

# 亜鉛輸送体の亜鉛状態に応答した 発現および局在の制御機構

京都大学大学院 生命科学研究所<sup>1)</sup> 京都薬科大学 薬学部<sup>2)</sup>

西藤有希奈<sup>1, 2)</sup> 神戸大朋<sup>1)</sup>

## 要約

亜鉛は生命活動に不可欠な必須微量元素であり、タンパク質の構造維持やシグナル伝達調節など、幅広い役割を担う。この多様な機能ゆえ、生体内で亜鉛が欠乏状態になると様々な障害や疾患が引き起こされる。生体内の亜鉛代謝は、23種類にもおよぶ亜鉛輸送体の局在と発現の厳密な制御によって維持されている。ノックアウトマウスや培養細胞を用いた昨今の目覚しい解析により、亜鉛輸送体は個体・細胞レベルにおいて非常に多様な生理機能を有すること、また、種々の疾患の発症や病態進行に関与することが明らかにされている。また、いくつかの亜鉛輸送体は、細胞内外の亜鉛濃度調節のために、亜鉛状態に応答して発現や局在をダイナミックに変動させることが最近の研究により示されている。特に、消化管からの亜鉛吸収過程は亜鉛を体内に取り込むための第一通過点となることから、体内の亜鉛代謝調節に非常に重要であり、そこでの亜鉛輸送体の発現と局在は他の組織に比較して極めて厳密に制御されている。

本稿では、消化管上皮細胞において細胞内への亜鉛取り込みに関与する ZIP4 と細胞から血液中への亜鉛放出に関与する ZNT1 の亜鉛依存的な発現と局在の巧妙な制御に焦点をあてながら、生体内の亜鉛代謝維持機構について最新の知見を織り交ぜて紹介したい。

KEY WORDS 亜鉛輸送体, 亜鉛代謝制御, 消化管上皮細胞

## はじめに

亜鉛は、体内に約2～3g存在し、生体内で鉄について多く存在する必須微量元素である<sup>1,2)</sup>。食事から摂取した亜鉛は、十二指腸および空腸から吸収され、血液中へと運ばれた後、各種臓器へと到達する。亜鉛の多くは骨や筋肉に存在するが、その他、皮膚、脳、肝臓、膵臓、腎臓など幅広い組織に分布する。この様にして、組織中へと運ばれた亜鉛は、様々なタンパク質と相互作用することによってその生理機能を発揮する。プロテオーム解析によると、ヒトゲノムにコードされたタンパク質の10%にあたる約3000種類ものタンパク質が亜鉛結合モチーフを有すると見積もられており、この事実からも亜鉛が生体内において極

めて重要であることを伺い知ることができる<sup>3,4)</sup>。実際に、亜鉛欠乏状態が続くと、皮膚炎・脱毛・味覚障害をはじめとした様々な疾患が引き起こされる<sup>5,6)</sup>。

亜鉛の機能について詳しく見てみると、その生理機能は、① Zn フィンガーモチーフなどに代表されるタンパク質の構造因子、② 酵素の活性中心としての触媒因子、③ 細胞内外のシグナル伝達調節因子の3つの役割に分類できる<sup>1,2)</sup>。亜鉛は、2価陽イオンとして安定であるため、上述の生理機能を発揮するためには細胞膜を隔てた輸送システムが必要であり、局在や発現の異なる多様な亜鉛輸送体がこの役割を担う。亜鉛輸送体は、細胞外または細胞内小器官から細胞質へ亜鉛を輸送する ZIP と、細胞質から細胞外または細胞内小器官へ

亜鉛を輸送する ZNT の 2 種類に分類される。哺乳類では、14 種類の ZIP と 9 種類の ZNT が機能しており、それぞれが、組織や細胞あるいは細胞内小器官において特異的な局在や発現を示す<sup>1,2)</sup>。

