

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

逸村 直也

目次

要旨	2
序論	4
結果	13
考察	71
材料と方法	84
引用文献	94
謝辞	102

要旨

亜鉛は生命活動に欠かせない微量元素であり、特に乳児は健全な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* (*SLC30A2*) 遺伝子の機能欠失変異が、TNZDの原因となる低亜鉛母乳を引き起こすことが報告されていた。しかしながら、TNZDの症例報告数自体が少ないこともあって、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、低亜鉛母乳が分泌される分子機構についても、解析は進んでいなかった。

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から提供を受けた血液から、ゲノム DNA を調製し遺伝子解析を行った。その結果、4人の母親全員から *ZnT2* 遺伝子に新規ミスセンス変異を見出した。母乳中亜鉛量が90%程度減少していた母親 (症例 I) からは、2つのミスセンス変異 (W152R・S296L) を複合ヘテロ接合体で見出した。また、母乳中亜鉛量が70%程度減少していた3人の母親 (症例 II, III, IV) からは、それぞれ異なるミスセンス変異 (G280R, T312M, E355Q) をヘテロ接合体で見出した。

変異と低亜鉛母乳との関係を明らかにするため、はじめに *ZnT2* の亜鉛輸送活性を評価する実験系を構築した。まず、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、細胞の亜鉛耐性発揮に機能する遺伝子をすべて欠損させた *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株を樹立した。本欠損株は、過剰亜鉛に対する耐性が著しく低下したが、野生型 *ZnT2* を発現させると、低下した耐性は完全に回復した。さらに、亜鉛蛍光試薬を用いたフローサイトメトリー解析により、細胞質から細胞小胞内への *ZnT2* による亜鉛輸送も確認した。以上から、この実験系によって *ZnT2* の亜鉛輸送活性を評価できると判断した。

ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-} 株を用いて、症例 I から見出された W152R と S296L の *ZnT2* タンパク質への影響を解析した。その結果、*ZnT2* W152R は亜鉛輸送活性を示さず、*ZnT2* の亜鉛輸送活性に必要な二量体形成能が消失することを示し、ドミナ

ントネガティブ作用を有さないことを明らかにした。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。以上から、症例 I の母乳中亜鉛量の顕著な減少の原因は、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。

続いて、ZnT2 G280R, T312M, E355Q の解析を行ったところ、これらの変異体はいずれも亜鉛輸送活性を失うが、二量体形成能を維持していた。そこで、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 との比較解析を行った。その結果、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が明らかになった。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。

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、ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}株を用いて解析し、それぞれの亜鉛輸送活性に及ぼす影響を評価した。その結果、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。

本研究で、4症例の母親から見出した5種類のZnT2遺伝子変異が、低亜鉛母乳を引き起こしたことがわかり、また低亜鉛母乳は、母親ZnT2遺伝子のハプロ不全によって生じることを示唆する結果を得た。さらに、低亜鉛母乳をまねく可能性のあるSNPミスセンス変異を4種類見出した。これにより、低亜鉛母乳を引き起こすZnT2遺伝子変異は多数存在し、これまでの予想よりも、乳児がTNZDに陥る可能性は大きいことが示唆された。

序論

亜鉛の生理的役割

必須微量元素である亜鉛は、生体内でタンパク質の構造因子、酵素の活性補因子、シグナル因子など、非常に幅広い役割を担う。亜鉛とタンパク質との関係としては、ヒトゲノムにコードされている全タンパク質の10%程度が、亜鉛結合モチーフをもつことが、バイオインフォマティクス解析により明らかにされている[1]。また、300種類以上の酵素において、その活性中心に亜鉛が必要である[2,3]。さらに、細胞内外の亜鉛イオン濃度が瞬間的に増減することで、各種のシグナル経路に影響し、亜鉛イオンが細胞のシグナル因子として機能することも報告されている[4]。

亜鉛トランスポーター

2価陽イオンである亜鉛イオンは、脂質二重膜を自由に透過できない。従って、細胞内外や細胞小器官内外の移動には、亜鉛トランスポーターと呼称される輸送タンパク質が必要になる。亜鉛トランスポーターは、その輸送の方向性から、ZIP (Zrt, Irt-related Protein; SLC39A) ファミリーとZnT (Zn Transporter; SLC30A) ファミリーの2つに大きく分けられる。ZIPファミリーは、亜鉛イオンを細胞外または細胞内小器官内から細胞質へと運び、ZnTファミリーはその逆に、細胞質から細胞外または細胞小器官内へと亜鉛イオンを運ぶ。ZIPファミリーはZIP1 (SLC39A1) からZIP14 (SLC39A14) までの14種類、ZnTファミリーはZnT9 (SLC30A9) を除く、ZnT1 (SLC30A1) からZnT10 (SLC30A10) までの9種類が存在する。

乳児亜鉛欠乏

生体内の亜鉛は、成人で2~3 g存在し、食物からの亜鉛の吸収は小腸、特に十二指腸や空腸において行われる。厚生労働省の「日本人の食事摂取基準（2015年版）」によれば、亜鉛の推奨摂取量は一日あたり成人男性で10 mg、成人女性で8 mgとなっている[5]。さらに、胎児や乳児の成育のために、妊娠期の母親では1日あたり2 mg、授乳期の母親では1日あたり3 mgの付加量が定められている[5]。亜鉛の吸収効率は、年齢や摂取量により変動するものの、約30%とされて

おり[6,7]、摂取する亜鉛量の不足は容易に亜鉛欠乏を引き起こす。重篤な亜鉛欠乏に陥ると、皮膚炎、脱毛、下痢、免疫機能の低下といった症状を呈する[8]。

「日本人の食事摂取基準（2015年版）」では、乳児の亜鉛摂取の目安量を定めており、一日あたり男女ともに0～5ヶ月児で2 mg、6～11ヶ月児で3 mgとなっている[5]。体重あたりに換算すると、この値は成人の2～3倍になる。亜鉛の摂取不足により、亜鉛欠乏となった乳児は、皮膚炎、脱毛、下痢、成長遅延といった症状を呈する[9]。乳児亜鉛欠乏症は、母乳栄養の早期産児（在胎37週未満）で多くみられる[10-14]。早期産児は、亜鉛貯蔵に重要な妊娠後期の在胎期間が短いため、亜鉛を十分に貯蔵できず、出生後に急速に成長する時期に、体内の亜鉛と母乳から得られる亜鉛のみでは必要量をまかないきれず、亜鉛欠乏に陥る危険性が大きい[14]。

母乳栄養の正常出生児においても、亜鉛欠乏は起こる[15,16]。症状として、脱毛や激しい下痢に加えて、肢端や口、鼻孔、外陰部など開口部の周辺に重篤な皮膚炎がみられ、先天性腸性肢端皮膚炎 {AE, Acrodermatitis Enteropathica; OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) 201100} と呼称される。この疾患は、亜鉛トランスポーターZIP4 (*SLC39A4*) 遺伝子の変異し、乳児の腸管における亜鉛吸収が減少することで起こる[17-19]。亜鉛の経口投与によって欠乏症状は改善されるが、成長後も生涯にわたり、亜鉛栄養の不足を補い続ける必要がある。AEの患者からは、現在までに30種類以上のZIP4遺伝子変異が同定されている[20,21]。

先天性腸性肢端皮膚炎とは別に、母乳中の亜鉛量の減少によっても、乳児亜鉛欠乏症は引き起こされる[22-27]。授乳開始直後の母乳中亜鉛濃度は、約500 µg/dLに達し、血清中亜鉛濃度（70-120 µg/dL）をはるかに上回る。この濃度は、その後低下していき、生後1～3ヶ月時点で約200 µg/dL、生後3～6ヶ月の時点で血清中亜鉛濃度と同程度となる（Fig. 0-1）[28-30]。母乳栄養により、乳児は1日あたり1～2 mgの亜鉛を得る[31-33]。母乳中亜鉛量が顕著に低下すると、乳児は亜鉛欠乏に陥るが、並行して亜鉛の経口投与を行うことで、欠乏症状は回復する。母乳亜鉛の減少による亜鉛欠乏の場合、離乳後に乳児の症状が再発することはなく、この疾患は一過性乳児亜鉛欠乏症（TNZD, Transient Neonatal Zinc Deficiency; OMIM 608118）として知られる。

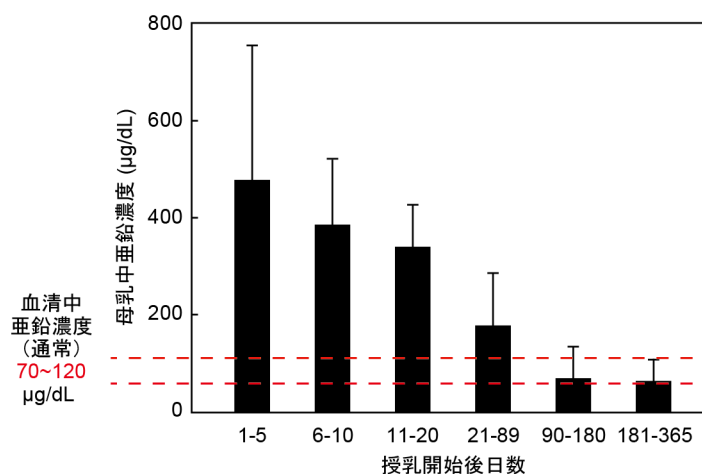


Figure 0-1. 母乳は血清を上回る濃度の亜鉛を含有している

日本人の母乳中亜鉛濃度の推移を示す。[30]を改変引用。

低亜鉛母乳を原因とするTNZDは、稀な疾患と考えられているが、報告数が少ないために、発生率の算出は困難である。しかしながら、日本国内では1981年から2006年の間に17例が報告されており[34]、さらに、日本国内の症例報告を調査したところ、2007年から2015年の間に、低亜鉛母乳を原因とする乳児亜鉛欠乏症は、少なくとも23例が報告されていることが判明した。いずれも満期産（在胎37～40週）・正常体重（出生体重2,500 g以上）の乳児が亜鉛欠乏に陥っており、母親の血清亜鉛値は正常であった一方、母乳亜鉛値は低値（低亜鉛母乳）であった。すべての症例において、乳児への亜鉛の経口投与により亜鉛欠乏症状は回復し、離乳後には再発しない、TNZDの症状を示していた（Table 0-1）。

Table 0-1. 日本国内の低亜鉛母乳によるTNZDの症例報告（2007～2015年）

症例（報告年）	母乳亜鉛値 ^a	乳児発症時期	乳児血清亜鉛値 ^b
1. (2007)	不明	6ヶ月	不明
2. (2007)	23 µg/dL (4ヶ月)	2ヶ月	29 µg/dL (4ヶ月)
3. (2008)	17 µg/dL (5ヶ月)	2ヶ月	不明
4. (2008)	20 µg/dL (4週)	13日	11 µg/dL (4週)
5. (2008)	16 µg/dL (2ヶ月)	30日	20 µg/dL (2ヶ月)
6. (2008)	12 µg/dL (7ヶ月)	4ヶ月	22 µg/dL (7ヶ月)
7. (2009)	15 µg/dL (8ヶ月)	3ヶ月	15 µg/dL (8ヶ月)
8. (2009)	16 µg/dL (8ヶ月)	2ヶ月	9 µg/dL (8ヶ月)
9. (2009)	<10 µg/dL (6ヶ月)	5ヶ月	25 µg/dL (6ヶ月)
10. (2009)	不明	3ヶ月	不明
11. (2010)	不明	2ヶ月	不明
12. (2011)	25 µg/dL (3ヶ月)	1ヶ月	12 µg/dL (2ヶ月)
13. (2011)	31 µg/dL (3ヶ月)	1ヶ月	14 µg/dL (3ヶ月)
14. (2012)	不明	4ヶ月	不明
15. (2012)	不明	不明	不明
16. (2012)	15 µg/dL (10ヶ月)	10ヶ月	16 µg/dL (10ヶ月)
17. (2012)	不明	6ヶ月	18 µg/dL (7ヶ月)
18. (2013)	21 µg/dL (4ヶ月)	1.5ヶ月	22 µg/dL (4ヶ月)
19. (2014)	17 µg/dL (4ヶ月)	2ヶ月	19 µg/dL (4ヶ月)
20. (2014)	32 µg/dL (5ヶ月)	4ヶ月	19 µg/dL (5ヶ月)
21. (2014)	10 µg/dL (4ヶ月)	3ヶ月	13 µg/dL (4ヶ月)
22. (2015)	不明	5ヶ月	22 µg/dL (6ヶ月)
23. (2015)	不明	4ヶ月	不明

^a 母乳亜鉛値：通常 200 µg/dL (4週)、80±30 µg/dL (4～6ヶ月)

^b 血清亜鉛値：通常 70～120 µg/dL

不明：記載なし

医中誌 web (<http://search.jamas.or.jp/index.php>) により日本国内の医学論文や学会要旨を検索し、TNZD の症例報告を収集した。

低亜鉛母乳の原因遺伝子

ヒトにおいて、母親の低亜鉛母乳の症状が遺伝性を示すことは以前から報告されていたが[35]、2006年になって、亜鉛トランスポーターであるZnT2 (SLC30A2)が、原因遺伝子として同定された[23]。ZnT2タンパク質は、乳腺上皮細胞において分泌小胞に局在し、細胞質から分泌小胞内に亜鉛を輸送することで、母乳中への多量の亜鉛分泌を担っていると考えられた[32,36]。

マウスにおいては、Znt4 (Slc30a4) 遺伝子の機能欠失変異が、母乳中亜鉛量を減少させることが報告されていた[37]。これはlethal milk (lm; OMIM 602095) と呼ばれ、430アミノ酸残基からなるマウスZnt4タンパク質の、297番目のアルギニンが終止コドンに変わるナンセンス変異であった。この変異をホモ接合体でもつ母親マウス (lm/lm) から授乳された仔マウスは、母乳中亜鉛の不足によって重篤な亜鉛欠乏に陥り、離乳前に死亡する。この仔マウスは、亜鉛の腹腔内投与を受けるか、lmマウスでない他の母親マウスから母乳を与えられると、亜鉛欠乏に陥ることなく正常に生育できる。

ヒトの乳腺上皮細胞にも、ZnT4の発現は確認されているが[38]、これまでのところ、ヒトのZnT4遺伝子の変異を原因とする低亜鉛母乳の報告は存在しない[39]。

低亜鉛母乳の母親から見出されたZnT2変異

ZnT2は当初、エンドソーム膜に存在し、エンドソーム・リソソーム内に亜鉛を封入する亜鉛トランスポーターとして同定された[40]。ZnT1やメタロチオネイン (MT) を欠損したBHK細胞 (ベビーハムスター腎臓細胞) を用いた実験によって、ZnT2は亜鉛が高濃度に存在する条件下で細胞質の亜鉛をエンドソーム内に封入し、ZnT1やメタロチオネインと同様に、高濃度亜鉛によって生じる細胞毒性を緩和することが示された[40]。

次いで、ZnT2がヒトにおいて母乳中への亜鉛輸送を担っていることが報告された[23]。母乳中の亜鉛量が大幅に低下するため、乳児が亜鉛欠乏となる家系が見出され、ZnT2遺伝子の解析の結果、372アミノ酸残基からなるヒトZnT2タンパク質の、54番目のヒスチジンがアルギニンに変わるミスセンス変異 (H54R) がヘテロ接合体で発見された[23]。さらに別の家系から、ZnT2タンパク質の87番目のグリシンがアルギニンに変わるミスセンス変異 (G87R) が、ヘテロ接合体で見出された[25]。培養細胞を用いた解析により、ZnT2 H54R変異体は、亜鉛輸送活性が低下し、タンパク質がアグリソームに凝集することが示され[23]、ZnT2

G87R変異体は、亜鉛輸送活性をもたず、野生型 (WT) に対してドミナントネガティブ作用をもつことが示された[25]。

本研究の開始時点で、TNZD症例児の母親の*ZnT2*遺伝子から同定された、低亜鉛母乳を引き起こす変異は、これら2種類のミスセンス変異のみであった。

ZnT2の発現制御

乳腺上皮細胞における細胞外への亜鉛の分泌は、母乳分泌を促すホルモンであるプロラクチンによって促進される[41,42]。細胞外からのプロラクチン刺激は、JAK2/STAT5経路を活性化し、JAK2によってリン酸化された転写因子STAT5が核内に移行し、STAT5結合配列 (5'-TTCNNNGAA-3') に結合することで、下流遺伝子の翻訳が起こる。マウスの*Znt2*遺伝子のプロモーター領域には、STAT5結合配列があり、マウス*Znt2*の転写調節は、JAK2/STAT5経路を介して制御される[41]。また同じくマウス*Znt2*のプロモーター領域には、細胞質の亜鉛イオンに応答する転写因子MTF-1 (Metal response element-binding Transcription Factor-1) が結合するMRE (Metal Response Element) が存在し、亜鉛イオンの刺激により、転写調節が行われる[43,44]。

ZnTファミリーのタンパク質構造と亜鉛輸送機能

ZnTが属する亜鉛トランスポーターZnTファミリーは、6回膜貫通領域 (TMD I~VI, Transmembrane Domain 1~6) を有し、C末端とN末端を細胞質側に向けた構造をとる。また現在までの解析から、ZnTは、ヘテロ二量体を形成するZnT5とZnT6を除いて、ホモ二量体を形成して亜鉛を輸送することが示されている[25,45-49]。

ZnTタンパク質の結晶構造解析の報告はないが、ZnTの大腸菌オーソログのYiiPでは、全長のタンパク質結晶構造が解析されている[50-52]。これにより、YiiPはホモ2量体を形成すること、また単量体のTMD IIとTMD Vにそれぞれ2つずつ位置する、計4つの親水性アミノ酸が、1個の亜鉛と四面体型の結合部位を形成していることが示された (Fig. 0-2A) [50,51]。このTMD IIとTMD Vの亜鉛結合部位は、ZnTにおいて、亜鉛輸送活性をもたないZnT6と[48]、マンガンのトランスポーターであることが明らかになったZnT10を除き[53-55]、2つのヒスチジンと2つのアスパラギン酸からなる形で保存されている (Fig. 0-2B)。この部

位をアラニンに置換すると、ZnTの亜鉛輸送活性が失われることから[56,57]、TMD IIとTMD Vの亜鉛結合部位は、ZnTの亜鉛輸送に必須と考えられる。

YiiPの結晶構造解析から、ホモ二量体のC末端領域にも、単量体あたり2個の亜鉛結合が確認された[50,51]。この亜鉛結合部位は、ZnTの細胞質C末端領域にも保存されており、ZnTの亜鉛輸送活性の発揮に必要と考えられている。ZnTの細胞質N末端領域、およびTMD IVとTMD Vの間にあるヒスチジンに富んだ細胞質領域（ヒスチジンリッチループ、His-rich loop）は、YiiPでは保存されておらず、その立体構造は明らかになっていないが、このうちヒスチジンリッチループはZnTの亜鉛輸送機能に不可欠なことが示されている（Fig. 0-2C）[45,58-60]。

ZnT5とZnT6のヘテロ二量体、ZnT1、各種のZnTオーソログを用いた解析により、ZnTはプロトンと亜鉛イオンを1:1で対向輸送することが示されている[56-58,61]。さらにYiiPの解析から、亜鉛イオンの結合と解離を引き金として、YiiPに構造変化が起こり、二種類のタンパク質構造を往復することで、交換輸送体として機能することが示唆された[52,62]。

