

## アレルギー応答における亜鉛／亜鉛トランスポーターの役割

西田 圭吾<sup>1</sup>, 平野 俊夫<sup>1,2</sup>

マスト細胞（肥満細胞）はアレルギー応答においてエフェクター細胞として機能している。マスト細胞はヒスタミン、セロトニン、プロテアーゼなどのケミカルメディエーターを含有している分泌顆粒と呼ばれるオルガネラを保有しており、刺激に応答して、内容物を脱顆粒によって細胞外に放出する。また、マスト細胞が分泌する因子としては転写依存性のサイトカインや脂質メディエーター等も含まれており、これらの一連の応答は厳密に細胞内のシグナル伝達によって制御されている。当研究グループにおいて、これらマスト細胞の様々な活性化に微量必須元素の亜鉛／亜鉛トランスポーターが重要な役割を担っていることが見いだされた。

## はじめに

骨髄由来の顆粒細胞であるマスト細胞は、他のリンパ球、また好酸球や好塩基球などの顆粒球細胞と異なって、血液中は循環せず、全身の皮下組織および粘膜に幅広く分布し、寄生虫などの感染防御の役割を担う免疫担当細胞の一つであることが知られている<sup>1,2)</sup>。マスト細胞の細胞膜上に発現している高親和性IgE受容体（FcεRI）が抗原により架橋されることによりマスト細胞は活性化し、ヒスタミン、セロトニン、種々のプロテアーゼなどを細胞外に放出する脱顆粒反応や、転写依存的な炎症性サイトカインの産生を行う。この活性化は感染防御に役割を果たす一方で、花粉症、喘息、食物アレルギー、蕁麻疹、アトピー性皮膚炎などの原因にもなることから、マスト細胞の活性化機構

を明らかにすることがアレルギー疾患を治療する観点で重要であると考えられている。

1960年代の電子顕微鏡と重金属イオン染色を用いた研究から、マスト細胞の顆粒に生体内微量元素の一つである亜鉛が豊富に含まれていることが明らかになっている<sup>3)</sup>。興味深いことに、亜鉛はマスト細胞の顆粒だけではなく神経細胞の小胞や膵臓β細胞のインスリン分泌顆粒にも豊富に含まれていることが示されている<sup>4,5)</sup>。亜鉛はシグナル伝達に関与する酵素や転写因子などの構成成分として機能しているため、発生、分化、増殖などの様々な生物活性に関与していることが考えられるが、マスト細胞の活性化における亜鉛の役割は詳しく知られていない。近年、筆者らの研究グループにおいて亜鉛キレート剤や亜鉛トランスポーター遺伝子欠損マウスを用いて、マスト細胞依存的なアレルギー反応が抑制されることを明らかにした。本稿では、マスト細胞依存的なアレルギー応答におけるFcεRI依存的な活性化と亜鉛／亜鉛トランスポーターの役割について解説するとともに、亜鉛が栄養素としてだけではなく細胞内のシグナル伝達因子として機能しているユニークな側面もあわせて紹介したい。

## 1. 亜鉛供給とその細胞内調節機構

亜鉛は必須微量元素のメンバーのうちの一つである。体重60kgの成人生体内におよそ2g、割合にすると0.003%程度しか存在しないが、生存する上で不可欠な元素であることが知られている。生体内の総亜鉛量は一定に保たれて

<sup>1</sup> 独立行政法人 理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター サイトカイン制御研究グループ (〒230-0052 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22)

<sup>2</sup> 大阪大学生命機能研究科・医学研究科・免疫学フロンティア研究センター免疫発生学研究室, JST-CREST

Role of zinc/zinc transporter in allergic response  
Keigo Nishida<sup>1</sup> and Toshio Hirano<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>RIKEN Research Center for Allergy and Immunology, Laboratory for Cytokine Signaling, 1-7-22, Suehiro, Tsurumi, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan; <sup>2</sup>Laboratory of Developmental Immunology, Graduate School of Frontier Biosciences, Graduate School of Medicine, and WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University/JST-CREST)

おり、この恒常性が崩れた場合は、様々な疾患が引き起こされることが報告されている。小腸からの亜鉛の吸収障害や、偏食、あるいは食品添加物による亜鉛のキレート作用などが原因で亜鉛欠乏状態になると、軽度の場合は味覚障害・夜盲症・生殖機能の低下、重度の場合は免疫機能の低下・感染症・皮膚炎・下痢・脱毛・成長障害・精神障害が引き起こされることが示されている。一方、亜鉛に汚染した飲食物が原因で亜鉛を過剰に摂取すると、即時的には金属中毒症状として嘔吐や下痢が引き起こされる。また、慢性的な過剰状態では鉄や銅など他の金属元素の吸収を妨げることで溶血性貧血症などを起こすことが報告されている。

亜鉛の恒常性の破綻によりこのように広範囲におよぶ機能障害が引き起こされるのは、亜鉛が300種類以上におよぶ酵素の活性中心の形成や、亜鉛フィンガーなど亜鉛イオン結合モチーフをもつ転写因子やシグナル伝達分子の立体構造維持に関与していることに起因していると考えられている。従って、亜鉛は細胞の増殖・分化・機能発現・生存・運動性といった幅広い生物反応を制御することで、初期発生・免疫機能・がん細胞の転移・創傷治癒などの局面に役割を果たしている。

先に述べたように、飲食物に含まれる亜鉛は小腸から吸収され、アルブミンやマクログロブリンと結合した状態で血中を循環して各組織、各細胞へと運ばれて行く。細胞内における亜鉛量は、亜鉛の取り込み・放出・貯蔵により調節されており、亜鉛の細胞膜内外における交換は亜鉛トランスポーターにより行われていることが知られている（図

1)。現在、細胞外または細胞内器官から細胞質方向へ亜鉛を輸送する14種類のZIP (Zrt-, Irt-like protein) ファミリー亜鉛トランスポーターと、細胞質から細胞外または細胞内器官へ亜鉛を輸送する8種類のZnT (zinc transporter) ファミリー亜鉛トランスポーターが存在することが報告されている<sup>6~8)</sup>。

これまでに亜鉛トランスポーターの異常と亜鉛依存的な疾患の関連を示した報告がなされてきている。腸性肢端皮膚炎 (acrodermatitis enteropathica; AE) は、小腸からの亜鉛吸収障害が原因で皮膚炎をはじめとする亜鉛欠乏による病態を呈する疾患で、亜鉛トランスポーター ZIP4 が AE の原因遺伝子であることが明らかになっている<sup>9)</sup>。ZIP4 は腸管上皮細胞に発現しており、AE が亜鉛トランスポーターによる亜鉛の取り込みの障害で起こる疾患であることが確認された。また乳汁中の亜鉛欠乏が原因で皮膚炎・脱毛・発育不全を起こし離乳前に死亡する lethal milk マウス の原因遺伝子は *Znt4* であることが明らかになっている<sup>10)</sup>。またヒトにおいても母親の *Znt2* 遺伝子の点突然変異により乳児の低亜鉛症状が誘導されることが明らかになっており<sup>11)</sup>、乳汁中に含まれる亜鉛が乳腺上皮に発現している ZnT2 や ZnT4 により分泌されていることが示されている。さらにII型糖尿病のリスク領域をゲノムワイドスクリーニングした結果、膵臓のβ細胞の分泌顆粒膜上に発現してインスリンの産生および貯蔵に関与することが知られている ZnT8 の遺伝子をコードする領域が該当することが明らかになっている<sup>12)</sup>。さらに、最近、著者らの研究グループ

