

研究

亜鉛要求性酵素による細胞外 ATP 代謝の制御

京都大学大学院生命科学研究所 武田貴成 神戸大朋

要約

必須微量元素である亜鉛の欠乏は、皮膚炎や脱毛、貧血や味覚障害など、実に様々な症状を引き起こす。しかし、このような亜鉛欠乏による症状がどのようなメカニズムで引き起こされているのについてはほとんど明らかとなっていない。亜鉛の機能は約 3000 種類存在するとされる亜鉛結合タンパク質を介して発揮されると考えられ、その中には亜鉛を活性中心に持つ酵素（亜鉛要求性酵素）が多数含まれている。本稿ではまず、亜鉛要求性酵素の活性制御、という観点から、亜鉛の生理的機能について概説する。続いて、筆者らが最近発表した、亜鉛栄養と細胞外 ATP 代謝との関連についての研究に関して、初期分泌経路における分泌型亜鉛要求性酵素の活性化の分子機構を交えて紹介する。

KEY WORDS 亜鉛要求性酵素, 亜鉛欠乏症, 細胞外 ATP 代謝, ZNT 複合体, 初期分泌経路

はじめに

亜鉛は体内で鉄に次いで多い必須微量元素であり、成人で約 2 g 存在する。食事中的亜鉛は 30% 程度の効率で十二指腸や空腸から吸収され、腭液への分泌等によって排出される¹⁾。体内で亜鉛を不足させないためには、日々の亜鉛摂取が肝要であり、厚生労働省による食事摂取基準（2015 年度版）では、一日あたり成人男性で 10 mg、成人女性で 8 mg の亜鉛摂取が推奨されており、妊婦や授乳婦にはさらに 2~3 mg が付加量として設定されている。また、亜鉛摂取量の不足に加え、亜鉛キレート作用を持つ成分は、腸管での亜鉛吸収を阻害することによって、亜鉛欠乏を引き起こすことが知られているため、豆類などに含まれるフィチン酸や柑橘類に多く含まれるクエン酸、一部の

食品添加物の過剰摂取には注意が必要である^{2~4)}。

体内で亜鉛が欠乏すると、皮膚炎、脱毛、貧血、味覚障害など、実に様々な症状を呈することが知られるが、これらの症状に関与する亜鉛の機能、言い換えれば亜鉛欠乏症のメカニズムはほとんど明らかとなっていない^{1,5)}。これまでの数多くの解析から、生体内での亜鉛の機能は便宜的に次の三つに分類される。すなわち、① Zn フィンガーモチーフや RING フィンガーモチーフなどのタンパク質の立体構造を保持させる構造因子、②一部の酵素の活性中心として機能し、酵素反応の触媒作用を司る触媒因子、③カルシウムのように濃度勾配の変化によってシグナルを伝達するシグナル因子、の三つである^{1,6)}。いずれも生理的に重要な機能であるが、本稿では特に②の触媒因子として働く亜鉛に注目して、その機能を紹介する。

