

博士論文

B 細胞受容体シグナルの活性化における
亜鉛トランスポーターZIP9 の役割に関する研究

平成 25 年 3 月

谷口 将済

岡山大学大学院

医歯薬学総合研究科

博士後期課程創薬生命科学専攻

【目次】

【目次】	・ ・ ・	1
【要約】	・ ・ ・	2
【略語一覧】	・ ・ ・	4
【序論】	・ ・ ・	6
【方法】	・ ・ ・	26
【結果】		
1. BCRシグナルの活性化における亜鉛の影響	・ ・ ・	36
2. BCRシグナルの活性化におけるニワトリZIP9ノックアウトの影響		44
3. BCRシグナルの活性化制御におけるヒトZip9遺伝子過剰発現の影響.		50
4. ZIP9による細胞質への亜鉛放出の評価と細胞質内亜鉛濃度の測定.		58
【考察】	・ ・ ・	64
【結語】	・ ・ ・	79
【参考文献】	・ ・ ・	81
【謝辞】	・ ・ ・	88

【要約】

亜鉛は生体内における必須微量元素であり，生命活動において欠かすことのできない金属イオンである．亜鉛は単に生体内の栄養素としての機能を有するだけでなく，細胞内のセカンドメッセンジャーとしても働きうることが明らかになっており，様々な細胞においてその重要性が注目されている．しかしながら，B 細胞受容体（BCR）シグナル伝達と亜鉛の関係については未だ明らかにされていない．著者は，BCR シグナル伝達における細胞内亜鉛の機能の解明を目的として，亜鉛トランスポーターのひとつである ZIP9（SLC39A9）に着目し，ニワトリ DT40 細胞を用いて，細胞内亜鉛レベルの変化によるシグナル伝達分子のリン酸化への影響について研究を行った．

BCR シグナル伝達における ZIP9 の機能を評価するため，DT40 細胞野生株（WT），ニワトリ ZIP9 欠損 DT40 細胞株（cZIP9KO），ZIP9 とは逆方向の亜鉛輸送を行う ZnT5, 6, 7 の三重欠損 DT40 細胞株（TKO），および cZIP9KO 株にヒト ZIP9 を導入した DT40 細胞株（cZIP9KO+hZIP9HA）を用いて，Akt および Erk のリン酸化レベルについて解析した．また，亜鉛蛍光プローブを用いて，それぞれの細胞株における細胞内亜鉛レベルを調べた．さらに，細胞内亜鉛の機能

評価として、protein tyrosine phosphatase (PTPase) の酵素活性を測定した。

WT 株および TKO 株において、亜鉛刺激により Akt および Erk のリン酸化レベルは増大したが、ZIP9KO 株では亜鉛刺激によるリン酸化レベルの増大は起こらなかった。一方、cZIP9KO+hZIP9HA 株においては、Akt と Erk のリン酸化が一部回復していた。また、ZIP9 の欠損による細胞質内の亜鉛レベルの減少が観察され、ZIP9 が細胞内亜鉛レベルの制御を介した BCR シグナルの活性化のために必要な分子であることが示された。さらに、ZIP9 欠損株においては PTPase 活性の上昇がみられたことから、ZIP9 によって制御される亜鉛は、PTPase 活性の抑制を介して BCR シグナルを制御している可能性が考えられた。以上の結果から、ZIP9 が細胞質の亜鉛レベルを制御することで、PTPase 活性の阻害を介した BCR シグナルの活性化における Akt および Erk のリン酸化を制御していることを明らかにした。本研究は、BCR シグナル伝達のメカニズムにおいて ZIP9 を介した細胞質の亜鉛調節に基づく新たな知見を与えるものである。

【略語一覧】

Akt: PKB (Protein kinase B)
ALP: Alkaline phosphatase
ATOX1: Antioxidant protein-1
ATP7A: Cu-P-type ATPase7A
ATP7B: Cu-P-type ATPase7B
 α IgM: anti-chicken IgM antibody (M4)
BAPTA: 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid
BCR: B cell receptor
BMP: Bone morphogenetic protein
BSA: Bovine serum albumin
Bsr^R: Blastcidin-S resistance gene
cAMP: cyclic adenosine monophosphate
CCS: Copper chaperone for SOD
CDF: Cation diffusion facilitator
ChS: Chicken serum
CK2: Casein Kinase 2
CREB: cAMP-response element-binding protein
CTR: Copper transporter
Cu/Zn-SOD: Cu/Zn-Superoxide dismutase
CX : Chelex-100
EGFR/IGF-1R: Epidermal growth factor receptor/Insulin-like growth factor-1 receptor
Erk : Extracellular signal-regulated kinase (=MAPK)
FBS : Fetal bovine serum
Fc ϵ R1: High-affinity IgE receptor
GPCR: G protein-coupled receptor
HA : Hemagglutinin
HBSS : Hepes buffered saline solution
His^R : Histidinol resistance gene
HRP : Horseradish peroxidase
IKK: I κ B kinase
IL: Interleukin
LCK: Lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase

MAPK: Mitogen-activated protein kinase
 2ME : 2-mercaptoethanol
 MEK : MAPK/ERK kinase
 MTT : (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
 Neo^R : Neomycin resistance gene
 PBS : Phosphate-buffered saline
 p-Akt : Phospho Akt
 PDE: Phosphodiesterase
 p-Erk : Phospho Erk
 PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
 PKC β /NF- κ B: Protein kinase C β /Nuclear factor- κ B
 PTEN: Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10
 PTP1B : Protein tyrosine phosphatase 1B
 PTPase : Protein tyrosine phosphatase
 p-Tyr : Phospho tyrosine
 Puro^R: Puromycin resistance gene
 Py: 2,2'-dithiodipyridine
 Raf : (=mitogen-activated protein kinase kinase kinase ; MAPKKK)
 SDS : Sodium dodecyl sulfate
 SDS-PAGE : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
 Smad: Mothers against decapentaplegic homolog
 TBST : Tris-buffered saline-Tween20
 TGF- β : Transforming growth factor- β
 TNF: Tumor necrosis factor
 TKO : (ZnT5, 6, 7) triple knockout
 TNAP : Tissue nonspecific ALP
 TPEN: *N, N, N', N'*-tetrakis- (2-pyridylmethyl)-ethylenediamine
 WT : Wild type
 ZAP70: z-chain-associated protein kinase
 Zeo^R: Zeomycin resistance gene
 ZIP : Zrt/Irt-like protein
 ZnT : Zinc transporter
 ZnPy : 1-Hydroxypyridine-2-thione zinc salt

【序論】

生体内の必須微量元素

ヒトをはじめとする生物の生命活動には、タンパク質や核酸などの有機物質以外にも、ビタミンや金属元素などが必須である。生命活動に必要な金属元素は、微量でありながらも、その恒常性維持の破綻が健康を損なうことが知られているため、必須微量元素金属元素と呼ばれている。ヒトの体内において最も多い必須微量元素金属元素は鉄であり、金属タンパク質としては、ヘム鉄（鉄—ポルフィリン錯体）を含むヘモグロビンが体内の酸素運搬にかかわっていることがよく知られている。その他にも、非ヘム鉄タンパク質として、鉄を運搬するトランスフェリン、鉄の貯蔵に関与するフェリチンがよく知られている。これらの鉄含有タンパク質はヒトの体内で必要とされる酸素と鉄の運搬・貯蔵および代謝に関係しており、生体にとって欠かすことのできない金属タンパク質である。一方で、ヘム鉄を持つカタラーゼは細胞内で生成される過酸化水素を酵素分解し、細胞内での抗酸化作用に関わっている。同じヘム鉄含有酵素でもシトクロム P-450 は薬物や異物などの代謝（解毒作用）に関わるなど、その機能は非常に多彩であり、我々の生命活動の維持において金属の果たす役割の重要性が伺え

る¹⁻⁶⁾。また、銅は Lysyl oxidase, Cu/Zn-Superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) や シトクロム c オキシダーゼなどに必要とされる必須微量元素である。遊離の銅イオンは、鉄と同様に酸化還元電位が高いため、鉄様フェントン反応によるラジカル生成を引き起こすことで細胞内酸化ストレスを亢進し、タンパク質の酸化や DNA の酸化的切断反応など、生体に対する毒性が非常に高い。そのため、銅の濃度は厳密に制御されている。銅の細胞内取り込みは、細胞質膜に存在する Copper transporter (CTR)により、細胞内へ取り込まれ、細胞質に存在する 3 種類の銅シャペロンと呼ばれるタンパク質により、様々な器官や銅要求性タンパク質に輸送される⁷⁾。通常、細胞内に最も多く存在する銅結合タンパク質は Cu/Zn-SOD であるが、Cu/Zn-SOD には、Copper chaperone for SOD (CCS) と呼ばれる銅シャペロンにより輸送される。また、Antioxidant protein-1 (ATOX1) は、CTR によって取り込まれた銅をゴルジ体に局在する Cu-P-type ATPase7A (ATP7A) および 7B (ATP7B) に輸送する。肝臓では ATP7B が特異的に発現しており、ATOX1 から受け取った銅をセルロプラスミンに受け渡し、銅セルロプラスミンは細胞外（血清中）へ分泌され、各組織へと銅を輸送する。それ以外の組織においては ATP7A に輸送することで細胞内外の銅恒常性維持を司って

いる。最近では ATP7A および ATP7B 自身も細胞膜に局在し，細胞外からの銅の取り込みにも関与していると言われ，ATP7A および ATP7B が組織特異的発現をしているために，これらの先天的および後天的遺伝子異常が，メンケス病（ATP7A の遺伝子疾患）⁸⁻¹¹⁾およびウィルソン病（ATP7B の遺伝子疾患）¹²⁻¹⁶⁾と呼ばれる銅代謝異常症を引き起こすことが知られている。

生体内必須微量元素としての亜鉛

亜鉛は生体内における必須微量元素であり，生体内の亜鉛恒常性の破綻により，様々な疾患が引き起こされると考えられている^{17, 18)}。亜鉛は，ヒトの体内に約 2 g 存在し，鉄に次いで多い微量金属である。細胞内に存在する亜鉛は，酵素や転写因子など約 300 種以上のタンパク質に結合して様々な生化学・生理的機能を発揮している¹⁹⁾。例えば，タンパク質自身の立体構造維持，転写因子と DNA との結合，あるいはタンパク質—タンパク質相互作用に亜鉛が関与しており，その制御に関する詳細な機序が現在明らかにされつつある。亜鉛が広く生物界で利用されている理由は，亜鉛イオンは鉄や銅と異なり，化合物中での原子価の変化がほとんどなく安定した元素であり，酸化還元反応を起こさず，ラ

ジカル生成のような毒性を持たないためであると考えられている。また、亜鉛自体は強い電子受容体として働き、電子供与体と強く結合する特性を持つため、酵素の活性中心に存在し、触媒として重要な機能を発揮している²⁰⁾。生体内における亜鉛の恒常性は非常に効率よく維持されており、鉄・銅と異なり亜鉛の過剰蓄積による疾患は大過剰の摂取による急性毒性の場合を除いて通常観察されない。しかしながら、亜鉛が過剰に存在すると、他の金属との競合により細胞に障害を与えることが知られている。また、生体内の亜鉛恒常性の破綻による亜鉛過剰、あるいは亜鉛欠乏状態が生体に悪影響をおよぼすことで、様々な疾患が引き起こされる。特に、亜鉛欠乏により顕著に影響を受ける組織として、皮膚、消化器官、中枢神経系、免疫系などがあり、成長遅滞、味覚障害、皮膚炎、骨格筋異常などの症状につながる²⁰⁾。そのため、生体内における亜鉛の恒常性は非常に効率よく維持されており、細胞内での遊離亜鉛濃度は、ナノモルからピコモル以下の非常に低い濃度に保たれている^{21, 22)}。

亜鉛トランスポーター

亜鉛はそのままの形で細胞膜を通過することができないため、細胞内の総亜

鉛量は細胞質膜および細胞内小胞器官の膜上に存在する亜鉛トランスポーターにより厳密に制御されている。現在、亜鉛トランスポーターは大別して、細胞質の濃度を減少させる方向に亜鉛を輸送する Cation diffusion facilitator (CDF) ファミリーとその逆方向、すなわち細胞質の亜鉛濃度を増加させる方向へ輸送を行う Zrt/Irt-like protein (ZIP) ファミリーの 2 種が存在することが明らかにされており²³⁻²⁵⁾、これらのトランスポーターによる亜鉛の輸送制御とメタロチオネインによる亜鉛貯蔵によって細胞内濃度が一定に保たれている²⁶⁾。CDF ファミリーに属するトランスポーターは 6 回膜貫通領域、N、C 末端ともに細胞質側に存在、そして 4、5 回膜貫通領域の間に亜鉛の結合に必要であると考えられているヒスチジンに富む配列を持つといった共通の構造的特徴を保持している。一方、ZIP ファミリーに属するトランスポーターは、8 回膜貫通領域、N、C 末端ともに細胞外、あるいは細胞内小器官内腔側に存在、そして 3、4 回膜貫通領域の間にヒスチジンに富む配列を持つといった共通の構造的特徴を保持している²⁷⁾。亜鉛輸送の駆動力に関しては菌類などのものについては一部報告があるが^{28, 29)}、ほ乳類に関しては、ほとんど分かっていない。

CDF ファミリーに属する亜鉛トランスポーターは ZnT1 から ZnT8 までの 8 種

類が同定されており，ZnT1 は細胞膜に，ZnT2 及び ZnT4 は細胞内小胞に，ZnT3 は神経細胞のシナプス小胞に，ZnT5~7 はゴルジ体近傍に局在し，ZnT8 は脾臓に特異的に発現している³⁰⁻³⁶⁾．一方，ZIP ファミリーに属する亜鉛トランスポーターは，ヒト及びマウスで現在 14 種類存在していることが知られている．これらはアミノ酸配列上，さらに 4 種のサブファミリーに分類され，それぞれ ZIPI (ZIP9)，ZIPII (ZIP1~3)，gufA (ZIP11)，LIV-1 (ZIP4~8, ZIP10, ZIP12~14) ファミリーと呼ばれている．最近，これら ZIP と細胞機能の関連性についての研究が加速しており，同定されたものの多くは細胞膜上での亜鉛取り込みにより，細胞の機能調節が制御されていることが明らかになってきた³⁷⁻⁴⁰⁾．図 1 および表 1 には現在明らかになっている亜鉛トランスポーターの分類と機能について示している．

CDF ファミリーにおける最近の知見としては，DT40 細胞を用いた遺伝子破壊実験により，ZnT5 と ZnT6 がヘテロ複合体，ZnT7 がホモ複合体を形成し，この複合体が，ゴルジ体に存在する亜鉛要求性酵素である Alkaline phosphatase (ALP) に亜鉛を供給し，ALP を活性化するという報告がなされた⁴¹⁻⁴³⁾．DT40 細胞は高頻度に相同組み換えを起こすという特徴を有し，目的の遺伝子ノックアウトを

容易に作成することができる^{44,45)}。3種類の亜鉛トランスポーター遺伝子 ZnT5, ZnT6, ZnT7 を欠損させた三重欠損 (TKO) 株では、組織非特異的アルカリホスファターゼ (TNAP) 活性が完全に消失するが、欠損させた遺伝子のうち、ZnT5 と ZnT6 あるいは ZnT7 を再び導入してタンパク質を発現させると TNAP 活性が回復することがわかり、TNAP の活性化にはゴルジ体に局在する亜鉛トランスポーター複合体 (ZnT5/ZnT6 ヘテロ複合体、および ZnT7 ホモ複合体) が必要であることが明らかになった⁴¹⁻⁴³⁾。さらに、TKO 株では、TNAP がすみやかに分解されてしまうことが見出され、ZnT5 に変異を持つ変異型亜鉛トランスポーター複合体を発現させた三重欠損株では、TNAP の活性化は起こらないものの、TNAP タンパク質は安定して発現していることが明らかにされた。このことから、TNAP の活性化プロセスは、亜鉛トランスポーター複合体によるタンパク質の安定化と、その後の亜鉛の供給による活性化の 2 段階の制御によって行われることが実証された⁴⁶⁾。

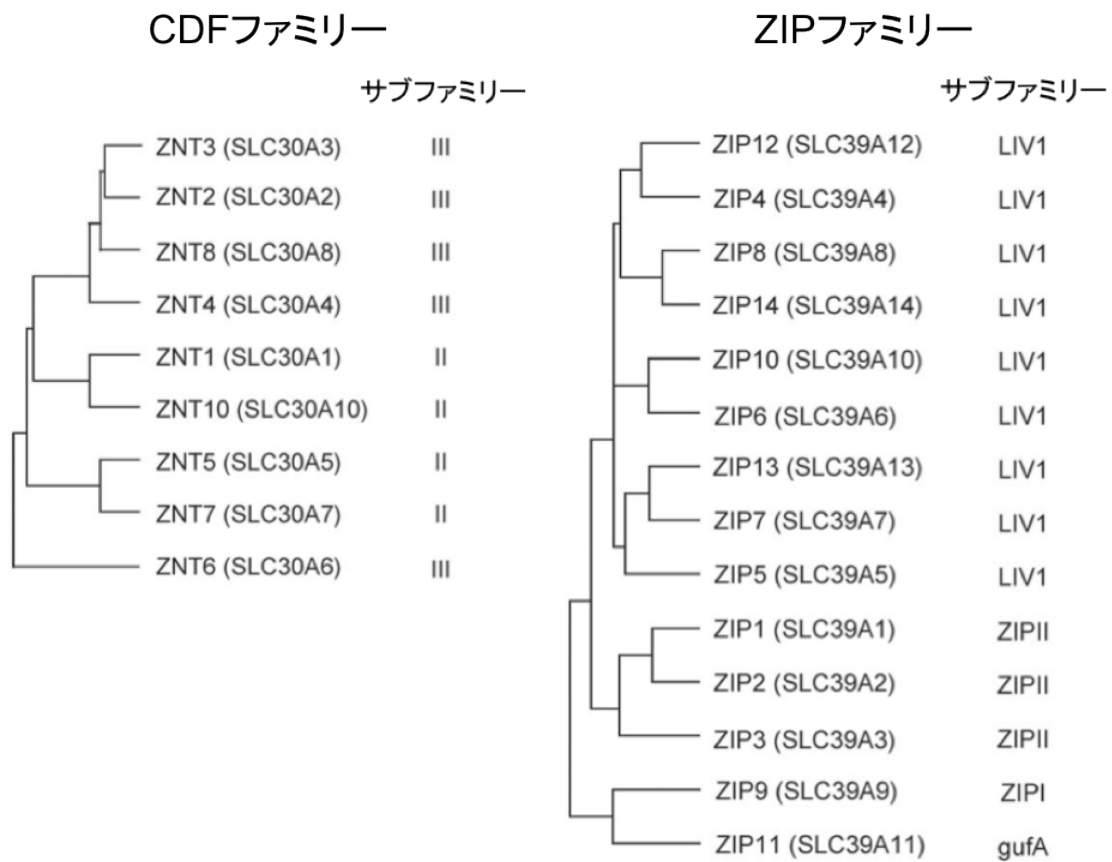


図 1, Classification of zinc transporters.