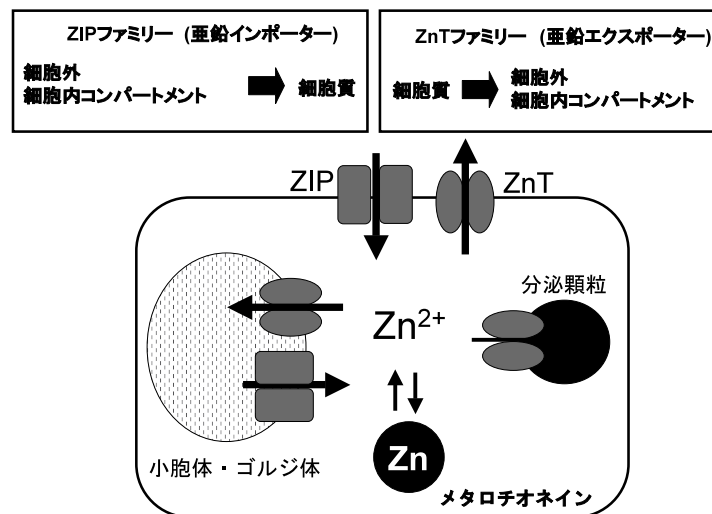


図1 細胞内亜鉛は亜鉛トランスポーターやメタロチオネインにより厳密に制御されている

細胞質における亜鉛濃度は亜鉛を増加させる方向性の輸送体として機能する ZIP ファミリータンパク質と、逆に細胞内亜鉛濃度を減少させる方向性をもつ輸送体として機能する ZnT ファミリータンパク質によって調節されている。また細胞質内に発現しているメタロチオネインも過剰な亜鉛イオンに対する解毒作用や反応系へ金属イオンを供給する貯蔵体としての機能を果たしている。

表1 亜鉛トランスポーター遺伝子欠損マウスの表現系

遺伝子名	タンパク質	変異タイプ	表現系
<i>SLC39A1</i>	ZIP1	KO	亜鉛摂食制限下による発生異常
<i>SLC39A2</i>	ZIP2	KO	亜鉛摂食制限下による発生異常
<i>SLC39A3</i>	ZIP3	KO	亜鉛摂食制限下による発生異常胸腺 T 細胞の分化異常
<i>SLC39A4</i>	ZIP4	KO	耐性致死
<i>hSLC39A4</i>	hZIP4	mutation	腸性肢端皮膚炎 (ヒト)
<i>SLC39A13</i>	ZIP13	KO	骨・歯・眼・皮膚等の硬組織および結合組織における異常
<i>hSLC39A13</i>	hZIP13	mutation	エーラスダンロス症候群 (ヒト)
<i>SLC30A1</i>	ZnT1	KO	耐性致死
<i>hSLC30A2</i>	hZnT2	mutation	母乳中の亜鉛量低下 (ヒト)
<i>SLC30A3</i>	ZnT3	KO	てんかん様症状
<i>SLC30A4</i>	ZnT4	mutation	母乳中の亜鉛量低下
<i>SLC30A5</i>	ZnT5	KO	成長遅延, 骨量低下, 脂肪低下, 筋肉低下, 心疾患 (雄のみ), アレルギー応答低下
<i>SLC30A7</i>	ZnT7	KO	食欲不振を伴う成長遅延体脂肪蓄積の減少
<i>SLC30A8</i>	ZnT8	KO	耐糖能障害
<i>hSLC30A8</i>	hZnT8	SNP	2型糖尿病との相関 (ヒト)

\*ヒト疾患における変異も含む

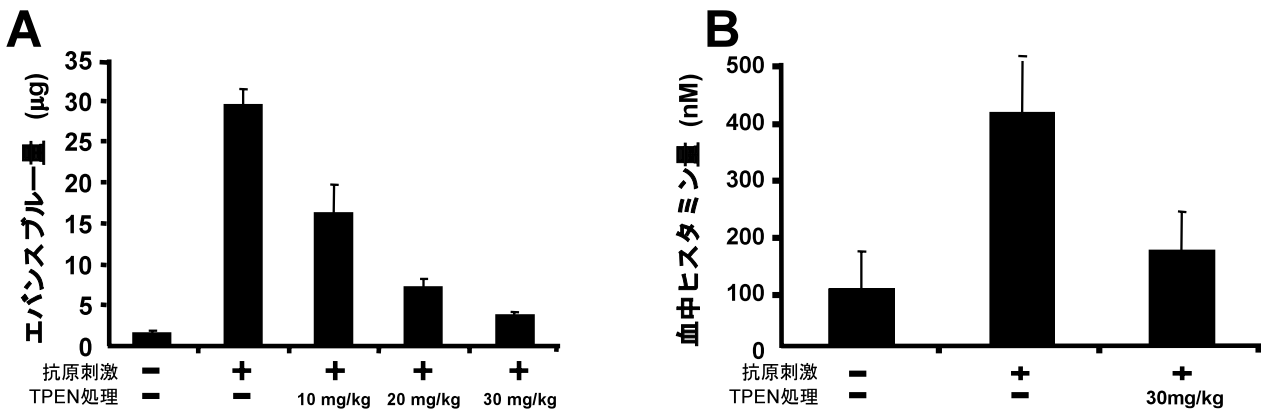


図2 亜鉛キレーターである TPEN はアナフィラキシー応答を抑制する

(A) 受動的皮膚アナフィラキシー (I型アレルギー) 誘導モデルにおいて亜鉛キレーター TPEN を投与したマウスでは血管透過性を指標とした局所性アナフィラキシー反応が TPEN の前処置によって抑制されることが確認された。(B) TPEN は全身性アナフィラキシー反応に対しても抑制効果を示した。

では ZIP13 が成長遅延をはじめ, 骨・歯・眼・皮膚等の硬組織および結合組織において異常を呈するエーラスダンロス症候群の原因遺伝子の一つとして報告した<sup>13)</sup>。このように亜鉛トランスポーターは生体の様々な生物現象に関与していることが示されつつある (表1)。亜鉛トランスポーターのこのような膜を介した取り込みと排出による亜鉛の制御に加えて, システイン残基を多く含むメタロチオネンが細胞質において過剰な金属イオンを貯蔵する役割を果たしている<sup>14)</sup>。細胞内亜鉛濃度は, トランスポーターとメタロチオネンの発現量を制御することにより一定に保たれていると考えられている (図1)。

## 2. マスト細胞活性化における亜鉛の役割

### I. 脱顆粒応答における亜鉛の役割

当研究グループにおいて, マスト細胞の活性化における亜鉛の役割を検討する目的で亜鉛キレート剤 TPEN (*N,N,N,N*-

*N,N*-tetrakis-2-pyridylmethyl ethylenediamine) をマウスに投与した。その結果, 血管透過性を指標とした局所性アナフィラキシー反応が TPEN の投与量依存的に抑制されることが確認された (図2A)。このときの耳の組織切片におけるマスト細胞の形態から, TPEN 投与を行った個体では脱顆粒反応が低下していることが明らかになった。また TPEN は全身性アナフィラキシー反応に対しても抑制効果 (血中ヒスタミン量の低下) を示すことが確認された (図2B)。さらに骨髓由来のマスト細胞を用いてマスト細胞活性化に対する TPEN の阻害効果を検討した結果, TPEN 処理により脱顆粒反応, ロイコトリエン産生, 及び IL-6 と TNF $\alpha$  の産生が低下することが明らかになった。TPEN は亜鉛以外の銅, 鉄, およびマンガンに対してもある程度のキレート効果があるが, 銅, 鉄, マンガンのキレート剤ではマスト細胞の脱顆粒を抑制しなかったことや, 亜鉛のイオノフォアであるピリチオンを用いて亜鉛イオンを細胞内に強制的

