

亜鉛欠乏が細胞外 ATP 代謝に与える影響
に関する解析

武田 貴成

目次

要旨	2
略語一覧	4
序論	6
結果	
1. 亜鉛欠乏が細胞外 ATP 代謝に与える影響についての解析	15
2. 細胞外 ATP 代謝に関わる亜鉛要求性酵素の活性化機構に関する解析	32
考察	41
材料と方法	48
引用文献	55
謝辞	63

要旨

必須微量元素である亜鉛は、生体内で様々な機能を発揮する。亜鉛が欠乏すると、炎症、脱毛、発育障害、アレルギー、貧血など、多様な症状が引き起こされるが、この詳細な発症メカニズムは不明な点も多い。

本研究では、亜鉛が重要な機能を果たし得る代謝系として、細胞外 ATP 代謝に注目した。細胞外 ATP 代謝は免疫系の調節や神経伝達、がん代謝など、多彩な機能に関与する。細胞外 ATP 代謝の遅延は、炎症やアレルギー、神経障害などの症状を引き起こすことが知られ、この症状の一部は亜鉛欠乏症と共通している。さらにこの細胞外 ATP 代謝を制御する主要な 5 つの分泌型酵素 (ALP、CD39、CD73、ENPP、PAP) のうち、3 つ (ALP、CD73、ENPP) は亜鉛を活性中心に持つ亜鉛要求性酵素であることが明らかとなっている。そこで本研究では、亜鉛の欠乏と細胞外 ATP 代謝の遅延には関連があるのではないかと考え、培養細胞、ラットを用いて、以下の二つの研究を進めた。

初めに、亜鉛欠乏による細胞外 ATP 代謝への影響について検討した。まず、細胞外 ATP 代謝に関わる 3 つの亜鉛要求性酵素に着目し、種々の培養細胞の分泌型酵素を含む膜面分中、またはラット血漿中の ALP、CD73、ENPP の酵素活性が亜鉛欠乏によって低下するか解析した。亜鉛欠乏培地または低亜鉛食を用いた解析の結果、培養細胞、ラットいずれにおいても、亜鉛欠乏によって ALP、CD73、ENPP の酵素活性が大きく低下することが明らかとなった。続いて、亜鉛欠乏によるこれらの酵素活性の低下が、実際の細胞外 ATP 代謝に与える影響について検討するため、まず高速液体クロマトグラフィーを用いた細胞外 ATP 代謝における代謝物 (ATP、ADP、AMP、アデノシン) の分離・定量系を樹立した。次に培養細胞における膜面分または、ラット血漿中の分泌型酵素によって ATP を分解させ、残存する ATP と生じた ADP、AMP、アデノシンの量が亜鉛欠乏によってどのように変化するか検討した。その結果、いずれの解析においても亜鉛欠乏によって細胞外 ATP 代謝は遅延しており、ATP 量や ADP 量の増加、アデノシン量の減少などが引き起こされていることを見出した。

次に、これらの亜鉛要求性酵素の亜鉛獲得による活性化機構について解析を進めた。ALP の一種である TNAP の正常な活性化には、2 つの亜鉛輸送複合体、ZNT5-ZNT6 ヘテロダイマーおよび ZNT7 ホモダイマー (ZNT 複合体) による亜鉛輸送が必須であることが報告されている。ニワトリ B リンパ球由来 DT40 細胞において ZNT 複合体を欠損させた細胞株 (TKO 株) では、TNAP 活性は消失し、TNAP タンパク質は速やかに分解

される。そこで本研究では、ENPP や CD73 を TKO 株に発現させ、その酵素活性やタンパク質の安定性について解析した。その結果、CD73 は TKO 株において酵素活性が消失し、CD73 タンパク質も分解されていた。一方で ENPP は、TKO 株での発現によっても酵素活性が低下せず、ENPP タンパク質も安定に存在していた。これらの結果より、CD73 は TNAP と同様の ZNT 複合体に依存した活性化機構を持つが、ENPP は ZNT 複合体に依存しない、異なった経路から亜鉛を獲得していると考えられた。

これらの研究により、亜鉛欠乏は亜鉛要求性酵素の活性低下を介して細胞外 ATP 代謝の遅延を引き起こすことが見出されたほか、これらの亜鉛要求性酵素は異なる機構によって亜鉛を獲得し、活性化されていることが示唆された。

略語一覽

ADA – adenosine deaminase

Ado – adenosine

ADP – adenosine diphosphate

AE – acrodermatitis enteropathica

ALP – alkaline phosphatase

AMP – adenosine monophosphate

ATP – adenosine triphosphate

ATX – autotaxin

bisNPP – bis(*p*-nitrophenyl) phosphate

CAIX – carbonic anhydrase IX

CALR – calreticulin

CD39 – cluster of differentiation 39

CD73 – cluster of differentiation 73

Cnx – calnexin

CX – Chelex 100 resin

DAMPs – damage-associated molecular patterns

ENPP – ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase

GCAP – germ cell alkaline phosphatase

GPI – glycosylphosphatidylinositol

HPLC – high performance liquid chromatography

Hyp – hypoxanthine

IAP – intestinal alkaline phosphatase

IB – immunoblotting

IL – insertion loop

IMP – inosine monophosphate

Ino – inosine

lysoPLD – lysophospholipase D

MMP9 – matrix metalloproteinase 9

MT – metallothionein

NTPDase – ectonucleoside triphosphate diphosphodiesterase

PAP – prostatic acid phosphatase
PCR – polymerase chain reaction
Pi – inorganic phosphate
PLAP – placental alkaline phosphatase
PMA – phorbol 12-myristate 13-acetate
PNP – purine nucleoside phosphorylase
p-NPP – *p*-nitrophenyl phosphate
p-NP-TMP – *p*-nitrophenyl thymidine monophosphate
PPi – inorganic pyrophosphate
QKO – quadruple knockout
RT-PCR – reverse transcription polymerase chain reaction
SLC – solute carrier
TKO – triple knockout
TNAP – tissue nonspecific alkaline phosphatase
VL – variable loop
WT – wild type
ZIP – zinc-regulated transporter/iron-regulated transporter like protein
ZNT – Zn transporter
4aa – 4 amino acids

序論

必須微量元素としての亜鉛

生体内では、様々な金属元素が機能している。カルシウム、カリウム、ナトリウム、マグネシウムは多量に含まれ、細胞内外での代謝や恒常性維持に機能する。また微量ながら生体内には鉄、亜鉛、銅、マンガンなどの重金属元素も含まれており（ヒト体重 60 kg あたり数グラム以下）、生体内で重要且つ特異的な機能を果たしている。このような元素は必須微量元素と呼ばれ、過不足なく体内へ取り込み、正しく機能させることが健康維持において肝要である¹。

亜鉛は鉄に次いで多く含まれる必須微量元素であり、ヒト体重 60 kg あたり約 2 g の亜鉛が含まれている。ヒトにおける亜鉛量の分布は、筋肉中に約 60%、骨中に約 30%が存在し、残りの約 10%は肝臓、膵臓、脳や前立腺などに多く存在する^{2,4}。

亜鉛はすべての生物ドメインにおいて必須の元素として機能しており、生体内で Zn フィンガーや RING フィンガーなどのタンパク質の構造因子^{5,6}、酵素の活性中心としての触媒因子⁷、またカルシウムのような濃度勾配の変化によるシグナル因子⁸として機能する。いずれの機能においても、亜鉛はタンパク質との結合を介して機能を発揮していると考えられるが、特にプロテオーム解析の結果から亜鉛は約 3000 種類のタンパク質に結合すると試算されており、この数は全タンパク質のうち約 10%にも及ぶ⁹。このように、亜鉛は生体内で多数のタンパク質と結合した状態で存在しており、これらのタンパク質を介してその特異な機能を発揮しているといえる¹⁰。亜鉛と結合するタンパク質の機能維持においては、小胞体やゴルジ体、リソソームなどの細胞内小器官、また細胞質や細胞外マトリックスへの亜鉛の適切な分配が必要不可欠であると推察される。

亜鉛トランスポーター

細胞内で遊離亜鉛と結合し、亜鉛ホメオスタシスに重大な影響を与えるタンパク質として、金属貯蔵タンパク質であるメタロチオネイン (metallothionein, MT) がこれまでよく研究されてきた¹¹⁻¹³。MT は亜鉛を含む重金属の体内での解毒代謝に重要な分子であり、今後も研究が進むことが期待される。近年では MT に加え、新たに亜鉛の生理機能の発揮に大きく貢献する分子として、種々の亜鉛トランスポーターに注目した研究が盛んに進められている。

哺乳類での亜鉛トランスポーターは、いずれも solute carrier (SLC) ファミリータンパ

ク質に属する二種類のファミリー、Zn Transporter (ZNT) /SLC30A ファミリーと Zrt, Irt-like protein (ZIP) /SLC39A ファミリーに分類される¹⁴。このうち ZNT は細胞質から細胞外、もしくは細胞小器官内へ亜鉛を排出するトランスポーターであり、ZIP では逆に細胞外もしくは細胞内小器官より細胞質中へ亜鉛を取り込むトランスポーターとして機能する。ヒトではこれまで、9 個の ZNT (ZNT1-8, 10) と 14 個の ZIP (ZIP1-14) が主要な亜鉛トランスポーターとして同定されているが、これらの ZNT および ZIP の局在、発現組織や発現量はそれぞれのトランスポーターにより全く異なる (Figure 1)¹⁴。生体では、このような多数の亜鉛トランスポーターが協調することで、細胞レベルから個体レベルまでの亜鉛ホメオスタシスの維持に機能し、適切な亜鉛の生理機能の発揮に寄与していると考えられる^{3,4,14}。

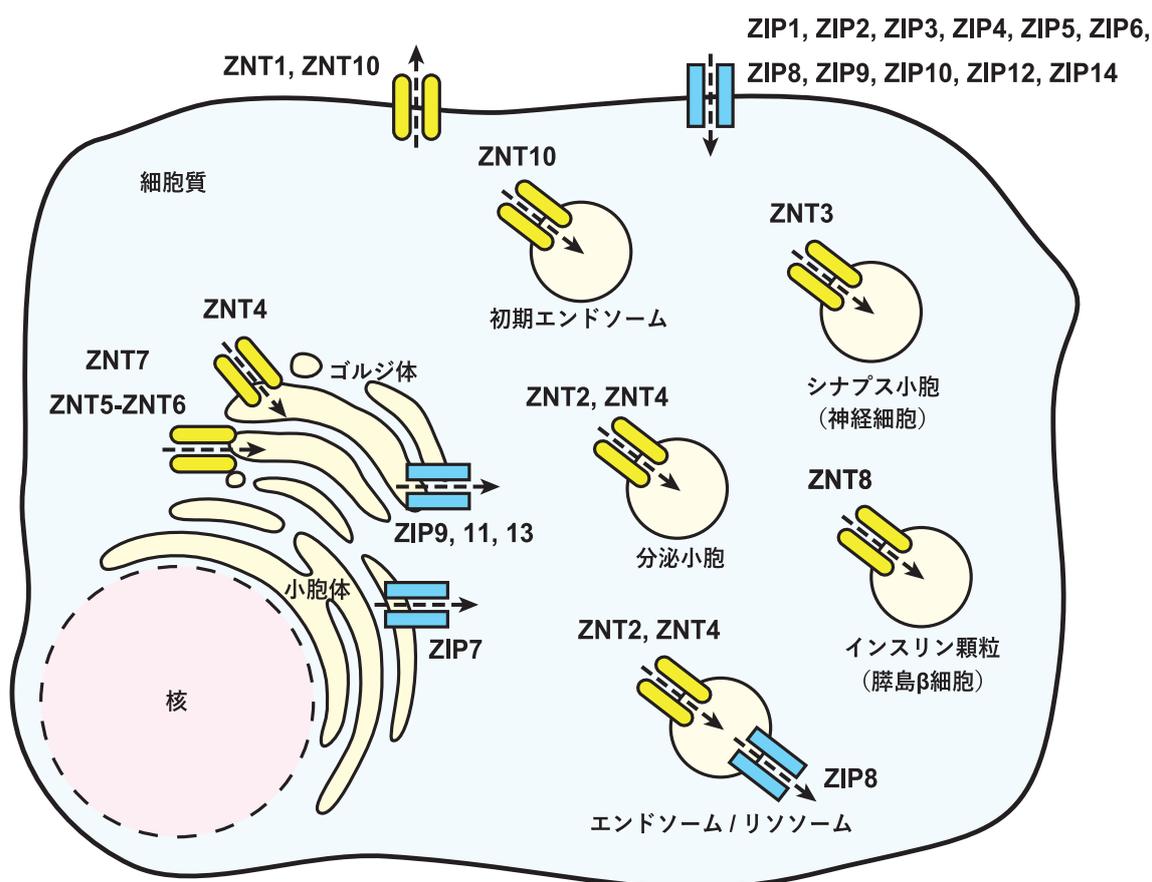


Figure 1. 細胞内における各 ZNT、ZIP の局在

亜鉛要求性酵素の機能

亜鉛が結合するタンパク質のうち、数百種類の酵素において亜鉛は活性中心として機能する^{9,15}。このように亜鉛を活性に必要とする酵素は亜鉛要求性酵素と総称され、生体反応の6種類の酵素（酸化還元酵素、転移酵素、加水分解酵素、脱離酵素、異性化酵素、合成酵素）全てに分布している。また亜鉛要求性酵素には、アルコール脱水素酵素やアンジオテンシン変換酵素、マトリックスメタロプロテアーゼなど、健康状態や疾患と深く関わる酵素が数多く存在している¹⁶⁻¹⁹。

亜鉛摂取と亜鉛欠乏症

厚生労働省による「日本人の食事摂取基準（2015年版）²⁰」では亜鉛の1日あたりの推奨摂取量が定められており、特に成長著しい乳幼児や妊娠期、授乳期の母親にはより多くの亜鉛摂取が推奨されている。腸管における亜鉛の吸収効率は約30%とされているが、亜鉛吸収を司る亜鉛トランスポーターであるZIP4の発現が摂取亜鉛量に伴って変動するため、吸収効率も一定ではないと考えられる。

一方、摂取亜鉛の欠乏は亜鉛ホメオスタシスの破綻に関与する諸症状を引き起こす。これらの症状は亜鉛欠乏症として知られ、日本臨床栄養学会による「亜鉛欠乏症の診療指針2018²¹」では、亜鉛欠乏症による症状として、皮膚炎、脱毛、貧血、味覚障害、下痢、創傷治癒遅延などを挙げている。また最近注目を集めている神経変性疾患や炎症性腸疾患の患者においても、亜鉛が欠乏傾向にあることが明らかとなるなど、亜鉛の欠乏により実に多様な症状が引き起こされることが示唆される。この亜鉛欠乏症のいくつかの症状については、発症メカニズムにつながる有力な知見が得られている。例えばZNT3を中心として進んでいる、神経系やシナプス小胞での亜鉛の機能に関する研究の多くは、亜鉛欠乏が神経系のホメオスタシスに重大な影響を及ぼすことを支持している。また赤血球の分化過程において、亜鉛代謝が緻密な制御を受けていることが明らかにされるなど、亜鉛欠乏と貧血との関連についての研究も進んでいる²²。

しかし、亜鉛欠乏がなぜこのように多くの症状に関連するのか、ということの根本的な解明はなされておらず、亜鉛の潜在的な生理機能について不明な部分も多いと考えられる。

細胞外 ATP 代謝

多彩なシグナルに関与する代謝系の一例として、細胞外 ATP 代謝が知られる。ATP は主に、細胞内でのエネルギーの基本通貨、核酸の構成因子としての機能が広く知られて

いるが、接触や酸化ストレスなど、様々な刺激によって細胞外へと放出される。この放出機構としては細胞膜の破損、ATP を多量に含む小胞のエキソサイトーシス、イオンチャネルやトランスポーターによる放出経路が知られている²³。細胞外で ATP はダメージ関連分子パターン (damage-associated molecular patterns, DAMPs) として機能し、オートクリンまたはパラクリン様式で後述する様々なシグナル経路を活性化する²⁴。

細胞内に ATP は数 mM という高濃度で存在する一方、細胞外の ATP は種々の酵素によって直ちに加水分解されており、細胞外での ATP 濃度は 20-100 nM と極めて低濃度に保たれている^{25,26}。ATP は ADP、AMP、そしてアデノシン (Ado) へと加水分解されるほか、Ado はさらに脱アミノ化され、イノシン (Ino)、ヒポキサンチン (Hyp) へと変換される場合もある^{23,27,28}。

これらのヌクレオチド、ヌクレオシドのうち、直接受容体に作用することでシグナル分子として機能するのは ATP、ADP、Ado であり、受容体はプリン受容体 (P1 及び P2 受容体) と総称される。ATP と ADP は P2 受容体を介して炎症やアレルギーを始めとする、様々なシグナルを活性化する。一方で Ado は P1 受容体を介して抗炎症や睡眠促進などのシグナルを誘発する。P1 受容体と P2 受容体のシグナルは拮抗することが多く、細胞外における ATP から Ado までの適切な加水分解のバランスが、細胞内のシグナル伝達に極めて重要な影響を与える (Figure 2)。

プリン作動性シグナル経路

P1 受容体 (A_{1,2A,2B,3}) はいずれも G タンパク質共役型であるが、P2 受容体はイオンチャネル型の P2X 受容体 (P2X₁₋₇) と G タンパク質共役型の P2Y 受容体 (P2Y_{1,2,4,6,11-14}) という 2 つのファミリーに分けられる。これらの受容体の発現、細胞内局在や機能は種類によって異なっており、細胞外 ATP 代謝による調節を介したプリン作動性シグナルの機能は複雑で多岐に渡る²⁹⁻³³。そのため細胞外 ATP 代謝の破綻は実に多様な症状を引き起こす。

細胞外 ATP 代謝に寄与する細胞外アデニンヌクレオチド分解酵素について概説する。まず、ATP から AMP までの分解は、CD39 (別名 ectonucleoside triphosphate diphosphodiesterase 1, NTPDase1 または E-NTPDase1) を中心とした NTPDase ファミリーに属する酵素と、ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (ENPP) ファミリーに属する ENPP1、ENPP3 が担っている。NTPDase は ATP から ADP、ADP から AMP とリン酸 (inorganic phosphate, Pi) を一つずつ加水分解するが、ENPP は主に、ATP から AMP とピロリン酸 (inorganic pyrophosphate, PPi) を生じる反応を触媒する。次に AMP から

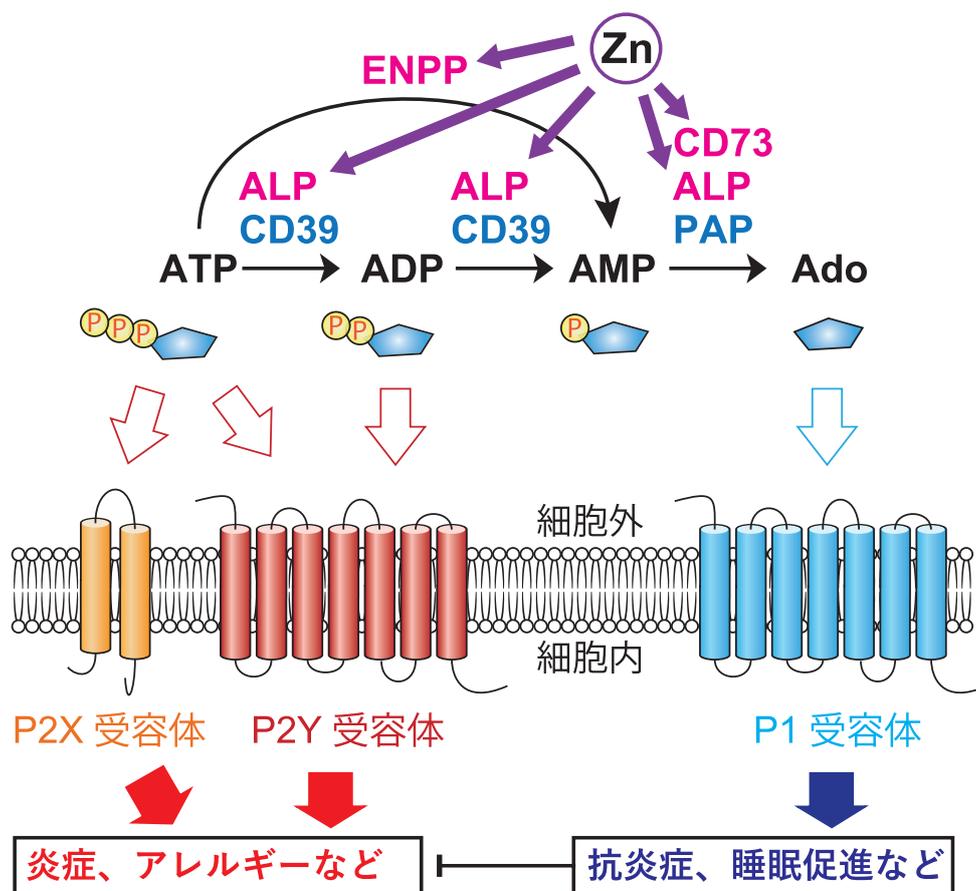


Figure 2. 細胞外 ATP 代謝に関わる酵素

様々なシグナルに寄与する細胞外 ATP 代謝に関わる主要な 5 つの分解酵素 (ALP、CD39、CD73、ENPP、PAP) のうち、3 つは亜鉛要求性酵素であることが判明している。

Ado の産生には CD73 (別名 ecto-5'-nucleotidase, NT5E) または、前立腺酸性ホスファターゼ (prostatic acid phosphatase, PAP) が寄与する。また、アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase, ALP) は基質の特異性が広く、ATP から ADP、ADP から AMP、AMP から Ado を生じる反応をそれぞれ触媒する (Figure 2)。

また、Ado の Ino への変換はアデノシンデアミナーゼ (adenosine deaminase, ADA) によって、Ino から Hyp への変換はプリンヌクレオシドホスホリラーゼ (purine nucleoside phosphorylase, PNP) によってなされる。