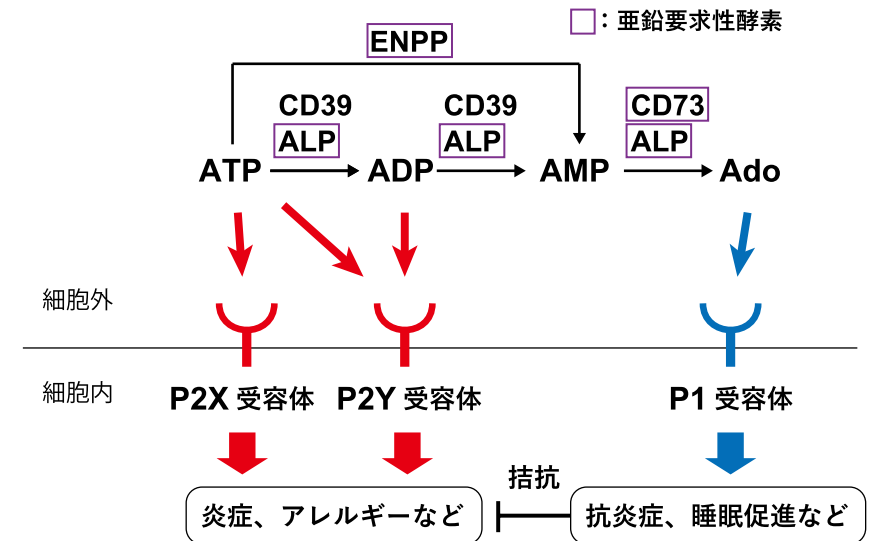


図1 細胞外 ATP 代謝に関わる亜鉛要求性酵素

細胞外 ATP 代謝には、4 種のエクスト型酵素（ALP, CD39, CD73, ENPP）が重要な役割を果たす。ALP, CD73, ENPP の活性は、亜鉛欠乏で大きく低下する。

1. 亜鉛要求性酵素が制御する代謝系

亜鉛を活性中心に持ち亜鉛依存的な活性を示す酵素は亜鉛要求性酵素と呼ばれ、データベースを用いたプロテオーム解析から、ヒト体内では約 1000 種類の酵素が亜鉛と結合すると概算されている^{7,8)}。亜鉛要求性酵素は細胞内外の様々な代謝系に関与しており、生理的にも重要な酵素が数多く含まれている^{7,8)}。例えば、血圧調節に重要なアンジオテンシン変換酵素、増殖や遺伝子発現に必須の DNA ポリメラーゼおよび RNA ポリメラーゼ、細胞の移動や浸潤に機能するマトリックスメタロプロテアーゼなどはいずれも亜鉛要求性酵素である。これら細胞内外で機能する様々な重要酵素の活性制御に関与する事実からは、亜鉛の機能の幅広さと重要性を窺い知ることができ、亜鉛欠乏は、亜鉛要求性酵素の関与する代謝系に大きく影響すると考えられる。このような観点から、筆者らはこれまで、亜鉛要求性酵素の亜鉛獲得機構やその活性制御機構の解明、さらに亜鉛要求性酵素と病態との関係についての研究を進めてきた。

2. 亜鉛と細胞外 ATP 代謝

亜鉛欠乏時には亜鉛要求性酵素の活性が低下し、これらの酵素の関連する代謝系に影響を及ぼすことが考えられるが、この影響は、特に亜鉛要求性酵素の集中する代謝系で顕在化しやすいと考えられる。今回、筆者らは多数の亜鉛要求性酵素が寄与する代謝系である細胞外 ATP 代謝に着目して解析を実施した⁹⁾。この細胞外 ATP 代謝は、炎症などのシグナルと深く関わっており、亜鉛欠乏症の発症とも関連が期待される代謝系である。

ATP は細胞内でのエネルギーの基本通貨としての機能が広く知られているが、接触や酸化ストレス、物理的な損傷などによって容易に細胞外へと放出される。細胞外での ATP は種々の加水分解酵素によってリン酸が加水分解され、ADP, AMP を介してアデノシンとなる (ATP → ADP → AMP → アデノシン)。また一部のアデノシンはこの後も変換酵素によってイノシン、ヒポキサンチンへと代謝される。このような細胞外 ATP 代謝において、ATP と ADP は細胞表面の P2X および P2Y 受容体を活性化し、炎症やアレルギー