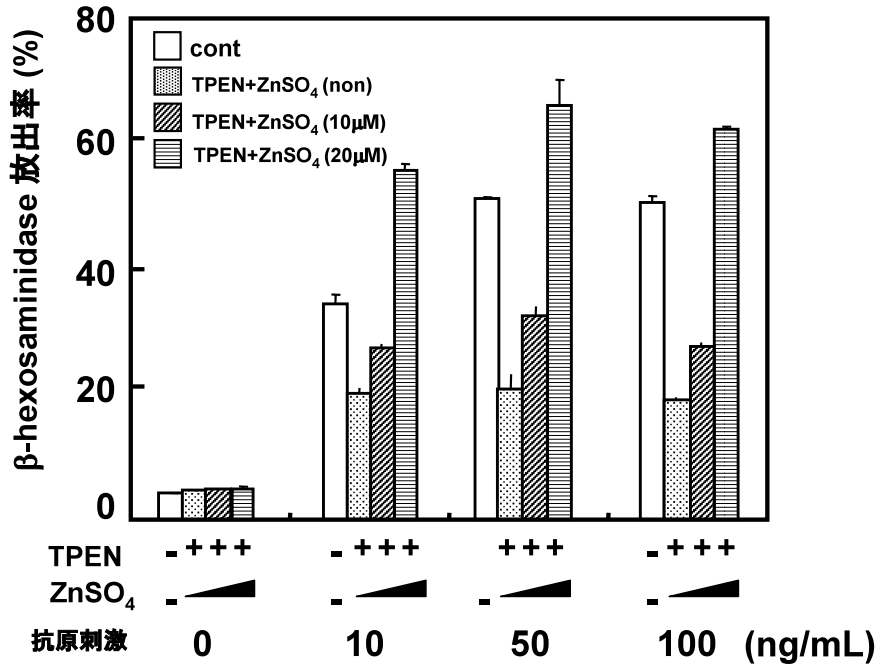


図3 亜鉛キレーターはマスト細胞の脱顆粒応答を抑制する  
 骨髓由来マスト細胞を用いて、TPENによる脱顆粒応答抑制効果を検討した。TPENは用量依存的に抗原刺激依存的な脱顆粒を抑制した。また、この抑制効果は硫酸亜鉛を補給することによって回復できた。

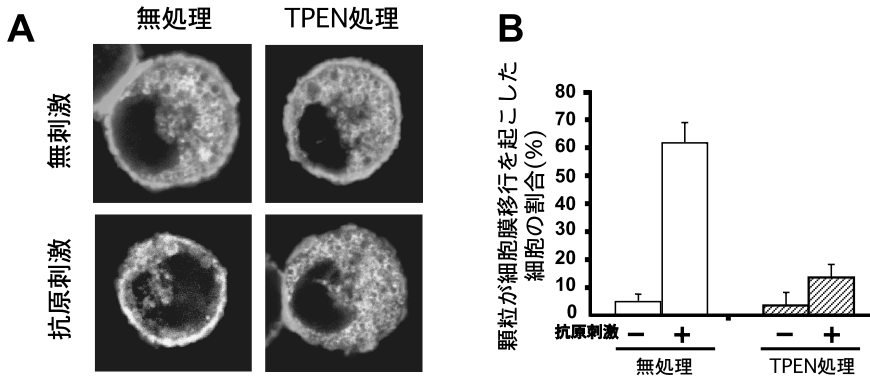


図4 亜鉛キレーターはマスト細胞内顆粒移動を抑制する  
 (A) マスト細胞内顆粒膜上に発現するCD63とGFPの融合タンパク質を導入することでマスト細胞顆粒を可視化した。コントロールでは刺激依存的な顆粒移動が観察されたが、TPEN処理では顆粒移動が抑制された。(B) 顆粒の細胞膜移動が観察された細胞の割合を数値化した。

に供給させてやることでTPENによる抑制効果が回復されたことから、FcεRI依存的なマスト細胞の脱顆粒に亜鉛が関与していることが示された(図3)<sup>15)</sup>。さらにTPENの作用機序を明らかとする目的で、刺激依存的なカルシウムの流入やFcεRIにおけるカルシウムシグナルを制御しているSyk, LAT, 及びPLCγ2のリン酸化を調べたところTPENでは阻害効果を示さなかった。当研究グループにおいて、既にマスト細胞における脱顆粒反応はカルシウム非依存的で微小管伸長依存的な顆粒の細胞膜への移動のステップと、カルシウム依存的な細胞膜と顆粒膜融合のステップで制御されていることを明らかとしている<sup>16)</sup>。そこで、

TPENがこれらカルシウム非依存的な顆粒の細胞膜への移動に関与しているのではと考え、顆粒膜上に発現するCD63とGFPの融合タンパク質を導入することでマスト細胞の顆粒を可視化し、刺激依存的な顆粒移動を調べたところ、定常状態では細胞質で見られた顆粒が刺激依存的に細胞膜近傍に集積していることが観察されたが、TPEN存在化では刺激依存的な顆粒の移行が抑制されることが示された(図4)。以上の結果はこれら亜鉛キレーターの作用点が顆粒移動の抑制であり、結果として顆粒膜と細胞膜の融合が起こらず脱顆粒応答が抑制されているものと考えられた(図5)。

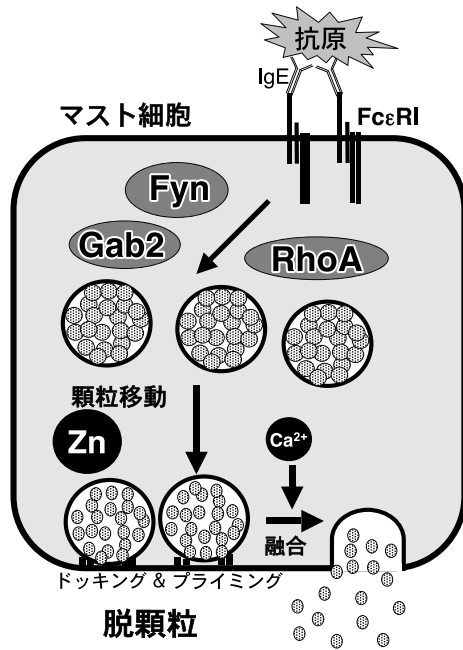


図5 脱顆粒応答における亜鉛の役割

亜鉛キレーターはマスト細胞内分泌顆粒の細胞膜への移動を抑制することによって、脱顆粒応答を抑制している。顆粒移動を制御する亜鉛要求性分子の存在を想定している。

## II. サイトカイン産生における亜鉛の役割

マスト細胞におけるサイトカイン産生のシグナル伝達は、様々な遺伝子欠損マウス由来のマスト細胞を用いて解析されている。特に、プロテインキナーゼC(PKC)の活性化と細胞膜移行が重要であり、マスト細胞においてはPKCβがIL-6の産生に必須であることが示されている<sup>17)</sup>。さらに最近、PKCの下流で機能する分子に関して、遺伝子欠損マウス由来のマスト細胞を用いた実験からBcl10及びMalt1が、IL-6やTNFαの遺伝子発現制御における主要転写因子として知られるNF-κB(nuclear factor-κB)とPKCをつなぐ分子として報告された<sup>18)</sup>。興味深いことにこれらの遺伝子欠損マスト細胞ではサイトカイン産生が特異的に抑制されており、脱顆粒や脂質メディエーターであるロイコトリエン遊離は抑制がない。上述したようにTPENはマスト細胞の刺激依存的なIL-6やTNFαなどの炎症性サイトカイン産生を抑制する(図6A)。そこで、これらサイトカイン産生における阻害機構を検討した結果、TPENはサイトカイン産生を転写レベルで抑制すること(図6B)、またNF-κBの刺激依存的な核移行がTPEN処理により抑制されており、さらにその上流のIκBのリン酸化とユビキチン化による分解、そしてIKK(I-κB kinase)の活性化が低下していることが明らかになった。さらにPKCβの活性

