

エクト型亜鉛要求性酵素の活性化機構：亜鉛栄養を絡めた考察

上田 祥子, 神戸 大朋

(京都大学大学院生命科学研究科*)

(受付 2019年8月30日, 受理 2019年9月18日)

Activation mechanism of zinc-requiring ectoenzymes: A consideration from zinc nutrition

Sachiko UEDA, Taiho KAMBE

*Division of Integrated Life Science, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto, Japan**

Summary

Recently, zinc ectoenzymes have received much attention owing to their important physiological and pathophysiological roles. They are thought to be activated through coordination with zinc, which is supplied by zinc transporters, ZNTs, which play a role in the early secretory pathway. However, the molecular mechanisms underlying the activation remain largely unknown. With an emphasis on recent findings, this manuscript briefly discusses an array of topics related to zinc ectoenzyme activation by the zinc transporters, specifically ZNT5-ZNT6 heterodimers and ZNT7 homodimers. Moreover, zinc ectoenzyme activation has been studied considering zinc deficiency, which reveals the importance of zinc in nutrition for the maintenance of good health.

はじめに

亜鉛は生命活動に欠かすことのできない必須微量栄養素である。生体内における亜鉛の役割は、タンパク質の立体構造を安定させる構造因子や、酵素の活性中心に配位して反応を司る触媒因子、および細胞内外の濃度変化を介して細胞内情報伝達を調節するシグナル因子の3つに大別される^{1,2)}。すなわち、亜鉛が多岐にわたる機能を果たすためには、種々のタンパク質と相互作用することが不可欠である。

近年、日本人における亜鉛欠乏者は増加傾向にあると考えられており、潜在的な数を含めると日本人の20～30%が亜鉛欠乏状態にあると報告されている³⁾。この現状をふまえて、2017年には低亜鉛血症の治療薬として亜鉛製剤が承認され、2018年には日本臨床栄養学会から「亜鉛欠乏症の診療指針2018」が発表された⁴⁾。この指針の中では亜鉛欠乏症の診断指針が示されており、血清亜鉛値60 µg/dL未満が亜鉛欠乏症、60～80 µg/dL未満が潜在性亜鉛欠乏と定められている。加えて、この指針では亜鉛欠乏の臨床症状として、皮膚炎、食欲低下、発育障害、易感染性、味覚障害などが、また、検査所見として血清アルカリフォスファターゼ (ALP) 低値が示されている⁴⁾。

上記のように、亜鉛欠乏による症状は非常に多様である

ことが知られているが、その理由に関してはこれまで明確には示されていない。要因の一つとして、ALPのような活性発現に亜鉛を必要とする亜鉛要求性酵素の活性低下が考えられており、亜鉛要求性酵素の活性制御機構の解明は、亜鉛欠乏による症状の発症メカニズムを理解する上で重要であるといえる。本稿では、細胞膜外葉や細胞外に分泌されるエクト型亜鉛要求性酵素の亜鉛による活性制御機構に関して、現在明らかになっていることを概説する。

亜鉛要求性酵素とその活性

活性中心に亜鉛を配位し、亜鉛依存的な活性を示す酵素を亜鉛要求性酵素と呼ぶ⁵⁾ (Table 1)。亜鉛要求性酵素は、酵素分類における Oxidoreductase (Class I), Transferase (Class II), Hydrolase (Class III), Lyase (Class IV), Isomerase (Class V), Ligase (Class VI) の6種いずれにも存在しており、このことから、亜鉛が酵素活性の制御に極めて重要であることが見て取れる⁶⁾。亜鉛要求性酵素には、DNA ポリメラーゼやRNA ポリメラーゼ、アルコール脱水素酵素などの細胞内で機能する酵素に加え、ALP やアンジオテンシン転換酵素、マトリックスメタロプロテアーゼなどの、細胞外あるいは細胞膜外葉に結合して存在するエクト型酵素も含まれる^{7,8)}。臨床での検査所

*所在地：京都市左京区北白川追分町 (〒606-8502)

Table 1 Properties of representative zinc-requiring ectoenzymes and their physiological functions

