメントにおいて ZIP のような輸送体からの適切に制御された亜鉛輸送が必要となることが推察される。

$ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$  細胞では野生株細胞と比べて細胞質内亜鉛レベルの顕著な上昇が認められるが、細胞質内の亜鉛代謝や分泌機能は野生株細胞と同等に機能していた(Figs. 1-2B,1-5)。このことは、細胞の生存のために ZnT1、MT、ZnT4 の機能を他の亜鉛代謝分子が代償した結果であると考えられる。序論でも述べたように、亜鉛の細胞内動態制御のゲートキーパーは亜鉛トランスポーターである。亜鉛トランスポーターは細胞周囲の亜鉛環境の変化に対して、その発現や局在が劇的に変化し亜鉛ホメオスタシスの維持に働くことが知られている[63-67]。従って、 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$  細胞においても亜鉛トランスポーターの発現が制御されることで生存が維持されたと考えられる。MT は細胞質内亜鉛ホメオスタシスの維持に働き亜鉛トランスポーターの発現制御に関与することが報告されている[56,68]。このことから、TNAP 活性化に必要な細胞質における選択的な亜鉛輸送が十分に機能するためには至適亜鉛濃度が存在し、これを維持するために MT による細胞質内亜鉛の緩衝作用が必要であることが推察される。MT はシャペロン分子として機能する可能性も報告されているが[3,69]、本解析において MT と亜鉛トランスポーターの直接相互作用を検出することはできなかった(data not shown)。又、 $MT^{-/-}$  細胞では TNAP 活性が部分的な減少にとどまっていることから、MT によって細胞質内から ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 へ亜鉛を送達する機構が規定されているのではないと考えられる。これらのことから、MT は細胞

質内の遊離亜鉛イオン濃度を制御し、TNAP 活性化に機能する亜鉛トランスポーターの時空間的な発現制御を介して TNAP の活性化に寄与すると考えられる。

本解析では TNAP 活性化に対して細胞質から ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 への亜鉛の受け渡しに ZnT1、MT、ZnT4 が関与する厳密に制御された機構が存在することを示したが、活性化機構の解析が先行している分泌型銅要求性酵素では、細胞質から早期分泌経路への銅輸送機構の分子機序に関する知見が複数報告されている。分泌型銅要求性酵素は TNAP と同様に早期分泌経路内で活性化するため、内腔側への銅輸送が必要となる。この働きを担うのが主に TGN に局在する銅トランスポーター ATP7A (Menkes disease protein) と ATP7B (Wilson disease protein) である[70-75]。これらの銅トランスポーターが細胞質内の銅を効率よく受け取るためには、細胞質に存在する銅シャペロン分子である ATOX1 が必要となる[76,77]。ATOX1 は細胞質内の銅イオンをキレートし、ATP7A/7B と直接相互作用により銅を受け渡す働きを有している。この機能が低下すると、細胞質内から ATP7A/7B への銅の受け渡しが障害され、細胞質内銅レベルが上昇し、分泌型銅要求性酵素の活性が低下する[73,78]。そして、この低下した活性は過剰の銅を添加することで回復することが明らかとなっている[72,74]。このように、ATOX1-ATP7A/7B を介した分泌型銅要求性酵素の活性化機構は、TNAP のそれと多くの類似点が認められる。すなわち、*ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>*細胞では、細胞質内亜鉛レベルが上昇するにも関わらず TNAP 活性が顕著に低下した(Fig. 1-1A)。この低下した活性は亜鉛を添加することで亜鉛濃度依存的に回復した(Fig. 1-3B)。又、*ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>*細胞の ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 の TNAP 活性化能は保持されていた(Fig. 1-3)。これらのことから、ZnT1、MT、ZnT4 が関与する細胞質から ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 への亜鉛の受け渡しの過程で、ATOX1 のようなシャペロン分子が選択的な亜鉛輸送に関与する可能性が想定される。細胞質において分布を制御された亜鉛がどのようにして ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 に受け渡されるかについての分子機序は未だ不明であるが、今後更なる解析により ZnT1、MT、ZnT4 の TNAP 活性化に対する分子機能並びに細胞質内亜鉛の送達機構が解明されることが望まれる。

## 第 2 章

### TNAP 活性化に必要な亜鉛トランスポーターの機能モチーフに関する解析

TNAP 活性化の過程で働く亜鉛の動態制御機構に関して、第 1 章では細胞質内で ZnT1、MT、ZnT4 による亜鉛の分布制御が必要であることを示した。第 2 章では、早期分泌経路内腔において TNAP が ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 を介して亜鉛を獲得する過程の分子機序に対する詳細な解析を実施することとした。

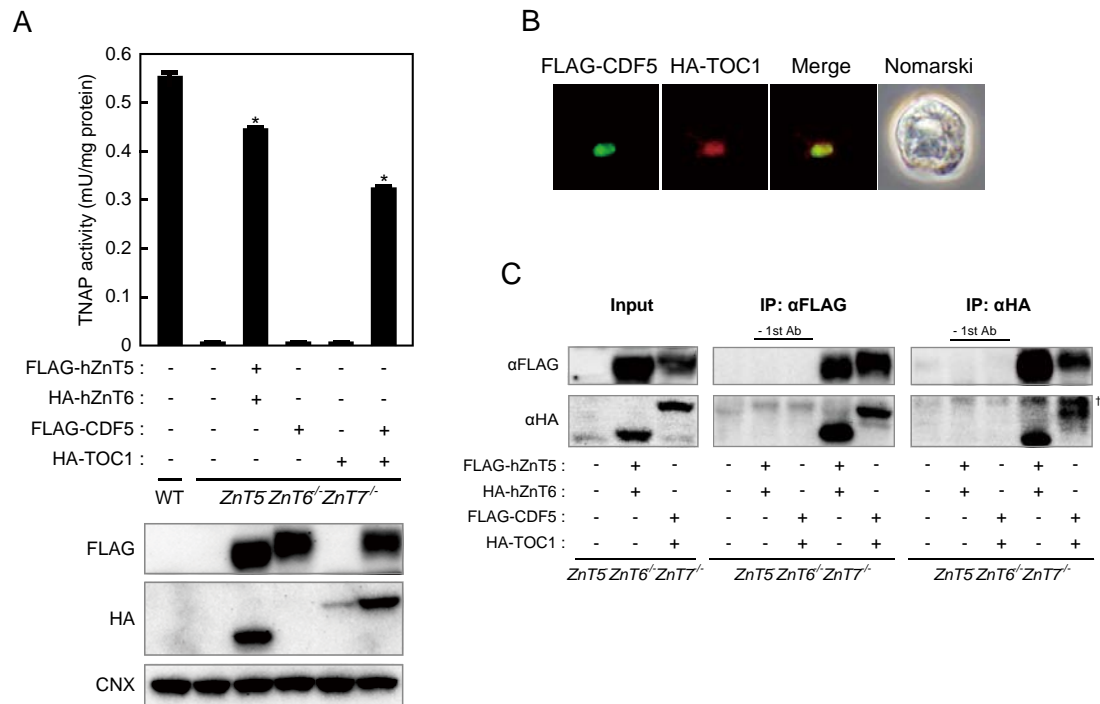
序論でも述べたように、ZnT5、ZnT6、ZnT7 の三重欠損 DT40 細胞 (*ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>*細胞)では TNAP 活性が完全に消失し、hZnT5 及び hZnT6、又は hZnT7 を発現させることで *ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>*細胞の TNAP 活性が回復する。一方、*ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>*細胞に hZnT1、hZnT2、hZnT3、hZnT4、hZnT8 を発現させると、これらの ZnT は部分的に早期分泌経路に局在するものの、TNAP 活性の回復は認められない[49]。これらのことから、ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 には TNAP 活性化能を規定する特定のモチーフが存在すると予想した。これまでに TNAP の活性化には早期分泌経路内において TNAP タンパクの安定化と亜鉛獲得の 2 段階の活性化機構が存在することが予想されるが(Fig. 0-3)、その詳細な分子機序についての解析は行われていなかった。そこで、本章では ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 における TNAP 活性化に機能するモチーフを同定し、TNAP 活性化機構について新たな知見を得ることを目的とした解析を行った。

## 結果

### 2-1. *C. elegans* の ZnT5、ZnT6 オーソログである CDF5、TOC1 はヘテロダイマーを形成し TNAP を活性化させる

ZnT5-ZnT6 と ZnT7 による TNAP 活性化は他の ZnT では代替できないが、他生物種が有する ZnT5 及び ZnT6、又は ZnT7 のホモログ分子の中に TNAP 活性化能を示すものの存在が考えられた。そこで *ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>*細胞に対して TNAP 活性を回復させる分子を探索したところ、*C. elegans* の ZnT5 及び ZnT6 のオーソログである CDF5 及び TOC1 を共発現させた *ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>*細胞で TNAP 活性が有意に回復することが判明した(Fig. 2-1A)。CDF5、TOC1 は ZnT5、ZnT6 と同様に細胞内で共局在しヘテロダイマーを形成することも確認された(Figs. 2-1B,C)。ZnT6 は亜鉛輸送活性に必須である膜貫通領域の亜鉛結合サイトを持たず、TOC1 も同様である。従って、TNAP の活性化に必要な亜鉛輸送とその動態制御に機能するモチーフは ZnT5、ZnT7 及び CDF5 に存在することが予想された。





**Figure 2-1. CDF5-TOC1 ヘテロダイマーは TNAP 活性化能を有している**

(A) *ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>*細胞に FLAG-hZnT5 と HA-hZnT6 又は FLAG-CDF5 と HA-TOC1 をそれぞれ共発現させた細胞株の膜画分タンパク質を調製し TNAP 活性を測定した。各タンパク質の発現は免疫ブロット解析により確認した。(n = 3、error bars = ± SD、\**P* < 0.01 vs. *ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>*細胞)

(B) *ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>*細胞に発現させた FLAG-CDF5 と HA-TOC1 の細胞内局在をタグに対する抗体を用いた免疫染色により観察した。

(C) *ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>*細胞に FLAG-hZnT5 と HA-hZnT6 又は FLAG-CDF5 と HA-TOC1 を共発現させた細胞株の膜画分タンパク質を調製し、タグに対する抗体を用いて免疫沈降を行った。(†: non-specific band)

## 2-2. TNAP 活性化に必要な機能モチーフの探索

ZnT5 と CDF5 は共に 15 回膜貫通型の構造をとると考えられており、hZnT5 と CDF5 ではアミノ酸同一性は 41 %、アミノ酸類似性は 58 % と高い相同性を示す。ZnT5 の長大な N 末端は TNAP の活性化には機能しないことが明らかとなっているため[18]、CDF ドメイン(ZnT5 及び CDF5 の第 10 膜貫通領域から C 末端に相当)の中に TNAP 活性化に機能するモチーフが存在することが強く示唆された。CDF ドメインは ZnT family で広く保存されており、hZnT5 と CDF5 の CDF ドメインを比較すると、全長に比べて相同性はさらに高くなり、アミノ酸同一性は 49 %、アミノ酸類似性は 65 % となる。CDF5 の CDF ドメインは ZnT7 とも相同性が高く、hZnT7 とではアミノ酸同一性は 38 %、アミノ酸類似性は 54 % である。興味深いことに、CDF5 の CDF ドメインは TNAP 活性化能を持たない ZnT4 とも高い相同性を有しており、hZnT4 とのアミノ酸同一性は 27 %、アミノ酸類似性は 54 % となる。このように CDF5 を含めて CDF ドメインは ZnT family で高い相同性を示すため、ZnT5、ZnT7、CDF5 に保存されており、かつ他の ZnT には保存されていないアミノ酸残基が、TNAP 活性化に必要なモチーフを構成することが推察された。更に、ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 は早期分泌経路内において TNAP を安定化させる機能を有していることから[49]、早期分泌経路内腔に露出した領域に重要な機能があると推測し、ルミナルループ(LL)領域に対して相同性検索を実施した。その結果、LL 領域で ZnT5、ZnT7、CDF5 にのみ保存されている複数のアミノ酸残基を見出した(Fig. 2-2) (ZnT5、CDF5 では LL1-3 は LL5-7 に存在するが、他の ZnT と比較するために便宜的に LL1-3 として扱う)。そこで、見出されたこれらのアミノ酸残基の TNAP 活性化に対する機能を評価した。

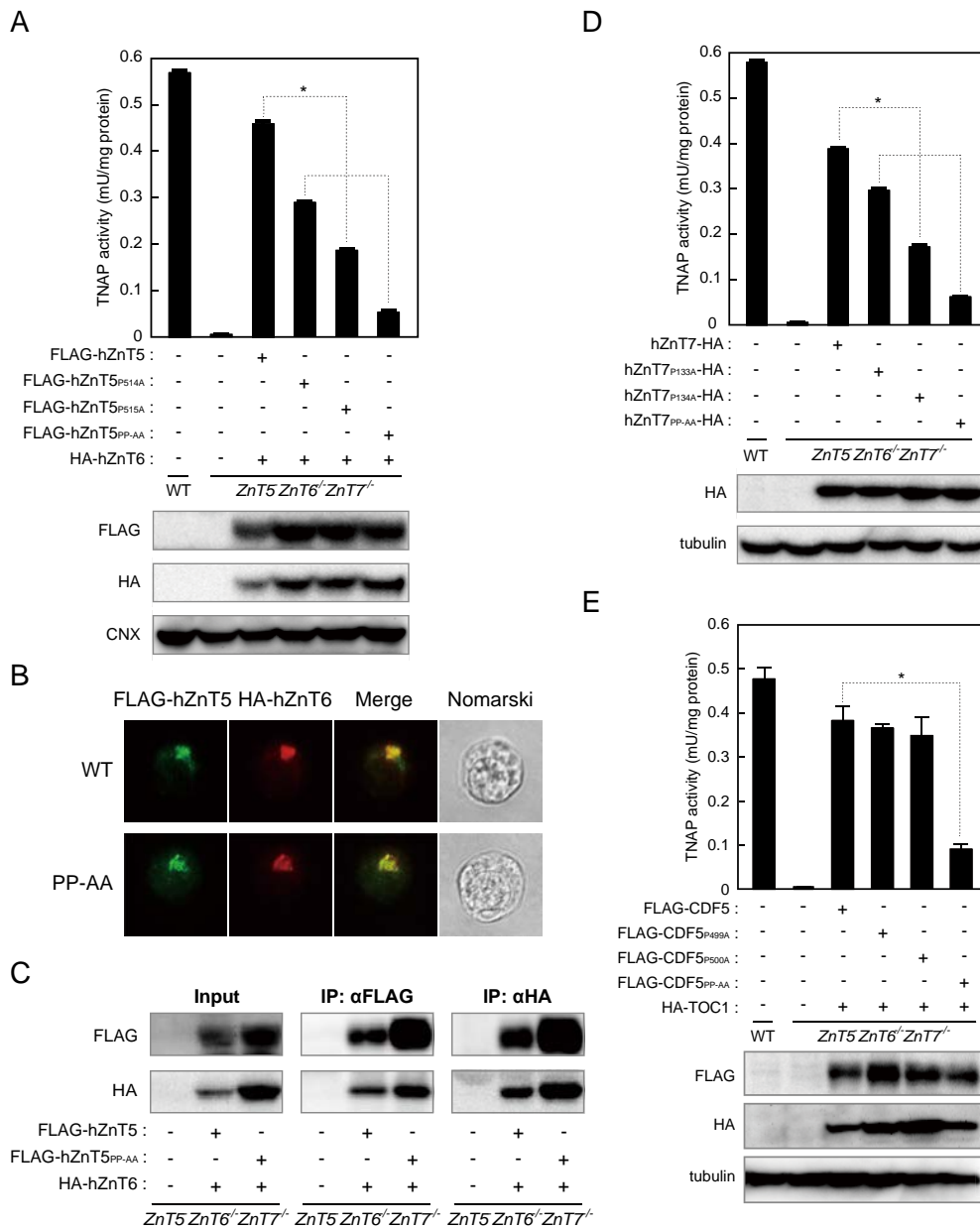
Name	LL1		LL2		LL3	
CDF5	419	FLYGFWTNSL <b>GLI</b> 431	494	ERLFD <b>PP</b> -NINTDRL 507	576	FV <b>II</b> STLLIQWFGWVWV 592
hZnT5	434	LFYGVLTNSL <b>GLI</b> 446	509	ARLID <b>PP</b> -ELDTHML 522	605	GV <b>IV</b> STVLIEQFGWFIA 621
hZnT7	53	LLYGIWNSCL <b>GLI</b> 65	128	ERAL <b>PP</b> -DVHHERL 141	250	GV <b>IA</b> SAIMMQN <b>FG</b> LMIA 266
hZnT1	26	VVSRVTSSLAML 38	202	ERFIEPHEMQQPLVV 216	261	IVV <b>VN</b> ALVFY <b>FS</b> WKGCS 277
hZnT2	89	VGGYLAHSLAVM 101	164	ERLISGDYEIDGGTM 178	233	GVLVAAYILY <b>FKPEYKY</b> 249
hZnT3	91	VGGYLAHSLAIM 103	166	VRL <b>LH</b> SDYHIEGGAM 180	248	GV <b>LA</b> ASILY <b>FKPQYKA</b> 264
hZnT4	129	LVGGYIANS <b>LAIM</b> 141	204	QRTIHMNYEINGDIM 218	287	GV <b>LI</b> AA <b>YIIRFKPEYKI</b> 303
hZnT6	49	LMWCSSTNSIALT 61	124	ERFLEQP-EIHTGRL 137	211	ALCITYMLIEINNYEAV 227
hZnT8	89	VGGHIA <b>GS</b> LAVV 101	164	ERLLYPDYQIQATVM 178	230	SVLISAL <b>IIYFKPEYKI</b> 246
hZnT10	26	L <b>VS</b> GYL <b>GN</b> SIALL 38	202	LRLARPERIDDP <b>ELV</b> 216	254	V <b>VV</b> ITAI <b>IFYV</b> LP <b>LKSE</b> 270