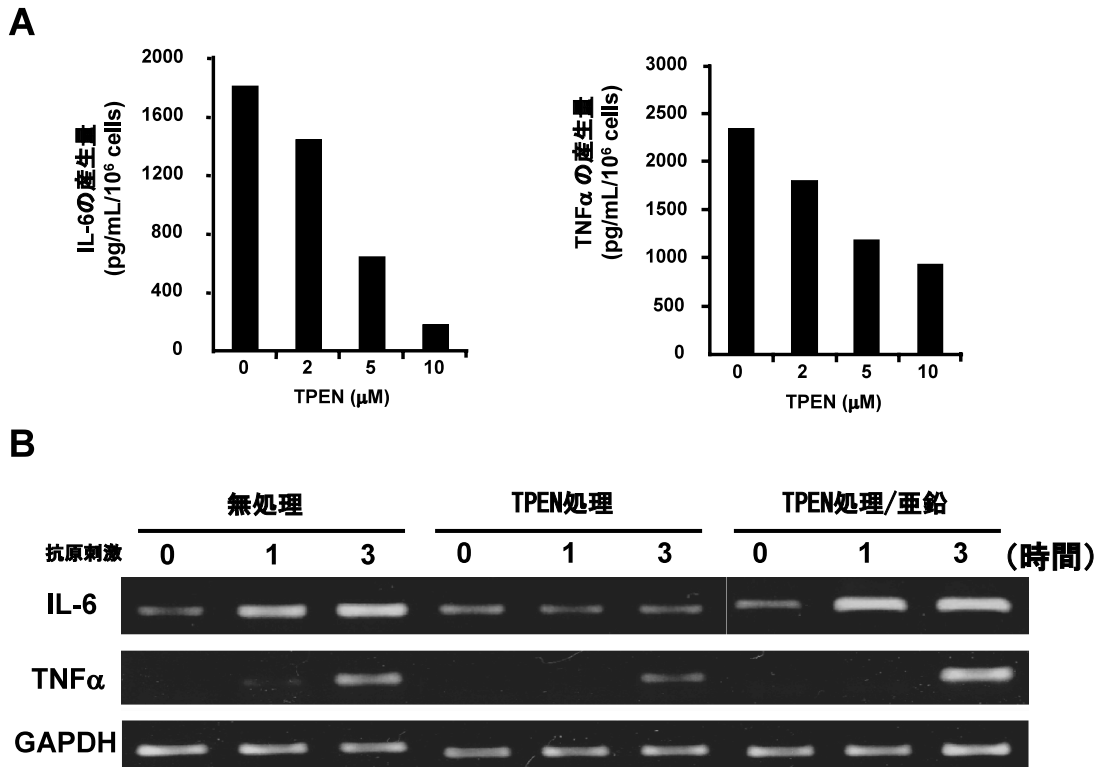


図6 亜鉛キレーターは抗原刺激依存的なサイトカイン産生及び転写を抑制する

(A) マスト細胞を亜鉛キレーターTPENで処理すると、抗原刺激依存的な炎症性サイトカインの産生が優位に抑制された。(B) TPENはサイトカイン産生を転写レベルで抑制しており、また、亜鉛の再添加によって抑制された転写活性が回復した。

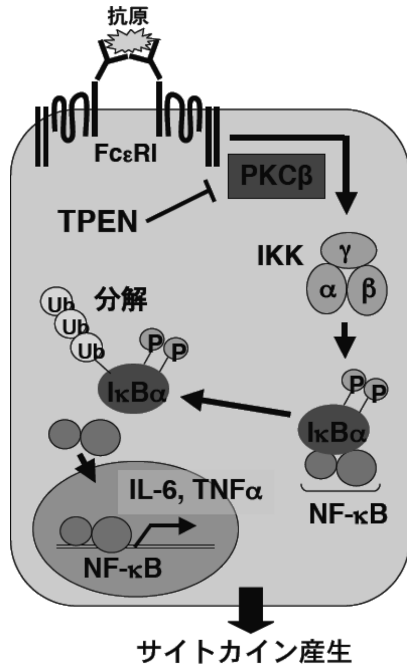


図7 サイトカイン産生における亜鉛の役割  
亜鉛キレーター TPEN は PKC の刺激依存的な膜移行を抑制することでサイトカインの転写を抑制している。

化に重要な細胞膜への移行が TPEN 処理により阻害されていたことから、サイトカイン産生における TPEN の阻害効果は PKCβ を抑制することにより、引き起こされていることが明らかになった<sup>15)</sup> (図7)。

### 3. 亜鉛トランスポーターとアレルギー応答

上述したように、亜鉛キレーターを用いて、亜鉛がマスト細胞の活性化に重要な役割を担っていることが示唆された。しかしながら、細胞内亜鉛は亜鉛トランスポーターによって厳密な制御を受けている。そこで、これら亜鉛調節に関与する亜鉛トランスポーターに着目して、より生理的な条件下で、アレルギー応答との関係を検討することにした。アレルギー接触性皮膚炎とは、ダニやほこりなどの抗原による感作後、再び同様の抗原に曝露されることにより炎症反応が起こるIV型アレルギー反応（遅延型アレルギー反応）の一つで、マスト細胞由来の TNFα などの炎症性サイトカインが炎症部位に必要であることがこれまでにマウスを用いたモデル実験で報告されている<sup>19)</sup>。また、マスト細胞では、亜鉛トランスポーター ZnT ファミリーメンバーのなかで、ZnT1, 2, 5, 6, 7 の発現が観察され、そのなかで ZnT5 が抗原刺激依存的に転写の増加が観察されたことから、筆者らの研究グループでは ZnT5 がアレルギー応答に関与するのではないかと考え、研究を進めることとした。ゴルジ/ER に局在する ZnT5 は 15 回膜貫通型タンパク質で、His リッチ領域を介して亜鉛が輸送される