細胞外 ATP 代謝に関わる酵素と亜鉛

細胞外 ATP 代謝に関わる酵素のうち、特にプリン作動性シグナルの調節に重要と考え

られる、細胞外アデニンヌクレオチド分解酵素 (ALP、NTPDase、CD73、ENPP、PAP) の構造と機能について、以下に概説する。

・ ALP

ALP は様々な基質においてリン酸基 (Pi) を外す酵素活性をもっている。また ALP にはさまざまなサブタイプが存在し、ヒトにおいては組織非特異的アルカリホスファターゼ (tissue-nonspecific alkaline phosphatase, TNAP)、胎盤型アルカリホスファターゼ (placental alkaline phosphatase, PLAP)、生殖細胞型アルカリホスファターゼ (germ cell alkaline phosphatase, GCAP)、腸管型アルカリホスファターゼ (intestinal alkaline phosphatase, IAP) の 4 種類が発現している。結晶構造解析の結果から、グリコシルホスファチジルイノシトール (glycosylphosphatidylinositol, GPI) アンカーにより細胞膜に固定されており、活性中心に 2 個の亜鉛イオンと 1 個のマグネシウムイオンを持つことが明らかにされている^{34,35}。また ALP は、GPI アンカーの切断により血中にも放出されることが知られており³⁶、「亜鉛欠乏症の診療指針 2018」では、血清 ALP 低値を亜鉛欠乏症の診断指針の一つとして推奨している²¹。

ALP の生理的な機能としては、特に TNAP による骨組織中での PPi の加水分解は、骨代謝制御において非常に重要であることが知られている³⁷。ALP による細胞外 ATP 代謝への寄与については不明な点も多いが、気道や神経組織において、TNAP が CD73、PAP と協調して Ado 産生を行い、抗炎症作用や感染防御、神経伝達の制御に機能することが報告されている^{38,39}。

・ NTPDase

NTPDase ファミリーは NTPDase1 から 8 までの 8 つの酵素が存在するが、細胞膜に局在し、細胞外 ATP 代謝に影響を及ぼすものは NTPDase 1 (CD39)、2、3、8 の 4 種類であると考えられている²³。NTPDase の活性を最大にするには Ca²⁺や Mg²⁺の二価陽イオンを必要とするが、CD39 の活性部位にはこれらの金属が配位していないことが明らかとなっている⁴⁰⁻⁴²。NTPDase ファミリーのうち、制御性 T 細胞や樹状細胞、ランゲルハンス細胞などの免疫細胞で発現が強く、炎症や免疫応答に関わる主要な酵素として知られるものが CD39 である^{23,43-45}。Cd39 を欠損させたマウスでは、血栓形成の促進や免疫応答の異常な亢進による皮膚炎等が認められる^{45,46}。

・ CD73

CD73 は細胞外において AMP から Ado を産生する主要な酵素であり、活性中心に亜鉛イオンを 2 個有している⁴⁷。また ALP と同様に、GPI アンカーによって細胞膜に挿入されているが、血中にも分泌されている²⁷。CD73 は様々な疾患に関連するが、

Cd73 欠損マウスなどの解析から、特に免疫寛容において重要なアデノシンを生み出しており、低酸素状態における血管の保護や、腫瘍の進行、炎症からの保護などに寄与することが明らかにされている⁴⁸⁻⁵⁰。

・ ENPP

ENPP はその活性中心に 2 個の亜鉛イオンを有する亜鉛要求性酵素ファミリーである⁵¹⁻⁵³。ENPP ファミリーのうち、ATP を AMP と PPi に加水分解する活性 (nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (NPP) 活性) を持つ酵素として ENPP1、ENPP2、ENPP3 が知られるが、ENPP1 や ENPP3 に比べ、ENPP2 の NPP 活性は著しく低いことが報告されている。ENPP1、ENPP2、ENPP3 の相同性は高いものの⁵⁴、ENPP1 と ENPP3 は一回膜貫通型の酵素であるのに対し、ENPP2 は膜貫通領域を持たない分泌型酵素である。ENPP2 は強力な NPP 活性を持たない代わりに、他の ENPP にはない、強力なリゾホスホリパーゼ D (lysophospholipase D, lysoPLD) 活性を示す^{55,56}。lysoPLD 活性は、細胞の増殖や浸潤に関わるシグナルを活性化することから、ENPP2 は別名オートタキシン (autotaxin, ATX) としても知られ、様々な種類の腫瘍において悪性化に関わる酵素として研究が進められている⁵⁶⁻⁵⁸。ENPP1 と ENPP3 は、どちらも細胞外 ATP 分解に機能する酵素と考えられるが、発現組織の違いなどから、報告されている生理機能が全く異なっている²³。ENPP1 は硬骨や軟骨などに強く発現し、骨代謝や組織の石灰化に深く関わる⁵⁹⁻⁶²。一方で、ENPP3 は好塩基球などに強く発現し、アレルギーなどの免疫応答に関わることが知られている^{59,63-65}。また ENPP1、ENPP3 は、N 末端の膜貫通領域を切断されることによって細胞外や血中へ分泌されると考えられている^{28,66}。

・ PAP

PAP は酸性ホスファターゼの一種であるが、pH 4 ~ pH 8 と、幅広い pH で AMP 加水分解活性を示す^{23,67}。主に膜貫通領域を持たない分泌型酵素として発現するが、膜貫通領域を含む PAP のスプライズバリエーションも確認されている⁶⁸。発現組織としては、特に唾液腺や前立腺での発現が強く、転移性の前立腺癌患者では血中の PAP 値が上昇するため、腫瘍マーカーとして用いられてきた⁶⁹。もう一つの酸性ホスファターゼである、酒石酸耐性酸性ホスファターゼでは細胞外 ATP 代謝に寄与する報告に乏しいのに対し、PAP は特に唾液腺や中枢系において細胞外で AMP から Ado を産生し、プリン受容体を介して鎮痛などのシグナルに関与することが報告されている^{39,70-72}。

近年の生化学的な解析や、結晶構造解析の報告から、これら細胞外アデニンヌクレオチド分解酵素のうち、NTPDase、PAP 以外の酵素は活性中心に亜鉛を有する亜鉛要求性酵素であることが明らかにされている。このような事実から、亜鉛代謝は細胞外 ATP 代謝と密接に関連することが示唆された (Figure 2)。

また前述のように、細胞外 ATP 代謝の破綻によって、実に多様な症状が引き起こされることが知られる。そのいくつかは炎症やアレルギー、脱毛など、亜鉛欠乏症の症状と共通しているものも多い。

このような知見から、亜鉛の生理機能は、細胞外 ATP 代謝と密接に関連しているのではないかと考え、本研究ではこの二つの代謝系の関連について解析することとした。

初期分泌経路に局在する亜鉛トランスポーターと分泌型亜鉛要求性酵素の活性化

亜鉛要求性酵素のうち、ALP や CD73、ENPP のように細胞外または細胞膜表面で機能する酵素、すなわち分泌型亜鉛要求性酵素は、小胞体やゴルジ体などの初期分泌経路において亜鉛を獲得し、活性化されると考えられる⁷³。初期分泌経路内への亜鉛輸送に関与すると考えられるのが、3 つの亜鉛トランスポーター、ZNT5、ZNT6、ZNT7 である^{7,74-76}。

ZNT5、ZNT6、ZNT7 は、初期分泌経路に局在する ZNT であり、それぞれ ZNT5-ZNT6 ヘテロダイマーまたは、ZNT7 ホモダイマーとして機能する^{77,78}。DT40 細胞において、これらの ZNT を欠損させた細胞 (*znt5, znt6, znt7* triple knockout 株, TKO 株) では、ALP のアイソザイムである PLAP や TNAP を安定的に遺伝子導入しても、酵素の正常な活性化が起こらず、タンパク質の不安定化および酵素活性の消失が引き起こされる^{76,78,79}。またこの TKO 株に、ヒト ZNT5、ZNT6、ZNT7 の再発現させることで消失した TNAP 活性が回復する。さらに、TKO 株において過剰な亜鉛を添加しても ALP は全く回復しないことより、ZNT 複合体は単純に初期分泌経路内の亜鉛濃度を上昇させることによって ALP の活性化を行っているのではなく、複雑な活性化機構を介して ALP を活性化させていることが示唆されている⁷⁶。

さらに ALP 以外の酵素として、腫瘍の悪性化に関わる分泌型亜鉛要求性酵素の活性化と、亜鉛トランスポーターとの関連も示されている⁸⁰。この解析では、ENPP2(別名 ATX)、マトリックスメタロプロテアーゼ 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9)、カルボニックアンヒドラーゼ IX (carbonic anhydrase IX, CAIX) という異なる分泌型亜鉛要求性酵素を発現させた DT40 細胞において ZNT を欠損させ、その影響を評価した。これらの分泌型亜鉛要求性酵素の活性化機構は、酵素によって全く異なっており、まず ENPP2 は

TKO 株においてタンパク質は存在するが、活性が完全に消失した。MMP9 は TKO 株においてタンパク質、酵素活性ともに消失したが、過剰量の亜鉛を加えることによってこれらの形質が回復した。また CAIX は、TKO 株ではタンパク質、酵素活性いずれも影響がなかったが、ZNT5、ZNT6、ZNT7 に加え、エンドソームに局在する ZNT である、ZNT4 を欠損させた細胞株 (quadruple knockout 株, QKO 株) において酵素活性の減少が認められ、過剰量の亜鉛を加えても活性は回復しなかった⁸⁰。このように、分泌型亜鉛要求性酵素によって亜鉛獲得による活性化機構は異なっていると考えられ、この機構の違いにおける法則性も見出されていない。

これらの解析により、これまで考えられていた以上に分泌型亜鉛要求性酵素の活性化機構は精巧かつ複雑な分子機序によって調節されていることが示唆された。このような分泌型亜鉛要求性酵素の活性化機構の解明を進めることで、生理的に重要な酵素群の活性調節機構に加え、関連分子の生理機能についても解明することが可能であると考えられる。

本研究の目的

本研究ではまず、細胞外アデニンヌクレオチドの分解に関わる亜鉛要求性酵素の活性制御の観点から、亜鉛欠乏が細胞外 ATP 代謝に与える影響について検討することとした。この解析により、亜鉛代謝と細胞外 ATP 代謝は関連するという、全く新しいアイデアの実証につながり、亜鉛欠乏症の発症メカニズムの解明に貢献することができると期待された。また次に、これらの亜鉛要求性酵素がどのように亜鉛を獲得し、活性化されるのか、その分子機構について解明を試みた。亜鉛要求性酵素の活性化機構の一端を明らかにすることで、この機構に関連する分子の同定や、この機構を利用した様々な応用研究の発展につながると考えられた。

結果

1. 亜鉛欠乏が細胞外 ATP 代謝に与える影響についての解析

各亜鉛要求性酵素の特異的な酵素活性測定法

まず、細胞外アデニンヌクレオチド分解に関わる亜鉛要求性酵素の、特異的な酵素活性測定法の樹立を試みた。ニワトリ B リンパ球由来 DT40 細胞において、ALP のアイソザイムである TNAP、そして ENPP1、ENPP3、CD73 をそれぞれ安定的に発現させた細胞株を樹立し、これらの細胞において各酵素活性の測定を試みた。ALP 活性の測定には *p*-nitrophenyl phosphate (*p*-NPP) の加水分解によって生じる *p*-nitrophenol の比色定量法を (Figure 3. a)、NPP 活性 (ENPP 活性) の測定には *p*-nitrophenyl thymidine monophosphate (*p*-NP-TMP) の加水分解によって生じる *p*-nitrophenol の比色定量法を (Figure 3. b)、CD73 活性の測定には inosine monophosphate (IMP) の加水分解によって生じた Ino をさらに反応させ、最終産物であるキノン型色素を比色定量する方法 (Figure 3. c)、または AMP の加水分解によって生じた Pi をマラカイトグリーンによって着色し、比色定量する方法 (Figure 3. d) を用いた。酵素サンプルとしては、細胞膜上や小胞内に局在する酵素を粗精製するため、細胞から膜サンプルを回収したものをを用いた。

測定の結果、ALP および ENPP の活性測定法では、それぞれの酵素 (TNAP または ENPP1 と ENPP3) 発現株において特異的に強い活性が認められた (Figure 3. a, b)。CD73 の活性測定法では、CD73 で特に強い活性が認められたものの、TNAP 発現株においても活性が認められた (Figure 3. c, d)。これらの結果から、本解析で用いる酵素活性測定法は、CD73 と ALP とでは触媒する反応が一部重複していたが、高い特異性で酵素活性を評価する手法として有効であることがわかった。

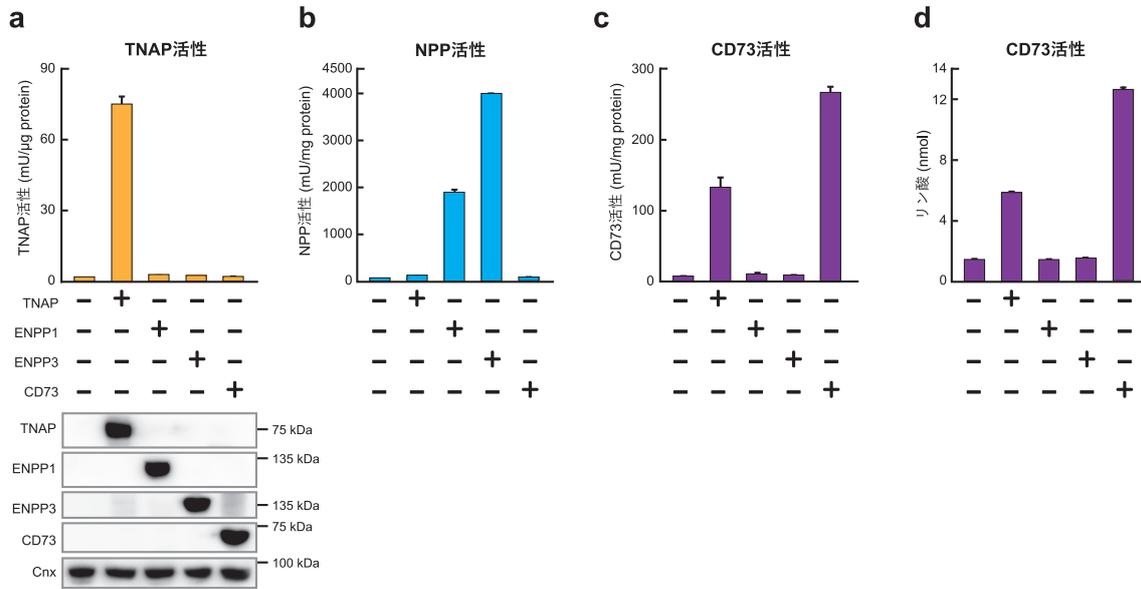


Figure 3. 各酵素に特異的な酵素活性の測定

各酵素活性の測定に用いる手法について、TNAP、ENPP1、ENPP3、CD73 を安定的に過剰発現させた DT40 細胞を用いて検討した。(a) *p*-NPP の加水分解による比色定量法で測定した TNAP (ALP) 活性。(b) *p*-NP-TMP の加水分解による比色定量法で測定した NPP (ENPP) 活性。(c) IMP の加水分解による比色定量法で測定した CD73 活性。(d) AMP の加水分解により生じた Pi の比色定量法で測定した CD73 活性。(a-d) 下の IB の結果では、膜サンプルにおけるそれぞれの酵素の発現と、ローディングコントロールとして用いたカルネキシン (calnexin, Cnx) の発現量を示した。

細胞外 ATP 代謝に関わる亜鉛要求性酵素は、亜鉛欠乏によって酵素活性が大きく低下する (細胞レベル)

次に細胞外アデニンヌクレオチド分解に関わる各酵素において、亜鉛欠乏による活性への影響を検討した。DT40 細胞において各酵素を安定的に過剰発現させた細胞株を樹立し、亜鉛欠乏培地中で 24 時間培養した後、膜サンプルを用いて各酵素の活性を測定することとした。酵素としては、亜鉛要求性酵素である ENPP1、ENPP3、および CD73 に加え、非亜鉛要求性酵素である CD39、PAP について解析した。DT40 細胞では内在性の TNAP (Tnap) が発現しており、安定的に過剰発現させた TNAP の酵素活性が亜鉛欠乏培養によって著しく低下することがすでに報告されている⁷⁶ため、TNAP について過剰発現系での詳細な解析を行う必要がないと考えた。尚、亜鉛欠乏培地は Chelex 100 resin (CX) を用いて作製した。

亜鉛要求性酵素である ENPP1、ENPP3、CD73 を安定発現させた細胞株において、そ

それぞれの酵素活性を測定した結果、亜鉛欠乏培地での培養によりいずれの酵素においても、各酵素活性が有意に低下していた (Figure 4. a-c)。尚、それぞれの酵素の発現量をイムノブロット (immunoblotting, IB) によって確認したところ、いずれの酵素の発現量も低下していなかった (Figure 4. a-c)。またこの活性の低下は、亜鉛欠乏培地にあらかじめ亜鉛を添加した培地中での培養では見られなかったことから、亜鉛量の違いによって引き起こされていると考えられた。

続いて非亜鉛要求性酵素である CD39 または PAP を安定的に過剰発現させた DT40 細胞株において、それぞれの酵素活性および、内因的に発現する Tnap の酵素活性を測定した。その結果、亜鉛欠乏培地中での培養により CD39 および、PAP の活性はほとんど変化しなかったが、内在性の Tnap 活性は顕著に低下した (Figure 5. a-d)。

これらの結果より DT40 細胞において過剰発現系において、細胞外アデニンヌクレオチド分解に関わる亜鉛要求性酵素の活性は、亜鉛欠乏によって低下することが明らかとなった。

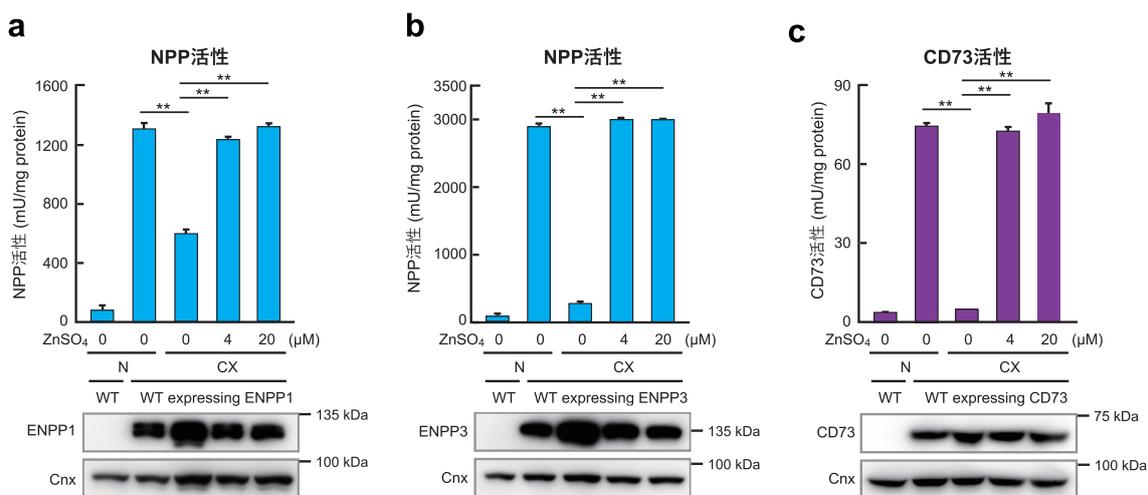


Figure 4. 亜鉛欠乏による、過剰発現させた ENPP1、ENPP3、CD73 の活性低下

(a) ENPP1、(b) ENPP3、(c) CD73 をそれぞれ DT40 細胞に安定的に過剰発現させた細胞株を用い、膜サンプルにおける各酵素活性および酵素タンパク質の発現量を、各酵素活性測定法と IB によって解析した。(a-c) N は通常培地を、CX は亜鉛欠乏培地を表し、野生型株 (WT) にそれぞれの酵素を発現させた細胞株において、N、CX、CX に終濃度 4 μM または 20 μM の亜鉛を添加した培地で 24 時間培養後の酵素活性、発現量をそれぞれ解析した。尚、ローディングコントロールとしてカルネキシンを用いた。

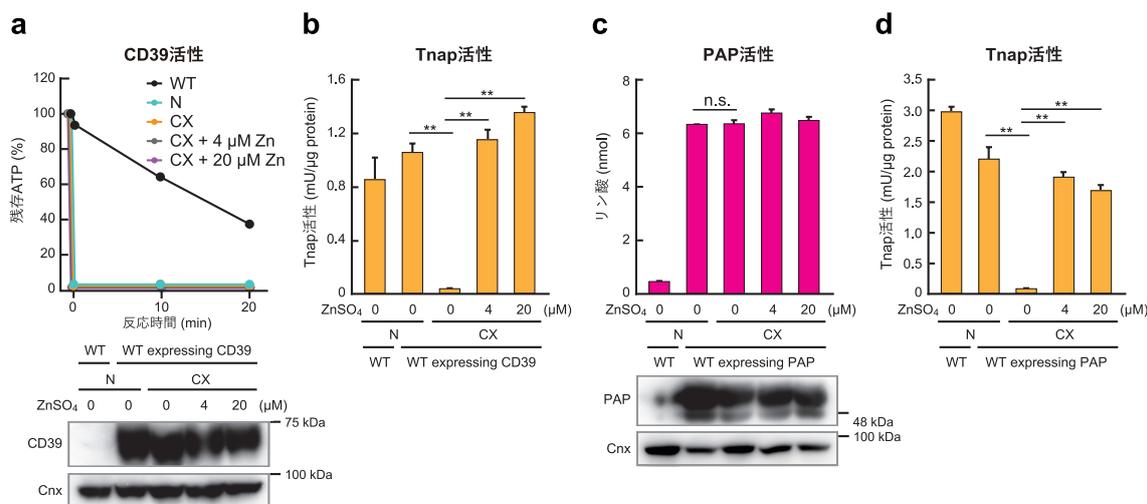


Figure 5. 亜鉛欠乏による、過剰発現させた CD39 および PAP の酵素活性への影響

(a) CD39 を DT40 細胞に安定的に過剰発現させた細胞株の膜サンプルにおける、CD39 活性および CD39 の発現量。(b) (a)における内在性の TNAP (Tnap) 活性。(c) PAP を安定的に過剰発現させた場合の PAP 活性。(d) (c)における内在性の TNAP (Tnap) 活性。(a-d) N は通常培地を、CX は亜鉛欠乏培地を表し、野生型株 (WT) にそれぞれの酵素を発現させた細胞株において、N、CX、CX に終濃度 4 μM または 20 μM の亜鉛を添加した培地で 24 時間培養後の酵素活性、発現量をそれぞれ解析した。尚、ローディングコントロールとしてカルネキシンを用いた。

次に、亜鉛欠乏培地中での培養によって亜鉛要求性酵素の活性を低下させた後、亜鉛を再添加することで活性が回復するか解析した。24 時間の亜鉛欠乏によって低下した ENPP1、ENPP3、CD73 の活性は、20 μM の亜鉛の再添加によって、24 時間後には通常培地中での培養と同程度まで回復した (Figure 6. a-c)。この結果より、亜鉛要求性酵素は亜鉛栄養状態に迅速に応答していることが細胞レベルの解析で明らかとなった。