（次頁）

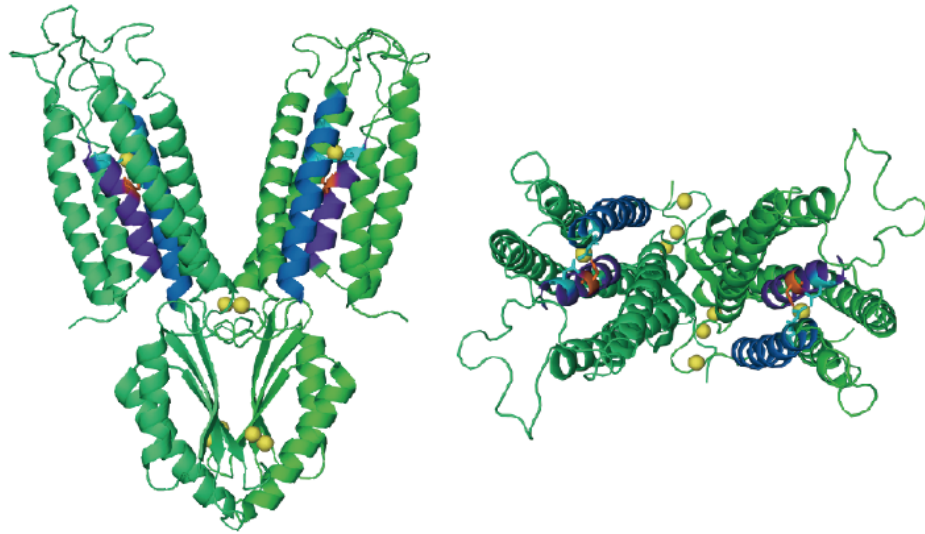
Figure 0-2. ZnT ファミリーのタンパク質構造

A. YiiPホモ二量体のタンパク質立体構造のリボンモデル（PDB 3H90）。左は横から、右は上から見た図である。TMD IIを青色、TMD Vを紫色、亜鉛を黄色で示す。

B. ヒトのZnTファミリーのアミノ酸配列を、ZnT2と相同性の高い順にアラインメントした。TMD IIとTMD Vに保存されている亜鉛結合部位のヒスチジンを橙色で、アスパラギン酸を水色で表す。

C. ZnTは6回膜貫通構造をとり、ホモ二量体を形成して亜鉛とプロトンを対向輸送する。亜鉛はZnT各単量体のTMD IIとTMD Vのヒスチジンとアスパラギン酸からなる部位と、ZnTの二量体間のC末端領域に位置する部位に結合する。また、TMD IVとTMD Vの間には、亜鉛が結合すると考えられるヒスチジンに富んだ領域（His-rich loop）が存在する。

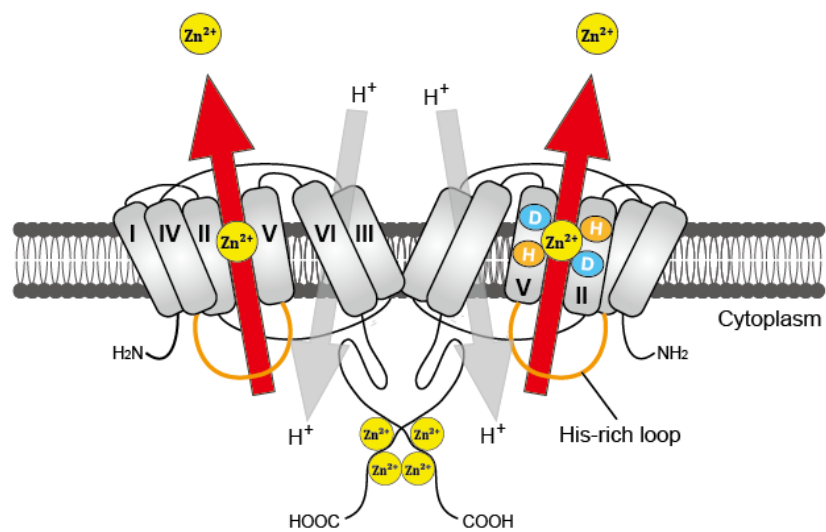
A



B

Name (A.A.length)		TMD II		TMD V	
ZnT2 (372)	103	DAA E LLT D FASMLISLFSLWMSS	125	215	PSVRAAF E HVIG D FM 229
ZnT3 (388)	105	DAA E LLADVGSMMGSLFSLWLST	127	230	TSVRAAF V HVLG D LL 244
ZnT8 (369)	103	DAA E LLIDLTSLFLLSLFSLWLSS	125	212	ASVRAAF V HALG D LF 226
ZnT4 (429)	143	DA E MLT D LSAIIITLLALWLSS	165	269	LAVRAAF V HALG D LV 283
ZnT7 (376)	67	DSE E MFF D STAILAGLAASVISK	89	232	QILQGV F HIL D TL 246
ZnT5 (765)	448	DGE E ML F DCSALVMGLFAALMSR	470	587	ANMRGV F HVL D TL 601
ZnT6 (461)	63	YTYLT I F D LFSLMTCLISYWVTL	85	193	IFLPRM N PFV L DL A 207
ZnT1 (507)	40	DSE E MLS D VLALVVALVAERFAR	62	243	LNMRGV F HVLG D AL 257
ZnT10 (486)	40	DSFNMLS D LISLCVGLSAGYIAR	62	236	LNIRGV L HV M GD L 250

C



本研究の解析内容

本研究では、TNZD の症例児の母親 4 人の協力を得て、血液から回収したゲノム DNA を解析した。その結果、1 人の母親からは、*ZnT2* 遺伝子上に 2 つのミスセンス変異 (W152R, S296L) を別々のアリルに見出し、さらに 3 人の母親から、それぞれ異なる 3 つのミスセンス変異 (G280R, T312M, E355Q) をヘテロ接合体で見出した (結果第 1 節)。続いて、変異と低亜鉛母乳との関係について調べるため、遺伝子組換え効率の高いニワトリ DT40 細胞の遺伝子欠損株を用いた実験系を構築した (第 2 節)。生化学的解析の結果、見出されたミスセンス変異は、いずれも *ZnT2* タンパク質の亜鉛輸送能やタンパク質安定性に影響し、低亜鉛母乳を引き起こすことが示された。加えて TNZD の原因となる低亜鉛母乳は、母親の *ZnT2* 遺伝子のハプロ不全によって起こることが示唆された (第 3 節、第 4 節)。最後に、データベースに登録されていた *ZnT2* にミスセンス変異をまねく 35 種類の SNP についても同様に解析を行い、低亜鉛母乳を引き起こす可能性を評価した (第 5 節)。

結果

第1節 4人の母親の *ZnT2* 遺伝子に5種類のミスセンス変異を見出す

1-1. 症例の臨床データ

亜鉛欠乏を呈した乳児は、4症例いずれも満期産（在胎37～40週）、正常体重（2,500g以上）で出生し、母親から完全母乳栄養哺育を受けた。乳児は生後13日から5ヶ月の間に皮膚炎を生じた。生後4週から6ヶ月の時点で乳児の血清中の亜鉛量を測定したところ、いずれも非常に低い値を示し、乳児の亜鉛欠乏が確認された。乳児の母親の母乳亜鉛値を測定したところ、いずれの症例においても母乳中の亜鉛量は通常よりもはるかに低い値を示した（Table 1-1）。一方、同時に測定した母親の血清亜鉛値は通常であり、亜鉛欠乏は認められなかった。すべての症例で、母乳栄養に加えて、乳児に亜鉛の経口投与を離乳期まで行ったところ、皮膚炎は治まって再発することなく、血清亜鉛値も通常となった。

Table 1-1. 母親の *ZnT2* 遺伝子変異および乳児が示した亜鉛欠乏症状

症例 ^a (遺伝子変異)	母乳 亜鉛値 ^b	発症 時期	乳児 血清亜鉛値 ^c	症状
I (c.454G>A, c.887C>T)	20 µg/dL (4週)	13日	11 µg/dL (4週)	口の周辺や指に重篤な皮膚炎、さらに脱毛、下痢、成長遅延
II (c.838G>A)	10 µg/dL (4ヶ月)	3ヶ月	13 µg/dL (4ヶ月)	口周囲や後頭部、四肢の間擦部に皮膚炎
III (c.935C>T)	<10 µg/dL (6ヶ月)	5ヶ月	25 µg/dL (6ヶ月)	口周囲・口腔内・後頭部・手足・陰部・肛門周囲に痂皮の付着するびらん
IV (c.1063G>C)	21 µg/dL (4ヶ月)	1.5ヶ月	22 µg/dL (4ヶ月)	首に紅斑、のち口囲や四肢の間擦部、肛囲、陰部にも紅斑、びらん

^a 症例 I, II, III, IV は、それぞれ Table 0-1 の症例 4, 21, 9[63], 18[64] と同一である。^b 母乳亜鉛値：通常 200 µg/dL (4週)、80±30 µg/dL (4～6ヶ月)、^c 血清亜鉛値：通常 70～120 µg/dL

1-2. 母親 *ZnT2* 遺伝子に見出されたミスセンス変異

京都大学医学部医の倫理委員会の承認（承認番号 G352 号および G573 号）を得て、各症例の母親の遺伝子解析を行った。はじめに、症例 I の母親の血液から得たゲノム DNA より、*ZnT2* 遺伝子と *ZnT4* 遺伝子のすべてのエクソンおよびスプライシングサイトを PCR で増幅し解析した。その結果 *ZnT4* 遺伝子のコーディング領域に、変異は発見されなかった。一方、*ZnT2* 遺伝子には、2 つのミスセンス変異を見出した。ヒトの *ZnT2* 遺伝子には 8 つのエクソンが存在するが、第 4 エクソンに位置する、454 番目のチミンがシトシンとなった変異 (c.454T>C) と、第 7 エクソンに位置する、887 番目のシトシンがチミンとなった変異 (c.887C>T) であった (Fig. 1-1A)。*ZnT2* タンパク質のアミノ酸配列では、それぞれ 152 番目のトリプトファンがアルギニンに (p.W152R)、296 番目のセリンがロイシン (p.S296L) に変わるミスセンス変異であった。またシーケンス波形から、いずれも一方のアリルのみが変異したヘテロ接合体であると考えられた (Fig. 1-1B)。さらに、第 4 エクソンから第 7 エクソンまでのゲノム DNA 配列を PCR で増幅しサブクローニングした結果、2 つの変異は別々にサブクローニングされたため、W152R と S296L の変異は別々のアリルに存在することが判明した。

続いて、症例 II, III, IV の母親の遺伝子解析を行った。母親の血液から得たゲノム DNA より、*ZnT2* 遺伝子の全エクソンとスプライシングサイトを PCR で増幅し解析した。その結果、*ZnT2* 遺伝子にそれぞれ異なるミスセンス変異を見出した。症例 II の第 6 エクソンに位置する、838 番目のグアニンがアデニンとなった変異 (c.838G>A)、症例 III の第 7 エクソンに位置する、935 番目のシトシンがチミンとなった変異 (c.935C>T)、第 8 エクソンに位置する、症例 IV の 1063 番目のグアニンがシトシンとなった変異 (c.1063G>C) であった (Fig.1-2A)。それぞれ、*ZnT2* タンパク質の 280 番目のグリシンがアルギニンに (p.G280R)、312 番目のトレオニンがメチオニンに (p.T312M)、355 番目のグルタミン酸がグルタミン (p.E355Q) に変わるミスセンス変異で、シーケンス波形から、いずれの変異も一方のアリルのみが変異したヘテロ接合体であると考えられた (Fig.1-2B)。*ZnT4* 遺伝子についても同様に解析を行ったが、コーディング領域に変異は発見されなかった。

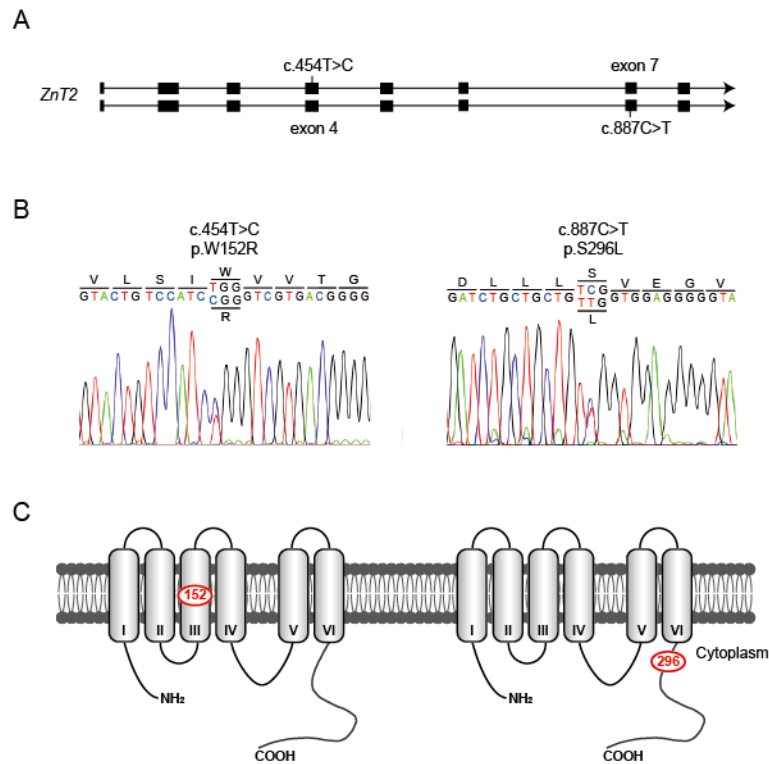


Figure 1-1. 症例 I の母親から見出した *ZnT2* 遺伝子の複合ヘテロ変異

A. ■はエクソンを表す。低亜鉛母乳を分泌した母親の *ZnT2* 遺伝子の第4エクソンと第7エクソンに変異を見出した。両変異はそれぞれ異なるアレルに位置した。

B. *ZnT2* 遺伝子をシーケンスした電気泳動図。

C. SOSUI および HMMTOP による *ZnT2* のタンパク質立体構造予想から、W152R と S296L の変異位置をそれぞれ示す。

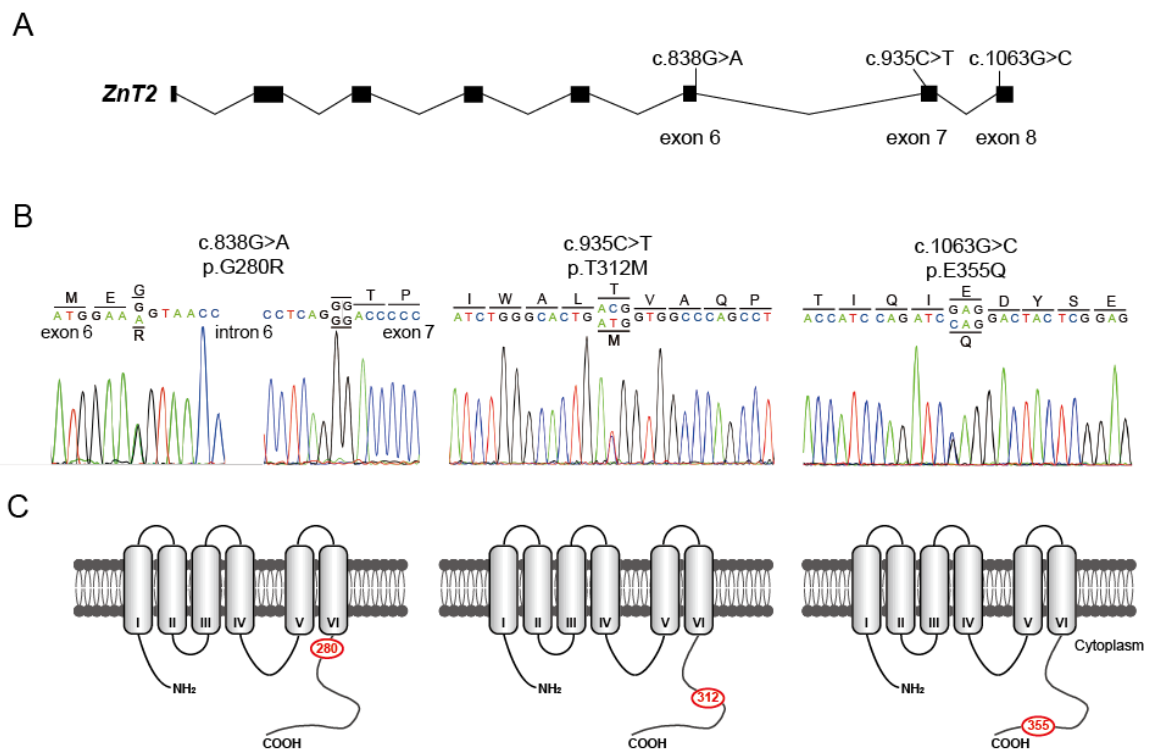


Figure 1-2. 症例 II, III, IV の母親から見出した *ZnT2* 遺伝子のヘテロ変異

A. ■はエクソンを表す。低亜鉛母乳を分泌した3人の母親それぞれから、*ZnT2* 遺伝子の第6、第7、第8エクソンに変異を見出した。c.838G>Aはエクソン6の3'末端に位置し、エクソン7の5'末端に位置するGGとコドンを形成すると考えられた。

B. *ZnT2* 遺伝子をシーケンスした電気泳動図。

C. SOSUIおよびHMMTOPによる*ZnT2*のタンパク質立体構造予想から、G280R, T312M, E355Qの変異位置を示す。

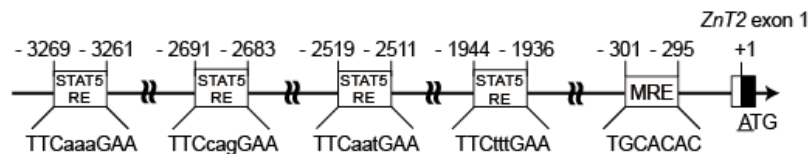
SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) および HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>) を用いた ZnT2 のタンパク質立体構造の予想から、Trp-152 は 3 番目の膜貫通領域 (TMD III) に、Ser-296 は細胞質側の C 末端領域に位置すると考えられた (Fig. 1-1C, Fig. 1-3)。また、Gly-280, Thr-312, Glu-355 は、細胞質側の C 末端領域に位置すると考えられた (Fig. 1-2C, Fig. 1-3)。

見出した 5 種類の変異は、NCBI の SNP (Single Nucleotide Polymorphism) データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) に登録されておらず、これまでに報告のないミスセンス変異であった。

続いて、各母親の *ZnT2* 遺伝子の翻訳開始位置から -1.0 kb 付近の MRE (Metal Response Element) を含むプロモーター領域、および、*ZnT2* 遺伝子上流領域のうち、-3.3 kb ~ -1.9 kb 付近の、STAT5 結合配列 (STAT5-RE) の可能性のある 4 つの領域周辺を PCR で増幅し、遺伝子解析を行った。MRE には、亜鉛に応答して細胞の亜鉛恒常性の制御を担う MTF-1 が結合し、STAT5-RE には乳腺刺激ホルモンであるプロラクチンに応答して活性化した STAT5 が結合する。いずれも *ZnT2* の転写調節を行い、母乳中への亜鉛輸送の制御に関係すると考えられる。解析の結果、すべての母親において MRE 周辺にも STAT5-RE にも、変異は見出されなかった (Fig. 1-4A, B)。