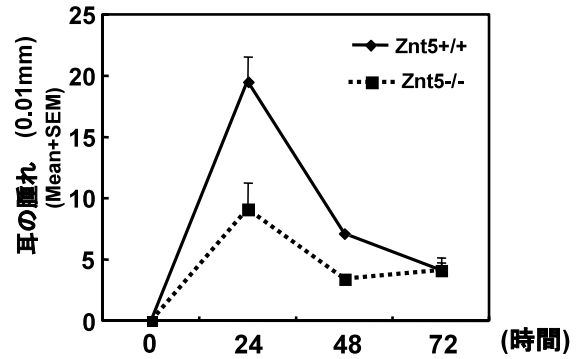


図8 亜鉛トランスポーター *Znt5* 遺伝子欠損マウスでは遅延型アレルギー応答が抑制される

*Znt5* 遺伝子欠損マウスに遅延型アレルギーモデル（接触性皮膚炎）を誘導したところ、野生型と比べ、接触性皮膚炎の指標となる耳の肥厚が低下していた。

のではないかと考えられている。これまで、*Znt5* 遺伝子欠損マウスは雌雄ともに体重減少を示し、雄では不整脈や突然死を起こすと報告されている<sup>20)</sup>。また、*Znt5*/*Znt6*/*Znt7* 遺伝子が欠損した細胞では、亜鉛要求性の酵素であるアルカリホスファターゼの活性が低く、この酵素の活性化に *Znt5*/*Znt6*/*Znt7* 遺伝子が必要であることが報告されている<sup>21,22)</sup>。しかし、アレルギー応答と ZnT5 の関係は不明のままであった。そこで、遅延型アレルギーのモデルである接触性皮膚炎を *Znt5* 遺伝子欠損マウスと野生型マウスで検討することにした。その結果、興味深いことに、*Znt5* 遺伝子欠損マウスにおいて、接触性皮膚炎が野生型マウスと比較して減弱していることが明らかになった<sup>23)</sup> (図8)。また、即時型のアレルギー応答であるアナフィラキシー応答には ZnT5 は関与しないことが示された。次に、*Znt5* 遺伝子欠損マウスから骨髓由来マスト細胞を調製し、抗原刺激を行ったところ、脱顆粒応答には影響が認められなかったが、IL-6, TNFα などの炎症性サイトカインの産生が減少する結果が得られた (図9)。また、マスト細胞欠損 *Kit<sup>W-sh</sup>/Kit<sup>W-sh</sup>* マウスに野生型マスト細胞、あるいは *Znt5* 遺伝子欠損マスト細胞をそれぞれ移植し、接触性皮膚炎の実験を検討した結果、予想通り野生型マスト細胞を移植した *Kit<sup>W-sh</sup>/Kit<sup>W-sh</sup>* マウスは接触性皮膚炎を発症したが、*Znt5* 遺伝子欠損マスト細胞を移植した *Kit<sup>W-sh</sup>/Kit<sup>W-sh</sup>* マウスは発症が減弱していた。これらのことから接触性皮膚炎にはマスト細胞の ZnT5 が重要な役割をしていることが示された。

引き続き、*Znt5* 遺伝子欠損による炎症性サイトカインの減少を分子レベルで解析する目的で、IL-6, TNFα の転写レベルを検討したところ、*Znt5* 遺伝子欠損マウスの骨髓由来マスト細胞ではその転写活性化が低下していたので、細胞内シグナル伝達の解析を試みることにした。*Znt5* 遺伝子欠損マウス由来マスト細胞では、炎症性サイトカイ

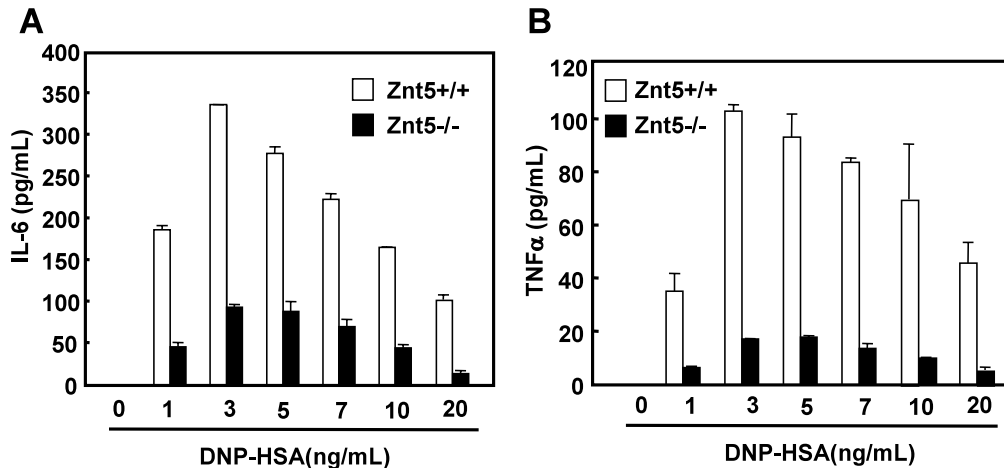


図9 *Znt5* 遺伝子欠損マウス由来マスト細胞では抗原刺激依存的なサイトカイン産生が低下する  
*Znt5* 遺伝子欠損マウスよりマスト細胞を調整して、抗原刺激後、3時間のサイトカイン産生量をELISAにて測定した。(A) IL-6, (B) TNFαともに *Znt5* 欠損マスト細胞で産生量の低下が観察された。DNP-HSA: 実験的に用いられる抗原の一つ。

ンの転写因子 NF-κB の核移行が抑制されており、その上流の IKK のリン酸化や I-κB のリン酸化と分解も抑制されていることが明らかになった。さらに、筆者らが注目したのは抗原刺激において IKK/I-κB/NF-κB シグナルを制御することが知られている PKC である。PKC はホルボールエステル結合領域に亜鉛と結合する二つの亜鉛フィンガードメインをもち、抗原刺激依存的に細胞質から細胞膜に移行してジアシルグリセロール (DAG) と結合し、活性化されるリン酸化酵素である<sup>24)</sup>。また、上述したようにマスト細胞のサイトカイン産生には 10 種類の PKC 分子種のなかでも PKCβ が関与していることが報告されている。生化学的な解析の結果、*Znt5* 遺伝子欠損マスト細胞ではこの PKCβ の膜移行が抑制されることが判明した。さらに PKCβ の亜鉛フィンガードメインに存在する 2 個のシステインをセリンに置換した PKCβ の変異体を用いた実験から、膜移行には亜鉛フィンガードメインが重要で、ホルボールエステルとの結合能力も減弱していることが示された。さらに、*Znt5* 遺伝子欠損マスト細胞の PKCβ はホルボールエステル、phorbol myristate acetate (PMA) との結合能力が亜鉛フィンガードメインと同様に減弱していることが分かった。このことから、*Znt5* 遺伝子欠損マウスでは、マスト細胞の PKC のホルボールエステルとの結合能が低下し、その下流の IKK/I-κB/NF-κB シグナルが抑制され、IL-6, TNFα などの炎症性サイトカインの発現が減弱した結果、アレルギー性接触皮膚炎が緩和されると考えられた (図 10)。次の疑問として、なぜ ZnT5 が欠損すると PKCβ の膜移行が抑えられるのであろうか? 上述したように 1) PKCβ の変異体ではホルボールエステルとの結合が抑制されていた。2) *Znt5* 遺伝子欠損マスト細胞由来 PKCβ においてもホルボールエステルとの結合が抑制されてい

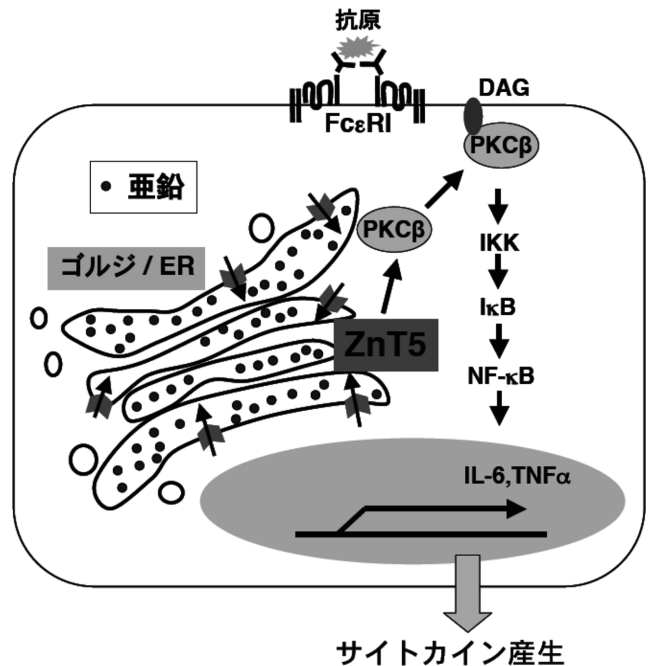


図 10 ZnT5 はマスト細胞依存的な遅延型アレルギー応答及び、PKC/NF-κB シグナル伝達経路に必須である  
ZnT5 は PKCβ の抗原刺激依存的な膜移行を制御することによって、マスト細胞におけるサイトカイン産生制御に関与している。