Figure 2-2. ZnT family 並びに CDF5 のルミナルループ(LL)領域のアミノ酸配列

ZnT family 及び CDF5 の LL 1-3 のアミノ酸配列を比較した(ZnT5、CDF5 では LL 5-7 であるが、便宜上 LL 1-3 として扱う)。PP モチーフは赤塗りを背景に黒字、PP モチーフ以外で ZnT5、ZnT7、CDF5 のみで保存されているアミノ酸残基は赤、ZnT5、ZnT7、CDF5 以外で高度に保存されたアミノ酸残基は緑で示す。

### 2-3. ZnT5、ZnT7、CDF5 の PP モチーフは TNAP 活性化に重要である

LL 領域の相同性検索で、ZnT5、ZnT7、CDF5 にのみ保存されているアミノ酸残基のうち、LL2 に存在する Pro-Pro 配列(PP モチーフ)に対応する他の ZnT のアミノ酸残基は ZnT6 を除き 3 残基で構成されることが予想された(Fig. 2-2)。又、プロリン残基は他のアミノ酸残基と異なり特徴的な立体構造を有することから、PP モチーフに特有の機能が存在することが推察された。そこでまず、PP モチーフと TNAP 活性との関係を解析することとした。hZnT5 の PP モチーフを構成するプロリン残基に対するアラニン置換変異体を作製し、ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>細胞に対して hZnT6 と共発現させたところ、hZnT5<sub>P514A</sub> 及び hZnT5<sub>P515A</sub> の TNAP 活性化能が野生型と比較して有意に低下していることが明らかとなった(Fig. 2-3A)。更に、hZnT5<sub>P514A,P515A</sub> (hZnT5<sub>PP-AA</sub>)の TNAP 活性化能は野生型の 10%程度にまで低下していた(Fig. 2-3A)。hZnT5<sub>PP-AA</sub> の細胞内局在を観察したところ、野生型と同様に hZnT6 と共局在していた(Fig. 2-3B)。又、免疫沈降により ZnT5<sub>PP-AA</sub> は野生型と同じく hZnT6 と複合体を形成することも確認された(Fig. 2-3C)。hZnT7 並びに CDF5 の PP モチーフに対するアラニン置換変異体も作製し、hZnT5 変異体と同様に TNAP 活性化能を評価した。その結果、hZnT7<sub>P133A</sub> 及び hZnT7<sub>P134A</sub> は野生型と比較して TNAP 活性化能が低下し、hZnT7<sub>P133A,P134A</sub> (hZnT7<sub>PP-AA</sub>)では顕著な低下が認められた(Fig. 2-3D)。CDF5<sub>P499A</sub>、CDF5<sub>P500A</sub> 及び CDF5<sub>P499A,P500A</sub> (CDF5<sub>PP-AA</sub>)では、野生型と比較して CDF5<sub>PP-AA</sub> の TNAP 活性化能が顕著に低下した(Fig. 2-3E)。これら変異体のタンパク発現量は野生型と同等であった。これらの結果から、PP モチーフは TNAP 活性化に重要な役割を有していることが明らかとなった。



**Figure 2-3. hZnT5、hZnT7、CDF5 の PP モチーフは TNAP 活性化に重要である**

(A) *ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>* 細胞に FLAG-hZnT5<sup>P514A</sup>、FLAG-hZnT5<sup>P515A</sup> 又は FLAG-hZnT5<sup>PP-AA</sup> と HA-hZnT6 を共発現させ、TNAP 活性を測定した。各タンパク質の発現は免疫ブロット解析により確認した。(n = 3、error bars = ± SD、\*P < 0.01)

(B) *ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>* 細胞に FLAG-hZnT5 又は FLAG-hZnT5<sup>PP-AA</sup> と HA-hZnT6 を共発現させ、それぞれの細胞内局在をタグに対する抗体を用いた免疫染色により観察した。

(C) Fig. 2-1C と同様の方法で FLAG-hZnT5 又は FLAG-hZnT5<sup>PP-AA</sup> と HA-hZnT6 に対し免疫沈降を行った。

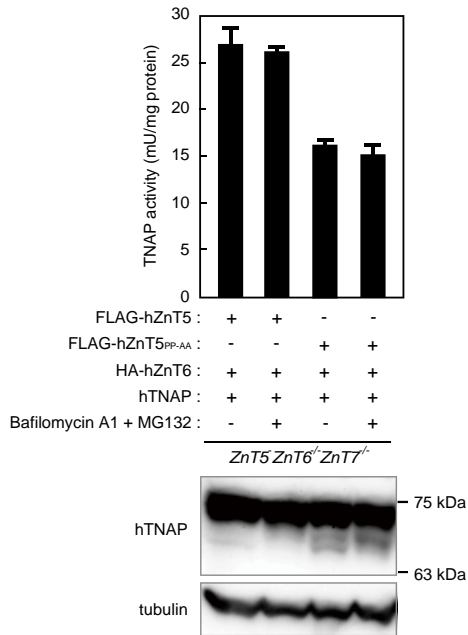
(D) *ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>* 細胞に hZnT7<sup>P133A</sup>-HA、hZnT7<sup>P134A</sup>-HA 又は hZnT7<sup>PP-AA</sup>-HA を発現させ、TNAP 活性を測定した。各タンパク質の発現は免疫ブロット解析により確認した。(n = 3、error bars = ± SD、\*P < 0.01)

(E) *ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>* 細胞に FLAG-CDF5<sup>P499A</sup>、FLAG-CDF5<sup>P500A</sup> 又は FLAG-CDF5<sup>PP-AA</sup> と HA-TOC1 を共発現させ、TNAP 活性を測定した。各タンパク質の発現は免疫ブロット解析により確認した。(n = 3、error bars = ± SD、\*P < 0.01)

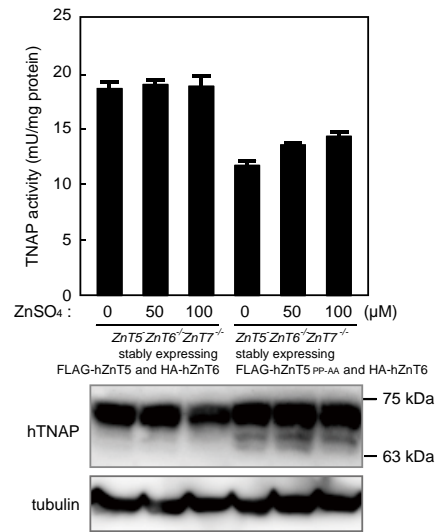
#### 2-4. PPモチーフはTNAPの成熟に重要な機能を有している

PPモチーフはTNAP活性化に対して特異的な機能を有していることが強く示唆されたため、PP-AA変異によるhTNAPタンパクへの影響を評価した。まず、*ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>*細胞に野生型hZnT5又はhZnT5<sub>PP-AA</sub>とhZnT6を共発現させた細胞株にhTNAPを発現させ、TNAP活性(hTNAPと内在性TNAPの活性の和)を測定した。その結果、hZnT5<sub>PP-AA</sub>を発現させた細胞株は野生型を発現させた細胞株と比べてTNAP活性が60%程度にまで低下した(Fig. 2-4A)。PP-AA変異によるhTNAPの発現パターンへの影響を確認したところ、hTNAPの発現レベルに関して大きな変化は認められなかった(Fig. 2-4A)。このことから、PPモチーフはZnT5-ZnT6によるhTNAPタンパクに対する安定化作用には寄与していないことが示唆された。一方で、PP-AA変異により低分子側に新たなバンドが検出された。このバンドはプロテアソーム阻害剤のMG132や、液胞性プロトンATPase阻害剤でありリソソームの機能を阻害するbafilomycin A1を処理しても変化が認められなかったことから、ユビキチン-プロテアソーム系及びリソソーム系によるタンパク質分解により生じたものでないことが明らかとなった(Fig. 2-4A)。更に、過剰の亜鉛を添加してもこのバンドに変化は認められなかった(Fig. 2-4B)。これらのことから、新たに生じたバンドはPP-AA変異によりZnT5-ZnT6によるTNAP活性化能に影響が生じたことによってもたらされたものであると推察された。このバンドを先行研究で報告されたhTNAPの発現パターンと比較したところ、アポ型hTNAPのバンドと一致していた[79]。従って、PP-AA変異がZnT5-ZnT6が機能するTNAPタンパクの成熟機構に障害をもたらした可能性が考えられ、PPモチーフはTNAPの成熟に重要な機能を有していることが示唆された。

A



B



**Figure 2-4. PPモチーフはTNAPの成熟に必要である**

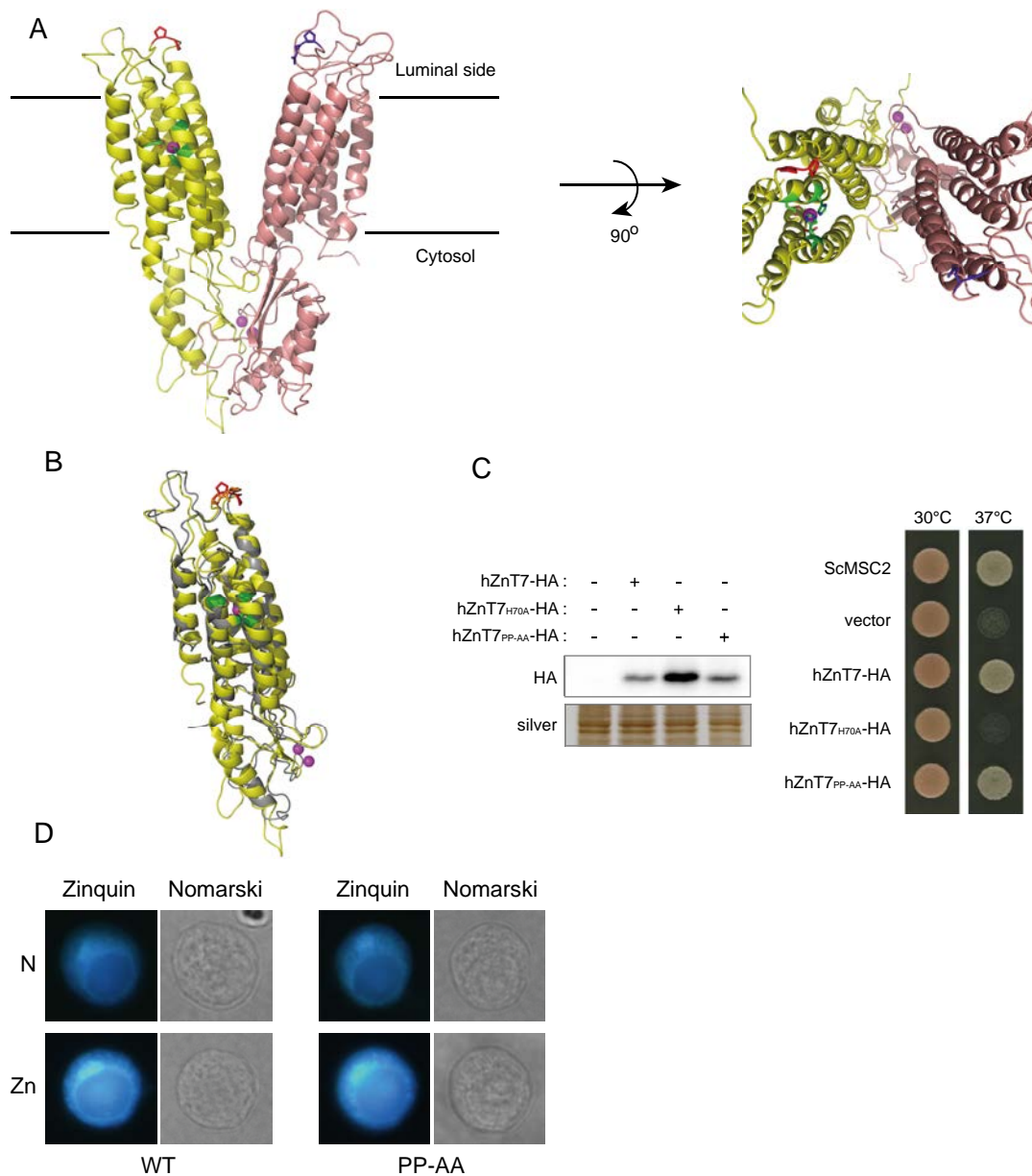
(A) *ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>*細胞に FLAG-hZnT5 又は FLAG-hZnT5<sup>PP-AA</sup> と HA-hZnT6 を共発現させた細胞株に hTNAP を発現させ、細胞全タンパク質における TNAP 活性(内在性 TNAP と hTNAP の活性の和)を測定した。hTNAP の発現パターンを確認したところ、FLAG-hZnT5<sup>PP-AA</sup> を発現させた細胞株で約 75-kDa の高分子量のバンドに加えて約 65-kDa の低分子量のバンドが検出された。この低分子量のバンドは MG132 (30 μM)や bafilomycin A1 (30 nM)を 2 時間処理しても変化が認められなかった。