CDF ファミリー	
ZnT1	細胞外への亜鉛の排出, 亜鉛誘導性の神経細胞死保護作用, Ras-MAPK シグナル伝達経路の調節
ZnT2	細胞内小胞への亜鉛輸送, 母乳への亜鉛輸送(マウス)
ZnT3	シナプス小胞への亜鉛輸送
ZnT4	細胞内小胞への亜鉛輸送, 母乳への亜鉛輸送(ヒト)
ZnT5	ゴルジ体内への亜鉛輸送
ZnT6	ゴルジ体内への亜鉛輸送
ZnT7	膵臓β細胞のインスリン顆粒内への亜鉛輸送
ZnT8	膵臓に特異的に発現
ZIP ファミリー	
ZIP1	細胞内への亜鉛(銅, 鉄, カドミウム)取り込み
ZIP2	細胞内への亜鉛取り込み(コバルト, カドミウム, 銅, マンガンで吸収阻害)
ZIP3	細胞内への亜鉛とりこみ
ZIP4	細胞内への亜鉛とりこみ, 小腸上皮細胞頂端側に発現し, 食物からの体内への亜鉛取り込みに必須, 膵臓がんの発現にも関与
ZIP5	細胞内への亜鉛取り込み, ZIP4 と逆向きの発現制御を受ける(体内亜鉛量のバランスに関与?)
ZIP6	細胞内への亜鉛取り込み, ゼブラフィッシュ LIV1 は上皮-間葉転換(EMT)に関与, エストロゲン応答性乳がん組織に高発現, がんの転移に関与
ZIP7	ゴルジ体から細胞質への亜鉛輸送
ZIP8	細胞内への亜鉛(マンガン, カドミウム)取り込み, カドミウムによる精巣・腎臓障害に関与
ZIP10	細胞内への亜鉛取り込み, 乳がん細胞の転移に関与
ZIP14	細胞内への亜鉛(鉄, マンガン, カドミウム)取り込み, 低亜鉛血症(Hypozincemia)に関与

表 1, The function of zinc transporters.

これまでに、腸管上皮細胞に発現している ZIP4 が腸性肢端皮膚炎の原因遺伝子であることや、2 型糖尿病発症に膵臓β細胞の分泌顆粒膜上に発現する ZnT8 が関与しているなど、亜鉛トランスポーターの遺伝子変異と亜鉛依存的な疾患との関連を示した報告がなされている^{47, 48)}。亜鉛キレート剤である *N, N, N', N'*-tetrakis-(2-pyridylmethyl)-ethylenediamine (TPEN) をマウスに投与すると、即時型アレルギー反応が TPEN 投与量依存的に抑制されたことから、亜鉛がマスト細胞を介したアレルギー応答に関与していることが示された。また、ZnT5 遺伝子欠損マウスでは野生型と比較して、アレルギー接触性皮膚炎発症が抑えられることが確認され、亜鉛が High-affinity IgE receptor (FcεR1) 依存的なマスト細胞の活性化および Protein kinase Cβ/Nuclear factor-κ B (PKCβ/NF-κB) 経路を介した、炎症性サイトカイン産生に関与することが示された。ZnT5 遺伝子欠損マウスの骨髄由来マスト細胞を FcεR1 刺激したところ、脱顆粒応答には遺伝子欠損の影響が認められなかったが、IL-6, TNF-αなどの炎症性サイトカインの産生が減少していた。この理由として、ZnT5 遺伝子の欠損により PKC が活性化された際の細胞膜移行が阻害されるために、PKC の下流に存在する IκB kinase (IKK)/IκB/NF-κB シグナルが抑制された結果、サイトカインの発現が減弱するた

めであると考えられている⁴⁹⁾。一方、これらの亜鉛トランスポーターと細胞機能の関連性についての研究が加速しており、亜鉛トランスポーターによって制御される細胞内亜鉛とその異常によって引き起こされる疾患等の関係について徐々に明らかになりつつある。

シグナル伝達分子としての亜鉛

近年、外来刺激により誘導される転写非依存的な細胞内亜鉛変動（Early zinc signaling）と亜鉛トランスポーター等による転写依存的な細胞内亜鉛変動（Late zinc signaling）の存在が示され、後者に関して、ZIP6 の発現増加に伴って流入する亜鉛がゼブラフィッシュのオーガナイザー細胞において Zinc フィンガー転写因子 Snail の核移行を促進し、上皮-間葉転換（Epithelial-mesenchymal transition: EMT）を誘導していることが明らかとなった⁵⁰⁻⁵²⁾。この発見以降、亜鉛がタンパク質の構造維持や触媒活性に関与するだけでなく、乳がん細胞⁵³⁾、リンパ球⁵⁴⁻⁵⁶⁾、および脂肪細胞⁵⁷⁾においてセカンドメッセンジャーとして機能することが多くの研究により証明され、その重要性に注目が集まっている。従って、これまで栄養素として知られていた亜鉛は、「シグナル因子」という機能性分子と

して認識されはじめている。ZIP13 は、成長遅延をはじめ、骨・歯・皮膚等の硬組織および結合組織の異常を示す“新しいタイプのエーラス・ダンロス症候群”の原因遺伝子の 1 つとして同定された⁴⁶⁾。ヒトにおけるエーラス・ダンロス症候群において、ZIP13 遺伝子の点変異が発見され、また、ZIP13 遺伝子のノックアウトマウスにおいても、ヒトの患者と同様に、骨量減少、脊椎後彎、歯形成異常、皮膚脆弱化等の進行性の異常を呈し、これら表現型は劣性遺伝的に継承されることが示された。生化学的解析により、ZIP13 は間葉系細胞のゴルジ体に局在しており、ZIP13 ノックアウトマウス由来の細胞では、細胞内亜鉛分布状態が野生型と比べて変化していた。ZIP13 により輸送される亜鉛は、Bone morphogenetic protein/Transforming growth factor- β (BMP/TGF- β) シグナル伝達経路における、転写因子 Mothers against decapentaplegic homolog (Smad) の亜鉛結合部位に作用することで、Smad の核移行を制御し、結合組織形成に必要なコラーゲン等の遺伝子発現を制御していることが見出された。以上のことから、ZIP13 遺伝子変異は BMP/TGF- β シグナル伝達を介した硬組織および結合組織形成に影響を与えることで、エーラス・ダンロス症候群発症の原因になっていることが証明された。次に、ZIP13 のトポロジーについての生化学的解析が行われ、

ZIP13 が細胞内の亜鉛状態に関わらずゴルジ体においてホモダイマーとして局在し、ZIP13 が亜鉛恒常性維持機能に関わる部分として、他の LIV-1 ファミリーの ZIP トランスポーターにはない独特の細胞内ループ構造を有することが明らかにされた⁵⁸⁾。また、細胞膜に局在する亜鉛トランスポーターZIP14 が、G protein-coupled receptor (GPCR) 依存シグナル伝達に関与し、ZIP14 を欠損させたマウスでは成長遅延や糖新生障害が起こることが報告された。この報告によると、ZIP14 によって細胞内に取り込まれた亜鉛が基底状態での Phosphodiesterase (PDE) 活性を抑制しているため、ZIP14 の欠損により PDE 活性が上昇し、その結果 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) が減少することが明らかにされた。cAMP の減少により、例えば、軟骨細胞においては、cAMP-response element-binding protein (CREB) のリン酸化の阻害を起し、GPCR-cAMP-CREB 経路を介した軟骨細胞の分化が抑制された結果、成長遅延に繋がるとされている⁵⁹⁾。がん研究の分野においては、タモキシフェン耐性ヒト乳がん細胞で ZIP7 の発現および細胞内亜鉛濃度が上昇していることが明らかにされた。タモキシフェン耐性獲得モデルとして用いられたヒト乳がん細胞 (MCF7 細胞) は、増殖能かつ浸潤性の高い表現型を示し、その表現型の発現の

ためには Epidermal growth factor receptor/Insulin-like growth factor-1 receptor (EGFR/IGF-1R) によるシグナル伝達が非常に重要な役割を担っているとされる⁶⁰⁾。ZIP7 はヒトおよびマウスの組織全体に発現しており、主に小胞体に局在している。ZIP7 は小胞体を含めた亜鉛貯蔵部位から細胞質へ亜鉛を放出していると考えられており、放出された亜鉛による Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) の酵素阻害により、受容体型および非受容体型チロシンキナーゼが活性化されることで、MAPK カスケードの活性化へと繋がる。したがって、タモキシフェン耐性乳がん細胞に見られる ZIP7 の発現上昇は、細胞内亜鉛の増加により、細胞増殖に関与する EGFR/IGF-1R 受容体自身が持つチロシンキナーゼの活性化、および受容体の下流に存在する種々のリン酸化酵素の活性化とその活性化持続作用が起こるため、最終的に乳がん細胞の増殖、浸潤を誘導すると考えられている^{53, 61)}。最近では、これらの乳がん細胞において、外因性の刺激（亜鉛あるいは EGF+カルシウムイオノフォアによる刺激）に対して ZIP7 が亜鉛を放出する際の分子機序が明らかにされた³⁷⁾。この報告では、ZIP7 の活性化に関連する分子として Casein Kinase 2 (CK2) が同定され、CK2 は外因性の刺激によって ZIP7 と会合し、ZIP7 の 275 番目と 276 番目のセリン残基をリン酸化する。

このリン酸化により ZIP7 による小胞体からの亜鉛放出が起こり、細胞質内の遊離亜鉛の増加と Erk1/2, Akt のリン酸化および細胞遊走が誘導されることが示された³⁷⁾.

BCR シグナルと亜鉛トランスポーターZIP9

細胞外からの刺激に応答する細胞内シグナル伝達は、細胞の生存に必須のシステムであり、その破綻は細胞のがん化等を引き起こすとされている。近年、T 細胞の抗原提示反応におけるシグナル伝達、およびインターロイキン-2 やインターフェロン- γ などのサイトカイン産生に亜鉛が関与していることが報告され^{62, 63)}、免疫担当細胞における亜鉛の役割について明らかになりつつある。樹状細胞においてリポポリサッカライドによる刺激が ZIP6 の発現を制御し、細胞内の亜鉛濃度が減少することで樹状細胞の成熟を誘導する⁶⁴⁾。また、ZIP8 の過剰発現が炎症や感染症を誘導し、ZIP8 を介した亜鉛輸送が細胞の自然免疫系において重要な役割を果たしていることが明らかにされている^{65, 66)}。一方で、抗体産生細胞である B 細胞におけるシグナル伝達と亜鉛に関する知見はほとんどなく、未だ不明な部分が数多く残されたままである。B 細胞の細胞機能発現は B 細胞

受容体 (B cell receptor: BCR) シグナル伝達によって制御されており, 代謝関連遺伝子や細胞骨格タンパク質の発現に影響を与え, B 細胞の生存, 増殖およびアポトーシスなどの細胞機能を制御している⁶⁷⁻⁷²⁾. BCR シグナルは増殖因子や抗 IgM 抗体などの刺激により, 受容体の架橋が形成されることで開始され, アダプター分子, およびシグナル因子のリン酸化反応を介して伝達される (図 2-1). また, BCR シグナル伝達は, T 細胞受容体シグナル伝達と非常に類似したタンパク質が関与しており, このことから BCR シグナル伝達における亜鉛が深く関与していることが推察された. そこで著者は, BCR シグナル伝達における亜鉛の機能を明らかにすることを目的として本研究に着手した.

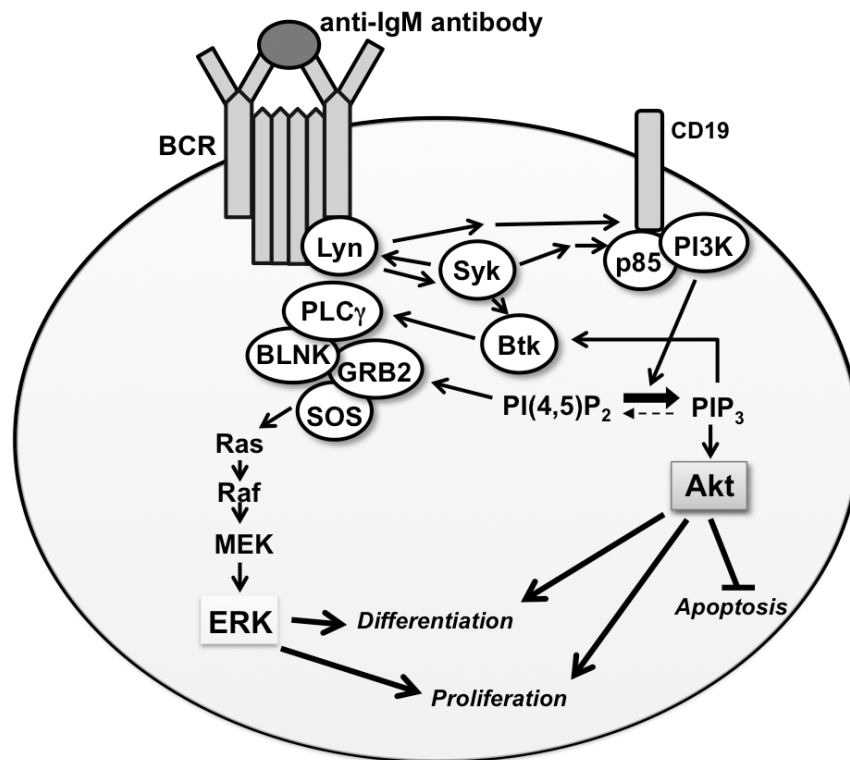


図 2-1, B-cell receptor signaling pathway.

本研究を遂行するにあたり，ニワトリ B リンパ球 DT40 細胞をモデル細胞として用いた．また，DT40 細胞は，BCR シグナル伝達における PI3K，Ras，PLCg などの重要なシグナル分子の機能およびそれらの関連性の解明を目指した研究にも頻繁に用いられてきた⁷³⁻⁷⁵⁾．本研究では，亜鉛トランスポーター遺伝子ノックアウト DT40 細胞株を用いて，亜鉛トランスポーターによる細胞内亜鉛の調節と BCR シグナルにおける細胞内リン酸化との関係を検討した（図 2-1）．亜鉛トランスポーター遺伝子ノックアウト細胞の作製にあたり，著者はゴルジ体

局在する亜鉛トランスポーターのひとつである ZIP9 に着目した (図 2-2)。ZIP9 は 7~8 回膜貫通型タンパク質で第 3, 第 4 膜貫通領域の間にヒスチジンリッチな領域を持つ ZIP ファミリータンパク質である。特に C 末端側の膜貫通領域は他の ZIP タンパク質と高い相同性を示す。一方で N 末端側, 特に第 1 膜貫通領域と推測される領域は他のどの ZIP タンパク質とも相同性を示さない。また細胞質外にあると予測される N 末端は非常に短く, N 末端に長い細胞外領域を持つと推測される LIV-1 サブファミリーとは構造上大きく異なる。C 末端領域, および第 7, 第 8 膜貫通領域の間に特徴的なヒスチジンリピート配列を持つ。これらリピート配列は他のヒト ZIP タンパク質には存在しないものであり, かつ広く生物種を越えて保存されていることから ZIP9 特異的な配列と考えられている。ZIP タンパク質では C 末端側の第 4~8 膜貫通領域にあたりと予測される配列が特に保存されている。この領域が亜鉛輸送時の孔を形成すると予測されており⁷⁶⁾, ヒスチジン残基の二価カチオンとの親和性の高さを考慮に入れると, ZIP9 に保存されているヒスチジンリピート配列はその特異的な基質への親和性に重要であるとされている。ZIP9 は ZIP ファミリー 14 種の中で, 出芽酵母からヒトまでそのホモログと推測できる配列の存在が確認でき, 生物種を越えて幅

広く保存されている遺伝子である。ZIP9 は他の ZIP トランスポーターとは異なり、亜鉛欠乏時でもその局在を細胞膜に変化させることなく、ゴルジ体に定常的に局在していることが知られているが⁷⁷⁾、その機能に関しては全く明らかにされていない。

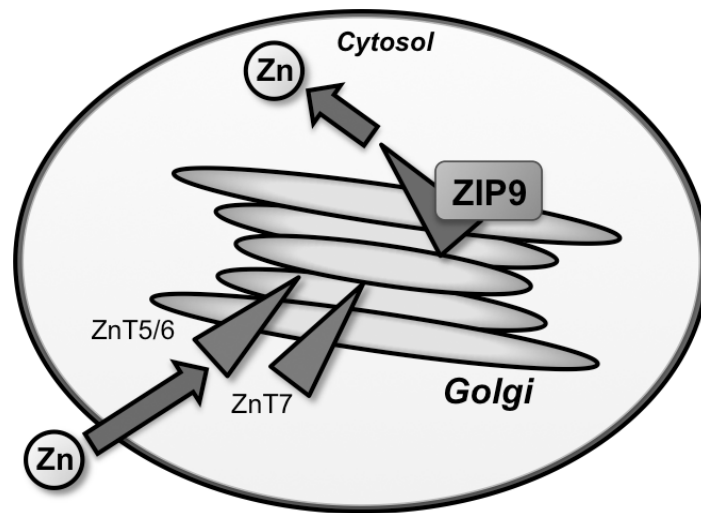


図 2-2, ZIP9; zinc transporters localized in Golgi.

著者は、ZIP9 による細胞内の亜鉛恒常性調節機能がシグナル伝達の制御に関与している可能性を考慮し、DT40 細胞の野生株 (WT 株)、ZIP9 ノックアウト株 (chicken Zip9KO: cZip9KO 株)、および ZIP9 とは逆方向の亜鉛輸送を行う ZnT5, 6, および 7 の TKO 株をエレクトロポレーション法により作製した。亜鉛トラン

スポンターの欠損に起因する細胞内亜鉛の調節異常が、BCR シグナル伝達経路の主要因子である Akt および Erk のリン酸化に与える影響についてウェスタンブロット法により解析した。また、細胞内亜鉛の機能評価として、それぞれの細胞株について Protein tyrosine phosphatase (PTPase) の酵素活性の測定を行った。さらに、細胞膜透過性亜鉛蛍光プローブである Newport Green PDX, および FluoZin-3 を用いた蛍光染色を行い、それぞれの細胞株における細胞内亜鉛レベル・局在の評価を行った。

【方法】

実験材料

1-Hydroxypyridine-2-thione zinc salt (ZnPy) および 2,2'-dithiodipyridine (Py) は Sigma-Aldrich, Inc.のものを使用した. TPEN は同仁化学研究所のものを使用した. Ionomycin, calcium salt Newport Green PDX, FluoZin-3 および BODIPY TR-ceramide は Invitrogen のものを使用した. 抗ニワトリ IgM 抗体は Beckman Coulter のものを使用した. phospho-Ser473 Akt, Akt, phospho-Thr202/Tyr204 p44/42 mitogen-activated protein kinase (MAPK) , p44/42 MAPK, HA-Tag (C29F4) , LY294002 (PI3K inhibitor) , U0126 (MEK inhibitor) は Cell Signaling Technologies のものを使用した. その他汎用試薬はナカライテスク株式会社のものを用いた.

実験方法

細胞培養

DT40 細胞株は, RPMI1640 (Sigma-Aldrich) に非働化済 10% FBS, 1% ChS, および 50 μ M 2-mercaptoethanol (2ME) を添加して, 温度 39.5°C, CO₂ 濃度 5%, 湿度 100%のインキュベーターで培養した. 亜鉛欠乏血清は 50 mL の血清 (体積

比で FBS:ChS=10:1) を Chelex-100 (CX) キレート樹脂 (Bio Rad) で処理した後、濾過滅菌することで調製した。

また、血清飢餓処理は、RPMI1640 に 0.5 % BSA (脂肪酸フリー), および 50 μ M 2ME を添加して、温度 37.0°C, CO₂ 濃度 5%, 湿度 100% のインキュベーターで培養することで行った。

プラスミドの設計

各亜鉛トランスポーター遺伝子の塩基配列から、機能的に重要なエクソンを薬剤耐性マーカー遺伝子 (Bsr^R, His^R, Puro^R, Zeo^R, および Neo^R) に置換させるようにコンストラクト DNA をデザインした (図 3)。 *Bam*HI, もしくは *Bg*III 切断部位を付加したプライマーを用いて、PCR 法により長腕、短腕にあたるゲノム DNA を回収し、それぞれ pCRII-TOPO ベクター (Invitrogen) にサブクローニングした。これらのプラスミドを *Bam*HI, *Bg*III で切断した後、1 つに連結し、長腕、短腕のつなぎ目にできた *Bam*HI, *Bg*III 認識部位に、*Bam*HI, *Bg*III 処理により切り出した薬剤耐性マーカー遺伝子を挿入することでコンストラクト DNA を作製した。DT40 細胞においてモノソミーである ZnT5 以外の亜鉛トランスポーターについては、2 個の対立遺伝子を別々にノックアウトする必要があるため、異な

るマーカー遺伝子を挿入したコンストラクト DNA を 2 種類それぞれ作製した.