続いて、ヒト培養細胞における内在性の酵素についても同様の結果が得られるのか、種々の培養細胞を用いて解析を行った。まず様々な組織由来のヒト培養細胞として、HAP1、HepG2、HT-29、KU-812、PANC-1、THP-1 細胞を用意し、CD39、CD73、ENPP1、ENPP3、PAP、また ALP のアイソザイムとして TNAP と PLAP の発現量を IB によって解析した (Figure 7)。その結果、細胞によって酵素の発現パターンは異なっており、それぞれ異なった亜鉛要求性の細胞外アデニンヌクレオチド分解酵素を強く発現することが明らかとなった。そしてこの解析結果をもとに、HAP1 では TNAP を、HepG2 では ENPP1 と ENPP3 を、HT-29 と KU-812 では ENPP3 を、PANC-1 と THP-1 では CD73 を、

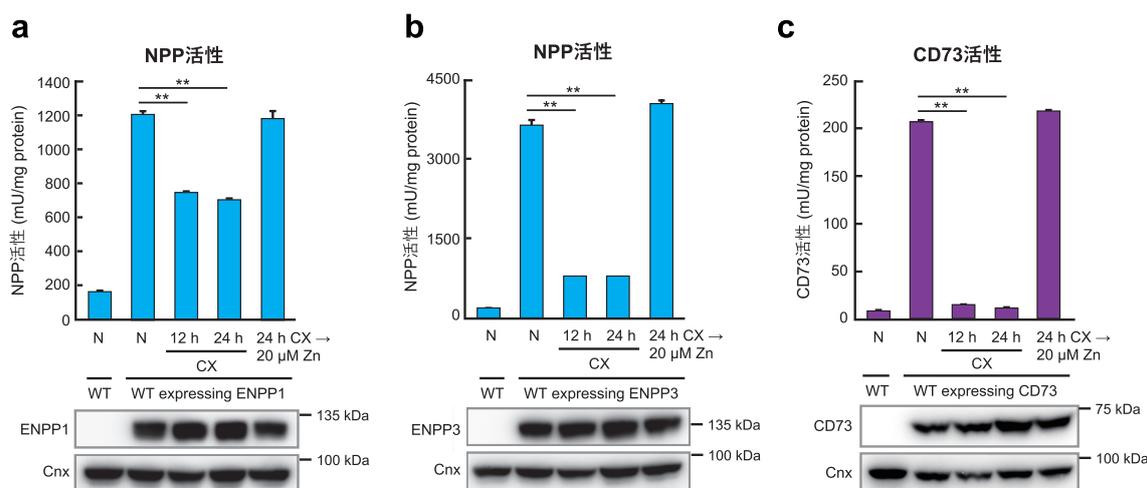


Figure 6. 亜鉛欠乏によって低下した酵素活性の、亜鉛の再添加による回復

(a) ENPP1、(b) ENPP3、(c) CD73 をそれぞれ DT40 細胞に安定的に過剰発現させた細胞株を用い、膜サンプルにおける各酵素活性および酵素タンパク質の発現量を、各酵素活性測定法と IB によって解析した。(a-c) N は通常培地を、CX は亜鉛欠乏培地を表し、野生型株 (WT) にそれぞれの酵素を発現させた細胞株において、N、CX 処理 12 時間、CX 処理 24 時間、CX 処理 24 時間後に終濃度 20 μM の亜鉛を再添加し、24 時間培養した後の酵素活性、発現量をそれぞれ解析した。尚、ローディングコントロールとしてカルネキシンを用いた。

特に発現量の高い亜鉛要求性の細胞外アデニンヌクレオチド分解酵素と見做して、続く解析を進めた。

DT40 細胞での過剰発現系での解析と同様に、種々の細胞を亜鉛欠乏培地中で 24 時間培養した後、膜サンプルを用いて各酵素活性を測定した。その結果、いずれの細胞においても酵素の活性低下が認められた (Figure 8)。また IB によって酵素の発現量を確認したところ、亜鉛欠乏による発現量の変化は認められなかった (Figure 8)。

また亜鉛欠乏培地中での培養によって、細胞に毒性などの障害を与え、その影響で酵素活性を低下させている可能性が考えられた。そこで亜鉛欠乏によって各培養細胞の生育に影響を及ぼすのかどうか、Alamar Blue アッセイによって検討した。24 時間の亜鉛欠乏培地中での培養によって、DT40 細胞でのみ軽度 (約 20%) の生育の阻害が認められたが、他のヒト培養細胞株では亜鉛欠乏による生育阻害は認められなかった (Figure 9)。これらの結果から、亜鉛欠乏による亜鉛要求性酵素の活性低下は、細胞毒性に起因するものではないと考えられた。

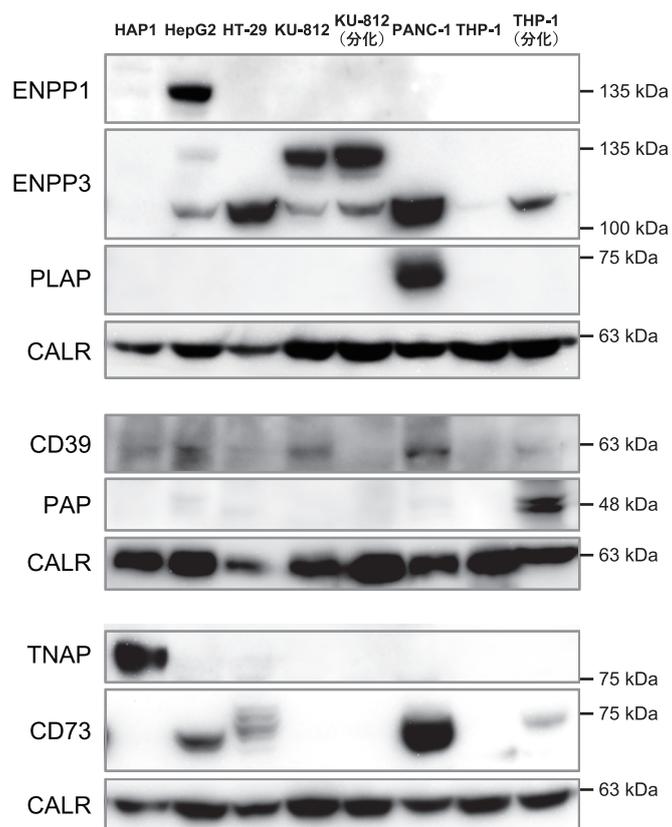


Figure 7. ヒト培養細胞株での、細胞外アデニンヌクレオチド分解に関わる酵素の IB 解析

HAP1、HepG2、HT-29、KU-812、PANC-1、THP-1 細胞の膜サンプルを用いて、細胞外アデニンヌクレオチド分解に関わる各酵素の内因的な発現量を IB によって解析した。KU-812 細胞では無血清培地中での 72 時間の培養によって、THP-1 細胞では終濃度 30 nM の phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を 48 時間処理することによって KU-812 は好塩基球様に、THP-1 はマクロファージ様に分化させた細胞においても解析した。尚、ローディングコントロールとして calreticulin (CALR) を用いた。

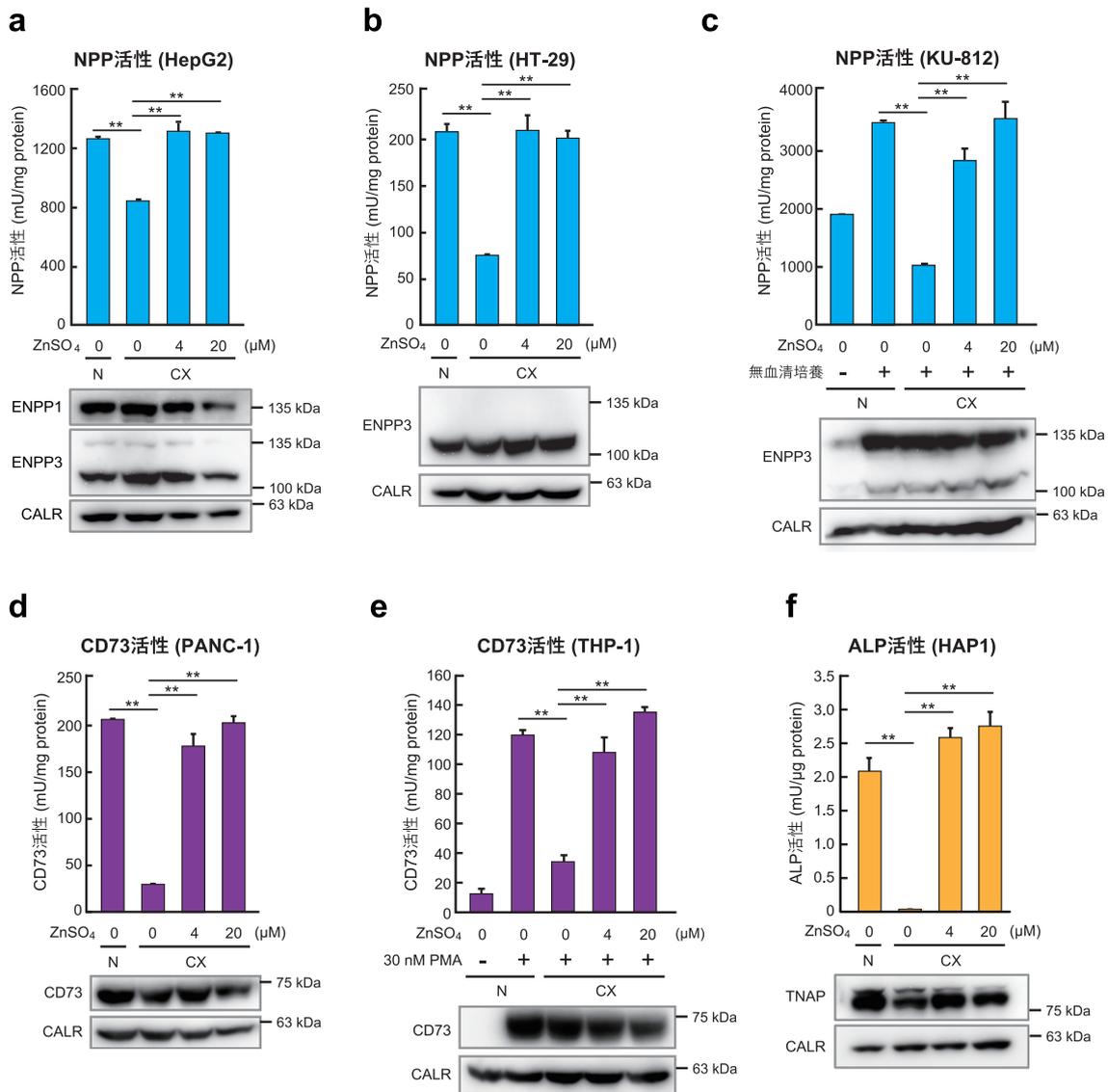


Figure 8. ヒト培養細胞における、亜鉛欠乏による内在性の ENPP、CD73、ALP (TNAP) の活性低下

(a) HepG2、(b) HT-29、(c) KU-812、(d) PANC-1、(e) THP-1、(f) HAP1 細胞の膜サンプルにおける、それぞれの酵素活性および酵素タンパク質の発現量を、各酵素活性測定法と IB によって解析した。(a-f) N は通常培地を、CX は亜鉛欠乏培地を表し、N、CX、CX に終濃度 4 μM または 20 μM の亜鉛を添加した培地で 24 時間培養後の酵素活性、発現量をそれぞれ解析した。また、(c) の KU-812 細胞では 72 時間の無血清培地での培養、(e) の THP-1 細胞では 48 時間の PMA 処理により、分化させた細胞を用いて亜鉛欠乏の影響について検討した。尚、ローディングコントロールとして CALR を用いた。

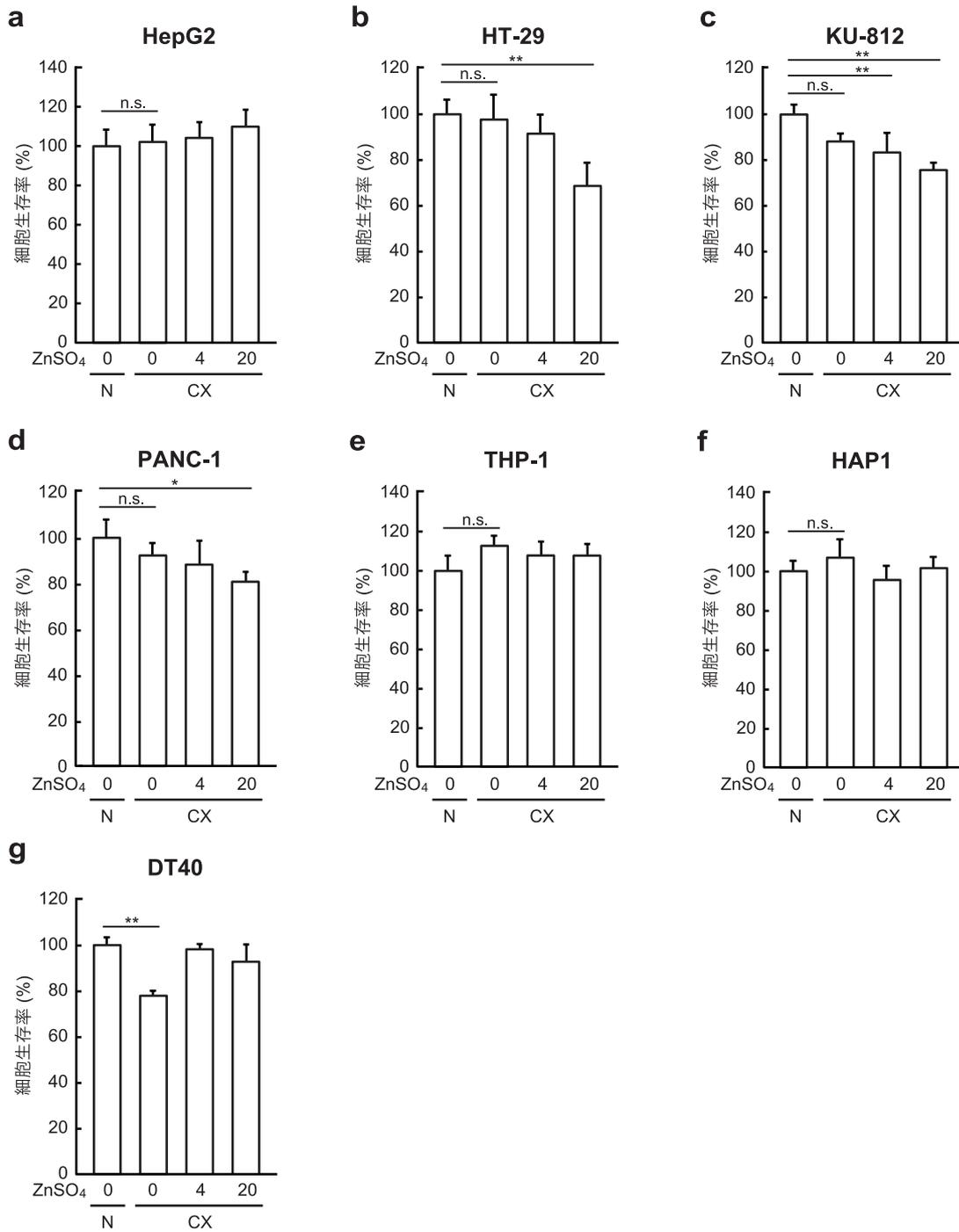


Figure 9. 各培養細胞における、亜鉛欠乏による細胞毒性の影響

(a) HepG2、(b) HT-29、(c) KU-812、(d) PANC-1、(e) THP-1、(f) HAP1、(g) DT40 細胞において、亜鉛欠乏による細胞生存率への影響を Alamar Blue アッセイにより検討した。(a-g) N は通常培地を、CX は亜鉛欠乏培地を表し、N、CX、CX に終濃度 4 μM または 20 μM の亜鉛を添加した培地で 24 時間培養後、N を 100% として細胞生存率を算出した。また(c)の KU-812 細胞と(e)の THP-1 細胞では、分化させた細胞を用いた。

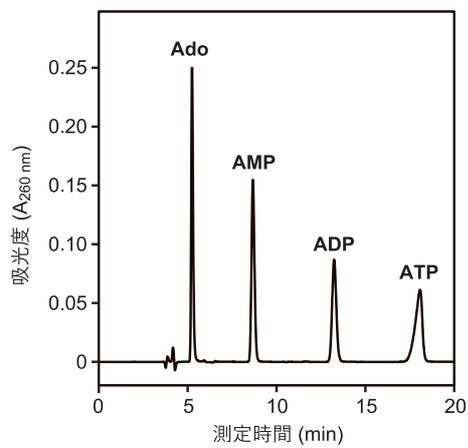
亜鉛欠乏による各酵素活性の低下は、実際に細胞外 ATP 代謝の遅延を引き起こす（細胞レベル）

ここまでの解析により、種々の培養細胞株において亜鉛欠乏は細胞外アデニンヌクレオチド分解に関わる亜鉛要求性酵素の活性を低下させることが示された。本研究では次に、亜鉛欠乏によるこれらの酵素活性の低下が、実際に細胞外 ATP 代謝にどのように影響するのかについて検討を進めた。

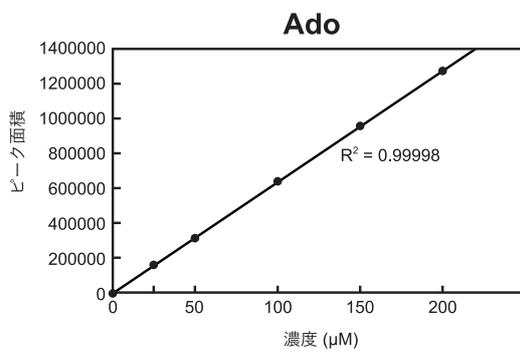
まず細胞外 ATP 代謝を正確に評価するため、高速液体クロマトグラフィー（high performance liquid chromatography, HPLC）による各アデニンヌクレオチドの分離・定量系を樹立した（Figure 10. a）。HPLC によって各アデニンヌクレオチド（ATP、ADP、AMP）および Ado は完全に分離され、ピーク面積と濃度は極めて高い相関（ $R^2 > 0.9999$ ）で比例したことから、この解析系によって ATP、ADP、AMP および Ado の正確な定量が可能であると考えられた（Figure 10. b-e）。

各培養細胞における細胞外 ATP 代謝の評価を行うため、細胞の膜サンプルに ATP を加え、一定時間反応させた後、残存する ATP および生じた ADP、AMP、Ado をそれぞれ定量し、細胞外 ATP 代謝の指標として用いることとした。酵素活性の場合と同様に、それぞれのヒト培養細胞株を通常培地、亜鉛欠乏培地、そして $4\ \mu\text{M}$ と $20\ \mu\text{M}$ の亜鉛添加培地中で 24 時間培養した後、膜サンプルを回収し、細胞外 ATP 代謝の評価を行った。その結果、いずれの培養細胞株においても、亜鉛欠乏培地での培養によって残存する ATP および生じた ADP の量が増加し、Ado の産生量が低下していた（Figure 11）。この結果より、亜鉛欠乏によって細胞外アデニンヌクレオチド分解に関わる亜鉛要求性酵素の活性が低下し、全体としての細胞外 ATP 代謝が遅延していることが示された。またこの亜鉛欠乏による ATP、ADP、AMP および Ado 量への影響の程度は、細胞によって異なっていた。

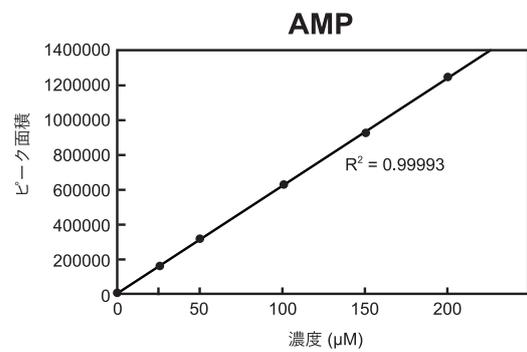
a



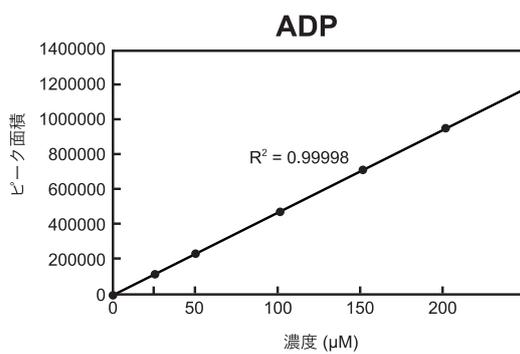
b



c



d



e

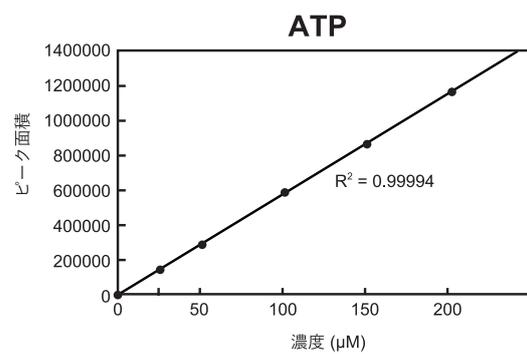


Figure 10. HPLC 解析による各アデニンヌクレオチドおよびアデノシンの分離・定量系

(a) ATP、ADP、AMP、Ado の標準混合溶液 (150 μM) を HPLC によって分離した解析におけるクロマトグラム。(b-e) ATP、ADP、AMP、Ado をそれぞれ 0、25、50、100、150、200 μM の各濃度に調整した溶液を分析し、クロマトグラムにおけるピーク面積と濃度の相関において検量線を作成した。