(B) (A)と同様の細胞株を硫酸亜鉛(50、100 μM)存在下で 24 時間培養し TNAP 活性を測定したところ、TNAP 活性の回復は認められず、約 65-kDa の低分子量のバンドにも変化がなかった。

## 2-5. PP-AA 変異体の亜鉛輸送活性の評価

PP モチーフがどのように TNAP 活性化に機能するのかが検証するために、ZnT5-ZnT6 の立体構造モデルを構築し、PP モチーフの立体配置を観察した(Fig. 2-5A)。PP モチーフを含む LL2 の立体配置に着目すると、膜貫通領域の亜鉛結合サイトの内腔側上部に位置することが推察された(Figs. 2-5A,B)。亜鉛結合サイトは亜鉛輸送の要であることから、その近傍に位置する PP モチーフは亜鉛輸送過程において重要な空間配置を占めており、亜鉛輸送に関与する可能性が考えられた。そこで、PP-AA 変異による亜鉛輸送活性への影響を評価した。

亜鉛輸送活性の評価には *S. cerevisiae* の ZnT5 オートログである *msc2* 遺伝子を変異させた DY150 *msc2* (*msc2* 変異株)を用いた[80-82]。 *msc2* 変異株は小胞体ストレスの上昇により、炭素源としてエタノール及びグリセロールを含む YPGE 寒天培地で培養すると温度感受性を示し、37°C でその生育が顕著に抑制される(Fig. 2-5C)。この *msc2* 変異株に hZnT7 を発現させると 37°C の培養条件における生育が野生株細胞と同等にまで回復することが判明した(Fig. 2-5C)。一方で、亜鉛結合サイトに変異を導入し亜鉛輸送活性が消失した hZnT7<sub>H70A</sub> を発現させた *msc2* 変異株では生育の回復は認められなかった(Fig. 2-5C)。このことから、*msc2* 変異株の温度感受性を指標とした hZnT7 の亜鉛輸送活性の評価が可能であると判断した。そして、hZnT7<sub>PP-AA</sub> を発現させた際の *msc2* 変異株の生育を観察したところ、37°C の培養条件で野生型 hZnT7 と同等にその生育が回復した(Fig. 2-5C)。このことから、hZnT7<sub>PP-AA</sub> は野生型と同等の亜鉛輸送活性を保持していることが明らかとなった。hZnT5<sub>PP-AA</sub> に対しても同様の評価を試みたが、hZnT5-hZnT6 による *msc2* 変異株の亜鉛耐性の回復が認められなかったために本系では解析できなかった。しかしながら、hZnT5 の CDF ドメインと hZnT7 の立体構造には高い類似性が認められ、PP モチーフが内腔側で同様の位置を占めていることが推測されたことから(Fig. 2-5B)、PP-AA 変異により細胞質から早期分泌経路内腔への亜鉛輸送に影響が出る可能性は hZnT7 と同様に極めて低いと考えられた。更に、PP-AA 変異による細胞内亜鉛ホメオスタシスに対する影響を評価するために、hZnT5 又は hZnT5<sub>PP-AA</sub> と hZnT6 を共発現させた *ZnT5<sup>-</sup>ZnT6<sup>-</sup>ZnT7<sup>-</sup>* 細胞を主に細胞内小器官の亜鉛を検出する亜鉛プローブの Zinquin で染色した。両細胞株を通常条件又は亜鉛添加条件で培養したところ、細胞株間で染色結果に明確な差異は認められなかった(Fig. 2-5D)。



**Figure 2-5. PP-AA 変異体は亜鉛輸送活性を保持している**

(A) hZnT5-hZnT6 の立体構造モデル。細胞膜を貫通する 6 本のらせん構造とそれらをつなぐグループ構造から構成される。hZnT5 及び hZnT6 の C 末端領域は細胞質側で会合しダイマーを形成する。hZnT5 (黄) は CDF ドメインのみを用いたモデルであり、PP モチーフを赤で示す。hZnT6 (マゼンタ) の PP モチーフに相当する QP 配列は紫で示す。

(B) hZnT5 の CDF ドメイン(黄)と hZnT7(グレー)の立体構造を重ね合わせると、両 PP モチーフ(hZnT5 は赤、hZnT7 はオレンジ)が同様の立体配置をとることがわかる。

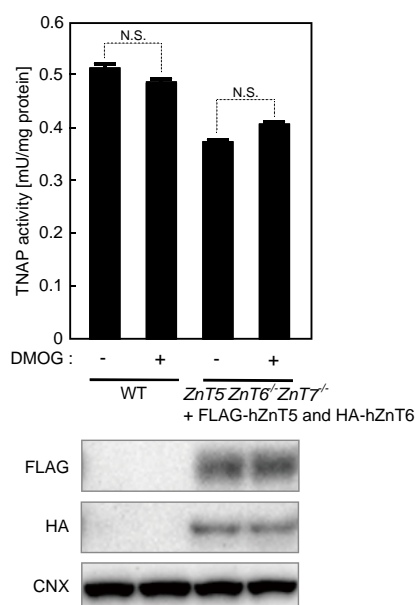
(C) *S. cerevisiae* 変異体 DY150 *msc2*(*msc2* 変異体)を用いた hZnT7 の相補性解析。*S. cerevisiae* *MSC2* (*ScMSC2*)、*hZnT7*-HA、*hZnT7*<sub>H70A</sub>-HA 又は *hZnT7*<sub>PP-AA</sub>-HA 遺伝子を形質転換した *msc2* 変異体を 3 日間 30°C 又は 37°C で培養した。それぞれのタンパク発現はイムノブロット解析により確認した。ローディングコントロールとして銀染色を行った。

(D) FLAG-hZnT5 (WT) 又は FLAG-hZnT5<sub>PP-AA</sub> (PP-AA) と HA-hZnT6 を共発現させた *ZnT5*<sup>-/-</sup>*ZnT6*<sup>-/-</sup>*ZnT7*<sup>-/-</sup> 細胞を通常培地(N)又は亜鉛添加培地(Zn, 100 μM 硫酸亜鉛)で 24 時間培養し亜鉛プローブの Zinquin で染色した。



## 2-6. PPモチーフに対するヒドロキシ化の検討

PP-AA 変異は細胞質から早期分泌経路内腔への亜鉛輸送には影響を及ぼさないことが明らかとなったことから、PPモチーフはHD-HDモチーフから早期分泌経路内腔へ亜鉛が遊離しTNAPへ受け渡されるまでの過程で機能すると考えられた。PPモチーフを構成するプロリン残基はそれ自体で亜鉛を配位させることはできないが、ヒドロキシ化されることで亜鉛の配位が可能となる。従って、PPモチーフがヒドロキシ化されることで亜鉛を受け渡す機能を担っている可能性が考えられた[83]。そこで、プロリルヒドロキシラーゼ阻害剤であるDimethyloxaloylglycine (DMOG)によるTNAP活性への影響を評価したところ、DMOGの有無でTNAP活性に差は認められなかった(Fig. 2-6)。このことから、PPモチーフがヒドロキシ化されることで亜鉛の動態制御に機能する可能性は低いと考えられた。



**Figure 2-6. PPモチーフはヒドロキシ化されることでTNAP活性化に寄与するのではない**

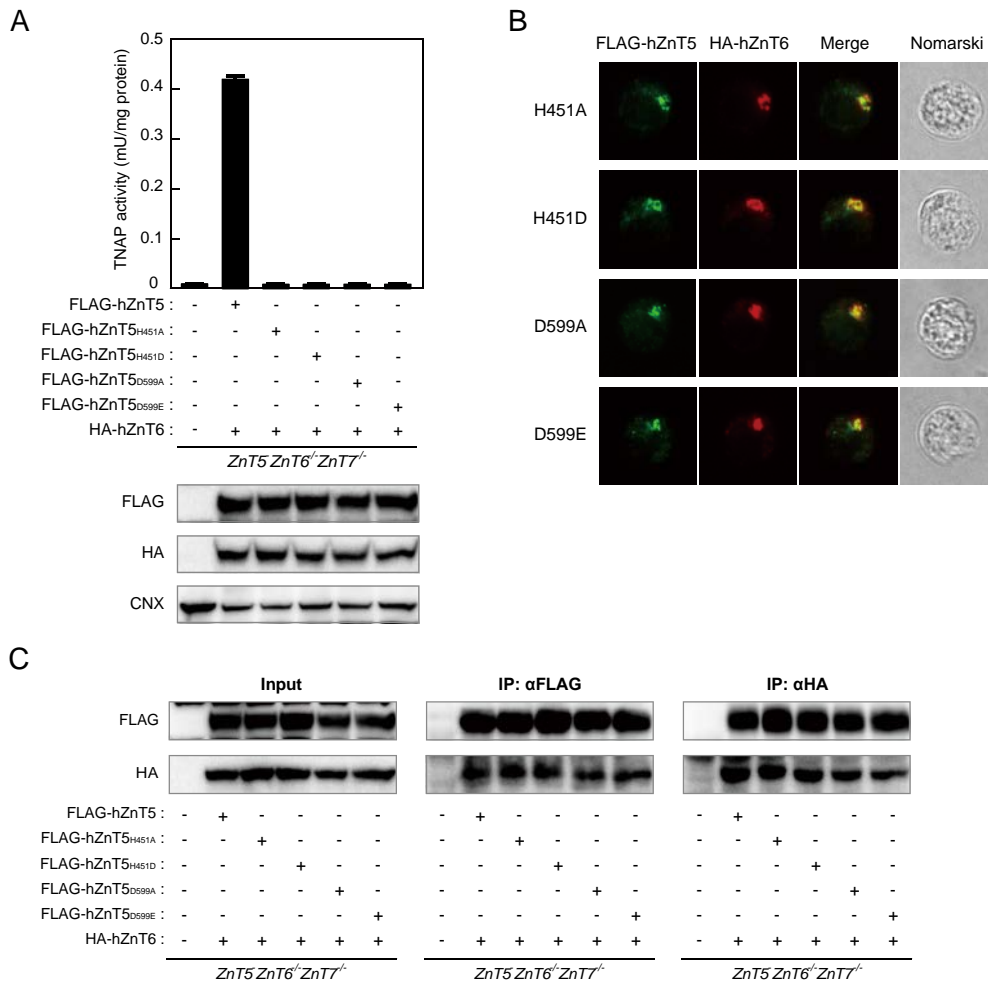
100 μM DMOG存在下、野生株細胞(WT)とFLAG-hZnT5とHA-hZnT6を共発現させたZnT5ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>細胞を24時間培養し、TNAP活性を測定した。タンパク質の発現はイムノブロット解析により確認した。

(n = 3、error bars = SD、N.S.: not significant)

## 2-7. TNAPの活性化には膜貫通領域の亜鉛結合サイトを構成するHD-HDモチーフからの適切な亜鉛輸送が必要である

ZnT5-ZnT6及びZnT7はPPモチーフの有無によらず亜鉛輸送活性を有するため、早期分泌経路内腔におけるTNAPの活性化には単に亜鉛濃度によらない特殊な機構により、亜鉛の動態が緻密に制御されていることが想定された。そこで、HD-HDモチーフから早期分泌経路内腔への亜鉛の遊離とTNAP活性との関係を精査した。HD-HDモチーフをAD-HD、HD-HAモチーフに変異させたhZnT5<sub>H451A</sub>、hZnT5<sub>D599A</sub>は亜鉛輸送活性が消失しており、TNAP活性化能を持たない[49]。一方でDD-HD並びにHD-HEモチーフに変異させたhZnT5<sub>H451D</sub>、hZnT5<sub>D599E</sub>は亜鉛輸送活性を保持していることが知られており[26,27]、TNAP活

活性化を示す可能性が考えられた。そこで、hZnT5<sub>H451D</sub>、hZnT5<sub>D599E</sub> の TNAP 活性化能を評価するために、*ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>*細胞に対して hZnT6 と共発現させ TNAP 活性を測定した。その結果、両細胞株で TNAP 活性が全く回復しないことが判明した(Fig. 2-7A)。hZnT5<sub>H451D</sub>、hZnT5<sub>D599E</sub> の細胞内局在を観察したところ、野生型 hZnT5 と同様に hZnT6 と共局在し、hZnT6 とヘテロダイマーを形成することが明らかとなった(Figs. 2-7B,C)。このことから、hZnT5<sub>H451D</sub>、hZnT5<sub>D599E</sub> は hZnT6 とヘテロダイマーを形成し早期分泌経路内腔へ亜鉛を輸送するものの、TNAP を活性化できないことが明らかとなった。



**Figure 2-7. TNAP の活性化には膜貫通領域の亜鉛結合サイトを構成する HD-HD モチーフからの適切な亜鉛輸送が必要である**

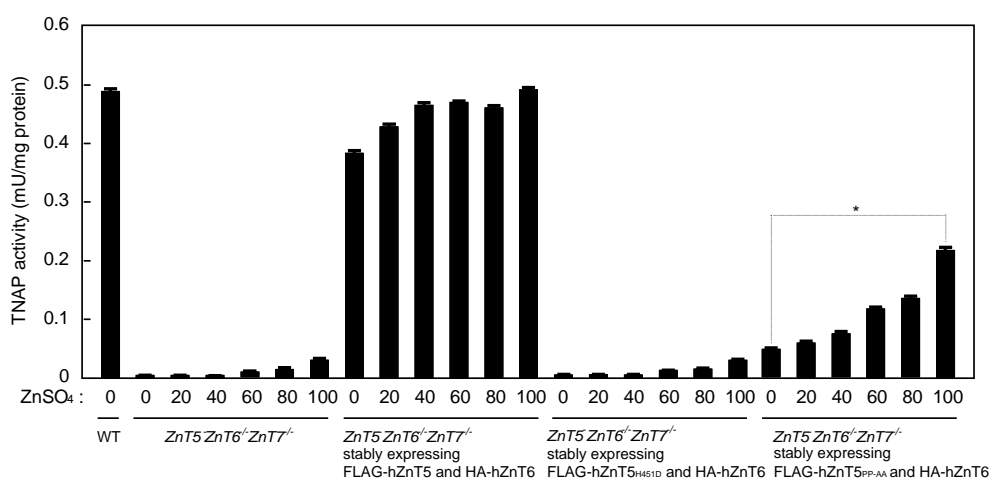
(A) *ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>*細胞に N 末端に FLAG-tag を融合させた hZnT5<sub>H451A</sub>、hZnT5<sub>H451D</sub>、hZnT5<sub>D599A</sub> 又は hZnT5<sub>D599E</sub> と HA-hZnT6 を共発現させ、TNAP 活性化を測定した。各タンパク質の発現は免疫ブロット解析により確認した。(n = 3, error bars = ± SD)

(B) FLAG-hZnT5 の変異体(hZnT5<sub>H451A</sub>、hZnT5<sub>H451D</sub>、hZnT5<sub>D599A</sub> 又は hZnT5<sub>D599E</sub>) と HA-hZnT6 の *ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>*細胞における局在をタグに対する抗体を用いた免疫染色により観察した。