以上から、各母親の *ZnT2* 遺伝子から見出されたミスセンス変異が、母乳中へ分泌される亜鉛量を減少させ、乳児の亜鉛欠乏を引き起こしたと考えられた。

A



B

human	CAGGTGGGCTCCG-CGGGCCCATGGGCGCAGGCACAGGTGTGCGGGGCCACAGCCGG--
rat	-CTCTCGGCTCCTTCAGGCTCCGG--ACGCAGGAGACGGGTCCCTGGGGCAGAGCAGCGA
mouse	---CTCAGCTCCTTCGGGCTCCGGGATGCAGGGGTTCAGGTCCCTGGGGCAAGAGCCGCAA
	* ***** * *** ** ***** * **** ** *** *
	MRE
human	-GCCTTTTGCAGCCGGCGACCGCCCCCTTCCCCGCGGGCTTT TGCACAC GACGCGCCG
rat	TTCCCTTTGCAGCCGGCCGCC-CTTCCCCCTCCCCGCGGGCTTT TGCACAC GACGCGCTG
mouse	TTCCCTTTGCAGCCGGCCACC-CTCCCCCTCCCCGCGGGCTTT TGCACAC GACGCGCGG
	** ***** ** * *** ***** ***** ***** ***** ***** **
human	ACGGCAGCTTCACACGGGTGGCGAG---GGCCGG--ATAAAGCCGGCGGCCGCGGGGCG
rat	CGGGCGGCTTCACACGAGGTGGTGAG---GGCCGGGATAAAGCGAGCGGGCGCGGGGCG
mouse	CGGGCGGCTTCACACCAGGTGGCGAGGAGGGCCGGGATAAAGCGGGCGGGCGCGGGGCG
	*** ***** * *** ** ***** ***** **** *****
human	CAGCGGCTGACCGGAGACACGGGAGCGCTTGGCACG
rat	CAGAGGCAGGACCAGAGCTGAAAGTAGAAGGTGA--
mouse	CAGCGGCAGGGCCGAGCGGAAGGTGGAAGG-----
	*** *** * * * * *

Figure 1-4. 母親 *ZnT2* 遺伝子のプロモーター領域に変異は見られなかった

A. *ZnT2* 遺伝子の上流に位置する、*ZnT2* の発現制御に関わる可能性のある配列とその位置を示す。ゲノムの配列情報は GenBank から入手した。ヒトの *ZnT2* 遺伝子の正確な転写開始点は不明なため、開始コドン (ATG) のアデニンを+1、その直前の塩基を-1 とし表記の付番をした。MRE (5'-TGCACAC-3') はプロモーター領域に 1 カ所、STAT5-RE (5'-TTCNNNGAA-3') の可能性のある配列が、上流領域に 4 カ所確認できた。各母親のゲノム DNA から、該当する領域周辺の配列を増幅し解析したが、いずれも変異は見出されなかった。

B. GenBank から入手したヒト、ラット、マウスの MRE 周辺の塩基配列の比較を示す。MRE の配列は完全に保存されており、その周囲の配列もよく保存されている。マウスの *Znt2* 遺伝子において予想される転写開始点を ■ で、MRE を太字で、配列が完全に一致する塩基を ★ で示した。

第2節 ZnT2の亜鉛輸送活性評価に用いる実験系の確立

2-1. ZnT2 亜鉛輸送活性の評価のための、DT40 細胞遺伝子欠損株の樹立

見出したミスセンス変異が ZnT2 の機能に影響するかどうかを調べるため、はじめに ZnT2 の亜鉛輸送活性を評価する実験系を構築した。遺伝子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[65]、亜鉛耐性が大幅に低下する欠損株を樹立し、その細胞株の亜鉛耐性の変化を指標として、ZnT2 の亜鉛輸送活性を評価する系を確立した[66]。

ZnT2 の亜鉛輸送活性に関しては、BHK 細胞変異株を用いた先行研究を参考とした。この先行研究では、細胞質の過剰亜鉛を細胞外に排出する ZnT1 と、細胞質の過剰亜鉛を除去するメタロチオネイン (MT) を欠いた BHK 細胞が、亜鉛耐性を大きく低下させたこと[67]、またこの二重欠損 BHK 細胞に N 末端を欠いたラット *Znt2* を発現させると、亜鉛耐性が大きく回復することを示していた[40]。

ニワトリゲノム上には、9 種類の ZnT がすべて存在し、DT40 細胞には ZnT1, ZnT4, ZnT5, ZnT6, ZnT7 が発現している (Table 2-1) [68,69]。このうち ZnT4 は、ZnT2 と同様に、前出の BHK 細胞変異株に発現させると、細胞の亜鉛耐性を回復させると報告されていた[70]。従って ZnT4 は、DT40 細胞の亜鉛耐性に寄与することが考えられた。また、早期分泌経路 (ゴルジ体や小胞体) で機能する ZnT5, ZnT6, ZnT7 に関しては、当研究室のこれまでの知見から、DT40 細胞の三重欠損株 (*ZnT5^{-/-}ZnT6^{-/-}ZnT7^{-/-}*) が野生株と変わらない亜鉛耐性を示すことが確認されていた。従って、ZnT5, ZnT6, ZnT7 は、DT40 細胞の亜鉛耐性に寄与しないと考えられた。

また、DT40 細胞に ZnT2, ZnT3, ZnT8, ZnT10 は発現していない (Table 2-1)。このうち、RT (reverse-transcription) -PCR により、DT40 細胞の野生株に ZnT2 が発現していないことを確認した結果を示す (Fig. 2-1)。

以上から、細胞質の過剰亜鉛を除去できなくなり、過剰亜鉛の環境において細胞の亜鉛耐性が大きく低下することを期待し、DT40 細胞のニワトリ *ZnT1*、*MT-1,2*、*ZnT4* 遺伝子を欠損させた三重欠損株 (*ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}*) を樹立した。遺伝子欠損に用いたノックアウトベクターのうち、*ZnT1* と *ZnT4* のノックアウトベクターはすでに作成されていたため[69]、*MT-1,2* のノックアウトベクターを作成して使用した (Fig. 2-2)。

Table 2-1. DT40 細胞に発現する *ZnT* の一覧

遺伝子	DT40 細胞における発現
<i>ZnT1</i>	+
<i>ZnT2</i>	-
<i>ZnT3</i>	-
<i>ZnT4</i>	+
<i>ZnT5</i>	+
<i>ZnT6</i>	+
<i>ZnT7</i>	+
<i>ZnT8</i>	-
<i>ZnT10</i>	-

「+」は発現あり、「-」は発現なしを示す。[68]を改変引用。

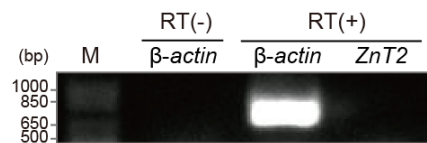


Figure 2-1. ニワトリ DT40 細胞に *ZnT2* は発現していない

ニワトリ DT40 細胞の野生 (WT) 株を用いた RT (reverse-transcription) -PCR の結果を示す。mRNA を回収し逆転写の後、Table 2-2 に示すプライマーを用いて PCR を行いアガロースゲルで泳動した。*β-actin* では 713bp の PCR 産物を検出したが、*ZnT2* では 570bp の PCR 産物は検出されなかった。M は DNA サイズマーカーを示す。

Table 2-2. ニワトリ *ZnT2* の発現確認に用いたプライマー配列

プライマー	塩基配列 (5' - 3')
<i>β-actin</i> -Fw	GATCATGTTTGAGACCTTCAACACCCCAGC
<i>β-actin</i> -Rv	TGCTGATCCACATCTGCTGGAAGGTGGACA
<i>ZnT2</i> -Fw	TCTATGTGGCTGCTGGCATCTGCCTCATCT
<i>ZnT2</i> -Rv	AGAAGAGGAAGGTGCAGATGGGGTCCACAT

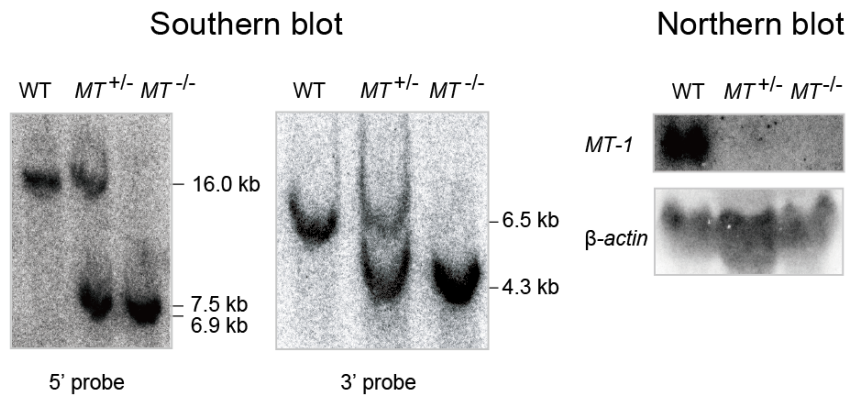
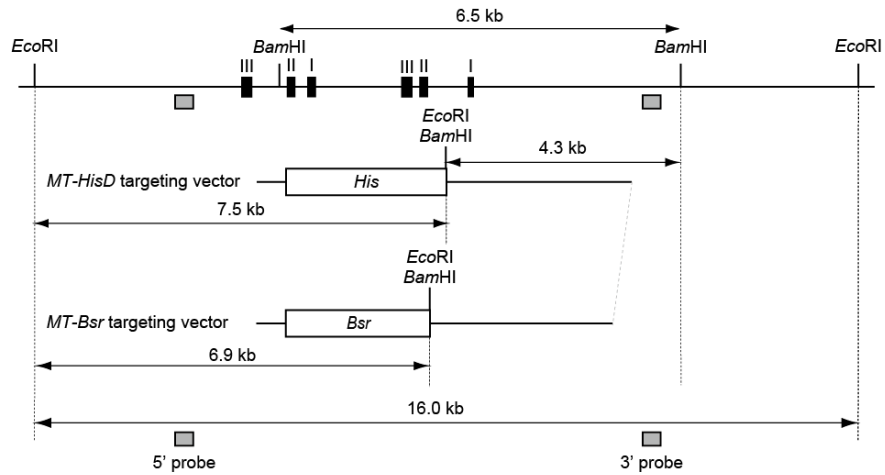


Figure 2-2. *MT-1,2* 遺伝子欠損に用いたノックアウトベクター

ニワトリ *MT-1,2* (メタロチオネイン) のノックアウトベクター図を示す。模式図の■はエクソンを表し、左3つが *MT-1*、右3つが *MT-2* である。ノックアウトベクターは *MT-1* と *MT-2* のエクソンを同時に欠損するように設計した。■は、サザンブロット (Southern blot) で組換え確認のために用いたプローブの位置を示す。5'側の Short arm の組み換えは、ゲノム DNA を *EcoRI* で制限酵素処理し、5' プローブを当てた際に、バンドが 16.0 kb から 7.5 kb と 6.9 kb に変化することで確認した。3'側の Long arm の組み換えは、ゲノム DNA を *BamHI* で制限酵素処理し、3' プローブを当てた際に、バンドが 6.5 kb から 4.3 kb に変化することで確認した。ノザンブロット (Northern blot) は各細胞株を 100 μM ZnSO_4 存在下で 6 時間培養後に回収した全 RNA を用い、ニワトリ *MT-1* cDNA の全長をプローブとして欠損株における *MT-1* の mRNA の消失を確認した。コントロールとして $\beta\text{-actin}$ を用いた。

DT40 細胞の野生 (WT) 株と、各遺伝子を単独欠損させた $ZnT1^{-/-}$ 株、 $MT^{-/-}$ 株、および二重欠損の $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}$ 株、三重欠損の $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株の、過剰亜鉛に対する耐性を評価した。その結果、 $ZnT1^{-/-}$ 株、 $MT^{-/-}$ 株では、過剰亜鉛に対する耐性は WT 株に比べてやや低下した。一方、 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}$ 株では、先行研究の BHK 細胞の二重欠損株と同様に、過剰亜鉛に対する耐性が大きく低下した。 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株は、特に顕著な耐性の低下を示し、WT 株が十分生育可能な $60 \mu\text{M ZnSO}_4$ 存在下で、生育できなくなった (Fig. 2-3A)。

また、細胞質の亜鉛量の変化を評価するため、マウスの *Mt-1* プロモーターを用いたルシフェラーゼレポーター実験を行った。*Mt-1* のプロモーター領域には 5 つの MRE があり、細胞質亜鉛濃度の上昇に応答して核内に移行する転写因子 MTF-1 が結合し、活性化される。このプロモーター領域の下流にホタルルシフェラーゼを接続したプラスミドと、コントロールとして用いたウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミドを、同時に細胞に一過的に発現させ (トランスフェクション)、デュアルレポーターアッセイを行った。細胞質亜鉛濃度の上昇に応じて増加するホタルルシフェラーゼの活性を細胞質亜鉛濃度の指標とし、各細胞の細胞質亜鉛量の相対値を算出した[66,71]。

WT 株と $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株を用いて、ルシフェラーゼレポーター実験を行ったところ、 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株は培地中に添加した ZnSO_4 濃度依存的に、WT 株よりも高いルシフェラーゼ活性の値を示した (Fig. 2-3B)。従って、 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株の細胞質内亜鉛濃度は、WT 株に比べて顕著に増加しており、さらに ZnSO_4 濃度依存的に、著しく上昇することが示された。この細胞質の亜鉛濃度の上昇が、過剰亜鉛に対する $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株の耐性低下の原因と考えられた。

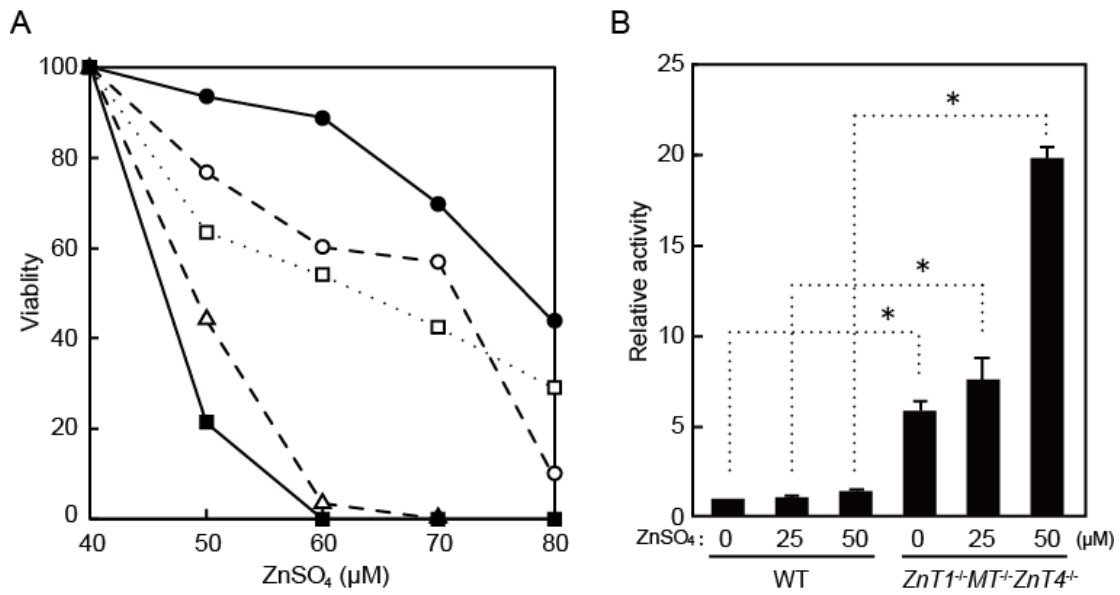


Figure 2-3. *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}*株の亜鉛耐性と細胞質亜鉛量の変化

A. 各遺伝子欠損 DT40 細胞株の過剰亜鉛に対する亜鉛耐性の変化を示す。表記の濃度の ZnSO₄ を添加した培地 1 mL に 1.0×10^4 個の細胞をまき、一定時間培養後に生存細胞数をアラマーブルー染色により計数した。各株の 40 μM ZnSO₄ 存在下における 72 時間後の生存細胞数を基準に、各濃度の生存細胞数の比率を算出した。●: WT 株、○: *MT^{-/-}* 株、□: *ZnT1^{-/-}* 株、△: *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}* 株、■: *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株をそれぞれ示す。実験は 2 連で行い、平均値を示した。

B. レポーター実験による、WT 株と *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株の細胞質亜鉛量の変化を示す。各株にトランスフェクション後、表記の濃度の ZnSO₄ を添加した培地で 24 時間培養した。ZnSO₄ を添加していない WT 株のルシフェラーゼ活性を 1 とし、それぞれの細胞と ZnSO₄ 濃度における比率を算出した。*ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株のルシフェラーゼ活性値は、WT 株より有意に高く、ZnSO₄ 濃度依存的に、顕著に増加した。(n = 3, *P < 0.05)

続いて、 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株に、欠損させた遺伝子に相補的な、ヒト ZnT1 (FLAG-ZnT1)、マウス Mt-1 (Mt-1)、ヒト ZnT4 (ZnT4-HA) をそれぞれ発現させ、各発現株の亜鉛耐性を確認したところ、ZnT1 や Mt-1 の発現株では、90 μ M 以上の $ZnSO_4$ 存在下で、ZnT4 の発現株ではやや弱いものの 70 μ M 程度の $ZnSO_4$ 存在下まで生育可能となった (Table 2-3, Fig. 2-4A)。ZnT1, Mt-1, ZnT4 は、それぞれ細胞質から過剰な亜鉛を取り除き、 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株の過剰亜鉛に対する耐性を回復させたと考えられた。

相補遺伝子の発現による、 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株の細胞質亜鉛量の低下を確認するために、ZnT1 発現 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株と Mt-1 発現 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株を用いて、ルシフェラーゼレポーター実験を行った。

Table 2-3. 相補遺伝子の発現による $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株の亜鉛耐性の回復

細胞	発現 タンパク質	ZnSO ₄ (μ M)					
		50	60	70	80	90	100
WT	-	+++	+++	+++	+++	+++	++
$ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$	-	+++	-			- (> 60 μ M)	
	FLAG-ZnT1	+++	+++	+++	+++	+++	++
	Mt-1	+++	+++	+++	+++	+++	++
	ZnT4-HA	+++	+++	++	-		- (> 80 μ M)

+++：コンフルエントまで増殖 (100%)、++：増殖やや低下 (+++に対し 50-20%)、-：完全に死滅、-> 60 μ M)：60 μ M 以上で完全に死滅、-> 80 μ M)：80 μ M 以上で完全に死滅を示す。表記濃度の $ZnSO_4$ 存在下に細胞を同数ずつまき、72 時間培養後の細胞の生育状態を比較した。 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株は 60 μ M $ZnSO_4$ 存在下で完全に死滅したが、FLAG-ZnT1、Mt-1 をそれぞれ発現させたところ、90 μ M $ZnSO_4$ 存在下でも、コンフルエントまで生育可能になった。また ZnT4-HA 発現 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株も、70 μ M $ZnSO_4$ 存在下まで生育可能になった。

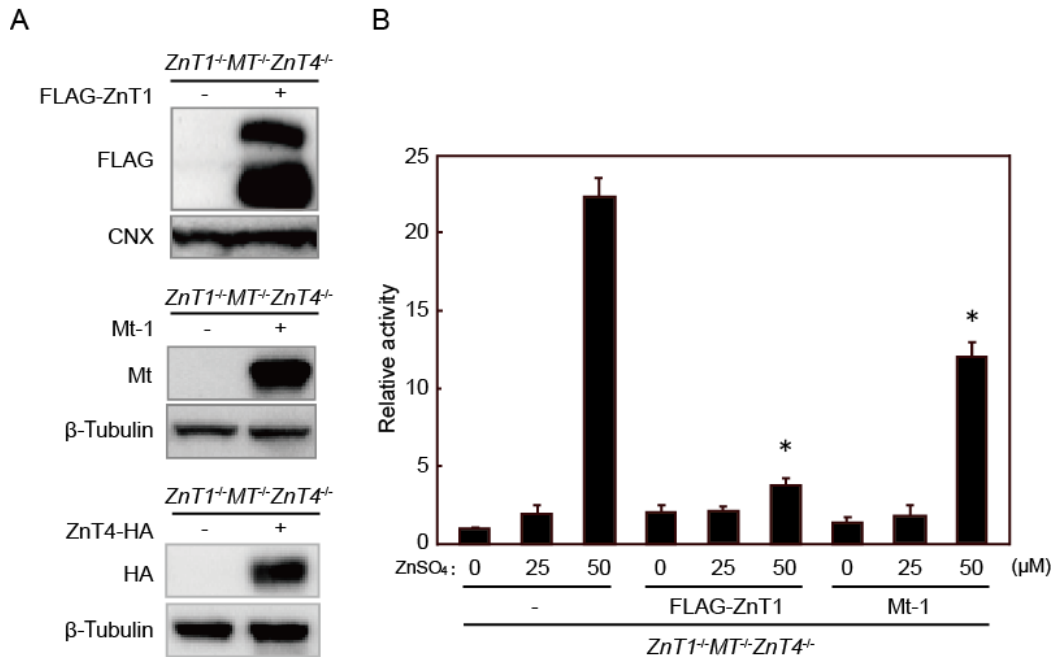


Figure 2-4. 相補遺伝子発現による $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株の細胞質亜鉛量変化