また、近年の研究により、いくつかの ZIP や ZNT の発現は亜鉛状態に反応して大きく変動することが示されており、体内での亜鉛代謝を厳密に制御する上で不可欠な調節機構となることが示唆されている。特に重要と考えられるのが、消化管からの亜鉛吸収過程における発現調節であり、消化管上皮細胞では、管腔側の頂端膜に局在する ZIP4 と血管内腔側の側底膜に局在する ZNT1 が、亜鉛状態に応じて局在と発現をダイナミックに変動させる。これまでに ZIP4 の発現および局在の制御機構については、個体・細胞レベルでの研究が進んでいたが、その一方で、ZNT1 については詳細な解析は行われてこなかった<sup>7-10)</sup>。今回、我々は、ZNT1 のタンパク質レベルでの発現および局在の制御機構について新たな知見を得た。本稿では、亜鉛輸送体の発現と局在の制御という観点から、ZIP4 と ZNT1 の特徴を比較解説し、生体の亜鉛代謝制御機構を概説したい。

## 1. 亜鉛吸収に関わる ZIP4 の発現および局在の制御機構

細胞膜表面には多数の ZIP が存在し、各組織・細胞における亜鉛の取り込みに関わっている。特に、食事から亜鉛の取り込みにおいては、消化管上皮細胞の頂端膜に高発現する ZIP4 が重要な役割を果たす。ZIP4 は、重篤な皮膚炎や下痢を症状の特徴とする先天性亜鉛欠乏症である腸性肢端性皮膚炎 (AE) の原因遺伝子として同定された輸送体であり、ZIP4 に変異をもつ AE 患者は、亜鉛補給によってのみ、その症状が改善する<sup>11,12)</sup>。ZIP4 の消化管での亜鉛吸収における重要性は、消化管特異的に ZIP4 を欠損させたマウスにおいても実証されており、このマウスは亜鉛過剰食を給餌しない限り生育できない<sup>13,14)</sup>。これは、上述の AE 患者の症状および治療効果と一致しており、ZIP4 が哺乳類全般の亜鉛吸収に必須の機能

を有することを強く示唆している。

ZIP4 の発現や局在は、亜鉛レベルによって転写後の多段階で制御されるが、特に頂端膜表面でのタンパク質発現制御は亜鉛吸収量の調節において鍵となる (図 1)。亜鉛十分時には、頂端膜に発現する ZIP4 は、細胞内へ速やかにエンドサイトーシスされ、リソソームやユビキチンプロテアソーム経路を介して細胞内で分解される<sup>15,16)</sup>。これにより、細胞膜表面での ZIP4 の発現が劇的に低下する。一方で、亜鉛欠乏時には、ZIP4 mRNA の発現が安定化し翻訳が促進する機構や、細胞内でのタンパク質分解が抑制される機構によって、頂端膜での ZIP4 の発現が上昇する<sup>7,17)</sup>。

さらに、長期的に亜鉛欠乏状態が続いた場合には、細胞内に取り込まれた ZIP4 は、細胞外 N 末端領域がプロセッシングを受け切断され、再び頂端膜に蓄積すると考えられている<sup>18)</sup>。ZIP4 の亜鉛依存的な発現や局在の制御メカニズムとしては、ZIP4 の細胞外のヒスチジン (His) 残基に富んだループ領域がエンドサイトーシス制御に関与する可能性や、細胞内の His 残基に富んだループ領域がユビキチン化を介した分解制御に必要な領域である可能性が示唆されている<sup>15,16,19)</sup>。

一方で、ZIP4 の N 末端領域におけるプロセッシング制御については、詳細なメカニズムは未だ解明されていない。AE 患者から見出された ZIP4 変異の中には、上述の様なエンドサイトーシスやプロセッシング制御に影響を及ぼす変異が見出されており、ZIP4 の亜鉛依存的な発現や局在応答の詳細な機構の解明が、AE 発症メカニズムの理解において重要な意味を持つと考えられる<sup>18,20)</sup>。