酵素名	亜鉛数	亜鉛の配位アミノ酸残基	生理機能・疾患との関連
Alkaline phosphatases (ALPs) (アルカリフォスファターゼ)	2	Zinc1: Asp, His, His Zinc2: Asp, Asp, His	リン酸モノエステルを加水分解 骨形成に関与, 低フォスファターゼ症の原因遺伝子
Carbonic anhydrase IX and XII (炭酸脱水酵素IX, XII)	1	His, His, His	$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ の反応を可逆的に触媒, pH調節, CO_2 輸送に関与 がん細胞の増殖・浸潤に関与
Matrix metalloproteinase 2 and 9 (マトリックスメタロプロテアーゼ2, 9)	2	Zinc1: His, His, His Zinc2: His, His, His, Asp	細胞外マトリックスの分解 がん細胞の浸潤・転移に関与, 炎症性疾患に関与
Angiotensin-converting enzyme (アンギオテンシン転換酵素)	1	His, His, Glu	昇圧作用のあるアンギオテンシンIIの生成を触媒, 血圧調節 高血圧症や心不全に関与
Endothelin-converting enzyme (エンドセリン転換酵素)	1	His, His, Glu	昇圧作用のあるエンドセリンの生成を触媒, 血圧調節 高血圧症・喘息・心不全・腎不全に関与
Carboxypeptidase A (カルボキシペプチダーゼA)	1	His, His, Glu	膵臓から分泌され, ペプチドのC末端のアミノ酸を切断

見で使用される血清中のALPは、この膜結合型ALPが細胞膜から遊離し、血液中に放出されたものに相当する。

エクト型を含む亜鉛要求性酵素の活性化には、亜鉛が配位していないアポ型（不活性型）の状態から亜鉛が配位したホロ型（活性型）の状態に変化することが必要である。これまでは、この変化は亜鉛の濃度勾配に従って受動的に起こると考えられてきたが、最近の研究から、亜鉛の濃度勾配にしたがった親和力のみでは説明できない制御機構の存在が示唆されている⁷⁾。例えば、亜鉛欠乏状態で産生させたエクト型亜鉛要求性酵素（すなわちアポ酵素）に、生理的条件下で過剰な亜鉛を加えるだけでは、活性は回復しない（ホロ酵素に変換されない⁹⁾。このことから、エクト型亜鉛要求性酵素は、生合成の場となる小胞体やゴルジ体などの早期分泌経路内で亜鉛を獲得することが必要であると考えられている。

エクト型亜鉛要求性酵素の活性化

エクト型亜鉛要求性酵素の活性化に必要な亜鉛の早期分泌経路内への輸送は、亜鉛トランスポーターZNT5, ZNT6, ZNT7が担っている。これらZNTが亜鉛輸送活性を獲得するには、ZNT5とZNT6はヘテロ二量体、ZNT7はホモ二量体を形成することが必要である^{10,11)}。ZNTは通常ホモ二量体を形成するため、ZNT5とZNT6がヘテロ二量体を形成するのは極めてユニークな特徴である。

ALPの活性は、これら3つのZNTをすべて欠損させるとほぼ完全に消失する。すなわち、ALPなどのエクト型亜鉛要求性酵素が亜鉛を獲得し、アポ酵素からホロ酵素に変換して活性発現するためには、ZNT5-ZNT6ヘテロ二量体とZNT7ホモ二量体が必要不可欠である^{9,12,13)}。面白いことに、この3つのZNTをすべて欠損させた細胞株においては、ALPは活性消失するだけでなく、タンパク質自体が速やかに分解される。しかしながら、亜鉛輸送能を持たないZNTの再発現によって、このALPの分解は回避

される¹⁴⁾。したがって、これらのZNTは何らかの方法でアポ型ALPを安定化でき、安定化した後に、亜鉛を供給して活性化させる（ホロ型ALPに変換する）という、二つの機構によってALPを活性化している。