また, TKO 株の作製には合計 5 個の対立遺伝子をノックアウトする必要がある

ため, 5 種の薬剤耐性マーカー遺伝子を用いてコンストラクト DNA を作製した.

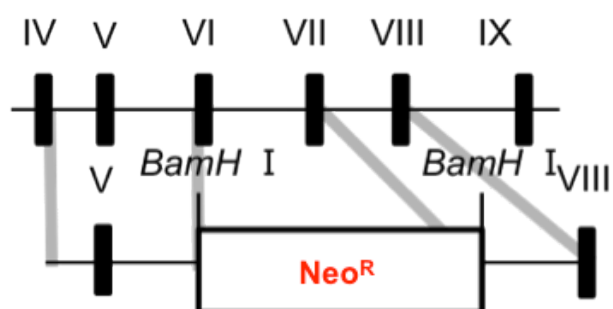


図 3-1, ZnT5-Neo^R targeting construct

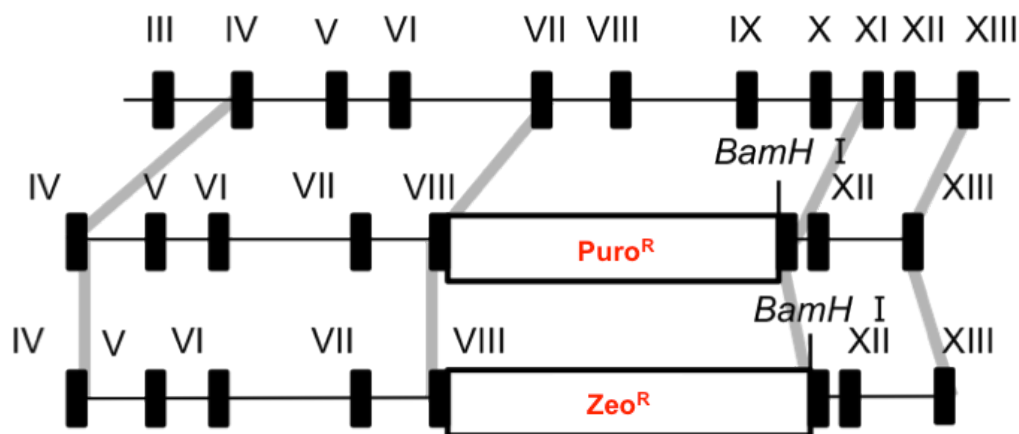


図 3-2, ZnT6-Puro^R targeting construct and ZnT6-Zeo^R targeting construct

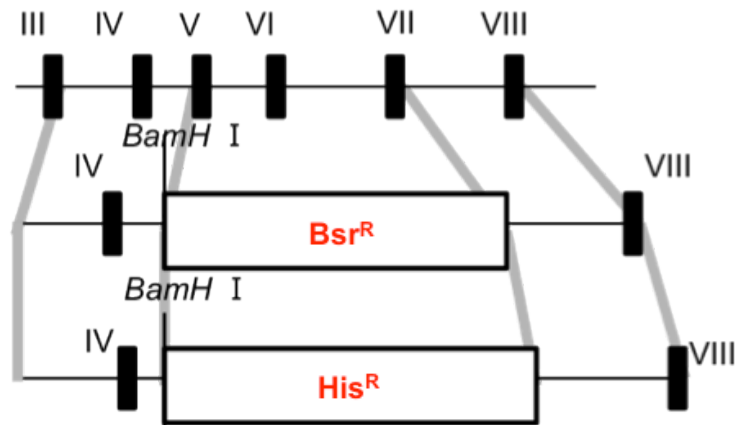


図 3-3, ZnT7-Bsr^R targeting construct and ZnT7-His^R targeting construct

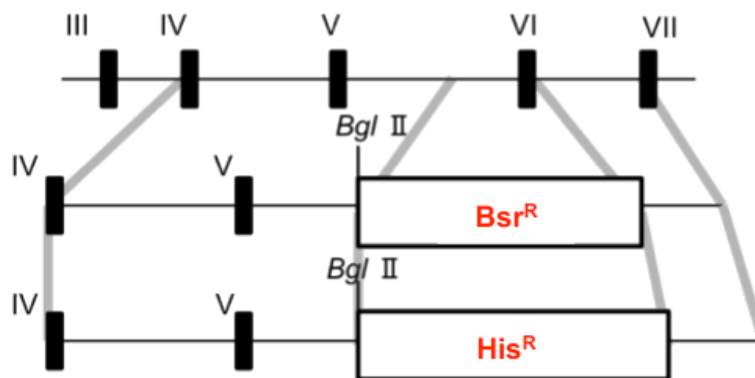


図 3-4, ZIP9-Bsr^R targeting construct and ZIP9-His^R targeting construct

大腸菌培養

プラスミド DNA の精製は, DH5 α (TOYOBO) 株を用いた. 培養は LB 培地において, 37°C で行った.

DNA の形質導入

DT40 細胞への形質導入はエレクトロポレーション法を用いて行った。 1×10^7 個の細胞を懸濁した PBS に、制限酵素により直鎖状にした 30 μg のコンストラクト DNA を添加し、Gene Pulser (Bio Rad) を用いて、550V, 25 μF の条件で電氣的に形質導入した。20mL の新鮮な培地で 24 時間培養した後、選択用薬剤を加えた 80mL の培地で懸濁し、96 穴プレートに 200 μL ずつ分注した。7-10 日後に薬剤耐性を持つクローンを 24 穴プレートに移して、さらに 2 日間培養した後、各クローンを 60 mm シャーレに移し、培養した。選択用薬剤にはそれぞれ、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Blastcidin-S (Sigma-Aldrich), 1 mg/mL Histidinol (ナカライテスク), 2 mg/mL Neomycin (ナカライテスク), 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Puromycin (Invitrogen) および 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zeomycin (Invitrogen) を用いた。さらに、ZnT7, ZnT5, ZnT6 の順で KO することで、TKO 細胞株を得た。また、いずれの形質導入細胞株についても 3 クローン以上取得した。

タンパク質の調製

DT40 細胞を 0.5% BSA-HBSS (25 mM Hepes-NaOH, pH 7.4, 120 mM NaCl, 0.8 mM MgCl_2 , 5.4 mM KCl, and 2 mM CaCl_2) で洗浄して 3000 rpm で 5 分間、室温で

遠心回収し、0.5% BSA-HBSS に 500 mL あたり 3.5×10^5 個となるように再懸濁した。その後、細胞懸濁液に対して、抗 IgM 抗体、ZnPy, ZnCl₂, あるいは Py を用いて 37.0°C で 10-30 分間処理を行った。また、実験によっては、PI3K 阻害剤として LY294002, MEK 阻害剤として U0126 を用いて 37.0°C で 30 分間、前処理を行った。0.5% BSA-HBSS で洗浄した後、Cell lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton-X100, 0.1% SDS, 10 mM NaF, and 1 mM NaVO₃) を用いて室温で 15 分間混和して溶解させ、14000 rpm で 5 分間、4°C で遠心して、上清をタンパク質として用いた。調製したタンパク質濃度は BSA を標準として、Bradford 法により測定した。

ウエスタンブロット解析

調製したタンパク質 (30 µg) を 10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、ニトロセルロースメンブレンにタンク式ブロッティング装置で転写した。その後、メンブレンは 5% スキムミルクを含む TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) でブロッキングした後、1 次抗体と 4°C で 15 時間反応させた。1 次抗体は、抗 pAkt, 抗 Akt, 抗 pErk, 抗 Erk, および抗 HA 抗体を、それぞれ 5 %BSA を含む TBST で 1000-2000 倍に希釈して用いた。イン

キューベートの後、メンブレンを TBST で 5 分間 × 3 回洗浄し、5 %BSA を含む TBST で 2000 倍に希釈した HRP 標識 2 次抗体を用いて、室温で 1 時間 2 次抗体反応を行った。再びメンブレンを TBST で 5 分間 × 3 回洗浄した後、Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrates (Millipore, Billerica, MA, USA) で化学発光させ、Chemi-Doc XRS system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いてバンドを検出した。

PTPase 活性の測定

DT40 細胞を 2mL の低温ホモジナイズバッファー (0.25 M sucrose, 20 mM HEPES, and 1 mM EDTA) に懸濁し、氷上でダウンスホモジナイザーを用いて破碎した。ホモジネートを 2200 rpm, 4°C で 10 分間遠心し、核を取り除いた。その後、12000 rpm, 4°C で 1 時間遠心し、ペレットを PTP lysis buffer (50 mM bis-tris, 2 mM EDTA, pH 6.3 with HCl 5 mM DTT, 20% glycerol, and 0.1% Triton X-100) を用いて室温で 15 分間混和して溶解させ、さらに 14000 rpm で 5 分間、4°C で遠心して、上清をタンパク質として用いた。調製したタンパク質濃度は BSA を標準として、Bradford 法により測定し、タンパク質 (10 µg) を 10 分間、室温でプレートインキュベートした後、96 穴プレートに分注した。Substrate solution (10 mg/mL

p-nitrophenyl phosphate in assay buffer: 50 mM Bis-Tris, 2 mM EDTA, pH 6.3 with HCl, and 5 mM DTT) を 100 μ L 添加し、室温で 15 分間インキュベートした後、酵素活性により遊離した p-nitrophenol の量を 405nm 波長の吸光度より求めた。無刺激の WT 株の PTPase 活性をコントロールとして、それぞれの株、および刺激条件における PTPase 活性の評価を行った。

亜鉛選択的蛍光染色および細胞内遊離亜鉛濃度の評価

1×10^6 個の DT40 細胞を 0.5%BSA および 50 μ M 2ME を添加した RPMI1640 培地にて 37°C で 5 時間インキュベートし、血清飢餓をかけた。0.05% ポリ-L-リジンでコーティングしたカバーガラス上で 5 μ M の Newport Green PDX あるいは FluoZin-3 を用いて 30 分間処理を行った。同時に、BODIPY TR ceramide を用いてゴルジ体の染色を行った。その後、ZnPy および抗 IgM 抗体を用いて DT40 細胞を刺激した。染色した細胞は共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss LSM510) を用いて観察した。

5×10^5 個の DT40 細胞を Newport Green PDX で染色し、抗 IgM 抗体刺激時の細胞内遊離亜鉛濃度を評価した。細胞内の遊離亜鉛濃度は以下の公式を用いて算出した。

$$[\text{Zn}] = K_D \times [(F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)]$$

蛍光強度 (F) の測定には、プレートリーダー GENIOS (TECAN) を用いた。F_{min} は 10 μM TPEN で処理することで求め、F_{max} は過剰の ZnPy (75 μM) を添加することで求めた。

また、細胞内に蛍光プローブが取り込まれているかを確認するため、細胞を Newport Green PDX で処理し、0.5% BSA/HBSS で洗浄した後、50 μM のジギトニンを含む HBSS で細胞を溶解した。過剰量の ZnSO₄ (20 μM) を添加することで細胞内に取り込まれていた Newport Green PDX すべてを亜鉛と結合させ、その蛍光強度を測定した。Newport Green PDX の濃度は *in vitro* で作成した検量線を用いて算出した。

細胞生存率の評価

細胞生存率の評価は MTT アッセイおよび Cytotox-Glo (Promega) を用いて行った。MTT アッセイは、1 × 10⁶ 個/mL の DT40 細胞を 100 μL ずつ 96 穴プレートに分注し、5 mg/mL MTT 溶液を 10 μL 添加して行った。6 時間培養した後、可溶化液 (10% SDS, 10mM NH₄Cl) を 100 μL 添加して 37°C で 16 時間インキュベートした。その後 595 nm 波長における吸光度を測定し、細胞の生存率を評価

した.

Cytotox-Glo に関しては, DT40 細胞を 0.5% BSA-HBSS (25 mM Hepes-NaOH, pH 7.4, 120 mM NaCl, 0.8 mM MgCl₂, 5.4 mM KCl, and 2 mM CaCl₂) で洗浄して 3000 rpm で 5 分間, 室温で遠心回収し, 0.5% BSA-HBSS に 500 μL あたり 3.5×10^5 個となるように再懸濁した. その後, 細胞懸濁液に対して, ZnPy を用いて 37.0°C で 10 分間処理し, DT40 細胞を 100 μL ずつ 96 穴プレートに分注した. AAF-Glo Substrate 溶液を 100 μL 添加し, 室温で 15 分間静置した後, アミノルシフェリンと死細胞に由来するプロテアーゼとの反応によって生じる発光強度 (A) を測定した. その後, ジギトニンを含む Assay Buffer を添加し, 細胞をすべて溶解させた時の発光強度 (B) を測定した. その後, B から A を差し引くことで細胞の生存率を評価した.

【結果】

1. BCRシグナルの活性化における亜鉛の影響.

著者はまず，DT40 細胞の野生株を用いて，抗原刺激された BCR シグナル経路に対する細胞内亜鉛の影響を検討した． Akt および Erk それぞれのリン酸化体，あるいは総 Akt および総 Erk に特異的な抗体を用いて，細胞膜透過性亜鉛キレーターである TPEN 処理の有無による BCR シグナルにおけるこれらのタンパク質のリン酸化についてウェスタンブロット法により解析した（図 4-1）．

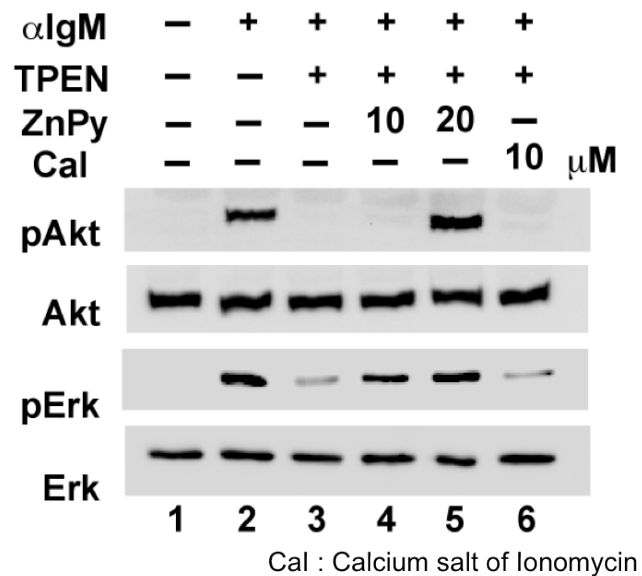


図 4-1, Enhancement of Akt and Erk phosphorylation required zinc. Serum-starved cells were treated with (+) or without (-) 10 μ M TPEN for 1 h, before treatment with 0.5 mg/mL anti-IgM antibody (lane 2 and 3), and then treated with 10 and 20 μ M ZnPy (lane 4 and 5) or 10 μ M Cal (lane 6).

その結果、抗 IgM 抗体による BCR の活性化が、Akt および Erk のリン酸化を誘導していることが観察された (図 4-1, レーン 2). 興味深いことに、抗 IgM 抗体の刺激による Akt および Erk のリン酸化は細胞膜透過性の亜鉛キレート剤である TPEN 10 μ M で 1 時間処理することにより抑制された (図 4-1, レーン 3). また、亜鉛イオノフォアである、ZnPy, Akt に関しては 10 μ M, Erk に関しては 20 μ M 添加することで、TPEN 処理によるこれらのタンパク質のリン酸化の抑制が回復した (図 4-1, レーン 4, および 5). 一方で、カルシウムイオノフォアであるイオノマイシンカルシウム塩の添加では、これらのタンパク質のリン酸化は回復されなかった (図 4-1, レーン 6).

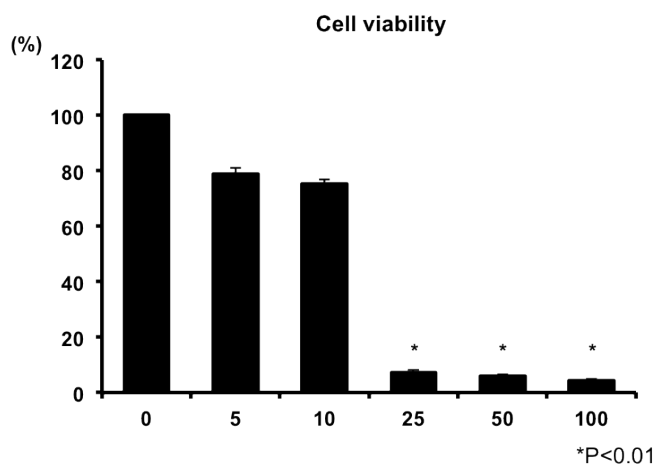


図 4-2, Effect of TPEN pretreatment against a viability of DT40 cells. Serum-starved cells were treated with 5 μ M (column 2), 10 μ M (column 3), 25 μ M (column 4), 50 μ M (column 5), and 100 μ M (column 6) TPEN.

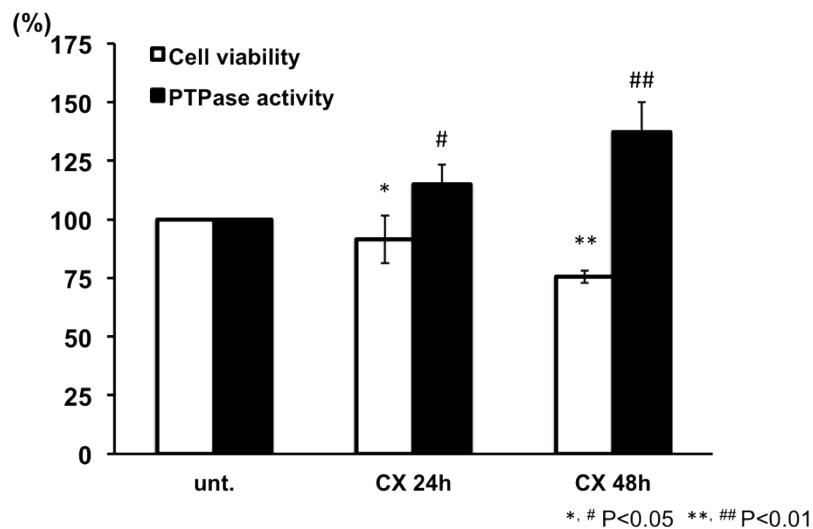


図 4-3, Effect of treatment with Chelex-100 resin (CX) against a viability of DT40 cells and PTPase activity. Cells were incubated for 24 h (column 3 and 4), and 48 h (column 5 and 6) with zinc-free serum constructed by CX treatment.

また，MTT アッセイにより，10 μ M の TPEN による処理が細胞の生存率に影響していないことを確認した（図 4-2）．さらに，Chelex-100 樹脂（CX）を用いて培地中の血清に含まれる亜鉛をキレートして作製した亜鉛欠乏培地を用いて DT40 細胞を培養したところ，培養後 24 時間で細胞生存率が低下し，48 時間後には約 25%の細胞の死滅が観察された．また，亜鉛欠乏培地での培養によって，細胞質内の PTPase 活性が上昇していることが明らかになった（図 4-3）．

次に、細胞内の亜鉛が Akt および Erk のリン酸化に関与しているかどうかを調べるため、亜鉛イオンとして ZnCl_2 を用いて、 ZnPy を添加した場合と比較した (図 4-4). その結果、5-10 μM の ZnPy の添加により、抗 IgM 抗体で刺激した場合と同程度まで Akt および Erk のリン酸化が増強されていた (図 4-4, レーン 2, 5, および 6). しかしながら、10 μM の塩化亜鉛の添加では、これらのタンパク質のリン酸化は増強されなかった (図 4-4, レーン 3, および 4). また、亜鉛を含まないピリチオン (Py) のみを添加した場合にも、Akt および Erk のリン酸化が増強されることはなかった (図 4-4, レーン 7).

