

がん促進性分泌型亜鉛要求性酵素の
亜鉛トランスポーター複合体を介した
活性化過程に関する解析

辻 徳治

目次

要旨	1
略語表	3
序論	5
結果	
第 1 節 ZnT5-ZnT6 複合体と ZnT7 複合体は、TNAP と同様、ATX の活性化過程に必須の役割を果たす	13
第 2 節 ZnT5-ZnT6 複合体と ZnT7 複合体は、MMP9 の活性化と細胞外への分泌に重要な役割を果たす	18
第 3 節 CAIX への亜鉛配位には、ZnT5-ZnT6 複合体と ZnT7 複合体以外の経路が関与する	23
第 4 節 CAIX への亜鉛配位には、ZnT4 複合体が、ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体とともに早期分泌経路において寄与する	27
考察	35
材料ならびに手法	44
文献	52
謝辞	59

要旨

亜鉛は生体にとって必須の微量金属元素であり、その重要な機能の一つとして、酵素タンパク質の構成因子となることがあげられる。ヒトにおいては1,000種類近くの酵素が亜鉛含有酵素であると推察されており、この中でも、亜鉛が活性中心に配位し、補因子として触媒活性に必須の役割を果たしている酵素は亜鉛要求性酵素と総称される。亜鉛要求性酵素は、細胞内外における様々な生体反応を司っていることが知られ、これら酵素の発現や活性が適切に制御されることは、生命活動を維持する上でも非常に重要なプロセスとなる。

亜鉛要求性酵素の中でも、細胞外領域で機能する分泌型亜鉛要求性酵素は、小胞体やゴルジ体からなる早期分泌経路において亜鉛を獲得し、酵素活性を呈するようになると考えられている。実際に、分泌型亜鉛要求性酵素の一つである tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP)の活性化過程には、早期分泌経路で機能する亜鉛トランスポーター (Zinc transporter; ZnT)複合体である ZnT5-ZnT6 ヘテロ複合体及び ZnT7 ホモ複合体が、TNAP タンパク質の安定化ならびに TNAP タンパク質への亜鉛配位に必須の役割を果たすことが明らかとなっている。一方、TNAP 以外の分泌型亜鉛要求性酵素の活性化過程における ZnT 複合体の寄与に関してはほとんど明らかとなっていない。本研究では、がん細胞の生存・増殖・浸潤能の亢進に寄与する分泌型亜鉛要求性酵素であり、がん治療の標的因子としても近年注目を集める autotaxin (ATX)、matrix metalloproteinase 9 (MMP9)、carbonic anhydrase IX (CAIX)といった3つの酵素に着目し、これら酵素の活性化過程に ZnT 複合体が関与するか否かを明らかにすることを目的として解析を行った。

まず、高い相同組換え効率を有するニワトリ DT40 細胞野生株 (wild type 株; WT 株)や、WT 株を用いて樹立した ZnT 欠損株に ATX、MMP9、CAIX の各酵素をそれぞれ安定発現させ、WT 株や ZnT 欠損株における各酵素の活性の違いが生じるかを検証した。その結果、ATX 活性は TNAP 活性と同様、ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体が欠損した ZnT5, ZnT6, ZnT7 三重欠損株 (triple knockout 株; TKO 株)において顕著に低下した。すなわち、ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体は ATX タンパク質への適切な亜鉛配位に寄与している可能性が示された。MMP9 に関しては、細胞培養液中に分泌された MMP9 の活性が、TNAP 活性や ATX 活性と同様、TKO 株において低下した。加えて、培養液中に分泌された

MMP9 の発現量も TKO 株において低下し、ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体が MMP9 の活性化と分泌過程に寄与していることが示された。これに対し、CAIX 活性は TKO 株において低下しなかった。すなわち、CAIX の活性化過程には ZnT5-ZnT6 複合体と ZnT7 複合体以外の ZnT 複合体が関与する可能性が考えられた。そこで次に、CAIX の活性化過程に関与する ZnT 複合体を特定するため、DT40 細胞に高発現し、さらに早期分泌経路に局在が認められた ZnT4 ホモ複合体に着目し、ZnT4 単独欠損株、ならびに TKO 株から更に ZnT4 遺伝子を欠損させた ZnT4, ZnT5, ZnT6, ZnT7 四重欠損株 (quadruple knockout 株; QKO 株) を樹立して解析を行った。結果、ZnT4 単独欠損株では CAIX 活性は低下しなかった。一方、QKO 株において CAIX 活性は低下し、低下した CAIX 活性は、ZnT4 を再発現させた場合のみならず、ZnT5 と ZnT6 とを再発現させた場合、ZnT7 を再発現させた場合のいずれにおいても回復が認められた。すなわち、CAIX の活性化過程には、少なくともいずれか一つの ZnT 複合体を介して輸送された亜鉛が必要であることが明らかとなり、各々の ZnT 複合体が CAIX タンパク質への適切な亜鉛配位に等価に寄与していることが考えられた。

以上より、ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体は、がん促進性分泌型亜鉛要求性酵素である ATX、MMP9、CAIX の活性化過程に寄与することを明らかにした。また CAIX の活性化過程には ZnT5-ZnT6 複合体、ZnT7 複合体に加え、ZnT4 複合体が寄与することを見出し、各酵素の活性化過程における ZnT 複合体の作用機序はそれぞれ異なっている可能性を示した。本結果は、がんの進行抑制や治療に繋がる有用な知見となると同時に、分泌型亜鉛要求性酵素の活性化過程の制御に関わる ZnT 複合体の役割についての新たな知見となるものである。

略語集

ACTZ: acetazolamide
ALP: alkaline phosphatase
ATX: autotaxin
BSA: bovine serum albumin
CA: carbonic anhydrase
CBB: coomassie brilliant blue
CNX: calnexin
CX: chelex
DTT: diethanolamine
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
Enpp: ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase
FBS: fetal bovine serum
HBSS: Hank's balanced salt solution
HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
LPA: lysophosphatidic acid
LPC: lysophosphatidylcholine
LL2: luminal loop 2
MMP: matrix metalloproteinase
MT: metallothionein
PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis
PBS: phosphate buffered saline
PLAP: placenta alkaline phosphatase
p-NPP: *p*-nitrophenyl phosphate
PP-motif: di-proline motif
PVDF: polyvinylidene difluoride
QKO: quadruple knockout
RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction
SDS: sodium dodecyl sulfate
SLC: solute carrier
TKO: triple knockout
TNAP: tissue non-specific alkaline phosphatase
WT: wild type
ZIP: Zrt, Irt-like protein
ZnT: zinc transporter

序論

生体における亜鉛の生理機能

亜鉛は生体にとって必須の微量元素である。亜鉛の重要な生理機能の一つとして、タンパク質の構成因子としての機能があげられ、亜鉛は、タンパク質の構造因子や、酵素タンパク質の触媒因子として機能している (1-6) (Fig. 0-1)。近年報告されたプロテオーム解析の結果からは、ヒトにおいて約 3,000 種類のタンパク質が亜鉛含有タンパク質であると見積もられており、その内の約三分の一にあたる 1,000 種類近くが亜鉛含有性の酵素であると予想されている (1,2)。金属含有酵素の中でも亜鉛含有酵素は、基質・反応特異性を基に 6 種類に分類された Enzyme commission 番号 (EC 番号 :EC 1. Oxidoreductase, EC 2. Transferase, EC 3. Hydrolase, EC 4. Lyase, EC 5. Isomerase, EC 6. Ligase)の全てにクラス、亜鉛含有酵素が司る反応が生体内において極めて多様であることが推察できる(1-3)。また近年、細胞内外の亜鉛イオン濃度の増減が様々なシグナル経路の制御に寄与することも報告されており、亜鉛の細胞内外のシグナル調整因子としての機能も明らかになってきた (5)。

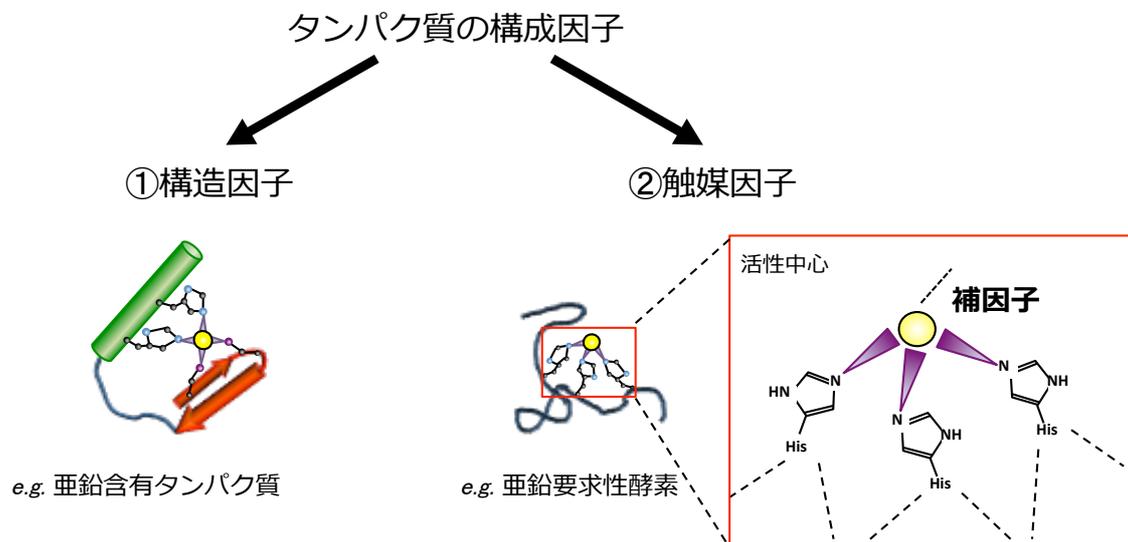


Figure 0-1. タンパク質の構成因子として機能する亜鉛

タンパク質の構成因子となる亜鉛は、①タンパク質の構造因子ならびに②酵素タンパク質の触媒因子として機能するものの二つに大別される (1,2)。酵素タンパク質の活性中心に亜鉛が補因子として配位する酵素は亜鉛要求性酵素と総称され、亜鉛は酵素の触媒活性に必須の役割を果たす。なお亜鉛イオンを黄色の円で示す。

亜鉛ホメオスタシスの維持に関わる亜鉛トランスポーター

亜鉛の生理的機能は非常に多岐に渡るため、亜鉛ホメオスタシスは細胞レベルにおいて非常に厳密に制御される必要がある。亜鉛は細胞内で二価陽イオンとして安定に存在しており、亜鉛ホメオスタシスの維持には、金属貯蔵タンパク質であるメタロチオネイン (metallothionein; MT) や、Solute carrier family (SLC) に属する Zinc transporter (ZnT) family/ SLC30A family 及び Zrt, Irt-like protein (ZIP) family/ SLC39A family が重要な役割を果たしている (6)。ZnT family は細胞質から細胞外、もしくは細胞小器官内腔への亜鉛輸送を司ることで細胞質亜鉛レベルを減少させる方向に機能し、ZIP family は細胞外から細胞質、もしくは細胞小器官内腔から細胞質への亜鉛輸送を司ることで細胞質亜鉛レベルを上昇させる方向に機能する。ヒトにおいては9種類の ZnT トランスポーターならびに14種類の ZIP トランスポーターが亜鉛輸送の中核を担っており、これらの働きによって細胞内亜鉛ホメオスタシスは非常に厳密に保たれている (6) (Fig. 0-2)。特に小胞体やゴルジ体からなる早期分泌経路においては、数多くの亜鉛含有タンパク質や亜鉛含有酵素タンパク質に亜鉛が適切に供給される必要があるため、数多くの ZnT、ZIP トランスポーターがその亜鉛ホメオスタシス維持に寄与している (7,8)。

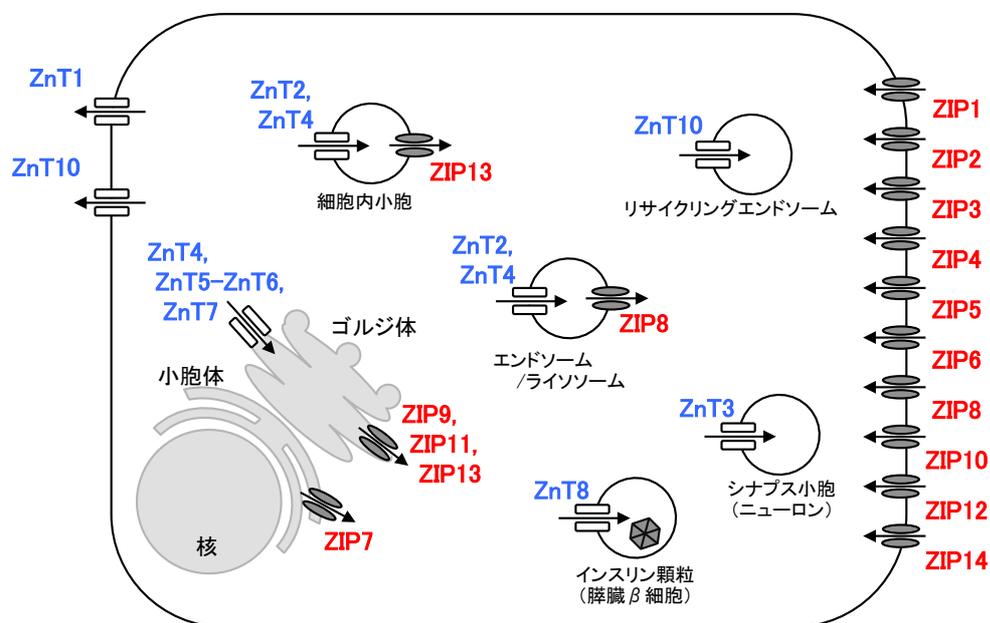


Figure 0-2. 亜鉛トランスポーターZIP と ZnT の細胞内局在

これまでに明らかとなっている ZIP トランスポーター及び ZnT トランスポーターの細胞内における主要な局在部位を模式的に示す。ZIP、ZnT トランスポーターの中には、特定の細胞や細胞小器官に発現するものや、細胞内亜鉛濃度に応じて局在を変化させるものもある (6)。

分泌型亜鉛要求性酵素

亜鉛含有酵素タンパク質において、亜鉛は構造因子としてタンパク質の構造安定性に寄与する他、酵素タンパク質の活性中心に配位することで、酵素の触媒活性に必須の役割を果たす補因子として機能することが知られる (1-4, 8) (Fig. 0-1)。このような亜鉛を必須の補因子とする酵素は亜鉛要求性酵素と総称され、亜鉛含有酵素の内およそ半数以上酵素が亜鉛要求性酵素であるとの推察もなされている (2)。中でも細胞膜上や細胞外領域で機能する分泌型亜鉛要求性酵素は、早期分泌経路において活性中心の亜鉛を獲得し、酵素活性を呈するようになると考えられており (7,8)、分泌型亜鉛要求性酵素の活性化過程には、亜鉛が、細胞質から早期分泌経路を構成する細胞小器官内腔に輸送された後、輸送された亜鉛が適切に酵素タンパク質へと供給されることが極めて重要なプロセスであると想定される。

亜鉛トランスポーターZnT を介した分泌型亜鉛要求性酵素の活性化過程に関する知見

早期分泌経路内への亜鉛輸送に関しては、ZnT family の中でも ZnT5 及び ZnT7 が中心的な役割を担っている。ZnT5 は、亜鉛輸送能を持たない ZnT6 とヘテロ二量体 (ZnT5-ZnT6 複合体) を形成すること、ZnT7 はホモ二量体 (ZnT7 複合体) を形成することが明らかとなっており、これら ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体が、分泌型亜鉛要求性酵素の一つである組織非特異型アルカリホスファターゼ (tissue non-specific alkaline phosphatase; TNAP) の活性化過程に必須の役割を果たすことも明らかとなっている (Fig. 0-3) (9-12)。

TNAP は、活性中心に 2 つの亜鉛イオンが配位した膜結合型の亜鉛要求性酵素であり、TNAP 遺伝子の変異は骨形成の異常を伴う低ホスファターゼ症の原因となることが知られている (13-15)。これまでのニワトリリンパ B 細胞由来 DT40 細胞を用いた種々の解析から、TNAP 活性は、亜鉛欠乏に応じて鋭敏に低下するのみならず、ZnT5, ZnT6, ZnT7 三重欠損株 (triple knockout 株; TKO 株) においてほぼ完全に消失することが明らかとなっている (12)。また、ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体の欠損によって apo 型 TNAP タンパク質が細胞内タンパク質分解経路によって迅速に分解されることや、消失した TNAP 活性が ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体の再発現によって回復し、かつ TNAP タンパク質の分解も抑制されることも明らかとなっている (12)。すなわち、ZnT 複合体は、①apo 型 TNAP タンパク質の安定化、ならびに②apo 型 TNAP タンパク質への亜鉛供

給といった2段階の制御機構を介して TNAP の活性化過程に必須の役割を果たすことが示されている (Fig. 0-3A)。

加えて近年の解析から、9種類の ZnT トランスポーターの中でも ZnT5 及び ZnT7 において、種を超えて高度に保存されている di-proline motif (PP-motif)が、TNAP タンパク質への適切な亜鉛配位に寄与することが示されている (16)。ZnT family は一般に6回の膜貫通領域を持つことが知られるが、PP-motif は ZnT5 と ZnT7 の細胞小器官内腔の2番目のループ領域 (luminal loop 2; LL2)に位置している (ZnT5 に関しては15回の膜貫通領域を持つため、正確には6番目のループ領域となるが、PP-motif は亜鉛輸送に必須の cation efflux domain を構成する6回膜貫通領域の2番目のループ領域に位置するため、便宜上 LL2 と示す) (6,16)。この PP-motif をアラニン置換した変異型 ZnT5 (ZnT5_{PP-AA})、ZnT7 (ZnT7_{PP-AA})を用いた解析では、TKO 株に ZnT5_{PP-AA} と ZnT6、あるいは ZnT7_{PP-AA} を再発現させても低下した TNAP 活性はほとんど回復しない。一方、PP-motif のアラニン変異によっても ZnT 複合体の亜鉛輸送能は損なわれないことも示唆されており、分泌経路内における ZnT5-ZnT6、及び ZnT7 複合体から TNAP タンパク質への亜鉛の配位過程においても、ZnT 複合体を介した複雑な分子機構が存在する可能性が示されている (16) (Fig. 0-3B)。

また一方で、TNAP が適切に酵素活性を呈するようになるためには、早期分泌経路における ZnT 複合体を介した亜鉛動態の制御が必要であるのみならず、細胞質においてもその亜鉛動態が正常に維持される必要があるということも明らかとなっている (17)。細胞内の遊離亜鉛イオン濃度は pM (10^{-12} M)以下の低いレベルに保たれていると予想されているが (18)、金属貯蔵タンパク質である MT、細胞外に亜鉛を排出する ZnT1、細胞小胞内への亜鉛輸送に機能する ZnT4 といった細胞質亜鉛代謝の維持に寄与する3つの分子を欠損させた *ZnT1, MT, ZnT4* 三重欠損株 ($\Delta 1M4$ 株)においては、細胞質亜鉛レベルは顕著に増加する。一方、 $\Delta 1M4$ 株においては、TNAP の活性化に必須である ZnT5-ZnT6 複合体、ZnT7 複合体が正常に発現しているにも関わらず、細胞質亜鉛ホメオスタシスが破綻したことで TNAP 活性が顕著に低下する。加えて、 $\Delta 1M4$ 株において低下した TNAP 活性は、細胞質亜鉛レベルを減少させても回復しない一方、逆に過剰量の亜鉛によって細胞質亜鉛レベルをさらに増加させることで部分的に回復することが明らかとなっている (17)。すなわち、細胞質の亜鉛ホメオスタシスが破綻することで、細胞質の亜鉛イオンが ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 複合体に適切に受け渡さ

れなくなっている可能性が示されており、ZnT1 及び MT、ZnT4 によって協調的に細胞質亜鉛動態が制御されることが TNAP の活性化過程には重要な過程であることが考えられる(Fig. 0-3A)。