## 2. 亜鉛の排出に関わる ZNT1 の発現および局在の制御機構

ZIP4 によって消化管上皮細胞内へ取り込まれた亜鉛は、側底膜へと運ばれ血流中へと放出された後、アルブミンや  $\alpha$ 2-マクログロブリンと結合した状態で各種臓器へと運ばれる。亜鉛の血流中への放出には、上皮細胞の側底膜に局在する ZNT1 が重要な役割を果たすことが予想されてい

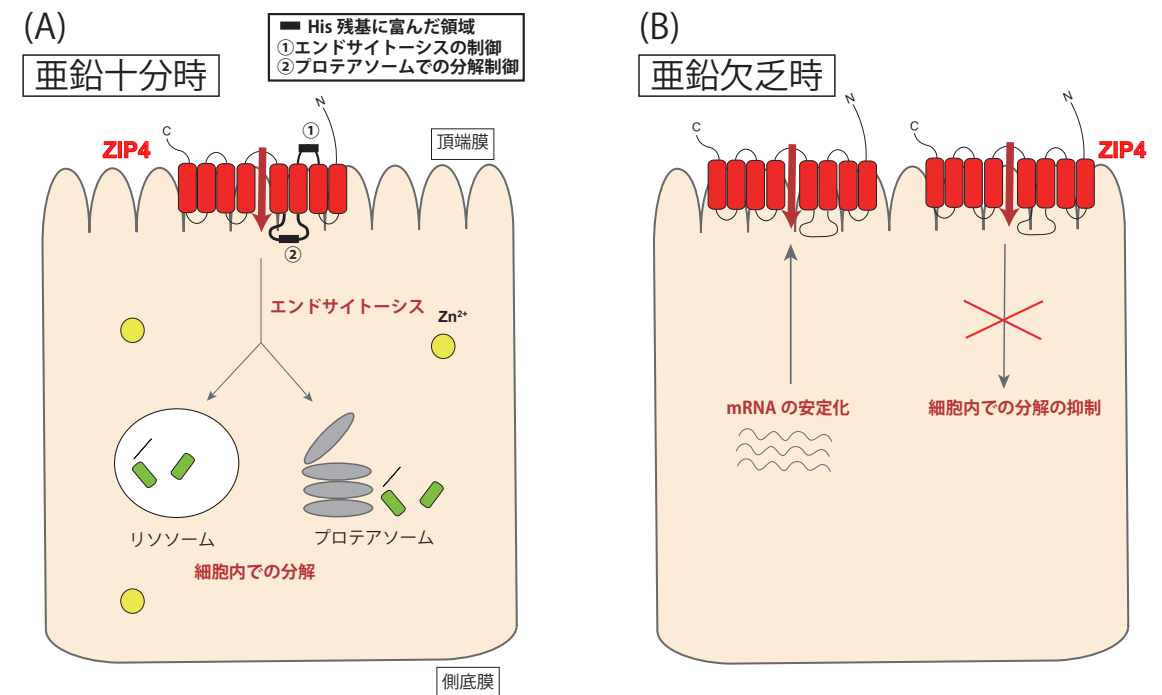


図 1 亜鉛吸収に関わる ZIP4 の発現および局在の制御機構

(A) 亜鉛十分時における ZIP4 の発現と局在の制御

亜鉛十分時には、ZIP4 は細胞膜表面から細胞内へエンドサイトーシスされて、プロテアソームまたはリソソーム経路によって分解される。エンドサイトーシスの制御においては ZIP4 における細胞外の His に富んだループ領域が、ユビキチン化を介した分解制御には細胞内の His に富んだループ領域が重要である可能性が示唆されている。

(B) 亜鉛欠乏時における ZIP4 の発現と局在の制御

亜鉛欠乏時には、ZIP4 の mRNA の安定化や細胞内での分解抑制によって、頂端膜上での ZIP4 の発現が上昇する。

る<sup>21-23)</sup>。これまでに、消化管特異的に ZNT1 を欠損させたマウスは作出されておらず、哺乳類における ZNT1 の亜鉛吸収に対する機能の詳細は未解明である。一方で、消化管特異的に ZNT1 を欠損させたショウジョウバエにおいては、血液中への亜鉛放出が抑制され、このフェノタイプはヒトの ZNT1 を再発現させると回復するため、哺乳類での亜鉛吸収過程においても ZNT1 が必須の機能を持つことが想定される<sup>24)</sup>。