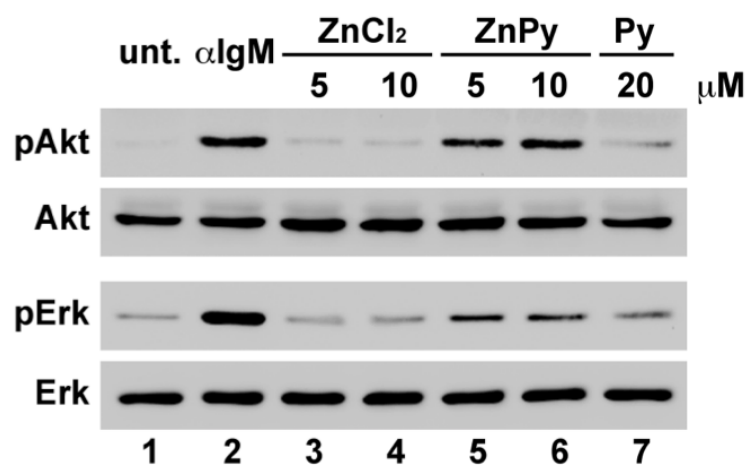
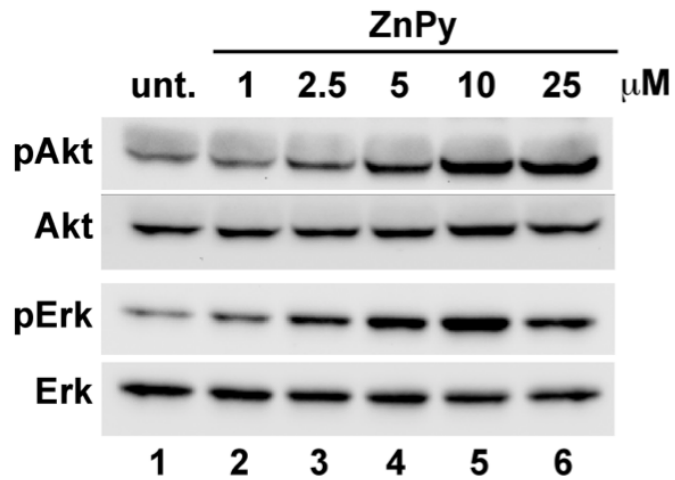


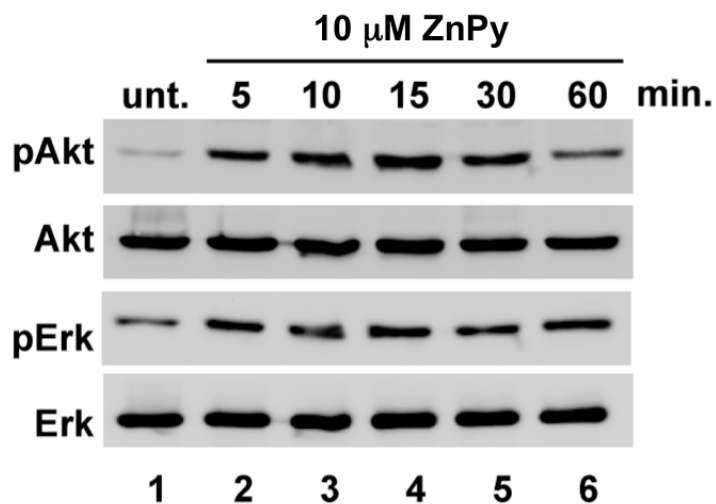
図 4-4, The treatment with ZnPy activated the phosphorylation of Akt and Erk. The abbreviation, "unt." was defined the untreated sample. Serum-starved cells were treated with 0.5 mg/mL anti-IgM antibody (lane 2), 5 and 10 μM ZnCl_2 (lanes 3 and 4), 5 and 10 μM ZnPy (lanes 5 and 6), and 20 μM pyridithione (lane 7) for 10 min.

さらに, ZnPy の濃度を 0, 2.5, 5, 10, 25 μ M と変化させて添加したところ, ZnPy 濃度依存的な Akt および Erk のリン酸化の増強がみられた (図 4-5). また, 10 μ M の ZnPy の添加により, Akt および Erk が充分増強されることがわかった.

また, 10 μ M の ZnPy を用いて, 添加時間を 0, 5, 10, 15, 30, および 60 分に変化させて検討を行った (図 4-6). その結果, ZnPy 添加時間依存的な Akt および Erk のリン酸化の増強が観察され, 約 10 分の添加時間により, これらのタンパク質のリン酸化が充分増強され, Akt においては 30 分, Erk に関しては 60 分まで, リン酸化の増強が持続されることがわかった. 次に, 同じ実験条件における細胞生存率を評価したところ, 少なくとも 60 分の ZnPy 添加までは, DT40 細胞の生存率に影響を与えないことが確認された (図 4-7).



☒ 4-5, Akt and Erk phosphorylation by ZnPy was enhanced in a dose-dependent manner. The abbreviation, "unt." was defined the untreated sample. Serum-starved cells were treated with 1 μ M ZnPy (lane 2), 2.5 μ M (lane 3), 5 μ M (lane 4), 10 μ M (lane 5), and 25 μ M (lane 6).



☒ 4-6, Akt and Erk phosphorylation by ZnPy was enhanced in a time-dependent manner. The abbreviation, "unt." was defined the untreated sample. Serum-starved cells were treated with 10 μ M ZnPy for 5 min (lane 2), 10 min (lane 3), 15 min (lane 4), 30 min (lane 5), and 60 min (lane 6).

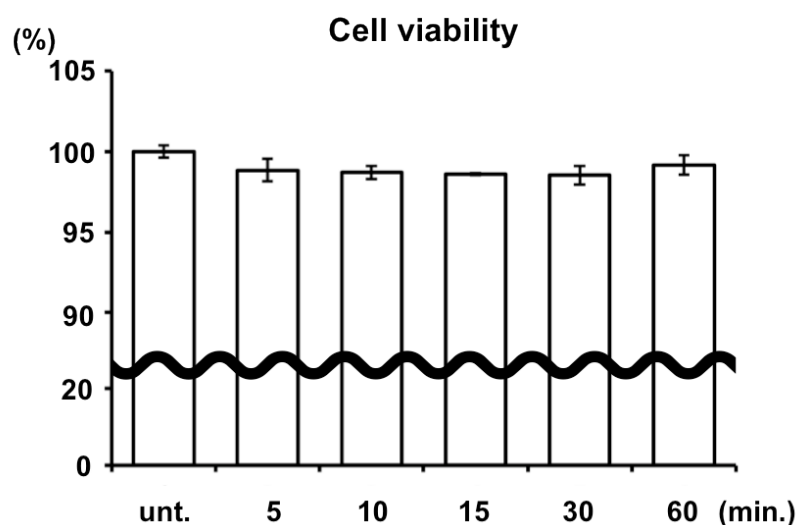


図 4-7, ZnPy did not affect against a viability of DT40 cells. The abbreviation, "unt." was defined the untreated sample. Serum-starved cells were treated with 10 μ M ZnPy for 5 min (column 2), 10 min (column 3), 15 min (column 4), 30 min (column 5), and 60 min (column 6).

さらに、細胞内の亜鉛により誘起される Akt および Erk のリン酸化について、より詳細な検討を行うため、BCR シグナルにおける Akt の上流因子である PI3K, および Erk の上流因子である MEK の阻害剤として、LY294002 (図 4-8 A) および U0126 (図 4-8 B) をそれぞれ用いて処理した後、DT40 細胞に抗 IgM 抗体による刺激, あるいは ZnPy 添加を行った. その結果, 抗 IgM 抗体で刺激した場合, シグナルの開始点である BCR からリン酸化が伝達されるため, これらの阻害剤の処理により Akt および Erk のリン酸化がそれぞれ抑制されていた (図 4-8 C,

レーン 1-4). 一方, ZnPy を添加した場合にも, これらの阻害剤によって Akt および Erk のリン酸化が抑制を受けていることがわかった(図 4-8 C, レーン 5-8).

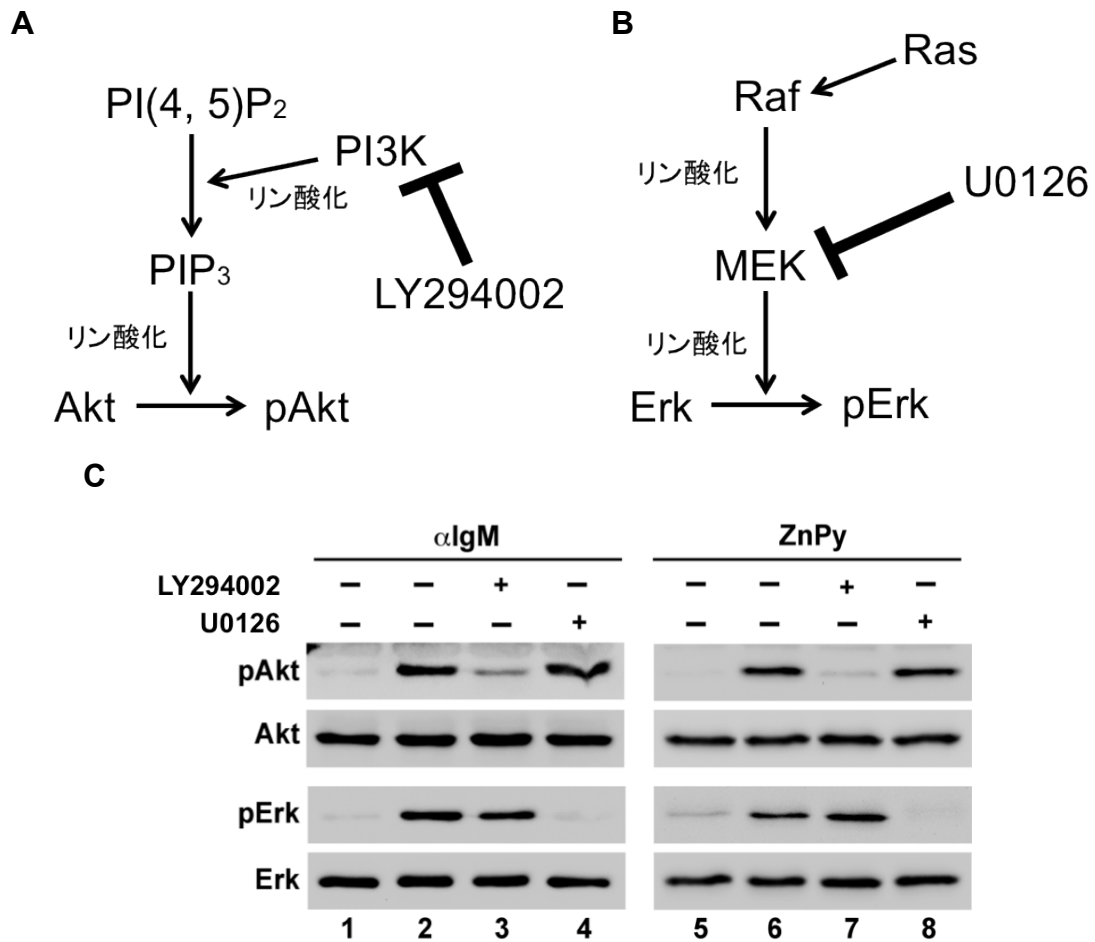


図 4-8, A, and B: The inhibitors of PI3K and MEK. C: These inhibitors inhibited the phosphorylation of Akt and Erk. Serum-starved cells were pretreated with (+) or without (-) LY294002 or U0126, before treatments with 0.5 mg/mL anti-IgM antibody (lanes 1-4) and 10 μ M ZnPy (lanes 5-8).

2. BCRシグナルの活性化におけるニワトリZIP9ノックアウトの影響.

著者は、亜鉛トランスポーターにより制御される細胞内の亜鉛レベルの変動が、Akt および Erk のリン酸化に影響を与えるかどうかを検討するため、ZIP9あるいは ZnT5, 6 および 7 をノックアウトした細胞株を用いた。著者はまず、血清の存在下、通常培養条件におけるこれらのタンパク質のリン酸化について検討した。その結果、野生株および ZnT5, 6 および 7 遺伝子の三重欠損 (TKO) 株においては、通常培養の状態において観察される Akt および Erk のリン酸化がみられたが、ニワトリ Zip9 遺伝子ノックアウト (cZip9KO) 株においてはこれらのタンパク質はリン酸化されていなかった (図 5-1)。

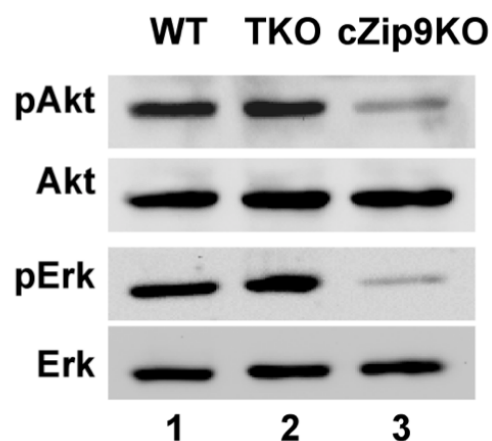


図 5-1, Suppression of Akt and Erk phosphorylation in cZip9KO cells. Western blot analysis was performed using exponentially growing WT (lane 1), TKO (lane 2), and cZip9KO (lane 3) cells.

また、同じ実験条件において、細胞内の PTPase 活性を測定したところ、TKO 株においては PTPase 活性の低下がみられ、cZip9KO 株においては PTPase 活性の上昇が観察された (図 5-2)。

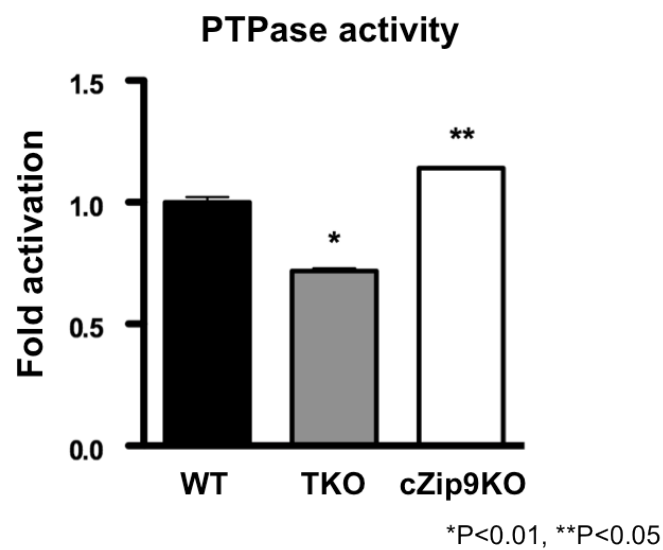


図 5-2, Analysis of total PTPase activity. WT (column 1), TKO (column 2), and cZip9KO (column 3) cells were subjected to PTPase assay.

また、それぞれの株における総チロシンリン酸化レベルをウエスタンブロット法により解析したところ、cZip9KO 株においてチロシンリン酸化レベルの減弱がみられた (図 5-3)。

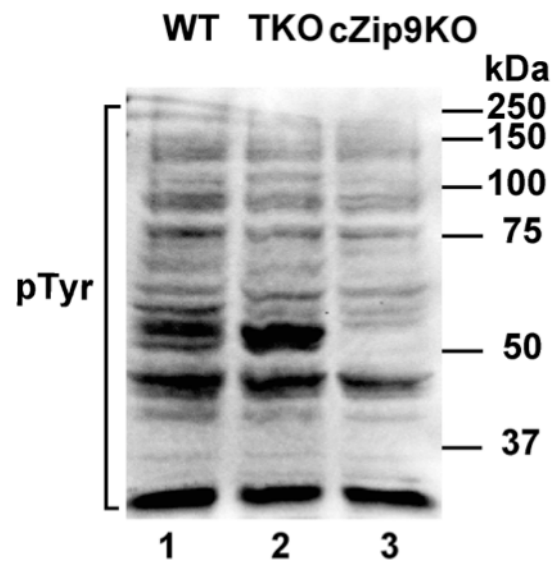


Figure 5-3, Suppression of total tyrosine phosphorylation in cZip9KO cells. Western blot analysis was performed using exponentially growing WT (lane 1), TKO (lane 2), and cZip9KO (lane 3) cells.

さらに詳細な検討を行うため、血清飢餓条件において、それぞれの株に 10 μ M の ZnPy を添加して検討を行った (図 5-4)．その結果、野生株および TKO 株では、ZnPy の添加による Akt および Erk のリン酸化の増強がみられたが、cZip9KO 株においてはこれらのタンパク質のリン酸化は増強されなかった．

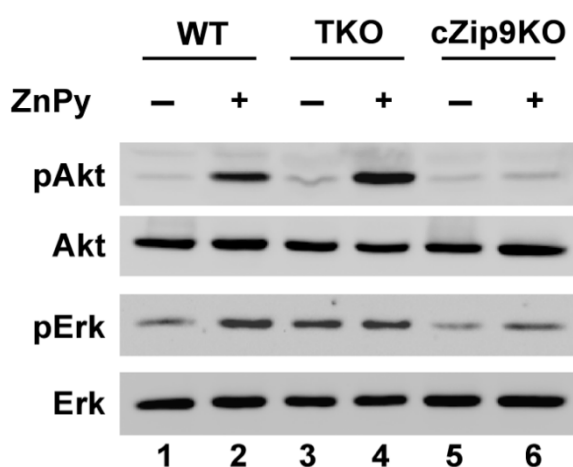


図 5-4, ZnPy failed to induce Akt and Erk phosphorylation in cZip9KO cells. Serum-starved WT (lanes 1 and 2), TKO (lanes 3 and 4), and cZip9KO (lanes 5 and 6) cells were treated with (+) or without (-) 10 μ M ZnPy for 10 min.

また、それぞれの株について PTPase 活性を測定した．野生株において、ZnPy 添加による PTPase 活性の低下がみられた (図 5-5, カラム 2)．それに対して、TKO 株においては、ZnPy の添加による顕著な PTPase 活性の低下はみられなかった (図 5-5, カラム 3, および 4) また、cZip9KO 株の PTPase 活性は未処理の

状態で野生株の約 2 倍以上まで上昇しており，ZnPy を添加しても PTPase 活性は低下しなかった（図 5-5，カラム 5，および 6）。

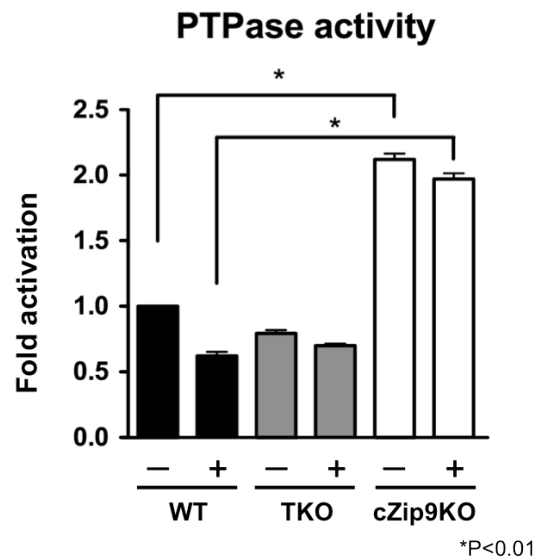


図 5-5, Analysis of PTPase activity in serum-starved DT40 cells. After treatment of serum-starved WT (columns 1 and 2), TKO (columns 3 and 4), and cZip9KO (columns 4 and 5) cells treated with (columns 2, 4 and 6) or without (columns 1, 3 and 5) 10 μ M ZnPy for 10 min, and subjected to PTPase assay.

