

アルカリホスファターゼの活性化には亜鉛トランスポーターが重要な役割を果たす

森野菜穂 ● 神戸大朋 ●

● 京都大学大学院生命科学研究所

要約

アルカリホスファターゼ (ALP) は、臨床的に非常に馴染み深い酵素の一つであり、健康診断の検査所見としても測定される。また、近年の研究では、ALPの活性が様々な炎症性疾患に関与することが報告されており、ALPの機能が改めて注目を集めている。一方で、ALPが如何に活性化し、生理機能を獲得するのにかについては、これまでほとんど明らかにされてこなかった。ALPは、正常な機能を持つために活性部位への亜鉛の配位が必要な、亜鉛要求性酵素の一つである。すなわち、ALPが正常に生理機能を果たすには亜鉛の獲得が不可欠であり、その機序を明らかにすることが重要である。本稿では、臨床的視点から見たALPと、分子生物学的視点から見た亜鉛要求性酵素としてのALPについて概説したのち、筆者らの研究グループが最近発表した、ALPの詳細な活性化機構およびALPをはじめとした亜鉛要求性酵素と各種疾患との関連性について紹介する。

KEY WORDS

アルカリホスファターゼ (ALP)、亜鉛トランスポーター、ZNT、初期分泌経路、亜鉛酵素

1 はじめに

アルカリホスファターゼ (ALP) は、リン酸モノエステルを加水分解する活性を持つ酵素である¹⁾。先天的な骨形成異常をきたす低ホスファターゼ症の患者において、骨組織に発現するALP遺伝子の変異がみとめられることが報告されており、骨の石灰化に重要な役割を果たす酵素として知られる²⁾。ALPは広い基質特異性を持ち、生体内での痛みや炎症などにおいても重要な役割を果たしていることが近年明らかになってきた。酵素活性測定が比較的容易であることから、血清ALP値は、健康診断の検査所見の一つとして定められており、肝臓や骨組織の障害、がん、亜鉛欠乏など様々な疾患の診断に用いられる、臨床的に馴染み深い酵素の一つである。本稿では、ALPが亜鉛を獲得し

て活性化し、生理機能を果たすまでの分子機序について概観する。

2 臨床的視点から見た ALP

臨床的にALPは、ALP1型～ALP6型の6種類に分類される。組織ごとに発現しているALPの型が異なり、病態によって血清中に検出されるALPの型が変化する。具体的には、胆道障害ではALP1型が、肝硬変ではALP5型が上昇することなどが知られており、その他にも骨組織障害やがんなどの診断に一般的に用いられている³⁾。

一方で、ヒトゲノムにコードされているALPは、組織非特異型ALP (TNAP)、胎盤型ALP (PLAP)、生殖細胞型ALP (GCAP)、小腸型ALP (IAP) の4種類のみである。このうちPLAP・

GCAP・IAPは非常に相同性が高く、熱安定性などにおいてTNAPとは若干異なる性質を持つことが知られる(図1)。また、臨床的に使用されることの多い肝型・骨型・腎型のALPは、全てTNAP遺伝子によってコードされている⁴⁾。4種類の遺伝子から臨床的に分類される6種類のALPが生じるわけであるが、これらの違いは、糖鎖修飾などの翻訳後修飾により生じる。ALPには少なくとも三つのN-結合型糖鎖が結合することが知られ⁵⁾、実際に、一部のALPでは、肝硬変やがん化に伴って糖鎖の修飾パターンが変化することも報告されている⁶⁾。

また、血清中に分泌されたALPの活性は、亜鉛欠乏患者において顕著に低下することが知られており、日本臨床栄養学会による「亜鉛欠乏症の診療指針」では、「血清アルカリホスファターゼ(ALP)低値」が、亜鉛欠乏症の検査所見として定められている⁷⁾。

広い基質特異性を持つALPは、生体内において様々な生理現象に関与しているため、多くの疾患の発症に関与する可能性を持つ。実際、近年の研究では、ALPの活性が炎症性腸疾患(IBD)や原発性胆汁性胆管炎(PBC)などの炎症性疾患に関与することが報告されており、ALPの機能が改めて注目されている^{8~10)}。