た。これらのことから、おそらく PKC の亜鉛結合部位への供給に障害が起こり、その結果 PKC は正常な構造を保つことができない可能性が考えられ、ZnT5 が PKC に亜鉛を直接もしくは間接的に供給していることが推測された。しかしながら ZnT5 がどのようにして PKC に亜鉛を供給しているのかは今後の課題である。

これまで PKC の亜鉛フィンガードメインがホルボール

エステルとの結合に重要であることは知られていた。今回、紹介した実験結果により、PKCの膜移行に亜鉛トランスポーターが重要で、アレルギー反応などの免疫応答に影響することが明らかになった。今後は、ZnT5だけでなく他の亜鉛トランスポーターにおける解析も必要であると考えている。ZnT2, 6は抗原刺激で転写レベルの減少が観察され、細胞内局在に関して、ZnT2はリソソーム、ZnT6, 7はゴルジ/ERと、発現制御や局在に関してバリエーションがあることが既に分かっている。これら亜鉛トランスポーター欠損マウスを用いて系統的に、アレルギー応答との関係を調べていくことによって、さらにアレルギー応答における亜鉛トランスポーターの役割が明らかになるものと期待している。

#### 4. 細胞内セカンドメッセンジャーとしての亜鉛： 早期亜鉛シグナル

マスト細胞において亜鉛が細胞内シグナル伝達分子として作用するかどうかを明らかにするために、筆者らの研究グループではマスト細胞において、細胞外刺激依存的な細胞内遊離亜鉛の変化を検討した。抗原刺激依存的な細胞内遊離亜鉛濃度の変化を蛍光顕微鏡で経時的に観察した結果、抗原刺激の数分後から細胞内遊離亜鉛濃度の上昇が確認された(図11)。この亜鉛の上昇は、神経細胞で報告されているようにエキソサイトーシスで細胞外に放出された亜鉛が再流入しているものではなく、細胞内イベントであることを明らかにした。筆者らはこの現象を亜鉛ウェーブ

(zinc wave) と命名した<sup>25)</sup>。様々な遺伝子欠損マウス由来のマスト細胞において zinc wave が観察されるかどうか検討したところ、Syk や PLC $\gamma$  のカルシウムシグナルが重要であることが明らかになり、この結果と一致して、カルシウムイオンが存在しない条件、あるいは小胞体に存在する IP $_3$  作動性カルシウムチャネル (IP $_3$ R) の阻害剤存在下で、zinc wave が抑制された。しかしながらカルシウムイオノフォアによるカルシウム濃度単独上昇だけでは zinc wave は誘導されず、カルシウムシグナルとは独立した経路の活性化が必要であることが示唆された。そこで、一つの候補として Ras-MAPK 経路に着目して MEK 阻害剤を添加した結果、カルシウムシグナルは阻害せず zinc wave が抑制されていることが示された。この結果は、zinc wave がカルシウムと MAPK 経路の活性化により制御されていることを示唆しており、実際、MAPK 経路を活性化する EGF 刺激とカルシウムイオノフォアの同時刺激により zinc wave が起こることを確認した。さらに zinc wave が起こるメカニズムを解明する目的で zinc wave の源泉となる細胞内領域を高感度な顕微鏡システムを用いて解析した。Newport Green と小胞体のマーカーで二重染色を行った結果、Newport Green のシグナルが上昇する領域が小胞体の染色領域と一致していたことから、核周辺部の小胞体近傍で zinc wave が生じることが示唆された。しかしながら、亜鉛放出に関係するトランスポーターやチャネルの存在、そしてその調節機構については今後の検討が必要である。zinc wave の生理的役割を検討したところ、亜鉛キレーターで zinc wave の効果を打ち消すことでサイトカインの mRNA 誘導が短時間で消失し、反対に亜鉛の添加により遷延化することが明らかになった。また、MAPK の活性化でも同様の結果が観察された。亜鉛がチロシンホスファターゼ活性を抑制することが報告されており<sup>26)</sup>、著者らもマスト細胞を用いて、細胞内への亜鉛添加によるチロシンホスファターゼ活性の抑制を確認した。以上の結果より、zinc wave がサイトカイン産生に関わる MAPK シグナル伝達経路に対して、チロシンホスファターゼを介して調節することでサイトカイン産生を制御している可能性が示唆された。細胞外からの刺激により、転写応答を介さずに細胞質の遊離亜鉛濃度が上昇する現象“zinc wave”が、少なくともマスト細胞において生じることが明らかになった。現時点で zinc wave が普遍的に種々の細胞において生じるか否かは不明であるが、著者らの見いだした zinc wave の存在は亜鉛が細胞内セカンドメッセンジャーとして機能していることを示している(図12)。

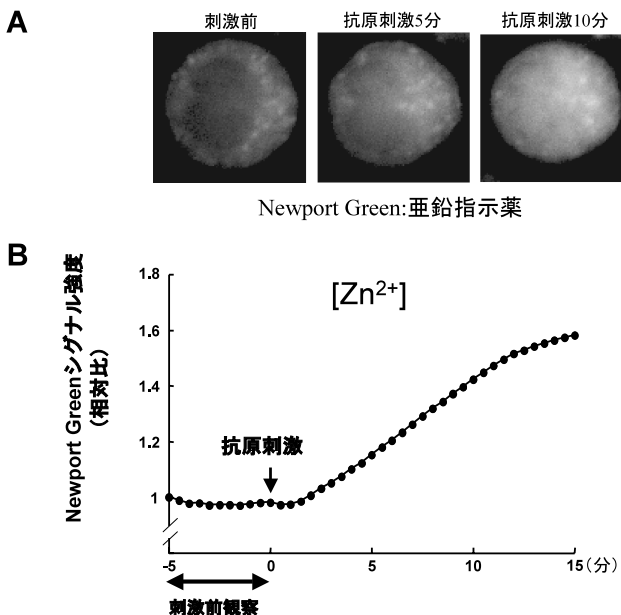


図11 抗原刺激依存的なマスト細胞内遊離亜鉛の上昇  
マスト細胞内遊離亜鉛は抗原刺激後に、転写非依存的に上昇していることが観察された。この現象を zinc wave と呼ぶ。(A) 蛍光顕微鏡像。(B) Newport Green のシグナル強度の相対値。

#### 5. 亜鉛は細胞内シグナル伝達分子として作用する： トランスポーター依存的な後期亜鉛シグナル

原腸陥入、器官形成、創傷治癒、がん転移が起こる際



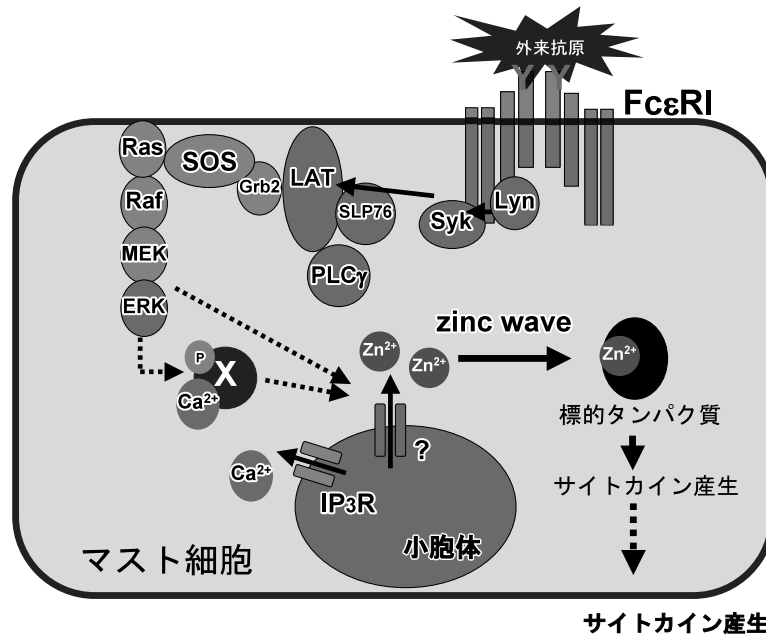


図12 細胞内セカンドメッセンジャーとしての亜鉛  
細胞外刺激依存的に細胞内遊離亜鉛濃度が上昇することから、亜鉛は細胞内セカンドメッセンジャーとして働いていることが示唆された。