これまで、ZNT1 の発現調節については、転写レベルでの制御のみが明らかにされていた<sup>10)</sup>。細胞内においては、亜鉛応答のマスターレギュレーターとして働く転写因子 MTF1 が、亜鉛レベルの増加に伴い核内へ移行し、標的因子の MTF1 結合配列 (MRE: metal response

element) に結合する<sup>25)</sup>。ZNT1 はプロモーター領域に MRE 配列を有するため、亜鉛上昇時には ZNT1 の転写活性が促進される<sup>10)</sup>。ZNT1 のタンパク質レベルでの発現制御機構については長らく不明であったが、先日、我々のグループでは、ZNT1 も ZIP4 同様に亜鉛依存的な発現や局在の応答を示すことを見出した<sup>26)</sup> (図 2)。

亜鉛十分時、ZNT1 は MTF1 を介した転写レベルでの発現誘導に加えて、積極的に細胞膜表面での発現を上昇させる。この応答により、ZNT1 は亜鉛十分時に速やかに細胞膜表面での発現を上昇させ、より効率的に細胞外 (血液中) へ亜鉛を放出する機構に働くことが考えられる。一方、亜鉛欠乏時には、ZNT1 は細胞膜表面から細胞内へエンドサイトーシスされ取り込まれた後、リソソ-