A. $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株に FLAG-ZnT1, Mt-1, ZnT4-HA をそれぞれ発現させ、FLAG 抗体、メタロチオネイン (Mt) 抗体、HA 抗体を用いてイムノブロットで確認した。コントロールとして Calnexin (CNX) あるいは β -Tubulin を用いた。

B. レポーター実験による、 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株と各発現株の細胞質亜鉛量変化を示す。トランスフェクション後、表記濃度の $ZnSO_4$ 添加培地で 24 時間培養した。 $ZnSO_4$ 添加なしの $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株のルシフェラーゼ活性を 1 とし、各細胞の $ZnSO_4$ 各濃度における比率を算出した。 $ZnT1$ 、Mt-1 各発現 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株は、50 μM $ZnSO_4$ 存在下において、 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株より有意に低いルシフェラーゼ活性値を示した。(n = 3, *P < 0.05)

その結果、ZnT1 発現株と Mt-1 発現株は、いずれも 50 μM $ZnSO_4$ 添加培地において、 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株に比べて有意に低いルシフェラーゼ活性の値を示した (Fig. 2-4B)。従って両発現株の、高濃度亜鉛存在下における細胞質亜鉛量は、 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株より低下することが示された。このことから、ZnT1 や Mt-1 は、細胞質から過剰な亜鉛を取り除き、細胞質の亜鉛濃度を低下させ、 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株の亜鉛耐性を回復させたことが示された。

以上から、 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株の亜鉛耐性の変化を指標として、ZnT2 の亜鉛輸送活性を評価できると判断し、解析を行った。

2-2. ZnT2 の亜鉛輸送活性の評価

*ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}*株に、ヒト ZnT2 の野生型 (WT) を発現させ、亜鉛輸送活性を評価した。ZnT2 は細胞質から細胞小胞内へと亜鉛を輸送し、*ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}*株の亜鉛耐性を回復させると予想された。

はじめに、エピトープタグを付加していない ZnT2、または ZnT2 の C 末端に HA タグあるいは FLAG タグを付加した、ZnT2-HA、ZnT2-FLAG をそれぞれ *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}*株に発現させた。その結果、タグを付加していない ZnT2 発現 *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}*株と、ZnT2-HA または ZnT2-FLAG 発現 *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}*株は、いずれも 100 μM ZnSO₄ 存在下まで生育可能になり、予想通り、過剰亜鉛に対する耐性を示した (Table 2-4, Fig. 2-5A)。従って ZnT2 は、*ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}*株において亜鉛輸送活性を発揮し、細胞株の亜鉛耐性を回復させ、また ZnT2 の C 末端へのタグの付加は、亜鉛輸送活性を阻害しないことが示された。

続いて、亜鉛結合部位として ZnT の TMD II と TMD V に保存されており (Fig. 0-2B)、ZnT2 においても亜鉛輸送活性に必須と考えられる、親水性アミノ酸残基をアラニンに置換した変異体、ZnT2 H106A と ZnT2 D227A を作成した。ZnT5 の同位置のアミノ酸をアラニンに置換した変異体は亜鉛輸送活性を失うことが示されており [56]、予想通り、ZnT2-HA H106A または ZnT2-HA D227A を発現させた *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}*株は、ZnT2-HA WT を発現させた株とは異なり、過剰亜鉛に対する耐性を回復しなかった (Table 2-4, Fig. 2-5B)。

Table 2-4. ZnT2 を発現させた *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}*株の亜鉛耐性変化

細胞	発現 タンパク質	ZnSO ₄ (μM)					
		50	60	70	80	90	100
	-	+++	-				- (> 60 μM)
	ZnT2	+++	+++	+++	+++	+++	++
<i>ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}</i>	ZnT2-FLAG	+++	+++	+++	+++	+++	++
	ZnT2-HA	+++	+++	+++	+++	+++	++
	ZnT2-HA H106A	+++	-				- (> 60 μM)
	ZnT2-HA D227A	+++	-				- (> 60 μM)

+++ : コンフルエントまで増殖 (100%)、++ : 増殖やや低下 (+++に対し 50-20%)、+ : 増殖大きく低下 (+++に対し 20%以下)、- : 完全に死滅、- (> 60 μM) : 60 μM 以上で完全に死滅を示す。表記濃度の ZnSO₄ 存在下に細胞を同数ずつまき、72 時間培養後の細胞の生育状態を比較した。

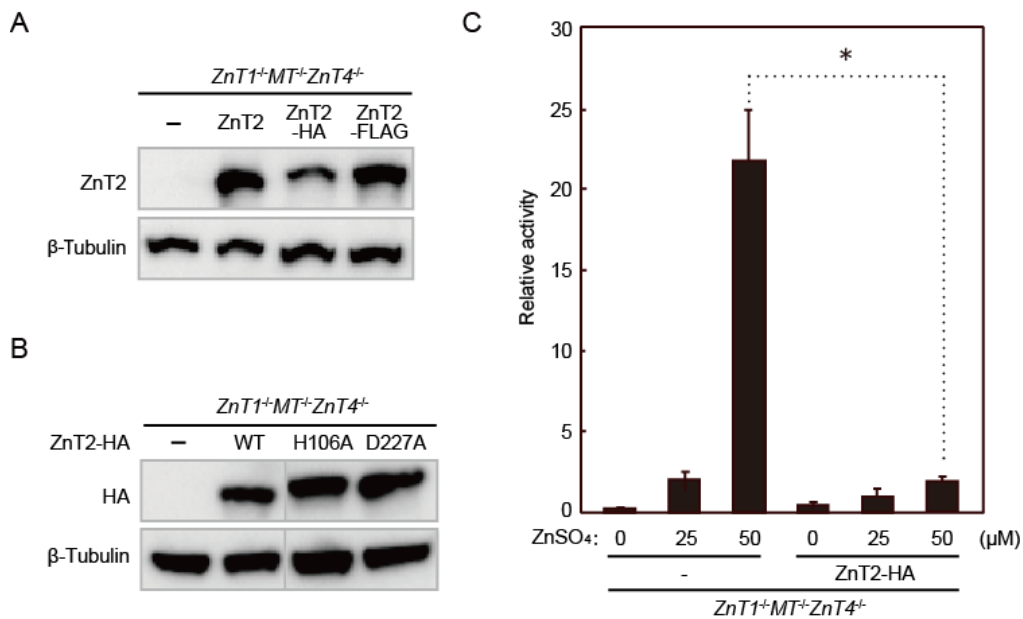


Figure 2-5. ZnT2 タンパク質の発現量および細胞質亜鉛量の変化

A. ZnT2, ZnT2-HA, ZnT2-FLAG を *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株にそれぞれ発現させ、ZnT2 抗体を用いてイムノブロットで確認した。コントロールとして β-Tubulin を用いた。

B. ZnT2-HA の WT および変異体を *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株にそれぞれ発現させ、HA 抗体を用いてイムノブロットで確認した。コントロールとして β-Tubulin を用いた。仕切り線は、画像が同じメンブレン上で同一のイムノブロットから得られたことを示す。

C. レポーター実験による、*ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株と ZnT2-HA WT 発現株の細胞質亜鉛量の変化を示す。トランスフェクション後、表記の濃度の ZnSO₄ を添加した培地で 24 時間培養した。ZnSO₄ 添加なしの *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株のルシフェラーゼ活性を 1 として、比率を算出した。50 μM ZnSO₄ 存在下において、ZnT2-HA WT 発現 *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株は、*ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株より顕著に低いルシフェラーゼ活性の値を示した。(n = 3, *P < 0.05)

続いて、ルシフェラーゼレポーター実験により、ZnT2 WT の発現による細胞質の亜鉛量への影響を確認した。その結果、ZnT2-HA WT 発現株では、50 μ M ZnSO₄ 存在下において、*ZnT1*^{-/-}*MT*^{-/-}*ZnT4*^{-/-}株よりも低いルシフェラーゼ活性値を示し、また ZnSO₄ 濃度依存的な、顕著なルシフェラーゼ活性値の上昇はみられなかった (Fig. 2-5C)。従って ZnT2-HA WT 発現株では、*ZnT1*^{-/-}*MT*^{-/-}*ZnT4*^{-/-}株に比べ細胞質亜鉛量の増加は抑制されると考えられた。*ZnT1*^{-/-}*MT*^{-/-}*ZnT4*^{-/-}株において、発現した ZnT2 WT は、細胞質から細胞小胞内へ亜鉛を輸送することで、細胞質の亜鉛量を低下させ、細胞の亜鉛耐性を回復させたと考えられた。

以上から、*ZnT1*^{-/-}*MT*^{-/-}*ZnT4*^{-/-}株を用いた実験系により、見出した ZnT2 変異体の亜鉛輸送活性を評価できると結論付けた。

第3節 複合ヘテロ接合体で見出された ZnT2 ミスセンス変異の解析

3-1. ZnT2 変異体の亜鉛輸送活性の評価

ZnT1^{-/-}*MT*^{-/-}*ZnT4*^{-/-}株を用いて、症例 I の母親から見出された ZnT2 の W152R と S296L の変異体、および既に低亜鉛母乳を引き起こすと報告されていた ZnT2 H54R と G87R の変異体の亜鉛輸送活性を評価した。既報では、H54R と G87R はともに亜鉛を輸送しないとされていた[23,25]。

各変異体を *ZnT1*^{-/-}*MT*^{-/-}*ZnT4*^{-/-}株に発現させたところ、ZnT2-HA W152R 発現株は亜鉛耐性を回復せず、ZnT2-HA S296L 発現株は亜鉛耐性を回復したものの、ZnT2-HA WT 発現株よりやや弱い結果となった。また、ZnT2-HA H54R 発現株の亜鉛耐性の回復は非常に弱く、ZnT2-HA G87R 発現株では耐性の回復はみられなかった (Fig. 3-1, Table 3-1)。

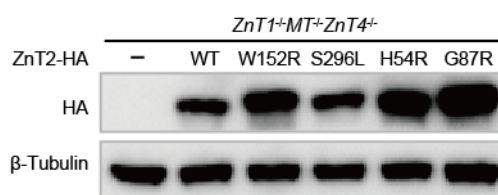


Figure 3-1. ZnT2-HA 変異体タンパク質の発現量

ZnT2-HA の各変異体を *ZnT1*^{-/-}*MT*^{-/-}*ZnT4*^{-/-}株にそれぞれ発現させ、HA 抗体を用いてイムノブロットで確認した。コントロールとして β -Tubulin を用いた。

Table 3-1. ZnT2 変異体を発現させた *ZnT1*^{-/-}*MT*^{-/-}*ZnT4*^{-/-}株の亜鉛耐性変化

細胞	発現 ZnT2-HA	ZnSO ₄ (μ M)					
		50	60	70	80	90	100
<i>ZnT1</i> ^{-/-} <i>MT</i> ^{-/-} <i>ZnT4</i> ^{-/-}	-	+++	-			- (> 60 μ M)	
	WT	+++	+++	+++	+++	+++	++
	W152R	+++	-			- (> 60 μ M)	
	S296L	+++	+++	+++	++	+	-
	H54R	+++	++	+	-		- (> 80 μ M)
	G87R	+++	-			- (> 60 μ M)	

(前頁 Table 3-1 の説明)

+++ : コンフルエントまで増殖 (100%)、++ : 増殖やや低下 (+++に対し 50-20%)、+ : 増殖大きく低下 (+++に対し 20%以下)、- : 完全に死滅、- (> 60 μ M) : 60 μ M 以上で完全に死滅、- (> 80 μ M) : 80 μ M 以上で完全に死滅を示す。表記濃度の ZnSO_4 を添加した培地中に細胞を同数ずつまき、72 時間培養後の細胞の生育状態を比較した。

従って、ZnT2 W152R は亜鉛輸送活性をもたず、また ZnT2 S296L は ZnT2 WT よりわずかに低下するものの、亜鉛輸送活性を保つことが示された。また、ZnT2 H54R の亜鉛輸送活性は非常に弱く、さらに ZnT2 G87R が亜鉛輸送活性をもたないことを示す結果から、 $\text{ZnT1}^{-/-}\text{MT}^{-/-}\text{ZnT4}^{-/-}$ 株の亜鉛耐性の変化を指標とする、ZnT2 各変異体の亜鉛輸送活性の評価結果は妥当であると考えられた。

続いて、ZnT2 W152R または S296L の発現による $\text{ZnT1}^{-/-}\text{MT}^{-/-}\text{ZnT4}^{-/-}$ 株の細胞質亜鉛量の変化を、ルシフェラーゼレポーター実験により確認した。その結果、 $\text{ZnT1}^{-/-}\text{MT}^{-/-}\text{ZnT4}^{-/-}$ 株と ZnT2-HA W152R 発現株では、50 μ M ZnSO_4 存在下において、高いルシフェラーゼ活性の値を示したが、ZnT2-HA WT 発現株と ZnT2-HA S296L 発現株では、値は低下した (Fig. 3-2)。

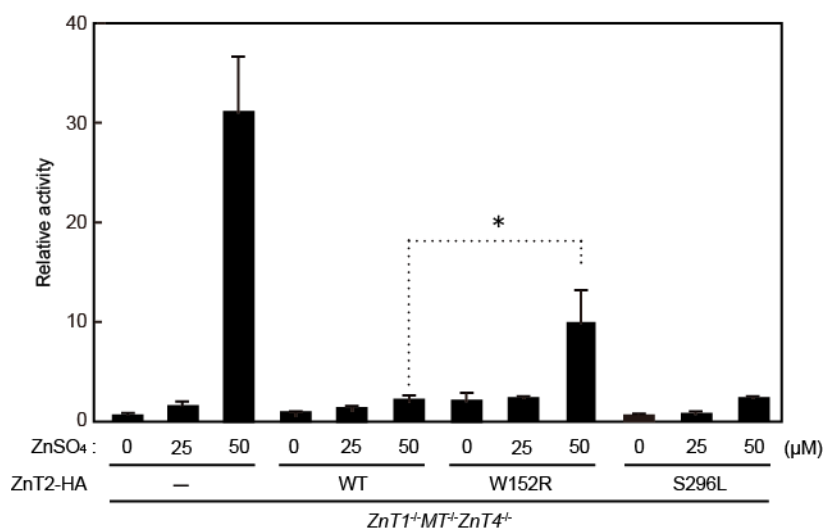


Figure 3-2. ZnT2 W152R は亜鉛輸送活性を失うが、ZnT2 S296L は保つ

レポーター実験による、 $\text{ZnT1}^{-/-}\text{MT}^{-/-}\text{ZnT4}^{-/-}$ 株と ZnT2-HA 各変異体発現株の細胞質亜鉛量の変化を示す。トランスフェクション後、表記の濃度の ZnSO_4 を添加した培地で 24 時間培養した。 ZnSO_4 添加なしの ZnT2-HA WT 発現株のルシフェラーゼ活性を 1 とし、それぞれの細胞と ZnSO_4 濃度における比率を算出した。50 μ M ZnSO_4 存在下において、ZnT2 W152R 発現株は ZnT2 WT に比べて顕著に高いルシフェラーゼ活性の値を示した。(n = 3, *P < 0.05)

レポーター実験の結果から、ZnT2-HA W152R 発現株において、高濃度亜鉛存在下で細胞質亜鉛量の増加が確認された。従って ZnT2 W152R の、細胞質から細胞小胞内への亜鉛輸送活性は、ZnT2 WT に比べて大幅に低下していることが示された。一方、ZnT2-HA S296L 発現株では、ZnT2-HA WT 発現株と同様に、亜鉛濃度依存的な細胞質亜鉛量の増加はみられず、ZnT2 S296L は ZnT2 WT と同様に、細胞質から細胞小胞内へ亜鉛を輸送すると考えられた。以上の結果は、各変異体 ZnT2 発現 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株の、亜鉛耐性変化の結果とも合致した。

$ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株を用いた解析により、ZnT2 W152R は亜鉛輸送活性を示さないが、ZnT2 S296L は亜鉛輸送活性を保っていることが明らかになった。

3-2. ZnT2 W152R と ZnT2 S296L の二量体形成能の評価

ほとんどの ZnT は、ホモ二量体 (ホモ多量体) を形成して亜鉛を輸送し、ZnT2 もホモ二量体を形成することが示されている[25,49]。ZnT2 W152R や ZnT2 S296L が二量体を形成するかどうかを確認するため、ZnT2 WT と各変異体を $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株に二重発現させた細胞株を樹立した。二重発現させる ZnT2 は、それぞれの C 末端に HA タグまたは FLAG タグを融合させ、免疫沈降 (Immunoprecipitation, IP) が可能なように組み合わせた。

まず、ZnT2-HA WT と ZnT2-FLAG WT が相互作用し、二量体を形成することを確認した (Fig. 3-3, lane 2)。次に、ZnT2-HA WT と ZnT2-FLAG S296L との間で、WT 同士よりはやや弱いと考えられるが、二量体形成を確認した (Fig. 3-3, lane 4)。一方、ZnT2-FLAG WT と ZnT2-HA W152R では二量体形成は見られなかった (Fig. 3-3, lane 3)。また、ZnT2-HA W152R と ZnT2-FLAG S296L では、HA 抗体で IP を行い、FLAG 抗体でイムノブロットを行った場合、バンドが観察されたが (Fig. 3-3, lane 5)、二量体形成はほとんど起こらないと考えられた。

以上から、ZnT2 W152R は二量体形成能を有さず、ZnT2 S296L は二量体形成能を保っていることが示された。従って、ZnT2 W152R は ZnT2 WT と二量体を形成しないことから、ZnT2 WT に対してドミナントネガティブ作用を示さないと考えられた。これは、低亜鉛母乳を引き起こす既報の変異のうち、ZnT2 WT に対してドミナントネガティブ作用を示すとされた、ZnT2 G87R とは異なる結果であった。また ZnT2 S296L が二量体形成能を示すことは、亜鉛輸送活性を示すこととも合致した。

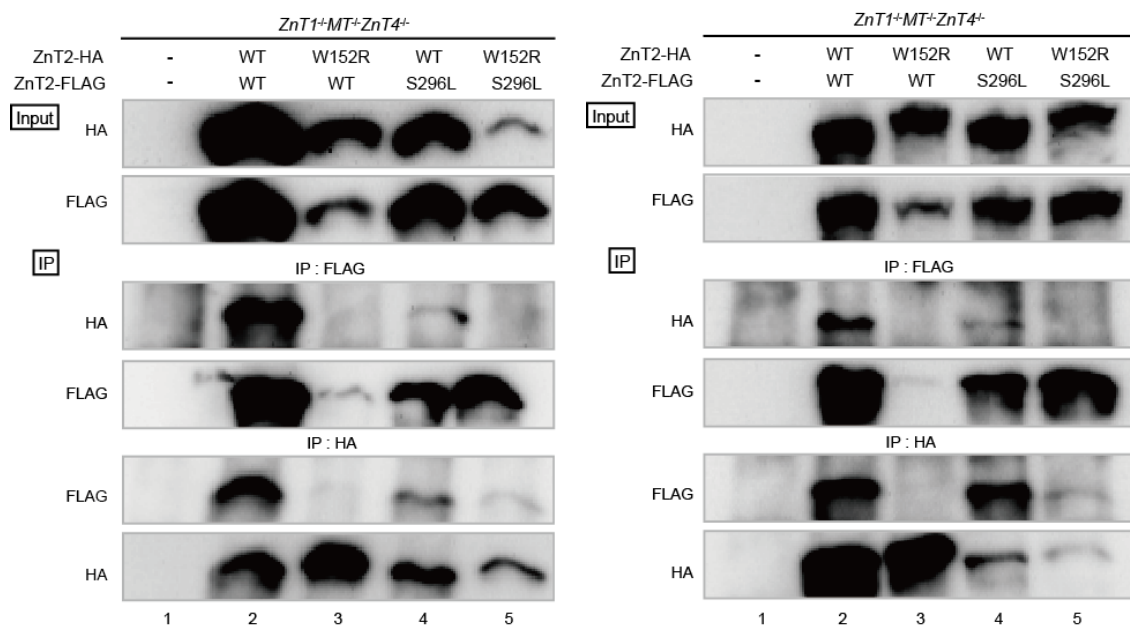


Figure 3-3.