3 分子生物学的視点から見た、亜鉛要求性酵素ALPの特徴

ALPは、リン酸モノエステルを加水分解する活性を持つ酵素である。二量体を形成し、カルボキシ末端に付加されたGPIアンカーを介して細胞膜に結合して機能する。一方で、GPIアンカーが付加されていないALP、あるいはGPIアンカーが切断された一部のALPは、血中に分泌される。また、X線結晶構造の解析から、ALPの活性中心に2

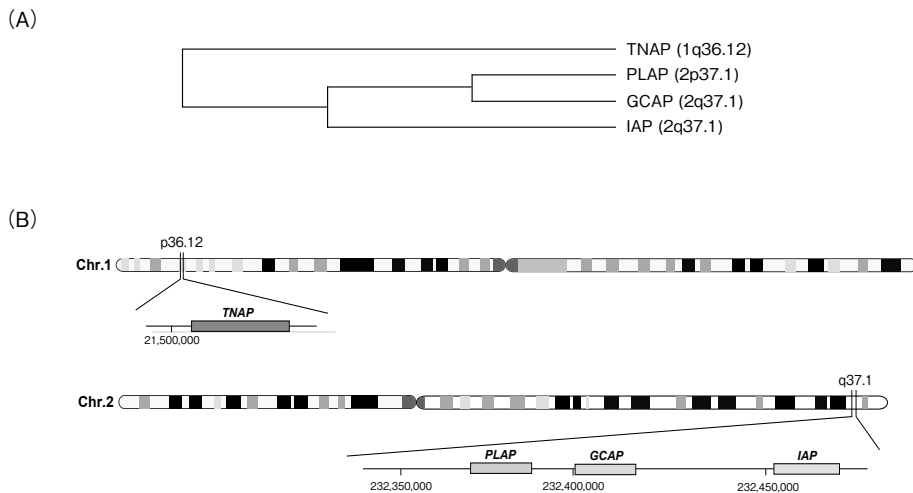


図1 各ALPの相同性

(A) ヒトにおける組織非特異型ALP(TNAP)、胎盤型ALP(PLAP)、生殖細胞型ALP(GCAP)、小腸型ALP(IAP)の相同性
 (B) TNAP遺伝子は一番染色体に、PLAP遺伝子、GCAP遺伝子、IAP遺伝子は二番染色体に位置している。

→ 68 ページにカラー掲載

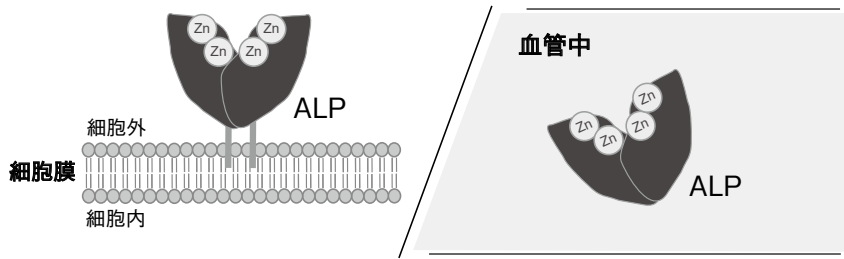


図2 ALPの構造

ALPは二量体を形成し、カルボキシ末端に付加されたGPIアンカーを介して細胞膜に結合して機能する。一方で、GPIが付加されていないALP、もしくはGPIアンカーが切断された一部のALPは、血中に存在する。活性中心には2個の亜鉛イオンと1個のマグネシウムイオンを配位している（図ではマグネシウムイオンは省略）。

個の亜鉛イオンと1個のマグネシウムイオンを配位していることが明らかにされている^{11,12)}（図2）。亜鉛欠乏症の診断基準の検査所見の一つに血清ALP値低下があげられているように、ALPが正常に酵素活性を保つには、この活性中心への亜鉛の配位が必須となる。

では如何にしてALPは亜鉛を獲得するのだろうか？この分子機序については、これまでほとんど明らかにされてこなかった。一般的に、ALPのような細胞膜上や細胞外で機能するエクト型酵素は、細胞内の小胞体で生合成されゴルジ体で修飾を受け、細胞膜上や細胞外まで輸送される。したがって、この活性化過程のどのタイミングで亜鉛を獲得するのかを明確にすることが重要となる。筆者らの研究グループでは、小胞体やゴルジ体（以下、初期分泌経路と呼ぶ）に局在する亜鉛トランスポーターに焦点を当て、その機序の解明を目指した研究を長年実施してきた。