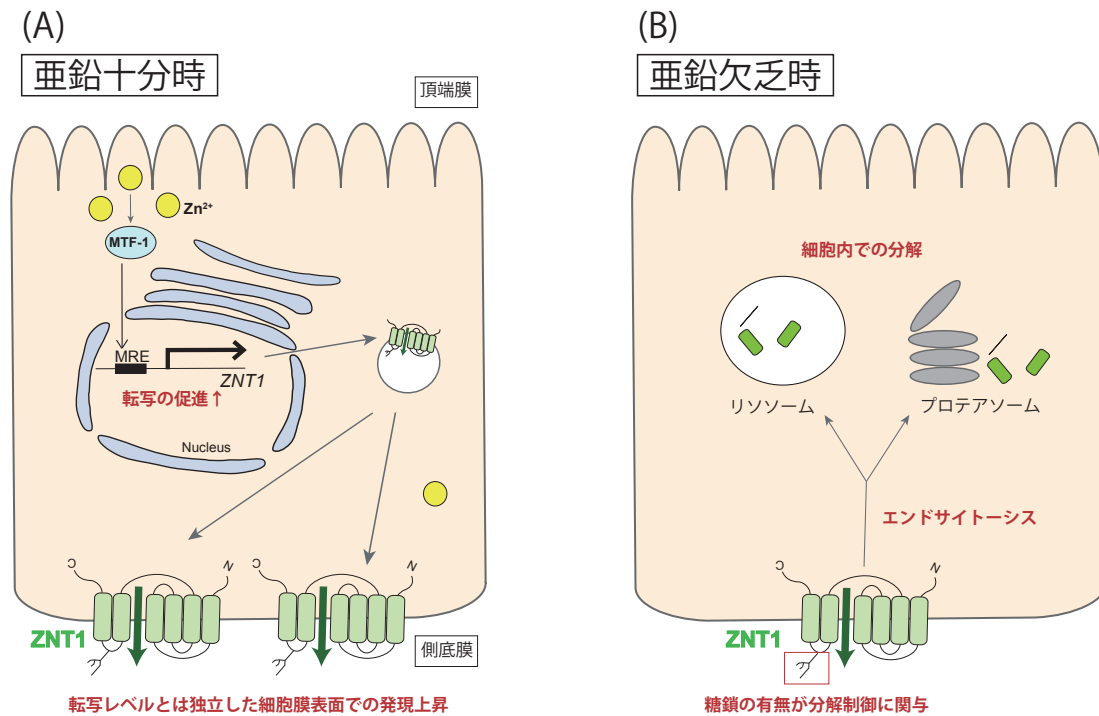


図2 亜鉛の排出に関わる ZNT1 の発現および局在の制御機構

(A) 亜鉛十分時における ZNT1 の発現と局在の制御

亜鉛十分時には、ZNT1 は MTF1 を介した転写レベルでの発現誘導に加えて、タンパク質レベルで細胞膜表面における発現を上昇させる。

(B) 亜鉛欠乏時における ZNT1 の発現と局在の制御

亜鉛欠乏時には、ZNT1 は細胞膜表面から細胞内へエンドサイトーシスされて、プロテアソームまたはリソソーム経路によって分解される。この制御においては、ZNT1 の細胞外ループ領域に修飾された糖鎖が重要な役割を果たすことが示唆される。

ムやユビキチンプロテアソーム経路を介して細胞内で分解される。興味深いことに、この制御には ZNT1 の細胞外ループ領域に修飾される糖鎖が重要な役割を果たすことが示唆されており、糖鎖修飾されない ZNT1 変異体では、細胞膜表面での ZNT1 タンパク質の安定性が劇的に増大する。

ZNT1 の細胞外ループ領域における糖鎖付加部位は脊椎動物において広く保存されている一方で、他の ZNT では認められない。したがって、ZNT1 における糖鎖修飾は脊椎動物において重要かつ特有の機能を有している可能性が高く、その詳細を解明することが、今後、重要となる。また、消化管上皮細胞の側底膜側に局在する ZNT1 にも糖鎖が修飾されていることを認めており、消化管からの亜鉛の排出制御においても糖鎖を介した

ZNT1 の亜鉛依存的な発現や局在の応答が重要な意味をもつ可能性も考えられる。ZNT1 は、細胞膜表面に唯一局在する ZNT であるため、その亜鉛依存的な発現や局在の制御のメカニズムをより詳細に解明していくことで、消化管からの亜鉛吸収機構の全容解明や生体内の亜鉛代謝維持機構についての更なる理解に繋がるであろう。

## おわりに

本稿では、消化管で機能する亜鉛輸送体について、その発現および局在の制御機構に着目し概説した。頂端膜に局在する ZIP4 と側底膜に局在する ZNT1 の発現と局在は亜鉛状態に応じて非常に厳密に制御されることを示したが、亜鉛代謝維

持のために両輸送体の発現が相互的に制御されるのは非常に興味深い。この制御により、例えば、亜鉛欠乏時には、頂端膜での ZIP4 の発現上昇を介して、上皮細胞内へ亜鉛が取り込まれ、結果、亜鉛濃度が上昇し、これに付随して側底膜での ZNT1 の発現が上昇することで、血液中への亜鉛放出が促進される機構の存在などを想定することができる。

一方で、この制御の分子機序については未解明

## ◆文献

- 1) T. Kambe, T. Tsuji, A. Hashimoto, and N. Itsumura : The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism, *Physiological Reviews*, vol. 95, no. 3, : 749-784, 2015
- 2) T. Hara, T. aki Takeda, T. Takagishi, et al : Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis, *Journal of Physiological Sciences*, vol. 67, no. 2 : 283-301, 2017
- 3) C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, and A. Rosato : Counting the zinc-proteins encoded in the human genome, *Journal of Proteome Research*, vol. 5, no.1 : 196-201, 2006
- 4) W. Maret and Y. Li : Coordination dynamics of zinc in proteins, *Chemical Reviews*, vol. 109, no.10 : 4682-4707, 2009
- 5) A. S. Prasad : Clinical Manifestations of Zinc Deficiency, *Annual Review of Nutrition*, vol. 26, no 2 : 167-172, 1985
- 6) M. Hambidge : Human zinc deficiency., *The Journal of nutrition*, vol. 130, no. 5S Suppl : 1344S-1349S, 2000
- 7) B. P. Weaver, J. Dufner-Beattie, T. Kambe, and G. K. Andrews : Novel zinc-responsive post-transcriptional mechanisms reciprocally regulate expression of the mouse Slc39a4 and Slc39a5 zinc transporters (*Zip4* and *Zip5*), *Biological Chemistry*, vol. 388, no. 12 : 1301-1312, 2007
- 8) A. Hashimoto, et al : Properties of *Zip4* accumulation during zinc deficiency and its usefulness to evaluate zinc status: a study of the

