

## マグネシウム輸送チャネル TRPM7 を介したマグネシウム代謝と 亜鉛代謝のクロストークに関する解析

神戸 大朋

京都大学大学院生命科学研究科

**概要** 近年の分子生物学的アプローチの進展により、必須ミネラルの新たな生理機能が相次いで見つかっている。特に膜輸送に関わるトランスポーターやチャネルの機能が分子レベルで明らかにされ、各種ミネラルの細胞内での代謝メカニズムに関する知見が劇的に増加している。その過程で、これまで想像もされていなかったミネラル間の相互作用が存在することを示す知見が報告され、各種ミネラルが互いに影響を与えていることが示唆されるようになってきた。したがって、その全容を解明することは、健康機能を理解する上でも重要な課題となる。これらミネラルの間の相互作用には、ミネラルの膜輸送に関わるトランスポーターやチャネルがどのように互いの機能に影響を与えるのかについて解析できる実験系を確立し、その分子メカニズムの理解を深めることが重要となる。本研究では、ニワトリ DT40 細胞を用いて、マグネシウム輸送チャネル TRPM6 が小器官局在型の亜鉛トランスポーターが発信する亜鉛シグナルに及ぼす影響について、B 細胞受容体シグナルで活性化される ERK のリン酸化レベルを指標にして解析を実施した。さらに、亜鉛トランスポーターが他のミネラルの輸送に関わる可能性について、亜鉛トランスポーター ZnT10 に着目し、ZnT10 のミネラル認識機構について検討した。

まず、ゴルジ体に局在する亜鉛トランスポーター ZIP9 と ZIP13 を欠損させた二重欠損株では、両トランスポーターから発信される亜鉛シグナルにより増加する ERK のリン酸下が激減する現象に対して、マグネシウムチャネル TRPM6 が与える影響について解析した。しかしながら、これまでのところ、TRPM6 が ERK のリン酸下を与える影響を検出できてはおらず、亜鉛シグナルとのクロストークの可能性について検討したが、これまでのところ、ZIP9 と ZIP13 に関連する亜鉛シグナルとの相互作用を強く示唆する結果は得られていない。また、トランスポーターを介したミネラル相互作用の分子機序を明らかにする目的で ZnT10 のマンガン輸送機序について、亜鉛特異的輸送を担う ZnT1 と比較解析した結果、膜貫通領域内の一つのアミノ酸残基が、亜鉛とマンガンの識別に重要であることを明らかにした。

ミネラルの膜輸送に関わる各トランスポーターやチャネルにおいて、このようなアミノ酸残基を特定していくことで、それぞれがどのようにミネラルの相互作用に関与するのか、また、相互作用に関与しないのかについて明らかにすることが可能となると考えている。

### 1. 研究背景および目的

近年の分子生物学的アプローチの進展により、必須ミネラルの新たな生理機能が相次いで報告されている<sup>(1-3)</sup>。特に膜輸送に関わるトランスポーターやチャネルの機能が分子レベルで明らかにされ、各種ミネラルの細胞内での代謝メカニズムに関する知見が劇的に増加している。その

過程で、これまで想像もされていなかったミネラル間の相互作用が存在することを示す知見が報告され<sup>(4-8)</sup>、各種ミネラルが互いに影響を与えていることが示唆されるようになってきた。したがって、その全容を解明することは、健康機能を理解する上でも重要な課題となる。これらミネラルの間の相互作用には、ミネラルの膜輸送に関わるトランス

ポーターやチャンネルがどのように互いの機能に影響を与えるのかについて解析できる実験系を確立し、その分子メカニズムの理解を深めることが重要となる。本研究では、我々のグループが亜鉛トランスポーターの機能解析に用いているニワトリ B リンパ球 DT40 細胞において<sup>9)</sup>、マグネシウム輸送チャンネル TRPM6<sup>(10)</sup>が亜鉛シグナルに及ぼす影響について、B 細胞受容体シグナルで活性化される MAPK のリン酸化レベルを指標にして解析を実施した。さらに、亜鉛トランスポーターが他のミネラルの輸送に関わる可能性について、亜鉛トランスポーター ZnT10 に着目し、ZnT10 のミネラル認識機構について検討した。