さらに，それぞれの株について総チロシンリン酸化レベルの解析を行った。その結果，WT 株および TKO 株において，ZnPy 添加によるチロシンリン酸化の減弱がみられた。また，cZip9KO 株におけるチロシンリン酸化レベルの減弱は，ZnPy を添加しても回復しなかった（図 5-6）

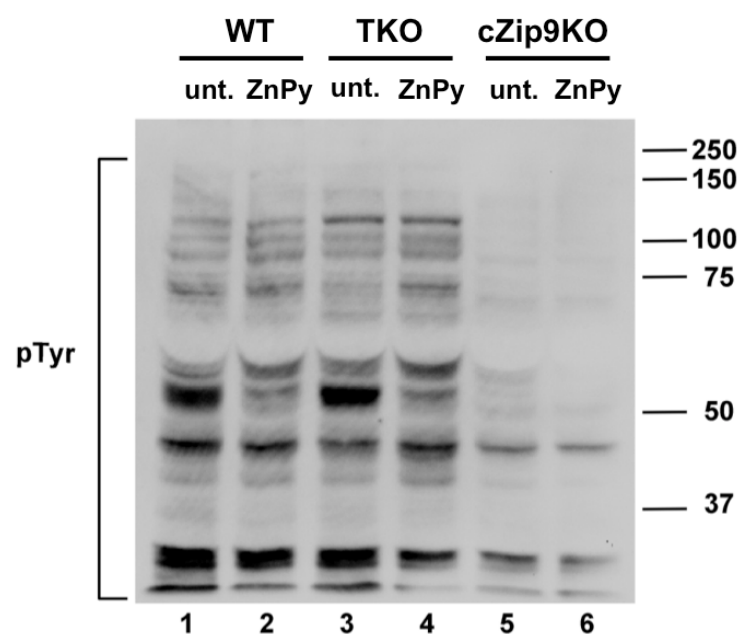
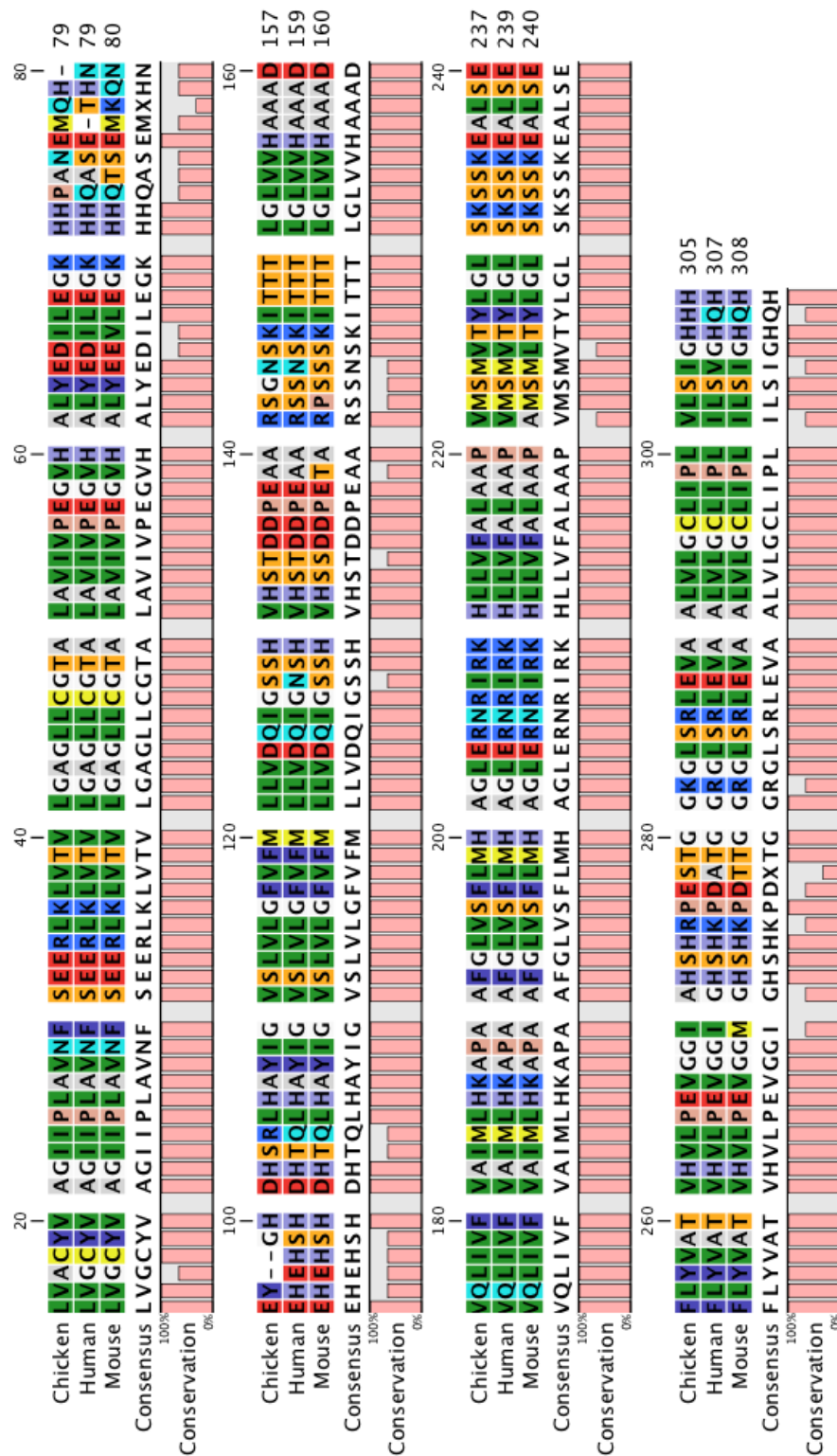


Fig. 5-6, ZnPy failed to induce total tyrosine phosphorylation in cZip9KO cells. The abbreviation, "unt." was defined the untreated sample. Serum-starved WT (lanes 1 and 2), TKO (lanes 3 and 4), and cZip9KO (lanes 5 and 6) cells were treated with 10 μ M ZnPy for 10 min.

3. BCRシグナルの活性化制御におけるヒトZip9遺伝子過剰発現の影響.

ここまでの実験結果により, Akt および Erk のリン酸化を亜鉛トランスポーターZIP9 が制御している可能性が示唆された. ここで, 亜鉛調節による, 細胞内リン酸化の制御が ZIP9 の分子機能として, ニワトリ以外の生物種においても保存されているかを調べるため, ニワトリ, ヒトおよびマウスの ZIP9 のアミノ酸配列を比較した (図 6-1). ニワトリ ZIP9 はヒト ZIP9 と約 90%, マウス ZIP9 と約 87%の高い相同性を有していたことから, cZip9KO 株に hZip9 を導入することで, ZIP9 の機能の回復が見られるかどうかを検討した. cZip9KO 株には, ヘマグルチニン (HA) タグを付加した hZip9 遺伝子を導入し, cZip9KO+hZip9HA 株とした.



☒ 6-1, Amino acid sequence of ZIP9 protein

通常培養条件において、Akt および Erk のリン酸化について調べたところ、cZip9 のノックアウトにより減弱していたこれらのタンパク質のリン酸化が、hZip9 遺伝子の導入により回復していることがわかった(図 6-2). また、hZip9HA 株における PTPase 活性に関しても、野生株と同程度の活性を示した (図 6-3).

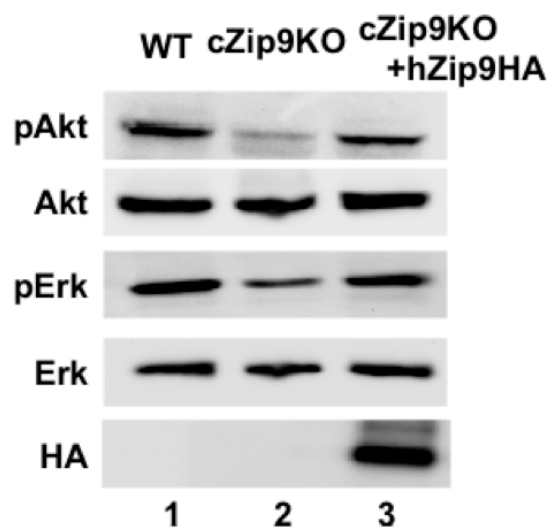


図 6-2, Overexpression of hZip9 restored the phosphorylation of Akt and Erk. Western blot analysis was performed using exponentially growing WT (lane 1), cZip9KO (lane 2), and cZip9KO+hZip9HA (lane 3) cells.

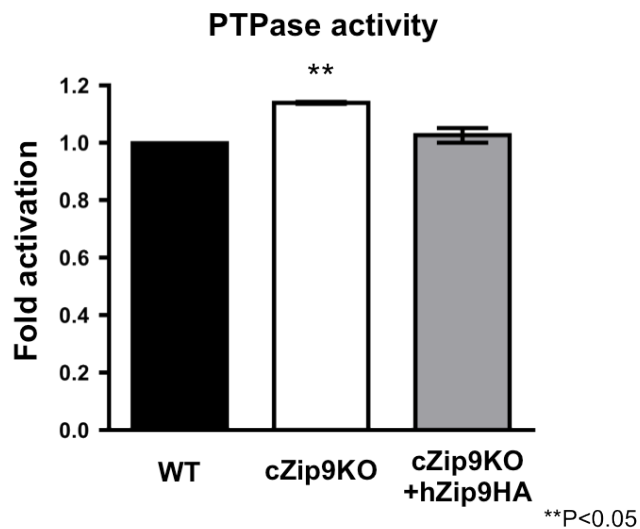


図 6-3, Analysis of total PTPase activity. WT (column 1), cZip9KO (column 2), and cZip9KO+hZip9HA (column 3) cells were subjected to PTPase assay.

さらに詳細な検討を行うため、血清飢餓条件においてそれぞれの株に 10 μ M の ZnPy を 10 分あるいは 30 分の添加時間で添加して検討を行った。その結果、cZip9KO 株において、Akt のリン酸化は 30 分の ZnPy 添加でも増強されないことがわかった（図 6-4, 第 1 パネル, レーン 5, および 6）。また、cZip9KO 株における Erk のリン酸化は 10 分の ZnPy 添加では起こらず、30 分の ZnPy 添加による増強のみが確認された（図 6-4, 第 3 パネル, レーン 5, および 6）。それに対して、hZip9HA 株においては、Akt および Erk のリン酸化が 10 分の ZnPy 添加の時点で増強されていた（図 6-4, レーン 8, および 9）。また、ZnPy の添加は

hZip9HA の発現に影響を与えなかった (図 6-4, 第 5 パネル, レーン 7-9).

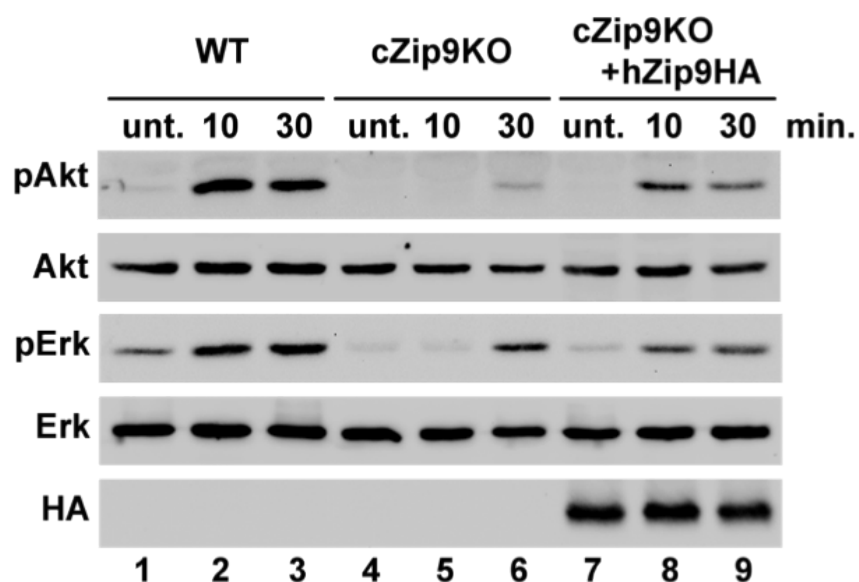


図 6-4, Overexpression of hZip9 in cZip9KO cells by ZyPy treatment stimulated the phosphorylation of both proteins. Serum-starved WT (lanes 1-3), cZip9KO (lanes 4-6), and cZip9KO+hZip9HA (lanes 7-9) cells were treated with 10 μ M ZnPy for 10 min (lanes 2, 5 and 8) and 30 min (lanes 3, 6 and 9). The abbreviation, "unt." was defined the untreated sample.

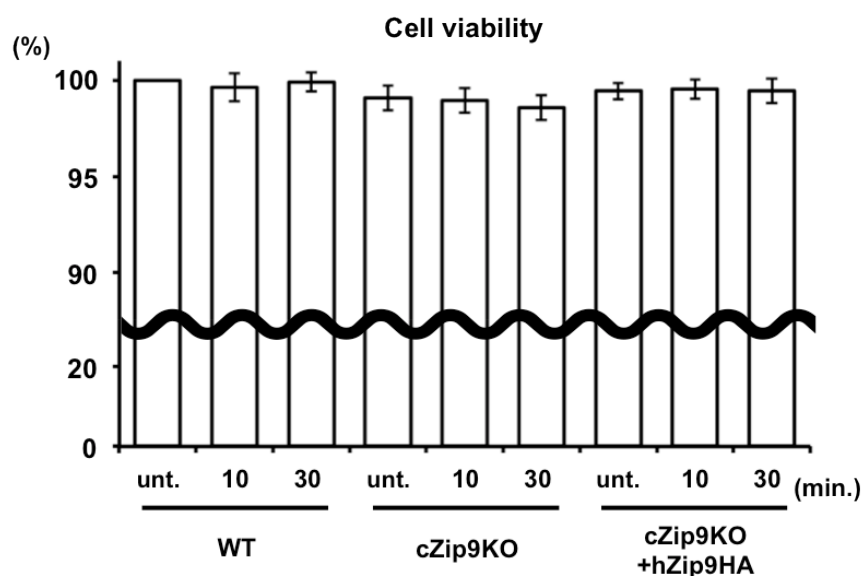


図 6-5, Overexpression of hZip9 in cZip9KO cells and ZnPy treatment did not affect against cell viability. Serum-starved WT (columns 1-3), cZip9KO (columns 4-6), and cZip9KO+hZip9HA (columns 7-9) cells were treated with 10 μ M ZnPy for 10 min (columns 2, 5 and 8) and 30 min (columns 3, 6 and 9). The abbreviation, "unt." was defined the untreated sample.

同条件における細胞生存率を評価したところ、cZip9 遺伝子のノックアウトおよび cZip9KO 株への hZip9 遺伝子の導入による影響、およびそれらの株に対する ZnPy 添加の影響はみられなかった (図 6-5)。さらに、それぞれの株における PTPase 活性を調べたところ、hZip9HA 株の PTPase 活性は野生株と同程度であった (図 6-6, カラム 7-9)。また、hZip9KO 株において ZnPy 添加による PTPase 活性の阻害が観察された (図 6-6, カラム 4)。

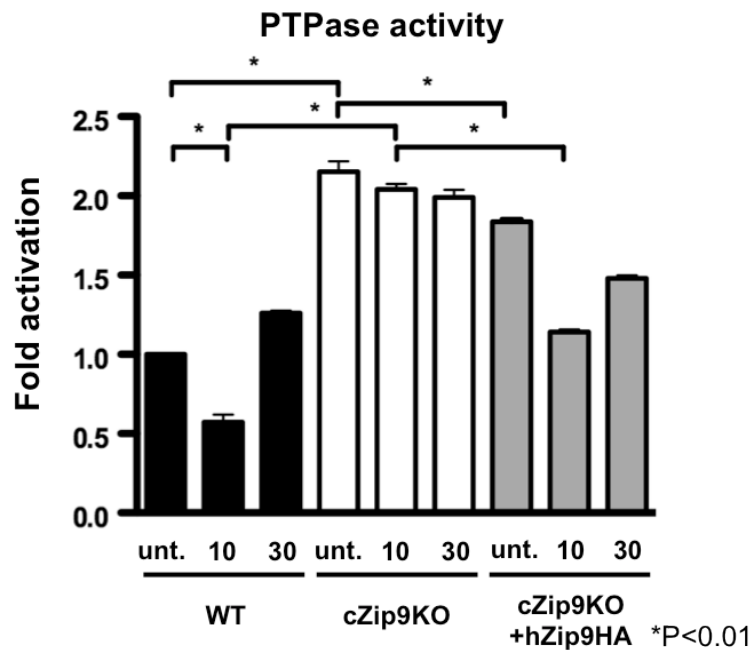


図 6-6, Analysis of total PTPase activity. Serum-starved WT (columns 1-3), cZip9KO (columns 4-6), and cZip9KO+hZip9HA (columns 7-9) cells were treated with 10 μ M ZnPy for 10 min (columns 2, 5 and 8) and 30 min (columns 3, 6 and 9). Values are expressed as the mean $\pm$ standard deviations. Significant difference at the level of $*P < 0.01$ for the columns linked by a line.

一方、抗 IgM 抗体による刺激条件において同様の検討を行ったところ、cZip9KO 株においては Akt および Erk のリン酸化が増強されなかった（図 6-7, レーン 4）。それに対して、hZip9HA 株においてはこれらのタンパク質のリン酸化が増強されていた（図 6-7, カラム 6）。

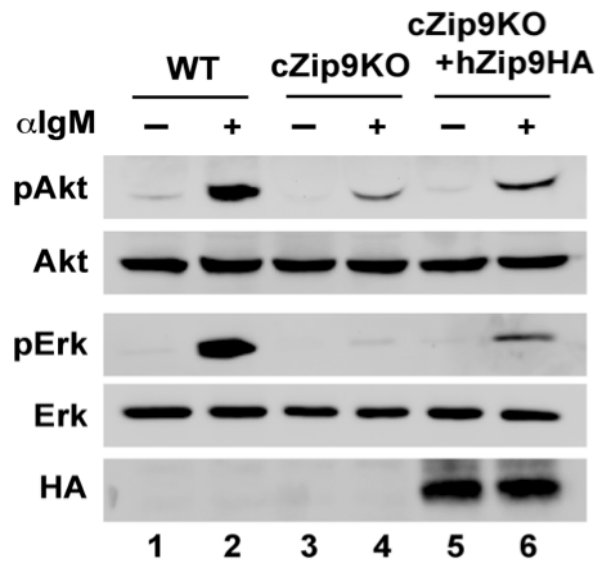


Fig. 6-7, Overexpression of hZip9 restored the response to anti-IgM antibody-stimulated BCR activation. Serum-starved WT (lanes 1 and 2), cZip9KO (lanes 3 and 4), and hZip9-HA-overexpressing cZip9KO (lanes 5 and 6) cells were treated with 0.5 mg/mL anti-IgM antibody for 10 min.

4. ZIP9による細胞質への亜鉛放出の評価と細胞質内亜鉛濃度の測定.

次に, DT40 細胞において, ゴルジ体から細胞質への亜鉛放出が ZIP9 によって行われているかを調べるため, 亜鉛に対する感受性の異なる 2 種の細胞膜透過性亜鉛選択的蛍光プローブ (Newport Green PDX, および FluoZin-3) を用いて細胞内の亜鉛染色を行った. また, ゴルジ体マーカーとして, BODIPY TR ceramide を使用し, これらの亜鉛選択的蛍光プローブと同時に染色することで, 細胞内の亜鉛の分布を評価した.

