



亜鉛トランスポーター ZnT と ZIP の亜鉛 輸送機構

はじめに

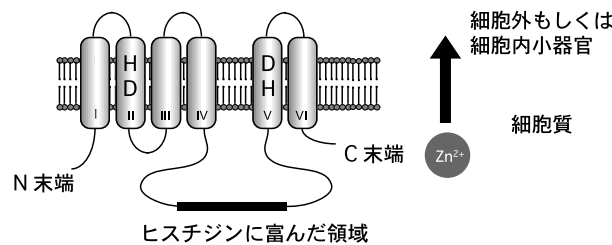
必須微量元素の一つである亜鉛の膜透過を媒介する亜鉛トランスポーターは、出芽酵母を用いた遺伝学的解析に

よって発見され、動物細胞における解析の進展により急速に理解が進んだ。現在では、哺乳類の亜鉛トランスポーターは23種類存在し、個体レベルや細胞レベルにおいて亜鉛ホメオスタシスを維持するだけでなく、非常に多様な生理作用を持つことが明らかにされている¹⁻³⁾。亜鉛トランスポーターの幅広い生理作用を理解する上で不可欠な情報となる構造・輸送様式・制御機構について、最新の知見を織り交ぜて紹介したい。

1. 真核細胞で機能する亜鉛トランスポーター

トランスポーターは、ATPの加水分解のエネルギーを利用する一次性能動輸送型のATP binding cassette transporter群(ABCファミリー)と、ATPを利用しない二次性能動輸送型のsolute carrier transporter群(SLCファミリー)に分類される。真核細胞において機能する亜鉛トランスポーターは、SLCファミリーに属しており、細胞質から細胞外や細胞内小器官内の向きに亜鉛を輸送するZnT

(A) ZnT トランスポーター



(B) ZIP トランスポーター

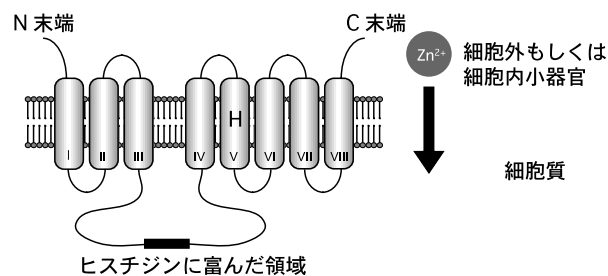


図1 ZnTトランスポーターとZIPトランスポーターの構造と亜鉛輸送の方向性

H, Dは膜貫通領域内の亜鉛結合部位を形成すると推定される保存されたヒスチジンとアスパラギン酸残基。

(Zn transporter, SLC30A ファミリー) と、細胞外や細胞内小器官内から細胞質の向きに亜鉛を輸送する ZIP (Zrt-, Irt-like protein, SLC39A ファミリー) に大別される²⁾。

ヒトやマウスでは9種の ZnT トランスポーターが存在することが知られ、アミノ末端とカルボキシル末端を細胞質側に持つ、6回膜貫通型タンパク質 (ZnT5 のみアミノ末端側に更に9回膜貫通領域を持つ15回) として機能すると予測されている。4回目と5回目 (ZnT5 では13回目と14回目) の膜貫通領域の間の細胞質側のループに特徴的なヒスチジン残基に富んだ配列を有し、この領域は亜鉛の輸送に必須である⁴⁾ (図1(A))。

一方、ZIP トランスポーターは14種存在し、アミノ末端とカルボキシル末端を細胞外に持つ、8回膜貫通型タンパク質であると予想されている。3回目と4回目の膜貫通領域の間の細胞質側のループに ZnT トランスポーターに類似した特徴的なヒスチジン残基に富んだ配列が認められる (図1(B))。ZIP トランスポーターは、アミノ酸配列の相同性からさらに四つのサブファミリーに分類され、多細