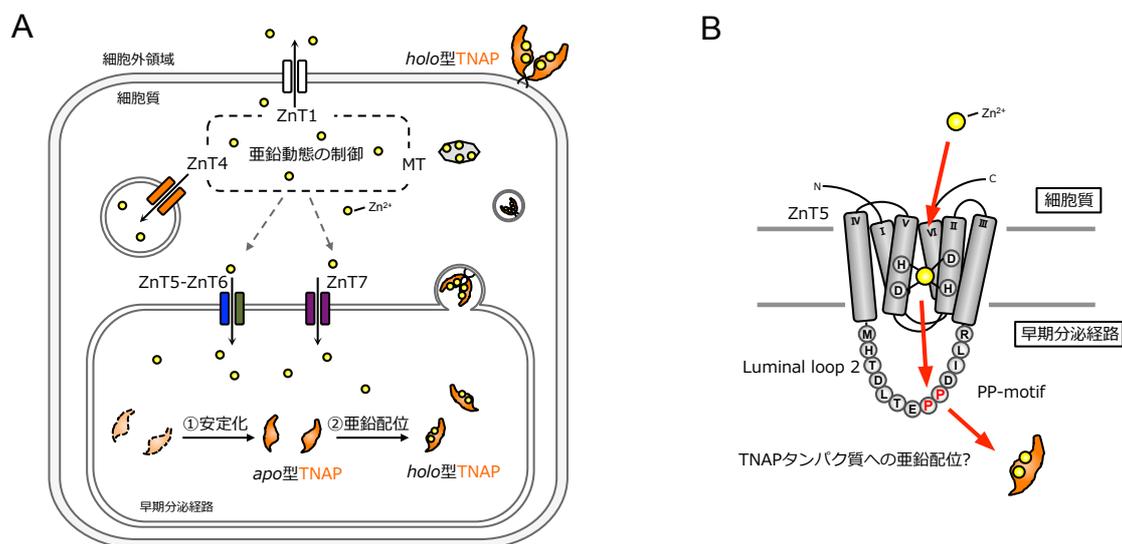


Figure 0-3. 分泌型亜鉛要求性酵素 TNAP の活性化過程のモデル図

A, これまでに明らかとなっている TNAP の活性化過程の分子機構を示す。ZnT5-ZnT6 複合体ならびに ZnT7 複合体は、早期分泌経路において、① apo 型 TNAP タンパク質の安定化、ならびに ② apo 型 TNAP タンパク質への亜鉛配位に機能する。両複合体が欠損すると、apo 型 TNAP タンパク質は速やかに分解される (12)。また、ZnT1、メタロチオネイン (MT)、ZnT4 を介した細胞質亜鉛の動態制御されることも TNAP の適切な活性化に必要である。細胞質亜鉛レベルが厳密に制御されることによって、ZnT5-ZnT6 複合体ならびに ZnT7 複合体に適切に受け渡されるようになると思われる (17)。**B**, TNAP の活性化過程における PP-motif の役割。ZnT5 と ZnT7 の細胞小器官内腔側に位置する 2 番目のループ領域 (Luminal loop 2) には、2 つのプロリン残基が高度に保存されている。この PP-motif は、亜鉛が通過するポア領域の出口付近に位置していることが推定されており、細胞質から早期分泌経路内に輸送された亜鉛の TNAP タンパク質への配位過程に寄与していると考えられる (16)。図には、ZnT5 のものを例として模式的に示す。また、ZnT トランスポーターの膜貫通領域 II 及び V には、ポア領域の亜鉛結合サイトである HD-HD motif が高度に保存されている (ZnT6 を除く) (6)。なお、亜鉛イオンを黄色の円で示す。

ニワトリ DT40 細胞を用いた遺伝子欠損-発現系の解析手法の有用性

前述のように、ニワトリリンパ B 細胞由来 DT40 細胞を用いて、亜鉛ホメオスタシスの制御機構をはじめ、亜鉛トランスポーターの機能解析や、上述の分泌型亜鉛要求性酵素 TNAP の活性化過程に関する種々の解析が行われてきた (9-12,16,17,19-21)。DT40 細胞は、相同組換え効率が高く、標的遺伝子の欠損株が容易に樹立できるという特性を持つ (22,23)。また DT40 細胞は、哺乳動物において、細胞の恒常性維持に必要不可欠と考えられる数多くのタンパク質を発現していることから、標的因子の機能解析に有用な細胞であると考えられている (22,23)。実際に、前述したように、内因性の ZnT5 及び ZnT7 の欠損によって、内因性 TNAP のみならず、外来的に発現させた human TNAP の活性も低下することが明らかとなっている。また、内因性 TNAP 及び human TNAP の活性は、human ZnT5 と human ZnT6、もしくは human ZnT7 を再発現させることで共に回復する (9,12)。一方、ZnT1、ZnT2、ZnT3、ZnT4、ZnT8 といった他の human ZnT の外来的な発現は、TNAP 活性に影響を与えないことも示されている (12)。すなわち、DT40 細胞を用いた ZnT 遺伝子欠損-再発現系の解析手法は、標的遺伝子の欠損や外来的な発現によっても、本来細胞が有している分子機構を損なうことなくその詳細な機能を解析できるという利点を有していることが分かる。加えて、外来的に発現させた human placenta alkaline phosphatase (PLAP) の活性化過程にも ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体が寄与していることが示されており (9)、TNAP 以外の分泌型亜鉛要求性酵素の活性化過程を検証する上でも本解析手法が有用なアプローチであると考えられる。

がん促進性分泌型亜鉛要求性酵素

これまでの TNAP に関する解析から、TNAP の活性化過程には、早期分泌経路における ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体を介したタンパク質の成熟過程や亜鉛配位過程、細胞質における ZnT1、MT、ZnT4 を介した亜鉛動態の適切な制御が必要であることが明らかとなっている。一方で、TNAP 以外の亜鉛要求性酵素に関する解析は非常に限られており、その活性化過程の分子機構に関してはほとんど明らかとなっていない。分泌型亜鉛要求性酵素の中には、生命活動の維持に関わる様々な生理反応を司る酵素のみならず、がんをはじめとした様々な疾患の発症や進行に関与する酵素も多く存在しており、その病理学的な機能に関しても近年注目が集まっている (8)。中でも、がんの進行や転移に関与する分泌型亜鉛要求性酵素であるオートタキシン (autotaxin; ATX)、マトリック

スメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase; MMP)、カルボニックアンヒドラーゼ (carbonic anhydrases; CA) といった3つの酵素は、がん治療の潜在的な標的因子として特に注目を集めている (24-29)。特に、これらのがん促進性分泌型亜鉛要求性酵素を標的とした、酵素活性阻害剤に関する研究は盛んに行われており、中には ATX、MMP、CA の活性を同時に阻害できる低分子化合物も報告されている (27)。

ATX は、ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (Enpp) family に属する、細胞外分泌型の亜鉛要求性酵素であり、Enpp2 としても知られる酵素である (30)。ATX の活性中心には2つの亜鉛イオンが補因子として配位しており、その配位形態は TNAP のものと似た形態をとることが明らかとなっている (14,31,32)。ATX は、悪性がん細胞の培養液上清から単離されたオートクリン型の細胞遊走促進因子であり、リゾホスホリパーゼ D 活性によって、細胞外のリゾホスファチジルコリン (lysophosphatidylcholine; LPC) を加水分解することでリゾホスファチジン酸 (Lysophosphatidic acid; LPA) とコリンを産生する (30)。LPA は、G タンパク質共役受容体である LPA 受容体を活性化することで細胞増殖や分化、遊走などといった種々の細胞応答を引き起こす脂質メディエーターとして機能することが知られており、ATX の発現亢進は、がん細胞の増殖や転移、腫瘍形成の亢進や悪性度の増強に関わることも報告されている (33,34)。MMP は、細胞外マトリックスの主要な構成成分を分解する酵素であり、MMP family には20種類以上の酵素が分類されている (35)。中でも、細胞基底膜の構成成分である IV 型コラーゲンを基質とする MMP2 ならびに MMP9 は、活性中心に1つの亜鉛イオンが配位する細胞外分泌型のゼラチナーゼであり、創傷治癒や胚発生、血管新生などに幅広く関与する他、両酵素の発現亢進はがん細胞の転移能や浸潤能の亢進と密接に関連していることが広く知られている (24, 36)。CA は、二酸化炭素を水和して重炭酸イオンとプロトンを生産する反応 ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$) を両方向に触媒し、細胞内外における pH バランスを制御する亜鉛要求性酵素である (25)。13 種類の活性型アイソザイムが報告されている CA family の中でも、CAIX は、悪性がん細胞においてがん関連タンパク質として同定された膜結合型の酵素であり、その活性中心には1つの亜鉛イオンが配位している (37,38)。CAIX は、がん細胞周辺領域の pH バランスを制御することで、がん細胞の増殖や浸潤、生存能の亢進に関わることも知られるが、がん診断におけるバイオマーカーとしての可能性にも注目が集まっている (39-42)。従って、これ

ら ATX、MMP9、CAIX の活性化過程に関わる因子や、その詳細な作用機序が明らかとなれば、がん治療への応用が期待できる新規の知見となり得る。

本研究の概要

本研究では、TNAP との比較により、がん促進性分泌型亜鉛要求性酵素である ATX、MMP9、CAIX の活性化過程に ZnT5-ZnT6 複合体や ZnT7 複合体が寄与するか否かを検証した。解析には、DT40 細胞野生株 (wild type 株; WT 株)や、WT 株を用いて樹立した ZnT 単独もしくは多重欠損株を用い、ZnT 複合体の欠損や再発現によって各酵素の活性が変化するかを検証した。その結果、ATX の活性化過程には TNAP の場合と同様、ZnT5-ZnT6 複合体と ZnT7 複合体が必須の役割を果たすことを明らかとした。しかし ZnT 複合体の機能は、酵素タンパク質への亜鉛配位や、酵素タンパク質の安定性制御といった点に関して TNAP の活性化過程における機能とは異なることを見出した。MMP9 に関しては、ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体が、早期分泌経路における MMP9 の活性化、ならびに MMP9 タンパク質の成熟過程や分泌過程の制御に関与していることを明らかとした。CAIX に関しては、ZnT5-ZnT6 複合体、ZnT7 複合体に加えて、ZnT4 複合体が早期分泌経路における CAIX の活性化過程に等価に寄与することを明示し、上記 3 経路の内、少なくともいずれか一つの経路を介することで CAIX タンパク質へと亜鉛が適切に配位される可能性を示した。

本結果により、ZnT 複合体を介した分泌型亜鉛要求性酵素の活性化過程の新たな一面を明らかとしたのみならず、ZnT 複合体の新規機能を明らかとした。また、がん促進性分泌型亜鉛要求性酵素の活性化過程は各酵素で異なることを示し、がんの進行抑制や治療に繋がることを期待される有用な知見を得た。

結果

第 1 節 ZnT5-ZnT6 複合体と ZnT7 複合体は、TNAP と同様、ATX の活性化過程に必須の役割を果たす

1-1. LPC を基質とした活性測定系は ATX 活性を選択的に検出できる

ATX は、リゾホスホリパーゼ D 活性を有する分泌型亜鉛要求性酵素であり、リゾホスファチジルコリン (lysophosphatidylcholine; LPC) のリン酸モノエステル結合を加水分解することで、リゾホスファチジン酸 (Lysophosphatidic acid; LPA) とコリンを産生する酵素である (30)。その活性中心には、補因子として機能する 2 分子の亜鉛が配位しており、その配位形態は、TNAP をはじめとした ALP のものによく似た形態であることが報告されている (14,31,32)。すなわち、ATX に関しても TNAP と同様、その活性化過程に ZnT5-ZnT6 複合体ならびに ZnT7 複合体が寄与している可能性が強く示唆された。そこで本研究ではまず、DT40 細胞野生株 (wild type 株; WT 株)ならびに ZnT 欠損株を用いて上記の可能性を検証した。WT 株を用いて RT (reverse-transcription)-PCR 解析を行った結果、chicken β Actin ($c\beta$ Actin) mRNA が検出された一方で、 c ATX mRNA は検出されなかった (Fig. 1-1A)。そこで本研究ではまず、ATX を安定発現させた WT 株を樹立し (Fig. 1-1B)、LPC を基質とする活性測定系を用いて、外来的な ATX の発現によって LPC を基質とする酵素活性が増加するか否かを検証した。加えて、TNAP が ATX と同様、リン酸モノエステル結合の加水分解活性を有する酵素であることをふまえ、TNAP を安定発現させた WT 株を用い、LPC を基質とした酵素活性測定系によって ATX 活性を選択的に測定できるかを確かめた。結果、ATX を安定発現させた WT 株では、LPC を基質とした酵素活性が顕著に増加した一方、TNAP の基質である *p*-nitrophenyl phosphate (*p*-NPP) を基質とした酵素活性はほとんど検出されなかった (Fig. 1-1C and D)。逆に TNAP を安定発現させた WT 株では、LPC を基質とした酵素活性は検出されなかったが、*p*-NPP を基質とした酵素活性は顕著に増加した (Fig. 1-1C and D)。以上の結果から、本研究で用いた LPC を基質とした ATX 活性測定系は、DT40 細胞に安定発現させた ATX の活性を選択的に検出できることが示された。

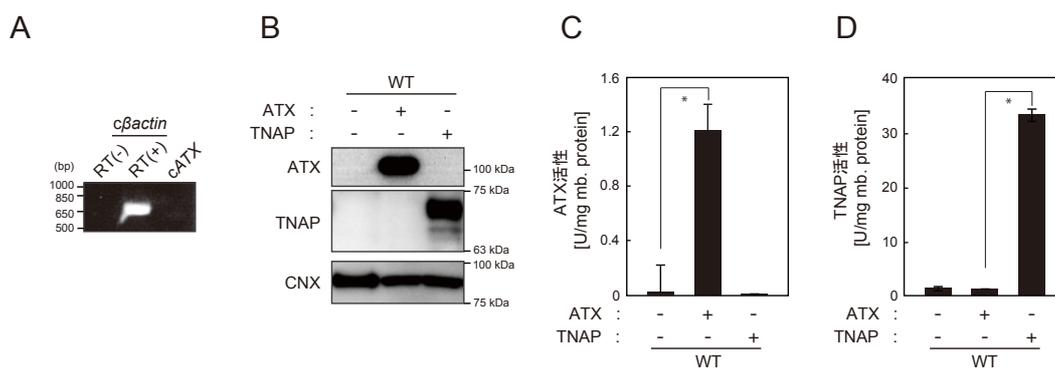


Figure 1-1. LPC を基質とした ATX 活性測定系の確立

A, DT40 細胞における chicken *ATX* (*cATX*) mRNA の発現確認。**B**, *ATX* 発現 WT 株、ならびに *TNAP* 発現 WT 株の樹立。*ATX* ならびに *TNAP* の発現はイムノブロッティングによって確認した。なおローディングコントロールとして *calnexin* (*CNX*) を用いた。**C**, *ATX*、*TNAP* 発現株における LPC を基質とした *ATX* 活性測定の結果。**D**, *ATX*、*TNAP* 発現株における *p*-*NPP* を基質とした *TNAP* 活性測定の結果。*ATX* 活性の測定には各々の細胞株から回収した 10 μ g の膜画分を (**C**)、*TANP* 活性の測定には 2 μ g の膜画分をそれぞれ用いた (**D**) (n = 3)。

1-2. *ATX* の活性化過程には *ZnT5*-*ZnT6* 複合体、*ZnT7* 複合体が必須である

次に、*ZnT5*-*ZnT6* 複合体及び *ZnT7* 複合体が、*TNAP* の場合と同様、早期分泌経路における *ATX* の活性化過程に寄与するか否かを検証した。本研究では、*ZnT5*、*ZnT6* 二重欠損株 ($\Delta 5\Delta 6$ 株)、及び *ZnT5*、*ZnT6*、*ZnT7* 三重欠損株 (triple knockout 株; TKO 株) を用いて *ATX* 安定発現株を樹立し、1-1. で用いた *ATX* 活性測定系によって *ATX* 活性を測定した。結果、 $\Delta 5\Delta 6$ 株、TKO 株の両株において、*ATX* タンパク質は WT 株のものと同程度に発現しているにも関わらず、*ATX* 活性が $\Delta 5\Delta 6$ 株では 30% 程度、TKO 株では 5% 未満にまで低下し、同一株における内因性の *TNAP* 活性と同様、*ZnT5*-*ZnT6*、*ZnT7* 両二量体の欠損によって顕著に低下した (Fig. 1-2A and B)。また、TKO 株において低下した *ATX* 活性は、*ZnT5* と *ZnT6* の再発現、ならびに *ZnT7* の再発現によって回復した。一方、終濃度 0, 25, 50 μ M の *ZnSO*₄ を含む培地にて TKO 株を 48 時間培養した場合では、低下した *ATX* 活性は回復しなかった (Fig. 1-2C and D)。以上の結果から、*ATX* の活性化過程には、*TNAP* 同様、*ZnT5*-*ZnT6*、*ZnT7* 両複合体が必須の役割を果たしていることが明らかとなった。また、両 *ZnT* 複合体が欠損しても *ATX* タンパク質は安定して発現することから、両 *ZnT* 複合体を介した *apo* 型 *ATX* タンパク質への亜鉛配位が *ATX* の活性化過程に重要なプロセスであり、*ATX* は亜鉛が配位していない *apo* 型でも安定的に存在できることが示唆された。

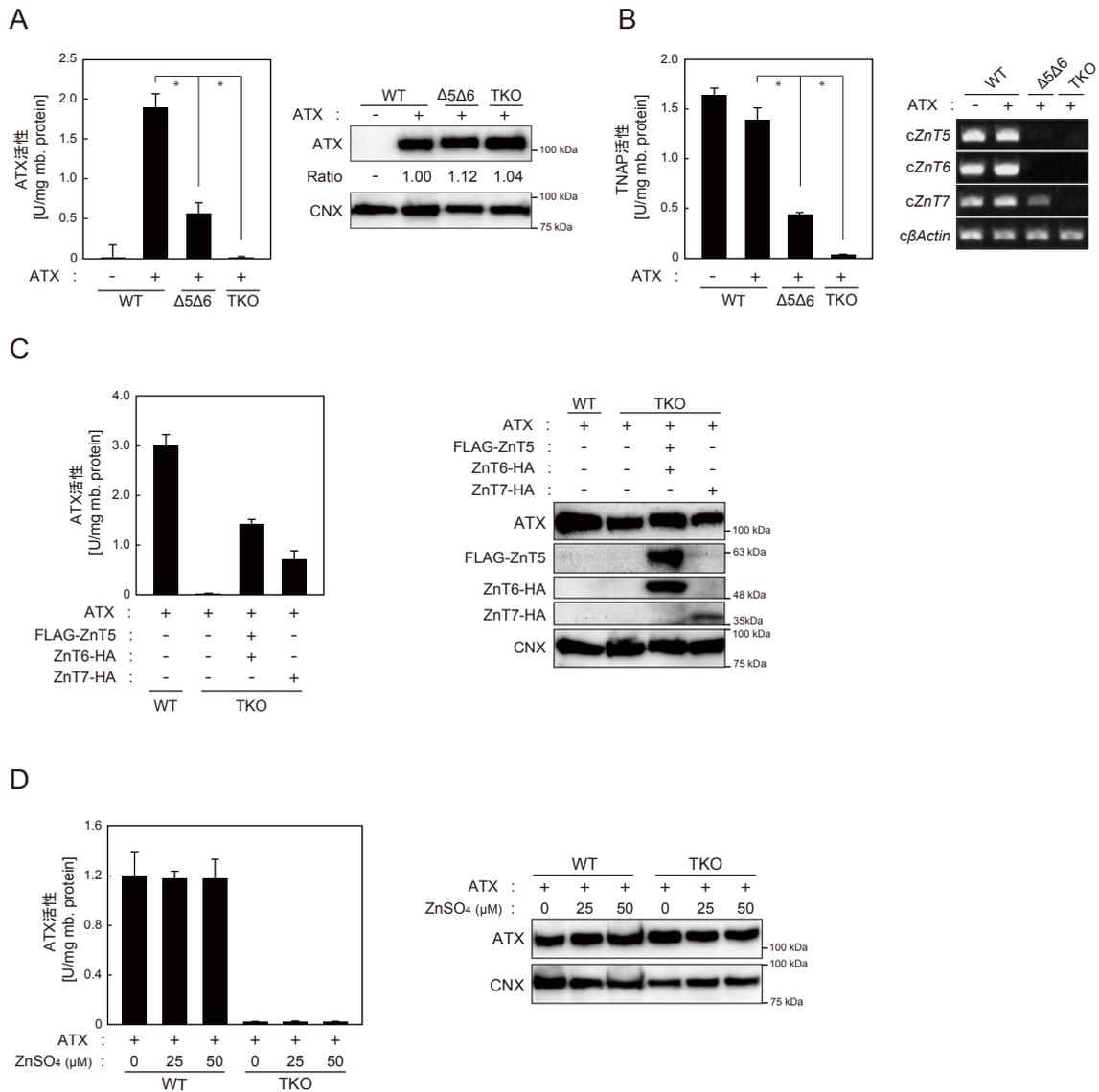


Figure 1-2. ATX の活性発現には ZnT5-ZnT6 複合体もしくは ZnT7 複合体が必要である

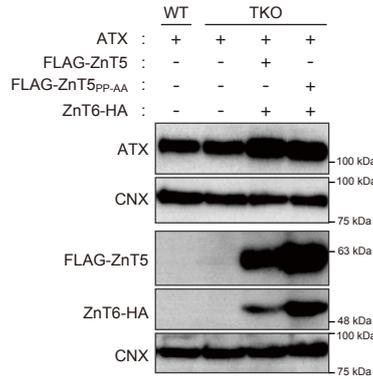
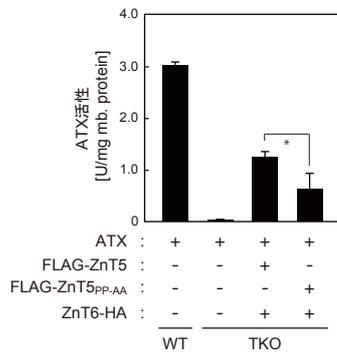
A, *ZnT5*, *ZnT6* 二重欠損株 ($\Delta 5\Delta 6$ 株)、及び *ZnT5*, *ZnT6*, *ZnT7* 三重欠損株 (triple knockout 株; TKO 株)に発現させた ATX の活性測定の結果。各レーンの下には、WT 株、 $\Delta 5\Delta 6$ 株、TKO 株の各々において検出された ATX タンパク質のバンドのシグナル強度を定量化した数値を示した。なお定量化は、各株における ATX のシグナル強度を CNX のシグナル強度で標準化した後 WT 株におけるものを基準値 (1.00)とし、それに対する相対値を各々示した。 **B**, **A** で用いた細胞株における内因性 TNAP の活性測定の結果。各株における ZnT の欠損は RT-PCR 解析によって確認した (*right panel*)。 **C**, ZnT 再発現株における ATX 活性測定の結果。 **D**, 亜鉛添加培地にて培養した WT 株及び TKO 株を用いた ATX 活性測定結果。 **A**~**D** において、ATX 活性の測定には 10 μ g、TNAP 活性の測定には 2 μ g の膜画分をそれぞれ用いた ($n=3$)。 **A**, **C**, **D** において、ATX 及び、FLAG-ZnT5、FLAG-ZnT5_{pp-AA}、ZnT6-HA、ZnT7-HA の発現は免疫ブロッティングによって確認した。なおローディングコントロールとして CNX を用いた。

