

B 細胞の運命決定に関わる亜鉛シグナリング機構の解明

深田俊幸

徳島文理大学薬学部 病態分子薬理学研究室

【研究の背景】

必須微量元素である亜鉛は多様な細胞機能に関わり、亜鉛の恒常性異常は免疫不全を初めとする様々な病気の原因となるが、その分子メカニズムは明らかではなかった。申請者は、亜鉛がシグナル因子(以下、亜鉛シグナル)として機能すること、B 細胞に発現する亜鉛トランスポーターZIP10を介する亜鉛シグナルが B 細胞の生存と正常な抗原刺激応答に必要であること、さらに ZIP10 が血液腫瘍に高発現することを見出した。具体的には、B 細胞における亜鉛シグナルの役割を解明するために、B 細胞特異的に ZIP10 を欠損したマウス(*Zip10^{Mb1}*)を作製し、このマウスに脾臓萎縮と B 細胞の減少を見出した。ZIP10 の役割を解明するために、タモキシフェンで欠損できる *Zip10^{Rosa26}* マウスを作製して解析した結果、ZIP10 の欠損依存的に細胞内亜鉛の低下と細胞死が誘導された。すなわち、ZIP10 の亜鉛シグナルが B 細胞の生存に必須であることを見出した。

さらに、ZIP10 の発現が JAK-STAT シグナル経路で誘導され、白血病細胞やリンパ腫に ZIP10 が発現することを確認し、血液腫瘍における亜鉛シグナルの関与を示した。加えて、ZIP10 の亜鉛シグナルが成熟 B 細胞の抗原受容体の情報伝達を介する免疫応答に関わることを示した(図1)。

上記の研究によって、ZIP10 の亜鉛シグナルが B 細胞の恒常性と機能に重要であることが明らかとなった(Miyai, *PNAS* 2014; Hojyo, *PNAS* 2014; Hojyo, *Receptor and Clinical Investigation* 2015)。

【目 的】

本研究は、B細胞の運命決定に関わる亜鉛シグナルの分子機序を解明するものである。前述のように、申請者は亜鉛トランスポーターZIP10の亜鉛シグナルがB細胞の死の抑制と抗原刺激応答に重要であること、ZIP10が血液腫瘍に過剰発現することを見出した。一方で、ZIP10の亜鉛シグナルがどのように細胞死や抗原受容体の情報伝達を制御するのか、その詳細な分子機序は明らかではなかった。本研究は、ZIP10による細胞死と抗原刺激応答の制御機構を解析し、B細胞の恒常性維持における亜鉛シグナルの分子メカニズムを明らかにすることを目的に実施された。

【方 法】

ZIP10 結合分子の同定

ZIP10 の亜鉛シグナルがどのように B 細胞の細胞死や抗原受容体の情報伝達を制御するのか、その分子機序の解明を試みた。具体的には、Yeast two hybrid system (Y2H)を用いて ZIP10 結合分子の同定を試行した。Y2H 用のプレイにはマウス脾臓由来の cDNA library を適用した。ベイトには、ZIP10 の N 末端側の細胞外領域と、亜鉛トランスポーターごとにユニークな細胞内領域を用いてスクリーニングを行った(図2)。

腫瘍関連細胞における ZIP10 亜鉛シグナルの意義

申請者は、ZIP10 が JAK-STAT 情報伝達経路の活性化によって発現誘導され、ヒト白血病細胞やリンパ腫に過剰発現することを見出した。悪性腫瘍における ZIP10 の役割を明らかにするために、ZIP10 を発現する種々のヒトがん細胞株を用いて shRNA プラスミドをトランスフェクションすることによって *Zip10* 遺伝子をノックダウンし、細胞増殖とコロニー形成能への影響を精査した。

【結 果】

ZIP10 結合分子の同定

Y2H によって多くの ZIP10 結合分子の候補が得られたが、複数個の同一クローン/免疫関連分子/細胞周期関連分子

／癌関連分子／疾患遺伝子／シグナル伝達制御分子／輸送体／金属代謝関連分子／変異体モデル／*Zip10*-KO マウス表現型との関連性を考察して、優先検討する分子群を選抜した。その結果、ZIP10 の細胞内領域に結合する分子候補として eukaryotic translation initiation factor 3 等が、細胞外領域に結合する分子として fibulin 5 等が単離された(未発表データ)。現在、これらの分子の会合について免疫沈降を用いて精査している。

腫瘍関連細胞における ZIP10 亜鉛シグナルの意義

Hela細胞と293T細胞を用いてZIP10をノックダウンすると、対照と比較して細胞数およびコロニー形成能が顕著に低下した(未発表データ)。現在、ヒトバーキットリンパ腫由来細胞Raji、Daudi、ヒトリンパ球性白血病由来細胞Jurkat等のヒト血液腫瘍由来細胞を用いて、ZIP10の遺伝子ノックダウンによる効果を検討している。