胞生物では、その内の一つ LIV1 サブファミリーに属するものが重要な生理機能を担っている¹⁾。

2. ZnT トランスポーター

ZnT トランスポーターやそのホモログにおいては、2回目と5回目の膜貫通領域内に高度に保存されたヒスチジンとアスパラギン酸残基が存在する。最近、これらの残基が膜貫通領域内の亜鉛結合部位として機能することが³⁾、ZnT トランスポーターの大腸菌ホモログ YiiP の X 線結晶構造解析から明らかにされた⁵⁾。YiiP は Y 字型のホモ二量体を形成し、各プロトマー当たり四つの亜鉛結合部位を持ち、その内の一つが上述の膜貫通領域内の亜鉛結合部位に相当する。残り三つの亜鉛結合部位は細胞質のカルボキシル末端領域に存在し、銅シャペロン Atox1 と類似した構造をとるため、結合した亜鉛イオンを膜貫通領域内の亜鉛結合部位に送り込む機能を果たすと推測されている。ZnT トランスポーターのホモ二量体形成には細胞質側に存在するカルボキシル末端領域が重要であることも知られており⁶⁾、領

(A)

トランスポーター	膜貫通領域 II	膜貫通領域 V
YiiP	41 AALVD SLVD IGASLTNL 57	146 AVRADML HYQSD VM 159
ZnT5	447 SDGF FMLFD CSALVMGL 463	588 NMRGV FLHVLAD TL 601
ZnT6	62 AYTY LTIFF DLFSLMTCL 78	194 FLPRM NPEVLI DLA 207

(B)

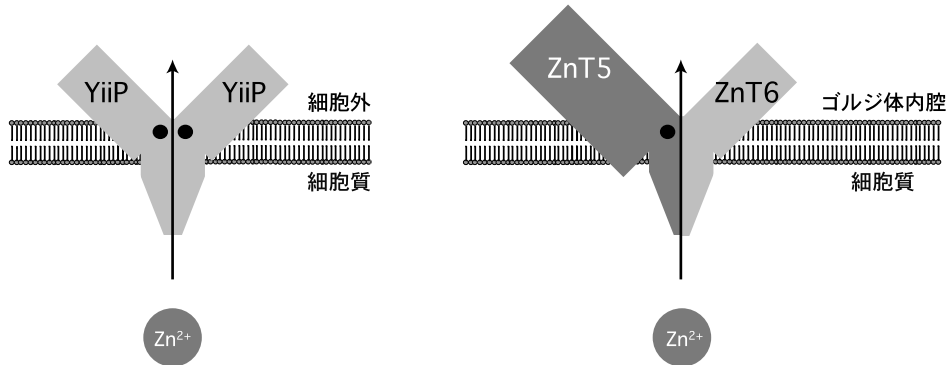


図2 YiiP ホモ二量体と ZnT5/ZnT6 ヘテロ二量体との比較

(A) ZnT6 では、膜貫通領域内にある保存された親水性アミノ酸残基 (黒四角) が、疎水性残基 (白四角) に置換されている。(B) ホモ二量体を形成する ZnT トランスポーターでは、それぞれのプロトマーが膜貫通領域内に亜鉛結合部位 (●) を形成するのにに対し、ZnT5/ZnT6 ヘテロ二量体では、ZnT5 のみが亜鉛結合部位を形成すると予想される。

域内に存在するチロシン残基を介したプロトマー間の結合によって、細胞内局在や亜鉛輸送活性が調節される例も示されている⁷⁾。

ZnT トランスポーターの亜鉛輸送様式に関しては、これまでそれほど多くの知見は明らかにされてはいないが、出芽酵母やシロイヌナズナの液胞に局在する ZnT トランスポーターホモログの亜鉛輸送活性は、バフィロマイシン等の V-ATPase (液胞型 ATPase) 阻害剤によって阻害され、プロトン依存的事であることが報告されている^{8,9)}。このことから、エンドソームやリソソーム等の酸性細胞内小器官に局在する ZnT トランスポーターも、亜鉛をプロトン依存的に輸送するものと予想される。