1-3. TNAP の活性化過程に重要な役割を果たす PP-motif は、ATX の活性化過程には大きく寄与しない

解析 1-2. から、ATX の活性化過程には TNAP 同様、ZnT5-ZnT6、ZnT7 複合体が必須であることが明らかとなった。しかしながら、TNAP は両 ZnT 複合体の欠損によって *apo* 型タンパク質の安定性が低下して分解される (12)のに対し、ATX は ZnT 複合体が欠損しても *apo* 型タンパク質は安定的に発現するという顕著な違いが認められた。近年の研究から、ZnT5 の細胞小器官内腔側に位置する 2 番目のループ領域に存在する di-proline motif (PP-motif)が、早期分泌経路における TNAP タンパク質への適切な亜鉛配位に重要な役割を果たすことが示されている (16)。そこで、この PP-motif が ATX の活性化過程やタンパク質の安定性に関与している可能性を検証するため、ZnT5 の PP-motif をアラニン置換した変異体 (ZnT5_{pp-AA})を用いて解析を実施した。結果、ATX 及び ZnT5_{pp-AA}、ZnT6 を共に発現させた TKO 株において、ATX 活性は ZnT5 と ZnT6 とを共に発現させた場合と比較して約 50%程度回復した (Fig. 1-3A)。一方、同一細胞株において、内因性 TNAP の活性は、ZnT5_{pp-AA} と ZnT6 とを共に発現させた場合ではほとんど回復しなかった (Fig. 1-3B)。また ZnT5 と ZnT6、ZnT5_{pp-AA} と ZnT6 とを共に発現させたいずれの場合においても、ATX の発現量に関して大きな違いは認められなかった (Fig. 1-3A, right panel)。すなわち、PP-motif は ATX の活性化過程に関与している一方で、その寄与の程度は、TNAP の活性化過程における寄与の度合いと比較して小さいということが明らかとなった。

以上 1-1. から 1-3. の解析によって、ATX の活性化には TNAP の場合と同様、ZnT5-ZnT6 複合体と ZnT7 複合体が必須の役割を果たすことを明らかにした。しかしながら、その ZnT5-ZnT6、ZnT7 両複合体を介した ATX の活性過程には TNAP のものとは異なる点も認められ、早期分泌経路内に輸送された亜鉛の酵素タンパク質への配位や、酵素タンパク質の安定性制御に関して異なる分子機序が働いている可能性が示された。

A



B

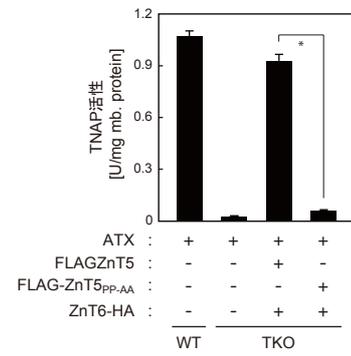


Figure 1-3. PP-motif は ATX の活性化過程に寄与する

A, ZnT5 及び ZnT5 の PP-motif をアラニン置換した変異体 (ZnT5_{PP-AA}) と ZnT6 との再発現株における ATX 活性測定の結果。 **B**, **A** で用いた細胞株における内因性 TNAP の活性測定の結果。ATX 活性の測定には 10 μ g、TNAP 活性の測定には 2 μ g の膜画分をそれぞれ用いた (n=3)。ATX 及び、FLAG-ZnT5、FLAG-ZnT5_{PP-AA}、ZnT6-HA の発現は免疫ブロットングによって確認し、ローディングコントロールとして CNX を用いた。

第2節 ZnT5-ZnT6 複合体と ZnT7 複合体は、MMP9 の活性化と細胞外への分泌に重要な役割を果たす

2-1. ZnT5-ZnT6 複合体と ZnT7 複合体の欠損によって MMP9、MMP2 活性ならびに両酵素タンパク質の細胞培養液中への分泌量が低下する

本研究では次に、MMP9 や MMP2 のゼラチナーゼ活性が ZnT5-ZnT6 複合体、ZnT7 複合体によって制御されるのかを検証した。まず、MMP9 もしくは MMP2 を安定発現させた DT40WT 株および TKO 株を樹立し、両酵素の活性を、各細胞株の細胞培養液上清を用いたゼラチンザイモグラフィ法 (非還元条件下) によって測定した。また、細胞培養液中に分泌された両酵素タンパク質の発現量をイムノブロッティング (還元条件下) によって確認した。結果、非還元条件下におけるゼラチンザイモグラフィ解析において、MMP9 を発現させた WT 株では、88 kDa 周辺に MMP9 活性を示す顕著なバンドが検出された。一方、TKO 株においては、MMP9 活性を示すバンドが著しく減少し、細胞培養液中に分泌された MMP9 タンパク質レベルも同様に大きく低下した (Fig. 2-1A)。同様の解析を MMP2 に関して実施した結果、MMP9 の結果と同様、WT において 63 kDa 周辺 (非還元条件下) に検出された MMP2 活性を示すバンドは TKO 株において顕著に減少し、細胞培養液中に分泌された MMP2 タンパク質レベルも低下した (Fig. 2-1B)。対照的に、細胞培養液中に分泌された ATX (Secretory-ATX) のタンパク質レベルは TKO 株においても減少せず、各株における細胞内 ATX (Intracellular-ATX) のタンパク質レベルと比較しても顕著な違いは認められなかった。すなわち、ZnT5-ZnT6、ZnT7 両複合体が欠損しても DT40 細胞が有するタンパク質分泌能に大きな影響はないことが示された。 (Fig. 2-1C)。以上の結果から、ZnT5-ZnT6、ZnT7 両複合体が MMP9 の活性化や分泌過程に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

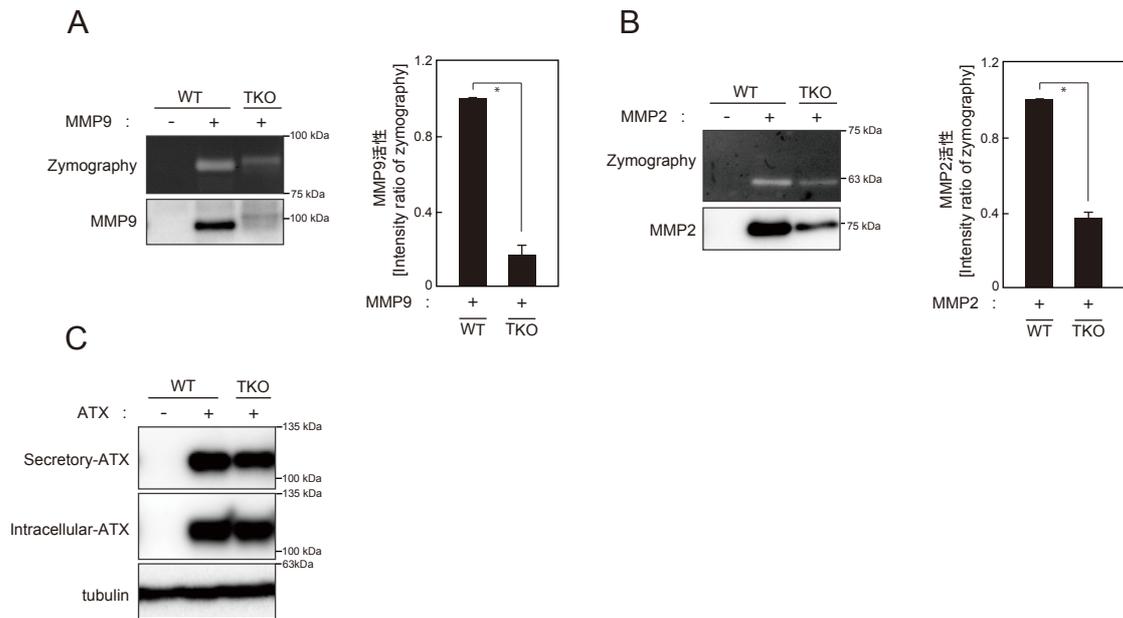


Figure 2-1. MMP9 及び MMP2 の活性発現ならびに細胞外分泌には ZnT 複合体が寄与する
A, MMP9 発現株を用いたゼラチンザイモグラフィー解析の結果。MMP9 の解析には、 2.0×10^6 個の細胞を 4 時間インキュベートした血清非含有細胞培養液 500 μ l から分取した細胞培養液上清 16 μ l を用いた。なお MMP9 活性を定量化した数値をグラフ化したものを右に示した (*right graph*) ($n = 3$)。定量化した数値は、活性・タンパク質発現量ともに、WT 株における数値を基準値 (1.00) とし、それに対する TKO 株のものを示した。**B**, WT 株、TKO 株を用いたゼラチンザイモグラフィー解析の結果。MMP2 に関して、MMP9 の解析条件に若干の調整を加えた同様の手法 (材料ならびに手法-MMP9 及び MMP2 活性の検出の項を参照) を用いて同様の解析を実施した。なお MMP2 活性を定量化した数値をグラフ化したものを右に示した (*right graph*)。 **C**, ATX 安定発現株における、培養液中へと分泌された ATX タンパク質 (Secretory-ATX)、及び細胞内 ATX タンパク質 (Intracellular-ATX) の発現レベル。Secretory-ATX の発現確認には、 2.0×10^6 個の細胞を 4 時間インキュベートした血清非含有細胞培養液 500 μ l から分取した細胞培養液上清 16 μ l を用いた。ATX 発現はイムノブロットイングによって確認し、ローディングコントロールとして tubulin を用いた。

2-2. ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体の再発現によって、MMP9 活性ならびに MMP9 タンパク質の細胞培養液中への分泌量が回復する

解析 2-1. から、MMP9、MMP2 両酵素の活性化過程にも TNAP や ATX と同様、ZnT 複合体が寄与することが明らかとなった。そこで次に、MMP2 と比較して ZnT 複合体の欠損による酵素活性の低下、ならびに分泌量の低下がより顕著に認められた MMP9 に着目し、ZnT 複合体の寄与に関して詳細な解析を実施した。

まず解析 2-1. と同様の手法によって、TKO 株に ZnT5 と ZnT6 もしくは ZnT7 を再発現させた場合における、培養液中の MMP9 活性を評価した。結果、各 ZnT 複合体の再発現によって、TKO 株で低下した MMP9 活性、ならびに細胞培養液

中への MMP9 タンパク質の分泌量は回復した (Fig. 2-2A)。また、同一細胞株における内因性 TNAP 活性の回復も同様に認められた (Fig. 2-2B)。以上から、ZnT5-ZnT6、ZnT7 両複合体は TNAP や ATX の場合と同様に、MMP9 の適切な活性発現に必要であることが明らかになった。一方、両複合体は、TNAP や ATX の場合とは異なり、MMP9 の分泌にも必須の役割を果たしていることが新たに示され、両複合体が酵素ごとに異なる機能によって、その活性化過程に寄与している可能性が示された。

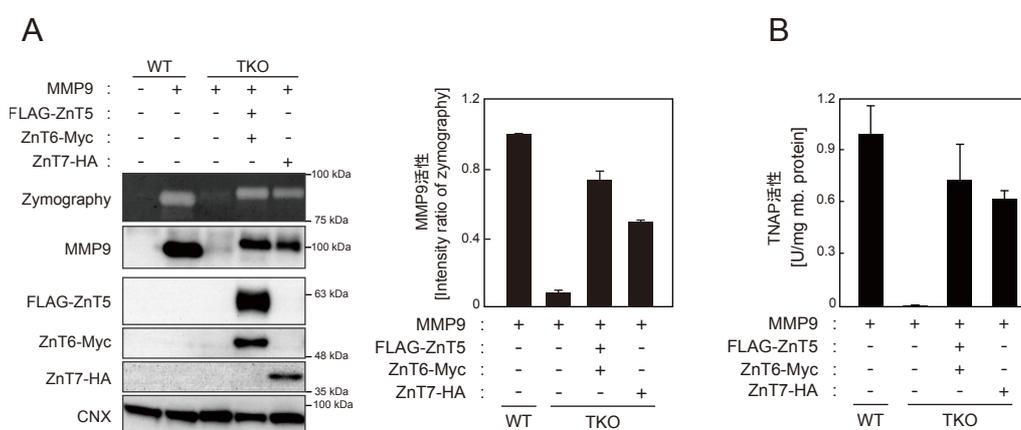


Figure 2-2. ZnT 複合体は MMP9 の活性発現と細胞外分泌に必須である

A, ZnT 再発現株を用いたゼラチンザイモグラフィー解析の結果。解析には、 2.0×10^6 個の細胞を 4 時間インキュベートした血清非含有細胞培養液 500 μ l から分取した細胞培養液上清 16 μ l を用いた。なお MMP9 活性を定量化した数値をグラフ化したものを右に示した (*right graph*) (n = 3)。定量化した数値は、活性・タンパク質発現量ともに、WT 株における数値を基準値 (1.00) とし、それに対する各株の相対値を示した。MMP9 及び、FLAG-ZnT5、ZnT6-Myc、ZnT7-HA の発現はイムノブロットィングによって確認し、ローディングコントロールとして CNX を用いた。**B**, **A** で用いた細胞株における内因性 TNAP の活性測定の結果。各々の ZnT 複合体の再発現によって、TNAP 活性は回復した (n = 3)。

2-3. ZnT 複合体の欠損によって低下した MMP9 活性は培地中への亜鉛添加によっても回復する

次に、解析 2-2. で示された MMP9 活性の回復、ならびに分泌量の回復が ZnT5-ZnT6 複合体もしくは ZnT7 複合体に依存的であるか否かを検証するため、細胞培養液中への亜鉛添加実験を行った。結果、TNAP や ATX の場合とは異なり、TKO 株で低下した MMP9 活性は培地中への亜鉛添加によって回復し、50 μ M の ZnSO₄ を添加した場合には、TKO 株で低下した MMP9 活性は WT 株における活性とほぼ同程度にまで回復した。また、MMP9 活性の回復に一致して、

培地中における MMP9 タンパク質レベルも回復した (Fig. 2-3A)。一方で、同一細胞株における TNAP 活性は、培地中への単なる亜鉛添加では回復しなかった (Fig. 2-3B)。以上の結果から、ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体は亜鉛通常条件において、MMP9 の適切な活性化や分泌に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。一方、亜鉛過剰条件においては、MMP9 は ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体以外の独立した経路を介して亜鉛を獲得している可能性が示唆された。

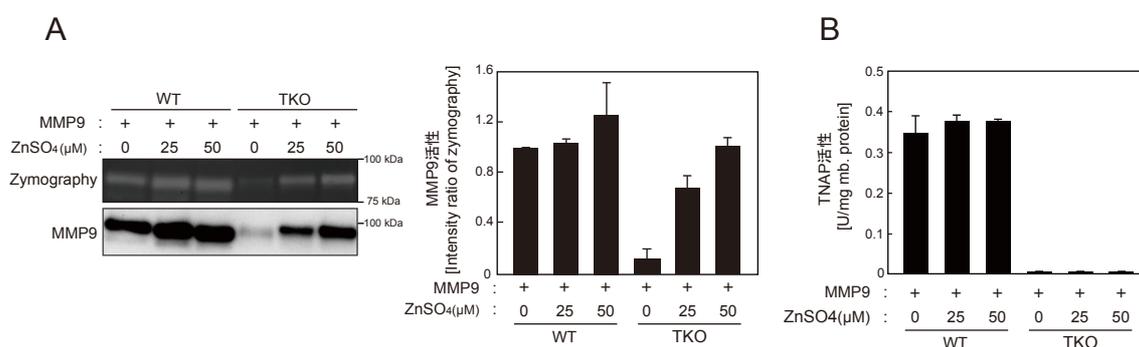


Figure 2-3. 亜鉛過剰条件下において MMP9 活性と細胞外分泌は回復する

A, 亜鉛添加培地にて培養した WT 株及び TKO 株を用いたゼラチンザイモグラフィ解析の結果。終濃度 0, 25, 50 μM の ZnSO₄ を添加した培地にて各細胞株を 48 時間培養した後、同濃度の ZnSO₄ を含む血清非含有培地 500 μl にて、2.0×10⁶ 個の細胞を 4 時間培養した。その後、細胞培養液上清 16 μl を回収して解析に用いた。なお MMP9 活性を定量化した数値をグラフ化したものを右に示した (*right graph*) (n = 3)。定量化した数値は、WT 株における数値を基準値 (1.00) とし、それに対する各株の相対値を示した。MMP9 の発現はイムノブロッティングによって確認した。**B**, **A** で用いた細胞株における内因性 TNAP の活性測定の結果。(n = 3)。

2-4. ZnT5-ZnT6 複合体と ZnT7 複合体は、早期分泌経路における MMP9 タンパク質の成熟過程に寄与する

TKO 株では、MMP9 活性及び分泌量が顕著に減少した。このことから、ZnT 複合体が欠損することによって、細胞内における MMP9 タンパク質の成熟過程に何らかの不備が生じている可能性が考えられた。そこで、ZnT5-ZnT6 複合体、ZnT7 複合体がどのようにして MMP9 の活性化や培地中への分泌に寄与しているのかを検証するため、細胞内 MMP9 タンパク質 (Intracellular-MMP9) に着目し、その発現をイムノブロッティングにて解析した。結果、還元条件下の SDS-PAGE において、MMP9 を発現させた WT 株では 80 kDa 周辺に Intracellular-MMP9 を示すバンドが検出された (Fig. 2-4A)。一方、TKO 株では Intracellular-MMP9 を