【考察および臨床的意義・臨床への貢献度】

申請者は、ZIP10がB細胞の生存に必要であり、ヒト血液腫瘍細胞に過剰発現することを見出した。これらの知見は、亜鉛トランスポーターZIP10とZIP10を介する亜鉛シグナルが、B細胞の生存・分化・その異常に起因する悪性腫瘍等の病気の新たな標的になる可能性を示唆している。今回新たに同定したZIP10の結合分子には、B細胞の機能制御への関与が既知な分子と不明な分子の両方が含まれている。これらの分子の解析と合わせてZIP10の悪性腫瘍における役割を追求することにより、亜鉛シグナルのB細胞の恒常性の維持とその異常における疾患での役割がさらに明らかにされると思われる。

【参考・引用文献】

Hojyo, S., T. Miyai, H. Fujishiro, M. Kawamura, T. Yasuda, A. Hijikata, BH. Bin, T. Irié, J. Tanaka, T. Atsumi, M. Murakami, M. Nakayama, O. Ohara, S. Himeno, H. Yoshida, H. Koseki, T. Ikawa, K. Mishima, and ※T. Fukada.
Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 controls humoral immunity by modulating B cell receptor signal strength.
PNAS. 111:11786-91, 2014 (※ corresponding author)

Miyai, T., S. Hojyo, T. Ikawa, M. Kawamura, T. Irié, H. Ogura, A. Hijikata, BH. Bin, T. Yasuda, H. Kitamura, M. Nakayama, O. Ohara, H. Yoshida, H. Koseki, K. Mishima, and ※T. Fukada.
Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 facilitates antiapoptotic signaling during early B-cell development.
PNAS. 111:11780-85, 2014 (※ corresponding author)

Hojyo S, Miyai T, ※Fukada T.
B-cell receptor strength and zinc signaling: Unraveling the role of zinc transporter ZIP10 in humoral immunity.
Receptor and Clinical Investigation 2: e387; 2015 (※ corresponding author)

【謝 辞】

申請者は2015年4月から現職に就任しました。当研究室は新しく開設された研究室であり、実験環境の整備と並行して、本研究が貴財団のご高配により実行できましたことに心より感謝の意を表します。

【図の説明】

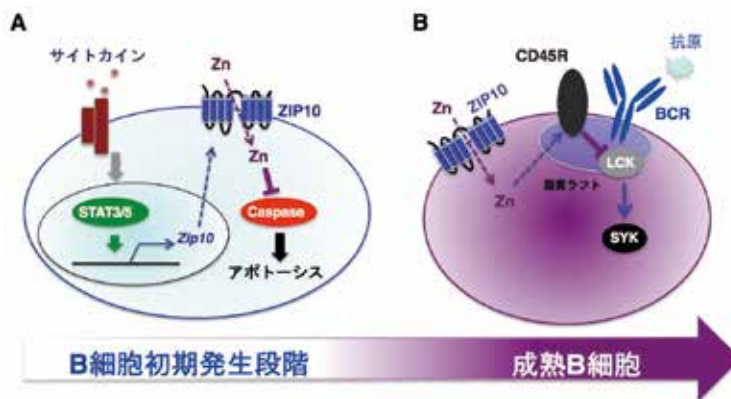


図1.亜鉛トランスポーターZIP10 は B 細胞の恒常性と機能に必要なである

A.ZIP10 を介した亜鉛シグナルは B 細胞初期発生における生存に必須である。

B 前駆細胞において、サイトカインの情報は細胞内シグナル伝達を介して亜鉛トランスポーターZIP10 の発現を誘導する。ZIP10 の亜鉛シグナルは、Caspase の酵素活性を抑制してアポトーシスを抑制する。

B.亜鉛シグナルによる BCR 情報伝達の調節機構

成熟 B 細胞において、ZIP10 の亜鉛シグナルは CD45R の酵素活性を制御して BCR シグナルの過剰な活性化を抑制し、正常な情報伝達に貢献している。

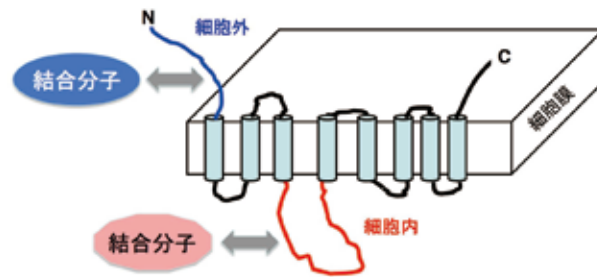


図2.ZIP10 のトポロジーと Y2H に用いた領域

ZIP10 は8回膜貫通領域を有する細胞膜表面に局在する亜鉛トランスポーターである。Y2H のベイトとして、細胞外領域の N 末端部分(青線)と、亜鉛トランスポーターごとにユニークなアミノ酸配列を有する N 末端から3番目と4番目の細胞膜貫通ドメイン間の細胞内領域部分を用いた(赤線)。