に、通常密に結合している細胞同士が隣接する細胞との接着を解除し可動性を獲得する上皮-間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) を行うことが知られている。筆者らの研究グループでは、STAT3の活性化が原腸陥入における細胞移動に必須であることを明らかにした<sup>27)</sup>。STAT3による細胞運動制御の分子メカニズムを明らかにする目的で正常とSTAT3遺伝子ノックダウンゼブラフィッシュの原腸胚を用いてサブトラクション法を行った。その結果、STAT3の標的遺伝子として亜鉛トランスポーター ZIP6 を同定した<sup>28)</sup>。細胞間接着に役割を果たすE-カドヘリンの抑制因子としてオーガナイザー細胞やがん細胞のEMTにおいて鍵となるSnailは亜鉛フィンガータンパク質であることが知られていることから、STAT3の標的遺伝子として同定した亜鉛トランスポーター ZIP6 がSnailの制御に関与している可能性が考えられた。そこでSnail-GFP融合タンパク質をオーガナイザー細胞に導入して細胞内局在を観察したところ、ZIP6がSnailの核移行に関与していることが明らかになった。またSnailの核への局在にはSnailの亜鉛フィンガードメインが必須であることも考えると、亜鉛自身がSnailの核への局在に関与していることを強く示唆している。これらの結果から、我々は亜鉛が細胞内シグナルに伝達分子として作用している可能性を考えるに至った (図13)。

また筆者らの研究グループは、獲得免疫における代表的な抗原提示細胞である樹状細胞においても亜鉛が成熟・活性化の制御に関与していることを見いだした。菌体成分で

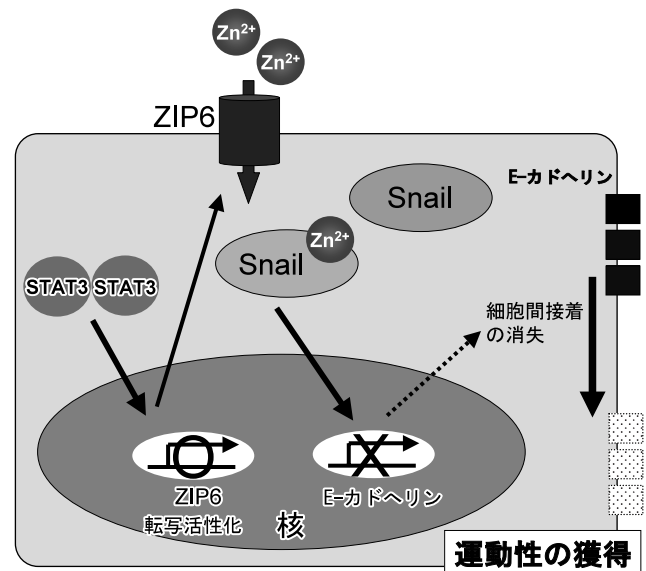


図13 細胞運動性の制御における亜鉛の働き  
ゼブラフィッシュの原腸胚において、STAT3依存的なZIP6発現がSnailの核内局在に重要である。

あるリポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) による刺激はトール様受容体 (Toll-like receptor; TLR) を介して樹状細胞の成熟・活性化のシグナル伝達を引き起こし、樹状細胞表面上にMHCクラスII分子を発現させることでT細胞を活性化することが知られている。樹状細胞の成熟における細胞内遊離亜鉛の役割を明らかにするために、蛍光亜鉛プローブNewport Greenを用いて検討した結果、LPS刺激依存的に細胞内遊離亜鉛の減少が観察された。亜鉛キレーター

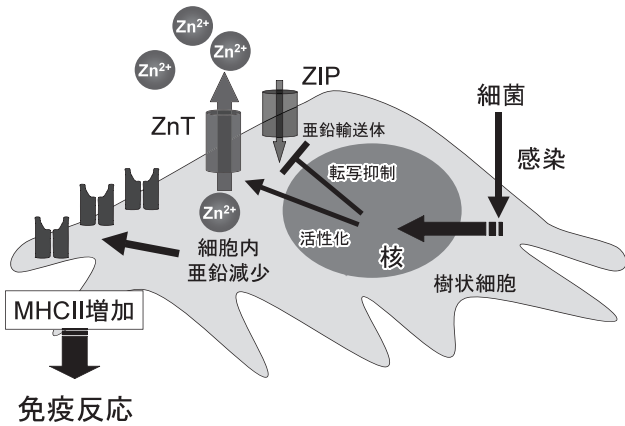


図14 樹状細胞活性化における亜鉛の役割

細菌の感染によるシグナルが亜鉛トランスポーターの発現依存的に細胞内遊離亜鉛濃度を低下させ、細胞表面におけるMHCクラスII分子の発現を制御し、樹状細胞の成熟・活性化に役割を果たしている。

TPENで細胞内遊離亜鉛濃度を減少させると、LPS刺激と同様に細胞表面でのMHCクラスIIの発現が上昇しT細胞を活性化することが示されたことから、細胞内亜鉛の減少が樹状細胞の成熟の段階において役割を果たしていることが示唆された。刺激後ZIPファミリー亜鉛トランスポーター mRNA 発現量の減少とZnTファミリー亜鉛トランスポーター mRNA 発現量の上昇が観察されたことから、LPS刺激依存的な細胞内遊離亜鉛の減少は、mRNAの転写を介したトランスポーター発現量の変化により数時間の単位で調節されていることが明らかになった。実際、LPS刺激によりmRNA発現量の減少するZIP6を強制発現させることで、刺激依存的な細胞内遊離亜鉛濃度減少が抑制されるだけでなく、MHCクラスIIの細胞表面における発現上昇とT細胞の活性化能も抑制されることが明らかになった<sup>29)</sup>。これらの結果は、亜鉛トランスポーター依存的な細胞内遊離亜鉛濃度の変化が樹状細胞の成熟・活性化に役割を果たしており、これら成熟・活性化においても亜鉛がシグナル伝達物質として機能することを示している(図14)。

おわりに

アレルギー応答のエフェクター細胞であるマスト細胞を用いて、亜鉛/亜鉛トランスポーターの役割に関して調べたところ、亜鉛がその機能発現に重要な役割を担っていることが明らかとなった。興味深いことに、亜鉛はタンパク質の構造形成や維持に必須であると考えられてきたが、著者らの一連の解析により、シグナル伝達因子として機能することも示された。また、亜鉛トランスポーターによって、細胞内の亜鉛関連分子の機能発現を制御することにより、サイトカイン産生や脱顆粒応答といった生物現象を調