示すバンドが 80 kDa から 90 kDa 周辺の高分子両側にシフトすること、ZnT5 と ZnT6 を共に再発現させた場合、ZnT7 を再発現させた場合においてはこの高分子量側へのシフトは起こらないことが明らかになった (Fig. 2-4A)。加えて、WT 株において、プロテアソームを介したタンパク質分解経路の阻害剤である MG132 で処理した場合には Intracellular-MMP9 を示すバンドの高分子量側へのシフトは認められなかった。一方、ライソソームを介したタンパク質分解経路の阻害剤である Bafilomycin A1 で処理した場合には、バンドの高分子両側へのシフトが認められた (Fig. 2-4B)。これらの結果から、MMP9 タンパク質は細胞内において、ライソソームを介した経路によってタンパク質切断を受けていることが明らかになった。また、ライソソームを介した MMP9 タンパク質のタンパク質切断が、細胞内における MMP9 タンパク質の成熟に関わる重要なプロセスである可能性が示された。

以上 2-1. から 2-4. の解析によって、ZnT5-ZnT6 複合体、ZnT7 複合体が、早期分泌経路における MMP9 タンパク質の成熟過程や分泌過程の制御に関わることで、その適切な活性化に寄与している可能性が示された。

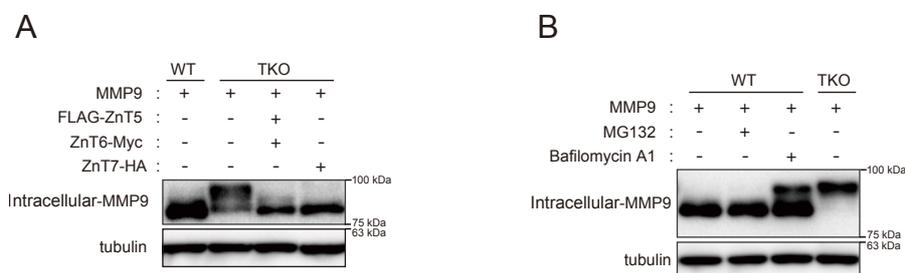


Figure 2-4. MMP9 タンパク質は細胞内において、ライソソームを介した経路によってタンパク質切断を受ける

A, MMP9 発現株における細胞内 MMP9 タンパク質 (Intracellular-MMP9) の発現。 **B**, MG132、Bafilomycin A1 処理後の Intracellular-MMP9 の発現。解析には、30 μ M の MG132 もしくは 30 nM の Bafilomycin A1 添加後、4 h 培養した細胞株を用いた。 **A**, **B** において、MMP9 の発現はイムノブロットニングによって確認し、ローディングコントロールとして tubulin を用いた。

第3節 CAIX への亜鉛配位には、ZnT5-ZnT6 複合体と ZnT7 複合体以外の経路が関与する

3-1. CO₂ を基質とした CAIX 活性測定系の確立

本研究では最後に、ZnT5-ZnT6 複合体、ZnT7 複合体が CAIX の活性化過程にも寄与する可能性について検証を行った。DT40 細胞 WT 株を用いて、主要な chicken CA (cCA) の発現を確認したところ、cCAIX mRNA の発現のみが認められた (Fig. 3-1A)。CO₂ を基質とした pH 変化を指標とする活性測定系 (材料ならびに手法—CAIX 活性の測定の記事を参照) を用い、WT 株における cCAIX 活性を測定した。結果、cCAIX 活性はほとんど検出されず、CA 活性阻害剤である acetazolamide (ACTZ) で処理した場合においても顕著な違いは認められなかった (Fig. 3-1B and C, *left graph*)。次に CAIX を安定発現させた WT 株を新規に樹立し (Fig. 3-1C, *right pannel*)、同様に活性を測定した。結果、CAIX を安定発現させることで CAIX 活性は顕著に増加し、増加した活性は 100 μ M の ACTZ 処理によってほぼ完全に抑制された (Fig. 3-1B and C, *left graph*)。また、CAIX タンパク質は 70-75 kDa の領域に広がる高分子量領域のバンドと 60 kDa 付近の低分子量のバンドとして検出され、その検出パターンは 100 μ M の ACTZ 処理によっても変化しなかった (Fig. 3-1C, *right pannel*)。以上の結果から、本活性測定系によって DT40 細胞に外来的に発現させた CAIX の酵素活性を選択的に評価できることが示された。これにより、本活性測定系を用いることで、ZnT 複合体が CAIX の活性化過程に与える影響を的確に評価することができると考えられたため、本活性測定系を用いて以降の解析を実施した。

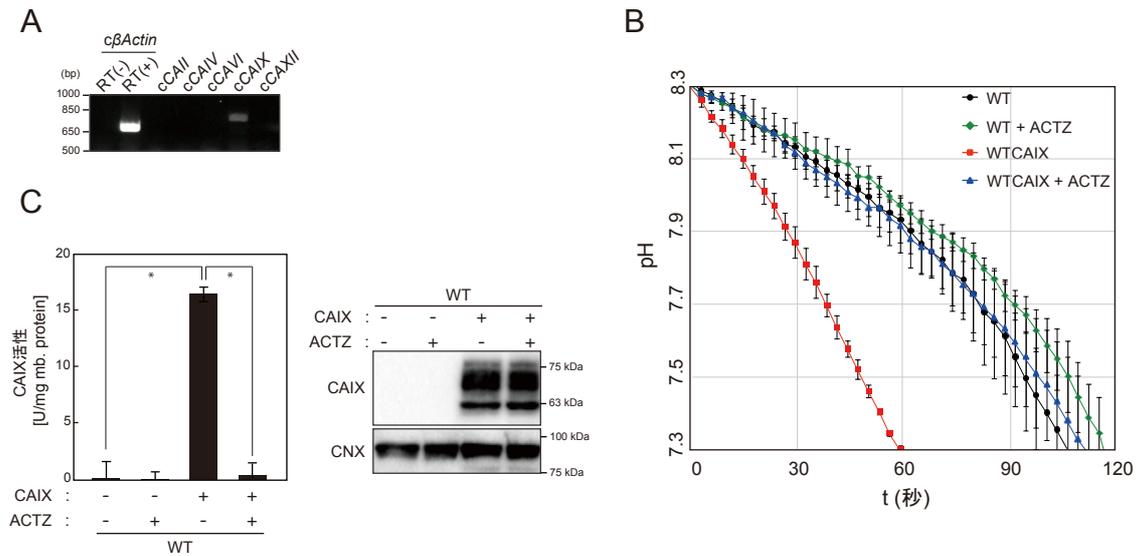


Figure 3-1. CO₂を基質とする CA 活性測定系の確立

A, DT40 細胞における chicken CA (*cCA*) mRNA の発現確認。RT-PCR 解析によって、主要な細胞質 CA である CAII ならびに主要な細胞外分泌型 CA である CAIV、CAVI、CAIX、CAXII (25) の mRNA の発現を確認した。なおコントロールとして *cβActin* を用いた。**B**, CO₂ を基質とした CAIX 活性測定結果の row data の一例。反応溶液中の pH を 8.3 から 7.3 まで低下させるのに要した時間 *t* は、WT 株で 105.7 ± 8.8 秒 (WT)、CA 活性阻害剤である acetazolamide (ACTZ) で処理した WT 株で 117.7 ± 5.1 秒 (WT + ACTZ)、CAIX を発現させた WT 株で 60.0 ± 0.6 秒 (WTCAIX)、ACTZ で処理した CAIX 発現 WT 株で 113.4 ± 10.8 秒 (WTCAIX + ACTZ) であった ($n = 3$)。CAIX 活性の測定には各細胞株から回収した膜画分 200 μ g を用い、ACTZ 処理は、回収した膜画分サンプルに終濃度 100 μ M となるよう ACTZ を添加した。**C**, **B** における CAIX 活性測定の結果を定量化したグラフ、及び使用サンプルのイムノブロットの結果。CAIX の発現はイムノブロットによって確認し、ローディングコントロールとして CNX を用いた。

3-2. CAIX 活性及び CAIX タンパク質の発現は亜鉛応答性を示すが、ZnT5-ZnT6、ZnT7 両複合体を欠損させても CAIX 活性は低下しない

解析 3-1. において、WT 株における CAIX タンパク質は、他の論文で報告されているように (43,44)、70-75 kDa の領域に広がる高分子量のバンドと 60 kDa 付近の低分子量のバンドとして検出された (Fig. 3-1C, right pannel)。この内、CAIX タンパク質として検出される高分子量領域のバンドは、亜鉛欠乏条件下において培養時間に応じて徐々に消失し、その消失と一致して CAIX 活性も 24 時間で約 70%、48 時間で約 40% にまで低下した (Fig. 3-2A)。一方、同一株における TNAP 活性は亜鉛欠乏 24 時間で、ほぼ完全に消失した (Fig. 3-2B)。すなわち、CAIX は亜鉛応答性を示すものの、その応答性は TNAP のものと比較して低いことが示された。また、亜鉛欠乏に応じて低下した CAIX 活性は、細胞株を亜鉛欠乏培地で 72 時間培養した後、終濃度 50 μ M となるように ZnSO₄ を培地中に添

加、48時間培養することで TNAP 活性と同様に回復し (Fig. 3-2C, *left graph*, and 3-2D)、その活性回復に応じて高分子量領域のバンドの発現も回復した (Fig. 3-2C, *right panel*)。以上の結果から、CAIX の活性及び発現は、亜鉛に対する応答性を示すことが示された。加えて、60 kDa 付近の低分子量のバンドとして検出される CAIX タンパク質と比較して、高分子量領域に検出される CAIX タンパク質が顕著な亜鉛応答性を示すことから、CAIX タンパク質は亜鉛応答性の異なる形態をとっている可能性が示唆された。

次に、CAIX を安定発現させた TKO 株を樹立し、ZnT 複合体の欠損によって CAIX 活性が低下するか否かを検証した。しかしながら、TKO 株において TNAP 活性の低下が認められる一方、顕著な CAIX 活性の低下は認められなかった (Fig. 3-2E, *left graph*, and 3-2F)。また、亜鉛応答性を示す高分子量領域のバンドの消失も同様に認められなかった (Fig. 3-2E, *right panel*)。以上の結果から、CAIX は早期分泌経路において、ZnT5-ZnT6 複合体、ZnT7 複合体以外の経路から亜鉛を獲得している可能性が示唆された。

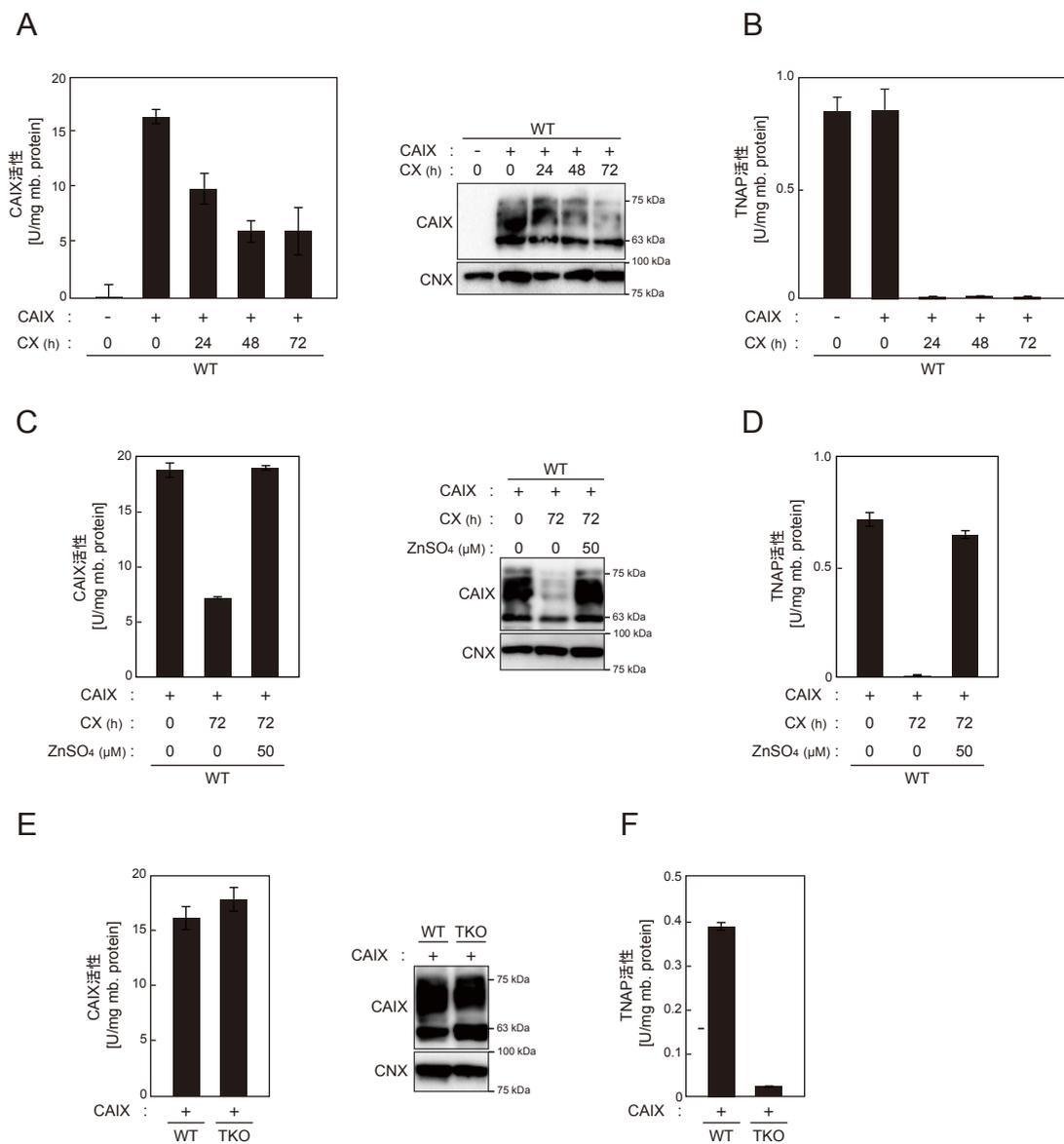


Figure 3-2. CAIX は ZnT5-ZnT6 複合体および ZnT7 複合体以外の経路からも亜鉛を獲得できる

A, 亜鉛欠乏条件下での WT 株における CAIX 活性及び CAIX タンパク質の発現。細胞株は、chelex (CX) 処理された fetal bovine serum (FBS) 及び chicken serum で調整された亜鉛欠乏培地で 24、48、72 時間培養したものを用いた。**B**, **A** で用いた細胞株における内因性 TNAP の活性測定の結果。**C**, 亜鉛欠乏条件下で培養後、培地中に亜鉛を添加した際の WT 株における CAIX 活性及び CAIX タンパク質の発現。**B**, **C** で用いた細胞株における内因性 TNAP の活性測定の結果。TNAP 活性は、CAIX 活性と同様、亜鉛を添加することによって回復した。**E**, TKO 株における CAIX 活性及び CAIX タンパク質の発現。**F**, **E** で用いた細胞株における内因性 TNAP の活性測定の結果。**A**, **C**, **D** において、CAIX 活性の測定には 200 μg の膜画分をそれぞれ用いた (n = 3)。CAIX の発現はイムノブロッティングによって確認し、ローディングコントロールとして CNX を用いた。**B**, **D**, **F** において、TNAP 活性の測定には 2 μg の膜画分をそれぞれ用いた (n = 3)。

第4節 CAIXへ亜鉛配位には、ZnT4複合体が、ZnT5-ZnT6複合体およびZnT7複合体とともに早期分泌経路において寄与する

4-1. ZnT4はホモ二量体を形成し、CAIXの活性化過程に寄与する

DT40細胞では、*ZnT4* mRNAが高度に発現していた (Fig. 4-1A)。加えて、*ZnT4* 単独欠損株 ($\Delta 4$ 株)を用いた免疫沈降 (immunoprecipitation: IP)実験、ならびに免疫染色実験によって、ZnT4はホモ二量体を形成し、その発現はゴルジ体と一部共局在を示すことが明らかとなった (Fig. 4-1B and C)。そこで、CAIXの活性化過程にZnT4ホモ二量体 (ZnT4複合体)が寄与する可能性を検討するため、TKO株からさらに*ZnT4*遺伝子を欠損させた*ZnT4*, *ZnT5*, *ZnT6*, *ZnT7*四重欠損株 (quadruple knockout株; QKO株)を新規に樹立した (Fig. 4-1D)。WT株やTKO株と比較して、QKO株においても細胞表面に局在するタンパク質の発現に大きな変化は認められず (Fig. 4-1E)、QKO株においてもタンパク質分泌能は減弱していないと考えられた。 $\Delta 4$ 株及びQKO株を用いてCAIX安定発現株を各々樹立し、解析を実施した結果、WT-CAIX株と比較して、CAIX活性はQKO株において約60%低下し、高分子量領域に検出されるCAIXタンパク質のバンドも著しく減少した (Fig. 4-1F)。一方、 $\Delta 4$ 株においては、安定発現させたCAIXの活性は低下せず、高分子量領域に検出されるCAIXタンパク質のバンドにも大きな変化は認められなかった (Fig. 4-1F)。これらの結果から、ZnT4複合体はCAIXの活性化過程に寄与していることが示された。しかしながら、ZnT4複合体がCAIXに亜鉛を供給する唯一の経路ではなく、複数の経路を介して亜鉛を獲得していることが予想された。

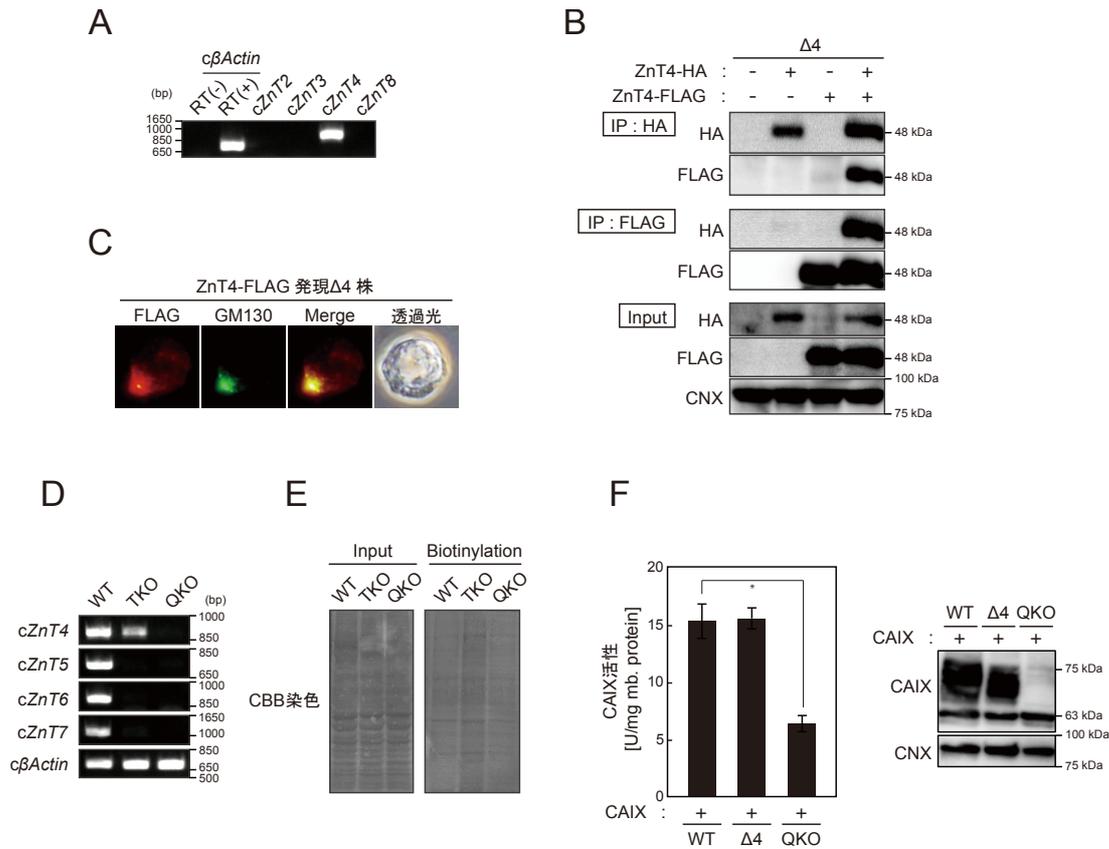


Figure 4-1.は *ZnT4*, *ZnT5*, *ZnT6*, *ZnT7* 四重欠損株 (quadruple knockout 株; QKO 株)の樹立、ならびに QKO 株における CAIX 活性