(C) Fig. 2-1C と同様の方法で FLAG-hZnT5 及びその変異体(hZnT5<sub>H451A</sub>、hZnT5<sub>H451D</sub>、hZnT5<sub>D599A</sub> 又は hZnT5<sub>D599E</sub>) と HA-hZnT6 に対し免疫沈降を行った。

## 2-8. PPモチーフは早期分泌経路内腔でTNAPへの効率的な亜鉛の受け渡しに寄与している

TNAP活性化に対するHD-HDモチーフとPPモチーフの機能を精査するために、hZnT5<sub>H451D</sub>及びhZnT5<sub>PP-AA</sub>のTNAP活性化における亜鉛添加による影響を比較評価した。hZnT5<sub>H451D</sub>、hZnT6を共発現させたZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>細胞では、亜鉛添加によるTNAP活性の変化がZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>細胞と同等であり、TNAP活性の回復はほとんど認められなかった(Fig. 2-8)。これに対して、hZnT5<sub>PP-AA</sub>、hZnT6を共発現させたZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>細胞では、野生株細胞の活性には及ばないものの、添加する亜鉛の濃度に依存してTNAP活性の著明な回復が認められた(Fig. 2-8)。この対照的な結果から、HD-HDモチーフとPPモチーフは異なる機序でTNAP活性化に関わることが明らかとなり、PPモチーフは早期分泌経路内腔でTNAPへ効率的に亜鉛を受け渡すために機能していることが強く示唆された。



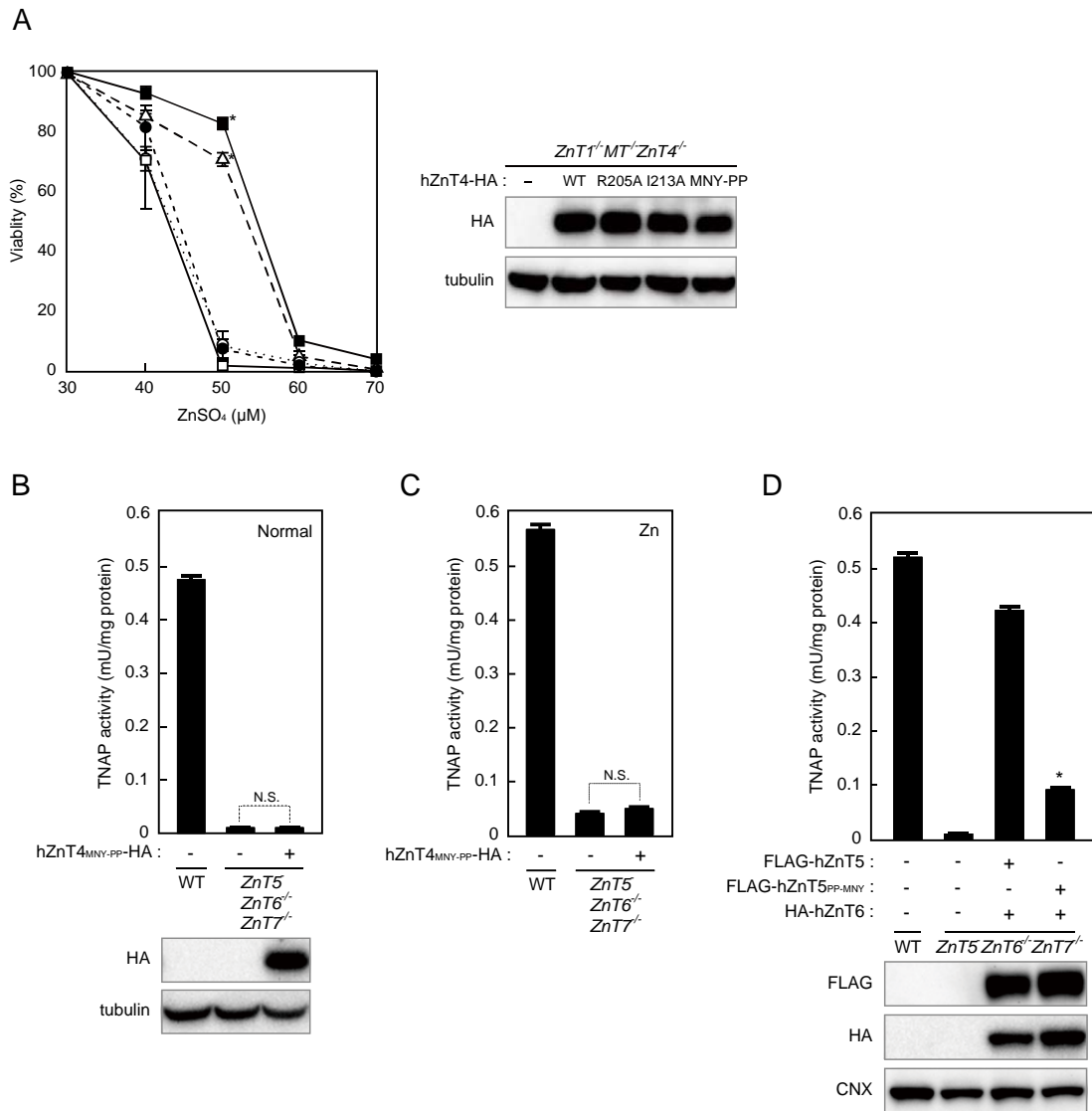
**Figure 2-8. PP-AA 変異により低下した TNAP 活性は亜鉛を添加することで回復する**  
ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>細胞に FLAG-hZnT5、FLAG-hZnT5<sub>H451D</sub> 又は FLAG-hZnT5<sub>PP-AA</sub> と HA-hZnT6 を共発現させた細胞を亜鉛添加培地(0、20、40、60、80、100 μM 硫酸亜鉛)で 72 時間培養後、TNAP 活性を測定した。(n = 3、error bars = ± SD、\*P < 0.01)

## 2-9. PPモチーフはTNAP活性化に重要であるが、ZnT5、ZnT7以外のZnTにTNAP活性化能を付与することはできない

TNAP活性化におけるPPモチーフの重要性を検証するために、ZnT familyの中でhZnT5やhZnT7と比較的相同性が高いhZnT4を対象として、相同性検索においてPPモチーフの位置に相当するアミノ酸残基(Met-Asn-Tyr(MNY))をPro-Pro配列に置換した変異体(hZnT4<sub>MNY-PP</sub>)を作製し、TNAP活性化能が付与できるかを検証した。

まず、*ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞の亜鉛耐性の回復を指標として、hZnT4<sub>MNY-PP</sub>の亜鉛輸送活性を評価した。*ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞は60 μMの硫酸亜鉛存在下においてほぼ死滅するが、hZnT4を発現させた細胞株では*ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞で低下した亜鉛耐性が有意に回復した(Fig. 2-9A)。次に、*ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞にhZnT4<sub>MNY-PP</sub>を発現させ亜鉛耐性を比較したところ、hZnT4<sub>MNY-PP</sub>は野生型と同等のレベルで*ZnT1*<sup>-/-</sup>*MT*<sup>-/-</sup>*ZnT4*<sup>-/-</sup>細胞の亜鉛耐性を回復させた(Fig. 2-9A)。従って、hZnT4<sub>MNY-PP</sub>は野生型と同等の亜鉛輸送活性を保持していることが明らかとなった。

hZnT4<sub>MNY-PP</sub>を*ZnT5*<sup>-/-</sup>*ZnT6*<sup>-/-</sup>*ZnT7*<sup>-/-</sup>細胞に発現させTNAP活性を測定したところ、*ZnT5*<sup>-/-</sup>*ZnT6*<sup>-/-</sup>*ZnT7*<sup>-/-</sup>細胞のTNAP活性の回復は認められず、亜鉛添加によっても回復しなかった(Fig. 2-9B,C)。一方で、hZnT5に対しPPモチーフをMNYに置換した変異体(hZnT5<sub>PP-MNY</sub>)を作製しTNAP活性化能を評価したところ、TNAP活性がhZnT5<sub>PP-AA</sub>と同じく顕著に低下した(Fig. 2-9D)。これらの結果から、PPモチーフはTNAP活性化に重要であるが、ZnT5、ZnT7以外のZnTにTNAP活性化能を付与することはできないことが明らかとなった。



**Figure 2-9. PP モチーフは TNAP 活性化に重要であるが TNAP 活性化能のない ZnT に TNAP 活性化能を付与することはできない**

(A) 硫酸亜鉛(30、40、50、60、70 μM)存在下で 72 時間培養した各細胞株の生存率(30 μM の硫酸亜鉛存在下で培養した際の生存率を 100 %として算出)を示す。各タンパク質の発現はイムノブロット解析により確認した。(●: ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞; ■: hZnT4-HA 発現 ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞、△: hZnT4<sub>MNY-PP</sub>-HA 発現 ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞、○: hZnT4<sub>R205A</sub>-HA 発現 ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞、□: hZnT4<sub>I213A</sub>-HA 発現 ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞) (n = 3、error bars = ± SD、\*P < 0.01 vs. ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞)

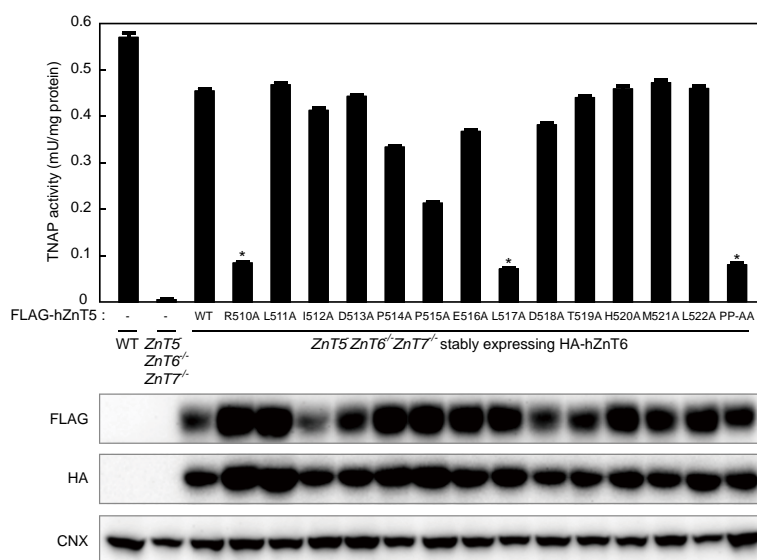
(B, C) hZnT4<sub>MNY-PP</sub>-HA を ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>細胞に発現させ、通常培養条件(Normal)又は亜鉛添加条件(Zn、100 μM 硫酸亜鉛)で 24 時間培養後、TNAP 活性を測定した。タンパク質の発現はイムノブロット解析により確認した。(n = 3、error bars = ± SD、N.S.: not significant)

(D) FLAG-hZnT5<sub>PP-MNY</sub> と HA-hZnT6 を共発現させた ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>細胞の TNAP 活性化を測定した。各タンパク質の発現はイムノブロット解析により確認した。(n = 3、error bars = ± SD、\*P < 0.01 vs. FLAG-hZnT5、HA-hZnT6 発現 ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>細胞)

## 2-10. LL2 を構成するアミノ酸残基の TNAP 活性化に対する機能評価

2-5 より、LL2 は膜貫通領域に存在する亜鉛結合サイトの内腔側上部に位置し、亜鉛輸送過程に対して重要な空間配置を占めている可能性が示唆された。従って、LL2 を構成するアミノ酸残基のうち、PP モチーフ以外にも TNAP 活性化に影響を及ぼすものが存在する可能性が推察された。そこで、hZnT5 の LL2 を構成するアミノ酸残基の TNAP 活性に対する影響をアラニンスキャニングにより網羅的に解析した。その結果、hZnT5<sub>PP-AA</sub> と同様に hZnT5<sub>R510A</sub>、hZnT5<sub>L517A</sub> で TNAP 活性が顕著に低下することが明らかとなった(Fig. 2-10)。hZnT5 で見出された R510 は他の ZnT においても保存されており、L517 は保存されていないものの、ほとんどの ZnT で類似性の高い疎水性アミノ酸であった(Fig. 2-2)。従って、これらのアミノ酸残基は PP モチーフとは異なり、細胞質から早期分泌経路内腔への亜鉛輸送そのものに重要であることが推測された。

R510 及び L517 の機能を精査するために、これらのアミノ酸残基に相当する hZnT4 の R205、I213 をアラニン置換した変異体を作製し、亜鉛輸送活性を評価した。ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞に対して hZnT4<sub>R205A</sub>、hZnT4<sub>I213A</sub> を発現させたところ、ZnT1<sup>-/-</sup>MT<sup>-/-</sup>ZnT4<sup>-/-</sup>細胞の亜鉛耐性の回復は認められなかった(Fig. 2-9A)。このことから hZnT4<sub>R205A</sub>、hZnT4<sub>I213A</sub> は亜鉛輸送活性が消失していることが明らかとなり、ZnT family において hZnT4 の R205A 及び I213A に相当するアミノ酸残基は亜鉛輸送活性に重要であることが推察された。



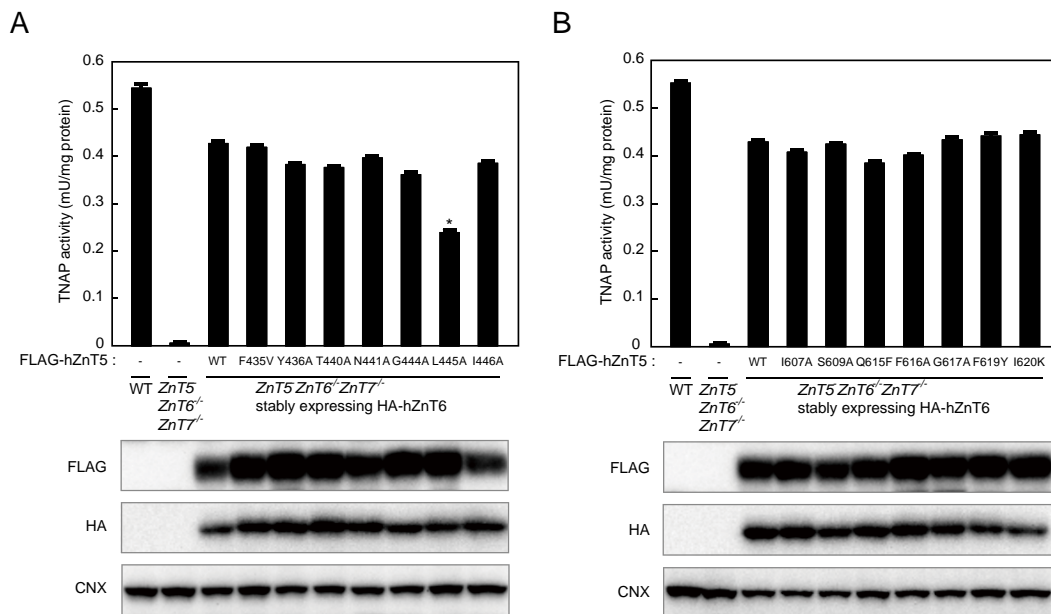
**Figure 2-10. hZnT5 の LL2 を構成するアミノ酸残基の TNAP 活性化能に対する機能評価**

hZnT5 の LL2 を構成するアミノ酸残基に対してアラニンスキャニングを実施した。ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>細胞に FLAG-hZnT5 の各変異体と HA-hZnT6 を共発現させ、TNAP 活性を測定した。タンパク質の発現はイムノブロット解析により確認した。(n = 3, error bars = ± SD, \*P < 0.01 vs. FLAG-hZnT5、HA-hZnT6 発現 ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>細胞)