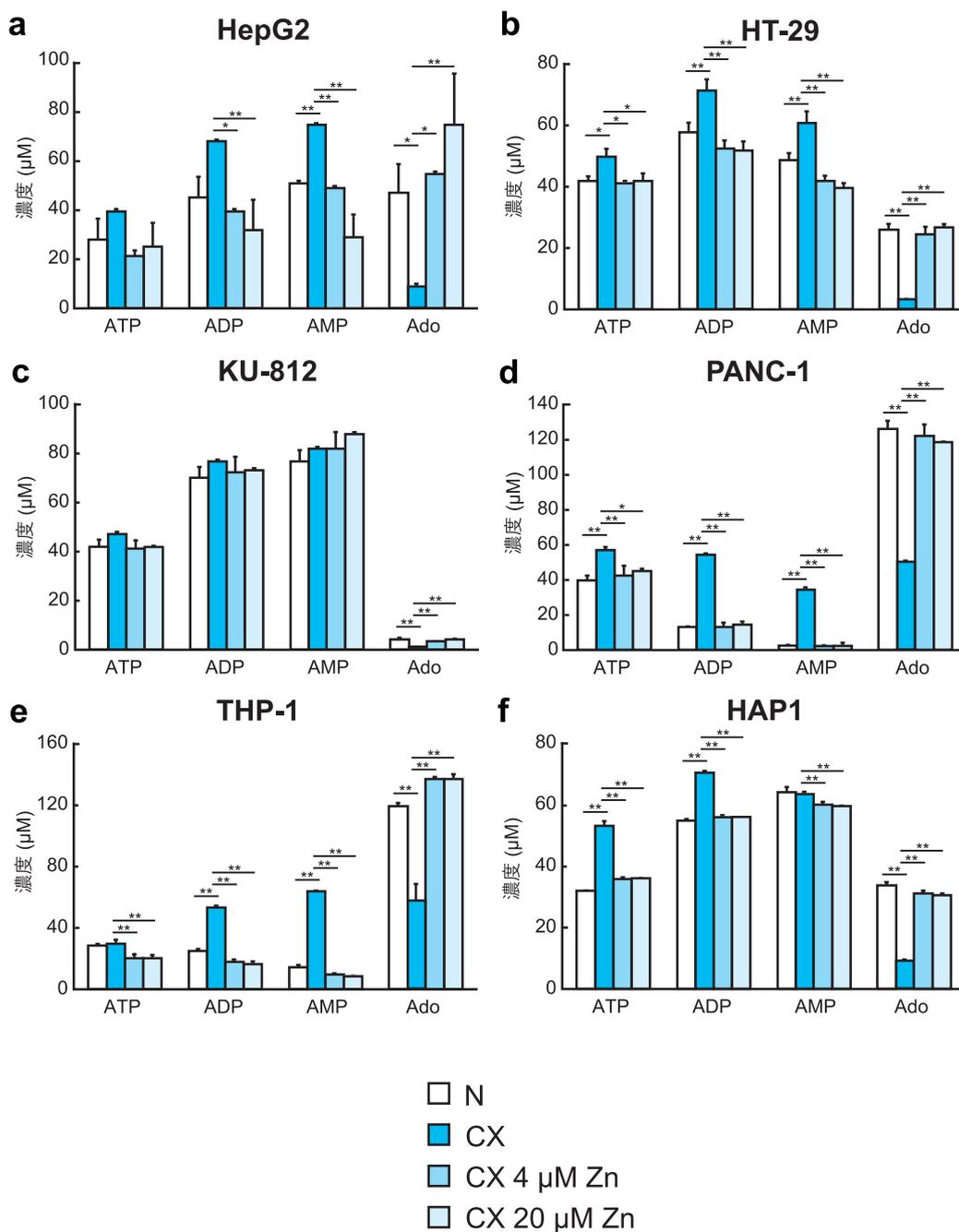


Figure 11. 亜鉛欠乏による細胞外 ATP 代謝の遅延 (細胞レベル)

(a) HepG2、(b) HT-29、(c) KU-812、(d) PANC-1、(e) THP-1、(f) HAP1 細胞の膜サンプルを用いて、200 μM の ATP を分解させた後、HPLC 解析によって ATP、ADP、AMP、Ado を定量した。(a-f) N は通常培地を、CX は亜鉛欠乏培地を表し、N、CX、CX に終濃度 4 μM または 20 μM の亜鉛を添加した培地で 24 時間培養後の膜サンプルを用いた。また(c)の KU-812 細胞と(e)の THP-1 細胞では、分化させた細胞を用いた。

次に DT40 細胞においても同様の解析を行った結果、亜鉛欠乏によって ATP と ADP の量が顕著に増加したほか、Ado の産生量が 90%以上減少した (Figure 12. a)。続いて DT40 細胞において、亜鉛要求性でない酵素である CD39、PAP を安定的に過剰発現させた細胞株を用意し、同様の解析を行った。まず CD39 過剰発現株では、亜鉛欠乏培地での培養においても、ATP と ADP は完全に加水分解されていたが、Ado 産生は著しく弱められていた (Figure 12. b)。また PAP 過剰発現株では、野生型株に比べて僅かに AMP 量が減少し、Ado 産生量が増加していたが、亜鉛欠乏培地での培養によって、Ado 産生量はやはり顕著に減少した (Figure 12. c)。また DT40 細胞において細胞外 ATP 代謝に関わる各酵素の mRNA の発現量を reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) によって解析したところ、DT40 細胞は亜鉛要求性酵素として内在性の *tnap* (*TNAP*) が強く発現していることが明らかとなった (Figure 13)。これらの結果より、DT40 細胞に

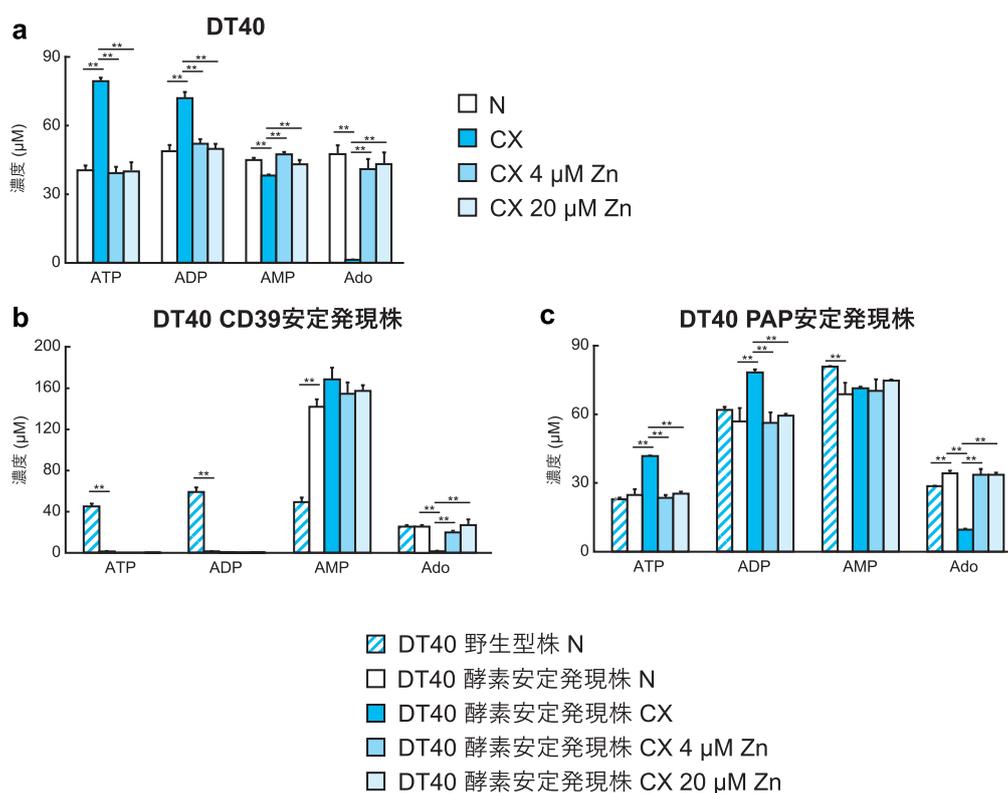


Figure 12. CD39、PAP が細胞外 ATP 代謝に及ぼす影響

(a) DT40 細胞の膜サンプルを用いて、200 μM の ATP を分解させた後、HPLC 解析によって ATP、ADP、AMP、Ado を定量した。(b) CD39 または(c) PAP を DT40 細胞に安定的に過剰発現させた細胞の膜サンプルを用いて、同様の解析を行った結果。(a-c) N は通常培地を、CX は亜鉛欠乏培地を表し、N、CX、CX に終濃度 4 μM または 20 μM の亜鉛を添加した培地で 24 時間培養後の膜サンプルを用いた。

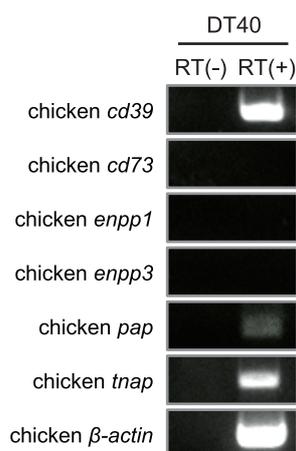


Figure 13. ヒト培養細胞株での、細胞外アデニンヌクレオチド分解に関わる酵素の IB 解析

RT-PCR により、細胞外 ATP 代謝に関わる *cd39* (*CD39*)、*cd73* (*CD73*)、*enpp1* (*ENPP1*)、*enpp3* (*ENPP3*)、*pap* (*PAP*)、*tnap* (*TNAP*) の DT40 細胞における mRNA の発現量を解析した。RT-PCR におけるネガティブコントロールとして、RT(-) (逆転写酵素なし) を用いた。polymerase chain reaction (PCR) におけるサイクル数は、いずれも 35 サイクルとして解析した。またコントロールとして β -*actin* を用いた。

における Ado 産生では Tnap (TNAP) の寄与が大きく、過剰発現させた CD39、および PAP が Ado 産生に及ぼす影響は軽微であることが示唆された。

ラット生体においても、亜鉛欠乏による酵素活性の低下を介した細胞外 ATP 代謝の遅延が引き起こされる

ここまで培養細胞を用いた解析結果から、亜鉛欠乏によって細胞外アデニンヌクレオチド分解に関わる亜鉛要求性酵素の活性が低下し、細胞外 ATP 代謝の遅延が引き起こされることを見出してきた。そこで次に、生体レベルでも同様の結果が得られるか、ラットを用いて解析した。またこの解析は、東北大学農学研究科駒井三千夫教授との共同研究で行った。

4 週齢のラットを 4 群に分け、33.7 mg/kg の亜鉛が含まれている通常食または、4 mg/kg、6 mg/kg、8 mg/kg の亜鉛が含まれている低亜鉛食をそれぞれ 10 日間給餌した。また今回の解析対象の亜鉛要求性酵素である ENPP、CD73、ALP は、いずれも膜貫通領域や GPI アンカーの切断により、血中に放出されることが知られている^{27,28,36,66}。そこでそれぞれの食餌を与えたラットから血液を回収し、血漿化したサンプル中の、各酵素活性 (ENPP、CD73、ALP)、ATP 分解活性、および亜鉛量を測定した。その結果、血漿中の

亜鉛量および、いずれの酵素活性も低亜鉛食の給餌によって有意に低下した (Figure 14. a-d)。また ATP 分解活性も低下しており、残存する ATP の量が有意に増加していた (Figure 14. e)。さらに同じ血漿サンプルを用いて、ATP の分解によって生じた ADP、AMP、Ado の定量による HPLC 解析を行った。その結果、低亜鉛食を給餌したラット群では、有意に ATP、ADP の量が増加し、産生される Ado の量が低下していた (Figure 14. f)。このようにラット生体においても、培養細胞の場合と同様に、亜鉛欠乏によって亜鉛要求性酵素の活性が低下し、その低下に伴って細胞外 ATP 代謝が遅延することが明らかとなった。

ラット生体において、各亜鉛要求性酵素の活性は亜鉛栄養状態を反映する

さらに興味深いことに、Figure 14 の結果において、亜鉛欠乏による酵素活性や ATP 分解活性の低下の程度は、食餌中の亜鉛量を反映していた。そこで次に、ラット血漿中の酵素活性と、亜鉛栄養状態との関係についてより詳細に解析を進めることとした。ラットに通常食 (33.7 mg/kg) または二種類の低亜鉛食 (2.2 mg または 4.1 mg/kg) を与え、4 日間 1 日ごとに血液を回収し、その血漿中の各酵素活性、ATP 分解活性、亜鉛量の変化を測定した。その結果、低亜鉛食を給餌したラット群では、通常食群と比較して、いずれの活性も 3 日以内に低下が認められた (Figure 15. a-e)。特に血漿中 ENPP 活性は、低亜鉛食の給餌開始後、1 日で活性の低下が見られ、血漿亜鉛値に次いで鋭敏な応答を示した (Figure 15. a)。この解析結果から、細胞外アデニンヌクレオチド分解に関わる亜鉛要求性酵素の活性は、亜鉛欠乏に迅速に応答することが明らかとなった。

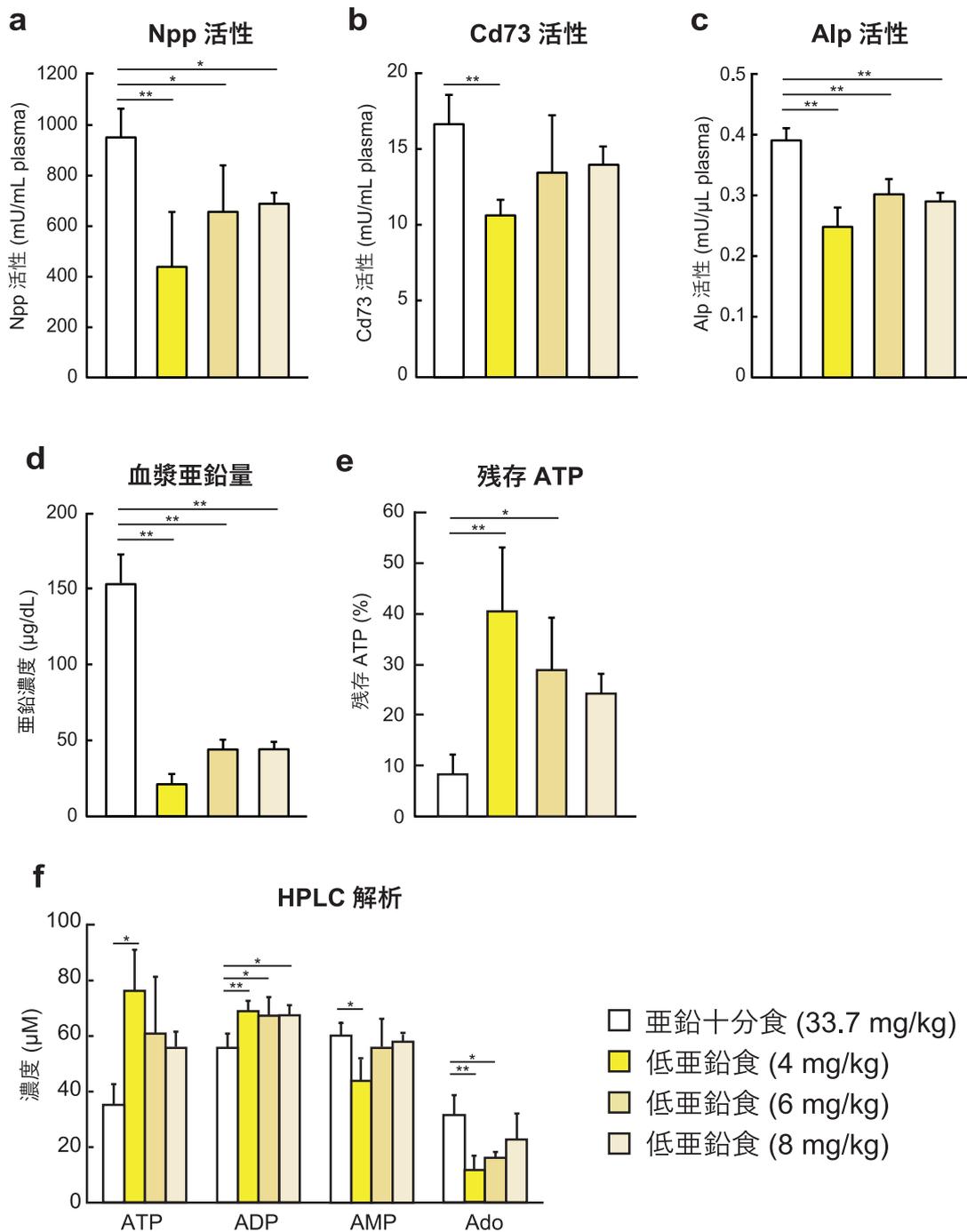


Figure 14. 低亜鉛食給餌による細胞外 ATP 代謝の遅延 (生体レベル)

(a-d) 亜鉛十分食 (33.7 mg/kg) または、3つの低亜鉛食 (4、6、8 mg/kg) を給餌したラットにおける、血漿中の(a) Npp (ENPP) 活性、(b) Cd73 (CD73) 活性、(c) Alp (ALP) 活性、および(d) 亜鉛量を測定した結果。(e) 回収した血漿を用いた ATP 分解活性。(f) HPLC 解析による細胞外 ATP 代謝の評価。

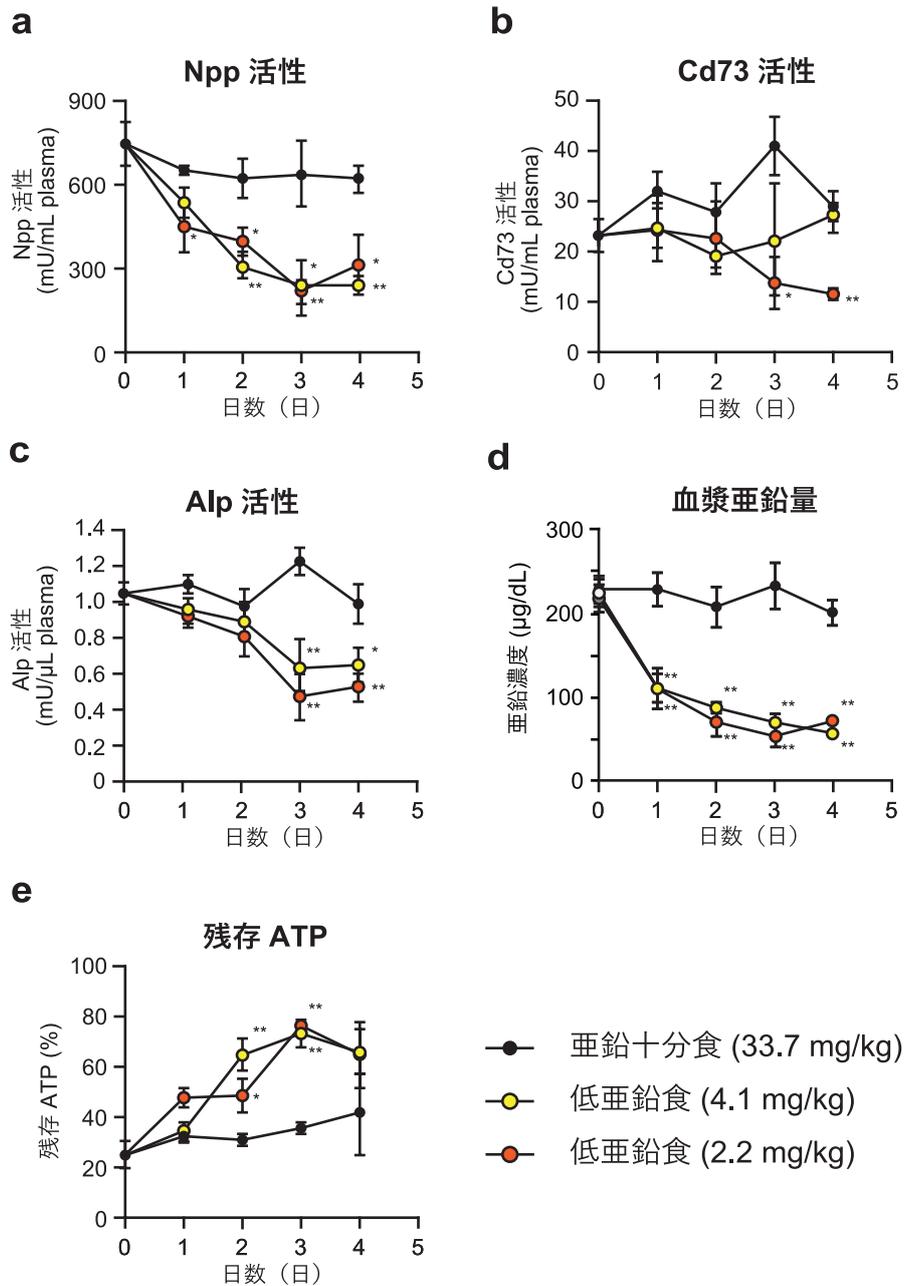


Figure 15. ラット血漿中の各酵素活性の、亜鉛欠乏への応答

(a-d) 亜鉛十分食 (33.7 mg/kg) または、2つの低亜鉛食 (2.2 または 4.1 mg/kg) を給餌したラットにおける、血漿中の(a)Npp (ENPP) 活性、(b)Cd73 (CD73) 活性、(c)Alp (ALP) 活性、および(d) 亜鉛量を1日ごとに測定した結果。(e) 回収した血漿を用いた ATP 分解活性。

続いて亜鉛欠乏状態から通常状態に回復させた際の、各酵素の応答について解析した。通常食の給餌により馴化したラットにおいて、4 mg/kg の低亜鉛食を4日間給餌した後、1日だけ通常食 (33.7 mg/kg) を与え、その間の血漿中の各酵素活性、ATP 分解活性、亜鉛量の変化を解析した。その結果、低亜鉛食の給餌によって低下した各酵素活性、特に ENPP 活性および ALP 活性、ATP 分解活性は、1日の通常食の給餌によって完全に回復した (Figure 16. a-c, e)。血漿亜鉛値においても同様の回復が見られた (Figure 16. d)。

これらの解析結果から、細胞外アデニンヌクレオチド分解に関わる亜鉛要求性酵素の血漿中の活性は、ラット生体において亜鉛栄養状態を迅速かつ正確に反映していることが示された。