## 2. 研究方法

### 2.1 細胞培養

ニワトリ DT40 細胞 (chicken pre-B cell) の培養には、FBS 10%, Chicken serum 1%, 2-Mercaptoethanol 0.1% を添加した RPMI1640 Medium を用いた<sup>9)</sup>。TRPM6 発現細胞に微量金属元素を添加する解析では、培地中に ZnSO<sub>4</sub> (終濃度 60 μM), MgSO<sub>4</sub> (同 1 mM), MnSO<sub>4</sub> (同 40 μM), あるいは CoCl<sub>2</sub> (同 100 μM) を加え、24 時間培養した。

### 2.2 欠損株の作成と TRPM6 発現株の樹立

DT40細胞から抽出したゲノムDNAをテンプレートに用いてPCRにて増幅したフラグメントを、薬剤耐性遺伝子の両端に接続し、各亜鉛トランスポーター、マンガン排出トランスポーター遺伝子破壊用ベクターを構築した。作成したベクターをエレクトロポレーション法にて、DT40細胞に導入し、それぞれについて欠損株を順次作成した<sup>9)</sup>。さらに、これらベクターを組み合わせ、本解析に使用した二重欠損株 (ZIP9ZIP13 二重欠損株)、三重欠損株 (ZnTIMTznT4三重欠損株)を樹立した。マンガン輸送チャンネルTRPM7欠損株については、現在、樹立を試みている。また、TRPM6遺伝子 (DNAFORMより購入)をDT40細胞発現用ベクターpA-puroに組み込み、ZIP9ZIP13二重欠損株に導入し、安定発現株を樹立した。同様の手法にて、TRPM6発現株の対象株としてTRPML1-GFPを安定に発現する株を樹立した。

### 2.3 Immunoblot 解析

回収した細胞から全タンパク質抽出液を調整し、それぞれの細胞における ERK のリン酸化の状態を

immunoblot 解析にて検出した。Immunoblot 解析では、各細胞から調製したタンパク質 20 μg を SDS-PAGE に供し、PVDF membrane に転写した。転写後、membrane を各一次抗体 (抗リン酸化 ERK 抗体, ERK 抗体, tubulin 抗体, 抗 TRPM6 抗体), 続いて HRP 標識二次抗体と反応させた後、発光基質を用いて検出した。

### 2.4 亜鉛・マンガン耐性アッセイ

各細胞を 10 × 10<sup>4</sup> cells/ml で播種し、図に示した亜鉛、マンガン濃度存在下で 2 日間培養した。その後、Alamar Blue 試薬を 10 μl を添加して 3 ~ 4 時間培養後、570 nm, 600 nm の吸光度を測定し、得られた値から各金属濃度における生存率を算出した。

## 3. 研究結果

### 3.1 亜鉛シグナル解析用細胞株の樹立

細胞内の亜鉛ホメオスタシスは、様々な亜鉛トランスポーターによって制御されるが、本解析では、ゴルジ体に局在する亜鉛トランスポーター ZIP9 と ZIP13 が関与する亜鉛シグナルにおいて TRPM6 の影響を解析することを試みた。そのため、まず、ZIP9ZIP13 二重欠損株を作成した。通常培養条件下での ERK のリン酸化レベルへの影響を検証したところ、野生型 (WT) に比較して、ZIP9 欠損株では約 85%, ZIP13 欠損株では約 25% までリン酸化レベルが減少しており、ZIP9ZIP13 二重欠損株においては、約 5% まで抑制されていることが判明した (図 1)。さらに、WT では BCR の活性化に伴い、MAPK のリン酸化レベルは上昇する。しかしながら、Δ9-13 においては BCR を刺激した場合においても、WT のような MAPK のリン酸化レベルの上昇はみられなかった。この現象が細胞内の亜鉛濃度の低下