4 ALPの活性化に関わる亜鉛トランスポーター

食事に含まれる亜鉛は、消化管で吸収されたのち、各組織の細胞に輸送される。さらに、細胞内に取り

込まれた亜鉛の一部は、小胞体やリソソームといった細胞小器官内腔に輸送される。亜鉛イオンは生体膜を自由に通過することができないため、細胞膜や細胞小器官膜を介した移動には、特異的な輸送体タンパク質が必要となる。これを担うのが亜鉛トランスポーターである。真核細胞では、亜鉛トランスポーターはアミノ酸配列の相同性および輸送方向の観点から、ZIP (Zrt, Irt-like protein) ファミリーとZNT (Zn transporter) ファミリーに大別される。ZIPファミリーは細胞外もしくは細胞小器官内の亜鉛を細胞質へと輸送する。一方でZNTファミリーは、細胞質の亜鉛を細胞外もしくは細胞小器官内へと輸送する。後述する初期分泌経路における亜鉛輸送について考えた場合、ZIPファミリーは初期分泌経路内の亜鉛量を減少させる方向に働き、ZNTファミリーは増加させる方向に働くことになる。ヒトでは、ZIPファミリーについては、ZIP1~ZIP14の14種類が、ZNTファミリーについてはZNT1~ZNT8およびZNT10の9種類が同定されている¹³⁾。

これら多数の亜鉛トランスポーターからALPの活性化に関わる亜鉛トランスポーターを同定するため、著者らの研究グループは、ニワトリDT40細胞を用いた解析系を使用して知見を集めてきた。

DT40細胞は、遺伝子欠損株の作成が容易である上、ALPのモデルとして用いたTNAPの発現量が高く、さらにヒト細胞で初期分泌経路に局在するとされる亜鉛トランスポーターを全て発現するなど、解析を進める上で都合の良い条件が揃っていたためである。様々な亜鉛トランスポーターについて欠損株を作成し、網羅的に解析を行った結果、ALPの活性化に直接関わるものは、20種類以上存在する亜鉛トランスポーターのうち、ZNT5, ZNT6, ZNT7の3つのみであった^{14,15)}。また、ZNT5とZNT6は、ZNT5-ZNT6ヘテロ複合体を形成すること、およびZNT7はZNT7ホモ複合体で機能することも明らかにしており¹⁶⁾、その後の解析結果を考え合わせ、現在では、ZNT5-ZNT6ヘテロ複合体とZNT7ホモ複合体の二つの複合体（以下、両ZNT複合体）が全てのALPの活性化に必要な不可欠であると考えられている。

両ZNT複合体の機能を消失させた細胞（以下、両ZNT複合体欠損細胞）では、ALPは活性を消失するのみならず、安定に発現することができない。すなわち、細胞膜上に輸送される前の段階で、ALPタンパク質が細胞内の分解経路において速やかに分解され、その発現が消失する。そのため、これまで両ZNT複合体欠損細胞を用いた実験系において、実際に両ZNT複合体がALPに亜鉛を供給することを、分子レベルでは明確に示すことができていない状況にあった。しかしながら最近細胞外に多量に分泌されるように遺伝子操作した分泌型PLAPを利用することで、両ZNT複合体欠損細胞においても分泌型PLAPを安定的に発現させることに成功した。これを利用し、野生型細胞で産生された分泌型PLAPと比較して、両ZNT複合体欠損細胞で産生された分泌型PLAPでは、亜鉛含有量が顕著に低下していることを明らかにし、実際に両ZNT複合体がALPに亜鉛を供給していることを実証した¹⁷⁾。

両ZNT複合体欠損細胞に、欠損させたZNTを再発現すると、消失したALPの発現と活性が回復する。一方で、亜鉛輸送活性を持たない変異体ZNTを発現させても、ALPの発現と活性は回復しない。また、両ZNT複合体欠損細胞に大過剰の