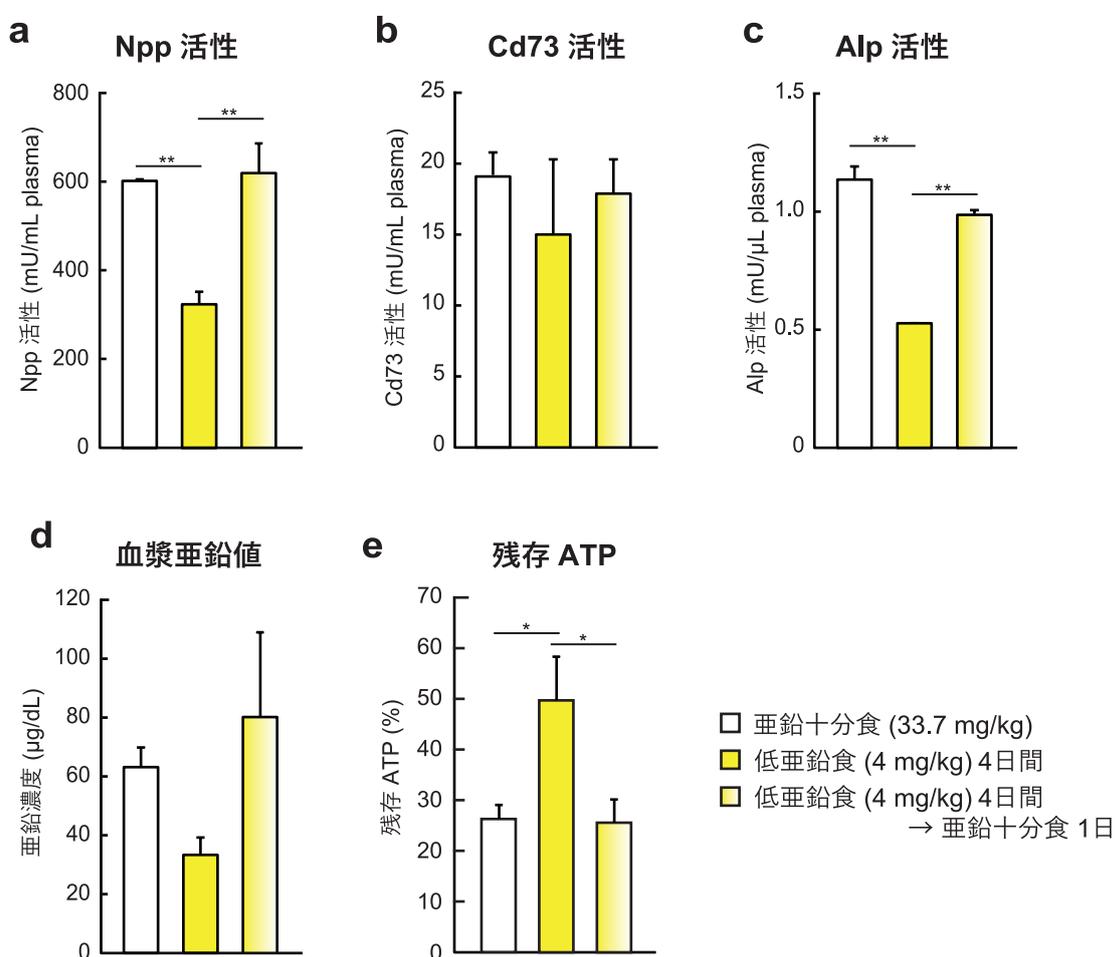


Figure 16. 低下した各酵素活性の、亜鉛十分食給餌による回復

(a-d) 4 mg/kg の低亜鉛食を4日間給餌した後、亜鉛十分食 (33.7 mg/kg) を1日給餌したラットにおける、血漿中の(a) Npp (ENPP) 活性、(b) Cd73 (CD73) 活性、(c) Alp (ALP) 活性、および(d) 亜鉛量の変化。(e) 回収した血漿を用いた ATP 分解活性。

2. 細胞外 ATP 代謝に関わる亜鉛要求性酵素の活性化機構に関する解析

分泌型亜鉛要求性酵素の活性化には、生合成過程での亜鉛獲得が必要である

各亜鉛要求性酵素の亜鉛獲得による活性化機構について解析するため、1. の解析において通常食 (33.7 mg/kg) を与えたラットと、2.2 mg/kg の低亜鉛食を 4 日間与えたラットから回収した血漿に、終濃度 20 μM となるように亜鉛を添加後、24 時間静置し、血漿中の酵素活性に変化があるか調査した。その結果、いずれの活性 (ALP、CD73、ENPP、ATP 分解) においても、亜鉛を添加したことによる回復は認められなかった (Figure 17)。

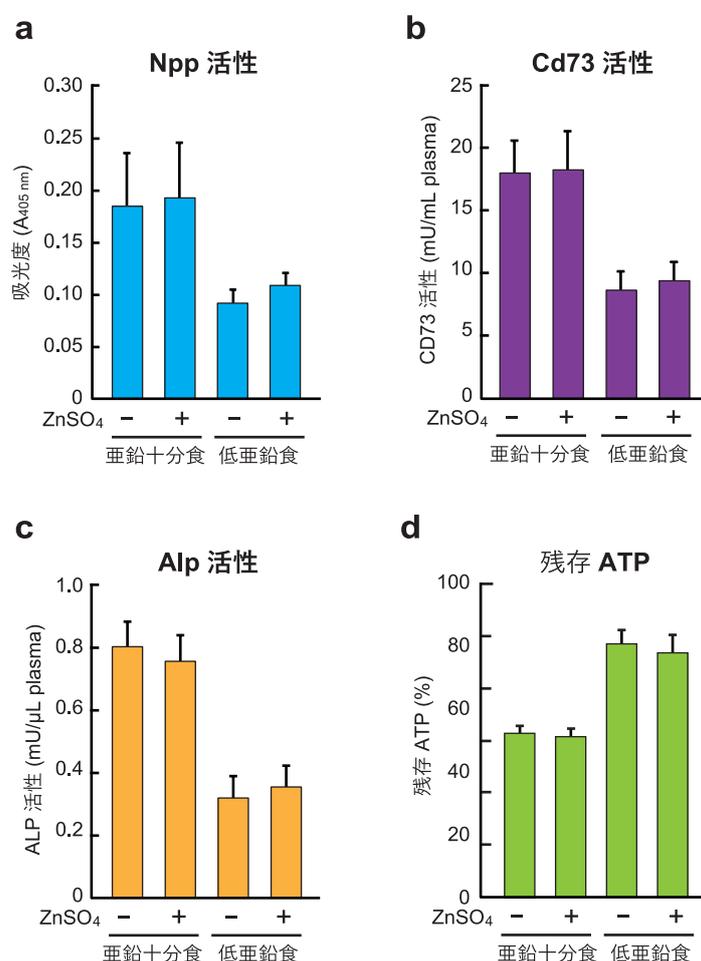


Figure 17. ラット血漿への亜鉛添加による、各酵素活性への影響

(a-d) 亜鉛十分食 (33.7 mg/kg) または低亜鉛食 (2.2 mg/kg) を 4 日間給餌したラットの血漿に、終濃度 20 μM の亜鉛を添加し 24 時間静置し、溶液中の(a) Npp (ENPP) 活性、(b) Cd73 (CD73) 活性、(c) Alp (ALP) 活性、(d) ATP 分解活性を測定した結果。

また同様に、各酵素を安定的に過剰発現させた DT40 細胞株において、通常培地または亜鉛欠乏培地中で培養した後、回収した膜サンプルに終濃度 20 μ M の亜鉛を添加し、4 時間静置後の各酵素活性を測定した。その結果、細胞レベルの解析においても、亜鉛添加による亜鉛要求性酵素の活性の回復は認められなかった (Figure 18)。

これらの結果より、単純に亜鉛を添加しただけでは酵素が亜鉛を獲得できておらず、分泌型亜鉛要求性酵素の活性化には、初期分泌経路における生合成過程での亜鉛獲得が必要であると考えられた。

細胞外 ATP 代謝に関わる各亜鉛要求性酵素の活性化機構は、酵素によって異なる

初期分泌経路での亜鉛獲得機構を解析するため、ZNT 複合体を介した分泌型亜鉛要求性酵素の活性化機構に着目した。ZNT5、ZNT6、ZNT7 を欠損させた TKO 細胞において、安定発現させた TNAP の活性、および TNAP タンパク質は消失することが明らかとなっている^{76,78,79}。そこで次に、まだ解析されていない CD73 や ENPP においても、同様の結果が得られるのか検討した。DT40 の野生型株または TKO 株において、CD73、ENPP1、ENPP3 を安定的に過剰発現させ、各酵素活性およびタンパク質の発現量を解析した。その結果、ENPP1 または ENPP3 を TKO 株に発現させたところ、野生型株に発現させた場合と比較して活性の消失や低下は認められず、ENPP1 または ENPP3 タンパク質も消失しなかった (Figure 19. a, b)。一方で、CD73 は、TNAP と同様に TKO 細胞において活性が消失しており、mRNA は発現しているにも関わらず、CD73 タンパク質は消失していた (Figure 19. c)。以上の結果より、CD73 は TNAP と同様の活性化機構を有しており、初期分泌経路において ZNT5-ZNT6 ヘテロダイマーまたは ZNT7 ホモダイマーを介して亜鉛を獲得し、活性化されるが、ENPP1 や ENPP3 では異なった経路から亜鉛を獲得することができると考えられた。

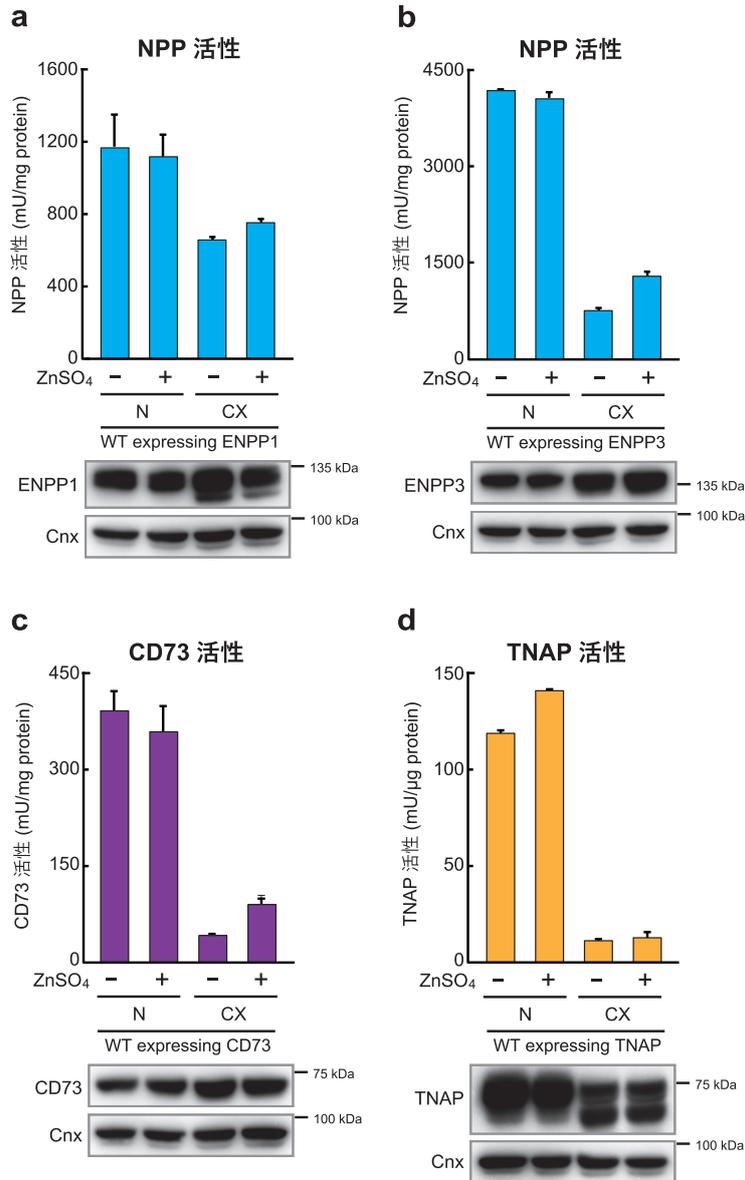


Figure 18. 膜サンプルへの亜鉛添加による、各酵素活性への影響

(a) ENPP1、(b) ENPP3、(c) CD73、(d)TNAP を安定的に過剰発現させた DT40 細胞を、通常培地 (N) または亜鉛欠乏培地 (CX) 中で 24 時間培養後、膜サンプルに終濃度 20 μ M の亜鉛を添加し 4 時間静置後、各サンプル中の各酵素活性を測定した結果。各酵素およびローディングコントロールとして用いたカルネキシンの発現量を IB で確認している。

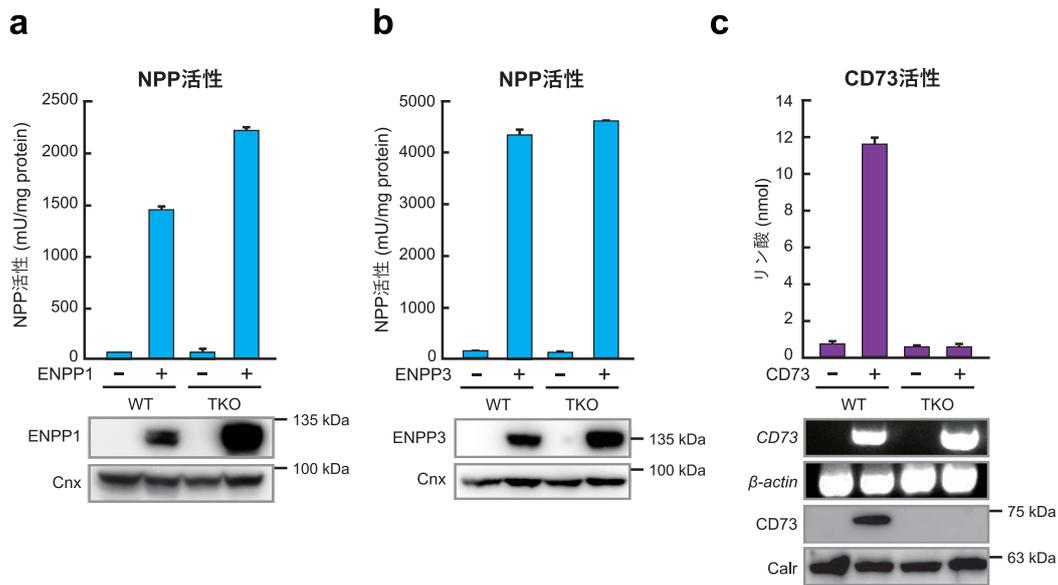


Figure 19. ZNT 複合体欠損による、ENPP1、ENPP3、CD73 への影響

(a-d) DT40 細胞の野生型株 (WT) または ZNT5、ZNT6、ZNT7 を欠損させた TKO 細胞 (TKO) に(a)ENPP1、(b)ENPP3、(c) CD73 を安定的に過剰発現させた細胞株の膜サンプルにおける各酵素活性と、酵素の発現量を解析した。(c) CD73 では酵素タンパク質が消失していたため、RT-PCR によって *CD73* mRNA の発現量を確認した。(a-c) 尚、RT-PCR におけるコントロールとして *β-actin* を、IB におけるローディングコントロールとしてカルネキシンを用いた。

ZNT5-ZNT6 ヘテロダイマーまたは ZNT7 ホモダイマー以外の経路で活性化される分泌型亜鉛要求性酵素として、これまでに CAIX の活性化機構が報告されている⁸⁰。CAIX の活性化には、ZNT5、ZNT6、ZNT7 に加え、ZNT4 が関与することが明らかとなっており、さらにこれら 4 つの ZNT を欠損させた細胞においても安定発現させた CAIX 活性は完全には消失しないことから、さらに別の経路からも亜鉛を獲得している可能性も示されている⁸⁰。そこで ENPP1 や ENPP3 においても、同様の機構で活性化されているのか検討するため、ZNT5、ZNT6、ZNT7 に加え、ZNT4 も欠損させた QKO 株においてこれらの酵素を安定的に発現させ、酵素の活性や発現量の変化を解析した。その結果、QKO 株においても ENPP1 や ENPP3 の酵素活性、タンパク質発現量ともに減少や消失は認められず、野生型株の場合と同程度であった (Figure 20. a, b)。また、QKO 株に発現させた ENPP1 や ENPP3 の酵素活性は、亜鉛欠乏培地での培養によって顕著に減少することから、これらの酵素は確かに亜鉛の獲得によって活性化されていることが示された (Figure 20. c, d)。よって、ENPP1 および ENPP3 は ZNT5、ZNT6、ZNT7 に加え、ZNT4 にも依存しない経路で亜鉛を獲得し、活性化されることが明らかとなった。

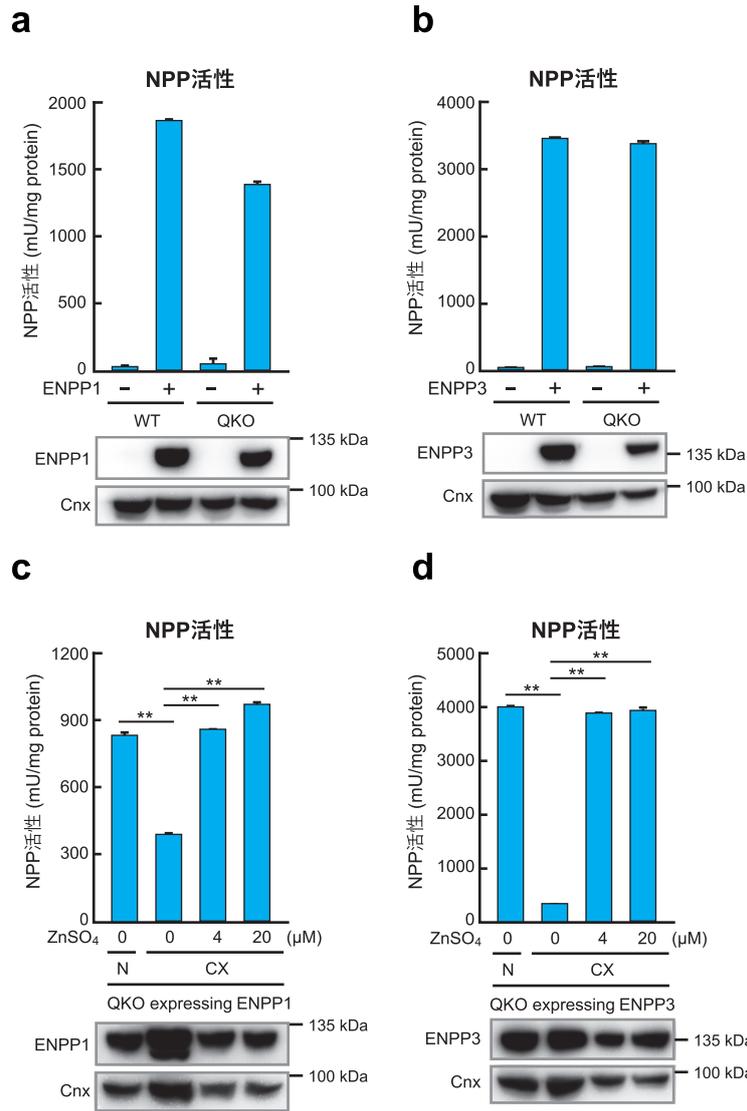


Figure 20. ZNT4、ZNT5、ZNT6、ZNT7 四重欠損による ENPP1、ENPP3 への影響

(a, b) DT40 細胞の野生型株 (WT) または ZNT4、ZNT5、ZNT6、ZNT7 を欠損させた QKO 細胞 (QKO) に (a) ENPP1、(b) ENPP3 を安定的に過剰発現させた細胞株の膜サンプルにおける各酵素活性と、酵素の発現量を調査した。(c, d) QKO 株に (c) ENPP1 または (d) ENPP3 を発現させた細胞において、亜鉛欠乏による酵素活性および酵素タンパク質の発現量を解析した結果。N は通常培地を、CX は亜鉛欠乏培地を表し、N、CX、CX に終濃度 4 μM または 20 μM の亜鉛を添加した培地で 24 時間培養後の酵素活性、発現量をそれぞれ解析した。尚、ローディングコントロールとしてカルネキシンを用いた。

ENPP1、ENPP2、ENPP3 における活性化機構、構造およびアミノ酸配列の比較

ここまでの解析から、ENPP1、ENPP3 は ZNT4、ZNT5、ZNT6、ZNT7 いずれの ZNT にも依存しない経路で亜鉛を獲得し、活性化されることが明らかとなった。しかし、ENPP1、ENPP3 と高い相同性を持つ酵素である ENPP2 は、ZNT5-ZNT6 ヘテロダイマーまたは ZNT7 ホモダイマーに依存した活性を示すことが報告されている⁸⁰。このように、同じ ENPP ファミリー内で相同性の高い酵素であるにも関わらず、ZNT 複合体への依存性が異なる要因を突き止めるため、ENPP1、ENPP2、ENPP3 のアミノ酸配列および構造の比較を行った。まず、Clustal Omega Multiple Sequence Alignment による、ENPP1、ENPP2、ENPP3 間でのアミノ配列の比較を行った (Figure 21)。また、ENPP1、ENPP2、ENPP3 の結晶構造はすでに解明されている^{51,52,81-84}。

これまでの結晶構造の解析から、ENPP1 と ENPP3 の持つ NPP 活性と、ENPP2 の lysoPLD 活性を厳密に区別する構造的な違いとして、特異的なループ構造 (Insertion Loop (IL) 領域) の有無が基質認識の違いに起因すると示唆されている⁵¹。ENPP1 および ENPP3 では、活性中心近傍に位置する 20 アミノ酸程度の IL 領域が存在する (Figure 21)。しかし ENPP2 ではこの IL 領域の欠失により、大きな基質を認識できる空間が生まれ、リゾホスファチジルコリンのような大きな基質を分解する、lysoPLD 活性の発揮が可能となると考えられている⁵¹。またアミノ酸配列の比較から、IL 領域以外に ENPP1、ENPP3 と ENPP2 とで異なっている領域として、機能不明の新たなループ構造 (Variable Loop (VL) 領域) を見出した (Figure 21)。