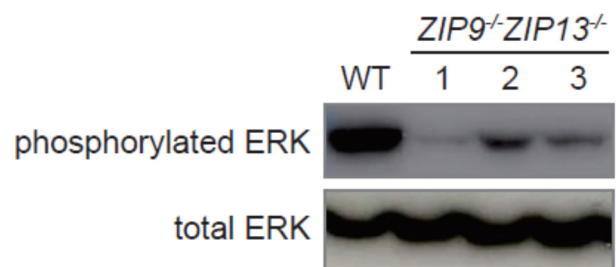


図 1. ZIP9ZIP13 二重欠損株においては ERK のリン酸化レベルが減少する。野生株を WT, ZIP9ZIP13 二重欠損株 (3 株) を ZIP9<sup>+</sup>/ZIP13<sup>-</sup> と表記。

に起因するものかを検証するために、亜鉛のイオノフォア (ZnPy) を用いて人為的に細胞内亜鉛濃度を上昇させる操作を行った。WT では MAPK のリン酸化レベルの上昇がみられる濃度の ZnPy 刺激を行った場合も、ZIP9ZIP13 二重欠損株では ERK のリン酸化レベルに有意な変化は観察されなかった。

### 3. 2 TRPM6 発現細胞株の樹立と亜鉛シグナルへの関与について

TRPM6 が亜鉛シグナルに及ぼす影響を観察するために、ZIP9ZIP13 二重欠損株に TRPM6 を恒常的に発現させ、ERK のリン酸化レベルに与える影響について解析した。TRPM6 発現株 3 株について解析したが、ZIP9ZIP13 二重欠損株において減少した ERK のリン酸化レベルに大きな影響はみとめられなかった(図2)。さらに、TRPM6 発現 ZIP9ZIP13 二重欠損株における ERK のリン酸化レベルがマグネシウムを含むいくつかの金属の添加によって回復する可能性についても検討したが、いずれの金属の添加によっても、ERK のリン酸化レベルに大きな影響をみとめることはできなかった(図3)。

### 3. 3 亜鉛トランスポーターのミネラル認識機構に関する解析

膜輸送に関わるトランスポーターが、どのように輸送基質となるミネラルを認識し区別しているのかについての知見を蓄積するために、亜鉛トランスポーターによる金属認識・輸送機構に関する検討を行った。これまで、亜鉛輸送に特化していると考えられていた ZnT トランスポーターの中で、ZnT10 がマンガン輸送に関与する可能性が相次いで報告されている<sup>(7)</sup>。そこで、亜鉛に特化した輸送を行う

ZnT1 と ZnT10 の間でドメイン交換変異体を作成し、ZnT10 のマンガン認識機構について解析した。マンガン輸送を評価するための細胞株として、マンガンに対して高感受性を示す SPCA1 欠損株を<sup>(11)</sup>、亜鉛輸送を評価するための細胞株として、ZnTIMTznT4 三重欠損株を作成し<sup>(12)</sup>、両株にそれぞれのドメイン変異体を発現させた。その結果、ZnT10 の膜貫通領域に特徴的なアスパラギン残基を ZnT1 でみとめられるヒスチジン残基に置換すると、マンガン輸送活性が消失することを見出した。また、逆に ZnT1 のヒスチジン残基を ZnT10 でみとめられるアスパラギン残基に置換すると、亜鉛輸送活性を消失すると同時に、マンガン輸送活性が付与されることを見出した<sup>(11)</sup>(図4)。他に作成したドメイン変異体ではこのような輸送活性の消失や変化が認められなかったことから、この膜貫通領域内の一つのアミノ酸残基が、亜鉛とマンガンの識別に重要であることを明らかにした。