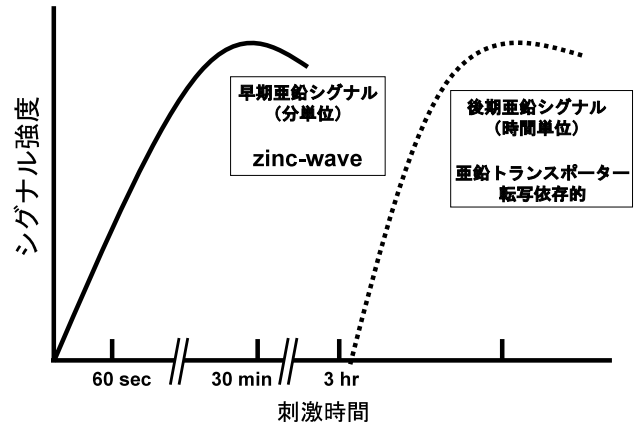


図15 亜鉛シグナル

筆者らの提唱する亜鉛シグナル伝達様式。時間軸に沿って、早期亜鉛シグナル、後期亜鉛シグナルの2種類あると考えている。

節していることが分かりつつある。著者らの研究グループでは、転写を介さず刺激後数分間で細胞内の亜鉛が変動する「早期亜鉛シグナル」と、亜鉛トランスポーター等の亜鉛制御分子の転写を介して刺激後数時間に亜鉛が変動する「後期亜鉛シグナル」の二つが存在しており(図15)、これら亜鉛シグナルがアレルギー応答を含め様々な生命現象に関与している可能性を提唱している<sup>30,31)</sup>。今後、亜鉛シグナルが生物学一般に認識されることを期待したい。

文 献

- 1) Galli, S.J., Maurer, M., & Lantz, C.S. (1999) *Curr. Opin. Immunol.*, 11, 53-59.
- 2) Wedemeyer, J., Tsai, M., & Galli, S.J. (2000) *Curr. Opin. Immunol.*, 12, 624-631.
- 3) Gustafson, G.T. (1967) *Lab. Invest.*, 17, 588-598.
- 4) Colvin, R.A., Fontaine, C.P., Laskowski, M., & Thomas, D. (2003) *Eur. J. Pharmacol.*, 479, 171-185.
- 5) Zalewski, P.D., Millard, S.H., Forbes, I.J., Kapaniris, O., Slavotinek, A., Betts, W.H., Ward, A.D., Lincoln, S.F., & Mahadevan, I. (1994) *J. Histochem. Cytochem.*, 42, 877-884.
- 6) Palmiter, R.D. & Huang, L. (2004) *Pflugers Arch.*, 447, 744-751.
- 7) Eide, D.J. (2004) *Pflugers Arch.*, 447, 796-800.
- 8) Kambe, T., Yamaguchi-Iwai, Y., Sasaki, R., & Nagao, M. (2004) *Cell. Mol. Life Sci.*, 61, 49-68.
- 9) Wang, K., Zhou, B., Kuo, Y.M., Zemansky, J., & Gitschier, J. (2002) *Am. J. Hum. Genet.*, 71, 66-73.
- 10) Huang, L. & Gitschier, J. (1997) *Nat. Genet.*, 17, 292-297.
- 11) Chowanadisai, W., Lonnerdal, B., & Kelleher, S.L. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 39699-39707.
- 12) Sladek, R., Rocheleau, G., Rung, J., Dina, C., Shen, L., Serre, D., Boutin, P., Vincent, D., Belisle, A., Hadjadj, S., Balkau, B., Heude, B., Charpentier, G., Hudson, T.J., Montpetit, A., Pshzhetsky, A.V., Prentki, M., Posner, B.I., Balding, D.J., Meyre, D., Polychronakos, C., & Froguel, P. (2007) *Nature*, 445, 881-885.
- 13) Fukada, T., Civic, N., Furuichi, T., Shimoda, S., Mishima, K.,

- Higashiyama, H., Idaira, Y., Asada, Y., Kitamura, H., Yamasaki, S., Hojyo, S., Nakayama, M., Ohara, O., Koseki, H., Dos Santos, H.G., Bonafe, L., Ha-Vinh, R., Zankl, A., Unger, S., Kraenzlin, M.E., Beckmann, J.S., Saito, I., Rivolta, C., Ikegawa, S., Superti-Furga, A., & Hirano, T. (2008) *PLoS One*, **3**, e3642.
- 14) Andrews, G.K. (2001) *Biometals*, **14**, 223–237.
- 15) Kabu, K., Yamasaki, S., Kamimura, D., Ito, Y., Hasegawa, A., Sato, E., Kitamura, H., Nishida, K., & Hirano, T. (2006) *J. Immunol.*, **177**, 1296–1305.
- 16) Nishida, K., Yamasaki, S., Ito, Y., Kabu, K., Hattori, K., Tezuka, T., Nishizumi, H., Kitamura, D., Goitsuka, R., Geha, R. S., Yamamoto, T., Yagi, T., & Hirano, T. (2005) *J. Cell Biol.*, **170**, 115–126.
- 17) Nechushtan, H., Leitges, M., Cohen, C., Kay, G., & Razin, E. (2000) *Blood*, **95**, 1752–1757.
- 18) Klemm, S., Gutermuth, J., Hultner, L., Sparwasser, T., Behrendt, H., Peschel, C., Mak, T.W., Jakob, T., & Ruland, J. (2006) *J. Exp. Med.*, **203**, 337–347.
- 19) Suto, H., Nakae, S., Kakurai, M., Sedgwick, J.D., Tsai, M., & Galli, S.J. (2006) *J. Immunol.*, **176**, 4102–4112.
- 20) Inoue, K., Matsuda, K., Itoh, M., Kawaguchi, H., Tomoike, H., Aoyagi, T., Nagai, R., Hori, M., Nakamura, Y., & Tanaka, T. (2002) *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 1775–1784.
- 21) Suzuki, T., Ishihara, K., Migaki, H., Matsuura, W., Kohda, A., Okumura, K., Nagao, M., Yamaguchi-Iwai, Y., & Kambe, T. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 637–643.
- 22) Suzuki, T., Ishihara, K., Migaki, H., Nagao, M., Yamaguchi-Iwai, Y., & Kambe, T. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 30956–30962.
- 23) Nishida, K., Hasegawa, A., Nakae, S., Oboki, K., Saito, H., Yamasaki, S., & Hirano, T. (2009) *J. Exp. Med.*, **206**, 1351–1364.
- 24) Corbalan-Garcia, S. & Gomez-Fernandez, J.C. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1761**, 633–654.
- 25) Yamasaki, S., Sakata-Sogawa, K., Hasegawa, A., Suzuki, T., Kabu, K., Sato, E., Kurosaki, T., Yamashita, S., Tokunaga, M., Nishida, K., & Hirano, T. (2007) *J. Cell Biol.*, **177**, 637–645.
- 26) Maret, W., Jacob, C., Vallee, B.L., & Fischer, E.H. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 1936–1940.
- 27) Yamashita, S., Miyagi, C., Carmany-Rampey, A., Shimizu, T., Fujii, R., Schier, A.F., & Hirano, T. (2002) *Dev. Cell*, **2**, 363–375.
- 28) Yamashita, S., Miyagi, C., Fukada, T., Kagara, N., Che, Y.S., & Hirano, T. (2004) *Nature*, **429**, 298–302.
- 29) Kitamura, H., Morikawa, H., Kamon, H., Iguchi, M., Hojyo, S., Fukada, T., Yamashita, S., Kaisho, T., Akira, S., Murakami, M., & Hirano, T. (2006) *Nat. Immunol.*, **7**, 971–977.
- 30) Hirano, T., Murakami, M., Fukada, T., Nishida, K., Yamasaki, S., & Suzuki, T. (2008) *Adv. Immunol.*, **97**, 149–176.
- 31) Murakami, M. & Hirano, T. (2008) *Cancer Sci.*, **99**, 1515–1522.
-