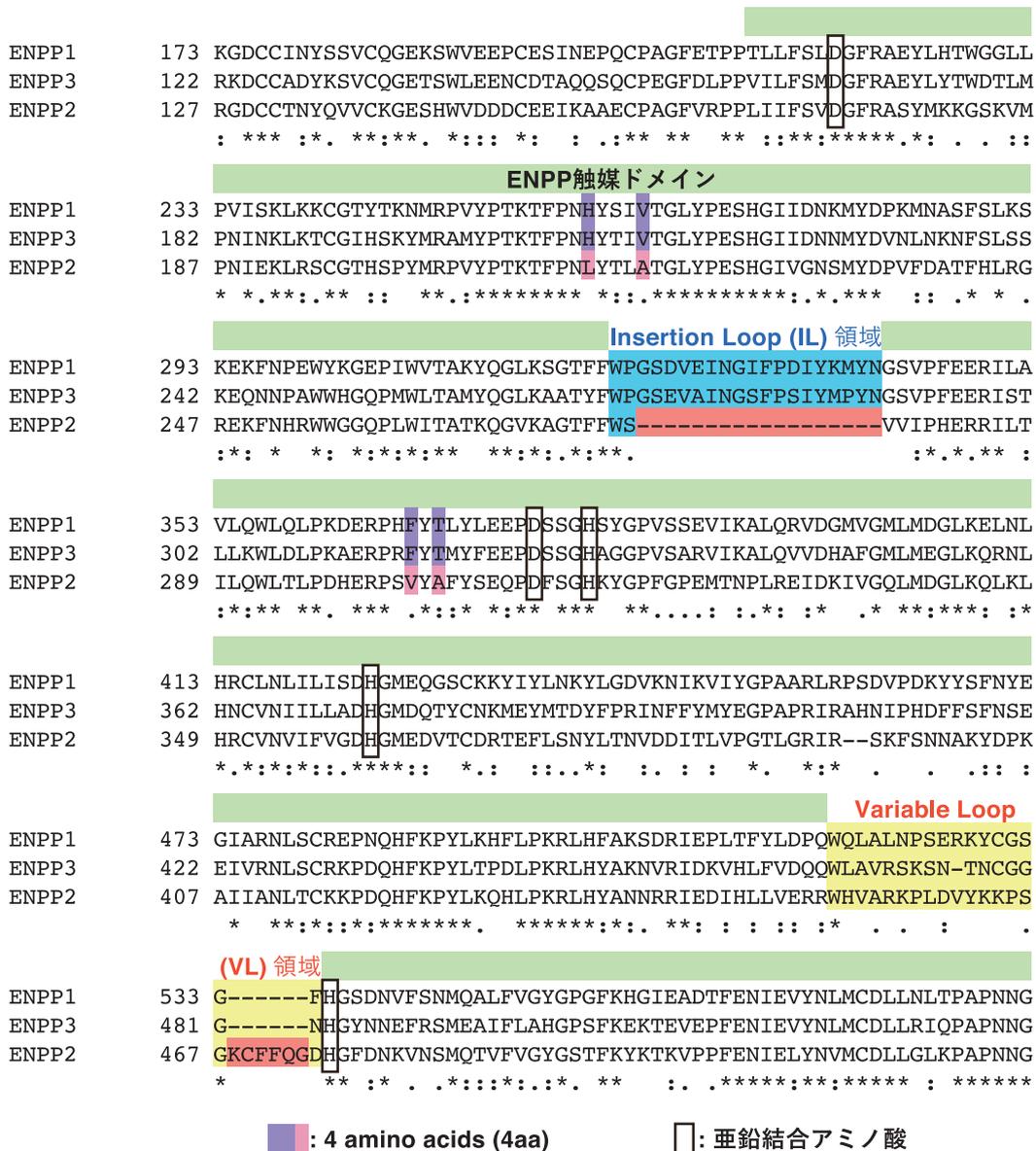


Figure 21. ENPP1、ENPP2、ENPP3 における、アミノ酸配列のアラインメント比較

ヒト ENPP1、ヒト ENPP2、ヒト ENPP3 の、触媒ドメインのアミノ酸配列における、Clustal Omega Multiple Sequence Alignment を用いたアラインメント比較。Insertion Loop (IL) 領域、Variable Loop (VL) 領域、4 amino acids (4aa) を着色し、活性中心における亜鉛結合アミノ酸を黒線で囲った。

NPP 活性を示す ENPP2 変異体の作製

野生型の ENPP2 では、ENPP1 や ENPP3 に比べて顕著に低い NPP 活性しか示すことができない (Figure 22. a)。本研究では、ENPP2 の基質特異性を変えることで、ENPP2 で

は極めて弱い活性しか持たない NPP 活性を示すことが可能となった ENPP2 変異体では、ZNT 複合体に対する酵素活性の依存性がどのように変化するか検討することとした。そこで ENPP2 において、IL 領域や VL 領域を ENPP3 と同一の配列に組換えた変異体を複数作製し、それらの変異体を DT40 細胞に安定的に過剰発現させた株における NPP 活性を測定した。その結果、IL 領域のみを ENPP3 のものに組換えた変異体 (ENPP2_(IL)) では NPP 活性が確認されなかった (Figure 22. b)。そこで IL 領域に加え、IL 領域と相互作用する 4 つのアミノ酸⁵¹ (4 amino acids, 4aa) (Figure 21) を ENPP1 や ENPP3 と同一のアミノ酸に置換した変異体 (ENPP2_(IL,4aa)) を作製し、解析したところ、有意に強い NPP 活性が認められた (Figure 22. b)。また IL 領域と VL 領域を組換えた変異体 (ENPP2_(IL,VL)) では、NPP 活性の増大は認められなかった (Figure 22. b)。

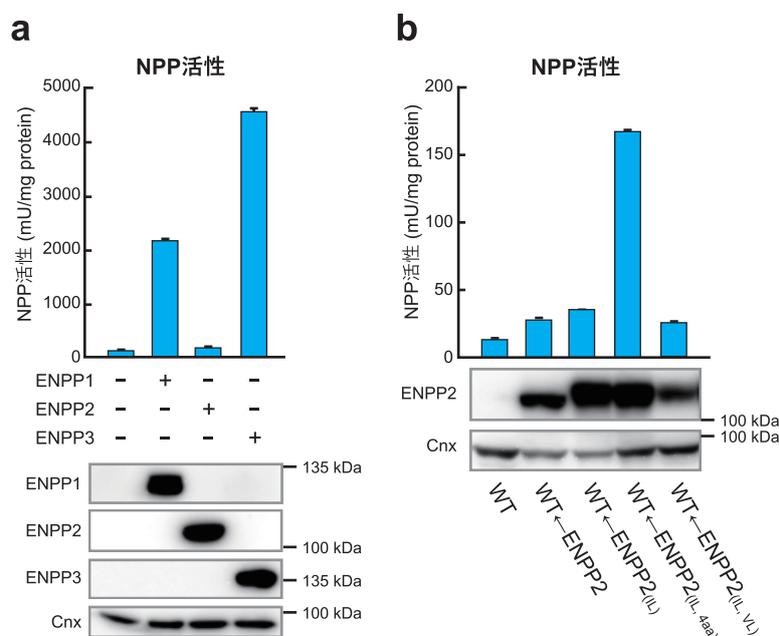


Figure 22. ENPP1、ENPP2、ENPP3 および ENPP2 変異体における NPP 活性

(a) DT40 細胞の野生型株 (WT) および ENPP1、ENPP2、ENPP3 をそれぞれ安定的に過剰発現させた株の膜サンプルにおいて、NPP 活性を測定した結果。(b) DT40 細胞の野生型株 (WT) および ENPP2 の各変異体を安定的に過剰発現させた株の膜サンプルにおいて、NPP 活性を測定した。(a, b) 尚、発現させた酵素およびローディングコントロールとして用いたカルネキシンの発現量を IB で確認した。

ENPP2 変異体の NPP 活性は、ZNT 複合体に依存しない

続いてこの NPP 活性を示す ENPP2_(IL,4aa) において、ZNT5-ZNT6 ヘテロダイマーおよび ZNT7 ホモダイマーへの酵素活性の依存性を検討するため、DT40 細胞の野生型および TKO 株に ENPP2_(IL,4aa) を安定的に過剰発現させ、酵素の活性や発現量を解析した。その結果、ENPP2_(IL,4aa) では TKO 株での発現によっても酵素活性が消失せず、ENPP2 ではなく ENPP1 や ENPP3 と同様の、ZNT 複合体に依存しない活性化機構を持つことが示された (Figure 23)。

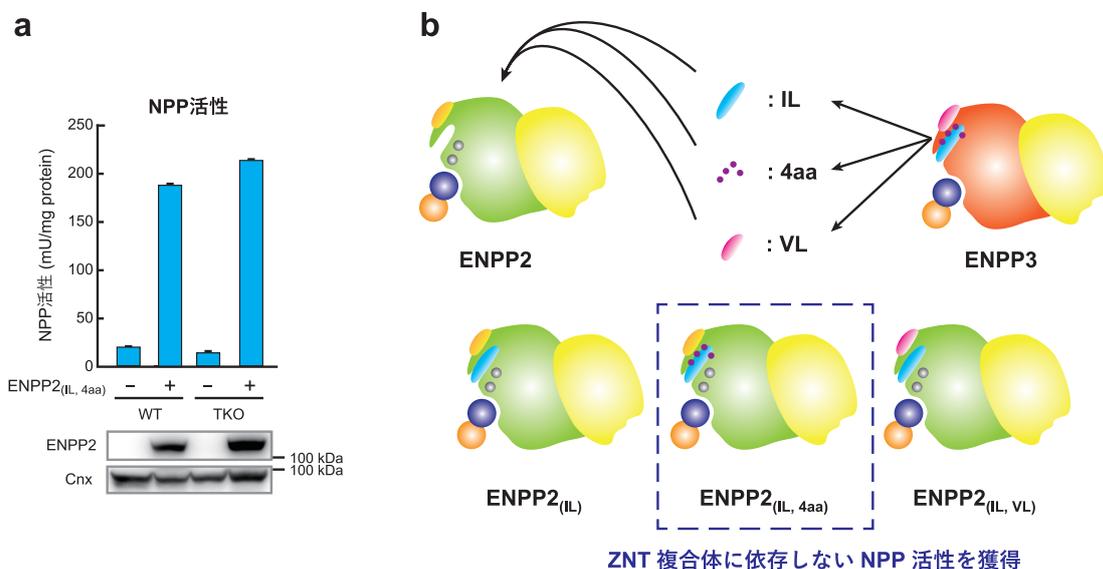


Figure 23. ENPP2_(IL,4aa) の ZNT 複合体への依存性

(a) DT40 細胞の野生型株 (WT) または ZNT5、ZNT6、ZNT7 を欠損させた TKO 細胞 (TKO) に ENPP2_(IL,4aa) を安定的に過剰発現させた細胞株の膜サンプルにおける各酵素活性と、酵素の発現量を解析した。ローディングコントロールとしてカルネキシンを用いた。(b) ENPP2 変異体の解析についての概要図。ENPP2 において ENPP3 の IL 領域と 4aa 領域を導入することで、ZNT 複合体に依存しない NPP 活性を付与することができた。

考察

本研究で用いた手法の意義について

本研究では、細胞における膜サンプル、またはラット血漿に含まれる酵素を用いた生化学的な解析により、主に二つの方法で亜鉛欠乏が細胞外 ATP 代謝に与える影響を検討した。一つ目が、細胞外アデニンヌクレオチド分解に関わる各亜鉛要求性酵素（ALP（TNAP）、CD73、ENPP）の活性測定法、そして二つ目が、過剰量の ATP を分解させ、分解後の各アデニンヌクレオチドまたはアデノシンを HPLC によって分離・定量する、細胞外 ATP 代謝の直接的な評価法である。

安定的に酵素を過剰発現させた DT40 細胞、内因的に各酵素を発現する各ヒト培養細胞株、また酵素を含むラット血漿を用いた解析により、細胞外アデニンヌクレオチド分解に関わる亜鉛要求性酵素、ALP（TNAP）、CD73、ENPP の活性は、亜鉛欠乏によって有意に低下し、細胞外 ATP 代謝が遅延することが示された。また培養細胞の解析において、ウシ胎児血清を Chelex 100 resin（CX）で処理することによって亜鉛欠乏培地を調製した。CX は亜鉛以外にも、鉄などの二価金属イオンも吸着する性質を持つ。しかし CX 処理による酵素活性の低下は、亜鉛を添加することで回復させることが出来たため、他の金属イオンではなく亜鉛欠乏の影響によるものであると考えられる。また CX 処理によって作製した亜鉛欠乏培地を用いた解析は、N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine に代表される亜鉛キレート剤の添加によって、強制的に亜鉛の利用能を阻害する解析に比べ、より生理的な亜鉛欠乏条件に近い実験系であることが期待できる。さらにラットを用いた解析において、様々な亜鉛量の低亜鉛食（2.2~8 mg/kg）の給餌による影響を検討したことで、各亜鉛要求性酵素は、亜鉛量の違いを反映した活性値を示すこと、また 8 mg/kg の低亜鉛食給餌のような、軽度の亜鉛欠乏状態においても、血漿中の各酵素活性が有意に低下し、それに伴う細胞外 ATP 代謝の遅延が引き起こされることが見出された。

亜鉛欠乏と細胞外 ATP 代謝との関連について

本研究のような、亜鉛欠乏と細胞外 ATP 代謝との関連について亜鉛要求性酵素の機能に着目して進められた研究は、これまでに報告がなかった。しかし亜鉛欠乏症による症状は、細胞外 ATP 代謝の破綻による症状と一部共通することが示唆されていた。

生体内で亜鉛は痛みを緩和する作用があることが知られ、亜鉛欠乏と舌痛症などの疾

患は関連することが報告されている^{85,86}。細胞外で ATP や ADP は痛みのシグナル分子として機能し、アデノシンは痛みを緩和する作用があることが知られている^{87,88}。また亜鉛は炎症を抑える作用があり、亜鉛の欠乏は炎症性サイトカインの増加などを引き起こし、炎症を亢進させる⁸⁹⁻⁹²。細胞外で ATP や ADP は、DAMPs として炎症を引き起こす一方で、アデノシンは炎症を鎮める作用があることが広く知られている^{29,31,50,93,94}。

また亜鉛欠乏と細胞外 ATP 代謝に関わる酵素の機能についての関連を例に挙げると、亜鉛は古くから創傷治癒を助け、亜鉛欠乏は治癒を阻害することが知られるが、CD73 欠損マウスにおいても創傷治癒の遅延が確認されている⁹⁵⁻⁹⁷。さらに亜鉛はノンレム睡眠を促進し、眠りの質を向上させる機能を持つことが知られる^{98,99}。またアデノシンは睡眠を促進する作用があり、CD73 欠損マウスではノンレム睡眠の抑制が起こる^{100,101}。亜鉛欠乏はアレルギー性の下痢を引き起こすが、ENPP3 欠損マウスにおいてもアレルギー性の下痢や、これに伴う体重低下が引き起こされることが報告されている^{64,102}。

さらに亜鉛欠乏症での皮膚炎の発症メカニズムとして、細胞外 ATP 代謝の破綻による影響が示唆されている。先天性の亜鉛欠乏症であり、重篤な皮膚炎を発症する腸性肢端皮膚炎 (acrodermatitis enteropathica, AE) の患者では、ランゲルハンス細胞が皮下組織において消失する¹⁰³。ランゲルハンス細胞は、CD39 を強く発現し、細胞外 ATP の除去に寄与することから、AE 患者では正常な細胞外 ATP の除去が行われないことにより、重篤な皮膚炎が発症すると考えられた¹⁰³。

このように多くの先行研究において、亜鉛欠乏症の症状と細胞外 ATP 代謝の破綻による症状は共通している。また本研究により、亜鉛欠乏は細胞外 ATP 代謝の遅延を引き起こすことが明示され、亜鉛代謝と細胞外 ATP 代謝は密接に関連しており、亜鉛欠乏症の症状においても細胞外 ATP 代謝の破綻が寄与する可能性が示唆された。

亜鉛欠乏による細胞外 ATP 代謝への影響は、細胞の種類によって異なる

各亜鉛要求性酵素を内因的に発現する、それぞれのヒト培養細胞株において、HPLC 解析による細胞外 ATP 代謝の評価を行なったところ、いずれの細胞においても亜鉛欠乏による細胞外 ATP 代謝の遅延が認められたものの、その影響の様式は細胞によって全く異なっていた (Figure 11)。例を挙げると、多くの細胞 (HepG2、HT29、PANC-1、THP-1) では亜鉛欠乏によって、ATP、ADP、AMP 量が増加し、Ado 産生量が減少している。しかし KU-812 では亜鉛欠乏の影響が極めて軽微であり、HAP1 では亜鉛欠乏によっても AMP 量にはほとんど影響していない。また亜鉛欠乏によって同じ代謝物に影響が出ている細胞間でも、影響の程度はそれぞれ異なっている。

亜鉛欠乏に対する応答性が異なる要因として、細胞外 ATP 代謝に関わる酵素の発現パターンの差異が考えられる (Figure 7)。CD39 や PAP のような亜鉛要求性でない酵素を多く発現している細胞では、亜鉛欠乏による細胞外 ATP 代謝への影響が現れにくく、逆に亜鉛要求性酵素を多く発現している細胞では亜鉛欠乏の影響を受けやすいことが予想される。また亜鉛要求性酵素である TNAP のアデニンヌクレオチド分解活性も、基質 (ATP、ADP、AMP) によって異なることが報告されているほか¹⁰⁴、今回の解析において ENPP1 と ENPP3 では亜鉛欠乏による活性低下の程度が異なっており (Figure 4, Figure 6)、亜鉛要求性酵素の発現パターンによっても亜鉛欠乏による影響の程度が異なると考えられる。

さらに本研究では、亜鉛要求性酵素の亜鉛獲得による活性化機構について解析し、これまで明らかになっていた ALP (TNAP) に加え、CD73 も ZNT5-ZNT6 ヘテロダイマーおよび ZNT7 ホモダイマーに依存した活性化機構を持ち、これらの ZNT を欠損させた細胞では CD73 が分解されることを見出している。よって、これらの ZNT も ALP や CD73 の活性化を介して細胞外 ATP 代謝に寄与していると考えられ、細胞における ZNT5、ZNT6、ZNT7 の発現パターンの違いも、亜鉛欠乏による影響の差異に寄与すると考えられた。実際、DT40 細胞でこれらの ZNT を欠損させた TKO 株において、HPLC 解析による細胞外 ATP 代謝の評価を行なったところ、TKO 株では WT 株に比べ ATP 量と ADP 量が顕著に増加し、産生される Ado 量が著しく低下していた (Figure 24)。

またこのような細胞による応答性の差は、同じ個体内でも組織によって亜鉛欠乏による影響が異なることを示唆している。すなわち、亜鉛欠乏症では亜鉛欠乏の影響が出やすい組織において、特に顕著な症状として現れているのかもしれない。

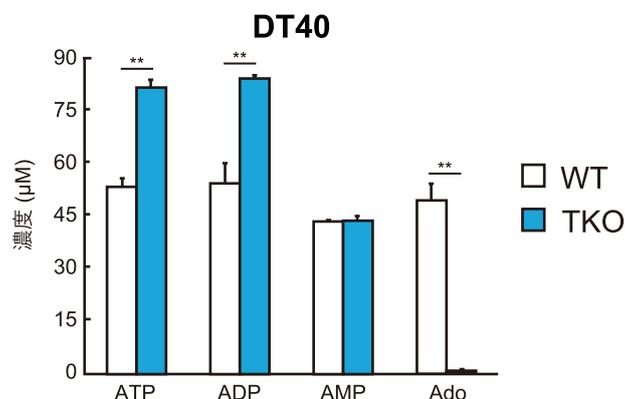


Figure 24. DT40 細胞において、ZNT 複合体の欠による損細胞外 ATP 代謝への影響

DT40 細胞の野生株 (WT) または ZNT 複合体欠損株 (TKO) の膜サンプルを用いて、200 μM の ATP を分解させた後、HPLC 解析によって ATP、ADP、AMP、Ado を定量した。

細胞外 ATP 代謝に関わる亜鉛要求性酵素の血漿中での活性値は、生体の亜鉛栄養状態を反映する

また本研究では、ラットでの低亜鉛食給餌による血漿中の各酵素活性の低下における、継時的な変化についても検討した。2 mg/kg の低亜鉛食の給餌によって、ALP、CD73、ENPP いずれの酵素活性も 3 日以内に有意に酵素活性を低下させることが明らかとなり、これらの酵素の亜鉛欠乏に対する応答は迅速に起こると考えられた (Figure 15. a-c)。特に ENPP 活性は低亜鉛食給餌後 1 日で低下し、血漿亜鉛値とよく似た変動を示した (Figure 15. a, d)。また低亜鉛食給餌による各酵素活性の低下は、1 日の亜鉛十分食の給餌により、正常状態まで回復した (Figure 16. a-c)。血中 ALP 活性値の低下は、亜鉛欠乏症の診断指針の一つとして推奨されているため²¹、今回の解析結果から、血漿中の各酵素活性や ATP 分解活性、特に迅速な応答を示した ENPP の活性は、鋭敏な亜鉛栄養状態のマーカーとして有用である可能性が示唆された。

分泌型の亜鉛要求性酵素の活性化において、ZNT 複合体への依存性はどのように決定されるのか

本研究では、CD73 および ENPP1、ENPP3 における ZNT5-ZNT6 ヘテロダイマーと ZNT7 ホモダイマー (ZNT 複合体) を介した活性化機構についても解析を進めた。先行研究により、ALP と ENPP では同一のアミノ酸 (ヒスチジン残基、アスパラギン酸残基) による類似した構造の亜鉛配位様式を持つことが示されている。さらに、ENPP1、ENPP3 と極めて相同性の高い酵素である ENPP2 は、ZNT 複合体に依存した lysoPLD 活性を示すことが報告されているため、ENPP1 と ENPP3 は ZNT 複合体に依存した活性化機構を持つことが予想された^{80,105}。しかし、ENPP1 および ENPP3 では ZNT 複合体に依存しない NPP 活性を示し、むしろ活性中心の構造の異なる CD73 において、ALP と同様の ZNT 複合体を介した活性化機構を持つことが明らかとなった (Figure 19)。しかしながら、ラット血漿や培養細胞の膜サンプルに亜鉛を添加した実験では、ENPP1、ENPP3 においても亜鉛添加によって酵素活性は回復しなかったことから、ZNT 複合体とは異なった経路から、細胞内で亜鉛を獲得する必要があると考えられた (Figure 17, Figure 18)。

そこで本研究では、ENPP1、ENPP2、ENPP3 のアミノ酸配列においてアラインメント比較を行い、ZNT 複合体への依存性を決定する領域の同定を試みた。手法としては、NPP 活性をほとんど示さない ENPP2 において、ENPP1 や ENPP3 と同等の NPP 活性を与えた場合、ZNT 複合体への依存性がどのように変化するのか調査を行なった。解析の結果、NPP 活性を付与した ENPP2 変異体 (ENPP2_(IL, 4aa)) では、ENPP1 や ENPP3 と同

様に ZNT 複合体に依存しない NPP 活性を示した。この結果より、分泌型の亜鉛要求性酵素における ZNT 複合体への依存性の違いには、亜鉛に配位するアミノ酸の違いではなく、活性中心近傍の構造的な違いによる基質特異性の違いが大きく関与することが強く示唆された。

また、この解析では野生型の ENPP2 と ENPP2_(IL, 4aa)において同じ酵素活性を比較しているわけではないため、同一の酵素における基質の種類によって ZNT 複合体への依存性が異なっている可能性を否定できない。しかし、野生型の ENPP2 と ENPP2_(IL, 4aa)共に分解できる基質である、bis(*p*-nitrophenyl) phosphate (bisNPP) を用いた酵素活性の測定では、ENPP2 は TKO 株では活性が低下しているのに対し、ENPP2_(IL, 4aa)では TKO 株においても活性を保持しており、同一の酵素の違う基質に対する活性においても、同じ ZNT 複合体への依存性を示した (Figure 25)。