上記の見解は、ほとんどはニワトリ細胞を使用した解析で明らかにされたが、最近我々はヒトの培養細胞においても同様の制御機構が働くことを見出している。例えば、ZNT5とZNT7を欠損させたヒト培養細胞（すなわち、ZNT5-ZNT6ヘテロ二量体とZNT7ホモ二量体の機能欠損細胞）では、ALPの活性はほぼ完全に消失する。免疫ブロット解析では、ALPの分子量が通常よりやや小さく検出される。この原因としては、ALPのフォールディング不全によって十分な糖鎖付加が起こらなかった可能性が考えられる（Fig.1）。また、タンパク分解を阻害することによってALPの発現を回復させることができるが、野生型細胞と同程度の分子量にまで回復させることができない。このことから、ZNT5-ZNT6ヘテロ二量体とZNT7ホモ二量体により輸送された亜鉛を新生ALPが受け取り正しくフォールディングすることが、引き続いて起こる糖鎖修飾を受ける上で不可欠となることが示唆された。ALPの亜鉛を介した発現制御機構・成熟化機構については、さらなる解析が必要である。

エクト型亜鉛要求性酵素と亜鉛欠乏症

我々は、亜鉛栄養とALPなどの亜鉛要求性酵素の活性が健康機能と密接に関連すると考えて解析を進めている。最近、亜鉛栄養と細胞外ATP代謝が密接に関わることを報告した⁹⁾。細胞外ATP代謝は、細胞外に存在するATP/ADPとアデノシンのバランスを制御する代謝系であり、炎症・抗炎症や痛み・鎮痛などのバランス制御と関連する¹⁵⁻¹⁸⁾。また、上述の亜鉛欠乏症の症状に大きく関与することが考えられる代謝系である。

