亜鉛トランスポーター ZIP9 による B 細胞受容体シグナルの活性化制御

谷口将済,^{*,a,†} 榎本秀一,^{a,b} 廣村 信^{b,††}

The Regulation of the Activation in BCR Signaling by ZIP9 Transporter

Masanari Taniguchi,^{*,a,†} Shuichi Enomoto,^{a,b} and Makoto Hiromura^{b,††}

^aGraduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University; 1-1-1 Tsushimanaka, Kita-ku, Okayama 700-8530, Japan; and ^bLaboratory of Multiple Molecular Imaging Research Center for Molecular Imaging Science, RIKEN Kobe Institute; 6-7-3 Minatojima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe 650-0047, Japan.

(Received January 30, 2014)

Zinc is the essential trace element and important for all living organisms. Zinc functions not only as a nutritional factor, but also as a second messenger. However, the effects of intracellular zinc on the B cell-receptor (BCR) signaling pathway are not poorly understood. Here, we indicate that the ZIP9 induces increase in intracellular zinc level and plays an important role in the phosphorylation of Akt and Erk in response to BCR activation. In DT40 cells, the enhancement of Akt and Erk phosphorylation requires intracellular zinc. To clarify this event, we used chicken Zip9-knockout DT40 (cZip9KO) cells. The levels of Akt and Erk phosphorylation significantly decreased in cZip9KO cells treated with zinc pyruithione (ZnPy), and overexpressing the human Zip9 gene restored these biochemical events. Moreover, we found that the increase in intracellular zinc level depends on the expression of ZIP9. Additionally, intracellular zinc was localized at the Golgi, even if it was treated with ZnPy in cZip9KO cells. We concluded that ZIP9 regulates cytosolic zinc level, resulting in the enhancement of Akt and Erk phosphorylation. Our observations provide new mechanistic insights into the BCR signaling pathway underlying the regulation of intracellular zinc level by ZIP9 in response to the BCR activation.

Key words—zinc transporter; B cell-receptor signaling; phosphorylation

生体内における微量金属元素としての亜鉛

亜鉛はヒトの体内に約 2 g 存在する鉄について多い必須微量元素であり、細胞内に存在する亜鉛は、酵素や転写因子など約 300 種以上のタンパク質に結合して様々な生化学・生理的機能を発揮している。亜鉛は金属分子あるいはイオンの形で細胞膜を通過することができないため、細胞質膜及び細胞内小胞器官の膜上に存在する亜鉛トランスポーターにより

輸送されている。現在、亜鉛トランスポーターは大別して、細胞質の濃度を減少させる方向に亜鉛を輸送する Cation diffusion facilitator (CDF) ファミリーとその逆方向へ輸送を行う Zrt/Irt-like protein (ZIP) ファミリーの 2 種が存在することが明らかにされており、これらのトランスポーターによる亜鉛の輸送制御とメタロチオネインによる亜鉛貯蔵によって細胞内濃度が一定に保たれている。^{1,2)} また、生体内において亜鉛が細胞内シグナル伝達物質として働くことが証明され、これまで栄養素として知られていた亜鉛は、「シグナル因子」という機能性分子として認識され始めている。³⁾

細胞内シグナル伝達と亜鉛

細胞外からの刺激に应答する細胞内シグナル伝達は、細胞の生存に必須のシステムであり、その破綻は細胞のがん化等を引き起こすとされている。近年、T 細胞の抗原提示反応におけるシグナル伝達に亜鉛が関与していることが報告され、免疫担当細胞にお

The authors declare no conflict of interest.

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 (薬学) (〒700-8530 岡山市北区津島中 1-1-1), ^b独立行政法人理化学研究所神戸研究所分子イメージング科学研究所複数分子イメージング研究チーム (〒650-0047 神戸市中央区港島南町 6-7-3)

現所属: [†]摂南大学薬学部 (〒573-0101 枚方市長尾峠町 45-1), ^{††}第一薬科大学 (〒815-8511 福岡市南区玉川町 22 番 1 号)

*e-mail: m-tanigu@pharm.setsunan.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 133 年会シンポジウム GS-2 で発表した内容を中心に記述したものである。