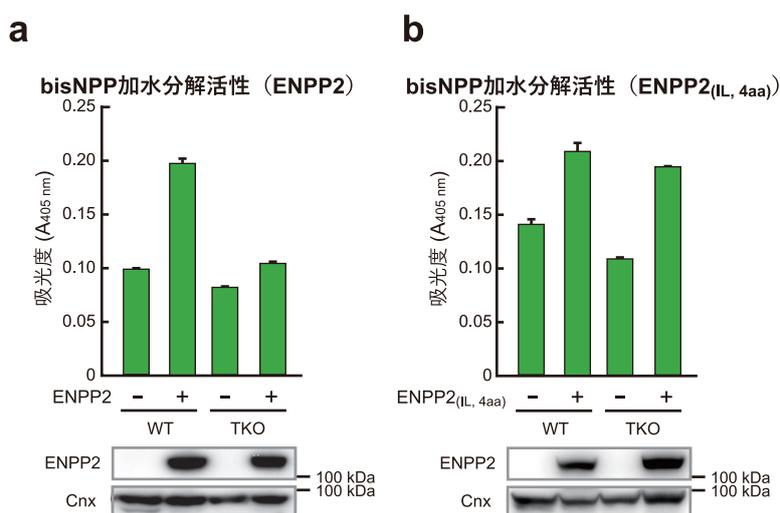


Figure 25. bisNPP に対する加水分解活性における、ENPP2 と ENPP2_(IL, 4aa)の ZNT 複合体への依存性

(a, b) DT40 細胞の野生型株 (WT) または ZNT 複合体を欠損させた細胞株 (TKO) に(a) ENPP2、(b) ENPP2_(IL, 4aa)を安定的に過剰発現させた細胞株の膜サンプルにおける bisNPP 加水分解活性と、酵素の発現量を調査した結果。ローディングコントロールとしてカルネキシンを用いた。尚、(b) で用いた膜サンプルは Figure 23 と同一であるため、同じ IB の結果を示している。

このように、分泌型の亜鉛要求性酵素の活性化機構における ZNT 複合体への依存性の決定には、亜鉛配位様式ではなく、基質特異性に関与する活性中心近傍の構造が影響することが示唆された。しかし、ZNT 複合体の欠損により ALP と CD73 では酵素タンパク質が消失するのに対して、ENPP2 では酵素タンパク質が安定に存在するなど、ZNT 複合体欠損による不活性化の機構も異なっており、ZNT 複合体による分泌型亜鉛要求性酵素の活性化機構の詳細な解明には、今後の解析が必要不可欠である。

亜鉛の生理機能について、亜鉛要求性酵素の観点から研究を進める展望

亜鉛要求性酵素は数百種類存在すると試算され、そのいくつかは亜鉛欠乏によって酵素活性が有意に低下することが報告されている^{15,106,107}。そのため亜鉛の生理機能をより詳細に明らかにするためには、亜鉛要求性酵素の関わる代謝系全体を見渡す必要があり、オーム解析などの包括的な手法が有効であると考えられる。

しかし亜鉛欠乏によって、全ての亜鉛要求性酵素が同程度に活性を減ずるわけではなく、その影響は酵素の種類や発現する組織の違いによっても異なることが示唆されている^{80,107}。よって亜鉛欠乏による代謝系への影響を正確に評価するためには、本研究のように、個々の亜鉛要求性酵素や代謝系に亜鉛欠乏の与える影響についても検討を加える必要があると考えられる。

総括

本研究では、亜鉛欠乏症と細胞外 ATP 代謝の破綻による症状の一部が共通していること、また細胞外 ATP 代謝に関わる酵素の多くが、亜鉛要求性酵素 (ALP、CD73、ENPP) であることに着目した。亜鉛欠乏によってこれらの亜鉛要求性酵素の活性や細胞外 ATP 代謝がどのように影響するのか、培養細胞およびラットを用いて生化学的な解析を進め、亜鉛欠乏によって細胞外 ATP 代謝に関わる亜鉛要求性酵素の活性は低下し、これによって細胞外 ATP 代謝の遅延が引き起こされることを見出した。この研究により、亜鉛欠乏と細胞外 ATP 代謝との生化学的な関連を明らかにしたことにより、亜鉛欠乏症での諸症状には、細胞外 ATP 代謝の破綻による、プリン作動性シグナルが寄与する可能性が示唆された (Figure 26)。

また本研究では、これらの亜鉛要求性酵素における、亜鉛獲得による活性化機構についても検討した。ALP、CD73、ENPP は細胞内での生合成過程において亜鉛を獲得することが示されたが、ZNT 複合体を欠損した細胞株を用いた解析により、その機構に関わる分子は、酵素によって異なることが見出された。

本研究成果により、亜鉛による亜鉛要求性酵素の活性制御機構の一端が明らかとなったほか、細胞外 ATP 代謝の制御という、亜鉛の新たな生理機能の解明に貢献することができた。今後ますます解析が進むことで、亜鉛が代謝系に与える影響について、より詳細な理解が進むことが期待される。

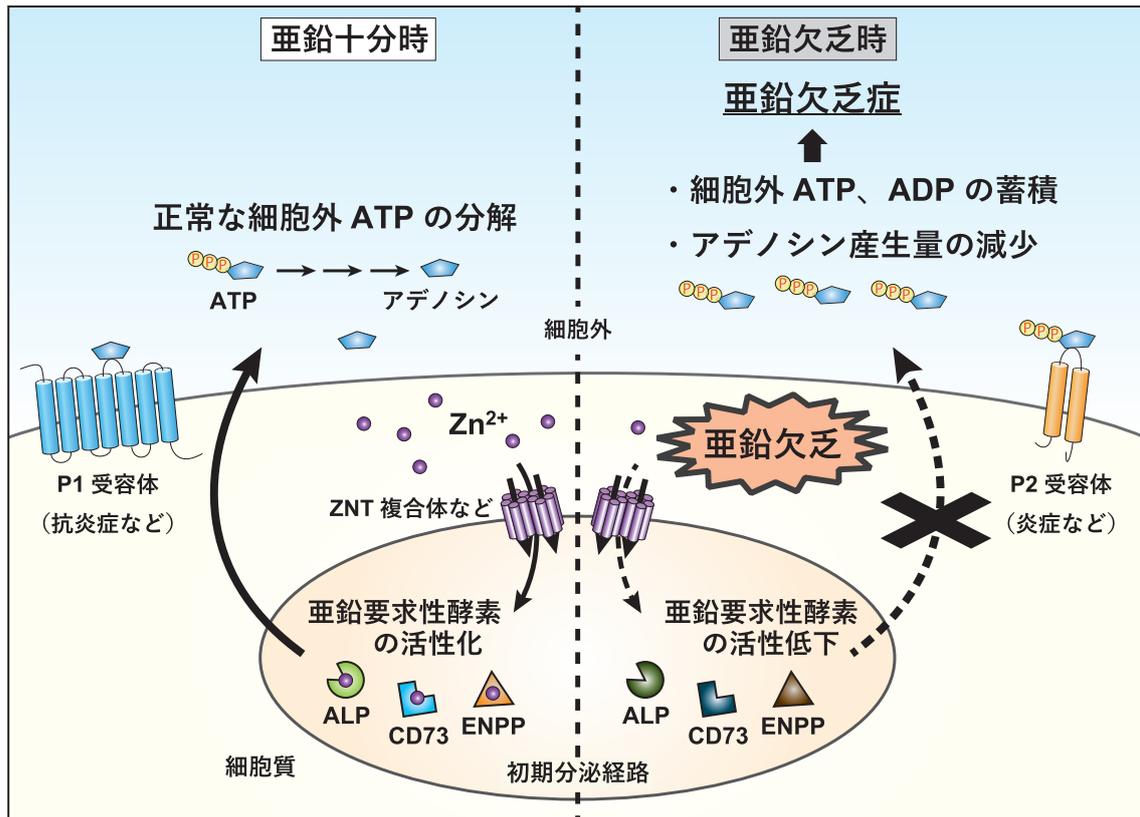


Figure 26. 本研究の示唆：亜鉛欠乏による細胞外 ATP 代謝の破綻

材料と方法

細胞培養

DT40 細胞株では 10% fetal bovine serum (FBS) (Multiser, Trace Scientific, Melbourne, Australia)、1% chicken serum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、0.1% 2-mercaptoethanol、100 unit/mL penicillin & 100 µg/mL streptomycin (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を添加した Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 培地 (Nacalai Tesque) 中で、39.5°C、5% CO₂ 条件下で細胞培養を行った。HAP1 細胞では、10% FBS、100 unit/mL penicillin & 100 µg/mL streptomycin を添加した Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) 培地 (Nacalai Tesque) 中で 37°C、5% CO₂ 条件下で細胞培養を行った。HepG2 細胞、PANC-1 細胞、HT-29 細胞は 10% FBS、100 unit/mL penicillin & 100 µg/mL streptomycin を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM) 培地 (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) 中で 37°C、5% CO₂ 条件下で細胞培養を行った。ほかの細胞では 10% FBS、100 unit/mL penicillin & 100 µg/mL streptomycin を添加した RPMI 1640 培地中で 37°C、5% CO₂ 条件下で細胞培養を行った。また KU-812 細胞の好塩基球様細胞への分化誘導には 72 時間の無血清培地での培養、THP-1 細胞のマクロファージ様細胞への分化誘導には 48 時間の 30 nM (18.5 ng/mL) の PMA 処理による方法で行った^{108,109}。

亜鉛欠乏培地は、Chelex 100 resin (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) にて 24 時間処理した FBS および chicken serum を培地に添加することで調製した。細胞レベルの解析では、播種した各培養細胞を通常培地中で 48 時間培養した後、滅菌した PBS で細胞を洗浄し、それぞれの培地中で 24 時間培養したものをを用いた。

動物実験

ラットを用いた動物実験は、東北大学農学研究科食品機能健康科学講座駒井三千夫教授との共同研究で行った。4 週齢のラット (Japan SLC, Hamamatsu, Japan) を購入後、3 日間馴化のため亜鉛十分食で飼育し、栄養実験を行った。飼料は自由摂取させ、明期 12 時間、暗期 12 時間の条件で飼育した。斬首による屠殺後、血液より得た血漿サンプルを用いて種々の活性測定に用いた。亜鉛量の測定には、原子吸光分光法を用いた¹¹⁰。

プラスミドコンストラクション

ヒト CD39 cDNA は GE Healthcare Dharmacon 社 (Buckinghamshire, UK) より購入した

もの、ヒト ENPP1 cDNA、ヒト ENPP3 cDNA は DNAFORM 社 (Tokyo, Japan) より購入したもの、ヒト CD73 は DV Biologics 社 (Costa Mesa, CA, USA) の human skeletal muscle cDNA、ヒト PAP は Cosmo Bio Co. Ltd 社 (Tokyo, Japan) の human pancreatic islet cDNA より cDNA を入手したものを pA-Puro ベクターに挿入し、遺伝子導入に用いた。ENPP2 変異体発現用のプラスミドは、PCR 法によって変異配列を挿入した cDNA を pA-Puro ベクターに挿入することで作製した。

遺伝子導入

DT40 細胞における遺伝子導入による安定発現株の樹立はエレクトロポレーション法によって行った。1.0 × 10⁷ 個の細胞に、制限酵素処理によって直鎖状にした 25 μg の標的遺伝子発現ベクターを用い、GenePulser Xcell™ (Bio-Rad) にて 550V、25 μF の条件で遺伝子導入を行い、導入した薬剤耐性を持つ株を選択し、クローン株を樹立した。薬剤には終濃度 0.5 mg/mL puromycin (InvivoGen, San Diego, CA, USA) を用いた。

細胞回収・膜サンプルの回収

細胞を PBS で洗浄後、回収した。膜サンプルの回収ではペレットを HES buffer (20 mM HEPES-NaOH、1 mM EDTA、0.25 M sucrose、pH 7.1~7.5) 1.4 mL に懸濁し、ダウンホモジナイザー (DWK Life Sciences, Millville, NJ, USA) を用いてホモジナイズした。ホモジネート溶液を 2900 × g、4°C、5 min 遠心し、上清を回収することによって細胞核を除去した。上清を 20400 × g、4°C、30 min 遠心し、沈殿を TBS でリンス洗浄し、膜サンプルとした。膜サンプルは適量の Pi buffer (10 mM Tris-HCl、500 mM MgCl₂、0.1% Nonidet P-40、pH 7.5) に溶解し、解析に用いた。

タンパク質定量

タンパク質濃度の定量には、DC™ Protein assay Kit (Bio-Rad) を用いて行った。検量線の作成には bovine γ-globulin を溶解した標準溶液 (0、250、500、1000、1500、2000 μg/mL) を用い、750 nm の吸光度測定には iMark™ microplate reader (Bio-Rad) を用いた。

ALP 活性測定

膜タンパク質 3 μg 分を含む膜サンプル、あるいは血漿 5 μL を 96 ウェルプレートの各ウェルに添加し、そこへ基質溶液 (2 mg/mL *p*-NPP (FUJIFILM Wako Pure Chemical)、1 M diethanolamine、0.5 M MgCl₂、pH 9.8) 100 μL/well を加え、室温で約 15 分間反応させ

た。iMark™ microplate reader を用いて 405 nm における吸光度を測定し、その値を基に酵素活性の定量化を行った。尚、検量線の作成には calf intestinal alkaline phosphatase (Promega, Madison, WI, USA) を用いた。

bisNPP 分解活性測定

膜タンパク質 3 μg 分を含む膜サンプルを 96 ウェルプレートの各ウェルに添加し、そこへ基質溶液 (5 mM bisNPP、50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、1 mM CaCl₂、1 mM MgCl₂、pH 8.0) 100 μL/well を加え、37°C で 1 時間反応させた。その後、iMark™ microplate reader を用いて 405 nm における吸光度を測定した。

NPP 活性測定

膜タンパク質 3 μg 分を含む膜サンプル、あるいは血漿 5 μL を 96 ウェルプレートの各ウェルに添加し、そこへ基質溶液 (0.1 mM *p*-NP-TMP (Sigma, St. Louis, MO, USA)、1 mM CaCl₂、140 mM NaCl、5 mM KCl、50 mM Tris-HCl、pH 7.5) 100 μL/well を加え、37°C で約 20 分間、または 16 時間反応させた。iMark™ microplate reader を用いて 405 nm における吸光度を測定し、その値を基に酵素活性の定量化を行った。尚、検量線の作成を行う場合は Recombinant Human ENPP-1 Protein (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用いた。

CD73 活性測定

CD73 活性の測定には 5'-Nucleotide Assay Certificate of Analysis (Diazyme Laboratories, Poway, CA, USA) を用いた。膜タンパク質 3 μg 分を含む膜サンプル、あるいは血漿 5 μL を 96 ウェルプレートの各ウェルに添加し、そこへ R1 reagent を 100 μL/well 加え、37°C で 5 分間反応させた後、R2 reagent を 50 μL/well 添加し、37°C、20 分間反応させた。Plate Reader Powerscan 4 を用いて 550 nm での吸光度を測定し、その値を基に酵素活性の定量化を行った。尚、検量線の作成には 5'-Nucleotidase Calibrator (Diazyme Laboratories) を用いた。

また、AMP から遊離したリン酸の定量による CD73 活性の測定では、膜タンパク質 5 μg 分を含む膜サンプルあるいは血漿 10 μL を 200 μL の Pi buffer に懸濁し、終濃度 2 mM の AMP を加え、37°C で 30 分間反応させた。反応液 50 μL ずつを 96 ウェルプレートに分注し、そこに Biomol Green (Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA, USA) 100 μL を添加した。室温で 10 分間振とうし、iMark™ microplate reader を用いて 595 nm の吸光度

を測定し、遊離リン酸 (Pi) の量を定量した。検量線の作成にはリン酸水素二ナトリウムを溶解した標準溶液 (0、50、100、200 μM) を用いた。

PAP 活性測定

PAP 活性の測定は AMP から遊離したリン酸の定量法により、CD73 活性測定法と同様にして行なった。

ATP 加水分解活性測定 (CD39 活性測定)

ATP 分解活性の測定には、「細胞の」ATP 測定試薬 (Toyo Beanet, Tokyo, Japan) を用いて行った。膜タンパク質 10 μg 分を含む膜サンプル、または血漿 10 μL を 900 μL の H/H buffer (終濃度 20 mM の HEPES-NaOH (pH 7.1~7.5) を添加した HBSS buffer (Ca、Mg、フェノールレッド不含) (Nacalai Tesque)) に混合し、37°Cにて 10 分間プレインキュベートした後、10 μM ATP 溶液 (H/H buffer に溶解) を 100 μL 加え (終濃度 1 μM ATP)、37°Cで反応させた。30 秒、10 分、20 分で反応液を 100 μL ずつ回収し、反応液 50 μL と 50 μL のホタルルシフェラーゼ発光試薬を混合し 10 秒後、10 秒間の相対発光強度を測定した。H/H buffer を 0%、1 μM ATP 溶液を 100%として、残存 ATP の割合を算出した。

HPLC による各アデニンヌクレオチドの定量

HPLC による各アデニンヌクレオチドおよびアデノシンの分離では、高速液体クロマトグラフ Chromaster (Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan) を用いて解析を実行した。使用カラムは Inertsil[®] ODS-SP カラム (粒子径 5 μm 、4.6 mm \times 250 mm) (GL Sciences, Tokyo, Japan)、移動相は 12.5 mM tetra-*n*-butylammonium hydroxide in 20 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 水溶液 : methanol = 65 : 35 として、流速 0.7 mL/min、カラム温度 35°Cにて、ATP、ADP、AMP、Ado の分離を行った。

膜タンパク質 10 μg 分を含む膜サンプル、または血漿 25 μL を反応溶液 (200 μM ATP 二ナトリウム、100 mM Tris-HCl、0.5 mM CaCl_2 、0.5 mM MgCl_2 、pH 7.5) 600 μL に添加し、37°Cで 2 時間反応 (DT40 細胞およびラット血漿) または 4 時間反応 (ヒト培養細胞株) させた後、同条件で各アデニンヌクレオチドおよびアデノシンの分離・定量を行った。検量線の作成には ATP、ADP、AMP、Ado の標準混合溶液を用いた。

Alamar Blue アッセイによる細胞毒性評価

HAP1 細胞 (1.0×10^3 個/100 μL)、HepG2 細胞 (5.0×10^3 個/100 μL)、HT-29 細胞 (5.0

$\times 10^3$ 個/100 μ L)、PANC-1 細胞 (5.0×10^3 個/100 μ L) を 96 ウェルプレートに播種し、通常培地中で 48 時間培養後、それぞれの培地中で 24 時間培養した。KU-812 細胞 (1.0×10^4 個/100 μ L)、THP-1 細胞 (1.0×10^4 個/100 μ L)、DT40 細胞 (1.0×10^4 個/100 μ L) では、分化誘導後または培養後、直ちに 96 ウェルプレートにて各培地中での培養を開始した。培養後、Alamar Blue 試薬 (Bio-Rad) を培地で 5 倍希釈した溶液を 50 μ L ずつ添加し、4 時間反応させ、Plate Reader Powerscan 4 (DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan) を用いて 570 nm および 600 nm の吸光度を測定した。得られた値を以下の計算式に代入し、通常培地を生存率におけるコントロール (100%) として細胞生存率を算出した。

$$\text{細胞生存率} = \{(117216 \times A1) - (80586 \times A2)\} / \{(117216 \times P1) - (80586 \times P2)\} \times 100$$

A1 = 細胞サンプルにおける 570 nm での吸光度

A2 = 細胞サンプルにおける 600 nm での吸光度

P1 = コントロールサンプルにおける 570 nm での吸光度

P2 = コントロールサンプルにおける 600 nm での吸光度

(117216 は酸化された Alamar Blue の波長 600 nm でのモル吸光係数、80586 は酸化された Alamar Blue の波長 570 nm でのモル吸光係数)

イムノブロット (immunoblotting (IB))

IB には、膜タンパク質 20 μ g 分を含む膜サンプルに、6 \times sample buffer (0.35 M Tris-HCl pH 6.8、10% sodium dodecyl sulfate (SDS)、30% glycerol、2 mM dithiothreitol) を加え、100°C で 5 分間処理し、7% のポリアクリルアミドゲルを用いて、室温、20 mA/gel の条件下で SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動後、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Millipore, Bedford, MA, USA) に 20 V、30 分の条件でタンパク質を転写した。その後、PVDF 膜をブロッキング液 (3% スキムミルクを含む PBS-T 溶液 (0.1% Tween-20/PBS)) 中で室温、1 時間ブロッキングした後、ブロッキング液に一次抗体を懸濁した溶液中で 4°C、16 時間にて一次抗体反応を行った。その後膜を PBS-T 溶液にて洗浄後、同様に二次抗体を調製した溶液中で室温、1 時間にて二次抗体反応を行った。同様に洗浄した後、Immunoblotting Western (Millipore) もしくは Chemi-Lumi One L (Nacalai Tesque) で発光させ、Image Quant LAS500 (GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA) にて画像の撮影を行った。尚、一次抗体には anti-calnexin (Enzo Life Sciences)、anti-calreticulin (Abcam, Cambridge, UK)、anti-CD39 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、

anti-CD73 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)、anti-ENPP1 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)、anti-ENPP2 (Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan)、anti-ENPP3 (Sigma)、anti-TNAP (Santa Cruz Biotechnology)、anti-PAP (Sigma)、anti-PLAP (Santa Cruz Biotechnology)を、二次抗体には horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse、-rabbit、-rat IgG (GE Healthcare)、-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology) を用い、いずれも 3000 倍に希釈して用いた。

RT-PCR

細胞回収後、Sepasol-RNA I Super G (Nacalai Tesque) 1 mL に懸濁して総 RNA を回収後、RNA 1 µg 分に対して 5 × RT Master Mix II (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて逆転写反応を行った。得られた cDNA を鋳型とし、Table 1 に示すプライマーを用いて PCR を行った。PCR におけるサイクル数は、いずれも 35 サイクルとして解析した。