Newport Green PDX による染色の結果から, WT 株において ZnPy の添加による細胞質の亜鉛レベルの上昇がみられた (図 7-1 パネル a および b). しかし, cZip9KO 株においては ZnPy 添加による細胞内の亜鉛レベルの上昇はみられなかった (図 7-1, パネル c および d). また, hZip9HA 株においては WT 株と同様に, ZnPy の添加による細胞質の亜鉛レベルの上昇が観察された (図 7-1, パネル e および f). 次に, FluoZin-3 による染色の結果から, 未処理の DT40 細胞においては, ゴルジ体内に亜鉛が集積していることが明らかになった (図 7-1, パネル g, i および k). また, 野生株および hZip9HA 株において, ZnPy を添加した時に細胞内全体に亜鉛が拡散しているのに対し (図 7-1, パネル h および l),

cZip9KO 株においては、ZnPy を添加しても細胞内の亜鉛はゴルジ体に蓄積したままであった (図 7-1, パネル j)。

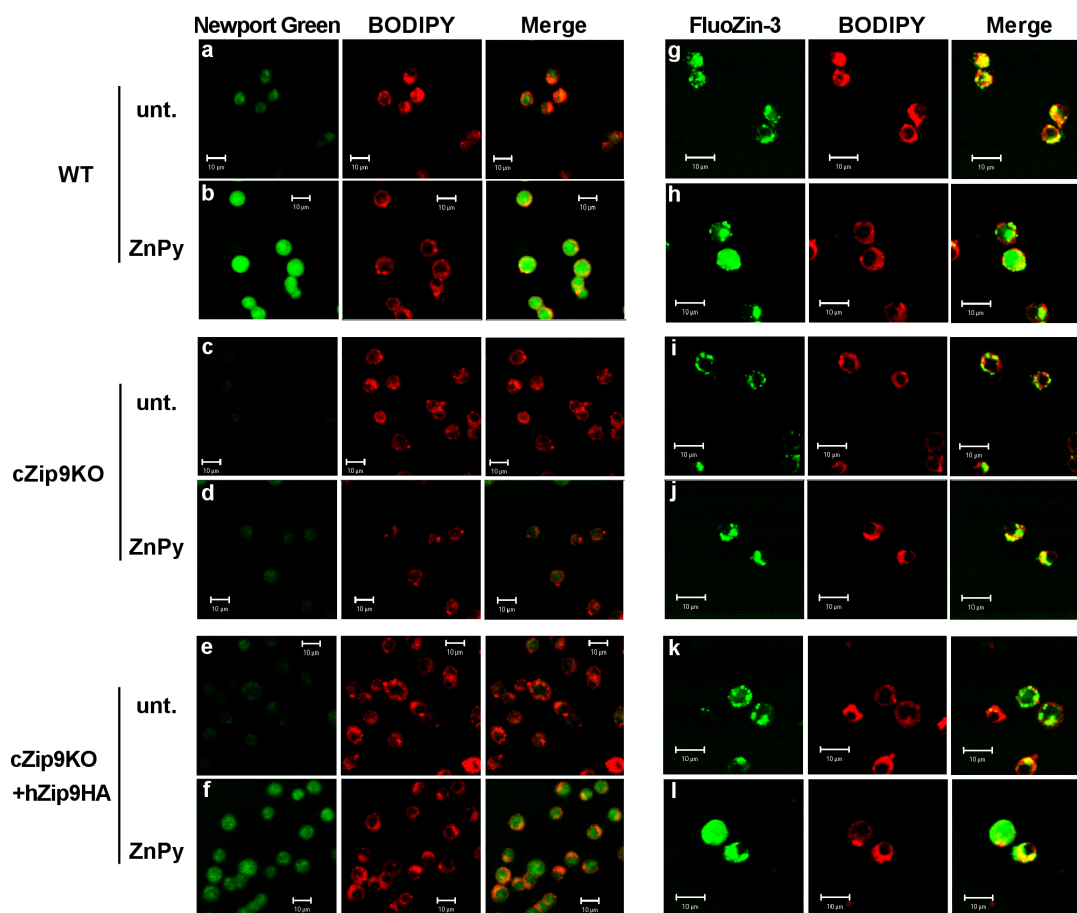


図 7-1, The intracellular zinc release depends on the expression of ZIP9. Serum-starved WT (panels a, b, g and h), cZip9KO (panels c, d, i and j), and hZip9-HA-overexpressing cZip9KO (panels e, f, k and l) DT40 cells were pretreated with 5 μ M Newport Green PDX (magnification; $\times 40$), FluoZin-3 (magnification; $\times 60$) and BODIPY TR-ceramide for 30 min before treatment with 10 μ M ZnPy (WT: panels b and h, cZip9KO: panels d and j, hZip9-HA-overexpressing cZip9KO: panels f and l) for 10 min.

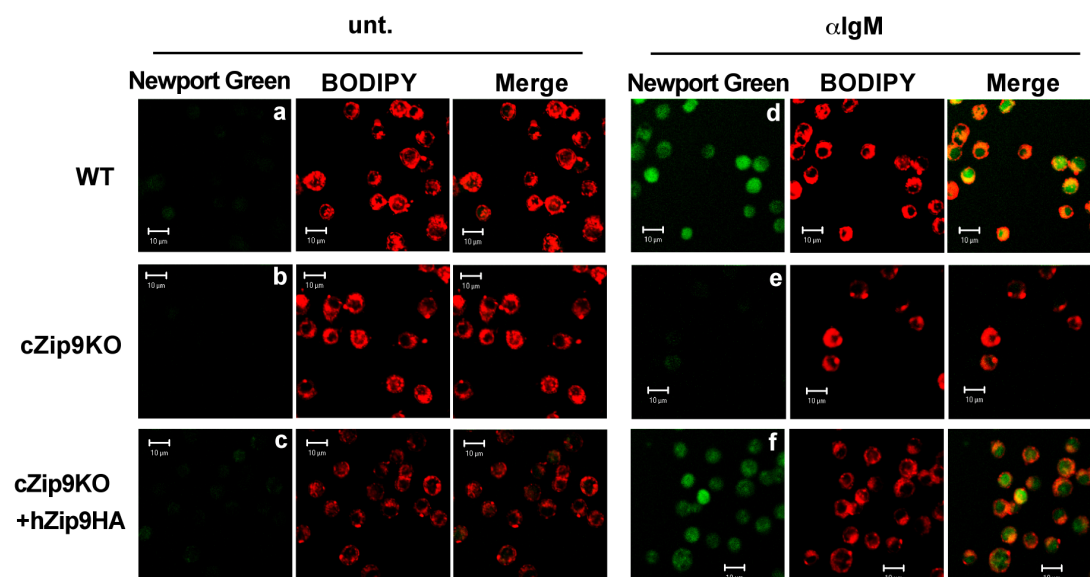


図 7-2, Serum-starved WT (panels a and d), cZip9KO (panels b and e), and hZip9-HA-overexpressing cZip9KO (panels c and f) DT40 cells were pretreated with 5 μ M Newport Green PDX (magnification; $\times 40$) and BODIPY TR-ceramide for 30 min before treatment with 0.5 mg/mL anti-IgM antibody (WT: panel d, cZip9KO: panel e, hZip9-HA-overexpressing cZip9KO: panel f) for 10 min. The abbreviation, "unt." was defined the untreated sample, and white bars were defined as 10 μ m length.

同様に、抗 IgM 抗体で刺激した場合にも、野生株および hZip9KO 株においては抗 IgM 抗体の刺激に応じて細胞質の亜鉛レベルの上昇が起きていたのに対し（図 7-2, パネル a, d, c および f), cZip9KO 株においては抗 IgM 抗体の刺激に起因する細胞内の亜鉛レベルの上昇は観察されなかった（図 7-2, パネル b および e).

また, Newport Green PDX を細胞内に取り込ませた後, 洗浄し, 50 μM のジギトニンを含む HBSS で溶解させた. 過剰量の亜鉛 (20 μM ZnSO_4) を添加することで, 細胞内に取り込まれていた Newport Green PDX すべてを亜鉛と結合させて蛍光強度を測定し, 得られた検量線 (図 7-3 A) から細胞内の Newport Green PDX の濃度を求めたところ, それぞれの株において, 5 μM の Newport Green PDX のうち, 約 95%以上が細胞内に取り込まれていることを確認した (図 7-3 B).

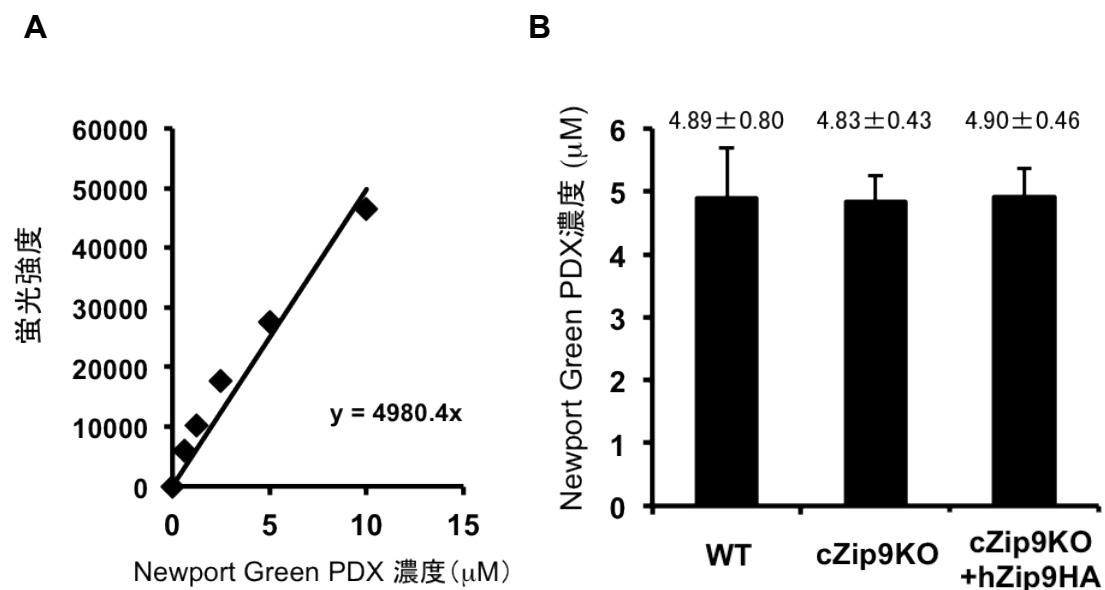


図 7-3, The concentration of Newport Green PDX in DT40 cells was calculated using the calibration curve. After treatment of Newport Green PDX (5 μM for 30 min), washed out with 0.5% BSA/HBSS, and then lysed with HBSS buffer containing 50 μM Digitonin, and added excessive amounts of ZnSO_4 (20 μM).

さらに、 5×10^5 個の DT40 細胞内に取り込ませた $5 \mu\text{M}$ の Newport Green PDX の蛍光強度を測定することにより、細胞質内の亜鉛濃度の測定を行った (図 7-4) .

その結果、WT 株において、抗 IgM 抗体の刺激により、細胞質の亜鉛濃度の上昇が確認できた (未処理 ; $2.05 \pm 0.17 \mu\text{M}$, 抗体刺激 ; $2.87 \pm 0.30 \mu\text{M}$) . 一方で、cZip9KO 株においては、細胞質内の亜鉛濃度は抗 IgM 抗体で刺激しても上昇しなかった (未処理 ; $0.58 \pm 0.09 \mu\text{M}$, 抗体刺激 ; $0.87 \pm 0.13 \mu\text{M}$) . また、hZip9HA 株の細胞質内亜鉛濃度は、野生株と同程度まで回復していた (未処理 ; $1.88 \pm 0.18 \mu\text{M}$, 抗体刺激 ; $2.71 \pm 0.14 \mu\text{M}$) .

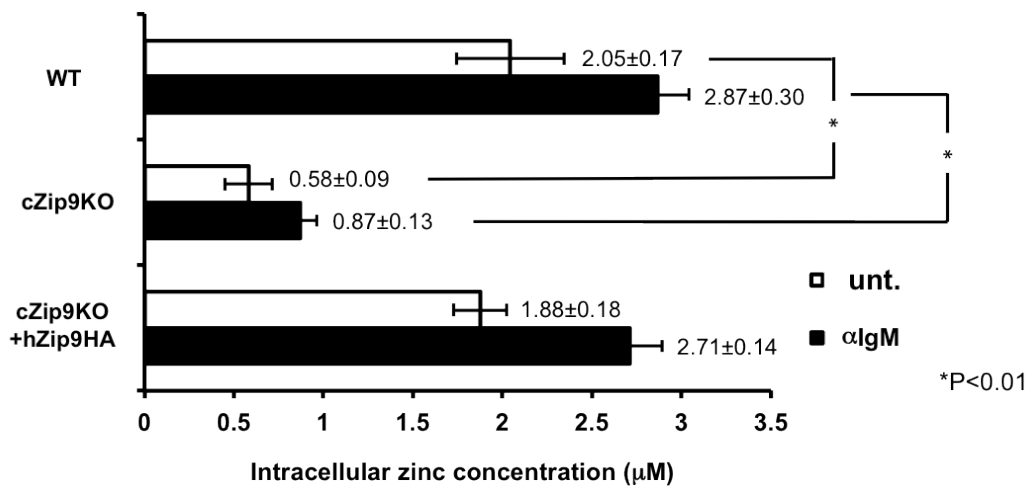


図 7-4, The concentration of intracellular free zinc in DT40 cells. Serum-starved WT (column 1 and 2), cZip9KO (column 3 and 4), and hZip9-HA-overexpressing cZip9KO (column 5 and 6) cells were treated with $5 \mu\text{M}$ Newport Green PDX for 30min, and then stimulated with 0.5 mg/mL anti-IgM antibody.

さらに, DT40 細胞の野生株を抗 IgM 抗体で刺激した場合についても亜鉛濃度の測定を行った (図 7-5). その結果, 細胞質内の亜鉛濃度の上昇は遅くとも刺激 5 分後には起きており, Akt および Erk のリン酸化が十分に増強される刺激 10 分後と同程度まで上昇していることがわかった (未処理 ; $2.05 \pm 0.17 \mu\text{M}$, 抗体刺激 5 分後 ; $2.61 \pm 0.22 \mu\text{M}$, 抗体刺激 10 分後 ; $2.87 \pm 0.30 \mu\text{M}$). 一方で, 細胞に ZnPy を添加した場合には, 細胞内に取り込まれた Newport Green PDX のほぼすべてが亜鉛と結合している状態であることが確認された (ZnPy 添加 ; $5.45 \pm 0.52 \mu\text{M}$).

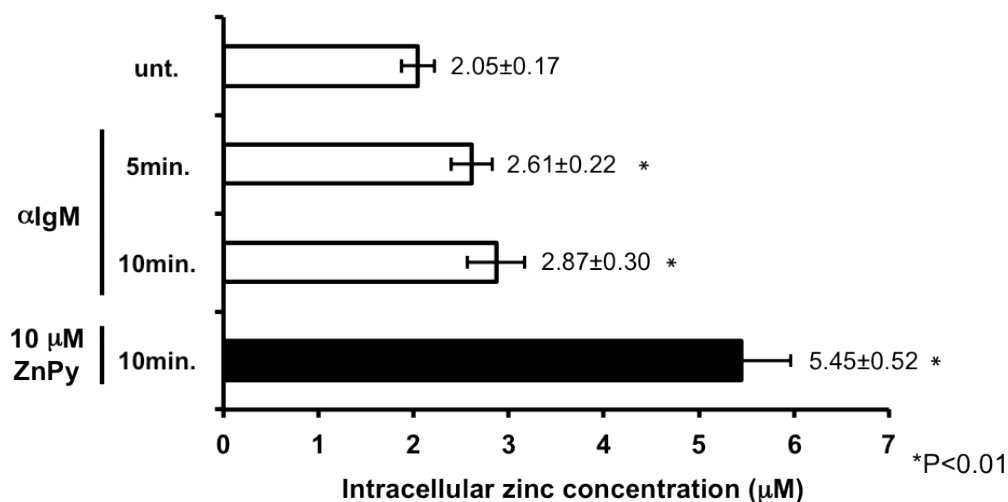


図 7-4, The concentration of intracellular free zinc in DT40 cells. Serum-starved WT cells were treated with $5 \mu\text{M}$ Newport Green PDX for 30min, and then stimulated with 0.5 mg/mL anti-IgM antibody for 5 min (column 2), 10 min (column 3), or treated with $10 \mu\text{M}$ ZnPy for 10 min (column 4).

【考察】

必須微量元素である亜鉛は、すべての生物種にとって重要な金属元素である。また、亜鉛は栄養素としてだけでなく、細胞内のセカンドメッセンジャーとして機能する⁵⁷⁾。生体内における亜鉛の恒常性は、ZnTあるいはZIPと呼ばれる2種の亜鉛トランスポーターによって厳密に制御されている。ZIPファミリーに属する亜鉛トランスポーターは4つのサブファミリー (I, II, LIV-1, およびgufA) に分類される14の亜鉛トランスポーターで構成されている。これまでに、ZIPトランスポーターに関する研究は数多くなされており、それらの機能と重要性に関して明らかにされている³⁷⁻³⁹⁾。しかしながら、これまでの研究により報告されているのは、LIV-1およびZIPIIサブファミリーに属する亜鉛トランスポーターに関する知見しかなく⁴⁰⁾、ZIPIサブファミリーに属する亜鉛トランスポーターである、ZIP9の細胞機能については、未だ不明なままであった。

一方、細胞内の亜鉛はT細胞受容体シグナル伝達の活性化およびサイトカイン産生を含むT細胞およびリンパ球の免疫機能に影響を与えることが知られている⁵⁴⁾。これは、細胞内の亜鉛濃度上昇が、Lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase (LCK) およびPKCの活性化を誘導するだけでなく、TCRシグナルの活性化につ

ながら ζ -chain-associated protein kinase (ZAP70) のチロシンリン酸化を増強することに起因することも併せて報告されている⁵⁶⁾。BCRシグナルはB細胞の生存、細胞増殖、アポトーシスなど多くの細胞機能に関して重要な役割を担っており^{67-72, 76)}、BCRの活性化はPI3K-Akt, PLC γ 2-PKC, およびRas-Raf-Erkなどのカスケード経路にシグナルを伝達する^{71, 73, 76)}。これらのカスケードは、抗体産生や記憶B細胞への分化に重要であるが、BCRシグナルにおける細胞内亜鉛の影響は不明な部分が多い。

そこで、本研究ではモデル細胞としてニワトリBリンパ球DT40細胞株を用いて、BCRシグナル伝達経路におけるZIP9によって制御された細胞内亜鉛の影響について検討を行った。

細胞膜透過性の亜鉛キレーターである TPEN 処理によって細胞内外の亜鉛をマスクした状態では、抗 IgM 抗体刺激に起因する Akt, および Erk のリン酸化の増強が起こらなかった (図 4-1, レーン 3)。また、TPEN によるこれらのタンパク質のリン酸化の減弱はカルシウムイオノフォアである、イオノマイシンの添加では回復しなかったのに対し、亜鉛イオノフォアである ZnPy を、Akt では 20 μ M, Erk では 10 μ M 添加することにより回復した (図 4-1, レーン 4, 5 およ

び 6). また, CX 処理により血清中に含まれる亜鉛イオンを取り除いた亜鉛欠乏培地で DT40 細胞を培養すると, 24-48 時間の培養で細胞生存率の低下および PTPase 活性の上昇がみられた (図 4-3). PTPase は活性中心のシステイン残基と亜鉛が結合することでその活性が阻害されることが知られているため, 細胞質内の亜鉛欠乏により, その活性が上昇したものと考えられた. 以上の結果から, DT40 細胞の細胞機能の維持および抗 IgM 抗体刺激による BCR シグナルの活性化には亜鉛が必要である可能性が示された. 次いで, 亜鉛イオンとして塩化亜鉛を添加しても Akt および Erk のリン酸化は増強されなかった (図 4-4, レーン 3 および 4). また, 亜鉛を含まないピリチオンのみでも, これらのタンパク質のリン酸化は増強されなかった (図 4-4, レーン 7) ことから, BCR シグナルの活性化には細胞内の亜鉛が必要であることが示された. これは, ZnPy は細胞膜透過性を持つため, 強制的に亜鉛を細胞内に動員できるのに対し, 亜鉛イオンのままでは, 細胞膜上の亜鉛トランスポーターによる輸送のみでしか亜鉛を細胞内に汲み入れることができず, BCR シグナルを活性化できないためであると考えられた. また, ZnPy 濃度依存的な Akt および Erk のリン酸化が見られ (図 4-5), 10 分の ZnPy 添加により十分なリン酸化の増強が起きていた (図 4-6) こ