亜鉛を添加しても、ALPの活性や発現を回復させることはできない¹⁷⁾。以上の解析結果から、初期分泌経路において両ZNT複合体によって供給された亜鉛がALPの活性中心に配位し、その結果、最終的に細胞膜などに輸送されたALPが生理機能を果たすという活性化機構が考えられる（図3）。

ニワトリ細胞でみとめられたALPの活性化の両ZNT複合体依存性は、ヒト細胞においてもみとめられる。すなわち、ヒト細胞においても、両ZNT複合体を欠損させるとALPは活性化されず、その発現も消失する。哺乳類を含む後生動物の多くはZNT5やZNT6, ZNT7を発現する上、TNAP遺伝子を持っていることから、両ZNT複合体によるALPの活性化の機序は後生動物で保存されていることが示唆される。興味深いことに、線虫や植物ではZNT5およびZNT6のオーソログのみが、ショウジョウバエではZNT7のオーソログのみが発現することが知られる。ニワトリDT40細胞を用いた解析系において、両ZNT複合体欠損細胞に線虫や植物のオーソログを発現させると、ALPの発現および活性は回復する^{17,18)}。したがって、両ZNT複合体の機能は、あらゆる生物種において広く保持されていると予想される（図4）。

5 亜鉛要求性酵素と疾患

ヒトの体内で発現するタンパク質の約10%、すなわち3000種以上のタンパク質が亜鉛と結合すると試算されている¹⁹⁾。その中で亜鉛要求性酵素は約500種類存在するとされ¹³⁾、ALP以外にも多数のエクト型亜鉛要求性酵素が、細胞膜や細胞外で機能している。これらの中には疾患と密接に関わる酵素が多数存在しており、著者らの研究グループでは上述のDT40細胞を駆使した解析系を用いて、様々なエクト型亜鉛要求性酵素について、その活性制御や生理機能について解析を行っている。最後にこれらの研究成果の一部を紹介したい。

亜鉛欠乏によって引き起こされる主な病態の一つである過度な炎症反応には、細胞外ATP代謝が密接に関与することが知られる。ATPは細胞

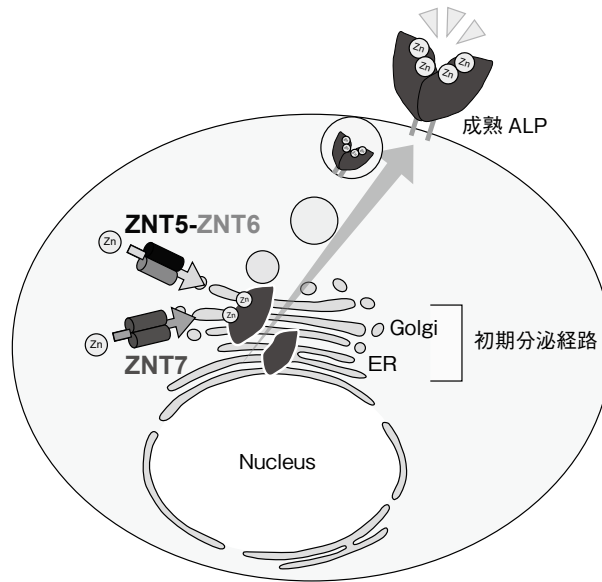


図3 ALPの活性化機構

ALPは初期分泌経路において、ZNT5-ZNT6ヘテロ複合体およびZNT7ホモ複合体（両ZNT複合体）によって供給された亜鉛を、その活性部位に配位する。その後、最終的に細胞膜などに輸送されて生理機能を果たす。