であり、今後の研究で明らかにされていくことが重要と考える。また、消化管以外の様々な組織においても、同様の制御機構が存在することが予想される。今後、各組織での亜鉛輸送体の発現の相関性についての詳細な解析を通じて、生体内の亜鉛代謝制御機構について新たな知見を得ることで、亜鉛代謝が関与する疾病の予防や治療に役立つ情報が蓄積されていくことを期待したい。

- 9) A. Hashimoto and T. Kambe : Mg, Zn and Cu Transport Proteins: A Brief Overview from Physiological and Molecular Perspectives, *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, vol. 61 : S116-S118, 2015
- 10) S. J. Langmade, R. Ravindra, P. J. Daniels, and G. K. Andrews : The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse *ZnT1* gene, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 44 : 34803-34809, 2000
- 11) K. Wang, B. Zhou, Y.-M. Kuo, J. Zemansky, and J. Gitschier : A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica., *American journal of human genetics*, vol. 71, no. 1 : 66-73, 2002
- 12) S. Küry, et al : Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica., *Nature genetics*, vol. 31, no. 3 : 239-240, 2002
- 13) J. Geiser, R. C. de Lisle, D. Finkelstein, et al : Clotiquinol Synergistically Augments Rescue by Zinc Supplementation in a Mouse Model of Acrodermatitis Enteropathica, *PLoS ONE*, vol. 8, no 8 : 2013
- 14) J. Geiser, K. J. T. Venken, R. C. de Lisle, and G. K. Andrews : A mouse model of acrodermatitis enteropathica: Loss of intestine zinc transporter ZIP4 (*Slc39a4*) disrupts the stem cell niche and intestine integrity, *PLoS Genetics*, vol. 8, no. 6 : 2012

- 15) B. E. Kim, F. Wang, J. Dufner-Beattie, et al : Zn<sup>2+</sup>-stimulated Endocytosis of the mZIP4 Zinc Transporter Regulates Its Location at the Plasma Membrane, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 6 : 4523-4530, 2004
- 16) X. Mao, B. E. Kim, F. Wang, et al : A histidine-rich cluster mediates the ubiquitination and degradation of the human zinc transporter, hZIP4, and protects against zinc cytotoxicity, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 10 : 6992-7000, 2007
- 17) J. Dufner-Beattie, Y. M. Kuo, J. Gitschier, and G. K. Andrews : The adaptive response to dietary zinc in mice involves the differential cellular localization and zinc regulation of the zinc transporters ZIP4 and ZIP5, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 47 : 49082-49090, 2004
- 18) T. Kambe and G. K. Andrews : Novel Proteolytic Processing of the Ectodomain of the Zinc Transporter ZIP4 (SLC39A4) during Zinc Deficiency Is Inhibited by Acrodermatitis Enteropathica Mutations, *Molecular and Cellular Biology*, vol. 29, no 1 : 129-139, 2009
- 19) H. Chun, et al : Extracellular zinc sensor motif in ZIP4 endocytosis 1 An extracellular histidine-containing motif in the zinc transporter ZIP4 plays a role in zinc sensing and zinc-induced endocytosis in mammalian cells : 1-21, 2018
- 20) F. Wang, B. E. Kim, J. Dufner-Beattie, et al : Acrodermatitis enteropathica mutations affect transport activity, localization and zinc-responsive trafficking of the mouse ZIP4 zinc transporter, *Human Molecular Genetics*, vol. 13, no 5 : 563-571, 2004
- 21) R. D. Palmiter and S. D. Findley : Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc., *The EMBO journal*, vol. 14, no 4 : 639-649, 1995
- 22) R. J. Cousins, J. P. Liuzzi, and L. A. Lichten : Mammalian Zinc Transport, Trafficking, and Signals, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no 34 : 24085-24089, 2006
- 23) Y. Y. Yu, C. P. Kirschke, and L. Huang : Immunohistochemical analysis of ZnT1, 4, 5, 6, and 7 in the mouse gastrointestinal tract, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 55, no 3 : 223-234, 2007
- 24) X. Wang, Y. Wu, and B. Zhou : Dietary zinc absorption is mediated by ZnT1 in *Drosophila melanogaster*., *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 23, no. 8 : 2650-2661, 2009
- 25) Y. Li, T. Kimura, R. W. Huyck, et al : Zinc-Induced Formation of a Coactivator Complex Containing the Zinc-Sensing Transcription Factor MTF-1, p300/CBP, and Sp1, *Molecular and Cellular Biology*, vol. 28, no13 : 4275-4284, 2008
- 26) Y. Nishito, T. Kambe : Zinc transporter 1 (ZNT1) expression on the cell surface is elaborately controlled by cellular zinc levels, *Journal of Biological Chemistry*, doi: 10.1074/jbc.RA119.010227, 2019, in Press,