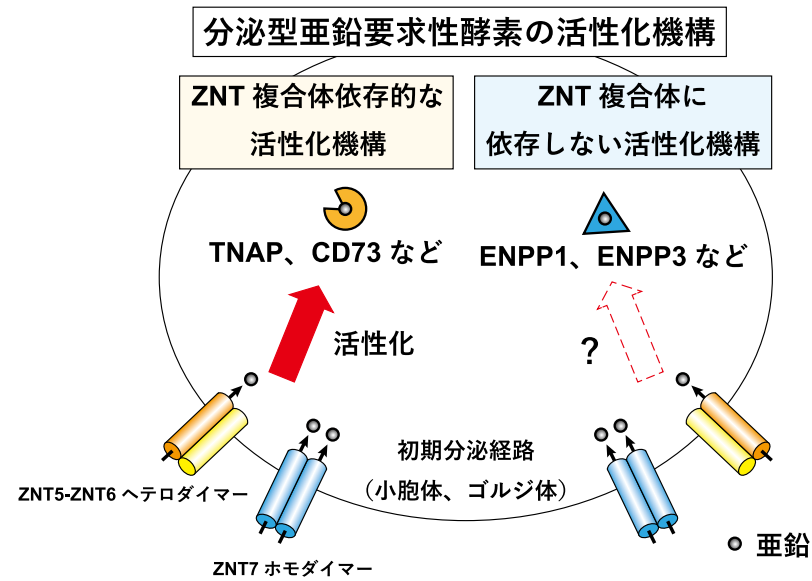


図2 分泌型亜鉛要求性酵素の活性化機構

初期分泌経路で活性化される分泌型亜鉛要求性酵素であっても、酵素の種類によって活性化機構や、亜鉛獲得のタイミングが異なる。TNAPはALPのアイソザイム、ENPP1及びENPP3はENPPのアイソザイムである。

などのシグナルを細胞内へ伝達するが、逆に分解産物であるアデノシンはP1受容体を活性化することでP2XやP2Y受容体に拮抗する抗炎症や睡眠促進などのシグナルを誘発する。そしてこの細胞外でのATP→ADP→AMP→アデノシンの分解に関わる四つの酵素(Alkaline phosphatase (ALP), CD39, CD73, Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (ENPP))のうち、三つ(ALP, CD73, ENPP)が亜鉛を含有する酵素であることが結晶構造などにより明らかとされていた^{10~15)}。すなわち、細胞外ATP代謝に関連する酵素には亜鉛要求性酵素が集中しており、亜鉛欠乏時にはこれらの代謝が弱まり、さらにその影響により炎症などのシグナルが活性化され、亜鉛欠乏症で見られる多様な症状を引き起こしているのではないかと考えられた(図1)。

この仮説を検証するために、筆者らは実際に細胞やラットを亜鉛欠乏状態に陥らせ、細胞中または血漿中の各酵素活性が変化するか解析した。通常の亜鉛状態と比較すると、亜鉛欠乏状態では

ALP, CD73, ENPP活性が顕著に低下することをまず確認し、これら酵素が確かに亜鉛要求性酵素であることを確認した。さらに、ATP加水分解により生じるADP, AMP, アデノシン、及び残存するATPの量を液体クロマトグラフィーを用いて定量した結果、細胞およびラット血漿において、亜鉛欠乏状態では細胞外ATPの分解とアデノシンの産生が著しく弱まっていることを明らかにした。この結果は、亜鉛欠乏が細胞外ATP代謝を減弱させ、P2XやP2Y受容体を介したシグナルが強まる一方、アデノシンによるP1受容体を介したシグナルが弱まることによって亜鉛欠乏症の多様な症状を引き起こすという仮説を支持する⁹⁾。本解析により、これまで細胞外ATP代謝の異常によって引き起こされることが明らかとなっていた種々の症状に亜鉛栄養が大きく関与していることが示唆された⁹⁾。今後は、多様な亜鉛欠乏症の個々の症例において、どの程度細胞外ATP代謝の遅延が影響を及ぼしているのかについて、解明を進めていきたい。

