

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890237

研究課題名（和文） 亜鉛トランスポーターから亜鉛酵素への亜鉛供給メカニズムに関する解析

研究課題名（英文）The elucidation of the zinc supplying mechanism of zinc requiring enzyme by zinc transporters

研究代表者

福中 彩子 (FUKUNAKA AYAKO)

独立行政法人理化学研究所・複数分子イメージング研究チーム・研究員

研究者番号：60586402

研究成果の概要（和文）：

亜鉛要求性酵素の1つである TNAP の活性化は、分泌経路に局在する亜鉛トランスポーター ZnT5, ZnT6, ZnT7 の複合体によって活性化されること、また亜鉛を強制導入しても TNAP の活性化は起こらないことから、ZnT5/ZnT6 ヘテロ複合体 (ZnT7 ホモ複合体) を介して TNAP に亜鉛が供給される必要があることが判明した。また亜鉛輸送ができない ZnT5/ZnT6 ヘテロ複合体を発現させると TNAP は活性化されないが、アポ型として安定に発現していた。以上の結果から、ZnT 複合体は、最初に TNAP タンパク質を安定化し、続いて TNAP に亜鉛を供給する2段階の制御機構によって TNAP の活性化を行っていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

The reduced activity of TNAP in DT40 cells deficient of two ZnT complexes (ZnT5/ZnT6 heterodimer and ZnT7 homo-oligomer) was not restored by zinc supplementation nor by exogenous expression of other ZnTs that increase the zinc content in the early secretory pathway. Moreover the expression of ZnT5/ZnT6 heterodimers reconstituted with zinc-transport-incompetent ZnT5 mutant failed to restore TNAP activity, but could stabilize the TNAP protein as the apo-form. These findings demonstrate that TNAP is activated not simply by passive zinc binding, but by an elaborate two-step mechanism *via* protein stabilization followed by enzyme conversion from the apo- to the holo-form with zinc loaded by ZnT complexes in the early secretory pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医化学一般

キーワード：亜鉛トランスポーター、亜鉛要求性酵素、分泌経路、活性化機構

1. 研究開始当初の背景

多くの亜鉛要求性酵素は、分泌経路で亜鉛

が供給されることによりアポ型からホロ型へと変換される。申請者らはこれまでに、亜

鉛要求性酵素の1つである組織非特異的アルカリフォスファターゼ(TNAP)の活性化には分泌経路に局在する亜鉛トランスポーター複合体(ZnT5/ZnT6ヘテロ複合体とZnT7ホモ複合体)が必要であることを示してきたが、その活性化機構の詳細は明らかにされていない。

2. 研究の目的

亜鉛トランスポーター複合体によるTNAP活性化機構の詳細を明らかにする。

3. 研究の方法

申請者らはこれまでに、相同組み換え効率が高く、欠損株作製が容易にできるDT40細胞を用いて分泌経路に局在する亜鉛トランスポーター複合体(ZnT5/ZnT6ヘテロ複合体およびZnT7ホモ複合体)を欠損させた三重欠損株(以下TKO株と略す)を作製し、この株ではTNAP活性が完全に消失すること、さらに、この株に亜鉛トランスポーター複合体を発現させるとTNAPの活性が回復できることを観察していた。そこで亜鉛トランスポーター複合体によるTNAPの活性化の機序をさらに明らかにするために、TKO株に、亜鉛の強制導入や様々な亜鉛トランスポーターの変異体などを発現させたレスキュー実験を行い、その時のTNAP活性とTNAPタンパク質の挙動を観察した。

4. 研究成果

分泌経路に局在し、その内腔に亜鉛を輸送することが知られる亜鉛トランスポーターZnT1, ZnT2, ZnT3, ZnT4, ZnT8をTKO株に発現させてもTNAPの活性は回復しないことがわかった(図1A)。またTKO株に亜鉛を強制導入し、分泌経路内に十分量の亜鉛を存在させても、TNAPが活性化されなかった。さらに、亜鉛輸送能を失ったZnT5変異体をZnT6と共にTKO株に発現させた細胞を樹立し、亜鉛を強制導入した場合においてもTNAPの活性を回復することはできなかった(図1B)。これらの結果は、TNAPの活性化にはZnT5/ZnT6ヘテロ複合体(ZnT7ホモ複合体)を介して亜鉛が供給される必要があることを示唆している