ZnT2 S296L は WT と二量体を形成するが、ZnT2 W152R は形成しない

ZnT2 S296L は ZnT2 WT と二量体形成能を示すが、ZnT2 W152R は二量体形成能を示さない。WT および変異体の ZnT2-HA または ZnT2-FLAG を、*ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株にそれぞれ二重発現させた。200 μ g 分の膜タンパク質を用いて、HA 抗体および FLAG 抗体によって免疫沈降 (IP) を行い、各抗体を用いてイムノブロットで確認した。20 μ g の膜タンパク質を用いて、各細胞株の ZnT2 の発現量をイムノブロットで確認し、Input に示した。実験は 4 回行い、同様の結果を得た。左右は独立の実験結果を示す。

ZnT2 W152R と ZnT2 S296L を見出した症例 I において、乳児の亜鉛欠乏症の発症時期は生後 13 日目と大変早く、母乳亜鉛値も特に顕著に低下していた (生後 4 週の時点で 20 μ g/dL、通常値に対し 90%低下) (Table 1-1)。この母乳中亜鉛量の顕著な減少と、ZnT2 W152R がドミナントネガティブ作用を示さないと考えられる結果から、母乳中亜鉛量の減少を説明する、亜鉛輸送活性や二量体形成能以外の何らかの要因が、ZnT2 S296L にあると考えられた。

3-3. ZnT2 S296L の変異はタンパク質の安定性を低下させる

SOSUI や HMMTOP を用いたタンパク質立体構造予想では、S296L の変異が ZnT2 の立体構造を大きく変化させ、C 末端にもう一つ余分な膜貫通構造を付加させることが示唆された。従って当初、ZnT2 S296L は機能欠失であると予想した。しかし、ZnT2 S296L は亜鉛輸送活性と二量体形成能を示すという実験結果から、機能欠失変異ではないと考えられた。ZnT2 S296L は、WT よりもやや弱い亜鉛輸送活性を示したが、これだけでは母乳中亜鉛量が大きく低下することを説明するには不十分であり、他にも何らかの要因があると考えられた。

本実験系では、ZnT2 タンパク質の発現に、強力なプロモーターである β -アクチンプロモーターを用いていることから、ZnT2 S296L タンパク質の安定性の変化を見逃している可能性が考えられたため、以下の解析を行った。

ZnT2-HA WT 発現 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株および ZnT2-HA S296L 発現 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株の培養中に、以降のタンパク質合成を阻害するシクロヘキシミド (Cycloheximide, CHX) を加えて、経時的に細胞を回収し、イムノブロットで ZnT2 タンパク質量の変化を確認した。その結果、ZnT2 WT のタンパク質量には、シクロヘキシミド処理後 4 時間まで大きな変化はみられなかったが、ZnT2 S296L のタンパク質量には、顕著な減少がみられた (Fig. 3-4A)。イムノブロットのバンドの強度を定量化したところ、ZnT2 WT のタンパク質量はほとんど変化しないが、ZnT2 S296L のタンパク質量は、シクロヘキシミド処理後 4 時間で、開始時に比べて約 10% まで減少していた (Fig. 3-4B)。従って、ZnT2 S296L のタンパク質安定性は、ZnT2 WT に比べて大幅に低下していると考えられた。

続いて、コントロールとして DMSO、またはプロテアソーム阻害剤 MG132、あるいは V 型 ATP アーゼを阻害してリソソーム経路のタンパク質分解を阻害するバフィロマイシン A1 を加えた 2 時間後に、同様にシクロヘキシミド処理を行い、ZnT2 タンパク質量を定量化した。

ZnT2-HA S296L 発現 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株を用いて、阻害剤処理の実験を行った結果、コントロールの DMSO を加えた場合には、ZnT2 S296L タンパク質量の減少が確認されたが、MG132 またはバフィロマイシン A1 を加えた場合には、ZnT2 S296L タンパク質量の減少は抑制された (Fig. 3-5A, B)。

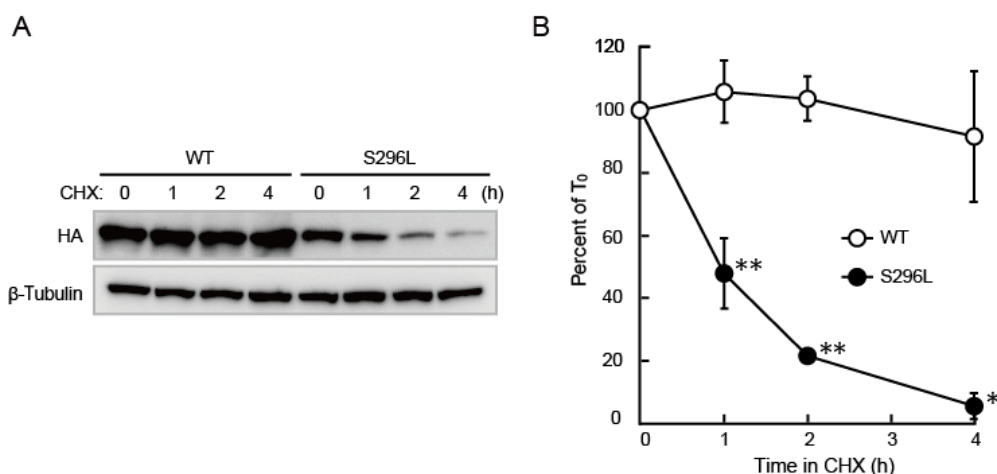


Figure 3-4. ZnT2 S296L はタンパク質の安定性を大幅に低下させる

A. ZnT2-HA WT および S296L 発現 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株を、シクロヘキシミド (CHX) で処理開始後、表記の時点で細胞を回収し、タンパク質をイムノブロットで確認した。コントロールに β -Tubulin を用いた。

B. イムノブロットの結果からタンパク質を定量化した。ZnT2-HA のバンド強度を、コントロールの β -Tubulin のバンド強度で割り、CHX 処理開始時の値 (T_0) を 100% として、各時点の比率を算出した。CHX 処理開始後 4 時間で、ZnT2 S296L のタンパク質量は処理開始時の 10% 程度に低下した。(n = 3, * P < 0.05, ** P < 0.01)

従って、ZnT2 S296L はユビキチン・プロテアソーム経路およびリソソームを介するタンパク質分解経路で分解されていると考えられた。分解経路の阻害により、ZnT2 S296L タンパク質量の減少が抑えられたことから、シクロヘキシミド処理による ZnT2 S296L のタンパク質量の減少は、タンパク質安定性の低下によるものと考えられた。

ミスセンス変異によるタンパク質発現レベルの低下が、亜鉛トランスポーターによる亜鉛輸送に影響する報告としては、ZIP4 のミスセンス変異によって引き起こされる腸性肢端皮膚炎 (AE) が知られる[18]。従って ZnT2 S296L は、亜鉛輸送活性は保っているものの、変異によって ZnT2 WT に比べてタンパク質の安定性が大幅に低下しており、生体内では急速に分解されるため、乳腺上皮細胞において母乳中への亜鉛輸送を十分に行えないと考えられた。

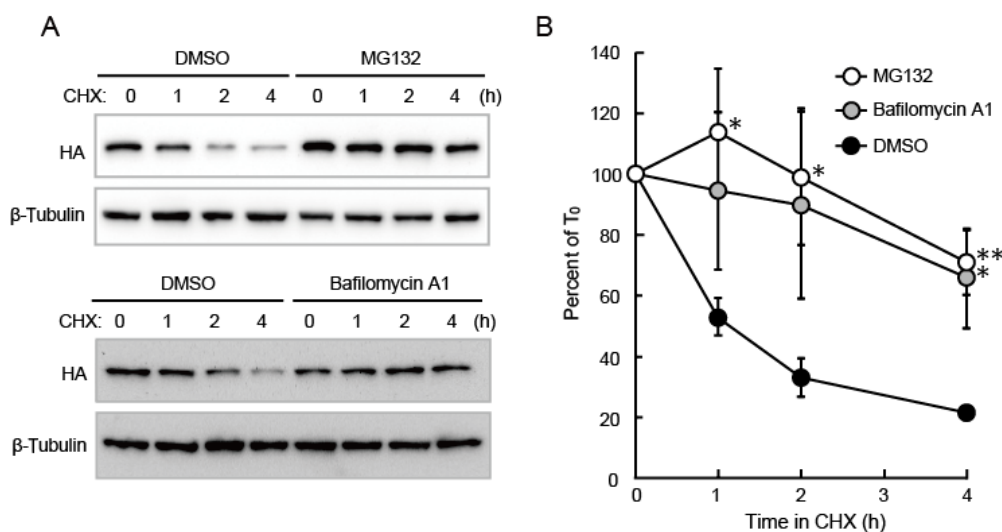


Figure 3-5.

MG132 と Bafilomycin A1 は ZnT2 S296L タンパク質の分解を抑制する

A. プロテアソーム阻害剤 MG132 およびリソソーム阻害剤バフィロマイシン A1 (Bafilomycin A1) は、ZnT2 S296L のタンパク質の分解を抑制する。シクロヘキシミド (CHX) 処理開始後、各時点におけるタンパク質量をイムノブロットで確認した。コントロールに β -Tubulin を用いた。

B. ZnT2-HA S296L のバンド強度をコントロールの β -Tubulin のバンド強度で割り、CHX 処理開始時の値 (T_0) を 100%として各時点の比率を算出した。(n = 3, * P < 0.05, ** P < 0.01)

以上の結果から、母親の *ZnT2* 遺伝子が、亜鉛輸送活性と二量体形成能をもたず、ドミナントネガティブ作用を示さない W152R と、亜鉛を輸送輸送活性と二量体形成能を保っているが、タンパク質が著しく不安定になっている S296L の複合ヘテロ接合体であるために、症例 I の母乳中亜鉛量の著しい減少が生じたと結論づけた。

3-4. ZnT2 W152R の変異はタンパク質安定性を低下させる

亜鉛輸送活性を示さなかった ZnT2 W152R についても、ZnT2 S296L と同様に、タンパク質の発現量の変化を見過ごしている可能性が考えられたため、シクロヘキシミド処理により、タンパク質安定性を評価した。その結果、ZnT2 W152R のタンパク質安定性は、ZnT2 S296L と同レベル（処理開始後 4 時間で、開始時点の 10%以下）まで、顕著に低下していることが判明した（Fig. 3-6）。従って ZnT2 W152R は、亜鉛輸送活性を失うとともに、タンパク質安定性の低下も起こしていることが示された。

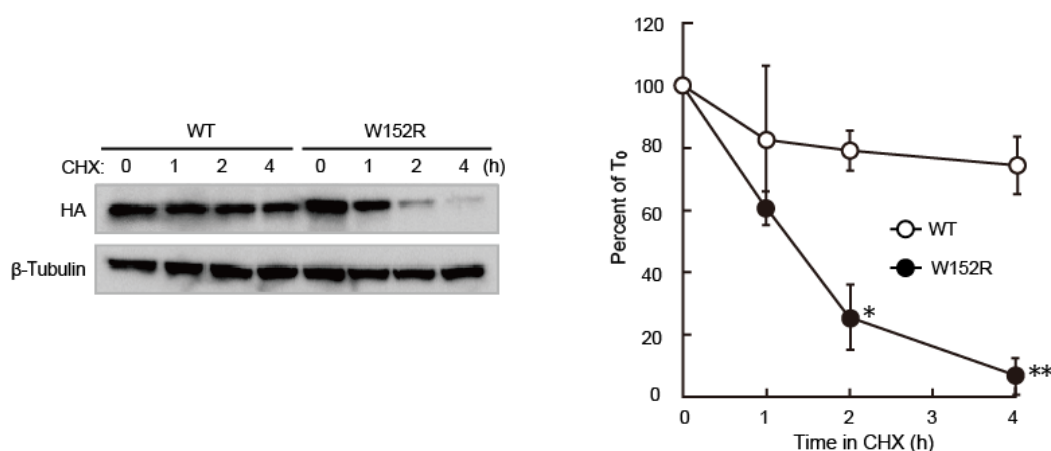


Figure 3-6. ZnT2 W152R のタンパク質安定性は低下する

ZnT2-HA WT および W152R 発現株を、シクロヘキシミド (CHX) で処理した。各時点におけるタンパク質量をイムノブロットで確認し、コントロールとして β -Tubulin を用いた。また、イムノブロットの結果からタンパク質量を定量化した。ZnT2-HA のバンド強度を、コントロールの β -Tubulin のバンド強度で割り、CHX 処理開始時の値 (T_0) を 100%として、各時点の比率を算出した。(n = 3, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

3-5. ZnT2 H54R と G87R の変異はタンパク質安定性を低下させる

低亜鉛母乳を引き起こす、既報の ZnT2 H54R と G87R を $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株により解析した結果、H54R は亜鉛輸送活性が顕著に低下し、G87R は亜鉛輸送活性を完全に失った (Table 3-1)。両変異についても、タンパク質安定性を評価するため、各変異体発現株を用いて、シクロヘキシミド処理を行った。その結果、ZnT2 H54R のタンパク質量は処理 4 時間で開始時点の約 25% (Fig. 3-7A)、G87R では処理 8 時間で約 20%になった (Fig. 3-7B)。従って、ZnT2 H54R および G87R のタンパク質安定性は、ZnT2 WT よりも低下していることが示された。

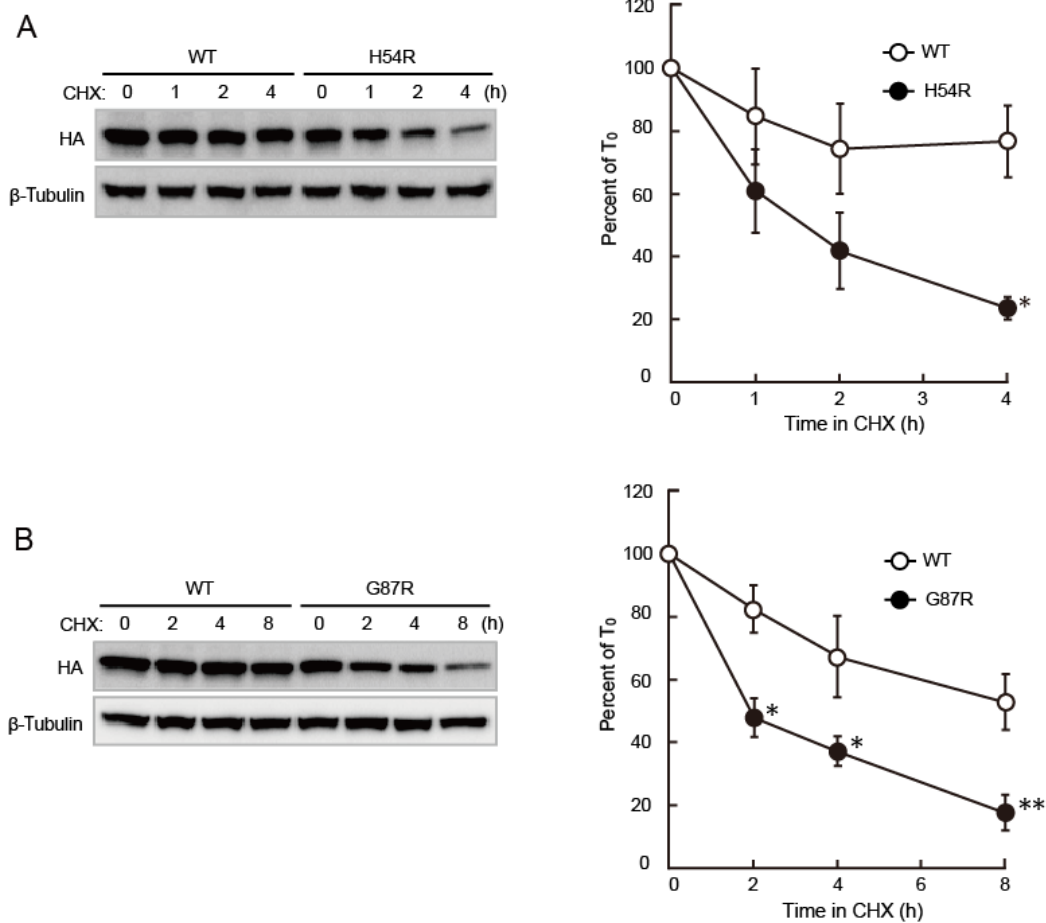


Figure 3-7. ZnT2 H54R および G87R のタンパク質安定性は低下する

A. ZnT2-HA WT および ZnT2-HA H54R の各発現株を、シクロヘキシミド (CHX) で処理した。各時点におけるタンパク質量をイムノブロットで確認し、コントロールとして β -Tubulin を用いた。ZnT2-HA のバンド強度を、コントロールの β -Tubulin のバンド強度で割り、CHX 処理開始時の値 (T_0) を 100%として、各時点の比率を算出した。

(n = 3, * $P < 0.05$)

B. 同様に、ZnT2-HA WT および ZnT2-HA G87R の各発現株による解析結果を示す。

(n = 3, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

以上から、低亜鉛母乳を引き起こす ZnT2 のミスセンス変異は、亜鉛輸送活性の低下だけでなく、タンパク質安定性の低下も引き起こすことが示唆された。

第 4 節 ヘテロ接合体で見出された 3 つの ZnT2 ミスセンス変異の解析

4-1. c.838G>A の変異はイントロン 6 のスプライシング効率を低下させる

症例 II, III, IV の母親 *ZnT2* 遺伝子にヘテロ接合体で見出された、c.838G>A (p.G280R)、c.935C>T (p.T312M)、c.1063G>C (p.E355Q) の 3 つの変異について、*ZnT2* の機能への影響を解析した。

見出した変異のうち、c.838G>A はエクソン 6 の 3'末端に位置しており、イントロン 6 をはさんでエクソン 7 の 5'末端の 2 塩基とコドン構成していた (Fig. 1-2B)。c.838G>A は、変異の前後で U-2 型イントロンのコンセンサス配列を維持していたが[72]、変異がイントロン 6 のスプライシングに影響する可能性が考えられた。そこで、スプライシング効率を解析するため、イントロン 6 (1787bp) を含む *ZnT2* cDNA の発現プラスミド {c.838G (WT) と c.838A (mut) の 2 種類} を作成した (Fig. 4-1)。*ZnT2* 配列の C 末端には HA タグを付加した。