ける亜鉛の役割について明らかになった。⁴⁾ 一方で、抗体産生細胞である B 細胞におけるシグナル伝達と亜鉛に関する知見はほとんどなく、いまだ不明な部分が数多く残されたままである。そこで筆者らは、BCR シグナル伝達における亜鉛の機能を明らかにすることを目的として本研究に着手した。本研究では、ゴルジ体に局在する亜鉛トランスポーターの 1 つである ZIP9 に着目した。ZIP9 はゴルジ体に定常的に局在し、亜鉛輸送を行っていることが知られているが、⁵⁾ その機能と役割に関しては全く明らかにされていない。また、本研究において、ニワトリ B リンパ球 DT40 細胞をモデル細胞として用いた。DT40 細胞には、高頻度で相同組換えを起こすという特徴があり、目的遺伝子のノックアウト株を容易に作製することが可能であり、エレクトロポレーション法により Zip9 遺伝子ノックアウト株を作製し、亜鉛トランスポーターによる細胞内亜鉛の調節と BCR シグナルにおける細胞内リン酸化との関係を検討した。

ZIP9 のノックアウトによる BCR シグナルへの影響

まず、野生株 (WT) を用いて、亜鉛と Akt、及び Erk のリン酸化との関係について調べた。細胞膜透過性亜鉛キレーターである *N,N,N',N'*-tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN) 処理によって、抗 IgM 抗体刺激に起因するこれらのタン

パク質のリン酸化の増強が抑制された。また、TPEN 処理によるリン酸化の抑制は、亜鉛ピリチオン (zinc pyruithione; ZnPy) を添加することにより回復したことから、抗 IgM 抗体刺激による BCR シグナルの活性化には亜鉛が必要であることが示唆された。次に、DT40 細胞の野生株、cZip9KO 株及び cZip9KO 株にヘマグルチニン (HA) タグを付加したヒト Zip9 遺伝子 (hZip9HA) を導入した株 (cZip9KO + hZip9HA 株) を用いて Akt, Erk のリン酸化について調べた。血清飢餓条件下においてそれぞれの株に ZnPy を添加したところ、野生株ではリン酸化の増大がみられたが、cZip9KO 株においては、これらの分子のリン酸化は増強されなかった。また、ZIP9 の欠損により減弱していた Akt 及び Erk のリン酸化が hZip9 遺伝子の導入により回復し [Fig. 1 (A)], ヒトにおいても ZIP9 が BCR シグナル経路のリン酸化において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。さらに、同様の実験条件において、野生株では抗 IgM 抗体刺激により Akt 及び Erk のリン酸化が増強されたが、cZip9KO 株においてはこれらのタンパク質のリン酸化は増強されず、ZIP9 の欠損により抑制されたリン酸化は、hZip9 遺伝子の導入により回復していた [Fig. 1 (B)]. 以上の結果から、抗 IgM 抗体刺激による BCR シグナルの活性化には、ZIP9 による細胞質への亜鉛放出が必要である可能性が示唆された。

Fig. 1. Effect of Overexpression of Human Zip9 on Phosphorylation Levels of Akt and Erk in Response to Zinc Treatment and Anti-IgM Antibody Stimulation

A, Overexpression of hZip9 in cZip9KO cells by ZyPy treatment stimulated the phosphorylation of both proteins. Serum-starved WT (lanes 1–3), cZip9KO (lanes 4–6), and cZip9KO + hZip9HA (lanes 7–9) cells were treated with 10 μM ZnPy for 10 min (lanes 2, 5 and 8) and 30 min (lanes 3, 6 and 9). The abbreviation, “unt.” was defined the untreated sample. B, Overexpression of hZip9 restored the response to anti-IgM antibody-stimulated BCR activation. Serum-starved WT (lanes 1 and 2), cZip9KO (lanes 3 and 4), and hZip9-HA-overexpressing cZip9KO (lanes 5 and 6) cells were treated with 0.5 mg/mL anti-IgM antibody for 10 min. All data are representative of three independent experiments.