上述したように、ZnT トランスポーターはホモ二量体を形成して亜鉛を輸送すると考えられているが、興味深いことに、ゴルジ体等の分泌経路に局在する ZnT5 と ZnT6、さらにそのホモログだけがヘテロ多量体を形成する。ホモ二量体を形成する ZnT トランスポーターに比べ、ヘテロ多量体に関する知見は乏しく、我々は ZnT5/ZnT6 ヘテロ多量体の性質を詳しく調べた。YiiP の結晶構造解析から明らかにされた膜貫通領域内の亜鉛結合部位を形成する親水性アミノ酸残基は、ZnT6 では保存されていない (図 2(A))。このことから ZnT5/ZnT6 ヘテロ多量体は、四量体等の大きな複合体を形成するものと予測されたが、実際にはヘテロ二量体を形成していた。このヘテロ二量体の形成には、ZnT5 の細胞質に存在するカルボキシル末端領域が重要であり、何らかの役割を果たすと考えられた ZnT5 の特徴である長いアミノ末端領域 (9 回膜貫通領域) は必要ではなかった。また、ZnT5/ZnT6 ヘテロ二量体の膜貫通領域内の亜鉛結合部位は、ZnT5 の保存された親水性アミノ酸残基のみを利用しており、ZnT6 はその形成に関与していなかった (図 2(B))¹⁰⁾。このようなユニークな特徴のため、ZnT5/ZnT6 ヘテロ二量体は、他のホモ二量体とは異なる独自の様式で亜鉛を輸送する可能性も考えられたが、亜鉛蛍光プローブを用いた解析の結果、その輸送様式もプロトンとの対向輸送であることが判明した¹¹⁾。液胞で機能する ZnT トランスポーターホモログの結果と考え合わせると、細胞内局在やホモとヘテロにかかわらず、ほとんどの ZnT トランスポーターは亜鉛/プロトン交換輸送体として機能するのであろう。

3. ZIP トランスポーター

ZIP トランスポーターやそのホモログにおいては、X 線結晶構造が報告されていないため、分子内の亜鉛結合部位

等の詳細に関しては明らかにされていない。幾つかの ZIP トランスポーターのホモログにおいて、5 番目の膜貫通領域内に存在する保存されたヒスチジン残基が亜鉛輸送活性に必須であることが示されており、亜鉛が膜通過する際には、この残基が亜鉛結合部位として機能すると予想される。

最近、一部の ZIP トランスポーター (ZIP5, ZIP6, ZIP10) の細胞外領域が、プリオンタンパク質 (PrP) のアミノ末端領域と構造的に類似していることが報告された¹²⁾。この結果は、ZIP トランスポーターと PrP が共通の祖先分子から進化を遂げたことを示唆しており、金属代謝と疾患との観点からも ZIP トランスポーターの構造に非常に注目が集まっている。

過剰発現細胞株を用いた解析の結果から、細胞膜上に局在する幾つかの ZIP トランスポーターの亜鉛取り込み活性は、炭酸イオンにより促進されることが明らかにされている¹⁾。このことから、細胞外亜鉛の取り込みに機能する他の ZIP トランスポーターも、基本的には亜鉛/炭酸イオン共輸送体として機能すると考えられる。

また、亜鉛輸送の活性制御を担う翻訳後修飾に関しては、ZIP トランスポーターにおいて解析が進展している。特に小腸上皮細胞に発現し、体内亜鉛量を統御する ZIP4 に関しては、精力的に解析が進められており、興味深い知見が得られている。