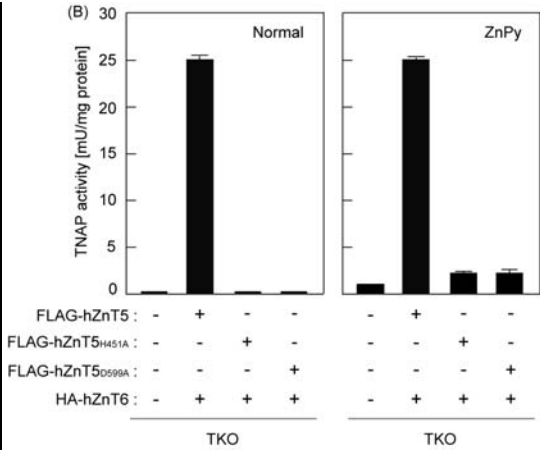
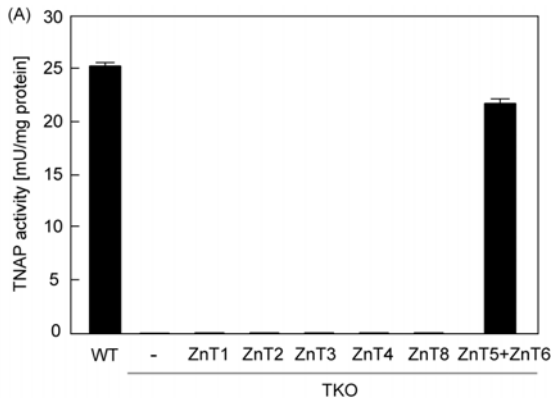
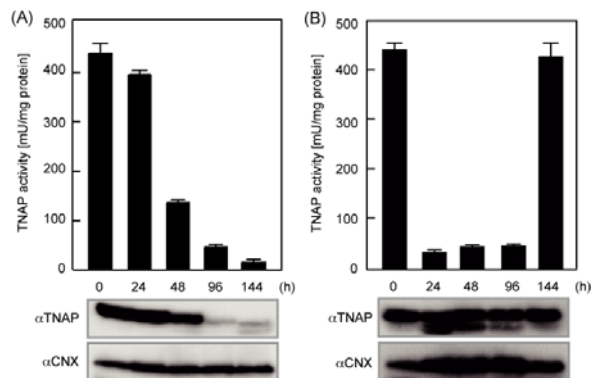


図1 (A) TKO株にZnT5/ZnT6以外の様々なZnTsを発現させてもTNAPの活性は回復しない。(B) ZnT5/ZnT6ヘテロ複合体の亜鉛輸送能がTNAPの活性化に重要である。ZnT5_{H451A}とZnT5_{D599A}は亜鉛輸送ができないZnT5の変異体。ZnPy:亜鉛イオノフォア

そこで次に、ZnT複合体とTNAPの関係をさらに詳しく解析した。まずCre-loxPシステムによりZnT6の発現を消失することができる細胞を作製した。この株にタモキシフェンを加えてZnT6の発現を消失すると、TNAPの活性は消失し、それと同時にTNAPタンパク質の発現も消失した(図2A)。一方、同じ株を亜鉛欠乏下で培養すると、TNAP活性は消失するものの、TNAPタンパク質の発現は消失しなかった(図2B)。次に同様の解析を、亜鉛輸送能を失ったZnT5変異体をもちいて行ったところ、ZnT5/ZnT6ヘテロ複合体から亜鉛が輸送されないにもかかわらず、TNAPタンパク質は不活性型のアポ型として存在することが判明した(図2C)。さらに、TNAPの安定化はZnT5/ZnT6ヘテロ複合体とは別経路で亜鉛を供給するZnT7ホモ複合体をTKO株に発現させた場合にも観察されることから、ZnT5, ZnT6, ZnT7の存在がTNAPタンパク質の安定化に必要であることが明らかになった。



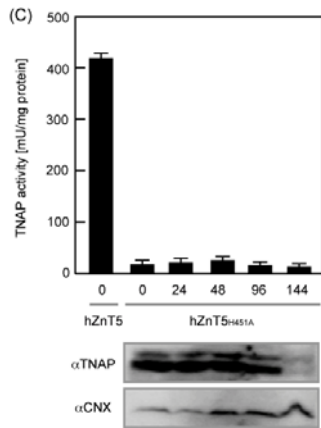


図2 ZnT5/ZnT6 ヘテロ複合体は TNAP タンパク質を安定化する。(A) ZnT5/ZnT6 ヘテロ複合体が消失すると、それに伴い TNAP タンパク質も消失する。(B) 亜鉛欠乏下では TNAP 活性は消失するものの、TNAP タンパク質の発現は消失しない。(C) 亜鉛輸送能を失った ZnT5 の変異体を発現させた場合は、ZnT5/ZnT6 ヘテロ複合体から亜鉛が輸送されないにも関わらず、TNAP タンパク質の発現は消失しない。このとき、ZnT6 の発現をタモキシフェン処理によって消失させると(A)の場合と同様に TNAP タンパク質の発現は消失する。