ZIP9 ノックアウト株における細胞内亜鉛レベルの評価

次に, ZIP9 を介したゴルジ体からの亜鉛放出と細胞内亜鉛レベルを評価するため, 2 種の異なる亜鉛蛍光プローブを用いて蛍光染色を行い, 共焦点蛍光顕微鏡により観察した. まず, Newport Green PDX を用いた染色により, WT 株において, ZnPy 添加により細胞内亜鉛レベルの上昇が起きている様子が観察された. 一方で, cZip9KO 株においては, ZnPy 添加による細胞内亜鉛濃度の増加は観察されなかったが, hZip9 遺伝子の導入により, 細胞内亜鉛の増加は回復された [Fig. 2(A)]. また, FluoZin-3 を用いた亜鉛染色の結果から, WT 株, 及び cZip9KO + hZip9HA 株においては細胞全体に亜鉛が拡散しているのが観察できるのに対し, cZip9KO 株においては亜鉛が細胞質にほとんど存在せず, ゴルジ体の内側に蓄積していることが明らかになった [Fig. 2(B)]. 同様に, WT 株及び cZip9KO + hZip9HA 株においては抗 IgM 抗体刺激により細胞内の亜鉛レベル上昇がみられたが, cZip9KO 株を抗 IgM 抗体で刺激しても細胞内亜鉛レベルは上昇しなかった [Fig. 2(C)]. 以上の結果から, BCR シグナル経路における Akt, Erk のリン酸化には,

ZIP9 によってゴルジ体から細胞質に亜鉛が放出されることが重要であることが示唆された.

結論

本研究において, BCR の活性化に伴う ZIP9 を介した細胞質への亜鉛放出により細胞質の亜鉛レベルが上昇し, PTPase 活性の阻害が起こることで BCR シグナルにおけるリン酸化反応が制御されることを明らかにした.⁶⁾ 本研究における成果は, 亜鉛トランスポーターや亜鉛代謝の異常に起因する疾患の解明と治療法開発及び細胞内において機能を発揮するシグナル分子としてのメカニズムの解明に貢献することが期待される.

謝辞 本研究の主軸となる DT40 細胞を用いた亜鉛トランスポーター遺伝子欠損株の作製に関しまして, 京都大学大学院生命科学研究科 神戸大朋 准教授, 並びに理化学研究所分子イメージング科学研究センター複数分子イメージング研究チーム 福中彩子 博士(現 順天堂大学大学院医学研究科代謝内分泌内科学 博士研究員)に心より感謝申し上げます.

Fig. 2. ZIP9 Is an Essential Factor for Regulating the Intracellular Zinc Level in DT40 Cells

A, B, The intracellular zinc release depends on the expression of ZIP9. Serum-starved WT (panels a, b, g and h), cZip9KO (panels c, d, j and i), and hZip9-HA-overexpressing cZip9KO (panels e, f, k and l) DT40 cells were pretreated with 5 μ M Newport Green; PDX, and FluoZin-3 for 30 min before treatment with 10 μ M ZnPy for 10 min. C, Serum-starved WT (panels a and b), cZip9KO (panels c and d), and hZip9-HA-overexpressing cZip9KO (panels e and f) DT40 cells were pretreated with 5 μ M Newport Green PDX for 30 min before treatment with 0.5 mg/mL anti-IgM antibody. The abbreviation, “Unt.” was defined the untreated sample.

REFERENCES

- 1) Sensi S. L., Canzoniero L. M., Yu S. P., Ying H. S., Koh J. Y., Kercher G. A., Choi D. W., *J. Neurosci.*, **17**, 9554–9564 (1997).
- 2) Outten C. E., O'Halloran T. V., *Science*, **292**, 2488–2492 (2001).
- 3) Yamashita S., Miyagi C., Fukada T., Kagara N., Che Y. S., Hirano T., *Nature*, **429**, 298–302 (2004).
- 4) Feske S., Skolnik E. Y., Prakriya M., *Nat. Rev. Immunol.*, **12**, 532–547 (2012).
- 5) Matsuura W., Yamazaki T., Yamaguchi-Iwai Y., Masuda S., Nagao M., Andrews G. K., Kambe T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 1142–1148 (2009).
- 6) Taniguchi M., Fukunaka A., Hagihara M., Watanabe K., Kamino S., Kambe T., Enomoto S., Hiromura M., *PLoS One*, **8**, e58022 (2013).