ZIP4 は十分に亜鉛が存在していると (亜鉛十分時)、恒常的にエンドサイトーシスされ、リソソームとプロテアソームの両経路にて分解される (図 3)。この際、ZIP4 はユビキチン化されるが、このユビキチン化には、膜貫通領域 3 番目と 4 番目の間のヒスチジン残基に富んだ領域が必要である¹³⁾。興味深いことに、これらヒスチジン残基は、ZIP4 の分解に必要な不可欠となる ZIP4 のエンドサイトーシスには関与していない。そのため、この領域が細胞質内の亜鉛濃度を感知する亜鉛センサーとして機能し、ZIP4 のユビキチン化を制御していることが示唆されるが、亜鉛を感知するメカニズムに関しては全く明らかにされていない。一方、亜鉛が不足すると (亜鉛欠乏時)、ZIP4 は細胞膜上に蓄積する (生体内では、小腸上皮細胞アピカル膜上に蓄積し、食事由来の亜鉛を細胞内に取り込む)。さらに、亜鉛不足が長時間に及ぶと、ZIP4 のアミノ末端側の長い細胞外領域が切断除去 (プロセシング) される (図 3)、このプロセシングには、ZIP4 が一度エンドサイトーシスされる必要がある¹⁴⁾。ZIP4 のエンドサイトーシスは、亜鉛十分時の分解にも亜鉛欠乏時のプロセシングにも必要とされるため、両者の違いを明らかにすることは、亜鉛代謝制

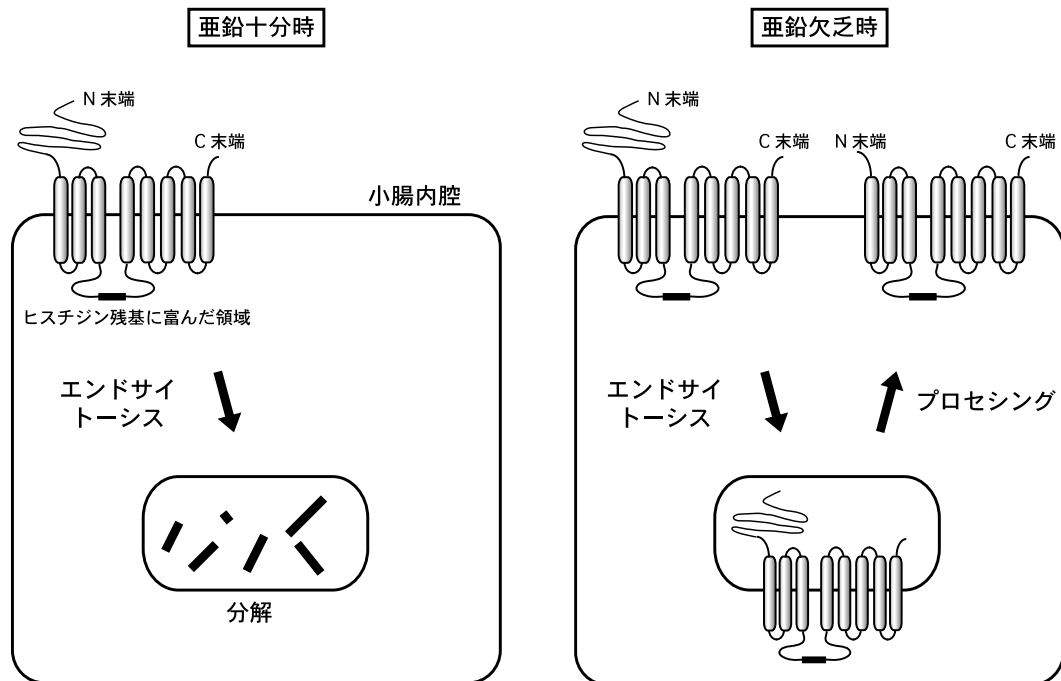


図3 ZIP4の亜鉛濃度に依存した制御機構

御機構を理解する上で非常に興味深い。

細胞膜上に局在する ZIP トランスポーターには、ZIP4 のプロセッシング部位と想定される配列を持つものや、亜鉛余剰時にエンドサイトーシスされるものも多い。ZIP4 の亜鉛濃度依存的な制御機構は、他の多くの ZIP トランスポーターにおいても機能していると予想される。