## 2-11. LL1、LL3 を構成するアミノ酸残基の TNAP 活性化に対する機能評価

LL のうち、hZnT5、hZnT7、CDF5 にのみ保存されているアミノ酸残基は PP モチーフのみならず、LL1、LL3 にも複数存在する(Fig. 2-2)。これらのアミノ酸残基が PP モチーフと同様に TNAP 活性に寄与しているかを検証した。LL1、LL3 において、hZnT5、hZnT7、CDF5 にのみ保存されているアミノ酸残基に対し、hZnT5 のアラニン置換変異体を作製し、TNAP 活性化能を評価した。その結果、ほとんどの変異体で TNAP 活性化能は野生型と同等であることが明らかとなった(Figs. 2-11A,B)。唯一 L445A で TNAP 活性の低下が認められたものの、PP-AA 変異体と比べて、その低下は軽微であった(Figs. 2-3A,2-11A)。

これまでの解析では LL 領域で hZnT5、hZnT7、CDF5 にのみ保存されているアミノ酸残基を対象に解析を行ってきたが、hZnT5、hZnT7 以外の ZnT で高度に保存されているアミノ酸残基も複数存在する(Fig. 2-2)。これらのアミノ酸残基が TNAP 活性化にネガティブに作用することで結果的に hZnT5、hZnT7 以外の ZnT では TNAP 活性化能がない可能性が考えられた。そこで、hZnT5 に対して hZnT5、hZnT7、CDF5 以外で高度に保存されたアミノ酸残基に置換した変異体(F435V、Q615F、F619Y、I620K)を作製し、TNAP 活性化能を評価した。その結果、TNAP 活性化能の低下は認められなかった(Figs. 2-11A,B)。



**Figure 2-11. hZnT5 の LL1、LL3 を構成するアミノ酸残基の TNAP 活性化能に対する機能評価**  
**(A)** LL1 を構成するアミノ酸残基に変異を導入した FLAG-hZnT5 変異体と HA-hZnT6 を *ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>* 細胞に共発現させ、TNAP 活性を測定した。タンパク質の発現は免疫ブロット解析により確認した。(n = 3, error bars = ± SD, \*P < 0.01 vs. FLAG-hZnT5 及び HA-hZnT6 発現 *ZnT5<sup>-/-</sup>ZnT6<sup>-/-</sup>ZnT7<sup>-/-</sup>* 細胞)

**(B)** (A)と同様の方法で LL3 を構成するアミノ酸残基に変異を導入した FLAG-hZnT5 変異体の TNAP 活性化能を評価した。タンパク質の発現は免疫ブロット解析により確認した。(n = 3, error bars = ± SD)

## 考察

TNAP は早期分泌経路において 2 段階の機構を経て活性化され、この活性化には特定の亜鉛トランスポーターを介した非常に特異的な機構が存在することが推測されていた。本章では、その詳細な分子機序について新たな知見を得ることを目的として、ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 から TNAP へ亜鉛が受け渡されるまでの過程にあると考えられた分子機序の解析を実施した。その結果、TNAP の活性化には膜貫通領域の亜鉛結合サイトからの適切な亜鉛輸送が必要であることを明らかにした。更に、LL2 において TNAP 活性化に必要なドメインとして PP モチーフを見出し、早期分泌経路内腔で TNAP へ効率的に亜鉛を受け渡すために重要な役割を果たすことを示した。

TNAP の活性化には第 2、5 膜貫通領域によって形成された HD-HD モチーフからの適切な亜鉛輸送が必須となるため、HD-HD モチーフの分子機能と TNAP 活性との関係についてより詳細に解析する必要があると考えられた。そこで、hZnT5 の HD-HD モチーフに対する変異体を複数作製し、それらの TNAP 活性化能を評価した。その結果、HD-HD モチーフに変異を導入した hZnT5 変異体は全て TNAP 活性化能が消失した (Table 2-1)。このことから、HD-HD モチーフは TNAP 活性化に必須であることが明らかとなったものの、どのように TNAP 活性化に寄与するかについての分子機序は解明できなかった。これまでに報告されている hZnT5 変異体における機能解析の結果から、hZnT5<sub>H451D</sub> 及び hZnT5<sub>D599E</sub> は亜鉛輸送活性を野生型と同等のレベルで保持していることが明らかとなっている [26,27]。従って、HD-HD モチーフは細胞質から早期分泌経路内腔への亜鉛輸送のみならず、より厳密に制御された機能により TNAP 活性化に寄与していることが推察される。序論でも述べたように、DD-HD、HD-HD の両モチーフに対する亜鉛の親和性及び輸送活性に有意差は認められない [26,27]。このことから、hZnT5<sub>H451D</sub> に関して亜鉛を輸送するにも関わらず TNAP を活性化できないのは、早期分泌経路内腔に存在すると考えられる TNAP 活性化機構に対して適切に亜鉛が供給できないためであると推察される。HD-HE モチーフに関する亜鉛の結合親和性に関する情報は無いものの、hZnT5<sub>D599E</sub> も hZnT5<sub>H451D</sub> と同様に内腔における亜鉛の動態制御機構に障害が生じるために TNAP を活性化することができなくなると考えられる。



**Table 2-1 hZnT5 の HD-HD モチーフに対する変異体と TNAP 活性化能の関係**

hZnT5	亜鉛結合モチーフ	TNAP 活性化能
WT	HD-HD	○
H451A	AD-HD	×(亜鉛輸送活性なし)
H451D	DD-HD	×(YiiP 型、亜鉛輸送活性あり)
H455E	HE-HD	×
H595D	HD-DD	×
D599A	HD-HA	×(亜鉛輸送活性なし)
D599E	HD-HE	×(亜鉛輸送活性あり)
H595D, D599H	HD-DH	×
H451D, D455H	DH-HD	×
H451D, D455H, H595D, D599H	DH-DH	×

hZnT5-hZnT6 及び hZnT7 の立体構造モデルによると、PP モチーフは HD-HD モチーフに対して内腔側上部に位置しており、亜鉛輸送過程で重要な空間配置を占めていると推察される(Fig. 2-4)。従って、早期分泌経路内腔において、TNAP 活性化機構の一端として HD-HD モチーフと PP モチーフが協奏的に機能する可能性が考えられた。立体構造モデルより、両モチーフ間の距離は 20 Å 程度と推定されるため、互いが連携して機能するためには、HD-HD モチーフから亜鉛が遊離する際に、PP モチーフに対してその方向が適切に制御される必要がある。HD-HD モチーフに変異を導入した hZnT5 変異体が TNAP 活性化能を持たないのは、仮に亜鉛輸送活性が保持されていたとしても、早期分泌経路内腔への亜鉛の遊離の方向性に異常が生じ TNAP 活性化の過程に適切に亜鉛を送り込むことができなくなるからかもしれない。本解析では両モチーフが連携して機能するという直接的な知見を得ることはできなかったが、それらは TNAP 活性化のために密接に関係していることが推察されることから、今後も TNAP の活性化に対する両モチーフの関係性について解析を進める必要があると考えられる。

Fig. 2-7 の結果より早期分泌経路内腔で TNAP が亜鉛を獲得するには単に亜鉛濃度に依存しない機構の存在が考えられたため、TNAP は遊離亜鉛を受動的に獲得するのではなく、亜鉛アクセプターとしての ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 から直接相互作用を伴って亜鉛を獲得するモデルが想定された(Fig. 2-12)。金属輸送体と金属酵素の相互作用に関しては、SOD3 が銅シャペロンである ATP7A と直接的相互作用により銅を獲得し活性化することが知られている[84]。亜鉛要求性酵素の活性化においてこのような事例は報告されていないものの、タンパク質間相互作用には亜鉛が介在するものが存在することが報告されており、亜鉛要求性酵素が亜鉛を介在因子として他の分子と相互作用する可能性も考えられる[85]。本解析において、早期分泌経路内腔で PP モチーフが直接的に亜鉛の受け渡しに関与する可能性を考慮し、ヒドロキシ化されることによる亜鉛の授受への関与を検討したが、その可能性は低いと考えられた。この結果は、PP モチーフを含む領域のアミノ酸残基がヒドロキシ化を高頻度で受けるとされる(XPG)<sub>n</sub>モチーフ

フとは異なっていることから強く示唆される[83]。一方で、プロリン残基はタンパク質間相互作用に必要な立体構造の維持に重要であることが知られている[86]。このことから、PPモチーフはプロリン残基によるコンフォメーション制御によるLL2の特徴的な立体構造の形成を介して、亜鉛存在下でTNAP活性化に積極的に関与することが推察される。

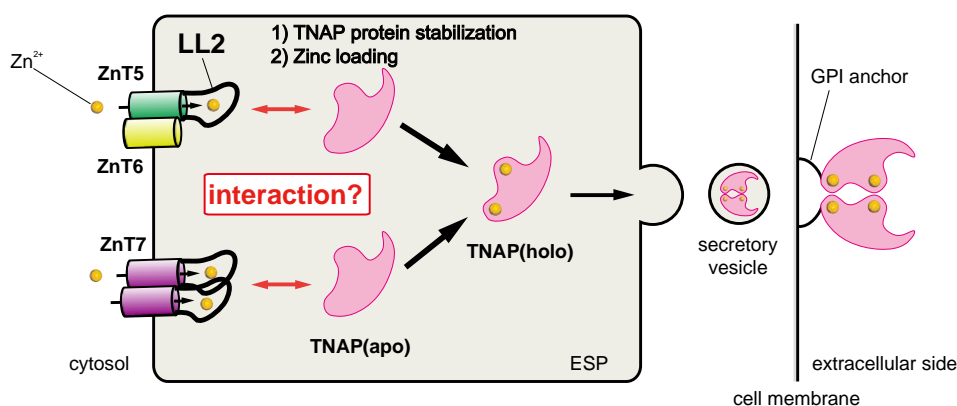


Figure 2-12. 本研究結果から想定される早期分泌経路内腔における TNAP 活性化機構のモデル図

ZnT5、ZnT7 の PP モチーフを構成する 2 つのプロリン残基は高等生物で高度に保存されており、その重要性が伺える(Tables 2-2,2-3)。本解析では、hZnT5 及び hZnT7 の PP モチーフに対してそれぞれのプロリン残基をアラニン置換した変異体を作製し、TNAP 活性化能を比較した。その結果、hZnT5<sub>P514A</sub> と比較して hZnT5<sub>P515A</sub> で TNAP 活性がより低下しており、hZnT7 の変異体解析でも hZnT5 と同様の結果が得られた(Figs. 2-3A,D)。一方で、CDF5 では一方のプロリン残基をアラニン置換しても TNAP 活性化能には大きく影響しなかった(Fig. 2-3E)。このことから、2 つのプロリン残基間並びに生物種間で TNAP 活性化に対する寄与度に差があることが示された。ZnT5 オースログの中にはこれらのプロリン残基が片方のみ保存されているものが存在し、出芽酵母の ZnT5 オースログである Msc2 (ZnT6 オースログの Zrg17 とヘテロダイマーを形成し分泌経路で機能する) は ALP 活性化能をもたないことが知られている(Table 2-2) [81]。一方で、出芽酵母の ZnT ホモログである Cot1 はアミノ酸配列からは ZnT5 オースログとはみなされないが PP モチーフを有しており、ALP 活性化能を有している(Tables 2-3,2-4) [87]。これらのことから、それぞれのプロリン残基による寄与度は異なるものの、ALP 活性化には亜鉛トランスポーターの PP モチーフが生物種を超えて重要な役割を果たしているのかもしれない。

**Table 2-2. ZnT5 オーソログの LL2 を構成するアミノ酸配列**

ZnT5 オーソログ	アミノ酸配列	生物種
ZnT5	510 ARLID <b>PP</b> ELDTHML 523	<i>Homo sapiens</i>
ZnT5	507 ARLID <b>PP</b> ELDTNML 520	<i>Mus musculus</i>
ZnT5	506 ARLVD <b>PP</b> DIDTNML 519	<i>Gallus gallus</i>
ZnT5	505 ARIYD <b>PP</b> DINTDML 518	<i>Xenopus tropicalis</i>
ZnT5	505 TRLVD <b>PP</b> NINTDML 518	<i>Danio rerio</i>
CDF5	494 ERLFD <b>PP</b> NINTDRL 407	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Cis4	440 YRLFH <b>PP</b> QMNTDQL 453	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Msc2	478 ERIFN <b>P</b> IHLHATNE 491	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
MTP12	510 ERILD <b>P</b> QEISTNSL 523	<i>Arabidopsis thaliana</i>

**Table 2-3. ZnT7 オーソログの LL2 を構成するアミノ酸配列**

ZnT7 オーソログ	アミノ酸配列	生物種
ZnT7	128 ERAL <b>PP</b> DVHHERL 141	<i>Homo sapiens</i>
ZnT7	128 ERAL <b>PP</b> DVHHERL 141	<i>Mus musculus</i>
ZnT7	128 ERALE <b>PP</b> DVHHERL 141	<i>Gallus gallus</i>
ZnT7	128 ERALDT <b>P</b> EVHHERL 141	<i>Xenopus tropicalis</i>
ZnT7	128 ERALE <b>PP</b> DVHHDRL 141	<i>Danio rerio</i>
ZnT86D	126 ERLIE <b>P</b> PEVKHERL 139	<i>Drosophila melanogaster</i>

**Table 2-4. ZnT5 と ZnT7 以外の ZnT ホモログの LL2 を構成するアミノ酸配列**

CDF ファミリー	アミノ酸配列	生物種
Cot1	101 QR <b>II</b> AP <b>P</b> VIENPKF 114	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Zhf1	101 ERFIE <b>PP</b> SVSNPTL 114	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
CzcD	104 ERFSN <b>PP</b> KVATTGM 117	<i>Bacillus subtilis</i>

本解析では、PP モチーフ以外にも hZnT5 の R510 及び L517 をアラニン置換することで TNAP 活性化能が顕著に低下することが明らかとなった(Fig. 2-10)。これらのアミノ酸残基は、hZnT4 変異体の機能解析により、亜鉛輸送活性に重要な役割を果たすことが示唆された(Fig. 2-9D)。このことは、R510 について、ZnT ホモログで高度に保存されており、基質輸送活性を規定することが示されていることから強く示唆される[88,89]。又、L517 に関しては、これまでに ZnT ホモログの中でこれに相当するアミノ酸残基についての機能解析は行われていないものの、ほとんどの ZnT family が疎水性アミノ酸残基を有することから、亜鉛輸送の際に疎水性領域の制御を介して亜鉛輸送活性に寄与している可能性が考えられる。hZnT5 の L445 はアラニン置換により TNAP 活性が 30%程度低下した(Fig. 2-11A)。ZnT ホモログにおいて、L445 に相当するアミノ酸残基の機能解析は行われていないものの、その周辺環境が疎水性アミノ酸によって構成されており、それらが基質輸送に重要であることが示されている[88,89]。従って、L445 をアラニン置換することで、軽微ではあるものの亜鉛輸送活性が低下したために TNAP 活性に影響を及ぼしたと推察される。