これらの結果より、TNAP タンパク質の活性化は、まず亜鉛トランスポーター複合体 (ZnT5/ZnT6 ヘテロ複合体および ZnT7 ホモ複合体) によって安定化された後に、亜鉛が供給されるという 2 段階の制御によって行われることが判明した(図 3)。

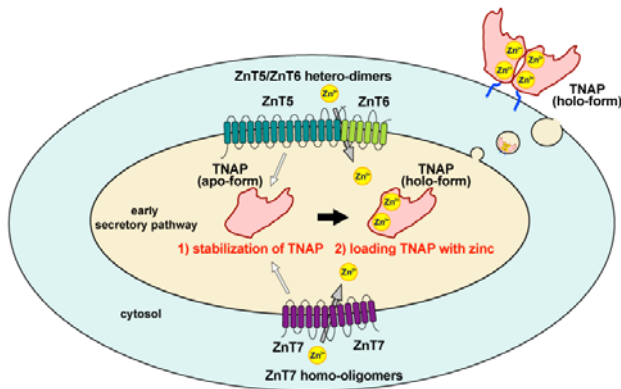


図 3 ZnT5/ZnT6 ヘテロ複合体と ZnT7 ホモ複合体は TNAP を 2 段階で活性化する。2 つの亜鉛トランスポーター複合体は、最初にアポ型の TNAP を安定化し、続いて亜鉛を供給することにより TNAP はアポ型からホロ型へと変換され、活性型となる。

最後に亜鉛トランスポーター複合体による

TNAP 活性化の分子メカニズムを調べるために、TNAP と ZnT5/ZnT6 ヘテロ複合体との相互作用を、クロスリンカーを用いた免疫沈降法により観察したが、両者の相互作用は観察できなかった。ZnT5, ZnT6, ZnT7 による TNAP の 2 段階制御の詳細な分子機序の解明は今後の課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Tissue non-specific alkaline phosphatase is activated via a two-step mechanism by zinc transporter complexes in the early secretory pathway

Fukunaka A, Kurokawa Y, Teranishi F, Sekler I, Oda K, Ackland M.L, Faundez V, Hiromura M, Masuda S, Nagao M, Enomoto S, Kambe T

J Biol. Chem. 286: 16363-16373. (2011)

[学会発表] (計 7 件)

1. 第 84 回日本生化学会大会、京都、2011 年 9 月 24 日

亜鉛トランスポーター複合体による亜鉛要求性酵素の活性化機構の解明

福中彩子、黒川弥生、廣村信、榎本秀一、神戸大朋

2. The 5th international Conference on Metal and Genetics, September 6th 2011, Kobe

ZnT transporters activate tissue non-specific alkaline phosphatase by two-step mechanism in the early secretory pathway

Ayako Fukunaka, Yayoi Kurokawa, Makoto Hiromura, Shuuichi Enomoto, Taiho Kambe

3. 第 22 回日本微量金属元素学会、京都、2011 年 7 月 1 日

亜鉛トランスポーター複合体による亜鉛要求性酵素の活性化機構の解明

福中彩子、黒川弥生、廣村信、榎本秀一、神戸大朋

4. 第2回メタロミクス研究フォーラム、2010年11月3日、京都

Demonstration and characterization of the heterodimerization of ZnT5 and ZnT6 in the early secretory pathway

福中彩子、黒川弥生、廣村信、榎本秀一、神戸大朋

5. The 60th Fujihara Seminar Zinc signaling and cellular functions, October 29th 2010. Osaka

Demonstration and characterization of the heterodimerization of ZnT5 and ZnT6 in the early secretory pathway

Ayako Fukunaka, Yayoi Kurokawa, Makoto Hirokawa, Syuuichi Enomoto, Taiho Kambe

6. 第21回日本微量金属元素、京都、2010年7月4日

亜鉛トランスポーターZnT5/ZnT6 ヘテロ複合体の性状解析

福中彩子、黒川弥生、廣村信、榎本秀一、神戸大朋

7. 第20回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、徳島、2010年6月25日

Conversion of the apoenzymes to the zinc-containing holoenzymes by ZnT transporters

福中彩子、神戸大朋

[図書] (計1件)

亜鉛酵素の活性化メカニズムを解明

福中彩子

第201回 日刊工業新聞「理研の最前線」

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
プレスリリース

<http://www.riken.jp/r-world/research/results/2011/110426/index.html>

<http://www.rikenresearch.riken.jp/eng/research/6654>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
福中 彩子 (FUKUNAKA AYAKO)
独立行政法人理化学研究所・複数分子イメージング研究チーム・研究員
研究者番号：60586402