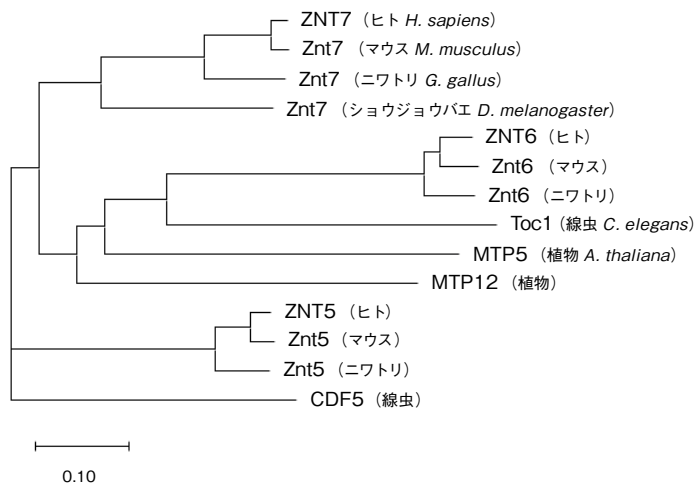


図4 ZNT5, ZNT6, ZNT7の相同性

ヒト、マウス、ニワトリ、ショウジョウバエ、線虫、植物のZNT5, ZNT6, ZNT7のオーソログの相同性。ZNT5およびZNT6のオーソログは、線虫ではそれぞれCDF5およびTOC1、植物ではそれぞれMtp12およびMtp5と命名されている。

が刺激を受けることによって細胞外に放出され、複数の酵素の働きによりADP, AMPを経て最終的にアデノシンにまで加水分解される。ATPとADPはP2受容体を介して炎症を促進するシグナルを伝達するが、アデノシンはP1受容体を介して炎症を抑制するシグナルを伝える²⁰⁾。すなわち、細胞外ATPの加水分解反応が進むと炎症が抑制される方向に傾き、この反応が遅延すると炎症が促進される方向に傾く。これらの加水分解反応を触媒する酵素の一つがALPであり、他にもCD73やENPPなどの複数の亜鉛要求性酵素がこの反応に関与することが知られる^{21, 22)}。このことから「亜鉛欠乏→ALP等の亜鉛要求性酵素の活性化が抑制されて生理活性が低下→細胞外ATP代謝が遅延→炎症」というメカニズムによって、亜鉛欠乏症の症例に多く見られる「炎症」が引き起こされる可能性が考えられる²³⁾(図5)。興味深いことに、CD73はALPと同様、その正常な発現や活性の獲得に両ZNT複合体を必要とすることが明らかになっている。一方でENPPについては、両ZNT複合体欠損細胞においてその発現や活性に顕著な変化は観察されなかった。すなわち、ENPPは両

ZNT複合体以外の何らかの経路から亜鉛を獲得していると考えられる²³⁾。

また、がんの悪性化についても、MMP9やCAIXをはじめ、複数の亜鉛要求性酵素が関与していることが知られる。これらについても同様の解析を行ったところ、MMP9ではALPと同様に両ZNT複合体に依存した活性化機構を持つことが明らかになった一方で、CAIXにおいては、両ZNT複合体以外の何らかの経路から亜鉛を獲得していることを示唆する結果を得ている²⁴⁾。

現在、著者らの研究グループでは、その他の亜鉛要求性酵素として、血圧調節に重要なアンジオテンシン転換酵素(ACE)やアンジオテンシン転換酵素2(ACE2)について解析を進めている。特に、ACE2は新型コロナウイルスの受容体としても注目を集めている酵素であり、この酵素が亜鉛をどのように獲得して、細胞表面に輸送されて機能するのかについては、非常に興味を持たれる。

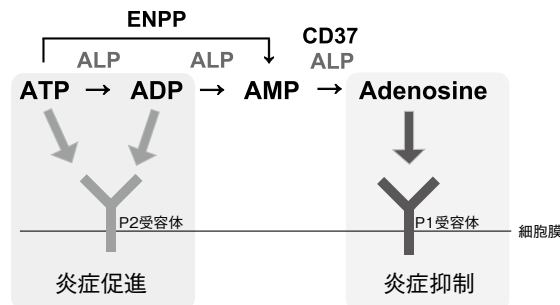


図5 細胞外ATP代謝とエクソ型亜鉛要求性酵素

細胞外ATP代謝に重要な役割を果たす亜鉛要求性酵素として、ALP, ENPP, CD73の三種類が存在する。これらの亜鉛要求性酵素は、細胞外ATPから細胞外アデノシンが産生されるまでの一連の加水分解反応を触媒する。ATPおよびADPはP2受容体を活性化し、炎症を促進するシグナルを伝達する。一方、アデノシンはP1受容体を活性化し、炎症を抑制するシグナルを伝達する。