様々な刺激に応じて細胞外に放出されたATPは、細胞膜に存在するP2受容体を介して炎症性のシグナルを細胞

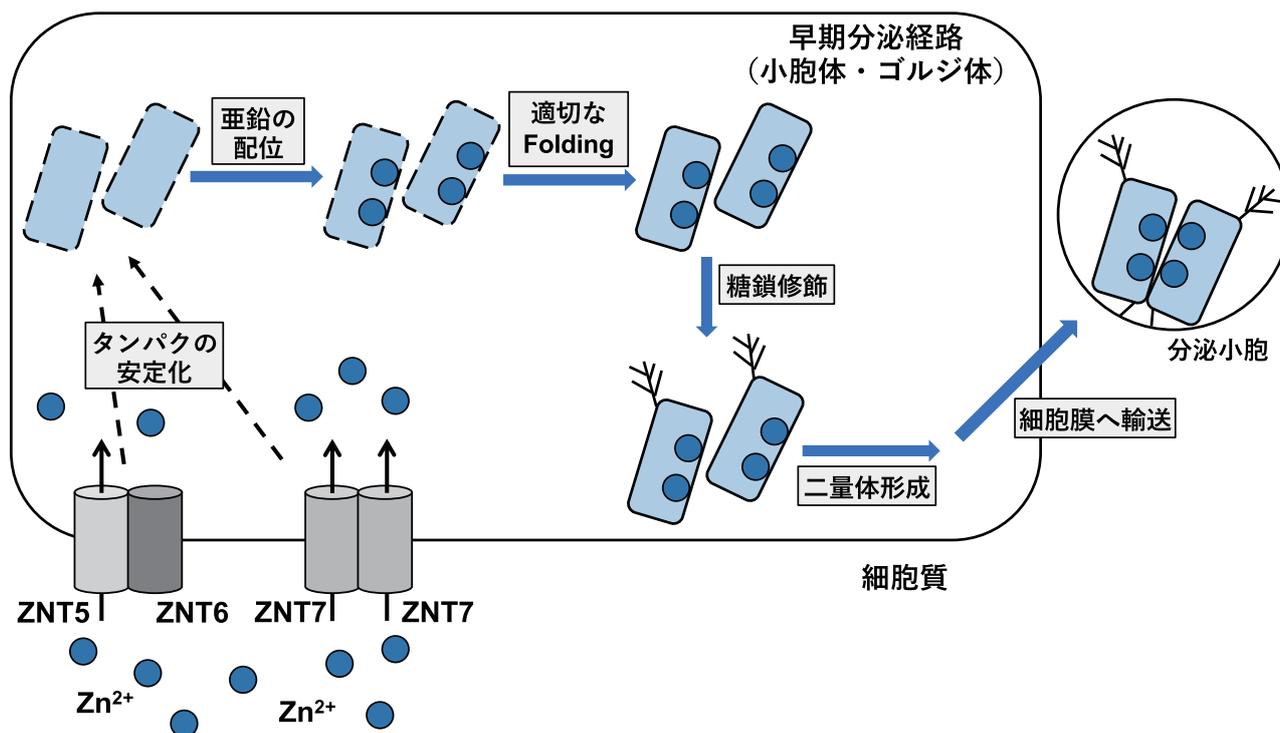


Fig. 1 Proposed model for ALP activation by ZNT transporters
 ALP is coordinated with zinc supplied by ZNT5-ZNT6 heterodimers and ZNT7 homodimers in the early secretory pathway. This process is essential for zinc ectoenzyme to fold correctly. Metalated ALP is N-glycosylated, and then probably forms homodimers before it exits out of the early secretory pathway to traffic to the plasma membrane.

内へ伝達し、一方、ATPの加水分解産物であるアデノシンはP1受容体を介して、抗炎症性のシグナルを伝達する。このATP → ADP → AMP → アデノシンの加水分解には、大きく4つの酵素ファミリーが関わるが、その中の3つ (ALP, 5'-ectonucleotidase (CD73と同一分子), Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (ENPP)) は、亜鉛要求性酵素である^{9, 19, 20)}。細胞やラットを亜鉛欠乏状態にすると、これらの酵素の活性が劇的に低下し、ATPの蓄積とアデノシンの産生低下が生じる⁹⁾。亜鉛が欠乏すると、細胞外ATP代謝の破綻 (細胞外ATPの増加とアデノシンの減少) によって炎症性シグナルが強まり、このことが炎症をはじめとした様々な亜鉛欠乏症に大きく関与していることが予想される。実際に、細胞外ATP代謝の破綻は、先天性亜鉛欠乏症・腸性肢端皮膚炎 (acrodermatitis enteropathica) の原因となることが実証されており²¹⁾、亜鉛欠乏症を理解する上で、エクト型亜鉛要求性酵素の活性化を理解することは重要である。

おわりに

生体内には多種多様な亜鉛要求性酵素が存在しており、疾病と密接な関わりを持つ酵素も多い。したがって、亜鉛要求性酵素の活性制御機構がより詳細に解明されれば、亜鉛要求性酵素の関わる種々の疾患の予防や治療に対して有用な知見が与えられるであろう。細胞外ATP代謝のように、亜鉛要求性酵素がクラスターを形成する代謝系は、特

に亜鉛欠乏の影響を受けやすいと予想され、今後はそのような代謝系を見つけ出し、解析を進めることが重要となると考える。本稿では、エクト型亜鉛要求性酵素の活性化が、3つのZNTを介して複雑に制御されていることを紹介したため、一見すると解析が進展している印象を持つ。しかしながら、細胞質に存在する亜鉛がこれらのZNTへどのように供給されるのかや、ZNTが輸送した亜鉛をエクト型亜鉛要求性酵素が活性中心に配位させる過程など、未だ明らかになっていない点が多い。さらには、亜鉛要求性酵素は多様な機能を有しており、細胞内局在も様々であることから、それぞれの酵素に応じて異なる活性制御機構が存在する可能性も考えられる。したがって、亜鉛要求性酵素の活性機構については、今後さらに解析を進める必要がある。

参考文献

- 1) Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, and Itsumura N. (2015) The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiol Rev* **95**: 749-784.
- 2) Hara T, Takeda TA, Takagishi T, Fukue K, Kambe T, and Fukada T. (2017) Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *J Physiol Sci* **67**: 283-301.