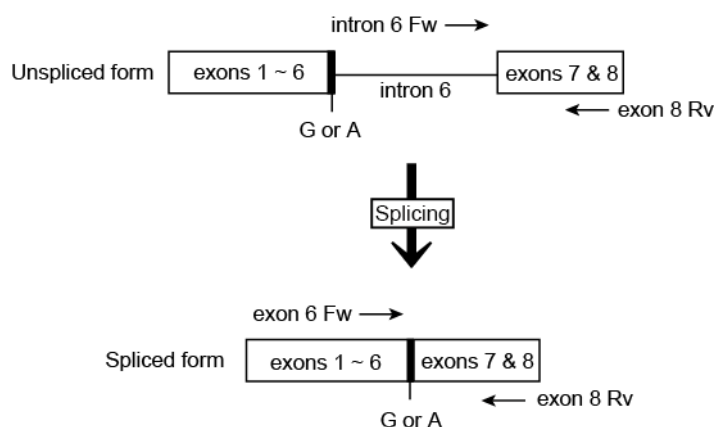


Figure 4-1. イントロン 6 のスプライシングの概略図

c.838G (WT) あるいは c.838A (mut) は、エクソン 6 の 3'末端に位置する。スプライシング効率の判定のため、RT (reverse-transcription) -PCR に用いたプライマー (intron 6 Fw, exon 6 Fw, exon 8 Rv) の位置を矢印で示した。

Table 4-1. スプライシング効率判定の RT-PCR に用いたプライマー配列

プライマー	塩基配列 (5' -3')
intron 6 Fw	GACACCTGAGGATCAGGAGCCAGCCCTGCA
exon 6 Fw	CCTGACCATCCTGAGAGATGTGATCCTGG
exon 8 Rv	CTCCGAGTAGTCCTTGATCTGGATGGT

プラスミドを $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株に一過的に発現（トランスフェクション）させ、mRNA を回収後、Table 4-1 に示したプライマーを用いて、半定量 RT (reverse-transcription) -PCR を行った。その結果、c.838A (mut) では c.838G (WT) に対しスプライシング効率が約 4 分の 1 に低下していた (Fig. 4-2A)。

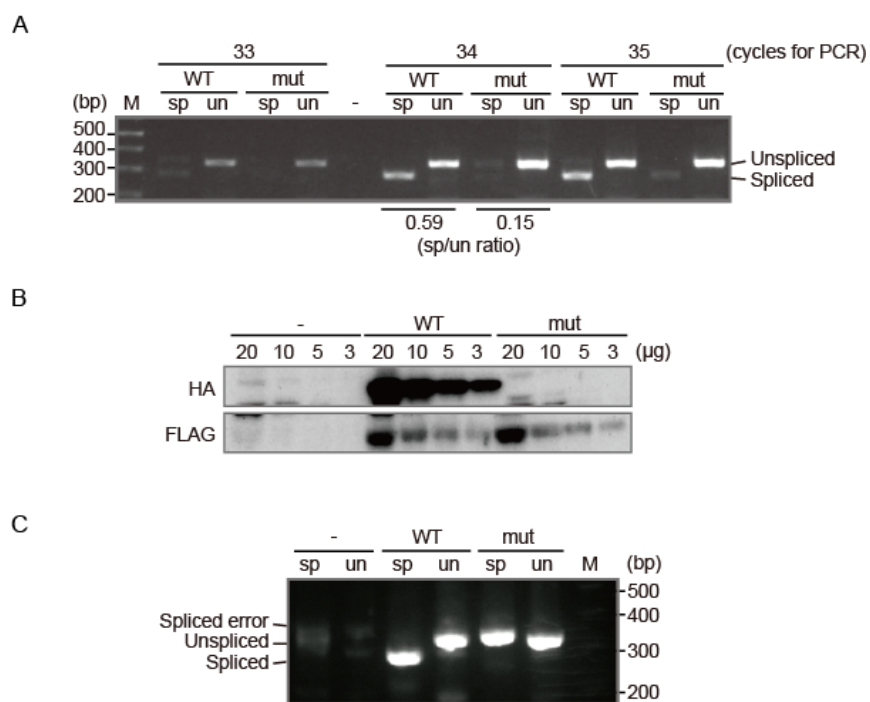


Figure 4-2.

c.838G>A の変異によりイントロン 6 のスプライシング効率は低下する

A. 半定量 RT (reverse-transcription) -PCR の結果を示す。 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株にイントロン 6 の配列を含んだ ZnT2-HA 発現プラスミドをトランスフェクションし、mRNA を回収した。逆転写の後、Table 4-1 に示したプライマーによって PCR (サイクル数 : 33, 34, 35 回) を行い、3%アガロースゲルで泳動した。非スプライシング mRNA から生じる PCR 産物 (un, unspliced) は 330bp、スプライシング mRNA から生じる PCR 産物 (sp, spliced) は 281bp である。PCR サイクル数 34 回の結果から、WT と mut の sp/un 比率を比較したところ、mut のスプライシング効率は WT に対し約 4 分の 1 に低下した。M は DNA サイズマーカー、- は PCR ブランクである。

B. HeLa 細胞に、イントロン 6 の配列を含んだ WT または mut の ZnT2-HA 発現プラスミドと、トランスフェクション効率のコントロールとして FLAG-マウス Znt5 発現プラスミドを、同時にトランスフェクションした。細胞を回収し、タンパク質量 (μg) を変えて SDS-PAGE し、HA 抗体あるいは FLAG 抗体を用いて、イムノプロットを行った。c.838G (WT) では ZnT2-HA の発現を確認できたが、c.838A (mut) では発現を確認できなかった。- はプラスミドトランスフェクションを行っていないネガティブコントロールである。

(前頁 Fig. 4-2 の説明の続き)

C. **B.**と同時に回収した Hela 細胞による RT (reverse-transcription) -PCR の結果を示す。mRNA を回収し逆転写の後、**A.**と同様に PCR (サイクル数: 35 回) を行い、3%アガロースゲルで泳動した。PCR (un) では、c.838G (WT) と c.838A (mut) とともに 330bp の PCR 産物 (Unspliced) を得た。一方、スプライシング mRNA を検出する PCR (sp) では、c.838G (WT) において正常な長さの 281bp の PCR 産物 (Spliced) を得たのに対し、c.838A (mut) では、より長いスプライシングエラーと考えられる 345bp の PCR 産物 (Spliced error) を得た。M は DNA サイズマーカー、- はプラスミドトランスフェクションを行っていないネガティブコントロールである。

続いて HeLa 細胞を用いて、同様にプラスミドをトランスフェクションし、イムノブロットと RT-PCR を行った。HA 抗体を用いたイムノブロットにおいて、c.838G (WT) では ZnT2-HA タンパク質の発現を確認できたが、c.838A (mut) では確認できなかった (Fig. 4-2B)。また、RT-PCR において、c.838G (WT) では正常なスプライシング mRNA から生じた PCR 産物 (281bp) を得た。一方、c.838A (mut) では、281bp の PCR 産物は確認できなかったが、スプライシングエラーの mRNA から生じたと考えられる、より長い PCR 産物 (345bp) を得た (Fig. 4-2C)。この 345bp の PCR 産物をシーケンスしたところ、c.838G>A の変異は、スプライシング部位を 3' 方向に移動させることが判明した。スプライシングエラーの mRNA では、エキソン 6 とエキソン 7 の間に、本来除去されるイントロン 6 が 64bp 入り込み、ZnT2 G280SfsX17 (ZnT2 タンパク質の 280 番目のアミノ酸がグリシンからセリンに変異し、そこから 17 番目が終止コドンとなる) のフレームシフト変異を引き起こし、C 末端を有さない ZnT2 タンパク質を生じさせると考えられた。従って、Hela 細胞の解析結果から、c.838G>A の変異は、スプライシングに異常を引き起こし、正常な ZnT2 タンパク質の発現を抑えることが示唆された。

以上の結果から、c.838G>A の変異は、スプライシングの効率低下あるいは異常を引き起こし、イントロン 6 が正確にスプライシングされた mRNA の量は減少すると考えられた。ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}株の解析において、ZnT2 G280R タンパク質を産生すると考えられる mRNA が検出できたことから (Fig. 4-2A)、引き続き ZnT2 G280R のタンパク質レベルの解析も行った。

4-2. ZnT2 変異体の亜鉛輸送活性の評価

ZnT2 G280R, T312M, E355Q の各変異体の亜鉛輸送活性を、*ZnT1*^{-/-}*MT*^{-/-}*ZnT4*^{-/-}株を用いて評価した。

各変異体の ZnT2-HA を発現させた *ZnT1*^{-/-}*MT*^{-/-}*ZnT4*^{-/-}株において、亜鉛耐性の回復は認められなかった (Fig. 4-3, Table 4-2)。従って、ZnT2 G280R, T312M, E355Q は、いずれも亜鉛輸送活性をもたないと考えられた。

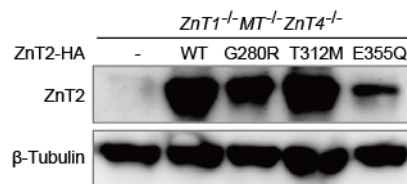


Figure 4-3. ZnT2 タンパク質の発現量

ZnT2-HA WT, G280R, T312M, E355Q を *ZnT1*^{-/-}*MT*^{-/-}*ZnT4*^{-/-}株にそれぞれ発現させ、ZnT2 抗体を用いてイムノブロットで確認した。コントロールとして β-Tubulin を用いた。

Table 4-2.

細胞	発現 ZnT2-HA	ZnSO ₄ (μM)					
		50	60	70	80	90	100
<i>ZnT1</i> ^{-/-} <i>MT</i> ^{-/-} <i>ZnT4</i> ^{-/-}	-	+++	-				- (> 60 μM)
	WT	+++	+++	+++	+++	+++	++
	G280R	+++	-				- (> 60 μM)
	T312M	+++	-				- (> 60 μM)
	E355Q	+++	-				- (> 60 μM)

+++ : コンフルエントまで増殖 (100%)、++ : 増殖やや低下 (+++に対し 50-20%)、+ : 増殖大きく低下 (+++に対し 20%以下)、- : 完全に死滅、- (> 60 μM) : 60 μM 以上で死滅を示す。表記濃度の ZnSO₄ 存在下に細胞を同数ずつまき、72 時間培養後の細胞の生育状態を比較した。母親から見出された ZnT2 G280R, T312M, E355Q はいずれも亜鉛輸送活性を示さなかった。

続いて、ZnT2 によって細胞質から細胞小胞内へ輸送される亜鉛量を評価するため、細胞小胞内の亜鉛イオンを特異的に検出可能な、亜鉛蛍光試薬 Zinpyr-1 を用いて、フローサイトメトリー解析を行った[73]。

$ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株および各変異体 $ZnT2$ -HA 発現 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株を、通常培地または $30 \mu\text{M}$ $ZnSO_4$ 添加培地で培養して回収し、遮光下で $5 \mu\text{M}$ Zinpyr-1 により 30 分処理した。フローサイトメーターにより Zinpyr-1 の蛍光強度を測定し、同一細胞株において $ZnSO_4$ の添加の有無で、変化がみられるかどうかを確認した。その結果、 $ZnT2$ -HA WT 発現 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株では、亜鉛添加培地で培養した細胞において、通常培地で培養した細胞よりも Zinpyr-1 の蛍光強度の増加がみられた。一方、 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株では変化がみられなかった (Fig. 4-4)。

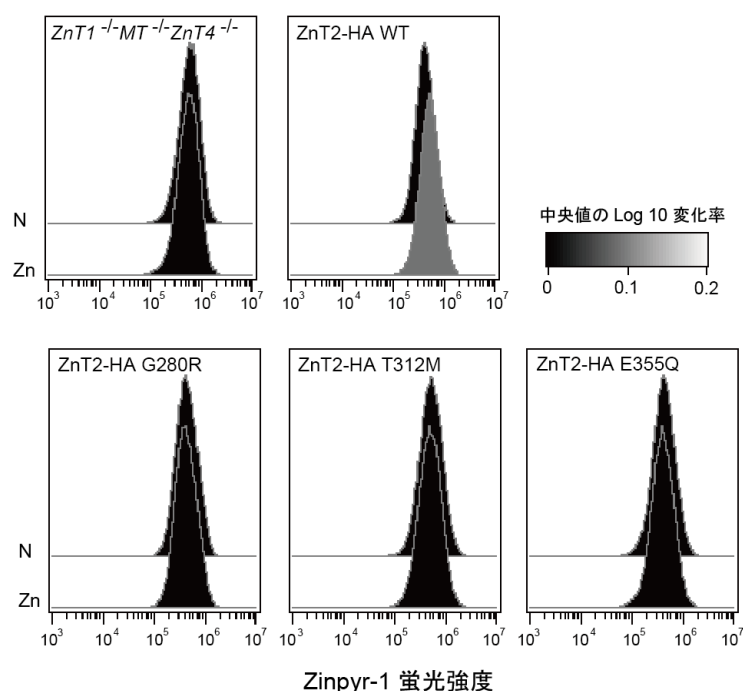


Figure 4-4.

Zinpyr-1 を用いた $ZnT2$ WT, G280R, T312M, E355Q の亜鉛輸送活性の評価

$ZnT2$ -HA WT, G280R, T312M, E355Q の亜鉛輸送活性をフローサイトメトリーにより解析した。各細胞株を通常培地 (N) または $30 \mu\text{M}$ $ZnSO_4$ 添加培地 (Zn) で 48 時間培養後、 2.0×10^6 個の細胞を $5 \mu\text{M}$ の亜鉛蛍光試薬 Zinpyr-1 で 30 分間処理し、フローサイトメーターにより蛍光を測定した。 $ZnT2$ -HA WT 発現株では、亜鉛添加による Zinpyr-1 の蛍光強度の増加を確認した。一方、 $ZnT2$ -HA G280R, T312M, E355Q の各変異体発現株では、 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株と同じく蛍光強度の増加はみられなかった。実験は 3 回行い、いずれも同様の結果を得た。

Table 4-3. ZnT2 G280R, T312M, E355Q は亜鉛輸送活性を示さない

細胞	発現 ZnT2-HA	Zinpyr-1 蛍光強度の比率
	-	0.91±0.04
	WT	1.24±0.04 *
<i>ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}</i>	G280R	0.91±0.04
	T312M	0.92±0.03
	E355Q	0.91±0.02

Fig. 4-4 の解析結果から、各細胞株の 30 μ M ZnSO₄ 亜鉛添加培地での Zinpyr-1 蛍光強度の中央値を、通常培地での Zinpyr-1 蛍光強度の中央値で割り、蛍光強度の比率を求めた。*ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株に対し、ZnT2-HA WT 発現株における Zinpyr-1 蛍光強度の増加は有意であった。一方、ZnT2-HA G280R, T312M, E355Q の各発現株では、*ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株と比べて有意な差はみられなかった。3 回行った実験の、平均比率と標準偏差を示す。(n = 3, *P < 0.05)

ZnT2-HA WT 発現株における蛍光強度の増加は、*ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株と比較して有意であった (Table 4-3)。Zinpyr-1 は細胞小胞内の亜鉛イオンを検出することから、本解析における Zinpyr-1 の蛍光強度の増加は、発現させた ZnT2-HA WT により、亜鉛が細胞質から細胞小胞内へと輸送され、小胞内の亜鉛が増加したことを反映していると考えられた[40,74]。

同様に、ZnT2-HA G280R, T312M, E355Q 発現 *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株を解析したところ、いずれの発現株においても Zinpyr-1 の蛍光強度の増加はみられず、*ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株と比較しても変化はなかった (Fig. 4-4, Table 4-3)。従って、各変異体 ZnT2 発現株において、細胞小胞内の亜鉛の増加がみられなかったことから、ZnT2 G280R, T312M, E355Q は、細胞小胞内への亜鉛輸送を行わないと考えられた。

発現株の亜鉛耐性変化と、フローサイトメトリーによる細胞小胞内の亜鉛蓄積量の解析結果から、ZnT2 G280R, T312M, E355Q は、いずれも亜鉛輸送活性をもたないことが示された。

4-3. ZnT2 G280R, T312M, E355Q のタンパク質安定性の評価

これまでに見出された低亜鉛母乳を引き起こす ZnT2 変異体は、すべてタンパク質安定性が低下していた (Fig. 3-4, Fig. 3-6, Fig. 3-7)。そこで ZnT2 G280R, T312M, E355Q についても、シクロヘキシミド処理によってタンパク質安定性を評価した。

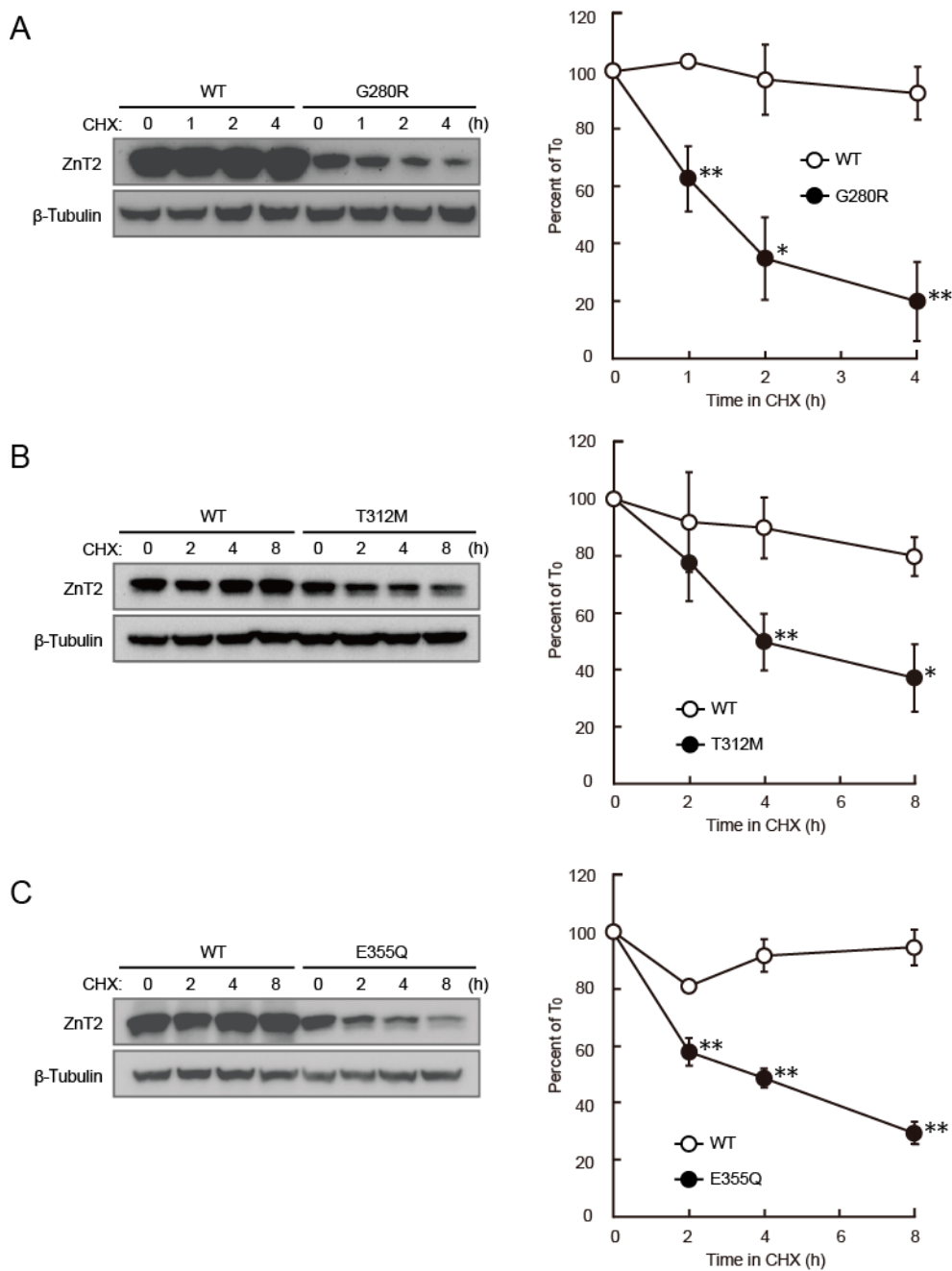


Figure 4-5. ZnT2 G280R, T312M, E355Q のタンパク質安定性は低下する
(次頁に説明)

(前頁 Fig. 4-5 の説明)