6 おわりに

本稿では、臨床的に多く利用されるALPの活性化機構について、初期分泌経路に局在する亜鉛トランスポーター、ZNT5-ZNT6ヘテロ複合体およびZNT7複合体に着目した解析結果を踏まえて概説した。今回モデルとして用いたALPの他にも、生体内には非常に多くの亜鉛要求性酵素が存在している。上述の通り、これらの酵素の中には

ALPと同様に両ZNT複合体に依存した活性化機構を持つものが一定数存在する一方で、ALPとは異なった挙動を示す酵素も複数見つかっている。生体内に数多く存在する亜鉛要求性酵素の挙動について明確に理解するためには、更なる詳細な解析が求められるだろう。ALPの活性化機構の解析で得られた知見は、様々な生理現象において、それぞれに重要な役割を果たす亜鉛要求性酵素の役割を深く理解するための第一歩となると考えている。

文 献

- 1) Millán, J.L. Alkaline phosphatases. *Purinergic Signal.* 2: 335-341, 2006
- 2) Whyte, MP. Hypophosphatasia: aetiology, nosology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat. Rev. Endocrinol.* 12: 233-246, 2016
- 3) 菅野剛史. アインザイム分析結果の表現法の統一は臨床医のために可能としたい. *生物試料分析* 29: 285-300, 2006
- 4) Harris H. The human alkaline phosphatases: What we know and what we don't know. *Clin. Chim. Acta* 186: 133-150, 1990
- 5) Shibata H, et al. Defective intracellular transport of tissue-nonspecific alkaline phosphatase with an Ala162→Thr mutation associated with lethal hypophosphatasia. *J. Biochem.* 123: 968-977, 1998
- 6) 石田陽子, 小丸圭一, 織田公光. アルカリホスファターゼの構造と機能. *臨床化学* 33, 36-44, 2004
- 7) 日本臨床栄養学会. 亜鉛欠乏症の診療指針 2018, 2018
- 8) Sánchez De Medina F, et al. Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: A novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. *Biochem. Pharmacol.* 68: 2317-2326, 2004
- 9) Stanich PP, et al. Alkaline phosphatase normalization is associated with better prognosis in primary sclerosing cholangitis. *Dig. Liver Dis* 43: 309-313, 2011
- 10) Lindström L, et al. Association between reduced levels of alkaline phosphatase and survival times of patients with primary sclerosing cholangitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 11: 841-846, 2013
- 11) Ghosh K, et al. Crystal structure of rat intestinal alkaline phosphatase: Role of crown domain in mammalian alkaline phosphatases. *J. Struct. Biol.* 184: 182-192, 2013
- 12) Micanovic R, et al. Aspartic acid-484 of nascent placental alkaline phosphatase condenses with a phosphatidylinositol glycan to become the carboxyl terminus of the mature enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85: 1398-402, 1988
- 13) Kambe T, et al. The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiol. Rev.* 95: 749-784, 2015
- 14) Suzuki T, et al. 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, 2005
- 15) Suzuki T, et al. 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, 2005

- 16) Fukunaka A, et al. Demonstration and characterization of the heterodimerization of ZnT5 and ZnT6 in the early secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 284: 30798-30806, 2009
- 17) Suzuki E, et al. Detailed analyses of the crucial functions of Zn transporter proteins in alkaline phosphatase activation. *J. Biol. Chem.* 295: 5669-5684, 2020
- 18) Fujimoto S, et al. The PP-motif in luminal loop 2 of ZnT transporters plays a pivotal role in TNAP activation. *Biochem. J.* 473: 2611-2621, 2016
- 19) Andreini C, Bertini I. A bioinformatics view of zinc enzymes. *J. Inorg. Biochem.* 111: 150-156, 2012
- 20) Antonioli L, et al. Immunity, inflammation and cancer: A leading role for adenosine. *Nat. Rev. Cancer* 13: 842-857, 2013
- 21) Knapp K, et al. Crystal structure of the human ecto-5'-nucleotidase (CD73): Insights into the regulation of purinergic signaling. *Structure* 20: 2161-2173, 2012
- 22) Kato K, et al. Crystal structure of Enpp1, an extracellular glycoprotein involved in bone mineralization and insulin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 16876-16881, 2012
- 23) Takeda T, aki et al. Zinc deficiency causes delayed ATP clearance and adenosine generation in rats and cell culture models. *Commun. Biol.* 1: 1-13, 2018
- 24) Tsuji T, et al. Dissecting the process of activation of cancer-promoting zinc-requiring ectoenzymes by zinc metalation mediated by ZNT transporters. *J. Biol. Chem.* 292: 2159-2173, 2017