ZnT の膜貫通領域以外の構造のうち、TNAP 活性に影響を及ぼす領域はこれまでも複数報告されている。第 4、5 膜貫通領域に挟まれたヒスチジンリッチ領域を欠損させた hZnT5 変異体は TNAP 活性化能が完全に消失する[18]。又、hZnT5 の C 末端は hZnT6 とのヘテロダイマーの形成に必須の役割を果たすため、TNAP の活性化に必須の領域であることが明らかとなっている[19]。序論でも述べたように、ヒスチジンリッチ領域は亜鉛輸送に重要であり、C 末端は細胞質側に存在する領域であることから、TNAP 活性化において直接的な亜鉛の受け渡しに機能する可能性は低いと考えられる。本解析では、TNAP 活性に特異的に機能する領域として見出した PP モチーフが早期分泌経路内腔において TNAP へ効率よく亜鉛を受け渡す機構を担っていることを示した。しかしながら、PP モチーフが TNAP 活性化能を規定するのではないことも明らかとなった(Figs. 2-9A,B)。このことから、早期分泌経路内腔において、PP モチーフ以外にも TNAP 活性化に特異的に機能する領域が存在する可能性があり、今後さらなる解析により TNAP 活性化に機能するモチーフの検証並びに TNAP 活性化機構の分子機序の解明が望まれる。

## 総括

分泌型亜鉛要求性酵素である TNAP は、早期分泌経路内腔で ZnT5-ZnT6 と ZnT7 による TNAP タンパクの安定化と、これらトランスポーターによって輸送された亜鉛の獲得という 2 段階の機構により活性化されると考えられる。この活性化機構の詳細な分子機序を解析するために、本研究では、細胞質並びに早期分泌経路内腔における亜鉛の動態制御と TNAP 活性との関わりを検証した。その結果、細胞質内において、ZnT1 及び ZnT4 による特定の細胞内コンパートメントへの亜鉛輸送、並びに MT による細胞質内亜鉛レベルの制御が、細胞質内亜鉛を ZnT5-ZnT6 と ZnT7 へ送達する機構の一端を担っていることを明らかとした。又、早期分泌経路内腔で ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 を介した TNAP 活性化に重要なドメインとして PP モチーフを見出し、TNAP に亜鉛を効率良く受け渡すために膜貫通領域の亜鉛結合サイトと協奏的に働く可能性があることを示した。これらの結果から、TNAP の活性化には細胞質並びに早期分泌経路内腔で単に亜鉛濃度に依存した受動的な亜鉛の受け渡しではなく、厳密に制御された分子機序が存在することを明らかとした(Fig. 3)。

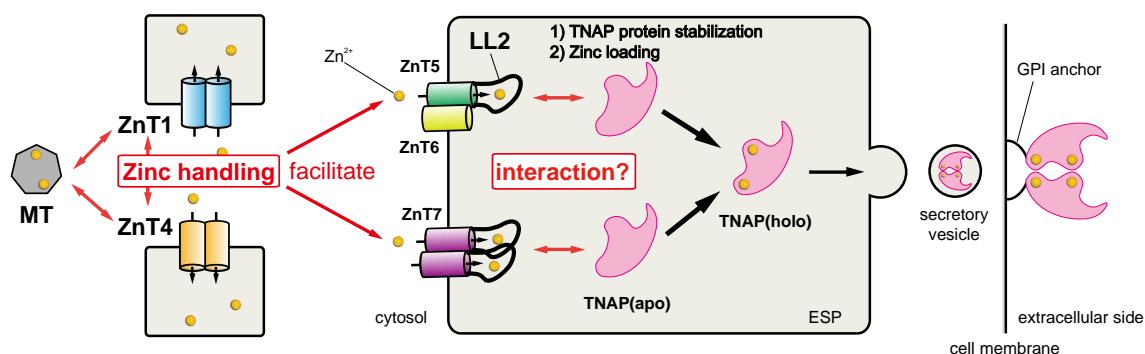


Figure 3. 本研究結果から想定される細胞質内及び早期分泌経路内における TNAP 活性化機構のモデル図

## 実験材料と方法

### 大腸菌

形質転換には DH5 $\alpha$  (TOYOBO)を用いた。培地には LB 培地を使用し、30°C 又は 37°C で培養した。

### 細胞培養

ニワトリ DT40 細胞の培養は、10 % (v/v)ウシ胎児血清(FCS) (BioTrace、56°C、30 分間インキュベートにより非働化)、1 % (v/v) ニワトリ血清(CS) (GIBCO)、50  $\mu$ M 2-メルカプトエタノール(Sigma)を加えた RPMI 1640 Medium (Nacalai Tesque) を培地とし、39.5°C、5 % CO<sub>2</sub> のインキュベーターで行った。亜鉛欠乏培地は Chelex-100 resin (Bio-Rad) で処理した FCS 及び CS を用いて調製した。亜鉛添加培地は通常培地に硫酸亜鉛を加えることで調製した。プロテアソーム阻害剤の MG132 (Peptide Institute Inc.)、液胞型プロトン ATPase 阻害剤の bafilomycin A1 (Sigma Aldrich)、プロリルヒドロキシラーゼ阻害剤の Dimethyloxaloylglycine (DMOG) (Sigma Aldrich)はそれぞれ図に示した濃度で用いた。

### プラスミドの設計

CDF5及びTOC1 (*C. elegans*のZnT5及びZnT6のオーソログ)のcDNAは、*C. elegans*のtotal RNAを逆転写することにより取得した。ヒトZnT1 (hZnT1)、hZnT2、hZnT4、hZnT5、hZnT6、hZnT7、マウスMT-1 (mMt-1)、CDF5、TOC-1、hTNAP を発現させるために、それぞれのcDNAを発現ベクターであるpA-Puro、pA-Zeocin、pA-Neo、pA-Ecogptに組み込み、これを発現プラスミドとして用いた。タグの付加と変異の導入には2段階PCR法を用いた。安定発現株の樹立の際は、これらのプラスミドは全て適切な制限酵素によりリニア化した。

細胞質内亜鉛レベルの評価には、5つのMREを配したmMt-1プロモーターを有するFireflyルシフェラーゼ発現プラスミド(摂南大学 木村明紀博士から恵与頂いた)及び*Renilla*ルシフェラーゼ発現プラスミドを用いた。分泌型ルシフェラーゼである*Cypridina*ルシフェラーゼの発現には、pMCS-*Cypridina* Luc(Thermo)のmulti-cloning siteにニワトリ $\beta$ -アクチンプロモーターを組み込んだものを発現プラスミドとして用いた。

*S.cerevisiae* を用いた生育試験では、hZnT7-HA 又は hZnT7<sub>P133A,P134A</sub> (hZnT7<sub>PP-AA</sub>) の cDNA を pYES2 ベクター(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)に組み込んで発現プラスミドとした。

## トランスフェクション

DT40 細胞への DNA の導入はエレクトロポレーション法を用いた。1.0×10<sup>7</sup> 個の細胞を 0.5 mL phosphate-buffered saline 溶液(PBS; 137 mM NaCl、20.4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、2.68 mM KCl、1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)に懸濁後、20 µg のリニア化したプラスミドを加え、10 分間氷上で静置した。次に、Gene pulser (Bio-Rad)により、550 V (トランジェントは 600 V)、25 µF で形質転換を行い、再び 10 分間氷上で静置した。形質転換後の細胞は 30 mL の培地で 24 時間培養し、適切な薬剤(0.5 µg/mL puromycin (Sigma)、0.1 mg/mL zeocin (Invitrogen)、2.0 mg/mL G418 (Nacalai tesque)、25 µg/mL micophenolic acid (MP bio))でセレクションを行った。薬剤耐性を獲得して生育してきたクローンに対して目的のタンパク質が発現していることを確認し、実験に用いた。

## 膜画分タンパク質の調製

約 2×10<sup>7</sup> 個の DT40 細胞を回収し、PBS で 1 回洗浄した後、細胞破碎液(0.25 M sucrose, 20 mM HEPES、1.0 mM EDTA)に懸濁させ、ダウンス型ホモジナイザーを用いて 60 ストロークで破碎した。(TNAP は亜鉛を強固に結合しているため、1.0 mM EDTA 存在下において、その酵素活性は影響をうけない。) 破碎処理液は 2300 g、4°C で 5 分間遠心し、得られた上清を 20400 g、4°C で 30 分間遠心した。沈殿物を ALP 溶解液(10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1 % (v/v) Triton X-100)に溶解させ、膜画分タンパク質溶液とした。検量線の作製にはウシ血清由来 γ-Globulin (Sigma)を用い、タンパク質濃度は Protein Assay CBB Solution (Nacalai Tesque)、又は DC Protein Assay Kit (Bio-Rad)を用いて測定した。

## 細胞全タンパク質の調製

DT40 細胞を 2300 g、4°C で 5 分間遠心して回収し、PBS で 1 回洗浄した。その後、ALP 溶解液に溶解させ、細胞全タンパク質溶液とした。タンパク質濃度は上述した方法で測定した。

## 亜鉛耐性の評価

DT40 細胞を 30-70 µM ZnSO<sub>4</sub> 存在下、72 時間培養した。培養液の 1/10 量の Alamar Blue (Trek Diagnostic Systems)を加え、39.5°C、5 % CO<sub>2</sub> で 3 時間インキュベートした後、570 nm 及び 600nm の吸光度を測定した。生存率は 30 µM ZnSO<sub>4</sub> 存在下における生存率を 100 %として算出した。

## 細胞質内亜鉛レベルの評価

K-PBS (5 mM MgCl<sub>2</sub>を含む PBS)に懸濁させた1.0×10<sup>7</sup>個の細胞に対し、20 µg Fireflyルシフェラーゼ発現プラスミド(レポーター)と5 µg *Renilla*ルシフェラー

ゼ発現プラスミド(コントロール)をエレクトロポレーションにより導入した。形質転換した細胞は通常培地で4時間培養後、亜鉛欠乏又は過剰培地で培養した。得られたサンプルのルシフェラーゼ活性はDual-Luciferase Reporter assay system (Promega)により、Lumat LB9501 (Berthold)を使用して測定した。(Fireflyルシフェラーゼ発現プラスミドは5つのMREを含むマウスMT-1プロモーターを有しており、Fireflyルシフェラーゼの蛍光により細胞質内亜鉛レベルをモニターすることが可能となる。)

### ALP 活性の測定

膜画分タンパク質又は細胞全タンパク質溶液をタンパク量にして 2-5 µg 分 96 穴プレートに分注し、p-nitrophenyl phosphate を 2 mg/mL で溶解させた基質溶液 (1 M diethanolamine (pH 9.8)、0.5 mM MgCl<sub>2</sub>) を 100 µL 加えた。室温で 10 分間振盪した後、TNAP によって遊離された p-nitrophenol を 405 nm の吸光度測定により定量した。検量線の作製には子牛の腸由来の ALP (CIAP) を使用した。

### Total RNA の回収と RT-PCR

3.0×10<sup>6</sup> 個の DT40 細胞を 1 mL Sepasol (Nacalai Tesque) に溶解させ、0.2 mL クロロホルムと混和した。5 分間静置後、20400 g、4°C で 15 分間遠心した。上清を分取し、0.5 mL 2-プロパノールを加え、混和後 10 分間室温放置した。20400 g、4°C で 10 分間遠心し、上清を除去した。1 mL 75 % エタノールで洗浄し、自然乾燥させ、RNA を得た。逆転写は ReverTra Ace (TOYOBO) を用い、PCR は KOD-FX (TOYOBO) を用いた。PCR プライマー及び反応条件は Table S1 に記した。

### SDS-PAGE とイムノブロットティング

膜画分タンパク質は 6×SDS サンプルバッファー(375 mM Tris-HCl (pH 6.8)、30 % (v/v) glycerol、6 % (w/v) SDS、0.5 M DTT、0.1 % (w/v) BPB) を加え、37°C で 30 分間インキュベートし、SDS-PAGE サンプルとした。細胞全タンパク質はソニケーションにより染色体を断片化した後、膜画分タンパク質と同様の方法によりサンプル化した。タンパク質は 8-12 % の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した後、セミドライ式ブロットティング装置(Bio-Rad)により PVDF メンブレン(Millipore) に転写した。メンブレンをブロッキング液(4 % (w/v) Skim-milk、0.1 % (v/v) Tween-20 を含む PBS) に浸し、室温で 1 時間攪拌した。1 次抗体には抗 FLAG タグ抗体(Anti-DDDDK; MBL; 1:3000)、抗 HA タグ抗体(HA-11; COVANCE; 1:3000)、抗 MT 抗体(Dako; 1:3000)、抗チューブリン抗体(Sigma; 1:10000)、抗カルネキシン抗体(Stressgen; 1:2000) を使用した。2 次抗体には HRP 標識抗マウス IgG 抗体(GE healthcare)、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体(GE healthcare) を用いた。発光基質には Immobilon Western (Millipore) 又は Chemi-Lumi



One L (Nacalai Tesque)を用いた。

MTの検出には、上述した SDS-PAGE サンプルに 1/9 量の 1 M iodoacetamide (終濃度 100 mM)を加え、遮光下、室温で 30 分間反応させた後、1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)で中和したものを泳動サンプルとした。転写には PVDF メンブレンを 2.5 % グルタルアルデヒドで処理したものをを用いた。

### 蛍光免疫染色

培地と共に回収した DT40 細胞を PBS で 1 回洗浄し、再度 PBS に懸濁させ、poly-L-lysine でコーティングしたカバーガラス上に滴下した。37°C、5 % CO<sub>2</sub> のインキュベーターで 30 分間静置させ細胞をガラスへ沈降させた。4 %ホルムアルデヒドの処理により、細胞を固定した後、0.1 % Triton X-100 で細胞膜透過処理を行った。1 次抗体は FLAG 及び HA タグに対する抗体、又は抗ニワトリ IgM 抗体(M4; Beckman; 1:400)を用いた。二次抗体は Alexa 488 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Molecular Probes; 1:3000)、Alexa 594 標識抗マウス IgG 抗体(Molecular Probes; 1:3000、IgM の染色では 1:400)を使用した。染色した細胞は蛍光顕微鏡(Olympus, Carl Zeiss AG)を用いて観察した。

### 細胞表面タンパク質の回収

細胞表面タンパク質の回収には Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit (Thermo) を用いた。3.0×10<sup>6</sup> 個の細胞を回収し PBS で 1 回洗浄し、Sulfo-NHS-SS-Biotin 溶液中で 4°C、30 分間攪拌した。クエンチング液を加え、未反応の Sulfo-NHS-SS-Biotin を取り除き、PBS で 1 回洗浄した。次に NP40 buffer (50 mM HEPES、100 mM NaCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 % (v/v) Nonidet P-40、0.5 % (w/v) Sodium Deoxycholate、0.1 % (w/v) SDS)で細胞を溶解させ、ソニケーションを行った。氷上で 30 分間静置させ、9100 g、4°C で 5 分間遠心し、得られた上清をビオチン標識細胞表面タンパク質溶液とした。この溶液をインプットとしてタンパク量 10 µg 分を SDS-PAGE により分離し、Streptavidin Biotin Complex Peroxidase Kit (Nacalai Tesque)を用いて検出した。残りの上清に NeutrAvidin Agarose を加え、4°C で数時間攪拌させた。Neutr Avidin Agarose を PBS で 3 回洗浄した後、6×SDS サンプルバッファー中で 37°C、30 分間インキュベートすることでタンパク質を溶出させた。20400 g、4°C で 1 分間遠心し、上清をレクチンブロットに用いた。