- A.** ZnT2-HA WT および G280R の各発現株を、シクロヘキシミド (CHX) で処理した。各時点におけるタンパク質量をイムノブロットで確認し、コントロールとして β -Tubulin を用いた。各時点の ZnT2-HA のバンド強度を、 β -Tubulin のバンド強度で割り、CHX 処理開始時の値 (T_0) を 100% として、各時点の比率を算出した。(n = 3, * P < 0.05, ** P < 0.01)
- B.** ZnT2-HA WT および T312M の各発現株による解析結果を示す。(n = 3, * P < 0.05, ** P < 0.01)
- C.** ZnT2-HA WT および E355Q の各発現株による解析結果を示す。(n = 3, ** P < 0.01)

シクロヘキシミド処理開始後 4 時間で、ZnT2 G280R のタンパク質量は開始時点の約 25% になり、顕著な減少が確認された (Fig. 4-5A)。ZnT2 T312M と E355Q では、処理後 8 時間で 40% 程度にまで減少した (Fig. 4-5B, C)。これにより、各変異体 ZnT2 のタンパク質安定性は、ZnT2 WT に比べ低下することが示された。

以上の結果から、ZnT2 G280R は、変異 (c.838G>A) によってスプライシング効率が低下し、正常な mRNA 量が減少するのみならず、タンパク質自体も亜鉛輸送活性をもたず、その安定性も顕著に低下していることが明らかになった。また ZnT2 T312M と ZnT2 E355Q は、亜鉛輸送活性を有さず、タンパク質安定性も低下していることが示された。

4-4. ZnT2 G280R, T312M, E355Q の二量体形成能の評価

ZnT2 G280R, T312M, E355Q が二量体を形成するかどうかを確認するため、ZnT2 の WT と各変異体を $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株に二重発現させた細胞株を樹立し、免疫沈降 (IP) を行った。

ZnT2 WT と ZnT2 変異体の IP と同時に、コントロールとして ZnT2-HA WT と ZnT2-FLAG WT の IP も行った。その結果、ZnT2-HA WT と ZnT2-FLAG G280R との間 (Fig. 4-6 左)、ZnT2-FLAG WT と ZnT2-HA T312M との間 (Fig. 4-6 中央)、ZnT2-HA WT と ZnT2-FLAG E355Q との間 (Fig. 4-6 右) のいずれにおいても、WT 同士と同様の、二量体形成を確認した。

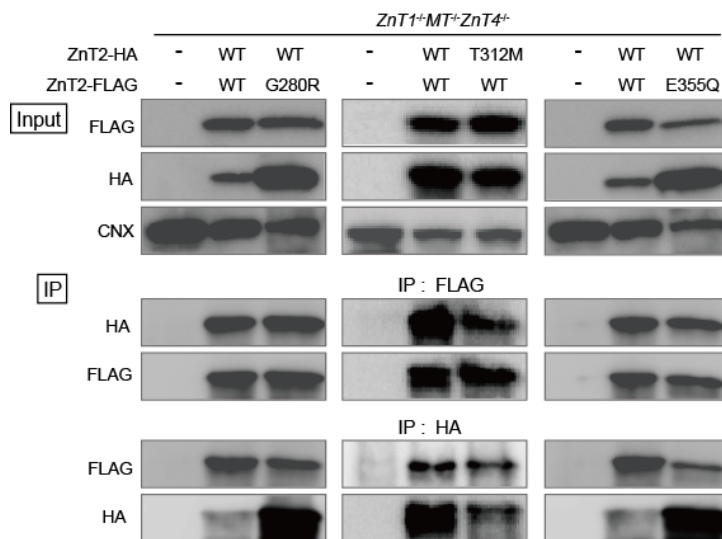


Figure 4-6. ZnT2 G280R, T312M, E355Q は ZnT2 WT と二量体を形成する

各変異体はいずれも ZnT2 WT との二量体形成能を維持する。WT および各変異体の ZnT2-HA または ZnT2-FLAG を、ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}株に二重発現させた。150 μg の膜タンパク質を用いて、HA 抗体および FLAG 抗体により免疫沈降 (IP) を行い、各抗体を用いてイムノブロットで確認した。15 μg の膜タンパク質を用いて、ZnT2 の発現量をイムノブロットで確認し、Input に示した。コントロールには Calnexin (CNX) を用いた。実験は 3 回繰り返し、同一の結果を得た。

従って、ZnT2 G280R, T312M, E355Q はいずれも亜鉛輸送活性をもたず、ZnT2 WT と二量体を形成することから、ZnT2 WT に対してドミナントネガティブ作用を有する可能性が示された。

4-5. ZnT2 G280R, T312M, E355Q のドミナントネガティブ作用の評価

低亜鉛母乳を引き起こす既報の ZnT2 変異体のうち、ZnT2 G87R は先行研究において、ZnT2 WT に対しドミナントネガティブ作用を示すことが報告されていた[25,49]。また、ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}株を用いた解析結果において、ZnT2-HA G87R は亜鉛輸送活性を示さなかった (Table 3-1)。ZnT2 G280R, T312M, E355Q のドミナントネガティブ作用の有無を調べるため、ZnT2 WT と各変異体の二重発現株を用いて、ZnT2 G87R との比較解析を行った。

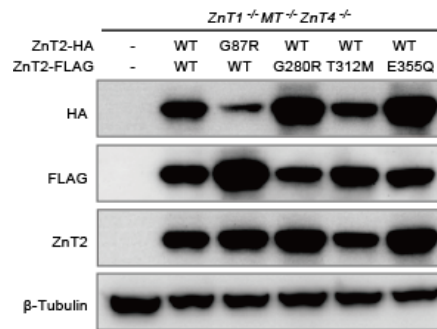


Figure 4-7. 二重発現株の ZnT2 タンパク質の発現量

各細胞株の ZnT2 WT と ZnT2 変異体の発現量を、同一メンブレンで HA 抗体、FLAG 抗体、ZnT2 抗体を用い、イムノブロットで確認した。コントロールとして β -Tubulin を用いた。

ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-} 株に ZnT2 G87R と ZnT2 WT を二重発現させた株 (G87R-HA+WT-FLAG) は、高濃度亜鉛に対し *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株より強い耐性を示したものの、90 μ M ZnSO₄ 存在下において完全に死滅した (Fig. 4-7, Table 4-4)。一方、ZnT2 WT 同士の二重発現株 (WT-HA+WT-FLAG) は 100 μ M ZnSO₄ 存在下においても十分生育したことから (Fig. 4-7, Table 4-4)、ZnT2 G87R と ZnT2 WT の二重発現株における高濃度亜鉛に対する耐性低下は、ZnT2 G87R が有する、ドミナントネガティブ作用によるものと考えられた。

続いて、亜鉛輸送活性をもたない ZnT2 G280R, T312M, E355Q が、それぞれ ZnT2 G87R と同様のドミナントネガティブ作用をもつかどうかを解析した。

まず、ZnT2 G280R と ZnT2 WT の二重発現株 (G280R-FLAG+WT-HA) と、ZnT2 T312M と ZnT2 WT の二重発現株 (T312M-FLAG+WT-HA) は、どちらも 100 μ M ZnSO₄ 存在下まで生育可能となった (Fig. 4-7, Table 4-4)。これらの二重発現株の高濃度亜鉛に対する耐性は、ZnT2 WT 同士の二重発現株 (WT-HA+WT-FLAG) に比べるとわずかに弱いものの、ほとんど変化がなかった。また、ZnT2 E355Q と ZnT2 WT の二重発現株 (E355Q-FLAG+WT-HA) では、WT 同士の二重発現株 (WT-HA+WT-FLAG) とまったく変わらない耐性を示した (Fig. 4-7, Table 4-4)。すなわち、これら 3 つの二重発現株は、ZnT2-FLAG WT と ZnT2-HA G87R の二重発現株 (G87R-HA+WT-FLAG) よりも、高濃度亜鉛に対して、強い耐性を示すことが明らかになった。

Table 4-4. ZnT2 を二重発現させた *ZnT1*^{-/-}*MT*^{-/-}*ZnT4*^{-/-} 株の亜鉛耐性変化

細胞	発現 ZnT2	ZnSO ₄ (μM)					
		50	60	70	80	90	100
	-	+++	-		-> 60 μM)		
	WT-HA+WT-FLAG	+++	+++	+++	+++	+++	++
<i>ZnT1</i> ^{-/-} <i>MT</i> ^{-/-} <i>ZnT4</i> ^{-/-}	G87R-HA+WT-FLAG	+++	+++	++	+	-	-
	G280R-FLAG+WT-HA	+++	+++	+++	+++	++	+
	T312M-FLAG+WT-HA	+++	+++	+++	+++	++	+
	E355Q-FLAG+WT-HA	+++	+++	+++	+++	+++	++

+++ : コンフルエントまで増殖 (100%)、++ : 増殖やや低下 (+++に対し 50-20%)、+ : 増殖大きく低下 (+++に対し 20%以下)、- : 完全に死滅、-> 60 μM) : 60 μM 以上で死滅を示す。表記濃度の ZnSO₄ 存在下に細胞を同数ずつまき、72 時間培養後の細胞の生育状態を比較した。ZnT2 WT と ZnT2 G87R の二重発現株が、ZnT2 WT の二重発現株よりも弱い亜鉛耐性を示したのに対し、ZnT2 WT と ZnT2 各変異体 (G280R, T312M, E355Q) の二重発現株では、ZnT2 WT の二重発現株とほとんど変わらない亜鉛耐性を示した。

二重発現株の各株間において、ZnT2 タンパク質の発現量にはややバラツキが見られた。しかしながら、ZnT2-HA G87R は、その発現量が同一株の ZnT2-FLAG WT よりも相対的に低いにも関わらず、高濃度亜鉛に対する細胞の耐性を低下させた。一方、ZnT2-FLAG G280R, T312M, E355Q は、いずれも同一株の ZnT2-HA WT と比べ同等の発現量であったが、亜鉛輸送活性の低下はみられなかった。従って ZnT2 G280R, T312M, E355Q は、いずれも ZnT2 G87R のような、ZnT2 WT に対するドミナントネガティブ作用を有さないと考えられた。

症例 II, III, IV の母親 *ZnT2* 遺伝子からそれぞれヘテロ接合体で見出された c.838G>A (p.G280R)、c.935C>T (p.T312M)、c.1063G>C (p.E355Q) の各ミスセンス変異は、いずれも亜鉛輸送活性を失い、タンパク質が不安定となる機能欠失変異であったが、二量体形成能を保っていた。しかしながら、ZnT2 G87R との比較から、これら 3 つの変異は、ドミナントネガティブ作用を有さないと考えられた。また、c.838G>A においては、mRNA のスプライシング効率の低下も確認された。

以上から、これらの3症例における母乳中亜鉛量の減少は、母親の *ZnT2* 遺伝子の一方のアリルが機能欠失変異であったため、乳腺上皮細胞において正常な *ZnT2* タンパク質が不足したこと（ハプロ不全：Haploinsufficiency）によって引き起こされたと結論づけた。

4-6. Gly-280, Thr-312, Glu-355 部位の変異体解析

症例 II, III, IV の母親から見出した3つのアミノ酸変異は、いずれも *ZnT2* タンパク質の C 末端領域に位置していた (Fig. 1-3)。各位置のアミノ酸が、*ZnT2* の亜鉛輸送機能にどのように影響するのかを詳しく解析するため、Gly-280, Thr-312, Glu-355 部位を様々なアミノ酸に置換した変異体の亜鉛輸送活性を、高濃度亜鉛に対する耐性の評価と、Zinpyr-1 を用いたフローサイトメトリーにより解析した。

はじめに、Gly-280 部位の変異体を *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株に発現させ (Fig. 4-8)、亜鉛輸送活性を比較した (Table 4-5, Fig. 4-9, Table 4-6)。

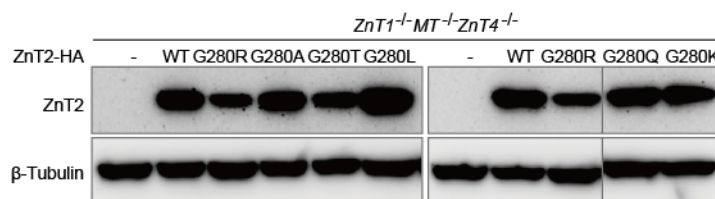


Figure 4-8. Gly-280 部位変異体 ZnT2-HA のタンパク質発現量

各変異体を発現させた *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株の *ZnT2*-HA タンパク質量を、*ZnT2* 抗体によりイムノブロットで確認した。コントロールとして β -Tubulin を用いた。仕切り線は、画像が同じメンブレン上で同一のイムノブロットから得られたことを示す。

ZnT2-HA G280A 発現株は、*ZnT2*-HA WT 発現株と同等の亜鉛耐性を示した (Table 4-5)。またフローサイトメトリー解析において、G280A 発現株は WT 発現株と同等まで、30 μ M ZnSO_4 存在下における Zinpyr-1 の蛍光強度を増加させた (Fig. 4-9, Table 4-6)。従って、*ZnT2* G280A の亜鉛輸送活性は、*ZnT2* WT と同等であると考えられた。また G280T 発現株は、80 μ M ZnSO_4 存在下まで生育可能となり、WT 発現株よりは弱いものの、*ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株の亜鉛耐性を回復させ、またフローサイトメトリー解析においても、Zinpyr-1 の蛍光強度の増加を確認した (Table 4-5, Fig. 4-9, Table 4-6)。

Table 4-5. Gly-280 部位変異体発現 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株の亜鉛耐性変化

細胞	発現 ZnT2-HA	ZnSO ₄ (μM)					
		50	60	70	80	90	100
$ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$	-	+++	-			- (> 60 μM)	
	WT	+++	+++	+++	+++	+++	++
	G280R	+++	-			- (> 60 μM)	
	G280A	+++	+++	+++	+++	+++	++
	G280T	+++	+++	++	+	-	-
	G280L	+++	-			- (> 60 μM)	
	G280Q	+++	-			- (> 60 μM)	
	G280K	+++	-			- (> 60 μM)	

+++ : コンフルエントまで増殖 (100%)、++ : 増殖やや低下 (+++に対し 50-20%)、+ : 増殖大きく低下 (+++に対し)、- : 完全に死滅、- (> 60 μM) : 60 μM 以上で死滅を示す。表記濃度の ZnSO₄ 存在下に細胞を同数ずつまき、72 時間培養後の細胞の生育状態を比較した。ZnT2-HA G280A 発現株は ZnT2-HA WT 発現株と同等の亜鉛耐性を示し、G280T は WT 発現株より弱いものの、高濃度亜鉛に対する耐性を示したが、G280R, G280L, G280Q, G280K 発現株は、いずれも 60 μM ZnSO₄ で死滅した。

一方、G280L, G280Q, G280K の各変異体を発現させた株では、低亜鉛母乳の母親から見出された変異体である、G280R の発現株と同様に、 $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株の亜鉛耐性を回復させず、Zinpyr-1 の蛍光強度の増加もみられなかった (Table 4-5, Fig. 4-9, Table 4-6)。従って、Gly-280 をロイシン (疎水性)、グルタミン (極性)、リジン (塩基性)、アルギニン (塩基性) に置き換えると、ZnT2 は亜鉛輸送活性を失うと考えられた。

以上の結果から、ZnT2 タンパク質の亜鉛輸送活性には、Gly-280 部位の、側鎖が小さく、非極性で、非疎水性、非電荷のアミノ酸が必要なことが示された。

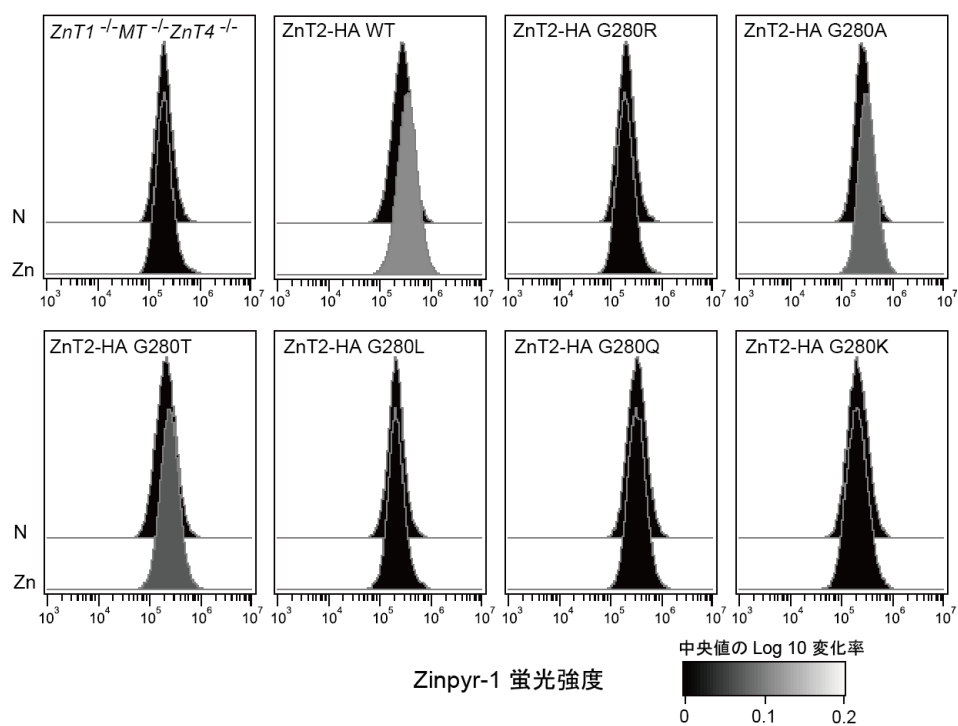


Figure 4-9. Zinpyr-1 を用いた Gly-280 部位変異体の亜鉛輸送活性の評価

各変異体の亜鉛輸送活性をフローサイトメトリーにより解析した。各細胞株を通常培地 (N) または 30 μ M ZnSO₄ 添加培地 (Zn) で 48 時間培養後、 2.0×10^6 個の細胞を 5 μ M の亜鉛蛍光試薬 Zinpyr-1 で遮光下 30 分間処理し、フローサイトメーターにより蛍光を測定した。ZnT2-HA WT, G280A, G280T 各発現株では、亜鉛添加による Zinpyr-1 の蛍光強度の増加を確認した。一方、ZnT2 G280R, G280L, G280Q, G280K 各発現株では、*ZnT1*^{-/-}*MT*^{-/-}*ZnT4*^{-/-}株と同じく蛍光強度の増加はみられなかった。実験は 3 回行い、いずれも同様の結果を得た。

Table 4-6. Gly-280 部位変異体の亜鉛輸送活性

細胞	発現 ZnT2-HA	Zinpyr-1 蛍光強度の比率
<i>ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}</i>	-	0.96 ± 0.06
	WT	1.26 ± 0.02 *
	G280R	1.00 ± 0.04
	G280A	1.26 ± 0.12 *
	G280T	1.09 ± 0.07 *
	G280L	1.06 ± 0.04
	G280Q	1.03 ± 0.08
	G280K	1.03 ± 0.06

Fig. 4-9 の解析結果から、各細胞株の 30 μM ZnSO₄ 亜鉛添加培地での Zinpyr-1 蛍光強度の中央値を、通常培地での Zinpyr-1 蛍光強度の中央値で割り、蛍光強度の比率を求めた。ZnT2-HA WT, G280A, G280T 各発現株における Zinpyr-1 蛍光強度の増加は、ZnT2-HA G280R 発現株に比べて有意であったが、他の細胞株では有意な差はなかった。3 回行った実験の、平均比率と標準偏差を示す。(n = 3, *P < 0.05)

次に、Thr-312 部位の変異体を *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株に発現させ (Fig. 4-10)、亜鉛輸送活性を比較した (Table 4-7, Fig. 4-11, Table 4-8)。