A, DT40 細胞における chicken *ZnT* (*cZnT*) mRNA の発現確認。RT-PCR 解析によって、*cZnT2*, *cZnT4*, *cZnT3*, *cZnT4*, *cZnT8* の mRNA の発現を確認した。なおコントロールとして *cβActin* を用いた。**B**, *ZnT4* はホモ二量体を形成する。なお IP に使用したサンプルの 10%相当の膜画分を用いて各細胞株の *ZnT4* の発現量をイムノプロットで確認した (Input)。なおローディングコントロールとして CNX を用いた。**C**, DT40 細胞における *ZnT4* の細胞内局在。 *ZnT4*-FLAG を安定発現させた Δ4 株を、FLAG 抗体と GM130 抗体にて二重染色し、各々の蛍光を観察した。なお透過光を当てた際の像も同様に示した。**D**, *ZnT4*, *ZnT5*, *ZnT6*, *ZnT7* 四重欠損株 (quadruple knockout 株; QKO 株)の樹立。TKO 株から *cZnT4* を欠損させ、各 *cZnT* の欠損を RT-PCR によって確認した。なお *cZnT4* の欠損には、文献 (12)にて用いられたものを使用し、コントロールとして *cβActin* を用いた。**E**, 細胞表面ビオチン化アッセイによる WT、TKO、QKO 株における細胞表面局在型タンパク質の分泌に関する解析。インプットには、ビオチン標識に使用したサンプルの 10%相当の細胞全タンパク質を用いた (Input)。**F**, QKO 株における CAIX 活性及び CAIX タンパク質の発現。なお CAIX 活性の測定には 200 μg の膜画分をそれぞれ用いた (n = 3)。CAIX の発現はイムノブロットイングによって確認し、ローディングコントロールとして CNX を用いた。

4-2. CAIX は ZnT4 複合体 ZnT5-ZnT6 複合体、ZnT7 複合体を介して輸送された亜鉛を獲得する

ZnT4 複合体が、複数の経路を介して亜鉛を獲得している可能性を検証するため、ZnT4、ZnT5 と ZnT6 ならびに ZnT7 を再発現させたそれぞれの場合での、QKO 株における CAIX 活性を測定した。結果、QKO 株に ZnT4 を再発現させた場合のみならず、ZnT5 と ZnT6 をともに再発現させた場合、ZnT7 を再発現させた場合のいずれの場合においても低下した CAIX 活性は回復し、活性の回復に伴って高分子量領域に検出される CAIX タンパク質の発現も回復した (Fig. 4-2A-C)。一方、亜鉛輸送能を欠失させた変異型 ZnT (ZnT4_{H146A}、ZnT5_{H451A}、ZnT7_{H70A}) (12,16,17) を各々再発現させた場合では、CAIX 活性ならびに高分子量領域の CAIX タンパク質の発現は回復しなかった (Fig. 4-2A-C)。加えて、細胞培養液中への亜鉛添加を行った場合においても同様に、CAIX 活性ならびに高分子量領域の CAIX タンパク質の発現の回復は認められなかった (Fig. 4-2D)。以上の結果から、CAIX の活性化過程には、ZnT4 複合体に加え、ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体も寄与していること、各 ZnT 複合体を介して亜鉛が輸送されることが CAIX の活性化過程に必要であることが明らかとなり、3 つの経路の内、少なくともいずれか一つの経路を介すれば CAIX タンパク質に適切に亜鉛が配位される可能性が示された。

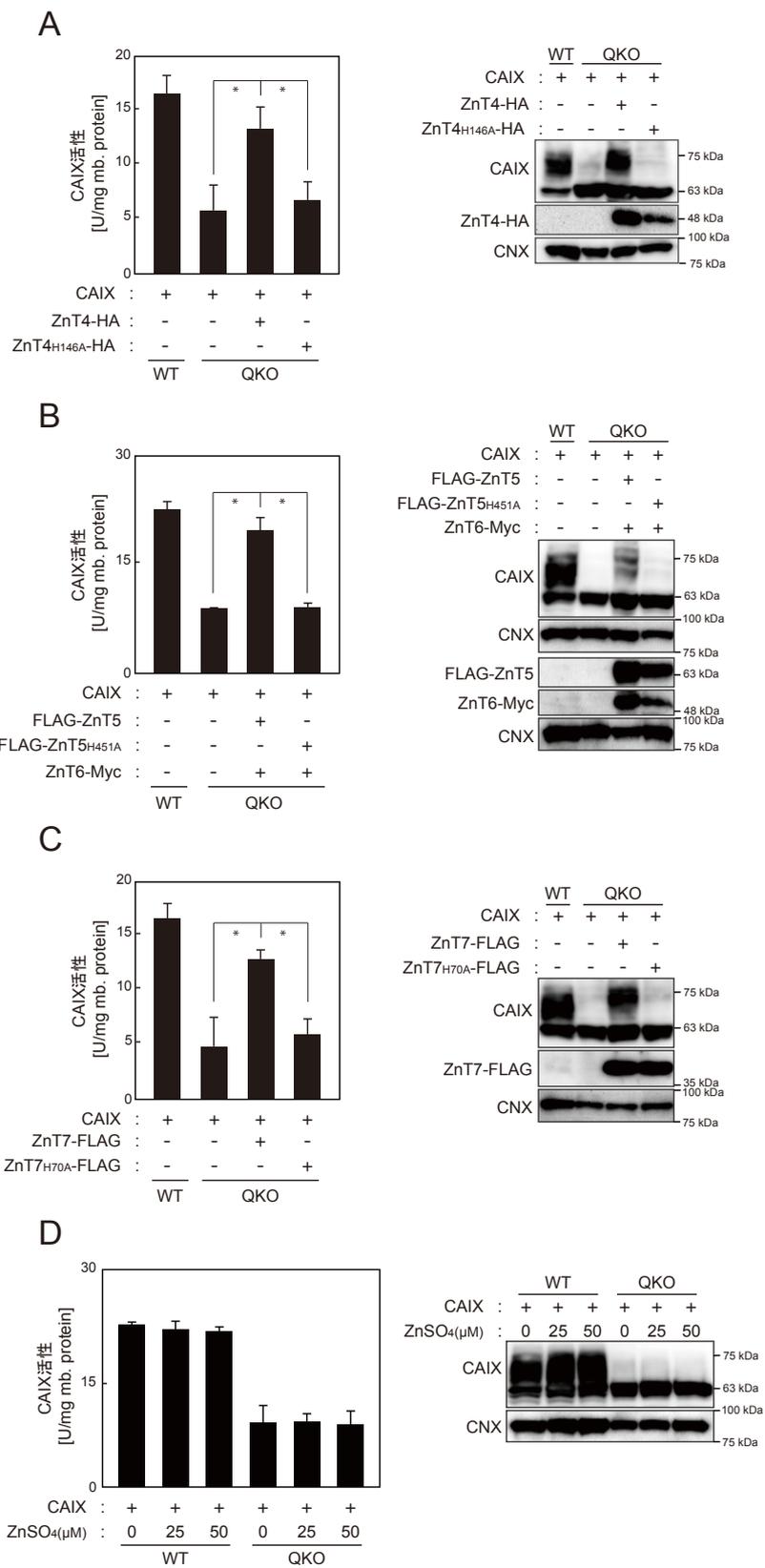


Figure 4-2. CAIX が活性を獲得するためには ZnT 複合体による亜鉛輸送が必須である

(次項へ続く)

(Figure legend 続き)

A-C, ZnT 再発現株における CAIX 活性及び CAIX タンパク質の発現。**D**, 亜鉛添加培地にて培養した WT 株及び QKO 株における CAIX 活性及び CAIX タンパク質の発現。**A~D** において、CAIX 活性の測定には 200 μ g の膜画分を用いた ($n=3$)。 **A-D** において、CAIX の発現及び ZnT4-HA、ZnT4_{H146A}-HA、FLAG-ZnT5、FLAG-ZnT5_{H451A}、ZnT6-Myc、ZnT7-FLAG、ZnT7_{H70A}-FLAG の発現は免疫ブロットイングによって確認し、ローディングコントロールとして CNX を用いた。

4-3. ZnT4 複合体は早期分泌経路において、ZnT5-ZnT6 複合体、ZnT7 複合体とともに CAIX の活性化過程に寄与する

ZnT5-ZnT6 複合体、ZnT7 複合体は、ゴルジ体内腔への亜鉛輸送に関与すると考えられている (9-12)。一方 ZnT4 は、ゴルジ体や分泌小胞をはじめとした分泌経路を構成する細胞小器官に加え、ライソソーム小胞やエンドソーム小胞内に亜鉛を輸送することが考えられている (17,45-47)。そこで ZnT4 が、早期分泌経路以外の場所で ZnT5-ZnT6、ZnT7 両複合体とは異なる機序によって CAIX の活性化過程に寄与している可能性について検討を行った。まず亜鉛蛍光試薬である Zinpyr-1 を用いて、QKO 株における細胞小器官内腔の亜鉛レベルを評価した (20,48)。結果、WT 株及び TKO 株と比較して、QKO 株における細胞小器官内腔の亜鉛レベルに顕著な違いは認められなかった (Fig. 4-3A)。すなわち、ZnT4 が QKO 株における細胞小器官内腔の亜鉛量に与える影響は小さいことが明らかとなった。また ZnT4 は、細胞質において ZnT1 及び MT と協調的に亜鉛動態を制御し、この ZnT1、MT、ZnT4 を介した細胞質亜鉛の制御が TNAP の適切な活性化に必須であることが報告されている (17)。この ZnT4 を介する同様の制御が、CAIX の活性化過程にも関与する可能性を検討するため、CAIX を安定発現させた ZnT1、MT、ZnT4 三重欠損株 (Δ 1M4 株)を用いて解析を行った。しかしながら、 Δ 1M4 株において内因性 TNAP 活性は低下する一方、CAIX 活性及び CAIX タンパク質の発現に変化は認められなかった (Fig. 4-3B and C)。すなわち、上記の細胞質における ZnT4 を介した細胞質亜鉛動態の制御は、CAIX 活性化過程には寄与していないことが明らかとなった。

最後に、TNAP の活性化に重要な役割を果たす PP-motif が ZnT4 には保存されていないことに着目し (16)、ZnT4 複合体と、PP-motif を有する ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体との間で、CAIX の活性化過程に対する寄与が異なるか否か検証した。ZnT5_{PP-AA} と ZnT6 とを共に再発現させた QKO 株を用いて解析を行った結果、CAIX 活性ならびに高分子量領域に検出される CAIX タンパク質の発現は、ZnT5 と ZnT6 とを共に再発現させた場合と同程度にまで回復した (Fig. 4-3D)。

この結果は、同一細胞株における内因性 TNAP の活性が ZnT5_{PP-AA} と ZnT6 の再発現ではほとんど回復しないという結果 (Fig. 4-3E)と対照的であり、TNAP の場合とは異なり、PP-motif が CAIX の活性化過程には必須ではないことが明らかとなった。すなわち ZnT4 複合体及び ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体を介した CAIX タンパク質への亜鉛配位には、PP-motif を介さない TNAP とは異なる機構が存在する可能性が示された。

以上 4-1. から 4-3. の解析によって、ZnT4 複合体は、ZnT5-ZnT6 複合体、ZnT7 複合体とともに早期分泌経路において CAIX への亜鉛配位に寄与していることが示された。また、ZnT4 複合体、ZnT5-ZnT6 複合体、および ZnT7 複体のうち、少なくともいずれか一つの経路を介して亜鉛が輸送されることで、CAIX タンパク質へと適切に亜鉛が配位されることが示唆された。一方、各 ZnT 複合体を介して輸送された亜鉛の配位に関しては、TNAP とは異なり、PP-motif が関与しない機構が働いている可能性が示された。

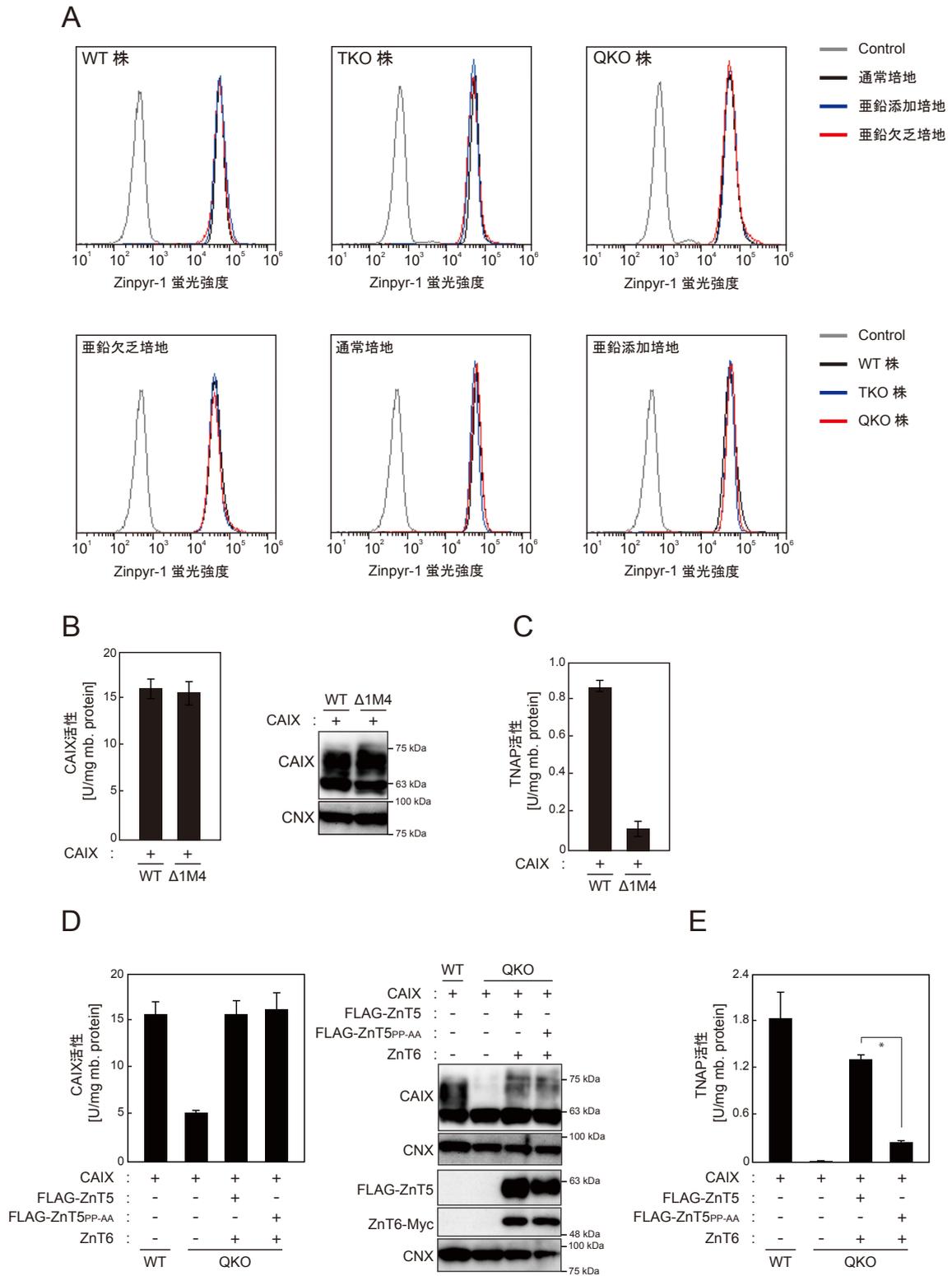


Figure 4-3. ZnT4 複合体は早期分泌経路において CAIX の活性化過程に寄与する

(次項へ続く)

(Figure legend 続き)

A, フローサイトメトリーを用いた細胞小器官内腔における亜鉛レベルの評価。各細胞株は、亜鉛欠乏培地、通常培地、亜鉛添加培地 (終濃度 50 μM ZnSO_4) の各々の培地で 48 時間培養したものを、5 μM の Zinpyr-1 で処理した。各々のヒストグラムは約 20,000 の細胞数を基に作成し、上部 3 つのヒストグラムには、WT 株、TKO 株、QKO 株における解析結果を、下部 3 つのヒストグラムには、亜鉛欠乏培地、通常培地、亜鉛添加培地で培養した各細胞株における解析結果を示した。なおコントロールは、Zinpyr-1 処理を行わなかった WT 株の解析結果を示した (Control)。**B**, $\Delta 1M4$ 株における CAIX 活性及び CAIX タンパク質の発現。**C**, **B** で用いた細胞株における TNAP 活性。**D**, ZnT5 及び ZnT5_{PP-AA} の再発現株における CAIX 活性及び CAIX タンパク質の発現。**E**, **D** で用いた細胞株における TNAP 活性。**B**, **D** において、CAIX 活性の測定には 200 μg の膜画分を用いた ($n=3$)。CAIX の発現及び FLAG-ZnT5、FLAG-ZnT5_{PP-AA}、ZnT6-Myc の発現は免疫ブロットイングによって確認し、ローディングコントロールとして CNX を用いた。**C**, **E** において、TNAP 活性の測定には 2 μg の膜画分をそれぞれ用いた ($n=3$)。

考察

これまでの TNAP の活性化過程に関する知見から、一般に、分泌型亜鉛要求性酵素は早期分泌経路において ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体を介した亜鉛配位によって亜鉛を獲得し、酵素活性を呈するようになると予想されている (7,8) (Fig. 5-1)。TNAP 以外の亜鉛要求性酵素に関しては、活性化に関わる報告がわずかになされてはいるものの、活性化過程の詳細な分子機構に関してはほとんど明らかとなっていないのが現状である (45,49)。本研究では、ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体が、TNAP 以外の 3 つのがん促進性分泌型亜鉛要求性酵素 ATX、MMP9、CAIX の活性化過程に寄与することを明らかとした (Fig. 5-2)。加えて、各酵素の活性化過程における ZnT 複合体の作用機序が酵素によって異なっていることも明らかとした。本成果から、ZnT 複合体を介した分泌型亜鉛要求性酵素の活性化過程に関する分子機構の一端や、ZnT トランスポーターの生理機能の新たな一面が示されたのみならず、ATX や MMP9、CAIX や各々の活性化過程を標的としたがん治療、がん予防法の新規構築に繋がると期待される知見が提示された。

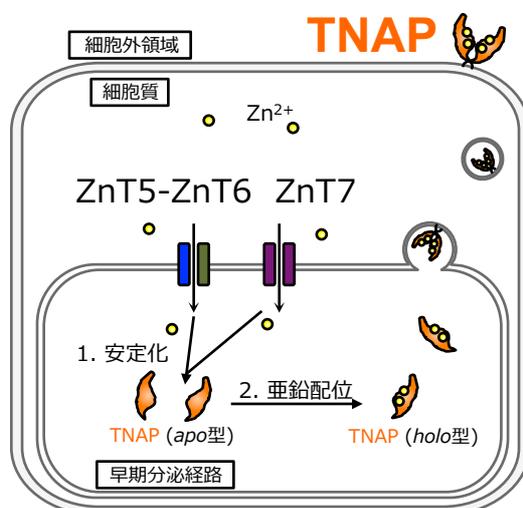


Figure 5-1. 早期分泌経路における ZnT 複合体を介した TNAP の活性化過程のモデル図
早期分泌経路に局在する ZnT5-ZnT6 ヘテロ二量体 (ZnT5-ZnT6 複合体)、ZnT7 ホモ二量体 (ZnT7 複合体)は、TNAP の活性化過程に必須である。両複合体は、亜鉛が配位していない TNAP タンパク質 (apo 型 TNAP タンパク質)の安定化、ならびに亜鉛の apo 型 TNAP タンパク質への配位に寄与する。apo 型 TNAP タンパク質は速やかに分解される。なお亜鉛イオンを黄色の円で示す。

ATX の活性化過程

ATX の活性中心における亜鉛の配位形態は、TNAP のものとよく似ていることが明らかとなっている (8,14)。両酵素の活性中心に配位した 2 つの亜鉛イオンは、片方が 2 つの His 残基と 1 つの Asp 残基、もう片方が 1 つの His 残基と 2 つの Asp 残基と配位結合を形成している (8)。従って、ATX の活性化過程には TNAP の場合と同様、ZnT5-ZnT6 複合体、ZnT7 複合体が寄与している可能性が強く示唆される。実際に本研究によって、ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体が ATX の活性化過程に必須であり、*apo* 型 ATX タンパク質への亜鉛配位過程に寄与している可能性が示されている。一方、ZnT 複合体の作用機序は、TNAP と ATX との間でわずかに異なる点が認められる。ZnT5-ZnT6 複合体と ZnT7 複合体が欠損した場合、*apo* 型 TNAP タンパク質が速やかに分解されるのに対し (12)、*apo* 型 ATX タンパク質は分解されず、細胞外に分泌される (Fig. 5-2A)。この違いは、両酵素間で、タンパク質の活性中心に亜鉛が配位する前に受けるタンパク質の成熟過程に何らかの差異があるために生じていると予想される。この可能性の一つとして、糖鎖修飾の影響が考えられる。一般に、*N*-型糖鎖修飾によって、被修飾タンパク質の安定性や酵素活性、細胞外への分泌過程が複雑の制御されることが知られている (50,51)。ATX と比較して、TNAP には多くの *N*-型糖鎖修飾部位があるため、TNAP タンパク質の成熟過程は、ZnT 複合体を介してより厳密に制御されている可能性が考えられる。