おわりに

細胞内における遊離の亜鉛（イオン）の濃度は非常に低いレベルに保たれており、亜鉛はタンパク質などにキレートされた状態で存在することが示されている。そのため、亜鉛トランスポーターが遊離の亜鉛を認識するのか、それとも何らかのキャリアを介して亜鉛を認識しているのか、その制御にも注目が集まる。亜鉛トランスポーターの亜鉛感知機構、さらには立体構造変化を伴う亜鉛輸送機構が解明され、近い将来亜鉛輸送の全貌が明らかになることを期待したい。

本稿で紹介した ZIP4 の研究は、Kansas 大学 Glen K. Andrews 教授のもとで実施したものであり、ZnT5/ZnT6 の亜鉛輸送活性の測定は、Ben-Gurion 大学 Israel Sekler 博士との共同研究の成果です。この場を借りてお礼申し上げます。

- 1) Lichten, L.A. & Cousins, R.J. (2009) *Annu. Rev. Nutr.*, **29**, 153–176.
- 2) Eide, D.J. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1763**, 711–722.
- 3) Kambe, T., Yamaguchi-Iwai, Y., Sasaki, R., & Nagao, M. (2004) *Cell Mol. Life Sci.*, **61**, 49–68.
- 4) Suzuki, T., Ishihara, K., Migaki, H., Nagao, M., Yamaguchi-Iwai, Y., & Kambe, T. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 30956–30962.
- 5) Lu, M. & Fu, D. (2007) *Science*, **317**, 1746–1748.
- 6) Cherezov, V., Hofer, N., Szebenyi, D.M., Kolaj, O., Wall, J.G., Gillilan, R., Srinivasan, V., Jaroniec, C.P., & Caffrey, M. (2008) *Structure*, **16**, 1378–1388.
- 7) Salazar, G., Falcon-Perez, J.M., Harrison, R., & Faundez, V. (2009) *PLoS One*, **4**, e5896.
- 8) MacDiarmid, C.W., Milanick, M.A., & Eide, D.J. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 39187–39194.
- 9) Kawachi, M., Kobae, Y., Mimura, T., & Maeshima, M. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 8374–8383.
- 10) Fukunaka, A., Suzuki, T., Kurokawa, Y., Yamazaki, T., Fujiwara, N., Ishihara, K., Migaki, H., Okumura, K., Masuda, S., Yamaguchi-Iwai, Y., Nagao, M., & Kambe, T. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 30798–30806.
- 11) Ohana, E., Hoch, E., Keisar, C., Kambe, T., Yifrach, O., Hershfinkel, M., & Sekler, I. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 17677–17686.
- 12) Schmitt-Ulms, G., Ehsani, S., Watts, J.C., Westaway, D., & Wille, H. (2009) *PLoS One*, **4**, e7208.
- 13) Mao, X., Kim, B.E., Wang, F., Eide, D.J., & Petris, M.J. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 6992–7000.

- 14) Kambe, T. & Andrews, G.K. (2009) *Mol. Cell Biol.*, 29, 129–139.

福中 彩子, 神戸 大朋
(京都大学大学院生命科学研究科)

Mechanism of zinc transport by zinc transporters, ZnT and ZIP

Ayako Fukunaka and Taiho Kambe (Division of Integrated Life Science, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kitashirakawa-Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan)

がん細胞の薬剤耐性制御機構の新展開

1. はじめに

我が国の死因の一位を占めるのは「がん」であり、働き盛りの年齢層における最大の死因でもあり、保健医療上の重要性は極めて高い。がんの本態はゲノム不安定性を背景に、多段階過程を通して複数の遺伝子構造・発現異常が体細胞（がん細胞）に集積することに起因する。従ってがん細胞・組織のゲノム解析は、診断・治療の分子標的を同定し、個別化された予知医療を確立するために極めて有効である。国内でも代表的ながんを対象にゲノム・遺伝子網羅的解析が進み、新たながん関連遺伝子・治療応答性関連遺伝子やその候補領域が多数同定され、機能解析から医薬への応用がはかられようとしている。

