

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	逸村 直也
論文題目	低亜鉛母乳を引き起こす亜鉛トランスポーターZnT2変異の解析		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>亜鉛は生命活動に欠かせない微量元素であり、特に乳児は成長のために体重あたりで成人の2~3倍量の亜鉛を必要とする。この乳児の要求する亜鉛量を満たすため、母乳中には血清の倍以上の濃度の亜鉛が含まれている。母乳中の亜鉛量が顕著に減少すると、乳児は一過性乳児亜鉛欠乏症 (TNZD, Transient Neonatal Zinc Deficiency) に陥り、皮膚炎や成長遅延といった症状を呈する。これまでに、亜鉛トランスポーター ZnT2が、母乳中への亜鉛輸送を担っていることが明らかになっており、母親の ZnT2 遺伝子の機能欠失変異が、低亜鉛母乳と TNZD の原因として報告されていた。しかしながら、これまで同定されていた ZnT2 遺伝子変異はわずか2種類であり、低亜鉛母乳による TNZD の発症機序については、ほとんど解析が進んでいなかった。本研究では、低亜鉛母乳により TNZD を発症した症例児の母親の遺伝子解析を実施すると共に、見出した変異の及ぼす影響を解析することで、TNZD 発症の原因である低亜鉛母乳分泌の分子機序を明らかにすることを目的に解析を実施した。</p> <p>4 人の母親において遺伝子解析を実施し、1 人 (症例 I) が 2 つのミスセンス変異 (W152R・S296L) を複合ヘテロ接合体で有すること、また、3 人 (症例 II, III, IV) が異なるミスセンス変異 (G280R, T312M, E355Q) をそれぞれヘテロ接合体で有することを明らかにした。これら変異と低亜鉛母乳との関係を明らかにするため、相同組換え効率の高いニワトリ B リンパ球系細胞株 DT40 を用いて、ZnT2 の亜鉛輸送活性を簡便に評価できる実験系を構築した。その実験系を使用し、症例 I の母親から見出された W152R と S296L の ZnT2 タンパク質への影響を評価した結果、ZnT2 W152R は亜鉛輸送活性を示さず、一方、ZnT2 S296L は野生型 ZnT2 と同等の亜鉛輸送活性を示すが、その細胞内でのタンパク質安定性が、野生型に比べ著しく低下することを明らかにした。これらの解析結果から、症例 I の母親の母乳中亜鉛量の顕著な減少は、母親の ZnT2 遺伝子の W152R と S296L の複合ヘテロ接合体変異にあると結論づけた。</p> <p>続いて、ZnT2 G280R, T312M, E355Q の解析を行い、これらの変異体はいずれも亜鉛輸送活性を失うことを明示した。さらに、既知の変異体でドミナントネガティブ作用をもつことが示されていた ZnT2 G87R との比較解析を行い、ZnT2 G87R とは異なり、ZnT2 G280R, T312M, E355Q はいずれもドミナントネガティブ作用をもたないことを明らかにした。従って症例 II, III, IV では、母親の ZnT2 遺伝子のヘテロ接合体変異により、乳腺上皮細胞において正常な ZnT2 タンパク質が不足し (ハプロ不全)、母乳中亜鉛量が低下したと考えられた。</p> <p>最後に、データベースに登録されていた、SNP によって生じる 35 種類の ZnT2 ミスセンス変異を上述の実験系を用いて評価し、低亜鉛母乳を引き起こすと予想される機能欠失変異を 4 種類 (T181M, N189K, G233D, E355K) 見出した。</p> <p>本研究の結果から、低亜鉛母乳を引き起こす ZnT2 遺伝子変異は多数存在しており、これまでの極めて希な疾患であるとの予想よりも、乳児が TNZD に陥る可能性が大きいことが示唆された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

乳児の健全な成長には、多量の亜鉛が必要となるため、母乳中には血清の倍以上の濃度の亜鉛が含まれている。母乳中の亜鉛量が顕著に減少すると、乳児は一過性乳児亜鉛欠乏症 (TNZD) に陥り、皮膚炎や成長遅延といった症状を呈する。これまでに、亜鉛トランスポーターZnT2が、母乳中への亜鉛輸送を担うこと、さらに、母親のZnT2遺伝子の機能欠失変異が、TNZDを引き起こす低亜鉛母乳の原因として報告されていた。しかしながら、同定されていたZnT2遺伝子変異はわずか2種類であり、低亜鉛母乳の発症機序については、ほとんど解析が進んでいない。本研究は、低亜鉛母乳によりTNZDを発症した症例児の母親の遺伝子解析を実施し、さらに低亜鉛母乳の分泌に至る分子機序を解析した結果をまとめたものであり、以下のような知見を得ている。

- 1) TNZDを発症した乳児の4人の母親の遺伝子解析を実施し、1人が2つのミスセンス変異 (W152R・S296L) を複合ヘテロ接合体で有すること、3人が異なるミスセンス変異 (G280R, T312M, E355Q) をヘテロ接合体で有することを明らかにした。
- 2) 見出した変異と低亜鉛母乳との関係を明らかにするため、相同組換え効率の高いニワトリBリンパ球系細胞株DT40を用いて、ZnT2の亜鉛輸送活性を簡便に評価できる*in vitro*実験系を構築した。
- 3) 構築した実験系を使用して、W152RとS296L変異の影響を評価し、W152RはZnT2の亜鉛輸送活性を消失させること、一方、S296LはZnT2のタンパク質安定性を著しく低下させることを明示した。これらの結果から、この母親においては、W152RとS296Lの複合ヘテロ接合体変異が、母乳中亜鉛量の顕著な減少の原因となると結論づけた。
- 4) G280R, T312M, E355Qの解析を行い、これらの変異体がいずれも亜鉛輸送活性を失うことを示した。さらに、既知のドミナントネガティブ変異体であるG87R変異との比較から、これら3つの変異はいずれもドミナントネガティブ作用をもたないことを明らかにした。
- 5) 同じ実験系を用いて、データベースに登録されていた、SNPによって生じる35種類のZnT2ミスセンス変異を評価し、低亜鉛母乳を引き起こすと予想される機能欠失変異を4種類 (T181M, N189K, G233D, E355K) 見出した。

以上のように、本研究は、TNZDを発症した乳児の母親のZnT2遺伝子に新しい5つの変異を見出し、さらに、それぞれの変異の影響を生化学的に解析することで、低亜鉛母乳分泌の分子機序の一端を明らかにしたものであり、新生児栄養学と細胞生物学に大きく貢献するものである。したがって、申請者は生命科学に関する高度で幅広い知識、専攻分野における優れた研究能力を有し、生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見と概念を提示していると判断できる。また、本論文は、論理的かつ一貫性をもって記述されていた。よって、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。

また、平成28年8月3日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、申請者を合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日