MMP9 の活性化過程

MMP9 に関しても、TNAP や ATX と同様、その活性化過程に ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体が寄与している。しかしながら、ZnT 複合体の作用機序に関しては、TNAP や ATX の活性化過程における機序とは顕著に異なっており、ZnT 複合体は MMP9 タンパク質の分泌過程や細胞内における成熟過程の制御に関与する (Fig. 5-2B)。また亜鉛通常条件下においては、ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体が MMP9 の成熟・分泌過程に寄与する主要な因子であることが考えられるが、亜鉛過剰条件下においては、両複合体以外の経路を介して分泌経路内に輸送された亜鉛が MMP9 への亜鉛配位や成熟・分泌過程に寄与していることが予想される。前立腺がん細胞や乳がん細胞などといった幾つかのがん由来細胞株においては、細胞質に亜鉛を輸送する ZIP トランスポーターの発現が亢進し、それに伴う細胞質亜鉛レベルの上昇が認められることから (52-58)、このような

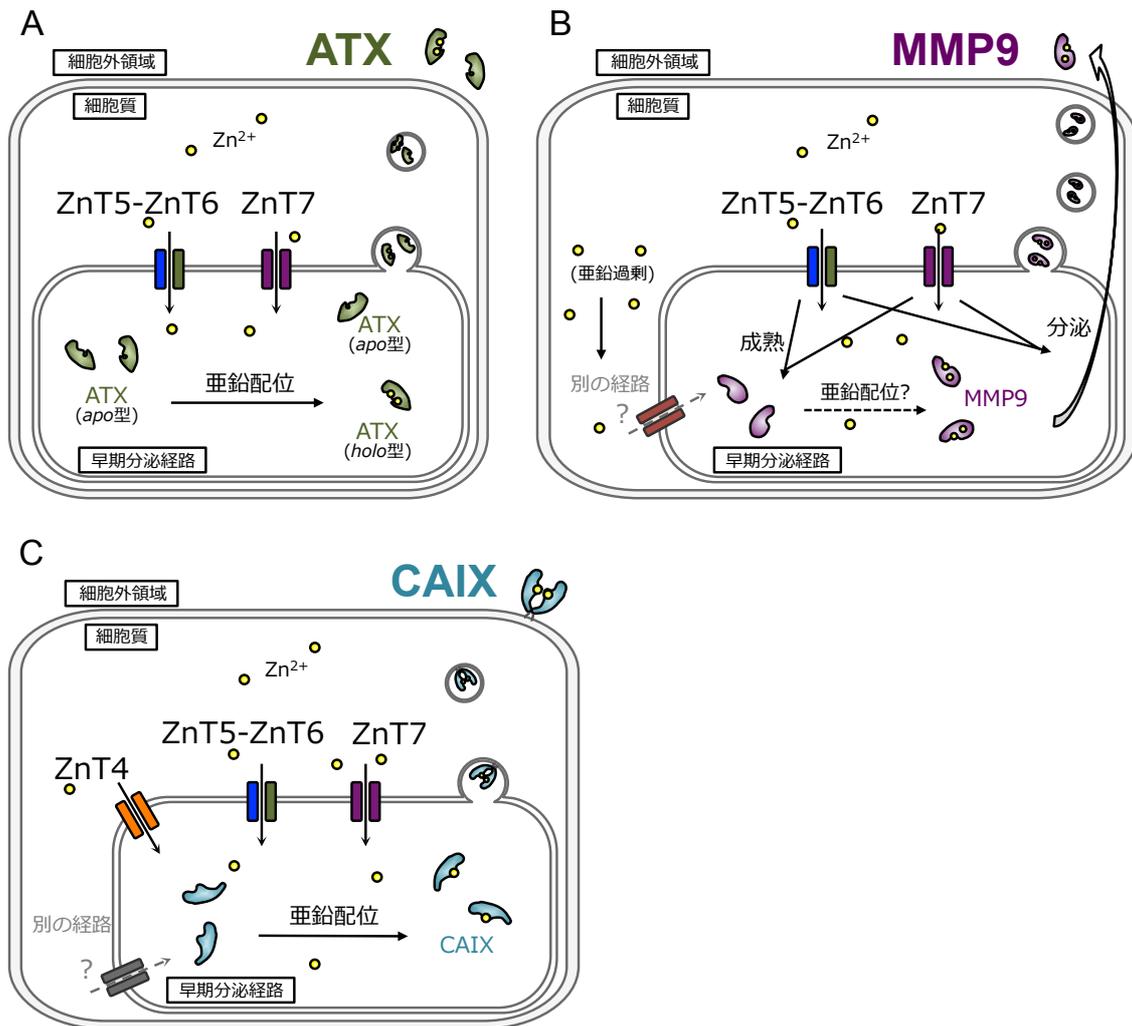


Figure 5-2. 早期分泌経路における ATX、MMP9、CAIX の ZnT 複合体を介した活性化過程のモデル図

ZnT5-ZnT6 ヘテロ二量体 (ZnT5-ZnT6 複合体)、ZnT7 ホモ二量体 (ZnT7 複合体)、ZnT4 ホモ複合体 (ZnT4 複合体)は早期分泌経路に局在する。ATX、MMP9、CAIX 各酵素の活性化過程における ZnT 複合体の作用機序はそれぞれ異なる。**A**, ATX の活性化過程。TNAP の場合と同様、TNAP の活性化過程には ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体が必須である。ただし apo 型 ATX タンパク質は安定的に細胞外に分泌される。**B**, MMP9 の活性化過程。ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体は、MMP9 タンパク質の適切な成熟ならびに細胞外への分泌に寄与する。しかし亜鉛過剰条件下では、ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体以外の経路が早期分泌経路内への亜鉛供給経路として機能することで、MMP9 タンパク質の成熟ならびに分泌に寄与している可能性がある。この場合、ZnT4 複合体がその候補因子の一つとして考えられる。**C**, CAIX の活性化過程。CAIX は異なる 2 つの機構によって亜鉛を獲得している。図には、高分子量領域に検出される亜鉛応答性の高い CAIX タンパク質に関するモデルを示す。高分子量領域に検出される CAIX タンパク質への亜鉛配位には、ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体に加えて ZnT4 複合体が寄与している。一方、これら ZnT 複合体は、低分子両側に検出される亜鉛応答性の低い CAIX タンパク質への亜鉛配位には機能しない。この場合、他の亜鉛輸送タンパク質が、CAIX タンパク質への亜鉛供給経路として機能している可能性が考えられる。亜鉛イオンを黄色の円で示す (A-C)。

がん細胞では、MMP9 の発現や分泌が亢進することによって、がん細胞の浸潤・転移能がより増強されている可能性が考えられる。亜鉛過剰条件下での MMP9 の活性化過程に寄与する可能性がある因子の一つとして、ZnT4 複合体が挙げられる。しかし本研究では、MMP9 を安定発現させた QKO 株を樹立することができず、この可能性について詳細に検討することはできなかった。また MMP2 に関しても、MMP9 と同様の ZnT 複合体による制御を受けていることが予想されるが、本研究では詳細な解析を実施できなかった。MMP9 や MMP2 が、がん治療の主要な標的因子であることを考慮すると、今後の解析を通じて両酵素の ZnT 複合体を介した活性化過程がより詳細に明らかにされることが望まれる。

ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体を介した MMP9 の活性化過程において、両複合体は MMP9 タンパク質の細胞外への分泌と細胞内におけるタンパク質切断に関与する。MMP9 タンパク質は、細胞内においてタンパク質切断を受け、おおよそ 90 kDa から 80 kDa のタンパク質に変化し、この変化は MMP9 タンパク質の分泌過程の制御に関与することが示唆される。また、このタンパク質分解は Bafilomycin A1 処理によって抑制されることから、正常に細胞外に分泌されない未成熟な MMP9 タンパク質や、ミスフォールドされた MMP9 タンパク質が、ライソソームで速やかにタンパク質切断を受けている可能性が考えられる。すなわち、ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体は、正しくフォールディングされた成熟 MMP9 タンパク質のみを適切に細胞外に分泌するためのクオリティーコントロールシステムの制御に寄与しており、タンパク質生合成過程で生じた異常な MMP9 タンパク質は、タンパク質切断を受けた後に分解、除去されていると予想される。この場合、ZnT 複合体の作用機序の一つの可能性として、MMP9 タンパク質の切断に関わる亜鉛要求性プロテアーゼへの亜鉛配位に関与していることがあげられる。MMP9 タンパク質は、種々のプロテアーゼによって認識される複数のタンパク質切断箇所を有することが知られており、その中には MMP3 などの亜鉛要求性酵素も含まれる (36)。従って ZnT 複合体が、MMP9 タンパク質の切断に関与する何らかのライソソーム局在型亜鉛要求性プロテアーゼへの亜鉛配位に寄与している可能性は十分に考えられる。今後の解析によって、上記クオリティーコントロールシステムの分子機構や、MMP9 タンパク質の切断に関わる亜鉛要求性プロテアーゼの存在が明らかとなれば、MMP9 を標的として、がんの浸潤・転移を抑制する新規治療戦略を構築する上でも重要な知見となることが期待される。

CAIX の活性化過程

前述の ATX や MMP9 の ZnT 複合体を介した活性化過程と比較して、CAIX の活性化過程には特徴的な違いが幾つか見受けられる。まず一つ目は、亜鉛通常条件下においても、CAIX タンパク質が独立した 2 つ (以上)の機構を介して活性中心に亜鉛が配位している点である。CAIX の活性化過程には、ZnT5-ZnT6 複合体、ZnT7 複合体に加えて、ZnT4 複合体が寄与する (Fig. 5-2C)。CAIX タンパク質のうち、70-75 kDa 付近の高分子領域に検出される亜鉛応答性の高い CAIX タンパク質には上記の 3 つの経路を介した機構によって亜鉛が配位される。一方、60 kDa 付近の低分子量側に検出される亜鉛応答性の低い CAIX タンパク質には、上記 3 経路以外の別の独立した経路を介した機構によって亜鉛が配位されることが予想される。後述の亜鉛配位機構に関して、本研究では詳細な解析を行っていないが、早期分泌経路で機能する他の亜鉛輸送タンパク質やチャンネルタンパク質 (5)が重要な役割を果たしていることが予想される。加えて、ZnT 複合体を介して輸送された亜鉛、もしくは ZnT 複合体を介した CAIX タンパク質への亜鉛配位が、高分子領域に検出される CAIX タンパク質の発現にどのように寄与しているのかという点に関しても、その詳細は明らかにできていない。しかしながら、*O*-結合型糖鎖切断酵素を処理しても、WT 株において検出される高分子領域の CAIX タンパク質のバンドは消失しないことや (Fig. 5-3A)、*N*-結合型糖鎖切断酵素で処理した場合には、CAIX タンパク質のバンドが全体的に 5 kDa 程度低分子量側にシフトする一方、WT 株における高分子領域の CAIX タンパク質のバンドは消失しないことを明らかにしている (Fig. 5-3B)。加えて、タンパク質分解系の阻害剤である MG132 及び Bafilomycin A1 で処理した場合においても、QKO 株において消失した高分子領域の CAIX タンパク質の発現は回復しないことを確認している (Fig. 5-3C)。すなわち、高分子領域に検出される CAIX タンパク質の消失は、*N*-結合型糖鎖修飾や *O*-結合型糖鎖修飾の不備によるものではないということが考えられる。加えて、高分子量領域に検出される CAIX タンパク質は、QKO 株においてプロテアソームやライソソームを介して分解を受けているのではないということも予想される (Fig. 5-3C)。一部の腎臓がん患者の尿中において、同じようなサイズの CAIX タンパク質が高分子量領域に検出されることが報告されており(43,44)、高分子量領域に検出される CAIX タンパク質の亜鉛応答性に関してより詳細な情報が得られれば、CAIX を標的としたがん治療に有用な知見となることが期待される。

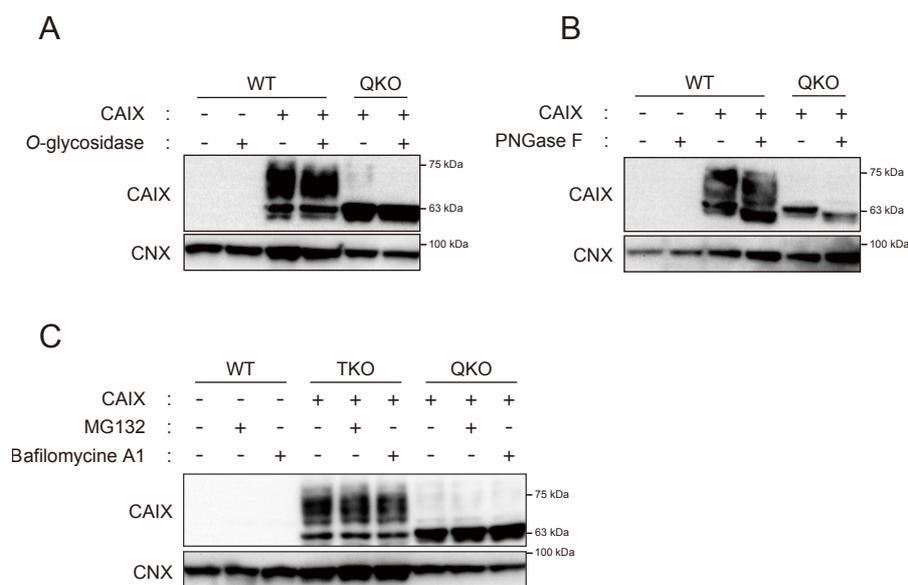


Figure 5-3. 糖鎖切断酵素ならびにタンパク質分解系阻害剤処理した際の CAIX タンパク質の発現変化

A and B, *O*-結合型糖鎖切断酵素及び *N*-結合型糖鎖切断酵素で処理した CAIX タンパク質のイムノブロットの結果。 (**B**). **C,** MG132 及び Bafilomycin A1 処理した細胞株における CAIX タンパク質の発現。ローディングコントロールとして CNX を用いた。

そして二つ目は、ZnT4 複合体が、ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体と早期分泌経路における CAIX の活性化過程に等価に寄与している点である (Fig. 5-2C)。ZnT4 複合体は、細胞質における亜鉛動態の制御を介して TNAP の活性化過程に寄与するが、早期分泌経路における TNAP の活性化過程には関与しない (12)。その一方で、ZnT4 複合体は細胞質ではなく、早期分泌経路において CAIX の活性化過程に寄与する。すなわち、ZnT4 複合体の作用機序は TNAP と CAIX との間では異なっていると考えられる。ZnT4 複合体が早期分泌経路において ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体と等価に CAIX タンパク質への亜鉛配位に寄与できる理由の一つとして、DT40 細胞において、ZnT4 複合体が ZnT5-ZnT6 複合体や ZnT7 複合体のように、ゴルジ体に局在することがあげられる。ZnT4 が亜鉛-プロトン交換輸送体と考えられること (59,60)、ゴルジ体内腔の pH が 6.0-6.7 と推察されていること (61)からも、ZnT4 複合体が細胞質からゴルジ体内腔に亜鉛を輸送する経路として機能することが予想される。また、早期分泌経路において TNAP の活性化過程に必要な PP-motif を介した制御機構が、CAIX の活性化過程には必要ではないことも、ZnT4 複合体が CAIX タンパク質への亜鉛配位に等価に寄与するもう一つの理由として考えられる。加えて、QKO

株における CAIX 活性が細胞培養液中への単純な亜鉛添加では回復しないことから、CAIX タンパク質への亜鉛配位が ZnT 複合体を介した何らかの分子機構によって厳密な制御されていることが推察される。実際に、分泌小胞において機能すると考えられている ZnT2 や、ゴルジ局在型の ZnT2 変異体である ZnT2_{L23P} および ZnT2_{R340C} (62)を用いた解析からは、ZnT2 が、ZnT4 と似たような機能を発揮する ZnT であるにも関わらず (17)、ZnT2 や変異型 ZnT2 を発現させたいずれの場合においても QKO 株において低下した CAIX 活性と高分子量領域の CAIX タンパク質の発現は回復しないことが確認できている (Fig. 5-4)。すなわち、CAIX への亜鉛配位は、ZnT4、ZnT5-ZnT6、および ZnT7 複合体を介して厳密に制御されており、亜鉛配位に関わる ZnT 複合体に関して何らかの選択性がある可能性が考えられた。近年、一アミノ酸残基を置換するだけでも ZnT トランスポーターの金属輸送能に大きな変化が生じると報告されていることから (21,63,64)、TNAP の場合における PP-motif のように (17)、ZnT4 複合体、ZnT5-ZnT6 複合体、ZnT7 複合体の細胞小器官内腔側に位置し、他の ZnT に保存されていない特定のアミノ酸残基 (配列)が、CAIX タンパク質への亜鉛配位に重要な役割を果たしているのかもしれない。

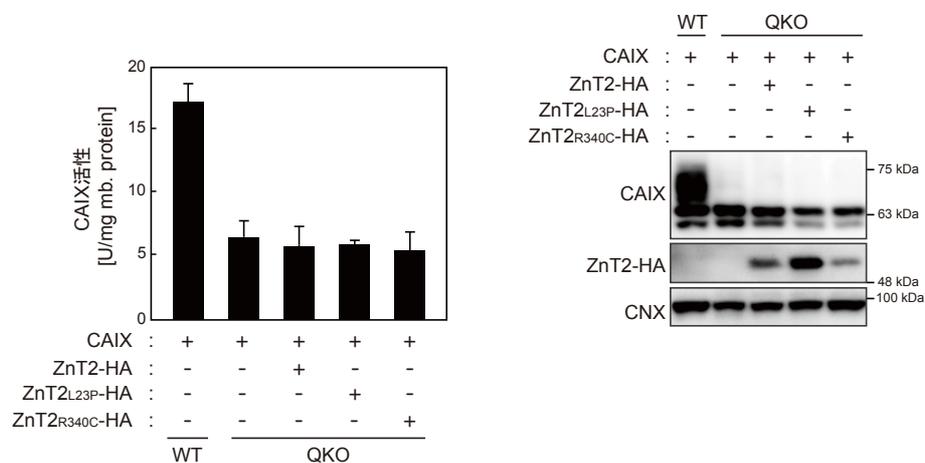


Figure 5-4. CAIX 発現 QKO 株において ZnT2 の再発現が CAIX 活性に与える影響

野生型 ZnT2 ならびにゴルジ局在型 ZnT2 の再発現株における CAIX 活性及び CAIX タンパク質の発現。ローディングコントロールとして CNX を用いた。

ZnT 複合体が有する、がん治療の標的因子としての可能性

これまでに、ZIP トランスポーターの発現亢進や機能破綻が、がんの進行と密接に関連することは数多く報告されている一方で、がんの進行と ZnT トランスポーターとの関連性を直接示した報告はほとんどなされていない (52-58)。しかし、前立腺がん細胞株において、*ZnT5* 及び *ZnT7* mRNA の発現量が増加しているとの報告もなされていることから (65)、ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体が、ある状況下においては、潜在的ながん促進性因子として機能していることが推察される。またこれまでも、上記の 3 つのがん促進性分泌型亜鉛要求性酵素を標的とした抗がん剤の開発が数多く試みられてはいるが、その作用機序の複雑さや副作用の面から実用化には至っておらず (24-29)、これら酵素やその活性化過程に関するより深く新しい知見の蓄積が求められている。従って、ATX、MMP9、CAIX の活性化過程における ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体の作用機序が、各々の酵素によって全く異なるという本研究の知見をふまえると、今後、両複合体が抗がん剤開発における新規標的因子として着目されるようになると思われる。CAIX に限っては、ZnT4 複合体がその活性化過程に寄与するため、ZnT4 を発現しないようながん細胞において、ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 複合体が有用な標的因子となり得る。