### レクチンブロット

SDS-PAGE で分離したタンパク質を PVDF メンブレンに転写した。メンブレンをブロッキング液(SuperBlock Blocking Buffer in PBS (Thermo)、0.1 % (v/v) Tween-20)中で室温、10 分間攪拌した。ブロッキングしたメンブレンをレクチン希釈液(10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、0.05 % (v/v) Tween-20)に浸し、

HRP 標識 WGA (生化学工業; 1:4000)を加え、室温で 30 分間攪拌した。レクチン希釈液で室温、10 分間の洗浄を 3 回行い、Chemi-Lumi One L (Nacalai Tesque)を用いて発光させた。

### 分泌型ルシフェラーゼの活性評価

エレクトロポレーションにより 20  $\mu$ g *Cypridina* ルシフェラーゼ発現プラスミドと 5  $\mu$ g *Renilla* ルシフェラーゼ発現プラスミドを細胞に導入し、通常培地で 4 時間培養後、各ルシフェラーゼ活性を測定した。*Cypridina* ルシフェラーゼの基質として、Pierce *Cypridina* Luciferase Glow Assay Kit (Thermo)を使用した。

### 立体構造モデルの構築と相同性検索

hZnT5、hZnT6、hZnT7 の相同性モデルの構築は YiiP (PDB ID code 3H90)の結晶構造をもとに Multiple Mapping Method を用いて行った[90]。構築した立体構造モデルは PyMOL (DeLano Scientific)を用いて可視化した。ZnT family 並びに CDF5 の相同性検索は NCBI BLAST server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)を利用して検索した。

Fig. 2-2及びTables 1-3で用いたアミノ酸配列のアクセッション番号は以下のものである。

NP\_067017.2 for hZnT1, NP\_001004434.1 for hZnT2, NP\_003450.2 for hZnT3, NP\_037441.2 for hZnT4, NP\_075053.2 for hZnT5, NP\_060434.2 for hZnT6, AAM21969.1 for hZnT7, NP\_776250.2 for hZnT8, NP\_061183.2 for hZnT10, NP\_740931.2 for CDF5, NP\_075023.2 for ZnT5 (*M. musculus*), AAV98201.1 for ZnT5 (*G. gallus*), NP\_001015911.1 for ZnT5 (*X. tropicalis*), NP\_001002322.1 for ZnT5 (*D. rerio*), NP\_594694.1 for Cis4 (*S. pombe*), NP\_010491.4 for Msc2 (*S. cerevisiae*), NP\_178539.2 for MTP12 (*A. thaliana*), AAO17323.1 for ZnT7 (*M. musculus*), NP\_001008788.1 for ZnT7 (*G. gallus*), NP\_989256.1 for ZnT7 (*X. tropicalis*), NP\_001093556.1 for ZnT7 (*D. rerio*), NP\_650049.1 for ZnT86D (*D. melanogaster*), NP\_014961.3 for Cot1 (*S. cerevisiae*), NP\_593645.1 for Zhf1 (*S. pombe*), and WP\_003229873.1 for CzcD (*B. subtilis*)

### 細胞内亜鉛イメージング

回収した細胞を PBS で 1 回洗浄し、25  $\mu$ M Zinquin ethyl ester (同仁化学)存在下、室温で 1 時間インキュベートした。染色した細胞は PBS で 3 回洗浄し、蛍光顕微鏡(Zeiss)で観察した。

### 免疫沈降

膜画分タンパク質を NP40 buffer に溶解させ、4°C で 2 時間攪拌した。その後、13000 g、4°C で 5 分間遠心し、上清をタンパク質溶液として用いた。DC Protein

Assay Kit (Bio-Rad)によりタンパク質の濃度を測定し、タンパク質 200  $\mu$ g 分を免疫沈降に用いた。抗 FLAG タグ抗体(FLAG M2; Sigma; 1:200)又は抗 HA タグ抗体 (HA-11; COVANCE; 1:200)を加え、4°C で 1 時間攪拌した後、10  $\mu$ L Protein G-Sepharose beads (Amersham)を添加し、4°C で 12 時間攪拌した。13000 g、4°C、5 分間遠心し、上清を除去した後、ビーズを NP-40 buffer (Sodium Deoxycholate(-)、SDS (-))で 4 回洗浄した。ビーズに 2.5  $\mu$ L 5 $\times$ Ling's buffer (150 mM sucrose、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、20 mM DTT、10 % (w/v) SDS、5 mM EDTA)と 12.5  $\mu$ L 2 $\times$ Urea buffer (8 M Urea、30 mM sucrose、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、4 mM DTT、2 % (w/v) SDS、1 mM EDTA)を加え、37°C で 30 分間インキュベートした。20400 g、20°C、5 分間遠心し、上清を SDS-PAGE サンプルとした。イムノブロットの 1 次抗体には、免疫沈降で FLAG M2 を使用した際は抗 FLAG タグ抗体(Anti-DDDDK; MBL; 1:3000)、HA-11 使用時は抗 HA タグ抗体(HA-11; COVANCE; 1:3000)を用い、2 次抗体にはそれぞれ HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体(GE healthcare)、Trueblot anti-mouse IgG (eBioscience)を用いた。

### **S. cerevisiae 亜鉛感受性変異体を用いた生育試験**

*S. cerevisiae* の変異株である DY150 *msc2* (*MATa ade2 can1 his3 leu2 trp1 ura3 msc2::HIS3*) に対して、酢酸リチウム/一本鎖キャリア DNA/ポリエチレングリコール法によって形質転換を行った[91]。SRaf 培地を用いて 30°C で 18 時間前培養した後、SGal 培地で OD600 が 0.1 になるように希釈した。30°C で 1 時間インキュベートした後、25  $\mu$ M の硫酸亜鉛を加えた YPGE 寒天培地に懸濁した培養液を 5  $\mu$ L 滴下した。その後プレートを 30°C 又は 37°C で 3 日間培養した。

### **統計処理**

全ての実験結果は平均値及び標準偏差として表し、統計学的処理には一元配置分散分析法(One-way ANOVA(analysis of variance))を用いた。

**Table S1. RT-PCR に用いたプライマーの塩基配列**

遺伝子		プライマーの塩基配列	長さ(bp)	サイクル数
<i>cZnT1</i>	Forward(5' to 3')	CGGCTGCTGTGCATGCTGGCGCTCACCTTC	1010	34
	Reverse (5' to 3')	TGGGAACAGTCTGTAGAAGTATGAGGGCCG		
<i>cZnT4</i>	Forward(5' to 3')	ATGGCCGGGCCCGGCCTGTGGAGCAGCATC	1288	34
	Reverse (5' to 3')	AGGCACTGGAACCTGACAACCTTGCGCAGG		
<i>cZnT5</i>	Forward(5' to 3')	GCTGTTTGAACACAGTGATGTGGTTGTGCT	778	28
	Reverse (5' to 3')	AGTGCCTTCAGGAGAATAGCCAATAAGGGT		
<i>cZnT6</i>	Forward(5' to 3')	TTCCGGTGCGGGGAGTACTATGGGGACAAT	905	34
	Reverse (5' to 3')	CGGACATGGACCGATCCAGCCAAAGTGCCA		
<i>cZnT7</i>	Forward(5' to 3')	ATGCTGCCCTCTCCATTAAGGACGATGAG	1137	34
	Reverse (5' to 3')	CTACATGGCTGCAACATCAATTTGTATGTA		
<i>cMT2</i>	Forward(5' to 3')	ATGGACCCTCAGGACTGCACTTGTGCTGCT	192	40
	Reverse (5' to 3')	TCAGTGGCAGCAGCTGCACTTGCTGCTGGC		
<i>cMT2*</i>	Forward(5' to 3')	TGACTCCTGCTCCTGTGCTGGGTCTGTCAA	129	21
	Reverse (5' to 3')	GGTTCCTTGCAGACACAGCCCTTGGCACAG		
<i>cTNAP</i>	Forward(5' to 3')	CGCGGATCCATGAAGGCTTTCCTCCTCACC	1506	40
	Reverse (5' to 3')	CTAGGAGCTGCAGTGCGCACGGTTGGGGCC		
<i>cβactin</i>	Forward(5' to 3')	TGCGTGACATCAAGGAGAAGCTGTGCTACG	500	40
	Reverse (5' to 3')	GAAGCATTTGCGGTGGACAATGGAGGGTCC		

\* 2 段階 PCR に用いた。全ての反応に対して、アニーリング温度は 68 °C で行った。

## 引用文献

1. Vallee BL, Falchuk KH (1993) The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* 73: 79-118.
2. Fukada T, Yamasaki S, Nishida K, Murakami M, Hirano T (2011) Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. *J Biol Inorg Chem*, 16, 1123-1134.
3. Maret W (2012) New perspectives of zinc coordination environments in proteins. *J Inorg Biochem* 111: 110-116.
4. Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A (2006) Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res* 5: 196-201.
5. Berg JM, Shi Y (1996) The Galvanization of biology: a Growing appreciation for the roles of zinc. *Science* 271: 1081-1085.
6. McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, et al. (2001) An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* 291: 1755-1759.
7. Knöpfel M, Solioz M (2002) Characterization of a cytochrome b(558) ferric/cupric reductase from rabbit duodenal brush border membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 220-225.
8. Lichten LA, Cousins RJ (2009) Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annu Rev Nutr* 29: 153-176.
9. Fukada T, Kambe T (2011) Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis. *Metallomics* 3: 662-674.
10. Bozym RA, Thompson RB, Stoddard AK, Fierke CA (2006) Measuring picomolar intracellular exchangeable zinc in PC-12 cells using a ratiometric fluorescence biosensor. *ACS Chem Biol* 1: 103-111.
11. Vinkenborg JL, Nicolson TJ, Bellomo EA, Koay MS, Rutter GA, Merckx M (2009) Genetically encoded FRET sensors to monitor intracellular Zn<sup>2+</sup> homeostasis. *Nat Methods* 6: 737-740.
12. Kambe T (2012) Molecular architecture and function of ZnT transporters. *Curr Top Membr* 69: 199-220.
13. Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, Itsumura N (2015) The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis metabolism. *Physiol Rev* 95: 749-784.
14. Lu M, Chai J, Fu D (2009) Structural basis for autoregulation of the zinc transporter YiiP. *Nat Struct Mol Biol* 16: 1063-1067.
15. Itsumura N, Inamo Y, Okazaki F, Teranishi F, Narita H, Kambe T, et al. (2013) Compound heterozygous mutations in SLC30A2/ZnT2 results in low milk zinc concentrations: a novel mechanism for zinc deficiency in a breast-fed infant. *PLoS One* 8: e64045.
16. Lasry I, Golan Y, Berman B, Amram N, Glaser F, Assaraf YG (2014) In situ dimerization of

- multiple wild type and mutant zinc transporters in live cells using bimolecular fluorescence complementation. *J Biol Chem* 289: 7275-7292.
17. Kambe T, Narita H, Yamaguchi-Iwai Y, Hirose J, Amano T, Sugiura N, et al. (2002) Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 277: 19049-19055.
  18. Suzuki T, Ishihara K, Migaki H, Ishihara K, Nagao M, Yamaguchi-Iwai Y, et al. (2005) Two different zinc transport complexes of cation diffusion facilitator proteins localized in the secretory pathway operate to activate alkaline phosphatases in vertebrate cells. *J Biol Chem* 280: 30956-30962.
  19. Fukunaka A, Suzuki T, Kurokawa Y, Yamazaki T, Fujiwara N, Ishihara K, et al. (2009) Demonstration and characterization of the heterodimerization of ZnT5 and ZnT6 in the early secretory pathway. *J Biol Chem* 284: 30798-30806.
  20. Lu M, Fu D (2007) Structure of the zinc transporter YiiP. *Science* 317: 1746-1748.
  21. Coudray N, Valvo S, Hu M, Lasala R, Kim C, Vink M, et al. (2013) Inward-facing conformation of the zinc transporter YiiP revealed by cryoelectron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 2140-2145.
  22. Gupta S, Chai J, Cheng J, D'Mello R, Chance MR, Fu D (2014) Visualizing the kinetic power stroke that drives proton-coupled zinc(II) transport. *Nature* 512: 101-104.
  23. Chao Y, Fu D (2004) Thermodynamic studies of the mechanism of metal binding to the Escherichia coli zinc transporter YiiP. *J Biol Chem* 279: 17173-17180.
  24. Wei Y, Fu D (2006) Selective metal binding to a membrane-embedded aspartate in the Escherichia coli metal transporter YiiP (FieF). *J Biol Chem* 280: 33716-33724.
  25. Kawachi M, Kobae Y, Mimura T, Maeshima M (2008) Deletion of a histidine-rich loop of AtMTP1, a vacuolar Zn<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter of *Arabidopsis thaliana*, stimulates the transport activity. *J Biol Chem* 283: 8374-8383.
  26. Ohana E, Hoch E, Keasar C, Kambe T, Yifrach O, Hershfinkel M, et al. (2009) Identification of the Zn<sup>2+</sup> binding site and mode of operation of a mammalian Zn<sup>2+</sup> transporter. *J Biol Chem* 284: 17677-17686.
  27. Hoch E, Lin W, Chai J, Hershfinkel M, Fu D (2012) Histidine pairing at the metal transport site of mammalian ZnT transporters controls Zn<sup>2+</sup> over Cd<sup>2+</sup> selectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 7202-7207.
  28. Kawachi M, Kobae Y, Kogawa S, Mimura T, Krämer U, Maeshima M (2012) Amino acid screening based on structural modeling identifies critical residues for the function, ion selectivity and structure of Arabidopsis MTP1. *FEBS J* 279: 2339-2356.
  29. Shusterman E, Beharier O, Shiri L, Zarivach R, Etzion Y, Campbell CR, et al. (2014) ZnT-1 extrudes zinc from mammalian cells functioning as a Zn<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Metallomics* 6: 1656-1663.
  30. Tuschl K, Clayton PT, Gospe SM Jr, Gulab S, Ibrahim S, Singhi P, et al. (2012) Syndrome of hepatic cirrhosis, dystonia, polycythemia, and hypermanganesemia caused by mutations

- in SLC30A10, a manganese transporter in man. *Am J Hum Genet* 90: 457-466.
31. Quadri M, Federico A, Zhao T, Breedveld GJ, Battisti C, Delnooz C, et al. (2012) Mutations in SLC30A10 cause parkinsonism and dystonia with hypermanganesemia, polycythemia, and chronic liver disease. *Am J Hum Genet* 90: 467-477.
  32. Nishito Y, Tsuji N, Fujishiro H, Takeda TA, Yamazaki T, Teranishi F, et al. (2016) Direct comparison of manganese detoxification/efflux proteins and molecular characterization of ZnT10 as a manganese transporter. *J Biol Chem* 284: 30798-30806.
  33. Cherezov V, Höfer N, Szebenyi DM, Kolaj O, Wall JG, Gillilan R, et al. (2008) Insights into the mode of action of a putative zinc transporter CzrB in *Thermus thermophilus*. *Structure* 16: 1378-1388.
  34. Higuchi T, Hattori M, Tanaka Y, Ishitani R, Nureki O (2009) Crystal structure of the cytosolic domain of the cation diffusion facilitator family protein. *Proteins* 76: 768-771.
  35. Murgia C, Vespignani I, Cerase J, Nobili F, Perozzi G (1999) Cloning, expression, and vesicular localization of zinc transporter Dri 27/ZnT4 in intestinal tissue and cells. *Am J Physiol* 277: G1231-1239.
  36. Podar D, Scherer J, Noordally Z, Herzyk P, Nies D, Sanders D (2012) Metal selectivity determinants in a family of transition metal transporters. *J Biol Chem* 287: 3185-3196.
  37. Tanaka N, Kawachi M, Fujiwara T, Maeshima M (2013) Zinc-binding and structural properties of the histidine-rich loop of *Arabidopsis thaliana* vacuolar membrane zinc transporter MTP1. *FEBS Open Bio* 3: 218-224.
  38. Natesh R, Schwager SL, Sturrock ED, Acharya KR (2003) Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme–lisinopril complex. *Nature* 421: 551-554.
  39. Overall CM, López-Otín C (2002) Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2: 657-672.
  40. Alterio V, Hilvo M, Di Fiore A, Supuran CT, Pan P, Parkkila S, et al. (2009) Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 16233-16238.
  41. Millán JL, Fishman WH (1995) Biology of human alkaline phosphatases with special reference to cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 32: 1-39.
  42. Perry JJ, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA (2010) The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta* 1804: 245-262.
  43. Kambe T, Takeda TA, Nishito Y (2016) Activation of zinc-requiring ectoenzymes by ZnT transporters during the secretory process: biochemical and molecular aspects. *Arch Biochem Biophys* in press.
  44. Le Du MH, Millan JL (2002) Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases. *J Biol Chem* 277: 49808-49814.
  45. Cai G, Michigami T, Yamamoto T, Yasui N, Satomura K, Yamagata M, et al. (1998) Analysis of localization of mutated tissue-nonspecific alkaline phosphatase proteins associated with neonatal hypophosphatasia using green fluorescent protein chimeras. *J*

*Clin Endocrinol Metab* 83; 3936-3942.