The activation of alkaline phosphatase by Zn transporters: molecular mechanism

Naho Morino, Taiho Kambe

Graduate School of Biostudies, Kyoto University

The activity of serum alkaline phosphatase (ALP) has been used in clinical practice for many years. Recent studies have shown that the hydrolytic activity of ALPs is associated with the pathogenesis of various inflammatory diseases, drawing attention to ALPs. ALPs are well-known zinc-requiring enzymes; however, the molecular mechanism behind their activation, particularly the acquisition of zinc at their active site, was unknown for a long time. Recently, we revealed the molecular process of the activation of ALPs in vitro, using a genetically engineered cell system. In this article, we will review the functions of ALPs from a clinical perspective and the properties of ALPs as zinc-requiring enzymes. We will also discuss the detailed mechanism of zinc-based ALP activation, which is mediated by Zn transporters. Moreover, we will discuss the relationship between zinc-requiring enzymes and various conditions, including inflammatory diseases, through reviewing our recently published results.

Keyword: alkaline phosphatase (ALP), Zn transporter, ZNT, Early Secretory Pathway, Zinc Enzymes

Address for correspondence

Graduate School of Biostudies, Kyoto University

Kyoto 606-8502, Japan.

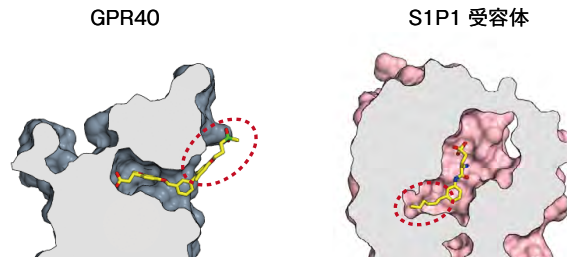
E-mail address: kambe.taiho.7z@kyoto-u.ac.jp



■ 森野菜穂略歴

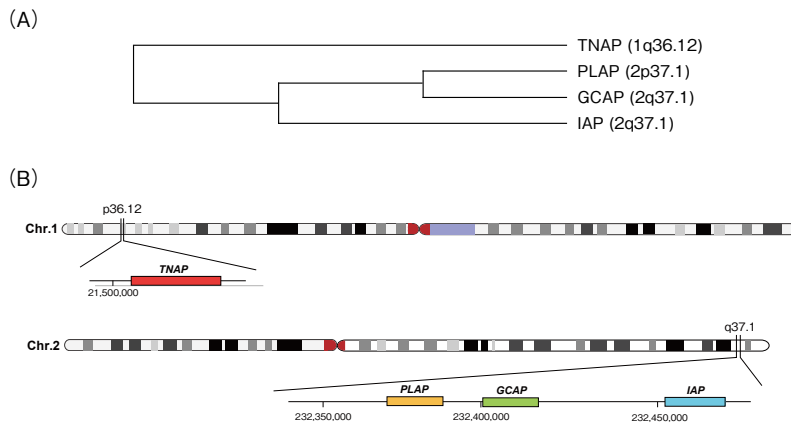
2020年 ● 京都大学農学部食品生物科学科 卒業

2021年 ● 京都大学大学院生命科学研究所
修士課程在学中



(11 ページ掲載) 図6 脂質受容 GPCR で見られる脂質リガンドの配向

GPR40 (右) と S1P1 受容体 (左) に結合したリガンドの脂溶性領域を赤い点線で囲んだ。



(14 ページ掲載) 図1 各 ALP の相同性

(A) ヒトにおける組織非特異型 ALP (TNAP), 胎盤型 ALP (PLAP), 生殖細胞型 ALP (GCAP), 小腸型 ALP (IAP) の相同性

(B) TNAP 遺伝子は一番染色体に, PLAP 遺伝子, GCAP 遺伝子, IAP 遺伝子は二番染色体に位置している。