Table 1. 解析に用いたプライマー

target gene	sequence (5'-3')
chicken <i>cd39</i>	F: AACAAAGGAAAATTCTACTCATACTAGGATT R: AAATTGCTGACACTTATAGTTCTCTGATAT
chicken <i>cd73</i>	F: GGGCAACCATGAATTTGATGAAGGTGTGCG R: AGCATAAGCTTGTACCACTGGCACCTTCCT
chicken <i>enpp1</i>	F: GTTTAATCCAGAGTGGTACCAAGGACAGCC R: GTGCAGTGGTTCAATCCGGTCATTATTGGC
chicken <i>enpp3</i>	F: CAAGATCATCTGTGGTGTCTGCTAGGTGC R: ATTGGTTGACCCTTCCACCATGAAGGCTGA
chicken <i>pap</i>	F: ATTACGACCGCACCATTATGAGTGCCCAGT R: TTGTGGTGTGCATGTGCAGAGTAGACCTCCA
chicken <i>tnap</i>	F: GGAGAGCCTGCTGGAGATGGACAAGTTCCC R: CTAGGAGCTGCAGTGCACGCGTTGGGGCC
chicken <i>β-actin</i>	F: GATCATGTTTGAGACCTTCAACACCCCAGC R: TGCTGATCCACATCTGCTGGAAGGTGGACA
human <i>CD73</i>	F: ACTCTAAATGTGAACAAAATTATTGCACTG R: CCTTCAGCTTCTAGGAGCCTGTAAAGATGG

統計処理

本研究における統計解析では、いずれも one-way analysis of variance (one-way ANOVA) による比較後、Tukey's test によって検定を行い、 $P > 0.05$ を有意差なし (n. s.)、 $P < 0.05$ を有意差ありとし、 $0.01 < P < 0.05$ を*、 $P < 0.01$ を**で表した。

引用文献

1. Gharibzahedi, S. M. T. & Jafari, S. M. The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation. *Trends Food Sci. Technol.*, **62**, 119–132 (2017).
2. 宮田 學. 諸疾患における亜鉛測定の意味 - 内科領域を中心として -. 亜鉛栄養治療, 第1巻, 第1号 (2010)
3. Kambe, T., Hashimoto, A. & Fujimoto, S. Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases. *Cell. Mol. Life Sci.*, **71**, 3281–3295 (2014).
4. Kambe, T., Tsuji, T., Hashimoto, A. & Itsumura, N. The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiol. Rev.*, **95**, 749–784 (2015).
5. Laity, J. H., Lee, B. M. & Wright, P. E. Zinc finger proteins: New insights into structural and functional diversity. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**, 39–46 (2001).
6. Freemont, P. S. The RING Finger: A Novel Protein Sequence Motif Related to the Zinc Finger. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **684**, 174–192 (1993).
7. Kambe, T., Takeda, T. & Nishito, Y. Activation of zinc-requiring ectoenzymes by ZnT transporters during the secretory process: Biochemical and molecular aspects. *Arch. Biochem. Biophys.*, **611**, 37–42 (2016).
8. Hojyo, S. & Fukada, T. Zinc transporters and signaling in physiology and pathogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **611**, 43–50 (2016).
9. Andreini, C., Banci, L., Bertini, I. & Rosato, A. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J. Proteome Res.*, **5**, 196–201 (2006).
10. Maret, W. & Li, Y. Coordination Dynamics of Zinc in Proteins. *Chem. Rev.*, **109**, 4682–4707 (2009)
11. Jacob, C., Maret, W. & Vallee, B. L. Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, **95**, 3489–3494 (1998).
12. Tapiero, H. & Tew, K. D. Trace elements in human physiology and pathology: Zinc and metallothioneins. *Biomed. Pharmacother.*, **57**, 399–411 (2003).
13. Kimura, T. & Kambe, T. The functions of metallothionein and ZIP and ZnT transporters: An overview and perspective. *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 336 (2016).
14. Hara, T. *et al.* Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance

- in zinc homeostasis. *J. Physiol. Sci.*, **67**, 283–301 (2017).
15. Andreini, C. & Bertini, I. A bioinformatics view of zinc enzymes. *J. Inorg. Biochem.*, **111**, 150–156 (2012).
 16. Jeloková, J., Karlsson, C., Estonius, M., Jörnvall, H. & Höög, J. -O. Features of Structural Zinc in Mammalian Alcohol Dehydrogenase: Site-Directed Mutagenesis of the Zinc Ligands. *Eur. J. Biochem.*, **225**, 1015–1019 (1994).
 17. Jörnvall, H., Persson, B. & Jeffery, J. Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases: The zinc-containing long-chain alcohol dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.*, **167**, 195–201 (1987).
 18. Natesh, R., Schwager, S. L. U., Sturrock, E. D. & Acharya, K. R. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature* **421**, 551–554 (2003).
 19. Massova, I., Kotra, L. P., Fridman, R. & Mobashery, S. Matrix metalloproteinases: Structures, evolution, and diversification. *FASEB J.*, **12**, 1075–1095 (1998).
 20. 厚生労働省. 日本人の食事摂取基準 (2015年版) . <https://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-10904750-Kenkoukyoku-Gantaisakukenkouzoushinka/0000041955.pdf>
 21. 児玉浩子 *et al.* 亜鉛欠乏症の診療指針 2018. 日本臨床栄養学会雑誌, **40**, 120–167 (2018).
 22. Tanimura, N. *et al.* GATA/Heme Multi-omics Reveals a Trace Metal-Dependent Cellular Differentiation Mechanism. *Dev. Cell.*, **46**, 581–594 (2018).
 23. Yegutkin, G. G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **49**, 473–497 (2014).
 24. Kaczmarek, A., Vandenabeele, P. & Krysko, D. V. Necroptosis: The Release of Damage-Associated Molecular Patterns and Its Physiological Relevance. *Immunity*, **38**, 209–223 (2013).
 25. Imamura, H. *et al.* Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 15651–15656 (2009).
 26. Falzoni, S., Donvito, G. & Di Virgilio, F. Detecting adenosine triphosphate in the pericellular space. *Interface Focus*, **3**, 20120101 (2013).
 27. Zimmermann, H., Zebisch, M. & Strater, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal.*, **8**, 437–502 (2012).
 28. Zimmermann, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-*

- Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **362**, 299–309 (2000).
29. Ferrari, D., McNamee, E. N., Idzko, M., Gambari, R. & Eltzschig, H. K. Purinergic Signaling During Immune Cell Trafficking. *Trends Immunol.*, **37**, 399–411 (2016).
 30. Burnstock, G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **7**, 575–590 (2008).
 31. Cekic, C. & Linden, J. Purinergic regulation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, **16**, 177–192 (2016).
 32. Eltzschig, H. K., Sitkovsky, M. V & Robson, S. C. Purinergic signaling during inflammation. *N. Engl. J. Med.*, **367**, 2322–2333 (2012).
 33. Di Virgilio, F., Sarti, A. C., Falzoni, S., De Marchi, E. & Adinolfi, E. Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer*, **18**, 601–618 (2018).
 34. Ghosh, K. *et al.* Crystal structure of rat intestinal alkaline phosphatase--role of crown domain in mammalian alkaline phosphatases. *J. Struct. Biol.*, **184**, 182–192 (2013).
 35. Le Du, M. H., Stigbrand, T., Taussig, M. J., Ménez, A. & Stura, E. A. Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8 Å resolution: Implication for a substrate specificity. *J. Biol. Chem.*, **276**, 9158–9165 (2001).
 36. Low, M. G. & Prasad, A. R. S. A phospholipase D specific for the phosphatidylinositol anchor of cell-surface proteins is abundant in plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 980–984 (1988).
 37. Kaunitz, J. D. & Yamaguchi, D. T. TNAP, TrAP, ecto-purinergic signaling, and bone remodeling. *J. Cell. Biochem.*, **105**, 655–662 (2008).
 38. Picher, M., Burch, L. H., Hirsh, A. J., Spychala, J. & Boucher, R. C. Ecto 5'-nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase: Two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways. *J. Biol. Chem.*, **278**, 13468–13479 (2003).
 39. Street, S. E. *et al.* Tissue-nonspecific alkaline phosphatase acts redundantly with PAP and NT5E to generate adenosine in the dorsal spinal cord. *J. Neurosci.*, **33**, 11314–11322 (2013).
 40. Zebisch, M., Krauss, M., Schäfer, P. & Sträter, N. Crystallographic evidence for a domain motion in rat nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) 1. *J. Mol. Biol.*, **415**, 288–306 (2012).
 41. Zebisch, M., Krauss, M., Schäfer, P., Lauble, P. & Sträter, N. Crystallographic snapshots along the reaction pathway of nucleoside triphosphate diphosphohydrolases. *Structure*, **21**,

- 1460–1475 (2013).
42. Kukulski, F. *et al.* Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal.*, **1**, 193–204 (2005).
 43. Mandapathil, M., Lang, S., Gorelik, E. & Whiteside, T. L. Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression. *J. Immunol. Methods*, **346**, 55–63 (2009).
 44. Yoshida, O. *et al.* CD39 expression by hepatic myeloid dendritic cells attenuates inflammation in liver transplant ischemia-reperfusion injury in mice. *Hepatology*, **58**, 2163–2175 (2013).
 45. Mizumoto, N. *et al.* CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat. Med.*, **8**, 358–365 (2002).
 46. Enjyoji, K. *et al.* Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat. Med.*, **5**, 1010–1017 (1999).
 47. Knapp, K. *et al.* Crystal structure of the human ecto-5'-nucleotidase (CD73): Insights into the regulation of purinergic signaling. *Structure*, **20**, 2161–2173 (2012).
 48. Thompson, L. F. *et al.* Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J. Exp. Med.*, **200**, 1395–1405 (2004).
 49. Stagg, J. *et al.* CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer Res.*, **71**, 2892–2900 (2011).
 50. Deaglio, S. *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.*, **204**, 1257–1265 (2007).
 51. Kato, K. *et al.* Crystal structure of Enpp1, an extracellular glycoprotein involved in bone mineralization and insulin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 16876–81 (2012).
 52. Nishimasu, H. *et al.* Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 205–212 (2011).
 53. Duan, J., Wu, J., Cheng, Y. & Duan, R. D. Understanding the molecular activity of alkaline sphingomyelinase (NPP7) by computer modeling. *Biochemistry*, **49**, 9096–9105 (2010).
 54. Stefan, C., Jansen, S. & Bollen, M. NPP-type ectophosphodiesterases: Unity in diversity. *Trends Biochem. Sci.*, **30**, 542–550 (2005).
 55. Jansen, S. *et al.* Proteolytic maturation and activation of autotaxin (NPP2), a secreted metastasis-enhancing lysophospholipase D. *J. Cell Sci.*, **118**, 3081–3089 (2005).

56. Umezu-Goto, M. *et al.* Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J. Cell Biol.*, **158**, 227–233 (2002).
57. Moolenaar, W. H. & Perrakis, A. Insights into autotaxin: how to produce and present a lipid mediator. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **12**, 674–679 (2011).
58. Van Meeteren, L. A. *et al.* Inhibition of autotaxin by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *J. Biol. Chem.*, **280**, 21155–21161 (2005).
59. Okawa, A. *et al.* Mutation in Npps in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nat. Genet.*, **19**, 271–273 (1998).
60. Meyer, J. L. Can biological calcification occur in the presence of pyrophosphate? *Arch. Biochem. Biophys.*, **231**, 1–8 (1984).
61. Rutsch, F. *et al.* Hypophosphatemia, hyperphosphaturia, and bisphosphonate treatment are associated with survival beyond infancy in generalized arterial calcification of infancy. *Circ. Cardiovasc. Genet.*, **1**, 133–140 (2008).
62. Rutsch, F. *et al.* Mutations in ENPP1 are associated with ‘idiopathic’ infantile arterial calcification. *Nat. Genet.*, **34**, 379–381 (2003).
63. Bühring, H. J., Streble, A. & Valent, P. The basophil-specific ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) as a marker for cell activation and allergy diagnosis. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **133**, 317–329 (2004).
64. Tsai, S. H. *et al.* The Ectoenzyme E-NPP3 Negatively Regulates ATP-Dependent Chronic Allergic Responses by Basophils and Mast Cells. *Immunity*, **42**, 279–293 (2015).
65. Bühring, H. J. *et al.* The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical to the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3. *Blood*, **97**, 3303–3305 (2001).
66. Belli, S. I., van Driel, I. R. & Goding, J. W. Identification and characterization of a soluble form of the plasma cell membrane glycoprotein PC-1 (5'-nucleotide phosphodiesterase). *Eur. J. Biochem.*, **217**, 421–428 (1993).
67. Lam, K. W., Li, O., Li, C. Y. & Yam, L. T. Biochemical properties of human prostatic acid phosphatase. *Clin. Chem.*, **19**, 483–487 (1973).
68. Quintero, I. B. *et al.* Prostatic acid phosphatase is not a prostate specific target. *Cancer Res.*, **67**, 6549–6554 (2007).
69. Ercole, C. J. *et al.* Prostatic specific antigen and prostatic acid phosphatase in the monitoring and staging of patients with prostatic cancer. *J. Urol.*, **138**, 1181–1184 (1987).
70. Zylka, M. J. *et al.* Prostatic Acid Phosphatase Is an Ectonucleotidase and Suppresses Pain

- by Generating Adenosine. *Neuron*, **60**, 111–122 (2008).
71. Weisman, G. A. Why do male mice spit soluble enzymes that hydrolyze extracellular nucleotides? Focus on ‘Prostatic acid phosphatase is the main acid phosphatase with 5'-ectonucleotidase activity in the male mouse saliva and regulates salivation’. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **306**, 997-998, (2014).
 72. Araujo, C. L. *et al.* Prostatic acid phosphatase is the main acid phosphatase with 5'-ectonucleotidase activity in the male mouse saliva and regulates salivation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **306**, 1017-1027, (2014).
 73. Kambe, T., Matsunaga, M. & Takeda, T. A. Understanding the contribution of zinc transporters in the function of the early secretory pathway. *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 2179 (2017).
 74. Takeda, T. A. & Kambe, T. Activation mechanism of zinc-requiring ectoenzymes by zinc acquisition. *Seikagaku*, **90**, 333–339 (2018).
 75. Fujimoto, S. *et al.* The PP-motif in luminal loop 2 of ZnT transporters plays a pivotal role in TNAP activation. *Biochem. J.*, **473**, 2611–2621 (2016).
 76. Fukunaka, A. *et al.* 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 (2011).
 77. Fukunaka, A. *et al.* Demonstration and characterization of the heterodimerization of ZnT5 and ZnT6 in the early secretory pathway. *J. Biol. Chem.*, **284**, 30798–30806 (2009).
 78. Suzuki, T. *et al.* 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 (2005).
 79. Suzuki, T. *et al.* 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 (2005).
 80. Tsuji, T. *et al.* Dissecting the process of activation of cancer-promoting zinc-requiring ectoenzymes by zinc metalation mediated by ZNT transporters. *J. Biol. Chem.*, **292**, 2159–2173 (2017).
 81. Jansen, S. *et al.* Structure of NPP1, an ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase involved in tissue calcification. *Structure*, **20**, 1948–1959 (2012).
 82. Hausmann, J. *et al.* Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 198–204 (2011).

83. Gorelik, A., Randriamihaja, A., Illes, K. & Nagar, B. Structural basis for nucleotide recognition by the ectoenzyme CD203c. *FEBS J.*, **285**, 2481–2494 (2018).
84. Döhler, C., Zebisch, M. & Sträter, N. Crystal structure and substrate binding mode of ectonucleotide phosphodiesterase/pyrophosphatase-3 (NPP3). *Sci. Rep.*, **8**, 10874 (2018).
85. Nozaki, C. *et al.* Zinc alleviates pain through high-affinity binding to the NMDA receptor NR2A subunit. *Nat. Neurosci.*, **14**, 1017–1022 (2011).
86. Tanaka, M. *et al.* Incidence and treatment of dysgeusia in patients with glossodynia. *Acta Otolaryngol. Suppl.*, **122**, 142–145 (2002).
87. Cook, S. P., Vulchanova, L., Hargreaves, K. M., Elde, R. & McCleskey, E. W. Distinct ATP receptors on pain-sensing and stretch-sensing neurons. *Nature*, **387**, 505–508 (1997).
88. Zylka, M. J. Pain-relieving prospects for adenosine receptors and ectonucleotidases. *Trends Mol. Med.*, **17**, 188–196 (2011).
89. Rink, L. & Haase, H. Zinc homeostasis and immunity. *Trends Immunol.*, **28**, 1–4 (2007).
90. von Bülow, V., Rink, L. & Haase, H. Zinc-Mediated Inhibition of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Activity and Expression Suppresses TNF- α and IL-1 β Production in Monocytes by Elevation of Guanosine 3',5'-Cyclic Monophosphate. *J. Immunol.*, **175**, 4697–4705 (2005).
91. Malin, S. A. & Molliver, D. C. Gi- and Gq-coupled ADP (P2Y) receptors act in opposition to modulate nociceptive signaling and inflammatory pain behavior. *Mol. Pain*, **6**, (2010).
92. Prasad, A. S. Zinc: Role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **12**, 646–652 (2009).
93. Idzko, M., Ferrari, D. & Eltzschig, H. K. Nucleotide signalling during inflammation. *Nature*, **509**, 310–317 (2014).
94. Haskó, G., Linden, J., Cronstein, B. & Pacher, P. Adenosine receptors: Therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **7**, 759–770 (2008).
95. Sandstead, H. H., Lanier, V. C., Shephard, G. H. & Gillespie, D. D. Zinc and wound healing. Effects of zinc deficiency and zinc supplementation. *Am. J. Clin. Nutr.*, **23**, 514–519 (1970).
96. Pories, W. J., Henzel, J. H., Rob, C. G. & Strain, W. H. Acceleration of wound healing in man with zinc sulphate given by mouth. *Lancet*, **1**, 121–124 (1967).
97. Borg, N. *et al.* CD73 on T cells orchestrates cardiac wound healing after myocardial infarction by purinergic metabolic reprogramming. *Circulation*, **136**, 297–313 (2017).

98. Cherasse, Y. *et al.* Zinc-containing yeast extract promotes nonrapid eye movement sleep in mice. *Mol. Nutr. Food Res.*, **59**, 2087–2093 (2015).
99. Cherasse, Y. & Urade, Y. Dietary zinc acts as a sleep modulator. *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 2334, (2017).
100. Porkka-Heiskanen, T. *et al.* Adenosine: A mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science*, **276**, 1265–1267 (1997).
101. Zielinski, M. R., Taishi, P., Clinton, J. M. & Krueger, J. M. 5'-Ectonucleotidase-knockout mice lack non-REM sleep responses to sleep deprivation. *Eur. J. Neurosci.*, **35**, 1789–1798 (2012).
102. Bhutta, Z. A. *et al.* Prevention of diarrhea and pneumonia by zinc supplementation in children in developing countries: Pooled analysis of randomized controlled trials. *J. Pediatr.*, **135**, 689–697 (1999).
103. Kawamura, T. & Ogawa, Y. Severe dermatitis with loss of epidermal Langerhans cells in human and mouse zinc deficiency. *J. Clin. Invest.*, **122**, 722–732. (2012).
104. Say, J. C., Ciuffi, K., Furriel, R. P. M., Ciancaglini, P. & Leone, F. A. Alkaline phosphatase from rat osseous plates: purification and biochemical characterization of a soluble form. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1074**, 256–262 (1991).
105. Bobyr, E. *et al.* High-resolution analysis of Zn²⁺ coordination in the alkaline phosphatase superfamily by EXAFS and x-ray crystallography. *J. Mol. Biol.*, **415**, 102–117 (2012).
106. Health, H. & Prasad, A. S. Discovery of Human Zinc Deficiency : Its Impact on. *Adv. Nutr.*, **4**, 176–190 (2013).
107. Prasad, A. S., Oberleas, D., Wolf, P. & Horwitz, H. P. Studies on zinc deficiency: changes in trace elements and enzyme activities in tissues of zinc-deficient rats. *J. Clin. Invest.*, **46**, 549–557 (1967).
108. Fukuda, T., Kishi, K., Ohnishi, Y. & Shibata, A. Bipotential cell differentiation of KU-812: evidence of a hybrid cell line that differentiates into basophils and macrophage-like cells. *Blood*, **70**, 612–619 (1987).
109. Park, E. K. *et al.* Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm. Res.*, **56**, 45–50 (2007).
110. Komai, M., Goto, T., Suzuki, H., Takeda, T. & Furukawa, Y. Zinc deficiency and taste dysfunction; contribution of carbonic anhydrase, a zinc-metalloenzyme, to normal taste sensation. *Biofactors*, **12**, 65–70 (2000).

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々にご助力を賜りました。

はじめに、5年間、指導教官として厚くご指導ご鞭撻いただきました、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の神戸大朋 博士に、深甚なる謝意を表します。

生体情報応答学分野教授である永尾雅哉 博士には、温かみのある人柄で日々叱咤激励していただき、研究に専念できる環境を提供していただきました。同助教の西野勝俊 博士には、実験手法にとどまらない様々な事柄について、多数のご助言をいただきました。誠にありがとうございました。

京都大学大学院生命科学研究科分子応答機構学教授の片山高嶺 博士、同准教授の増田誠司 博士、同助教の加藤紀彦 博士、また副指導教官としてご指導いただいた遺伝子特性学准教授の西浜竜一 博士には研究を進める上で貴重なご指摘やご助言を賜りました。東北大学農学研究科教授の駒井三千夫 博士率いる研究グループの方々、同教授の白川仁 博士、宮城学院女子大学生生活科学部准教授の後藤知子 博士には動物実験において大変有益なデータ、ご助言、ご指摘を賜りました。また京都大学大学院農学研究科教授の谷史人 博士、山梨大学医学部の川村龍吉 博士には、研究において新しい角度から様々なご助言をいただきました。感謝申し上げます。

いつも研究室の環境を整えて下さった事務員の嶋林かほるさん、生体情報応答学、分子応答機構学の先輩、同期、後輩の方々には、厚く御礼申し上げます。特に日々の研究生活のうちで直接ご指導、ご指摘していただいた、卒業生の逸村直也さん、辻徳治さん、西藤有希奈さん、福江和久さん、そして分子応答機構学の藤田賢一さんには感謝してやみません。また、本研究を共に進めていただいた卒業生の兵道（旧姓宮崎）志保さん、小林未希さん、松永麻佑さんに感謝申し上げます。また同期としてともに過ごした2年間だけでなく、卒業後も研究生活を支えてくださっている、中谷優太さん、重本真紀さんには言葉に尽くせぬ思いを感じております。ありがとうございました。

最後に、日々の研究生活を支えてくれる家族に、心から感謝申し上げます。

令和元年 12月 31日

武田貴成

本学位論文は、以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Taka-aki Takeda, Shiho Miyazaki, Miki Kobayashi, Katsutoshi Nishino, Tomoko Goto,
Mayu Matsunaga, Minami Ooi, Hitoshi Shirakawa, Fumito Tani, Tatsuyoshi Kawamura,
Michio Komai and Taiho Kambe

**Zinc deficiency causes delayed ATP clearance and adenosine generation in rats and
cell culture models**

Communications Biology, 113, 1-13, 2018