46. Mornet E (2000) Hypophosphatasia: the mutations in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene. *Hum Mutat* 15; 309-315.
47. Suzuki T, Ishihara K, Migaki H, Matsuura W, Kohda A, Okumura K, et al. (2005) Zinc transporters, ZnT5 and ZnT7, are required for the activation of alkaline phosphatases, zinc-requiring enzymes that are glycosylphosphatidylinositol-anchored to the cytoplasmic membrane. *J Biol Chem* 280: 637-643.
48. Kambe T (2014) Methods to evaluate zinc transport into and out of the secretory and endosomal-lysosomal compartments in DT40 cells. *Methods Enzymol* 534: 77-92.
49. Fukunaka A, Kurokawa Y, Teranishi F, Sekler I, Oda K, Ackland ML, et al. (2011) Tissue nonspecific alkaline phosphatase is activated via a two-step mechanism by zinc transport complexes in the early secretory pathway. *J Biol Chem* 286: 16363-16373.
50. Palmiter RD, Cole TB, Findley SD (1996) ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration. *EMBO J* 15: 1784-1791.
51. Falcón-Pérez JM, Dell'Angelica EC (2007) Zinc transporter 2 (SLC30A2) can suppress the vesicular zinc defect of adaptor protein 3-depleted fibroblasts by promoting zinc accumulation in lysosomes. *Exp Cell Res* 313: 1473-1483.
52. Palmiter RD, Findley SD (1995) Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J* 14: 639-649.
53. Nolte C, Gore A, Sekler I, Kresse W, Hershinkel M, Hoffmann A, et al. (2004) ZnT-1 expression in astroglial cells protects against zinc toxicity and slows the accumulation of intracellular zinc. *Glia* 48: 145-155.
54. Lazarczyk M, Pons C, Mendoza JA, Cassonnet P, Jacob Y, Favre M (2008) Regulation of cellular zinc balance as a potential mechanism of EVER-mediated protection against pathogenesis by cutaneous oncogenic human papillomaviruses. *J Exp Med* 205: 35-42.
55. Dutta A, Sankavaram K, Chong L, Palermo A, Michel RG, Freake HC (2011) Rapid homeostatic response of H4IIE cells to diethylenetriaminepentaacetic acid is not due to changes in the amount or localization of ZnT-1 protein. *Nutr Res* 31: 404-411.
56. Maret W (2011) Redox biochemistry of mammalian metallothioneins. *J Biol Inorg Chem* 16: 1079-1086.
57. Michalczyk AA, Allen J, Blomeley RC, Ackland ML (2002) Constitutive expression of hZnT4 zinc transporter in human breast epithelial cells. *Biochem J* 364: 105-113.
58. Ho LH, Ruffin RE, Murgia C, Li L, Krilis SA, Zalewski PD (2004) Labile zinc and zinc transporter ZnT4 in mast cell granules: role in regulation of caspase activation and NF- $\kappa$ B translocation. *J Immunol* 172: 7750-7760.
59. Aydemir TB, Liuzzi JP, McClellan S, Cousins RJ (2009) Zinc transporter ZIP8 (SLC39A8) and zinc influence IFN- $\gamma$  expression in activated human T cells. *J Leukoc Biol* 86: 337-348.
60. Taylor KM, Hiscox S, Nicholson RI, Hogstrand C, Kille P (2012) Protein kinase CK2



triggers cytosolic zinc signaling pathways by phosphorylation of zinc channel ZIP7. *Sci Signal* 5: ra11.

61. Taniguchi M, Fukunaka A, Hagihara M, Watanabe K, Kanino S, Kambe T, et al. (2013) Essential role of the zinc transporter ZIP9/SLC39A9 in regulating the activations of Akt and Erk in B-cell receptor signaling pathway in DT40 cells. *PLoS One* 8: e58022.
62. Jeong J, Walker JM, Wang F, Park JG, Palmer AE, Giunta C, et al. (2012) Promotion of vesicular zinc efflux by ZIP13 and its implications for spondylocheiro dysplastic Ehlers-Danlos syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: E3530-3538.
63. Huang L, Kirschke CP, Gitschier J (2002) Functional characterization of a novel mammalian zinc transporter, ZnT6. *J Biol Chem* 277: 26389-26395.
64. Kelleher SL, Lönnerdal B (2003) Zn transporter levels and localization change throughout lactation in rat mammary gland and are regulated by Zn in mammary cells. *J Nutr* 133: 3378-3385.
65. Devergnas S, Chimienti F, Naud N, Pennequin A, Coquerel Y, Chantegrel J, et al. (2004) Differential regulation of zinc efflux transporters ZnT- 1, ZnT-5 and ZnT-7 gene expression by zinc levels: a real-time RT-PCR study. *Biochem Pharmacol* 68: 699-709.
66. Kambe T, Andrews GK (2009) Novel proteolytic processing of the ectodomain of the zinc transporter ZIP4 (SLC39A4) during zinc deficiency is inhibited by acrodermatitis enteropathica mutations. *Mol Cell Biol* 29: 129-139.
67. Bosomworth HJ, Thornton JK, Coneyworth LJ, Ford D, Valentine RA (2012) Efflux function, tissue-specific expression and intracellular trafficking of the Zn transporter ZnT10 indicate roles in adult Zn homeostasis. *Metallomics* 4: 771-779.
68. Davis SR, McMahon RJ, Cousins RJ (1998) Metallothionein knockout and transgenic mice exhibit altered intestinal processing of zinc with uniform zinc-dependent zinc transporter-1 expression. *J Nutr* 128: 825-831.
69. Costello LC, Fenselau CC, Franklin RB (2011) Evidence for operation of the direct zinc ligand exchange mechanism for trafficking, transport, and reactivity of zinc in mammalian cells. *J Inorg Biochem* 105: 589-599.
70. Murata Y, Yamakawa E, Iizuka T, Kodama H, Abe T, Seki Y, et al. (1995) Failure of copper incorporation into ceruloplasmin in the Golgi apparatus of LEC rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 209: 349-355.
71. Petris MJ, Strausak D, Mercer JF (2000) The Menkes copper transporter is required for the activation of tyrosinase. *Hum Mol Genet* 9: 2845-2851.
72. El Meskini R, Culotta VC, Mains RE, Eipper BA (2003) Supplying copper to the cuproenzyme peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase. *J Biol Chem* 278: 12278-12284.
73. Steveson TC, Ciccotosto GD, Ma XM, Mueller GP, Mains RE, Eipper BA (2003) Menkes protein contributes to the function of peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase. *Endocrinology* 144: 188-200.

74. Jeney V, Itoh S, Wendt M, Gradek Q, Ushio-Fukai M, Harrison DG, Fukai T (2005) Role of antioxidant-1 in extracellular superoxide dismutase function and expression. *Circ Res* 96: 723-729.
75. Setty SR, Tenza D, Sviderskaya EV, Bennett DC, Raposo G, Marks MS (2008) Cell-specific ATP7A transport sustains copper-dependent tyrosinase activity in melanosomes. *Nature* 454: 1142-1146.
76. Banci L, Bertini I, Cantini F, DellaMalva N, Herrmann T, Rosato A, et al. (2006) Solution structure and intermolecular interactions of the third metal-binding domain of ATP7A, the Menkes disease protein. *J Biol Chem* 281: 29141-29147.
77. Achila D, Banci L, Bertini I, Bunce J, Ciofi-Baffoni S, Huffman DL (2006) Structure of human Wilson protein domains 5 and 6 and their interplay with domain 4 and the copper chaperone HAH1 in copper uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 5729-5734.
78. Hamza I, Faisst A, Prohaska J, Chen J, Gruss P, Gitlin JD (2001) The metallochaperone Atox1 plays a critical role in perinatal copper homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6848-6852.
79. Ishihara K, Yamazaki T, Ishida Y, Suzuki T, Oda K, Nagao M, et al. (2006) Zinc transport complexes contribute to the homeostatic maintenance of secretory pathway function in vertebrate cells. *J Biol Chem* 281; 17743-17750.
80. Li L, Kaplan J (2001) The yeast gene MSC2, a member of the cation diffusion facilitator family, affects the cellular distribution of zinc. *J Biol Chem* 276: 5036–5043.
81. Ellis CD, Macdiarmid CW, Eide DJ (2005) Heteromeric protein complexes mediate zinc transport into the secretory pathway of eukaryotic cells. *J Biol Chem* 280: 28811-28818.
82. Fujiwara T, Kawachi M, Sato Y, Mori H, Kutsuna N, Hasezawa S, et al. (2015) A high molecular mass zinc transporter MTP12 forms a functional heteromeric complex with MTP5 in the Golgi in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J* 282: 1965-1979.
83. Gorres KL, Raines RT (2010) Prolyl 4-hydroxylase. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45: 106-124.
84. Qin Z, Gongora MC, Ozumi K, Itoh S, Akram K, Ushio-Fukai M, et al. (2008) Role of Menkes ATPase in angiotensin II-induced hypertension: a key modulator for extracellular superoxide dismutase function. *Hypertension* 52: 945-951.
85. Horn JR, Sosnick TR, Kossiakoff AA (2009) Principal determinants leading to transition state formation of a protein-protein complex, orientation trumps side-chain interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 2559-2564.
86. Kay BK, Williamson MP, Sudol M (2000) The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J* 14: 231-241.
87. Qiao W, Ellis C, Steffen J, Wu CY, Eide DJ (2009) Zinc status and vacuolar zinc transporters control alkaline phosphatase accumulation and activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 72: 320-334.

88. Lin H, Burton D, Li L, Warner DE, Phillips JD, Ward DM, Kaplan J (2009) Gain-of-function mutations identify amino acids within transmembrane domains of the yeast vacuolar transporter Zrc1 that determine metal specificity. *Biochem J* 422: 273-283.
89. Menguer PK, Farthing E, Peaston KA, Ricachenevsky FK, Fett JP, Williams LE (2013) Functional analysis of the rice vacuolar zinc transporter OsMTP1. *J Exp Bot* 64: 2871-2883.
90. Rai BK, Fiser A (2006) Multiple mapping method: a novel approach to the sequence-to-structure alignment problem in comparative protein structure modeling. *Proteins* 63: 644-661.
91. Gietz RD, Woods RA (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350: 87-96.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの方々にお世話になりました。

博士後期課程より京都大学大学院生命科学研究科生体情報応答学分野に所属し本研究を進めてまいりましたが、同分野准教授 神戸大朋博士には、実験の基礎から論文執筆にいたるまで懇切丁寧なご指導を賜りました。ここに深大なる謝意を表します。

生体情報応答学分野教授 永尾雅哉博士、同助教 宮前友策博士、分子応答機構学分野准教授 増田誠司博士には、私が研究を続ける環境を常に整えてくださりました。ここに深謝申し上げます。

名古屋大学 藤原崇志博士には、ZnT の亜鉛輸送活性の評価において大変貴重な研究結果を提供頂きました。心より感謝申し上げます。ジョンス・ホプキンス大学准教授 Dax Fu 博士、同大学 Chengfeng Merriman 博士には、ZnT の立体構造モデルの構築に御尽力頂きました。深く感謝致します。ベングリオン大学教授 Israel Sekler 博士、同大学 Eitan Hoch 博士には、亜鉛結合モチーフの機能解析にご協力頂き、本研究で非常に意義のある考察を加えることができました。厚く御礼申し上げます。昭和薬科大学講師 阿南弥寿美博士、千葉大学教授 小椋康光博士には亜鉛の定量に関して貴重な結果を提供頂きました。誠にありがとうございました。摂南大学准教授 木村朋紀博士には、プラスミドを分与頂きました。ありがとうございました。

本研究は、生体情報応答学分野の先輩、後輩の協力なくして遂行することはできませんでした。本研究に最初に着手された福中彩子博士、本研究を進展させるために実験に協力して頂いた逸村直也博士、辻徳治氏、西藤有希奈氏、福江和久氏、武田貴成氏、辻奈都子氏には特に御礼申し上げます。又、苦楽を共にした生体情報応答学分野、分子応答機構学分野の諸氏に厚く御礼申し上げます。

京都薬科大学教授 安井裕之博士、神戸女子大学教授 吉川豊博士には、学部生のころに研究の醍醐味を体感させていただき、進路や私生活についても多くの助言を賜りました。私が研究に身を捧げられるようになったのはお二方のおかげです。心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、事務官の嶋林かほるさんの細かい気配りのおかげで、より良い環境で研究することができました。ありがとうございました。

最後に、私が研究に専念できたのはなによりも家族の支えがあったからです。家族の存在が励みとなり、辛いときも乗り切ることができました。心から感謝します。

2016年9月7日

藤本重行

本学位論文は以下の学術論文に基づいて書かれたものである。

Fujimoto S, Tsuji T, Fujiwara T, Takeda TA, Merriman C, Fukunaka A, Nishito Y, Fu D, Hoch E, Sekler I, Fukue K, Miyamae Y, Masuda S, Nagao M, Kambe T (2016) The PP-motif in luminal loop 2 of ZnT transporters plays a pivotal role in TNAP activation. *Biochem J* 473(17): 2611-2621.

Fujimoto S<sup>\*</sup>, Isumura N<sup>\*</sup>, Tsuji T, Anan Y, Tsuji N, Ogra Y, Kimura T, Miyamae Y, Masuda S, Nagao M, Kambe T (2013) Cooperative Functions of ZnT1, Metallothionein and ZnT4 in the Cytoplasm Are Required for Full Activation of TNAP in the Early Secretory Pathway. *PLoS One* 8(10): e77445. (\*: equal contribution)