- 3) Kumssa DB, Joy EJ, Ander EL, Watts MJ, Young SD, Walker S, and Broadley MR. (2015) Dietary calcium and zinc deficiency risks are decreasing but remain prevalent. *Sci Rep* **5**: 10974.
- 4) [http://jscn.gr.jp/pdf/aen2018.pdf#search=%27 亜鉛欠乏症の診療指針 2018%27](http://jscn.gr.jp/pdf/aen2018.pdf#search=%27%20亜鉛欠乏症の診療指針2018%27)
- 5) Vallee BL, and Auld DS. (1990) Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* **29**: 5647-5659.
- 6) Vallee BL, and Falchuk KH. (1993) The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* **73**: 79-118.
- 7) Kambe T, Takeda TA, and Nishito Y. (2016) Activation of zinc-requiring ectoenzymes by ZnT transporters during the secretory process: Biochemical and molecular aspects. *Arch Biochem Biophys* **611**: 37-42.
- 8) Kambe T, Matsunaga M, and Takeda TA. (2017) Understanding the Contribution of Zinc Transporters in the Function of the Early Secretory Pathway. *Int J Mol Sci* **18**: E2179.
- 9) Takeda TA, Miyazaki S, Kobayashi M, Nishino K, Goto T, Matsunaga M, Ooi M, Shirakawa H, Tani F, Kawamura T, Komai M, and Kambe T. (2018) Zinc deficiency causes delayed ATP clearance and adenosine generation in rats and cell culture models. *Commun Biol* **1**: 113.
- 10) Suzuki T, Ishihara K, Migaki H, Nagao M, Yamaguchi-Iwai Y, and Kambe T. (2005) Two different zinc transport complexes of cation diffusion facilitator proteins localized in the secretory pathway operate to activate alkaline phosphatases in vertebrate cells. *J Biol Chem* **280**: 30956-30962.
- 11) Fukunaka A, Suzuki T, Kurokawa Y, Yamazaki T, Fujiwara N, Ishihara K, Migaki H, Okumura K, Masuda S, Yamaguchi-Iwai Y, Nagao M, and Kambe T. (2009) Demonstration and characterization of the heterodimerization of ZnT5 and ZnT6 in the early secretory pathway. *J Biol Chem* **284**: 30798-30806.
- 12) Suzuki T, Ishihara K, Migaki H, Matsuura W, Kohda A, Okumura K, Nagao M, Yamaguchi-Iwai Y, and Kambe T. (2005) Zinc transporters, ZnT5 and ZnT7, are required for the activation of alkaline phosphatases, zinc-requiring enzymes that are glycosylphosphatidylinositol-anchored to the cytoplasmic membrane. *J Biol Chem* **280**: 637-643.
- 13) Tsuji T, Kurokawa Y, Chiche J, Pouyssegur J, Sato H, Fukuzawa H, Nagao M, and Kambe T. (2017) Dissecting the Process of Activation of Cancer-promoting Zinc-requiring Ectoenzymes by Zinc Metalation Mediated by ZNT Transporters. *J Biol Chem* **292**: 2159-2173.
- 14) Fukunaka A, Kurokawa Y, Teranishi F, Sekler I, Oda K, Ackland ML, Faundez V, Hiromura M, Masuda S, Nagao M, Enomoto S, and Kambe T. (2011) Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase Is Activated via a Two-step Mechanism by Zinc Transport Complexes in the Early Secretory Pathway. *J Biol Chem* **286**: 16363-16373.
- 15) Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, and Hasko G. (2013) Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat Rev Cancer* **13**: 842-857.
- 16) al-Rashida M, and Iqbal J. (2014) Therapeutic potentials of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase, ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase, ecto-5'-nucleotidase, and alkaline phosphatase inhibitors. *Med Res Rev* **34**: 703-743.
- 17) Cekic C, and Linden J. (2016) Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol* **16**: 177-192.
- 18) Eltzschig HK, Sitkovsky MV, and Robson SC. (2012) Purinergic signaling during inflammation. *N Engl J Med* **367**: 2322-2333.
- 19) Zimmermann H, Zebisch M, and Strater N. (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal* **8**: 437-502.
- 20) Yegutkin GG. (2014) Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **49**: 473-497.
- 21) Kawamura T, Ogawa Y, Nakamura Y, Nakamizo S, Ohta Y, Nakano H, Kabashima K, Katayama I, Koizumi S, Kodama T, Nakao A, and Shimada S. (2012) Severe dermatitis with loss of epidermal Langerhans cells in human and mouse zinc deficiency. *J Clin Invest* **122**: 722-732.