がんの予後を左右する因子としては、転移と薬剤耐性があげられる。この二つの問題をどうコントロールするかが患者の存命の鍵となるが、いずれもそのメカニズム解明が様々に検討されているものの、その基礎研究の成果が十分に臨床に反映されていないのが実情である。例えばタキサン系の抗がん剤として知られるドセタキセルはチューブリンの重合を促進して微小管を安定化し、細胞分裂を停止させ、がん細胞のアポトーシスを誘導する薬剤である。ドセタキセルは乳がん治療に有効な薬剤であるが、患者の約半数には奏効せず、奏効者においても乳がん細胞が次第にドセタキセル耐性化することが治療の障害となっている。しかしながら、ドセタキセル感受性や薬剤耐性化を予測する有用な診断キットは一般にはひろまっておらず、薬剤感受性を増感するための治療標的分子も見つかっていないことから、抗がん剤治療の臨床の現場での患者や医師の苦悩は

解決していない。本稿では、筆者らの研究室で発見された薬剤耐性メカニズムを制御する新たな分子の概説と、最近のトピックスである、薬剤耐性のメカニズム理解と根絶に寄与することが期待される microRNA の関与についての知見を紹介する。

2. 薬剤耐性機構の新たな主役の発見

RNA 干渉法を利用した網羅的な遺伝子機能解析セルトランスフェクションアレイによって、薬剤耐性を解除する分子を検索した。まず、ドセタキセル非奏効者の乳がん組織で発現上昇している遺伝子の small interfering RNA (siRNA) を合成し、ドセタキセル耐性乳がん細胞株に導入して、RNA 干渉 (RNAi) による機能スクリーニングを実施した。その結果、ribophorin II (RPN2) に対する siRNA は、ドセタキセル存在下で強い細胞増殖抑制とアポトーシス誘導を示し、RPN2 は乳がんの薬剤耐性化に関与していることが明らかになった¹⁾。RPN2 の機能を個体レベルで検証するため、薬剤耐性乳がんマウスにドセタキセルと同時に RPN2 siRNA を投与したところ、著しい腫瘍の縮小が認められ、ドセタキセルへの感受性が回復することが確認された。

3. 薬剤耐性における RPN2 の機能と糖鎖修飾

RPN2 分子とがんとの関わりは、今までほとんど報告されていない。図 1 左に示すように RPN2 は、粗面小胞体に局在する I 型膜タンパク質で、オリゴ糖転移酵素 (oligosaccharyl transferase: OST) 複合体を構成する成分のひとつである²⁾。OST は、新生ポリペプチド鎖に N-結合型糖鎖を付加する機能を持ち、糖タンパク質の品質管理機構に関与しているとされることから、OST 複合体の 1 成分である RPN2 の役割に着目した。

がん細胞の薬剤耐性化に関与する糖タンパク質として、P-糖タンパク質 (P-gp) は広く認知されている。実際に、薬剤耐性 MCF7-ADR 細胞では、P-gp の発現がその親株 MCF7 に比べ著しく亢進しており、ドセタキセルの排出ポンプとして働いている。P-gp は 140 kDa の新生タンパク質として合成され、糖鎖付加により 170 kDa の糖タンパク質となる。170 kDa の P-gp は細胞膜に移動したうえでリン酸化を受け、ようやく薬剤排出ポンプとして機能する (図 2)。そこで、RPN2 のノックダウンが P-gp の糖鎖修飾を抑制し、薬剤排出能を阻害するかをウエスタンブロット法により確認した。その結果、コントロール siRNA では 170 kDa の成熟型糖鎖の P-gp が主であったの