3. 分泌型亜鉛要求性酵素の活性化機構

上述の解析の途上で筆者らは、亜鉛欠乏状態により低下した血漿中の酵素活性は、回収後に十分量の亜鉛を添加しても全く回復しないという興味深い現象を見出した⁹⁾。この結果は、細胞外に分泌されている(=血漿中の)亜鉛が結合していないアポ型酵素は、周囲に遊離している亜鉛イオンを簡単に獲得して活性化することができないことを示唆していた。筆者らの研究グループのこれまでの解析から、多くの分泌型の亜鉛要求性酵素は、小胞体、ゴルジ体などの初期分泌経路において成熟して活性化されており、この活性化過程においては、細胞質から初期分泌経路内に亜鉛を輸送する二つの亜鉛輸送複合体、ZNT5-ZNT6ヘテロダイマーおよびZNT7-ZNT7ホモダイマーが必須の機能を果たすことが明らかとなっている^{16~19)}。そこで、ALP, CD73, ENPPの活性が、これら両ZNT複合体に依存しているか調査し、細胞外ATP代謝に関わる酵素群の活性制御機構を明らかにするための解析を実施した^{9, 19)}。両ZNT複合体を欠損させた細胞株では、ALPのアイソザイムの一つである組織非特異型アルカリホスファターゼ(Tissue nonspecific alkaline phosphatase (TNAP))やCD73が全く活性化されず、発現した酵素タンパク質も直ちに分解されていたが、興味深いことに、ENPPのアイソザイムであるENPP1やENPP3では、両ZNT複合体を欠損さ

せた細胞株においても正常に活性を保持していた。このことから、同じように初期分泌経路で活性化される分泌型亜鉛要求性酵素であっても、酵素の種類によって活性化機構や、亜鉛獲得のタイミングが異なっていると考えられた(図2)⁹⁾。本グループでは過去に、腫瘍の悪性化に関わる種々の分泌型亜鉛要求性酵素(オートタキシン、マトリックスメタロプロテアーゼ9、カルボニックアンヒドラーゼIX)の活性化に、初期分泌経路に局在するZNT複合体が重要な機能を果たすことを示しており²⁰⁾、このような活性化機構の違いが生理的あるいは病的にどのような影響を及ぼすのかについて、今後の解析で少しずつ明らかにしていくことが重要と考えている。

おわりに

本稿では、亜鉛欠乏が亜鉛要求性酵素を介して大きく影響する代謝系の一例として細胞外ATP代謝を紹介した。亜鉛要求性酵素は細胞外ATP代謝以外にも無数の代謝系に存在しており、亜鉛欠乏によるこれらの代謝系への影響も健康維持と密接に関連する可能性も大いに考えられる。今後は、このような亜鉛要求性酵素の全体の活性を評価することが、亜鉛欠乏による生体への影響の解明には重要かもしれない。また、その解析にあたっては、オーム解析などの包括的な手法が威力を発揮するであろう。