とから、BCR シグナルにおける Akt および Erk のリン酸化に細胞内の亜鉛が必要であることが示された。また、ZnPy の添加は、少なくとも 60 分までは細胞生存率に影響がなく（図 4-7）、これらのタンパク質のリン酸化が細胞死に起因するものではないことが示された。さらに、Akt の上流因子である PI3K および Erk の上流因子である MEK の阻害剤による前処理によって、これらのタンパク質のリン酸化の増強が ZnPy を添加した場合においても抗 IgM 抗体刺激の場合と同様にそれぞれ抑制された（図 4-8）ことから、細胞内の亜鉛は Akt, および Erk のリン酸化を直接的に増強するのではなく少なくとも PI3K および MEK の上流の因子に作用し、BCR シグナル経路の活性化を介してこれらのタンパク質のリン酸化を増強していることが示された。以上の実験結果により、細胞内の亜鉛が BCR シグナル伝達経路の活性化に必須であることが明らかになった。

次に、通常培養条件において cZip9KO 株の Akt および Erk のリン酸化が減弱していることがわかった（図 5-1）。TKO 株においては PTPase 活性が抑制され、cZip9KO 株においては増大していた（図 5-2）。以上の結果から、これらの亜鉛トランスポーターのノックアウトにより、細胞質の亜鉛レベルに変動が起きている可能性が示唆された。また、cZip9KO 株において総チロシンリン酸化レベ

ルの減弱がみられた (図 5-3). この結果は, cZip9Ko 株における PTPase 活性の上昇を反映したものであった. 特に, 約 50 kDa のタンパク質のチロシンリン酸化が特異的に減弱しており, このタンパク質が ZIP9 の標的タンパク質である可能性が考えられた (図 5-3, レーン 3). このタンパク質の同定に関しては, 今後さらなる検討を行う予定である. 次に, 血清飢餓条件下において, それぞれの株に ZnPy を添加して検討を行ったところ, WT 株および TKO 株ではリン酸化の増大がみられたが, cZip9KO 株においては, これら分子のリン酸化は増強されなかった (図 5-4). さらに, cZip9KO 株においては, PTPase 活性が WT 株および TKO 株と比較して, 著しく増大していた (図 5-5) ことから, 細胞内亜鉛による PTPase 阻害を介したチロシンリン酸化の誘導に ZIP9 が必要である可能性が示唆された. ここでも, cZip9KO 株における, 総チロシンリン酸化レベルの減弱が観察され, ZnPy を添加してもリン酸化レベルは回復しなかった (図 5-6). また, WT 株および TKO 株においても ZnPy 添加により, チロシンリン酸化が減弱しているタンパク質が存在することが明らかになった. 先の, cZip9KO 株における標的タンパク質と同様に, これらのチロシンリン酸化タンパク質に関しても, 今後, 検討を行う必要があると考えている.

一方、無刺激の状態の TKO 株においては、Erk のリン酸化が血清飢餓によって抑制されなかった (図 5-4, レーン 3). その理由として、ゴルジ体内への亜鉛輸送には、ZnT5/6/7 とは異なる独立した輸送機構が存在する可能性、あるいは ZnT5/6/7 の欠損のためにゴルジ体内に到達できなかった亜鉛が細胞質内に留まることで持続的な PTPase 活性の阻害が起きている可能性が推察された. また、cZip9KO 株に ZnPy を添加した場合において細胞質に亜鉛が拡散しないのは、細胞質において遊離の亜鉛が毒性を有するため、速やかにゴルジ体へと輸送されるためである可能性、あるいは ZnPy が有する膜透過性のためにゴルジ体内にまで ZnPy が透過し、ゴルジ体において何らかのタンパク質に亜鉛を供給している可能性が考えられた. 今後、ZnT5/6/7 を介したゴルジ体への亜鉛輸送が ZIP9 の機能のために必要とされているかどうかを明らかにするためには、これらの仮説に対するさらなる検討が必要である. しかしながら、TKO 株において、ZnPy の添加により WT 株と同程度までこれらのタンパク質のリン酸化が増強されていたことから、膜透過性を有する ZnPy は、TKO 株においてもゴルジ体内まで到達し、ZIP9 を介して細胞質に放出されることで BCR シグナルの活性化を制御している可能性が示唆された.

さらに、著者はこの活性化が ZIP9 に依存しているかどうかを調べるために、hZip9-HA エンコーディングプラスミド DNA を cZip9KO 細胞に導入し、過剰発現させた。ZIP9 の欠損により減弱していた Akt および Erk のリン酸化が hZip9 遺伝子の導入により回復し、ヒトにおいても ZIP9 が BCR シグナル経路のリン酸化において重要な役割を果たしている可能性が示唆された (図 6-2)。また、cZip9KO+hZip9HA 株の PTPase の酵素活性は WT 株と同程度まで抑制されており、ZIP9 の欠損に起因する PTPase 活性の増大が hZip9 遺伝子の導入により回復したことが確認された (図 6-3)。PTPase は、その活性中心であるシステイン残基に亜鉛が結合することにより、酵素活性が阻害されることが知られ^{78, 79)}、亜鉛による PTP1B の活性阻害がインスリン-/IGF 受容体の活性を高めることが報告されている⁸⁰⁾。PTP1B は小胞体の細胞質側表面に局在していることが明らかにされており^{81, 82)}、ゴルジ体から ZIP9 を介して細胞質に放出された亜鉛により生じる局所的な亜鉛濃度上昇による影響を受けている可能性が考えられる。また、神経細胞において亜鉛が Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) のユビキチン-プロテアソーム系を介したタンパク質分解を誘導することでその活性を阻害し、シグナル伝達を制御していることも報

告されており⁸³⁾、PTPase タンパク質の分解に亜鉛あるいは亜鉛トランスポーターが関与している可能性も考えられ、細胞質内の遊離亜鉛による PTPase 酵素阻害の分子メカニズムの解明を目指し、より詳細な検討を行なっていく必要がある。

次いで、血清飢餓条件においてもそれぞれの株に ZnPy を添加したところ、cZip9KO 株において、Akt では ZnPy 添加によるリン酸化の増強が起きないこと、Erk に関しては 30 分の ZnPy 添加まで、リン酸化の増強が起こらないことが明らかになった（図 6-4, レーン 4, 5 および 6）。それに対して、hZip9HA 株ではこれらのタンパク質のリン酸化が 10 分の ZnPy 添加により増強されていた（図 6-4, レーン 7, 8 および 9）。また、ZnPy は hZip9HA の発現レベルに影響を与えず（図 6-4, 第 5 パネル, レーン 7, 8 および 9）、cZip9 のノックアウトおよび hZip9HA の導入も細胞の生存率に影響を与えなかった（図 6-5）。さらに、同条件における PTPase 活性を検討したところ、cZip9 のノックアウトにより上昇していた PTPase 活性が、hZip9 の導入により回復したことが観察された（図 6-6）。以上の結果から、ZIP9 の分子機能がヒトにおいても保存されており、ZIP9 が亜鉛の輸送を介して PTPase 活性を制御することにより、BCR シグナルにおけるリン酸

化を調節していることが示された.

また, 同様の実験条件において, WT 株では抗 IgM 抗体刺激により Akt および Erk のリン酸化が増強されたが, cZip9KO 株においてはこれらのタンパク質のリン酸化は増強されなかった. 抗 IgM 抗体刺激条件においても, ZIP9 の欠損により抑制されたリン酸化は, hZip9 遺伝子の導入により回復していた (図 6-7). このことから, 抗 IgM 抗体刺激による BCR シグナルの活性化には, ZIP9 による細胞質への亜鉛放出が必要であり, ZIP9 が抗 IgM 抗体の刺激に応じて細胞質に亜鉛を放出している可能性が示唆された.

さらに, Akt および Erk のリン酸化に関与していると考えられる, ZIP9 を介したゴルジ体からの亜鉛放出と細胞内亜鉛レベルを評価するため, 細胞膜透過性の亜鉛選択的蛍光プローブである, Newport Green PDX および FluoZin-3 を用いて蛍光染色を行い, 共焦点レーザー顕微鏡により観察した. Newport Green PDX と亜鉛との結合は弱く ($K_D = 30 \mu\text{M}$), 細胞質に存在する遊離の亜鉛のみを染色することができる. 一方で, FluoZin-3 は亜鉛との強力な結合能 ($K_D = 15 \text{ nM}$) を持ち, かつ, ゴルジ体にも移行することから, ゴルジ体内に存在する亜鉛を染色することが可能である. これらの感度の異なる 2 種の蛍光プローブを

用いて染色することにより，細胞内の亜鉛の分布を明らかにした．

Newport Green PDX を用いた染色により，WT 株において，ZnPy 添加により細胞内亜鉛レベルの上昇が起きている様子が観察された（図 7-1 パネル a および b）．一方，cZip9KO 株においては無刺激の状態で細胞内亜鉛レベルが低下しており，ZnPy 添加による細胞内亜鉛濃度の増加も観察されなかった（図 7-1, パネル c および d）．これらの細胞内亜鉛レベルの減少に関しても hZip9 遺伝子の導入による回復が見られた（図 7-1, パネル e および f）．また，FluoZin-3 を用いた亜鉛染色の結果から，未処理の状態の DT40 細胞においては，亜鉛がゴルジ体内に集積していることが確認できた．また，ZnPy を添加した場合，WT 株および cZip9KO+hZip9HA 株においては細胞全体に亜鉛が拡散しているのが観察できるのに対し（図 7-1, パネル h および i），cZip9KO 株においては亜鉛が細胞質にほとんど存在せず，ゴルジ体内側に蓄積していることが明らかになった（図 7-1, パネル h および i）．

同様に，WT 株および cZip9KO+hZip9HA 株においては抗 IgM 抗体刺激による細胞内の亜鉛レベルの上昇が見られた（図 7-2, 上部パネル, および下部パネル）が，cZip9KO 株を抗 IgM 抗体で刺激しても細胞内亜鉛レベルは上昇しなかった

(図 7-2, 中央パネル) . この時, cZip9KO 株においては, 細胞質内の亜鉛濃度が野生株と比較して約 1/4 に減少し, hZip9 遺伝子の導入により細胞質内の亜鉛濃度も回復することが示された (図 7-4). 以上の結果から, BCR シグナル経路における Akt, Erk のリン酸化には, ZIP9 によってゴルジ体から細胞質に亜鉛が放出されることが必須であることが明らかになった.

本研究において示された結果は, ZnPy あるいは抗 IgM 抗体の処理による BCR シグナル伝達の活性化が, ZIP9 に依存する経路であることを示している. しかしながら, 活性化した BCR がどのようにして ZIP9 を介した細胞質の亜鉛濃度の上昇を引き起こしているかについては, 未だ検討すべき課題が残されたままである. 小胞体およびゴルジ体に局在している ZIP7 および ZIP13 に関しては, 細胞外からの刺激に応じて亜鉛トランスポータータンパク質の発現レベルの上昇が起こることが報告されており⁸⁴⁾, ZIP7 が EGF/IGF の刺激に応じて, カゼインキナーゼ (CK2) によってリン酸化されることで亜鉛輸送機能を発揮することが明らかにされている³⁷⁾. 一方で, Smad2/3 の Mad ホモロジドメインに亜鉛を供給しているとされる ZIP13 を介した亜鉛輸送が BMP/TGF β による制御を受けていることが明らかになっている^{85, 86)}. ZIP9 に関しても, その機能はこれら

の ZIP トランスポーターと類似した部分があり，ZIP7 や ZIP13 のような発現制御あるいは活性化の調節が細胞外刺激により行われているかもしれない．しかしながら，ZIP7 と ZIP13 はともに LIV-1 サブファミリーに属し，この 2 つの亜鉛トランスポーターは非常に酷似している．ZIP9 は ZIP I サブファミリーに属しており，これらのトランスポーターとは構造上異なる部分を数多く有しているため，全く異なる機序による制御を受けている可能性も伺える．また，本研究において用いた DT40 細胞は，ニワトリ B リンパ球であり，ZIP7 を発現していない⁴⁰⁾．そのため，DT40 細胞において，ZIP9 が重要な機能を保持していた可能性も考えられた．従って，哺乳類あるいはヒトの細胞において ZIP9 の分子機能やメカニズムおよび高次構造などに関してさらなる検討を行い，明らかにしていきたいと考えている．

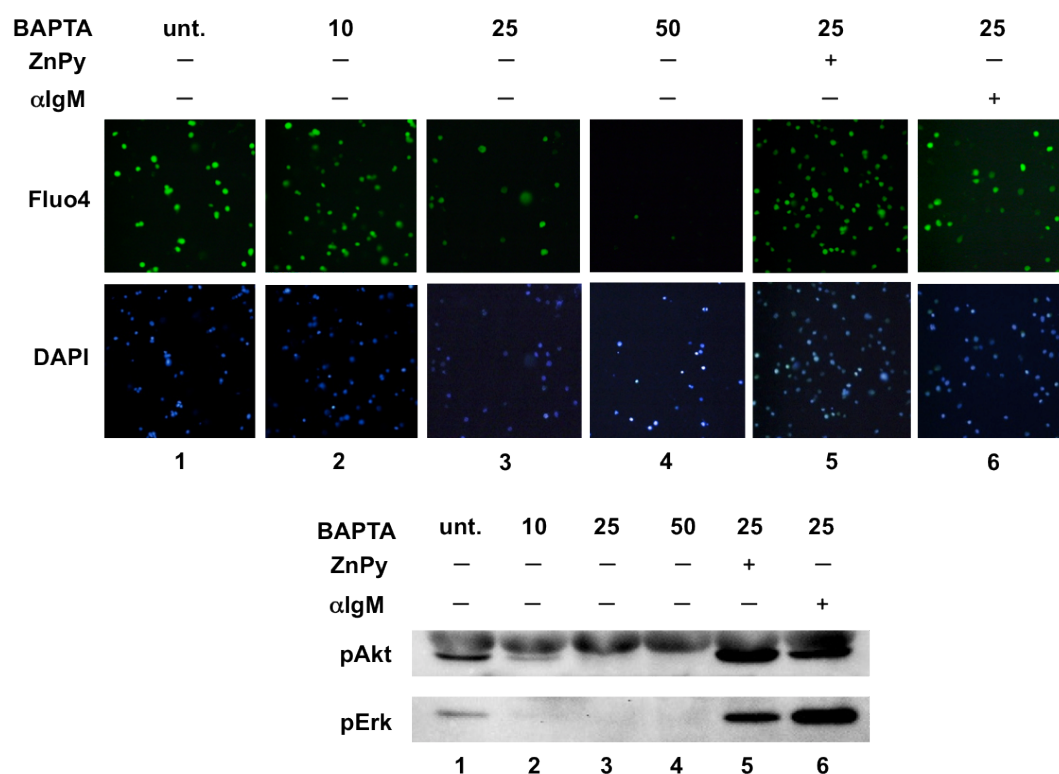
さらに，蛍光亜鉛プローブを用いて，cZip9KO 株において，ゴルジ体に亜鉛が蓄積していること，BCR シグナルの活性化には ZIP9 を介したゴルジ体からの亜鉛放出が必要であることを示したが，これらの現象が，細胞内の Ca^{2+} 流入と同時に起こり得る可能性が考えられた^{37, 57)}．DT40 細胞において，抗原刺激された BCR が，イノシトール 1,4,5-三リン酸受容体を介した小胞体からの Ca^{2+} 放出

を誘発すること, Ca^{2+} 放出活性化 Ca^{2+} チャネルを介した細胞外カルシウムの取り込みに関与していることが報告されている⁸⁷⁻⁸⁹⁾. このことから, ZIP9 が細胞内の Ca^{2+} 流入に関与している可能性も考えられる. Ca^{2+} と ZIP9 の関係については不明なままであるが, ZIP9 を介した細胞質の亜鉛濃度上昇は, BCR の活性化により制御され, 細胞外の亜鉛を必要としないことが示されている. また, 予備的な実験ではあるが, 細胞内の亜鉛とカルシウムの関係を調べる上で, 非常に興味深い結果が得られたので, 本項に記載させていただく.

細胞膜透過性を有する Ca^{2+} キレーターである,

1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (BAPTA) を用いて DT40 細胞を処理し, 蛍光 Ca^{2+} プローブである Fluo4 で細胞内のカルシウム染色を行ったところ, 25 μM の添加から細胞内のカルシウムが減少している様子が観察され, 50 μM の添加では, 細胞内のカルシウムが検出できなかった. また, DAPI による核染色を行い, BAPTA の細胞毒性についても検討したが, 50 μM までの BAPTA の添加は細胞の生存には影響を示さなかった. ここで, 25 μM の BAPTA で細胞内のカルシウムをキレートした上で, ZnPy あるいは抗 IgM 抗体による処理を行うと, 細胞内のカルシウム濃度の回復が観察された (図 8, 上部パネル).

これと並行して、同じ実験条件において Akt および Erk のリン酸化を調べたところ、細胞内のカルシウムの減少に伴って、これらのタンパク質のリン酸化が減弱し、ZnPy および抗 IgM 抗体の処理によって、リン酸化が回復することがわかった（図 8, 下部パネル）。抗 IgM 抗体で刺激した場合には、小胞体のカルシウム貯蔵から細胞質へのカルシウムの放出が起こることが知られているため、これにより、Akt および Erk のリン酸化が回復したと考えられる。ZnPy を添加した場合においても、これらのタンパク質のリン酸化および細胞内カルシウムの回復がみられたことから、細胞内のカルシウムが細胞内亜鉛によって制御されている可能性が考えられた。また、ZnPy を添加した場合と、抗 IgM 抗体で刺激した場合とでは、リン酸化の回復の仕方に違いがみられたことも非常に興味深い。この結果は、Akt および Erk のリン酸化がそれぞれ、亜鉛とカルシウムの選択性を有し、これらのタンパク質のリン酸化が、亜鉛とカルシウムとのバランスによって制御されている可能性を示していた。しかしながら、本実験で用いた BAPTA および Fluo4 は共に、カルシウム特異的であるとされてはいるが、少なからず亜鉛と結合する可能性があり、これらの実験に関しては、より詳細な検討を行う必要があると考えられた。



☒ 8, The relationship between intracellular zinc and calcium release. Serum-starved WT DT40 cells were pretreated with 10 μ M (panel 2 and lane 2), 25 μ M (panel 3, 5, 6 and lane 3, 5, 6), and 50 μ M (panel 4 and lane 6) of BAPTA for 30 min, and then treated with calcium specific fluorescent probe, Fluo4 before treatment with 10 μ M ZnPy (panel 5 and lane 5), or 0.5 mg/mL anti-IgM antibody (panel 6 and lane 6) for 10 min.