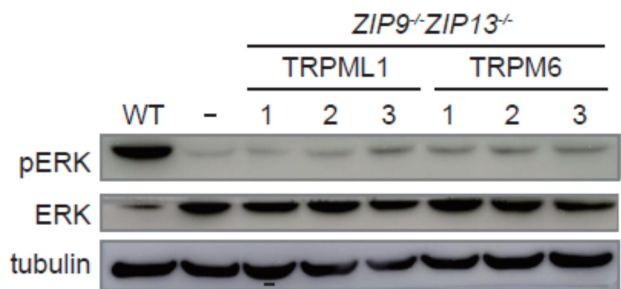


図2. TRPM6 は、ZIP9 と ZIP13 が関与する亜鉛シグナルに大きな影響を与えない。ZIP9ZIP13 二重欠損株に TRPM6 と TRMPL1 を発現させた時の ERK のリン酸化レベルを検出。Tubulin はローディングコントロール。

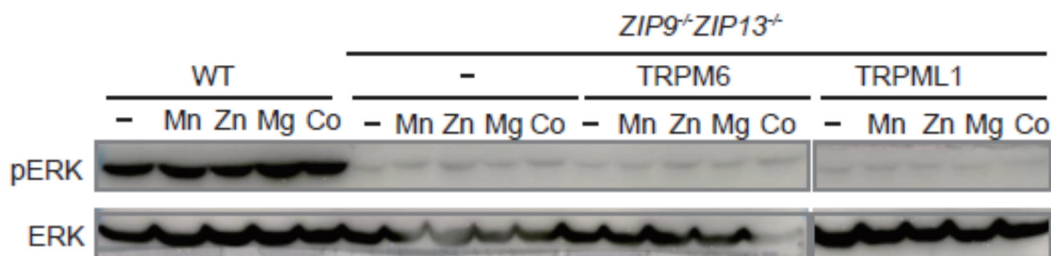


図3. TRPM6 を発現する ZIP9ZIP13 二重欠損株における亜鉛シグナルの減少は、マグネシウム添加によっても回復しない。TRPM6 発現 ZIP9ZIP13 二重欠損株をマグネシウム、亜鉛、マンガン、コバルトを含む培養液で 24 時間培養した後、ERK のリン酸化レベルを検出した。リン酸化 ERK のバンドに大きな変動はみとめられない。