総括

がん促進性分泌型亜鉛要求性酵素である ATX、MMP9、CAIX の活性化過程には、TNAP の場合と同様、ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体が寄与しており、CAIX の活性化過程に関しては、ZnT5-ZnT6 複合体及び ZnT7 複合体のみならず、ZnT4 複合体が重要な役割を果たしている。ATX、MMP9、CAIX 各酵素の活性化過程における ZnT 複合体の作用機序は、TNAP も含め、各々の酵素によって異なっており、その活性化過程には各酵素に特徴的な分子機構が働いていることが予想される。本成果は、ZnT 複合体が、早期分泌経路において酵素タンパク質への亜鉛配位や酵素タンパク質の成熟・分泌過程の制御を通じたがん促進性分泌型亜鉛要求性酵素の活性化過程に関与していることを示した初めての例であり、亜鉛や亜鉛トランスポーターの生理機能に関する理解を深めるうえで重要な知見となる。また、本成果は、ATX、MMP9、CAIX の 3 つの酵素の活性化過程に関わる ZnT 複合体が、がん治療の潜在的な標的因子となる可能性を示している。ATX、MMP9、CAIX の 3 つの酵素が、がん治療の有力な標的因子として注目されていることをふまえると、本知見は、がんの進行や浸潤、転移を

効果的に抑制するための阻害剤や治療法の新規考案に繋がる有用な情報となることが期待される。

分泌型亜鉛要求性酵素の中には、本研究で着目した ATX、MMP9、CAIX 以外にも、疾患の発症や進行に関わるものが数多く存在している。それら酵素の機能解析や活性化過程の解明は生理学的にも病理学的にも非常に重要な課題であり、本研究で実施した DT40 細胞を用いた遺伝子欠損-発現系による解析は、上記課題に取り組む上で有用なアプローチであると考えられる。今後の解析によって、ATX、MMP9、CAIX をはじめ、疾患に関与する分泌型亜鉛要求性酵素の活性化過程における ZnT 複合体の生理機能や作用機序がよりいっそう明らかとなり、疾患の予防や治療に繋がる数多くの知見が創出されることに期待したい。

材料ならびに手法

細胞培養ならびに遺伝子導入

ニワトリ B リンパ由来 DT40 細胞株の培養及び遺伝子導入は、以前に報告された手法に則って実施した (22)。10% Fetal bovine serum (FBS) (Multiser), 1% chicken serum (gibco), 0.1% 2-mercaptoethanol, 100 unit/ml penicillin・100 µg/ml streptomycin (nacalai tesque)に調製した RPMI 1640 培地 (nacalai tesque)を用いて、39.5°C, 5.0% CO₂ 条件下して継代培養を行った。なお FBS は非働化 (56°C, 30 分 インキュベート)したものを用いた。遺伝子導入はエレクトロポレーション法によって行い、 1.0×10^7 個の細胞ならびに、適した制限酵素にて直鎖状にした 30 µg の標的遺伝子プラスミドを用い、GenePulser Xcell™ (Bio-Rad)にて 550V, 25 µF もしくは 600V, 25 µF の条件でトランスフェクションした。遺伝子導入された細胞株は 96 well プレートに播種し、薬剤耐性を獲得して生育した細胞株を選択して解析に用いた。なお細胞株毎に独立した 3 つ以上のクローン株を樹立し、薬剤による細胞株のセレクションには、終濃度 0.5 mg/ml Puromycin (InvivoGen)、2 mg/ml Geneticin: G418 (Roche)、0.3 mg/ml Zeocin (InvivoGen)、25 µg /ml Mycophenolic acid (Sigma)、25 µg/ml Blasticidin (InvivoGen)、1 mg/ml Histidinol (Sigma)のいずれかの薬剤を用いた。亜鉛欠乏培地の調製は、Chelex-resin 100 (Bio-Rad)にて処理した FBS 及び chicken serum を用いて行った (66)。また、血清非含有培地は FBS と chicken serum を用いずに調製した。

プラスミドコンストラクション

FLAG、HA、Myc タグを融合した human ZnT2、ZnT4、ZnT5、ZnT6、ZnT7 (ZnT2-HA、ZnT4-HA、ZnT4_{H146A}-HA、FLAG-ZnT5、FLAG-ZnT5_{PP-AA}、ZnT6-HA、ZnT6-Myc、ZnT7-FLAG、ZnT7-HA) 発現用プラスミドは以前に作成されたものを用いた (12,16,17,20)。HA タグ融合 human ZnT2 変異体(ZnT2_{L23P}-HA、ZnT2_{R340C}-HA)、FLAG タグ融合 human ZnT4 (ZnT4-FLAG)、及び FLAG タグ融合 human ZnT7_{H70A} (hZnT7_{H70A}-FLAG) 発現用プラスミドは 2 step PCR 法によって作成した。また、human ATX、CAIX、MMP2、MMP9 発現用プラスミドは、各々の cDNA を pA-Puro もしくは pA-Neo ベクターに挿入して作成した (22)。なお human ATX cDNA は、DNAFORM (Tokyo, Japan) (<http://www.dnaform.jp/ja/>)にて購入し、PCR 法によって stop コドン配列を付加したのものを用いた。Human CAIX

cDNA は、Johanna Chiche 博士 (Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, France)から供与していただいたもの、human MMP2 cDNA は佐藤博 博士 (がん進展制御研究所、金沢大学)から供与していただいたものを用い、human MMP9 cDNA は、GE Healthcare (<http://dharmacon.gelifesciences.com>) にて購入したものを用いた。全てのプラスミドは、適した制限酵素にて直鎖状にしたものを用いた (22)。

ZnT4, ZnT5, ZnT6, ZnT7 四重欠損 DT40 細胞株の樹立

ZnT5、ZnT6、ZnT7 を欠損した TKO 細胞における Blasticidin 耐性遺伝子及び、Histidinol 耐性遺伝子を 4-hydroxytamoxifen (Sigma)処理にて除去し、薬剤感受性を有する TKO 株を樹立した (9,17)。以前に作成した cZnT4 ノックアウトベクター (12)を、薬剤感受性を有する TKO 株に順次トランスフェクションして cZnT4 を欠損させた。

RT-PCR 解析

mRNA は、 6.0×10^6 個の DT40 細胞を用い、Sepasol I (nacalai tesque)によって回収した。1 μ g の mRNA をテンプレートとし、ReverTra Ace (Toyobo)を用いて逆転写反応を行った。得られた cDNA をテンプレートとし、KOD Plus polymerase (Toyobo)を用いて PCR 反応を行った。なお、次項 Table 1 に解析で用いた各々のプライマーを示す。

細胞全タンパク質サンプルの調製

Phosphate buffered saline (PBS)にて洗浄した細胞を、解析に応じて適した可溶化液にて懸濁し、超音波ホモジナイザー処理にて細胞を破碎、細胞全タンパク質を可溶化した。可溶化液を 4°C、15,000 rpm で 5 分間遠心し、その上清を細胞全タンパク質サンプルとして解析に用いた。タンパク質濃度の定量化には、Protein Assay CBB Solution (nacalai tesque)あるいは DCTM Protein assay Kit (Bio-Rad)のいずれかを用い、検量線の作成には bovine serum albumin (BSA)もしくは bovine γ -globulin を使用した。

Table.1 解析に用いたプライマー

遺伝子名		プライマー塩基配列 (5' to 3')	PCR 産物 全長(bp)	サイクル数
<i>cZnT2</i>	Forward	TCTATGTGGCTGCTGGCATCTGCCTCATCT	570	34
	Reverse	AGAAGAGGAAGGTGCAGATGGGGTCCACAT		
<i>cZnT3</i>	Forward	ATGGAAGGAGCCCCGCGGGAATGGCAGTG	288	34
	Reverse	TCATGCCAGAGGGTTGTGGCCGTGTGGGCA		
<i>cZnT4</i>	Forward	GCCGCCGCCGTCTCTATCTGCTCTTCATG	954	28
	Reverse	GGCACTGGAACTCTGACAACCTGCGCAGGC		
<i>cZnT5</i>	Forward	GCTGTTTGAACACAGTGATGTGGTTGTGCT	778	28
	Reverse	AGTGCCTTCAGGAGAATAGCCAATAAGGGT		
<i>cZnT6</i>	Forward	TTCCGGTGCGGGGAGTACTATGGGGACAAT	905	34
	Reverse	CGGACATGGACCGATCCAGCCAAAGTGCCA		
<i>cZnT7</i>	Forward	ATGCTGCCCTCTCCATTAAGGACGATGAG	1137	34
	Reverse	CTACATGGCTGCAACATCAATTTGTATGTA		
<i>cZnT8</i>	Forward	ATGGTGACTGGTGTGCTGACGTATTTGGCT	630	34
	Reverse	GAATGGTGATGGAGTGGAAGCTGTAGTGCT		
<i>cATX</i>	Forward	TTTAGGAGGTCTGAAGAATGGGATGAGGGC	746	40
	Reverse	GGATGACAACAGACCAGAAGAATGTGCCAG		
<i>cCAII</i>	Forward	ACGAGCACTTCCCCATCGCCAATGGGGAGC	561	40
	Reverse	CATGCAGTGGTGGAGTAGTCAGGGAGCCAG		
<i>cCAIV</i>	Forward	CCAAGCTGTGAAGACCTCGACACTGGCAT	701	40
	Reverse	TTCTTCCCTTCGAAGTGAAGTGTGAGAAA		
<i>cCAVI</i>	Forward	ACCTACCGAGAGGGCGAGCTGGATGAAGAG	800	40
	Reverse	TGGCTGGCATTGTTCTTGTGTTGGGCCTGGC		
<i>cCAIX</i>	Forward	ACACGGAGACGACCATCTCAGCCCCCAGC	788	38
	Reverse	CACTCCGAATAGCACAGCAAGCACATCCCC		
<i>cCAXII</i>	Forward	TCTTCCTGAAGATACTACTCTCAGTACCAG	541	40
	Reverse	TATTCACATTCCGGAAGTGCCTGAAGATC		
<i>cβActin</i>	Forward	GATCATGTTTGAGACCTTCAACACCCAGC	685	27
	Reverse	TGCTGATCCACATCTGCTGGAAGGTGGACA		

膜タンパク質サンプルの調製

PBS にて洗浄した細胞を、0.25 M HES buffer (0.25 M sucrose, 20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA))にて再懸濁し、ガラスホモジナイザーにて破碎した。破碎液を、スイングローターを用いて 4°C, 5,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を回収、さらにスイングローターを用いて 4°C, 15,000 rpm で 40 分間遠心した。得られた沈殿を PBS にて洗浄し、膜タンパク質ペレットとした。膜タンパク質ペレットは解析に応じて適した可溶化液にて溶解し、4°C、15,000 rpm で 5 分間遠心し、その上清を解析に用いた。タンパク質濃度の定量化には、Protein Assay CBB Solution (nacalai tesque)あるいは DCTM Protein assay Kit (Bio-Rad)のいずれかを用い、検量線の作成には BSA もしくは bovine γ -globulin を使用した。なお *N*-結合型糖鎖、及び *O*-結合型糖鎖の切断には可溶化した 15 μ g 分の膜タンパク質を用い、PNGase F (NEB)、及び *O*-Glycosidase & Neuraminidase Bundle (NEB) 処理を行ったものをサンプルとして用いた。

TNAP 活性の測定

TNAP 活性の測定は、以前に報告された手法を参考に実施した (17,22)。細胞から回収した膜タンパク質を ALP lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100)にて可溶化した。調製した膜タンパク質サンプルを 96 well プレーットの各 well に添加し、そこへ基質溶液 (2 mg/ml *p*-NPP, 1 M diethanolamine (DTT), 0.5 M MgCl₂, pH 9.8)を 100 μ l/well となるよう分注して発色を行った。iMarkTM microplate reader (Bio-Rad)にて 405 nm の吸光度を測定し、その値を基に定量化を行った。なお活性測定には 2-5 μ g 分の膜タンパク質を用い、検量線の作成には calf intestinal alkaline phosphatase (Promega)を用いた。

ATX 活性の測定

ATX 活性の測定には、文献 (31,67,68)を参考として確立した比色法を用いた。ATX lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, and 0.1% Triton X-100)にて可溶化した 10 μ g の膜タンパク質を、96 well プレーット上にて 10 分間室温でインキュベートした。次に基質溶液として、2 mM LPC を含む ATX lysis buffer を 100 μ l/well ずつアプライし、37°C で 6 時間インキュベートして酵素反応を行い、LPA と choline を得た。その後、二次反応溶液 (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA (nacalai tesque), 2 mM 4-aminoantipyrine (Sigma), 2 mM TOOS

reagent (Dojindo), 100 mU peroxidase (Sigma), 100 mU choline oxidase (Wako))を 100 μ l/well ずつアプライし、5-20 分の間 37°C でインキュベートした。上記反応において、choline を基質として生成されたキノンイミン色素の 555 nm における吸光度を Plate Reader Powerscan4 (DS pharma)にて測定し、その値を基に定量化を行った。なお検量線の作成には、Phospholipase D from *Arachis hypogaea* (Sigma) を用いた。

MMP9 及び MMP2 活性の検出

MMP9 及び MMP2 活性の検出には、文献 (69)を参考としたゼラチンザイモグラフィ法を用いた。MMP9 活性の検出には、 2.0×10^6 個の細胞を 4 時間培養した 500 μ l の血清非含有培地から回収した細胞培養液上清を用いた。回収した上清 16 μ l に、非還元 6 \times SDS sample buffer (0.35 M Tris-HCl pH 6.8, 10% sodium dodecyl sulfate (SDS), 30% glycerol) 4 μ l を添加、37°C で 20 分インキュベートした後、0.12%ゼラチン含有 6% poly acrylamide gel を用いて 4°C, 10 mA/gel の条件で電気泳動を行った。泳動後のゲルを、washing buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 2.5% Triton X-100) を用いて室温で 1 時間振とうした後、re-naturing buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM CaCl₂, 0.02% NaN₃)を用いて 37°C で 18 時間振とうした。その後、ゲルを染色液 (10% ethanol, 5% acetic acid, 0.25% Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB))にて 1 時間室温にて染色し、脱色液 (50% ethanol, 10% acetic acid)にて数回洗浄した後、LAS1000 Plus image analyzer (Fujifilm)を用いて画像の撮影を行った。MMP2 活性の検出には、解析条件に若干の修正を加えた。細胞は 4.0×10^6 個使用し、0.09%ゼラチンを含むゲルにて泳動を行い、re-naturing buffer を用いた反応は 20 時間行った。タンパク質分解の抑制に関する解析には、30 μ M の MG132 (Peptide Institute)、30 nM の bafilomycin A1 (Sigma)を各々含む血清非含有培地にて 4 時間培養した細胞を用いた。

CAIX 活性の測定

CAIX 活性の測定には、文献 (70,71)を参考として確立した、反応溶液中の pH 変化とその反応時間を指標とした Δ pH/ Δ t assay 法を用いた。活性測定には、CA lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, and 0.1% Triton X-100)にて可溶化した膜タンパク質を用いた。また基質溶液として、ドライアイスを用いて氷上で 2 時間 CO₂ ガスを封入した超純水を用いた。4°C のウォーターバス中で、1 μ g/ μ l に調製した

膜タンパク質溶解液 200 μ l を、pH 8.6 に調製した反応溶液 (25 mM barbital sodium buffer (Wako)) 3.8 ml 中に添加し、ここに用時調製した基質溶液 2 ml を添加して酵素反応を開始させた。反応溶液の pH が 8.3 から 7.3 にまで低下する時間 Δt (秒)を測定した。CAIX 活性の阻害には、acetazolamide (Sigma)を終濃度 100 μ M で用い、氷上にて 30 分インキュベートしたものを活性測定に用いた。なお測定結果は HORIBA Data Navi FD-50 (ver. P1000834001D 1.10) (HORIBA)にて収集・記録し、検量線の作成には、bovine erythrocyte CA (Sigma)を用いた。算出された $\Delta pH/\Delta t$ の絶対値を基にプロットを作成し、測定データの定量化を行った。

イムノブロットティングならびに免疫沈降

イムノブロットティングならびに免疫沈降は、文献 (10,12,22)を参考に行った。イムノブロットティングには、可溶化した 10-20 μ g の膜タンパク質、もしくは 10-20 μ g の細胞全タンパク質を用いた。サンプルを、DTT 含有 6 \times SDS sample buffer (0.35 M Tris-HCl pH6.8, 10% SDS, 30% glycerol, 2 mM DTT)にて 37°C で 30 分インキュベートし、6-8%の poly acrylamide gel を用いて、室温、20 mA/gel の条件下で SDS-PAGE を行った。泳動後、polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (Millipore)にタンパク質を転写し、0.1% Tween-20/PBS (PBS-T)で調製した 5% スキムミルクを用いてブロッキングした(室温、1 時間振とう)。ブロッキング液に懸濁した一次抗体にて抗体反応を行い (4°C、over night、rotate)、メンブレンを PBS-T にて 3 回洗浄 (室温、10 分振とう)した後、ブロッキング液に懸濁した二次抗体にて抗体反応を行った (室温、1 時間、rotate)。同様にメンブレンを PBS-T にて 3 回洗浄した後、Immobilon Western (Millipore)もしくは Chemi-Lumi One L (Nachalai Tesque)でメンブレンを発色処理し、LAS1000 Plus image analyzer (Fujifilm)を用いて画像の撮影を行った。なおタンパク質の検出には一次抗体として、monoclonal anti-HA HA-11 (1:3000; Biolegend)、monoclonal anti-HA clone 3F10 (1:3000; Roche)、monoclonal anti-FLAG M2 (1:3000; Sigma)、polyclonal anti-FLAG (anti-DDDDK; 1:3000; MBL)、anti-TNAP (1:3000; Santa Cruz Biochemistry)、anti-ATX (1:6000; MBL)、anti-CAIX (1:6000; Novus Biologicals)、anti-MMP9 (1:6000; R&D Systems)、anti- β -tubulin (1:10000; Sigma)、及び anti-calnexin (CNX) (1:6000; Enzo Life Sciences)を用い、二次抗体として、horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse、-rabbit、-rat IgG (GE Healthcare)、あるいは anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology)抗体を各々 3,000 倍希釈で用いた。

検出されたバンドのシグナル強度の定量化には、ImageQuant TL software (GE Healthcare)を用いた。

免疫沈降には、NP-40 buffer (100 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1% NP-40, 0.5% Deoxycholate, 0.1% SDS)に可溶化し、不溶画分を除いた 200 μ g の膜タンパク質サンプルを用いた。膜タンパク質サンプルに、monoclonal anti-HA HA-11 (1:200; Biolegend)、monoclonal anti-FLAG M2 (1:200; Sigma)を加えて 4°C で 1 時間混和し、Protein G-Sepharose beads (GE Healthcare)を加えてさらに 4°C で 2 時間混和した。ビーズを SDS 非含有 NP-40 buffer にて 5 回洗浄し、2.5 μ l の Ling's buffer (150 mM sucrose, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM DTT, 10% SDS, 5 mM EDTA)と、12.5 μ l の Urea buffer (8 M urea, 30 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 4 mM DTT, 2% SDS, 1 mM EDTA)を添加して 37°C で 30 分インキュベートした後、可溶化画分を用いてイムノブロッティングを行った。

蛍光免疫染色

免疫染色は文献 (22)を参考に実施した。回収した 5.0×10^5 個の細胞を PBS にて洗浄後、4% formaldehyde/PBS を用いて、0.1% Poly-L-lysine (Sigma)にてコーティングしたカバーガラス上に固定した (室温、15 分、静置)。PBS にて 2 回洗浄を行った後、2% BSA/PBS にてブロッキングし (室温、1 時間静置)、2% BSA/PBS に懸濁した一次抗体を用いて抗体反応を行った (室温、1 時間静置)。PBS にて 3 回洗浄を行った後、引き続き 2% BSA/PBS に懸濁した二次抗体を用いて抗体反応 (室温、遮光、1 時間静置)を行った。PBS にて 3 回洗浄を行った後、SlowFade Antifade kit (Molecular Probes)を用いて退色防止処理を行った。ZnT4-FLAG の検出には、polyclonal anti-FLAG (1:2000; MBL) 及び Alexa 594-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:200; Molecular Probes, Eugene, OR, A11032)を、ゴルジ体の検出には anti-GM130 (1:100; Transduction Laboratories) 及び Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG (1:200; Molecular Probes)を用いた。染色された細胞の蛍光観察及び撮影は、FSX100 (Olympus)を用いた。