## Mechanisms underlying the regulated expression and subcellular localization of zinc transporters involved in the maintenance of zinc homeostasi

Yukina Nishito<sup>1,2)</sup>, Taiho Kambe<sup>1)</sup>

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

2) Department of Analytical & Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University, Kyoto, Japan

Zinc is an essential trace element in the human body. It plays a vital role as a structural and catalytic component in numerous cellular proteins. Thus, its deficiency results in various disorders and a myriad of pathophysiological symptoms. Systemic and cellular zinc homeostasis is maintained by many zinc transport proteins, which facilitate influx or efflux of zinc across the biological membrane. Analyses of mice with knocked out zinc transport proteins and their functional characterization in cell cultures have revealed their importance and involvement in manifesting pathophysiological symptoms in human patients. In addition, recent studies also revealed that the regulated expression and subcellular localization of specific zinc transporters are crucial for maintaining zinc homeostasis. Gastrointestinal absorption of zinc is a key step to control systemic zinc homeostasis by delivering zinc to the target tissues. Zinc transport across the biological membrane is a two-step process, involving its uptake from the intestinal lumen across the apical membrane of intestinal epithelial cells and its excretion to the portal blood across the basolateral membrane. Thus, zinc transporters expressed in the enterocytes are equipped with sophisticated regulatory mechanisms. ZIP4 is localized to the apical membrane for absorbing zinc, and ZNT1 is localized to the basolateral membrane for releasing zinc to the portal blood. In this review, we summarize the current progress toward understanding the roles of ZIP4 and ZNT1 in zinc homeostasis, with a focus on their regulated expression and subcellular localization in response to the levels of zinc in the cellular environment.

Keyword : Zinc, transporter, Zinc homeostasis, intestinal epithelial cell

Address for correspondence

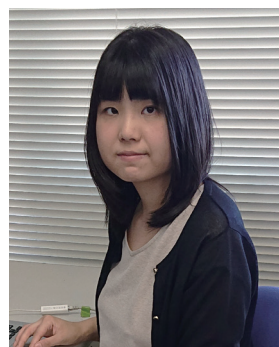
Kitashirakawa-Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

Phone : 075-753-6273

Fax : 075-753-6274

E-mail address

kambe1@kais.kyoto-u.ac.jp



### ◆西藤有希奈略歴

2013 年	同志社大学生命医科学部医生命システム学科卒業
2015 年	京都大学大学院生命科学研究科博士前期課程修了
2017 年	京都大学大学院生命科学研究科 日本学術振興会特別研究員 DC2
2018 年	京都大学大学院生命科学研究科博士後期課程修了 博士 (生命科学)
2019 年	京都薬科大学 日本学術振興会特別研究員 PD