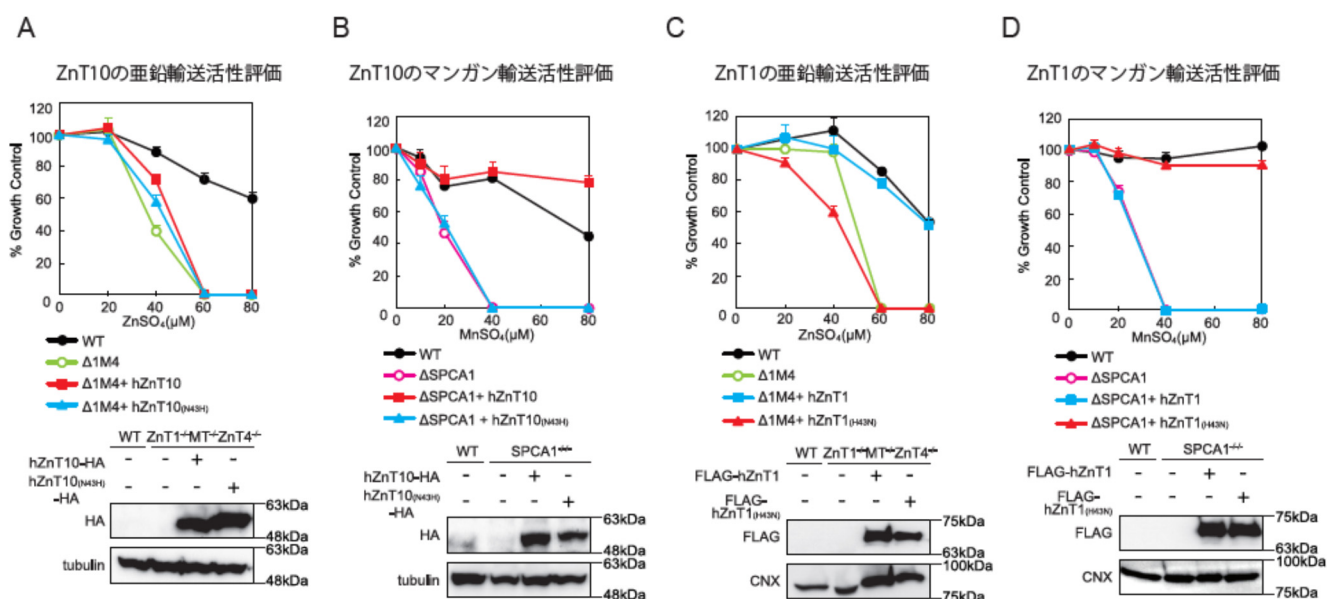


図4. ZnT10 の膜貫通領域に位置するアスパラギン残基がマンガンの認識に重要である。ZnT10 の膜貫通領域に位置するアスパラギン残基(N43)を ZnT1 でみとめられるヒスチジン残基に置換すると、ZnT10 は、亜鉛輸送活性を獲得することなく(A)、マンガン輸送活性を消失する(B)。一方、逆に ZnT1 のヒスチジン残基(H43)を ZnT10 でみとめられるアスパラギン残基に置換すると、ZnT1 は、亜鉛輸送活性を消失するが(C)、マンガン輸送活性を獲得する(D)。

#### 4. 考察と今後の展望

本研究では、マグネシウムチャネル TRPM6 の亜鉛シグナルとのクロストークの可能性について検討したが、これまでのところ、ZIP9 と ZIP13 に関連する亜鉛シグナルとの相互作用を強く示唆する結果は得られていない。今後は、*ZnT1MTZnT4* 三重欠損株を用いて亜鉛感受性に及ぼす影響や、*SPCA1* 欠損株を用いてマンガン感受性に及ぼす影響について解析する予定である。また、本研究では、トランスポーターを介したミネラル相互作用の分子機序を明らかにする目的で ZnT10 のマンガン輸送機序についても解析した。これまでに、ZnT1 との比較解析の結果、膜貫通領域内の一つのアミノ酸残基が、亜鉛とマンガンの識別に重要であることを明らかにしており、このようなアミノ酸残基を特定していくことで、各トランスポーターやチャネルがどのようにミネラルの相互作用に関与するのか、また、相互作用に関与しないのかについて明らかにすることが可能となり、ミネラル研究分野の発展に価値ある成果を生むと考えている。

#### 謝辞

本研究を実施するにあたり、研究助成金を賜りました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に感謝申し上げます。

#### 引用文献

- De Domenico, I., McVey Ward, D., and Kaplan, J. (2008) Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 72-81
- Wang, Y., Hodgkinson, V., Zhu, S., Weisman, G. A., and Petris, M. J. (2011) Advances in the understanding of mammalian copper transporters. *Adv Nutr* **2**, 129-137
- Kambe, T., Tsuji, T., Hashimoto, A., and Itsumura, N. (2015) The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiol Rev* **95**, 749-784
- Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Manasian, Y., and Clapham, D. E. (2014) The TRPM7 channel is