【結語】

結論として、BCR シグナルの活性化には細胞内の亜鉛が必須であり、細胞外の刺激による BCR の活性化に応じて ZIP9 がゴルジ体から細胞質へ亜鉛を放出することで細胞質の亜鉛レベルが上昇し、PTPase 活性の阻害を介した BCR シグナルにおけるリン酸化反応が制御されることを明らかにした（図 9）。本研究における発見は、ZIP9 による細胞質の亜鉛の調節と BCR シグナルの活性化との関係を明らかにした世界初の研究成果であり、B 細胞の運命決定に関与するシグナル伝達の分子機序において、ZIP9 による細胞質の亜鉛調節に基づく新たな知見を与えると共に、亜鉛トランスポーターや亜鉛代謝の異常に起因する疾患の解明および治療法開発に大いに貢献するものと考えられる。

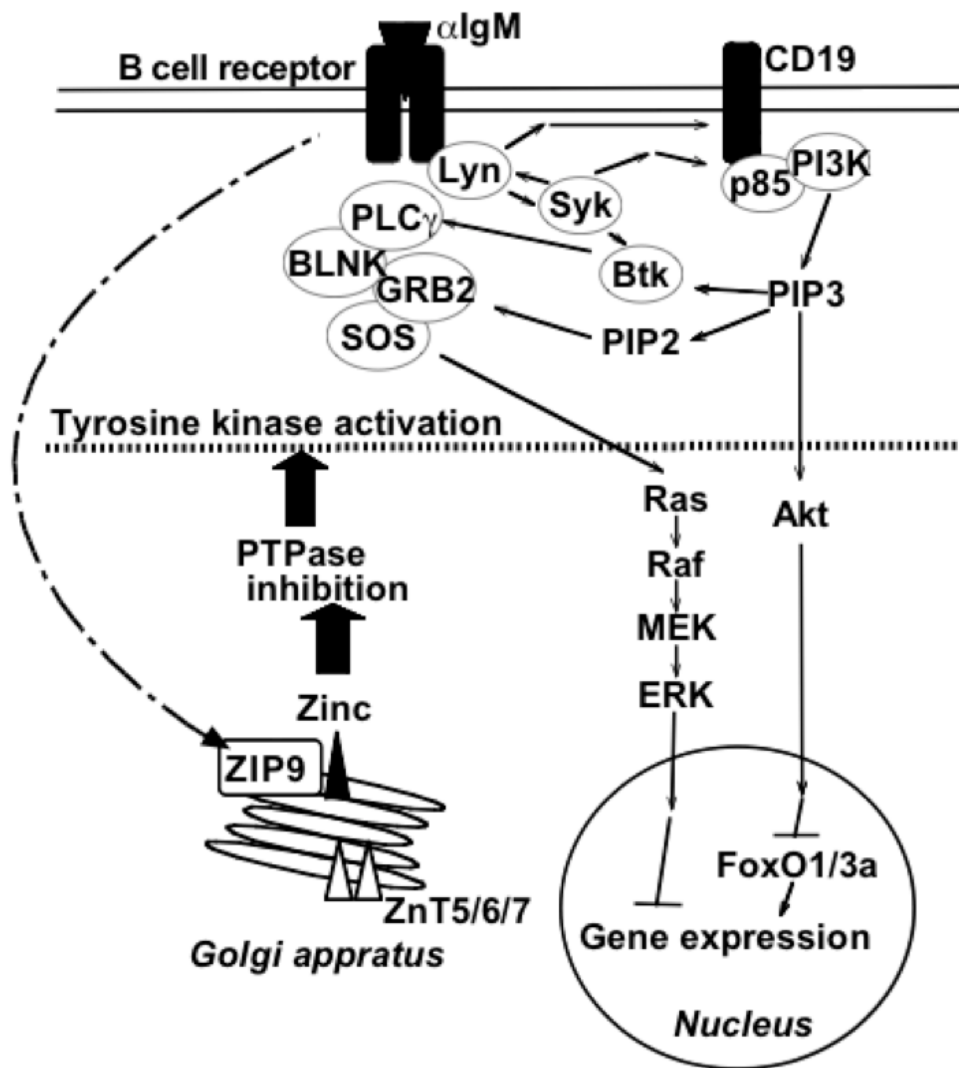


Fig 9, Proposed action sites of intracellular zinc release by ZIP9 in DT40 cells for activation of B cell receptor signaling. It is the proposed mechanism of Zn-induced PTPase inhibition by ZIP9, which leads to the activation of B cell receptor signaling in DT40 cells. Intracellular zinc is incorporated into the Golgi by ZnT5/6/7. Zinc is released as induced by ZIP9 into the cytosol from the Golgi, which in turn inhibits PTPase activity and induces the phosphorylation of Akt and Erk probably indirectly by regulating upstream components of the signal transduction.

【参考文献】

- 1) R. D. Klausner, T. A. Rouault, J. B. Harford, *Cell*, **72**, 19-28 (1993).
- 2) N. C. Andrews, *Nat. Rev. Genet.* **1**, 208-217 (2000).
- 3) M. W. Hentze, M. U. Muckenthaler, N.C. Andrews, *Cell*, **117**, 285 -297 (2004).
- 4) H. Gunshin, B. Mackenzie B, U. V. Berger, Y. Gunshin, M. F. Romero, W. F. Boron, S. Nussberger, J. L. Gollan, M. A. Hediger, *Nature*, **38**, 482-488 (1997).
- 5) R. S. Ohgami, D. R. Campagna, E. L. Greer, B. Antiochos, A. McDonald, J. Chen, J. Sharp, Y. Fujiwara, J. E. Barker, M. D. Fleming, *Nat. Genet.* **37**, 1264-1269 (2005).
- 6) H. Hayashi, T. Takikawa, N. Nishimura, M. Yano, T. Isomura, N. Sakamoto, *Am. J. Gastroenterol.*, **89**, 986-988 (1994).
- 7) Y. Ke, Z. Ming Qian, *Lancet Neurol.*, **2**, 246-253 (2003).
- 8) M. D. Harrison, C. E. Jones, M. Solioz, C. T. Dameron, *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 29-32 (2000).
- 9) A. P. Monaco, J. Chelly, *Adv. Genet.* **33**, 233-253 (1995).
- 10) T. Tønnesen, W. J. Kleijer, N. Horn, *Hum. Genet.* **86**, 408-410 (1991).
- 11) T. Tønnesen, A. Petterson, T. A. Kruse, A. M. Gerdes, N. Horn, *Am. J. Hum. Genet.*, **50**, 1012-1017 (1992).
- 12) B. Sarkar, K. Lingertat-Walsh, J. T. Clarke. *J. Pediatr.*, **123**, 828-830 (1993).
- 13) K. Petrukhin, S. G. Fischer, M. Pirastu, R. E. Tanzi, I. Chernov, M. Devoto, L. M. Brzustowicz, E. Cayanis, E. Vitale, J. J. Russo, *et al.*, *Nature Genet.* **5**, 338-343 (1993).

- 14) Y. Yamaguchi, M. E. Heiny, M. Suzuki, J. D. Gitlin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 14030-14035 (1996).
- 15) K. Nagano, K. Nakamura, K. I. Urakami, K. Umeyama, H. Uchiyama, K. Koiwai, S. Hattori, T. Yamamoto, I. Matsuda, F. End, *Hepatology*, **27**, 799-807 (1998).
- 16) T. Miyayama, Y. Ishizuka, T. Iijima, D. Hiraoka, Y. Ogura, *Metallomics*, **3**, 693-701 (2011).
- 17) M. S. Clegg, L. A. Hanna, B. J. Niles, T. Y. Momma, C. L. Keen, *IUBMB Life*, **57**, 661-669 (2005).
- 18) W. Wätjen, H. Haase, M. Biagioli, D. Beyersmann, *Environ. Health Perspect.* **110**, 865–867 (2002).
- 19) B. L. Vallee, K. H. Falcuk, *Physiol. Rev.* **73**, 79-118 (1993).
- 20) R. J. Cousins, *Washington, DC., International Life Sciences Institute Press.* (1996).
- 21) S. L. Sensi, L. M. Canzoniero, S. P. Yu, H. S. Ying, J. Y. Koh, G. A. Kerchner, D. W. Choi, *J. Neurosci.* **17**, 9554 (1997).
- 22) C. E. Outten, T. V. O'Halloran, *Science* **292**, 2488 (2001).
- 23) D. J. Eide, *Pflugers Arch.* **447**, 796-800 (2004).
- 24) R. D. Palmiter, L. Huang, *Pflugers Arch.* **447**, 744-751 (2004).
- 25) T. Fukada, T. Kambe, *Metallomics* **3**, 662-74(2011).
- 26) B. L. Vallee, *Neurochem Int.* **27**, 23–33 (1995).
- 27) L. A. Gaither, D. J. Eide, *Biometals* **14**, 251-270 (2001a).
- 28) Y. Chao, D. Fu, *J. Biol. Chem.* **279**, 12043-50 (2004).
- 29) A. A. Guffanti, Y. Wei, S. V. Rood, T. A. Krulwich, *Mol. Microbiol.* **45**, 145-153

(2002).

- 30) R. D. Palmiter, S. D. Findley, *Embo J.* **14**, 639-49 (1995).
- 31) R. D. Palmiter, T. B. Cole, S. D. Findley, *Embo J.* **15**, 1784-91 (1996).
- 32) R. D. Palmiter, T. B. Cole, C. J. Quaife, S. D. Findley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 14934-9 (1996).
- 33) L. Huang, J. Gitschier, *Nat Genet* **17**, 292-7 (1997).
- 34) T. Kambe, H. Narita, Y. Yamaguchi-Iwai, J. Hirose, T. Amano, N. Sugiura, R. Sasaki, K. Mori, T. Iwanaga, M. Nagao, *J. Biol. Chem.* **277**, 19049-55 (2002).
- 35) L. Huang, C. P. Kirschke, J. Gitschier, *J Biol Chem.* **277**, 26389-95 (2002).
- 36) C. P. Kirschke, L. Huang, *J. Biol. Chem.* **278**, 4096-102 (2003).
- 37) K. M. Taylor, S. Hiscox, R. I. Nicholson, C. Hogstrand, P. Killie, *Sci. Signal.* **5**, ra11 (2012).
- 38) B. Besecker, S. Bao, B. Bohacova, A.Papp, W. Sadee, D. Knoell. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **294**, L1127-36 (2008).
- 39) T. Fukada, N. Civic, T. Furuichi, S. Shimoda, K. Mishima, H. Higashiyama, Y. Idaira, Y. Asada, H. Kitamura, S. Yamasaki, S. Hojyo, M. Nakayama, O. Ohara, H. Koseki, H. G. Dos Santos, L. Bonafe, R. Ha-Vinh, A. Zankl, S. Unger, M. E. Kraenzlin, J. S. Beckmann, I. Saito, C. Rivolta, S. Ikegawa, A. Superti-Furga, T. Hirano, *PLoS ONE* **3**, e3642 (2008).
- 40) T. Kambe, T. Suzuki, M. Nagao, Y. Yamaguchi-Iwai, *Genomics Proteomics Bioinformatics* **4**, 1-9 (2006).
- 41) T. Suzuki, K. Ishihara, H. Migaki, W. Matsuura, A. Kohda, K. Okumura, M. Nagao,

- Y. Yamaguchi-Iwai, T. Kambe, *J. Biol. Chem.* **280**, 637-643 (2005a).
- 42) T. Suzuki, K. Ishihara, H. Migaki, M. Nagao, Y. Yamaguchi-Iwai, T. Kambe, *J. Biol. Chem.* **280**, 30956-30962(2005b).
- 43) K. Ishihara, T. Yamazaki, Y. Ishida, T. Suzuki, K. Oda, M. Nagao, Y. Yamaguchi-Iwai, T. Kambe, *J. Biol. Chem.* **281**, 17743-17750 (2006).
- 44) J. M. Buerstedde, S. Takeda, *Cell* **67**, 179–188 (1991).
- 45) P. Winding, M. W. Berchtold, *J. Immunol. Methods* **249**, 1–16 (2001).
- 46) A. Fukunaka, Y. Kurokawa, F. Teranishi, T. Sekler, K. Oda, M. L. Ackland, V. Faundez, M. Hiromura, S. Masuda, M. Nagao, S. Enomoto, T. Kambe, (2011) *J. Biol. Chem.* **286**, 16363-16373 (2011).
- 47) K. Wang, B. Zhou, Y. M. Kuo, J. Zemansky, J. Gitschier, *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 66-73 (2002).
- 48) R. Sladek, G. Rocheleau, J. Rung, C. Dina, L. Shen, D. Serre, P. Boutin, D. Vincent, A. Belisle, S. Hadjadj, B. Balkau, B. Heude, G. Charpentier, T. J. Hudson, A. Montpetit, A. V. Pshezhetsky, M. Prentki, B. I. Posner, D. J. Balding, D. Meyre, C. Polychronakos, P. Froguel, *Nature* **445**, 881- 885 (2007).
- 49) K. Nishida, A. Hasegawa, S. Nakae, K. Oboki, H. Saito, S. Yamasaki, T. Hirano, *J. Exp. Med.* **206**, 1351- 1364 (2009).
- 50) T. Hirano, M. Murakami, T. Fukada, K. Nishida, S. Yamasaki, T. Suzuki, *Adv. Immunol.* **97**, 149- 176 (2008).
- 51) M. Murakami, T. Hirano, *Cancer Sci.* **99**, 1515- 1522 (2008).

- 52) S. Yamashita, C. Miyagi, T. Fukada, N. Kagara, Y. S. Che, T. Hirano, *Nature*. **429**, 298–302 (2004).
- 53) K. M. Taylor, P. Vichova, N. Jordan, S. Hiscox, R. Hendley, R. I. Nicholson, *Endocrinology* **149**, 4912-4920 (2008).
- 54) J. Kaltenberg, L. M. Plum, J. L. Ober-Blöbaum, A. Hönscheid, L. Rink, H. Haase, *Eur. J. Immunol.* **40**, 1496-1503 (2010).
- 55) T. B. Aydemir, J. P. Liuzzi, S. McClellan, R. J. Cousins, *J. Leukoc. Biol.* **86**, 337-348 (2009).
- 56) M. Yu, W. W. Lee, D. Tomar, S. Pryshchep, M. Czesnikiewicz-Guzik, D. L. Lamar, G. Li, K. Singh, L. Tian, C. M. Weyand, J. J. Goronzy, *Nature Genet.* **31**, 239-240 (2002).
- 57) S. Yamasaki, K. Sakata-Sogawa, A. Hasegawa, T. Suzuki, K. Kabu, *J. Cell. Biol.* **177**, 637-645 (2007).
- 58) B. H. Bin, T. Fukada, T. Hosaka, S. Yamasaki, W. Ohashi, S. Hojyo, T. Miyai, K. Nishida, S. Yokoyama, T. Hirano, *J. Biol. Chem.* **286**, 40255–40265 (2011).
- 59) S. Hojyo, T. Fukada, S. Shimoda, W. Ohashi, B. H. Bin, H. Koseki, T. Hirano, *PLoS One* **6**, e18059 (2011).
- 60) C. Hogstrand, P. Kille, R. I. Nicholson, K. M. Taylor, *Trends. Mol. Med.* **15**, 101-111 (2009).
- 61) K. M. Taylor, H. E. Morgan, A. Johnson, R. I. Nicholson, *Biochem. J.* **377**, 131–139 (2004).
- 62) L. Rink, H. J. Kirchner, *Nutr* **130**, 1407S-11S (2000).

- 63) S. Feske, E. Y. Skolnik, M. Prakriya, *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 532-47 (2012).
- 64) H. Kitamura, H. Morikawa, H. Kamon, M. Iguchi, S. Hojyo, *Nat. Immunol.* **7**, 971-977 (2006).
- 65) B. Besecker, S. Bao, B. Bohacova, A. Papp. W. Sadee, D. Knoell, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **294**: L1127-36 (2008).
- 66) D. L. Knoell, M. J. Liu, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **80**, 271-7 (2010).
- 67) J. M. Dal Porto, S. B. Gauld, K. T. Merrell, D. Mills, A. E. Pugh-Bernard, *Mol. Immunol.* **41(6-7)**, 599-613 (2004).
- 68) N. E. Harwood, F. D. Batista, *Immunity* **28(5)**, 609-19 (2008).
- 69) N. E. Harwood, F. D. Batista, *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 185-210 (2010).
- 70) P. W. Kim, Z. Y. Sun, S. C. Blacklow, G. Wagner, M. J. Eck, *Science* **301**, 1725-1728 (2003).
- 71) A. Hashimoto, H. Okada, A. Jiang, M. Kurosaki, S. Greenberg, *J. Exp. Med.* **188**, 1287-95 (1998).
- 72) D. P. Brazil, B. A. Hemmings, *Trends Biochem. Sci.* **26**, 657-664 (2001).
- 73) T. Kurosaki, M. Hikida, *Immunol. Rev.* **228**, 132-48 (2009).
- 74) T. Kurosaki, H. Shinohara, Y. Baba, *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 21-55 (2010).
- 75) T. Kurosaki T, *Mol. Immunol.* **48**, 1287-91 (2011).
- 76) B. H. Eng, M. L. Guerinot, D. Eide, M. H. Saier Jr., *J. Membr. Biol.* **166**, 1-7 (1998).
- 77) W. Matsuura, T. Yamazaki, Y. Yamaguchi-Iwai, S. Masuda, M. Nagao, G. K. Andrews, T. Kambe, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 1142-1148 (2009).

- 78) J. M. Samet, R. Silbajoris, W. Wu, L. M. Graves, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **21**, 357-364 (1999).
- 79) H. Haase, W. Maret, *Biometals* **18**, 333-338 (2005).
- 80) H. Haase, W. Maret, *Exp. Cell Res.* **291**, 289-98 (2003).
- 81) F. G. Haj, P. J. Verveer, A. Squire, B. G. Neel, P. I. Bastiaens, *Science*, **295**, 1708-1711 (2002).
- 82) J. V. Frangioni, P. H. Beahm, V. Shifrin, C. A. Jost, B. G. Neel, *Cell*, **68**, 545-60 (1992).
- 83) W. Wu, X. Wang, W. Zhang, W. Reed, J. M. Samet, Y. E. Whang, A. J. Ghio, *J. Biol. Chem.* **278**, 28258-63 (2003).
- 84) T. Hirano, M. Murakami, T. Fukada, K. Nishida, S. Yamasaki, *Advances in Immunology* **97**, 149-176 (2008).
- 85) T. Fukada, S. Yamasaki, K. Nishida, M. Murakami, T. Hirano, *J. Biol. Inorg. Chem.* **16**, 1123-34 (2011).
- 86) B. H. Bin, T. Fukada, T. Hosaka, S. Yamasaki, W. Ohashi, S. Hojyo, T. Miyai, K. Nishida, S. Yokoyama, T. Hirano, *J. Biol. Chem.* **286**, 40255-65 (2011).
- 87) T. Morita, A. Tanimura, A. Nezu, T. Kurosaki, Y. Tojyo, *Biochem. J.* **382**, 793-801 (2004).
- 88) T. Morita, A. Tanimura, Y. Baba, T. Kurosaki, Y. Tojyo, *J. Cell. Sci.* **122**, 1220-8 (2008).
- 89) A. Limnander, P. Depeille, T. S. Freedman, J. Liou, M. Leitges, T. Kurosaki, J. P. Roose, A. Weiss, *Nat. Immunol.* **12**, 425-33 (2011).

【謝辞】

本研究を進めるにあたり，終始ご懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました岡山大学医歯薬学総合研究科 榎本 秀一 教授に衷心より感謝の意を表します．

また，論文の作成から実験の細部に至るまで御指導，御助言を頂きました理化学研究所 分子イメージング科学研究センター 複数分子イメージング研究チーム 廣村 信 副チームリーダーに心より感謝申し上げます．

さらに，本研究の主軸となるDT40細胞を用いた亜鉛トランスポーター遺伝子欠損株の作製に関しましては，京都大学大学院生命科学研究科 神戸 大朋 准教授，ならびに理化学研究所 分子イメージング科学研究センター 複数分子イメージング研究チーム 福中 彩子 博士（現 順天堂大学大学院医学研究科 代謝内分泌内科学 博士研究員）のご助言とご協力のおかげです．謹んで感謝の意を表します．

そして，日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂いた榎本研究室の皆様，さらには，私の研究活動を支えて下さった多くの方々に感謝の気持ちと御礼を申し上げたく，謝辞にかえさせていただきます．

2013 年 谷口 将済