細胞表面ビオチン化アッセイ

本解析は文献 (21)を参考に実施した。細胞は PBS にて 2 回洗浄した後、PBS に溶解した EZ-Link, a sulfo-NHS-SS-biotin reagent (Pierce Protein Biology, Thermo Fisher Scientific)にて 4°C で 30 分混和し、細胞外表面タンパク質のリシン残基の

ビオチン標識を行った。ここに、streptavidin-coupled beads を加えてさらに 4°C で 3 時間混和し、ビオチン標識されたタンパク質を回収した。PBS にてビーズを 3 回洗浄した後、DTT 含有 6× SDS sample buffer にて 37°C で 30 分インキュベートし、可溶化画分を用いて SDS-PAGE を行った。泳動後、タンパク質を PVDF メンブレン (Millipore) に転写し、CBB 染色液にて染色した。

亜鉛蛍光試薬 Zinpyr-1 を用いたフローサイトメトリー解析

本解析は文献 (20) を参考に実施した。解析には、亜鉛欠乏培地、通常培地、亜鉛添加 (50 μM ZnSO_4) 培地にて 48 時間培養した 2.0×10^6 個の細胞を用いた。回収した細胞を PBS で洗浄後、4% formaldehyde/PBS にて固定し、20 mM HEPES/Hank's balanced salt solution (HBSS) を用いて調製した 5 μM Zinpyr-1 (Santa Cruz Biotechnology) によって染色した(室温、遮光、30 分静置)。染色した細胞を 20 mM HEPES/HBSS にて 2 回洗浄した後、20 mM EDTA/PBS 処理 (室温、5 分静置) にて細胞外の亜鉛を除いた。1% BSA/PBS にて細胞を再懸濁し、40 μm フィルター通したものを測定サンプルとした。なお、解析には BD Accuri C6 Flow cytometer (BD Biosciences) を用い、Zinpyr-1 の蛍光強度を測定した。

統計処理

定量化したデータは $n=3$ の平均値を示し、その標準偏差の値をエラーバーで示した。t 検定により、 $p < 0.01$ (*) となったものを統計的に有意差ありと判断した。

文献

1. Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., and Rosato, A. (2006) Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *Journal of Proteome Research* **5**, 196-201.
2. Andreini, C., and Bertini, I. (2012) A bioinformatics view of zinc enzymes. *J Inorg Biochem* **111**, 150-156
3. Maret, W. (2012) New perspectives of zinc coordination environments in proteins. *Journal of Inorganic Biochemistry* **111**, 110-6.
4. Kochańczyk, T., Drozd, A., and Krężel, A. (2015) Relationship between the architecture of zinc coordination and zinc binding affinity in proteins – insights into zinc regulation. *Metallomics* **7**, 244-257.
5. Kambe, T., Tsuji, T. and Fukue, K. (2014) Zinc transport proteins and zinc signaling. *Fukada T, and Kambe T (Eds.). Zinc signals in cellular functions and disorders*, pp. 27-53.
6. Kambe, T., Tsuji, T., Hashimoto, A., and Itsumura, N. (2015) The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism. *Physiol Rev* **95**, 749-784
7. Kambe, T. (2011) An overview of a wide range of functions of ZnT and Zip zinc transporters in the secretory pathway. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**, 1036-1043.
8. Kambe, T., Takeda, T., and Nishito, Y. (2016) Activation of zinc-requiring ectoenzymes by ZnT transporters during the secretory process: Biochemical and molecular aspects. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 3-8.
9. Suzuki, T., Ishihara, K., Migaki, H., Matsuura, W., Kohda, A., Okumura, K., Nagao, M., Yamaguchi-Iwai, Y., and Kambe, T. (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
10. Suzuki, T., Ishihara, K., Migaki, H., Nagao, M., Yamaguchi-Iwai, Y., and Kambe, T. (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.
11. Fukunaka, A., Suzuki, T., Kurokawa, Y., Yamazaki, T., Fujiwara, N., Ishihara, K.,

- Migaki, H., Okumura, K., Masuda, S., Yamaguchi-Iwai, Y., Nagao, M., and Kambe, T. (2009) Demonstration and characterization of the heterodimerization of ZnT5 and ZnT6 in the early secretory pathway. *J Biol Chem* **284**, 30798-30806.
12. Fukunaka, A., Kurokawa, Y., Teranishi, F., Sekler, I., Oda, K., Ackland, M. L., Faundez, V., Hiromura, M., Masuda, S., Nagao, M., Enomoto, S., and Kambe, T. (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.
 13. Whyte, M. P. (2010) Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1192**, 190-200.
 14. Bobyr, E., Lassila, J. K., Wiersma-Koch, H. I., Fenn, T. D., Lee, J. J., Nikolic-Hughes, Hogston, K. O., Rees, D. C., Hedman, B., and Herschlag, D. (2012) High-resolution analysis of Zn²⁺ coordination in the alkaline phosphatase superfamily by EXAFS and x-ray crystallography. *Journal of Molecular Biology* **415**, 102-117.
 15. Papers, J. B. C., Doi, M., Mornet, E., Stura, E., and Stigbrand, T. (2001) Structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization. *Biological Chemistry* **276**, 31171-31178.
 16. Fujimoto, S., Tsuji, T., Fujiwara, T., Takeda, T. A., Merriman, C., Fukunaka, A., Nishito, Y., Fu, D., Hoch, E., Sekler, I., Fukue, K., Miyamae, Y., Masuda, S., Nagao, M., and Kambe, T. (2016) The PP-motif in luminal loop 2 of ZnT transporters plays a pivotal role in TNAP activation. *Biochem J* **473**, 2611-2621.
 17. Fujimoto, S., Itsumura, N., Tsuji, T., Anan, Y., Tsuji, N., Ogra, Y., Kimura, T., Miyamae, Y., Masuda, S., Nagao, M., and 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**, e77445.
 18. Feske, S., Skolnik, E. Y., and Prakriya, M. (2012) Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. *Nature Reviews Immunology* **12**, 532-547.
 19. Ishihara, K., Yamazaki, T., Ishida, Y., Suzuki, T., Oda, K., Nagao, M., Yamaguchi-Iwai, Y., and Kambe, T. (2006) Zinc transport complexes contribute to the homeostatic maintenance of secretory pathway function in vertebrate cells. *J Biol Chem* **281**, 17743-17750.
 20. Itsumura, N., Kibihara, Y., Fukue, K., Miyata, A., Fukushima, K.,

- Tamagawa-Mineoka, R., Katoh, N., Nishito, Y., Ishida, R., Narita, H., Kodama, H., and Kambe, T. (2016) Novel mutations in *SLC30A2* involved in the pathogenesis of transient neonatal zinc deficiency. *Pediatr Res* **80**, 586-594.
21. Nishito, Y., Tsuji, N., Fujishiro, H., Takeda, T., Yamazaki, T., Teranishi, F., Okazaki, F., Matsunaga, A., Tuschl, K., Rao, R., Kono, S., Miyajima, H., Narita, H., Himeno, S., and Kambe, T. (2016) Direct comparison of manganese detoxification/efflux proteins and molecular characterization of ZnT10 as a manganese transporter. *J Biol Chem* **291**, 14773-14787.
 22. 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.
 23. Buerstedde, J. M., and Takeda, S. (1991) Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell* **67**, 179-188.
 24. Overall, C. M., and Lopez-Otin, C. (2002) Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* **2**, 657-672.
 25. Supuran, C. T. (2008) Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 168-181.
 26. Reich, R., Hoffman, A., Veerendhar, A., Maresca, A., Innocenti, A., Supuran, C. T., and Breuer, E. (2012) Carbamoylphosphonates control tumor cell proliferation and dissemination by simultaneously inhibiting carbonic anhydrase IX and matrix metalloproteinase-2. Toward nontoxic chemotherapy targeting tumor microenvironment. *J Med Chem* **55**, 7875-7882.
 27. Reich, R., Hoffman, A., Suresh, R. R., Shai, O., Frant, J., Maresca, A., Supuran, C. T., and Breuer, E. (2015) Carbamoylphosphonates inhibit autotaxin and metastasis formation *in vivo*. *J Enzyme Inhib Med Chem* **30**, 767-772.
 28. Neri, D., and Supuran, C. T. (2011) Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nat Rev Drug Discov* **10**, 767-777.
 29. Vandenbroucke, R. E., and Libert, C. (2014) Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nat Rev Drug Discov* **13**, 904-927.
 30. Umezu-Goto, M., Kishi, Y., Taira, A., Hama, K., Dohmae, N., Takio, K., Yamori, T., Mills, G. B., Inoue, K., Aoki, J., and Arai, H. (2002) Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol* **158**, 227-233.

31. Nishimasu, H., Okudaira, S., Hama, K., Mihara, E., Dohmae, N., Inoue, A., Ishitani, R., Takagi, J., Aoki, J., and Nureki, O. (2011) Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 205-212.
32. Hausmann, J., Kamtekar, S., Christodoulou, E., Day, J. E., Wu, T., Fulkerson, Z., Albers, H. M., van Meeteren, L. A., Houben, A. J., van Zeijl, L., Jansen, S., Andries, M., Hall, T., Pegg, L. E., Benson, T. E., Kasiem, M., Harlos, K., Kooi, C. W., Smyth, S. S., Ovaa, H., Bollen, M., Morris, A. J., Moolenaar, W. H., and Perrakis, A. (2011) Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 198-204.
33. Houben, A. J., and Moolenaar, W. H. (2011) Autotaxin and LPA receptor signaling in cancer. *Cancer Metastasis Rev* **30**, 557-565.
34. Benesch, M. G., Ko, Y. M., McMullen, T. P., and Brindley, D. N. (2014) Autotaxin in the crosshairs: taking aim at cancer and other inflammatory conditions. *FEBS Lett* **588**, 2712-2727.
35. Egeblad, M., and Werb, Z. (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **2**, 161-174.
36. Vandooren, J., Van den Steen, P. E., and Opdenakker, G. (2013) Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **48**, 222-272.
37. Pastorek, J., Pastoreková, S., Callebaut, I., Mornon, J. P., Zelník, V., Opavský, R., Zát'ovicová, M., Liao, S., Portetelle, D., and Stanbridge, E. J. (1994) Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene*. **9**, 2877-2888.
38. Alterio, V., Hilvo, M., Di Fiore, A., Supuran, C. T., Pan, P., Parkkila, S., Scaloni, A., Pastorek, J., Pastorekova, S., Pedone, C., Scozzafava, A., Monti, S. M., and De Simone, G. (2009) Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 16233-16238.
39. Chiche, J., Ilc, K., Laferriere, J., Trottier, E., Dayan, F., Mazure, N. M., Brahimi-Horn, M. C., and Pouyssegur, J. (2009) Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis

- through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res* **69**, 358-368.
40. Shin, H. J., Rho, S. B., Jung, D. C., Han, I. O., Oh, E. S., and Kim, J. Y. (2011) Carbonic anhydrase IX (CA9) modulates tumor-associated cell migration and invasion. *J Cell Sci* **124**, 1077-1087.
 41. Parks, S. K., Chiche, J., and Pouyssegur, J. (2013) Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **13**, 611-623.
 42. Liao, S. Y., Aurelio, O. N., Jan, K., Zavada, J., and Stanbridge, E. J. (1997) Identification of the MN/CA9 protein as a reliable diagnostic biomarker of clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res* **57**, 2827-283124.
 43. Zavada, J., Zavadova, Z., Zat'ovicova, M., Hyrsl, L., and Kawaciuk, I. (2003) Soluble form of carbonic anhydrase IX (CA IX) in the serum and urine of renal carcinoma patients. *Br J Cancer* **89**, 1067-1071.
 44. Hyrsl, L., Zavada, J., Zavadova, Z., Kawaciuk, I., Vesely, S., and Skapa, P. (2009) Soluble form of carbonic anhydrase IX (CAIX) in transitional cell carcinoma of urinary tract. *Neoplasma* **56**, 298-302.
 45. Kukic, I., Lee, J. K., Coblenz, J., Kelleher, S. L., and Kiselyov, K. (2014) Zinc-dependent lysosomal enlargement in TRPML1-deficient cells involves MTF-1 transcription factor and ZnT4 (Slc30a4) transporter. *Biochem J* **451**, 155-163.
 46. Murgia, C., Vespignani, I., Cerase, J., Nobili, F., and 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.
 47. McCormick, N. H., and Kelleher, S. L. (2012) ZnT4 provides zinc to zinc-dependent proteins in the *trans*-Golgi network critical for cell function and Zn export in mammary epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **303**, C291-297.
 48. Ohana, E., Hoch, E., Kesar, C., Kambe, T., Yifrach, O., Hershinkel, M., and Sekler, I. (2009) Identification of the Zn²⁺ binding site and mode of operation of a mammalian Zn²⁺ transporter. *J Biol Chem* **284**, 17677-17686.
 49. Lee, S., Hennigar, S. R., Alam, S., Nishida, K., and Kelleher, S. L. (2015) Essential Role for zinc transporter 2 (ZnT2)-mediated zinc transport in mammary gland development and function during lactation. *J Biol Chem* **290**, 13064-13078.
 50. Duellman, T., Burnett, J., and Yang, J. (2015) Functional roles of N-linked glycosylation of human matrix metalloproteinase 9. *Traffic* **16**, 1108–1126.

51. Skropeta, D. (2009) The effect of individual N-glycans on enzyme activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **17**, 2645-2653.
52. Li, M., Zhang, Y., Liu, Z., Bharadwaj, U., Wang, H., Wang, X., Zhang, S., Liuzzi, J. P., Chang, S. M., Cousins, R. J., Fisher, W. E., Brunicardi, F. C., Logsdon, C. D., Chen, C., and Yao, Q. (2007) Aberrant expression of zinc transporter ZIP4 (SLC39A4) significantly contributes to human pancreatic cancer pathogenesis and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 18636-18641.
53. Kagara, N., Tanaka, N., Noguchi, S., and Hirano, T. (2007) Zinc and its transporter ZIP10 are involved in invasive behavior of breast cancer cells. *Cancer Sci* **98**, 692-697.
54. Taylor, K. M., Morgan, H. E., Smart, K., Zahari, N. M., Pumford, S., Ellis, I. O., Robertson, J. F., and Nicholson, R. I. (2007) The emerging role of the LIV-1 subfamily of zinc transporters in breast cancer. *Mol Med* **13**, 396-406.
55. Weaver, B. P., Zhang, Y., Hiscox, S., Guo, G. L., Apte, U., Taylor, K. M., Sheline, C. T., Wang, L., and Andrews, G. K. (2010) Zip4 (Slc39a4) expression is activated in hepatocellular carcinomas and functions to repress apoptosis, enhance cell cycle and increase migration. *PLoS One* **5** e13158.
56. Hogstrand, C., Kille, P., Ackland, M. L., Hiscox, S., and Taylor, K. M. (2013) A mechanism for epithelial-mesenchymal transition and anoikis resistance in breast cancer triggered by zinc channel ZIP6 and STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3). *Biochem J* **455**, 229-237.
57. Miyai, T., Hojyo, S., Ikawa, T., Kawamura, M., Irie, T., Ogura, H., Hijikata, A., Bin, B. H., Yasuda, T., Kitamura, H., Nakayama, M., Ohara, O., Yoshida, H., Koseki, H., Mishima, K., and Fukada, T. (2014) Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 facilitates antiapoptotic signaling during early B-cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, 11780-11785.
58. Taylor, K. M., Muraina, I. A., Brethour, D., Schmitt-Ulms, G., Nimmanon, T., Ziliotto, S., Kille, P., and Hogstrand, C. (2016) Zinc transporter ZIP10 forms a heteromer with ZIP6 which regulates embryonic development and cell migration. *Biochem J* **473**, 2531-2544.
59. Huang, L., and Gitschier, J. (1997) A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse. *Nat Genet* **17**, 292-297.
60. MacDiarmid, C. W., Milanick, M. A., and Eide, D. J. (2002) Biochemical

properties of vacuolar zinc transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**, 39187-39194.61.

61. Hassinen, A., Rivinoja, A., Kauppila, A., and Kellokumpu, S. (2010) Golgi N-glycosyltransferases form both homo- and heterodimeric enzyme complexes in live cells. *J Biol Chem* **285**, 17771-17777.
62. Seo, Y. A., and Kelleher, S. L. (2010) Functional analysis of two single nucleotide polymorphisms in SLC30A2 (ZnT2): implications for mammary gland function and breast disease in women. *Physiol Genomics* **42A**, 219-227.
63. Zogzas, C. E., Aschner, M., and Mukhopadhyay, S. (2016) Structural elements in the transmembrane and cytoplasmic domains of the metal transporter SLC30A10 are required for its manganese efflux activity. *J Biol Chem* **291**, 15940-15957.
64. Martin, J. E., and Giedroc, D. P. (2016) Functional determinants of metal ion transport and selectivity in paralogous cation diffusion facilitator transporters CzcD and MntE in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **198**, 1066-1076
65. Franz, M. C., Anderle, P., Burzle, M., Suzuki, Y., Freeman, M. R., Hediger, M. A., and Kovacs, G. (2013) Zinc transporters in prostate cancer. *Mol Aspects Med* **34**, 735-741.
66. Kambe, T., and Andrews, G. K. (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. Imamura, S., and Horiuti, Y. (1978) Enzymatic determination of phospholipase D activity with choline oxidase. *J Biochem* **83**, 677-680.
68. Tamaoku, K., Ueno, K., Akiura, K., and Ohkura, Y. (1982) New water-soluble hydrogen donors for the enzymatic photometric determination of hydrogen peroxide. *Chem. Pharm. Bull* **30**, 2492-2497.
69. Heussen, C., and Dowdle, E. B. (1980) Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem* **102**, 196-202.
70. Maren, T. H. (1960) A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* **130**, 26-29.
71. Henry, R. P. (1991) Techniques for measuring carbonic anhydrase activity *in vitro*. *S.J. Dodgson, R.E. Tashian, G. Gros, N.D. Carter (Eds.). The Carbonic Anhydrases, Plenum, New York*, pp 119-125.

謝辞

本研究を実施、遂行するにあたり多くの方々にご助力を賜りました。

はじめに、私が本研究に携わり始めた修士1年生の時以来、指導教員として基礎的な実験手技をはじめ、研究者としてのあり方など多くのことをご指導くださり、また研究を遂行し、論文を執筆する上でも必要不可欠な議論・ご指摘を賜りました京都大学大学院生命科学研究科生体情報応答学分野准教授 神戸大朋 博士に心より感謝申し上げます。また、同分野教授 永尾雅哉 博士からは実験結果に関する多くの有益なご指摘を頂くとともに、研究室での生活を暖かくサポートして頂きました。また、同分野前助教 宮前友策 博士からも多くのご助言を頂きました。深く感謝申し上げます。

また、副指導教員としてご指導頂いた京都大学大学院生命科学研究科教授 福澤秀哉 博士、同研究科教授 河内孝之 博士からも研究を進展させる上で貴重なご助言、ご指摘を賜りました。特に、福澤 博士には、CAIX 活性測定系を確立するにあたり、実験手法の指導のみならず、実験器具を快くご提供頂きました。両博士に、この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

そして、Centre Scientifique de Monaco の Jacques Pouysségur 博士、Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire の Johanna Chiche 博士、ならびに金沢大学がん進展制御研究所の佐藤博 博士には、研究を遂行する上で必要となった種々の遺伝子をご供与頂きました。誠にありがとうございます。

6年間にわたり本研究を遂行できたのは、生体情報応答学分野の諸先輩方・同期・後輩のご協力があったからだと考えております。特に、本研究の先駆けともなる解析を実施して下さった黒川弥生氏には深く感謝申し上げます。そして、研究室の皆様をはじめ、事務手続きや研究室の日々の生活を支えて下さった事務官 嶋林かほる氏に厚く御礼申し上げます。

最後に、博士前期・後期過程において、研究に専念できる環境を与えてくれ、応援してくれた家族、そして心が折れそうになった時支えになってくれた同期・友人の皆に心より感謝申し上げます。本当にありがとうございました。

2017年1月6日

辻 徳治

本論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Tokuji Tsuji, Yayoi Kurokawa, Johanna Chiche, Jacques Pouysségur, Hiroshi Sato,
Hideya Fukuzawa, Masaya Nagao and Taiho Kambe

Dissecting the process of activation of cancer-promoting zinc-requiring ectoenzymes by
zinc metalation mediated by ZNT transporters

The Journal of Biological Chemistry, in press, doi: 10.1074/jbc.M116.763946