- cleaved to release a chromatin-modifying kinase. *Cell* **157**, 1061-1072
5. Dong, X. P., Cheng, X., Mills, E., Delling, M., Wang, F., Kurz, T., and Xu, H. (2008) The type IV mucopolipidosis-associated protein TRPML1 is an endolysosomal iron release channel. *Nature* **455**, 992-996
  6. Eichelsdoerfer, J. L., Evans, J. A., Slaugenhaupt, S. A., and Cuajungco, M. P. (2010) Zinc dyshomeostasis is linked with the loss of mucopolipidosis IV-associated TRPML1 ion channel. *J Biol Chem* **285**, 34304-34308
  7. Leyva-Illades, D., Chen, P., Zogzas, C. E., Hutchens, S., Mercado, J. M., Swaim, C. D., Morrisett, R. A., Bowman, A. B., Aschner, M., and Mukhopadhyay, S. (2014) SLC30A10 is a cell surface-localized manganese efflux transporter, and parkinsonism-causing mutations block its intracellular trafficking and efflux activity. *J Neurosci* **34**, 14079-14095
  8. Hashimoto, A., and Kambe, T. (2015) Mg, Zn and Cu Transport Proteins: A Brief Overview from Physiological and Molecular Perspectives. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **61 Suppl**, S116-118
  9. Kambe, T. (2014) Methods to Evaluate Zinc Transport into and out of the Secretory and Endosomal-Lysosomal Compartments in DT40 Cells. *Methods Enzymol* **534**, 77-92
  10. Schlingmann, K. P., Waldegger, S., Konrad, M., Chubanov, V., and Gudermann, T. (2007) TRPM6 and TRPM7--Gatekeepers of human magnesium metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1772**, 813-821
  11. Nishito, Y., Tsuji, N., Fujishiro, H., Takeda, T., Yamazaki, T., Teranishi, F., Okazaki, F., Matsunaga, A., Tuschl, K., Rao, R., Kono, S., Miyajima, H., Narita, H., Himeno, S., and Kambe, T. (2016) Direct Comparison of Manganese Detoxification/Efflux Proteins and Molecular Characterization of ZnT10 as a Manganese Transporter. *J Biol Chem* in press
  12. Fujimoto, S., Itsumura, N., Tsuji, T., Anan, Y., Tsuji, N., Ogra, Y., Kimura, T., Miyamae, Y., Masuda, S., Nagao, M., and Kambe, T. (2013) Cooperative Functions of ZnT1, Metallothionein and ZnT4 in the Cytoplasm Are Required for Full Activation of TNAP in the Early Secretory Pathway. *PLoS One* **8**, e77445

## Effects of Magnesium Channel TRPM7 on Zinc Homeostasis

Taiho Kambe

Kyoto University

### Summary

Recent studies on mineral transporters and channels have revealed a number of novel physiological significances for many minerals. They have also shown unexpected phenomena that transporters/channels, which had been thought to be specifically functional for one mineral, can operate to mobilize other minerals and be involved in their metabolism. Elucidating of the molecular basis of these events is important for our better understanding of mineral functions and for applying its information for human health. Thus, we tried to clarify how each mineral transporter or channel can be associated with transporting its second mineral substrate, in addition to its primary substrate, and can be involved in its cellular metabolism in more detail.

Just like calcium ion as a second messenger, zinc ion is released into the cytosol, in which zinc transporters localized to Golgi apparatus play a pivotal role. We found the Golgi-resident ZIP9 and ZIP13 are necessary for sustaining the ERK phosphorylation level in the cells: the ratio of the phosphorylation ERK to total ERK was significantly decreased in chicken DT40 deficient in ZIP9 and ZIP13 (*ZIP9<sup>-/-</sup>ZIP13<sup>-/-</sup>* cells) compared with wild type DT40 cells. To evaluate magnesium channel TRPM6 on the regulation of this zinc signaling function, we overexpressed TRPM6 in *ZIP9<sup>-/-</sup>ZIP13<sup>-/-</sup>* cells and examined its contribution. However, we found no restoration of the reduced ERK phosphorylation ratio by TRPM6 expression. Moreover, we added magnesium in the culture medium of *ZIP9<sup>-/-</sup>ZIP13<sup>-/-</sup>* cells stably expressing TRPM6 and examined its effects, but addition of magnesium caused no significant effects on the reduced ERK signaling. We have not yet found direct evidences that TRPM6 plays a role in zinc signaling originated from the Golgi-resident ZIP9 and ZIP13.

Furthermore, we evaluated the molecular mechanism how mineral transporter determine its substrate metal. We found ZnT10 plays a role manganese specific transporter, while ZnT1 plays a zinc specific transporter. A domain swapping and substitution analysis between hZnT10 and hZnT1 showed that residue N43 of hZnT10, which corresponds to H43 in the intramembranous zinc coordination site of hZnT1, is necessary to impart hZnT10's unique manganese mobilization activity. Interestingly, the H->N reversion mutant in hZnT1 conferred manganese transport activity and loss of zinc transport activity. These results provide important information about metal substrate discrimination mechanism in mineral transporter/channels and crosstalk among minerals.