◆文献

- 1) Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, et al : The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiol. Rev.* 95 : 749-784, 2015
- 2) Zhou J R, Fordyce E J, Raboy V, et al : Reduction of phytic acid in soybean products improves zinc bioavailability in rats. *J. Nutr.* 122 : 2466-2473, 1992
- 3) Krebs N F : Overview of Zinc Absorption and Excretion in the Human Gastrointestinal Tract. *J. Nutr.* 130 : 1374S-1377S, 2000
- 4) Bel-Serrat S, Stammers A L, Warthon-Medina, et al : Factors that affect zinc bioavailability and losses in adult and elderly populations. *Nutr. Rev.* 72 : 334-352, 2014
- 5) Hambidge M : Human zinc deficiency. *J. Nutr.* 130 : 1344S-1349S, 2000
- 6) Hara T, Takeda T, aki Takagishi T, et al : Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *J. Physiol. Sci.* 67 : 283-301, 2017
- 7) Andreini C, Banci L, Bertini I, et al : Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J. Proteome Res.* 5 : 196-201, 2006
- 8) Andreini C, and Bertini, I : A bioinformatics view of zinc enzymes. *J. Inorg. Biochem.* 111 : 150-156, 2012
- 9) Takeda T, Miyazaki S, Kobayashi M, et al : Zinc deficiency causes delayed ATP clearance and adenosine generation in rats and cell culture models. *Commun. Biol.* 1 : 113, 2018
- 10) Bobyr E, Lassila J K, Wiersma-Koch H I, et al : High-resolution analysis of Zn²⁺ coordination in the alkaline phosphatase superfamily by EXAFS and x-ray crystallography. *J. Mol. Biol.* 415 : 102-117, 2012
- 11) Ghosh K, Mazumder Tagore D, Anumula R, et al : Crystal structure of rat intestinal alkaline phosphatase-role of crown domain in mammalian alkaline phosphatases. *J. Struct. Biol.* 184 : 182-92, 2013
- 12) Knapp K, Zebisch M, Pippel J, et al : Crystal structure of the human ecto-5' -nucleotidase (CD73) : Insights into the regulation of purinergic signaling. *Structure.* 20 : 2161-2173, 2012
- 13) Kato K, Nishimasu H, Okudaira S, et al : Crystal structure of Enpp1, an extracellular glycoprotein involved in bone mineralization and insulin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 : 16876-81, 2012
- 14) Gorelik A, Randriamihaja A, Illes K, et al : Structural basis for nucleotide recognition by the ectoenzyme CD203c. *FEBS J.* 285 : 2481-2494, 2018
- 15) Döhler C, Zebisch M, and Sträter, N : Crystal structure and substrate binding mode of ectonucleotide phosphodiesterase/pyrophosphatase-3 (NPP3). *Sci. Rep.* 8 : 10874, 2018
- 16) Suzuki T, Ishihara K, Migaki H, 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
- 17) Suzuki T, Ishihara K, Migaki H, 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
- 18) Fukunaka A, Suzuki T, Kurokawa Y, et al : Demonstration and characterization of the heterodimerization of ZnT5 and ZnT6 in the early secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 284 : 30798-30806, 2009
- 19) Fukunaka A, Kurokawa Y, Teranishi F, et al : 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, 2011
- 20) Tsuji T, Kurokawa Y, Chiche J, 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

Regulation of extracellular ATP metabolism by zinc-requiring ectoenzymes

Taka-aki Takeda and Taiho Kambe

Graduate School of Biostudies, Kyoto University

Zinc is a trace element indispensable for human health. Its deficiency causes various symptoms such as dermatitis, alopecia, anemia, taste disorder, as well as chronic inflammation. However, it is unclear how the symptoms of zinc deficiency occur. Here, we have overviewed the importance of zinc in human physiology and the mechanism underlying the functioning of the zinc-requiring ectoenzymes, and discussed our recent study that reveals the close relationship between zinc metabolism and extracellular ATP metabolism. Our study showed that zinc deficiency leads to delayed ATP clearance and adenosine generation and probably affects purinergic signaling, which may explain why humans show diverse symptoms of zinc deficiency. Moreover, we have briefly reviewed the activation mechanism of several zinc-requiring ectoenzymes in the early secretory pathway, and particularly focused on their involvement in extracellular ATP metabolism.

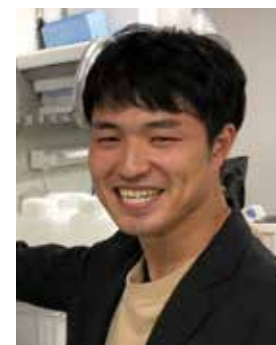
Keyword : zinc-requiring enzyme, extracellular ATP metabolism, zinc deficiency

Address for correspondence

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

E-mail address

kambel@kais.kyoto-u.ac.jp



◆武田貴成略歴

2015 年
2017 年

京都工芸繊維大学卒業（農学）
京都大学大学院生命科学研究科修士課程修了（生命科学）
博士課程進学，日本学術振興会特別研究員（DC1）