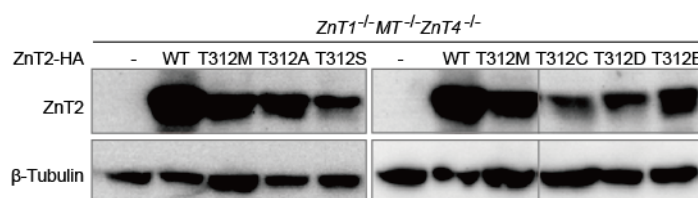


Figure 4-10. Thr-312 部位変異体 ZnT2-HA のタンパク質発現量

各変異体を発現させた *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株の ZnT2-HA タンパク質量を、ZnT2 抗体によりイムノブロットで確認した。コントロールとして β-Tubulin を用いた。仕切り線は、画像が同じメンブレン上で同一のイムノブロットから得られたことを示す。

Table 4-7. Thr-312 部位変異体発現 *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株の亜鉛耐性変化

細胞	発現	ZnSO ₄ (μM)					
		ZnT2-HA	50	60	70	80	90
<i>ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}</i>	-	+++	-			- (> 60 μM)	
	WT	+++	+++	+++	+++	+++	++
	T312M	+++	-			- (> 60 μM)	
	T312A	+++	-			- (> 60 μM)	
	T312S	+++	+++	+++	+++	+++	++
	T312C	+++	+++	+++	++	+	-
	T312D	+++	-			- (> 60 μM)	
	T312E	+++	-			- (> 60 μM)	

+++ : コンフルエントまで増殖 (100%)、++ : 増殖やや低下 (+++に対し 50-20%)、+ : 増殖大きく低下 (+++に対し)、- : 完全に死滅、- (> 60 μM) : 60 μM 以上で死滅を示す。表記濃度の ZnSO₄ 存在下に細胞を同数ずつまき、72 時間培養後の細胞の生育状態を比較した。ZnT2-HA T312S の発現株は、ZnT2-HA WT 発現株と同等の亜鉛耐性を示し、T312C 発現株は、WT 発現株より弱いものの、高濃度亜鉛に対する耐性を示した。T312M, T312A, T312D, T312E 各発現株は、いずれも 60 μM ZnSO₄ で死滅した。

ZnT2-HA T312S 発現株は、ZnT2-HA WT 発現株と同等の亜鉛耐性を示し、Zinpyr-1 の蛍光強度の増加も WT と同等であった。また、T312C 発現株も、90 μM ZnSO₄ 存在下まで生育可能となり、フローサイトメトリー解析により Zinpyr-1 の蛍光強度の増加がみられた。一方、ZnT2-HA T312A, T312E, T312D の各変異体を発現させた株では、低亜鉛母乳となった母親から見出された T312M 変異体と同様に、亜鉛耐性を回復させず、Zinpyr-1 の蛍光強度の増加もみられなかった (Table 4-7, Fig. 4-11, Table 4-8)。

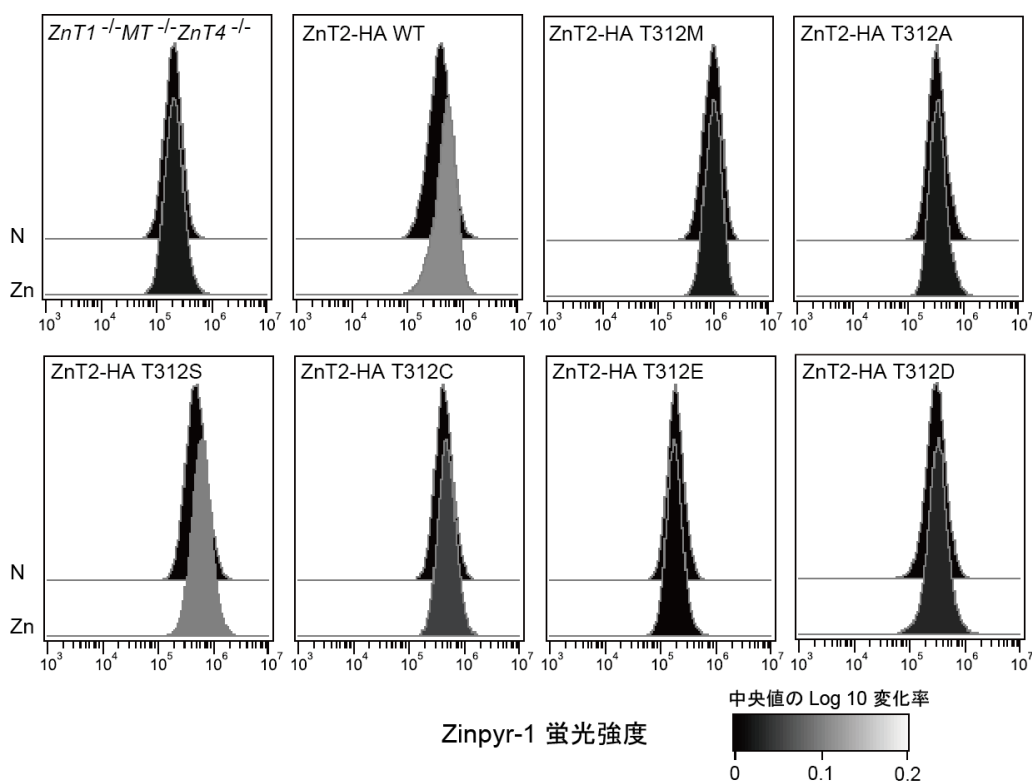


Figure 4-11. Zinpyr-1 を用いた Thr-312 部位変異体の亜鉛輸送活性の評価

各変異体の亜鉛輸送活性をフローサイトメトリーにより解析した。細胞株を通常培地 (N) または 30 μM ZnSO_4 添加培地 (Zn) で 48 時間培養後、 2.0×10^6 個の細胞を 5 μM の亜鉛蛍光試薬 Zinpyr-1 で遮光下 30 分間処理し、フローサイトメーターにより蛍光を測定した。ZnT2-HA WT, T312S, T312C 各発現株において亜鉛添加による Zinpyr-1 の蛍光強度の増加を確認した。一方、T312M, T312A, T312E, T312D 各変異体発現株では、 $\text{ZnT1}^{-/-}\text{MT}^{-/-}\text{ZnT4}^{-/-}$ 株と同じく蛍光強度の増加はみられなかった。実験は 3 回行い、いずれも同様の結果を得た。

Thr-312 部位のアミノ酸を、アラニン、メチオニン、グルタミン酸、アスパラギン酸に置き換えると、ZnT2 は亜鉛輸送活性を失った。一方、セリンやシステインといった、側鎖に求核性をもつアミノ酸置換体では、ZnT2 は亜鉛輸送活性を示した。従って、ZnT2 タンパク質の亜鉛輸送において、Thr-312 部位のアミノ酸側鎖は、球核性を必要とする可能性が考えられた。

Table 4-8. Thr-312 部位変異体の亜鉛輸送活性

細胞	発現 ZnT2-HA	Zinpyr-1 蛍光強度の比率
<i>ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}</i>	-	0.95 ± 0.03
	WT	1.29 ± 0.04 *
	T312M	0.99 ± 0.04
	T312A	1.05 ± 0.04
	T312S	1.23 ± 0.01 *
	T312C	1.15 ± 0.03 *
	T312E	1.02 ± 0.05
	T312D	1.02 ± 0.09

Fig. 4-11 の解析結果から、各細胞株の 30 μM ZnSO₄ 亜鉛添加培地での Zinpyr-1 蛍光強度の中央値を、通常培地での Zinpyr-1 蛍光強度の中央値で割り、蛍光強度の比率を求めた。ZnT2-HA WT, T312S, T312C 各発現株における Zinpyr-1 蛍光強度の増加は、T312M 発現株に比べて有意であったが、他の細胞株では有意な差はなかった。3 回行った実験の、平均比率と標準偏差を示す。
(n = 3, *P < 0.05)

Glu-355 部位は、ZnT2 のオーソログである大腸菌 YiiP の結晶構造解析から、C 末端領域における亜鉛結合部位であると予想された[51]。YiiP の同部位のアミノ酸は、グルタミン酸ではなくアスパラギン酸であった。そこで、ZnT2-HA E355A と E355D の各変異体を *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株に発現させ (Fig. 4-12)、亜鉛輸送活性を比較した (Table 4-9, Fig. 4-13, Table 4-10)。

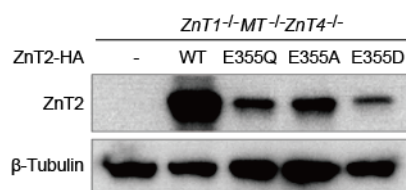


Figure 4-12. Glu-355 部位変異体 ZnT2-HA のタンパク質発現量

各変異体を発現させた *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株の ZnT2-HA タンパク質量を、ZnT2 抗体によりイムノブロットで確認した。コントロールとして β-Tubulin を用いた。

Table 4-9. Glu-355 部位変異体発現 *ZnT1*^{-/-}*MT*^{-/-}*ZnT4*^{-/-}株の亜鉛耐性変化

細胞	発現	ZnSO ₄ (μM)					
		ZnT2-HA	50	60	70	80	90
	-	+++	-			- (> 60 μM)	
	WT	+++	+++	+++	+++	+++	++
<i>ZnT1</i> ^{-/-} <i>MT</i> ^{-/-} <i>ZnT4</i> ^{-/-}	E355Q	+++	-			- (> 60 μM)	
	E355A	+++	-			- (> 60 μM)	
	E355D	+++	+	-		- (> 70 μM)	

+++ : コンフルエントまで増殖 (100%)、++ : 増殖やや低下 (+++に対し 50-20%)、+ : 増殖大きく低下 (+++に対し)、- : 完全に死滅、-> 60 μM) : 60 μM 以上で死滅、-> 70 μM) : 70 μM 以上で死滅を示す。表記濃度の ZnSO₄ 存在下に細胞を同数ずつまき、72 時間培養後の細胞の生育状態を比較した。*ZnT2*-HA E355D 発現株は *ZnT1*^{-/-}*MT*^{-/-}*ZnT4*^{-/-}株に比べ、わずかに強い亜鉛耐性を示したが、E355Q と E355A の各発現株は、いずれも 60 μM ZnSO₄ で死滅した。

ZnT2-HA E355D 発現株は、*ZnT1*^{-/-}*MT*^{-/-}*ZnT4*^{-/-}株の高濃度亜鉛に対する耐性をわずかに回復したが、フローサイトメトリー解析による Zinpyr-1 の蛍光強度の増加はみられなかった。また E355A 発現株では、低亜鉛母乳の母親から見出された E355Q 変異体の発現株と同じく、亜鉛耐性の回復と Zinpyr-1 の蛍光強度の増加は、ともに確認されなかった (Table 4-9, Fig. 4-13, Table 4-10)。

Glu-355 部位のアラニン、グルタミン、アスパラギン酸への置換で、*ZnT2* の亜鉛輸送活性は、いずれも大きく低下した。従って、*ZnT2* タンパク質の亜鉛輸送活性の発揮には、Glu-355 のグルタミン酸が重要であることが明らかになった。

以上、Gly-280, Thr-312, Glu-355 の解析から、*ZnT2* タンパク質の C 末端領域は亜鉛輸送に重要であり、各部位のアミノ酸が、亜鉛輸送機能の発揮に必要なことが示された。

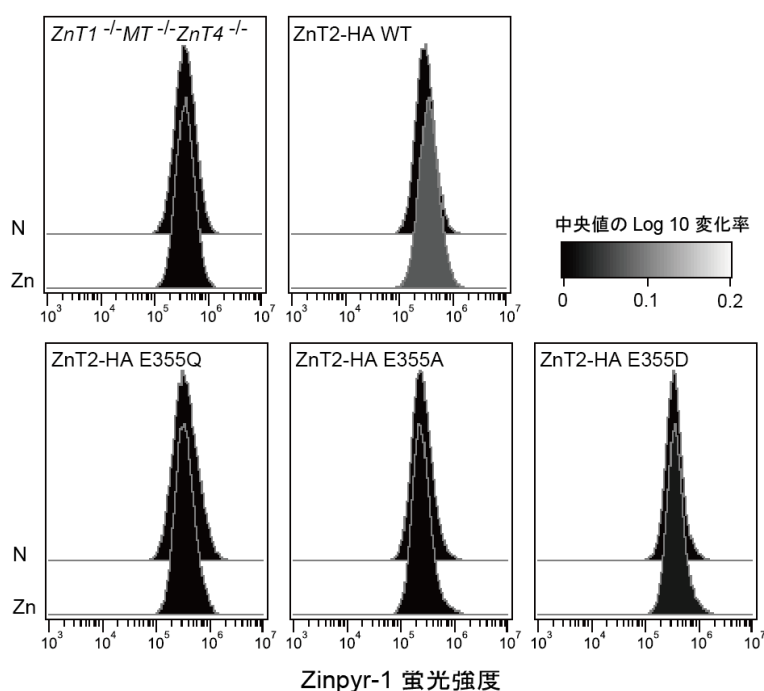


Figure 4-13. Zinpyr-1 を用いた Glu-355 部位変異体の亜鉛輸送活性の評価

各変異体の亜鉛輸送活性をフローサイトメトリーにより解析した。細胞株を通常培地 (N) または 30 μM ZnSO_4 添加培地 (Zn) で 48 時間培養後、 2.0×10^6 個の細胞を 5 μM の亜鉛蛍光試薬 Zinpyr-1 で遮光下 30 分間処理し、フローサイトメーターを用いて蛍光を測定した。ZnT2-HA WT 発現株では、亜鉛添加による Zinpyr-1 の蛍光強度の増加を確認した。一方、ZnT2-HA 355Q, E355A, E355D 各変異体の発現株では、 $\text{ZnT1}^{-/-}\text{MT}^{-/-}\text{ZnT4}^{-/-}$ 株と同じく、蛍光強度の増加はみられなかった。実験は 3 回行い、いずれも同様の結果を得た。

Table 4-10. Glu-355 部位変異体の亜鉛輸送活性

細胞	発現 ZnT2-HA	Zinpyr-1 蛍光強度の比率
	—	0.96 ± 0.07
	WT	1.30 ± 0.04 *
$\text{ZnT1}^{-/-}\text{MT}^{-/-}\text{ZnT4}^{-/-}$	E355Q	0.98 ± 0.06
	E355A	0.98 ± 0.02
	E355D	1.03 ± 0.03

Fig. 4-13 の解析結果から、各細胞株の 30 μM ZnSO_4 亜鉛添加培地での Zinpyr-1 蛍光強度の中央値を、通常培地での Zinpyr-1 蛍光強度の中央値で割り、蛍光強度の比率を求めた。ZnT2-HA WT 発現株における Zinpyr-1 蛍光強度の増加は、E355Q 発現株に比べて有意であったが、他の細胞株では有意差はなかった。3 回行った実験の、平均比率と標準偏差を示す。(n = 3, * $P < 0.05$)

第5節 SNP データベースから見出した ZnT2 ミスセンス変異体の解析

5-1. SNP によるミスセンス変異体の亜鉛輸送活性の評価

NCBI の SNP データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) には、ZnT2 にミスセンス変異を引き起こす SNP が 36 種類登録されていた(2014年3月時点)。これらの変異すべてと、データベースには登録されていないが、中国で行われた多型解析[75]により見出された c.1031A>G (p.K344R) 変異が、ZnT2 の亜鉛輸送活性に影響を及ぼすかどうかを解析した (Table 5-1)。解析した変異の発生率はいずれも低く、Global Minor Allele Frequency {1000 Genomes Phase 3 (<http://browser.1000genomes.org>) に基づく、全世界 2504 人の全ゲノム解析の結果から計算された変異の発生率} は、最も多い c.68T>C (p.L23P) で 0.0042 であった。これらの変異のうち、イントロンとのつなぎ目の近傍に位置するものは存在しなかったため、c.838G>A (p.G280R) のように、スプライシング効率に影響する変異はないと考えられた。なおデータベースに登録されていた SNP のうち、c.161A>G (p.H54R) と c.259G>A (p.G87R) の 2 種類は、低亜鉛母乳を引き起こすミスセンス変異として既報[23,25]であり、解析済み (Table 3-1, Fig. 3-7) であるため、ここでは結果を省略した。従って、本節で示す解析結果を示す ZnT2 ミスセンス変異体は計 35 種類である。また、ミスセンス変異を引き起こす SNP の登録数は、その後大幅に増加し、2016 年 7 月現在 133 種類となっている。

*ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}*株に、ZnT2-HA ミスセンス変異体をそれぞれ発現させ、高濃度亜鉛に対する耐性を確認した (Fig. 5-1, Table 5-2)。

その結果、発現株が 60 μ M ZnSO₄ 存在下で完全に死滅し、高濃度亜鉛に対する耐性を回復しない変異 (Null) を 4 種類 {c.542C>T (p.T181M)、c.567C>A (p.N189K)、c.698G>A (p.G233D)、c.1063G>A (p.E355K)} 見出した。その他、22 種類が WT と同等 (Full) の耐性を示し、7 種類の変異が WT とほぼ同等 (Almost full) の耐性を示した。また、2 種類 {c.692G>C (p.S231T)、c.895G>A (p.G299R)} の変異は 100 μ M ZnSO₄ 存在下で死滅し、ZnT2 WT 発現株よりもわずかに弱い亜鉛耐性 (Slightly Reduced) を示したが、低亜鉛母乳を引き起こした ZnT2 H54R のような、顕著な低下ではなかった (Table 5-2)。

Table 5-1. 解析した SNP ミスセンス変異の一覧

dbSNP rs #	コドン変異	アミノ酸変異	エキソン	Global Minor Allele
				Frequency ^a
rs142587047	c.17A>G	K6R	1	G=0.0008
rs144738392	c.21G>C	Q7H	1	N.A.
rs377136186	c.41C>T	P14L	1	N.A.
rs35235055	c.68T>C	L23P	2	C=0.0042
rs112850383	c.70T>C	W24R	2	N.A.
rs77193883	c.80G>A	G27E	2	A=0.0020
rs199685973	c.90G>T	W30C	2	N.A.
rs587776926 ^b	c.161A>G	H54R	2	N.A.
rs141752286	c.173G>A	G58D	2	N.A.
rs368255248	c.215G>A	R72H	2	N.A.
rs200712540	c.229G>A	A77T	2	A=0.0002
rs185398527 ^b	c.259G>A	G87R	2	A=0.0002
rs369142908	c.280C>G	L94V	3	G=0.0004
rs370485489	c.464C>T	T155M	4	N.A.
rs199594277	c.490G>A	E164K	4	N.A.
rs148861822	c.542C>T	T181M	4	N.A.
rs199807670	c.559G>T	A187S	4	N.A.
rs200520278	c.567C>A	N189K	4	A=0.0002
rs112127101	c.596C>G	S199C	5	N.A.
rs201917367	c.599G>A	G200D	5	A=0.0004
rs377645638	c.613C>G	H205D	5	N.A.
rs373747848	c.649G>C	V217L	5	N.A.
rs369755786	c.692G>C	S231T	5	N.A.
rs144129605	c.694A>G	M232V	5	N.A.
rs200039883	c.696G>A	M232I	5	A=0.0002
rs201084300	c.698G>A	G233D	5	A=0.0002
rs372442248	c.769G>A	V257I	6	N.A.
rs369345160	c.868G>A	V290I	7	N.A.
rs149340896	c.872G>A	R291H	7	A=0.0036

rs151175941	c.895G>A	G299R	7	N.A.
rs372456339	c.967G>A	A323T	7	N.A.
rs149723161	c.988G>A	A330T	8	N.A.
rs145406127	c.1018C>T	R340C	8	T=0.0002
rs35623192	c.1019G>A	R340H	8	A=0.0002
N.A.	c.1031A>G	K344R	8	N.A.
rs144832711	c.1048G>A	V350M	8	A=0.0002
rs377192955	c.1063G>A	E355K	8	N.A.

N.A. : Not Applicable (登録なし)

^a 1000 Genome phase 3 (<http://browser.1000genomes.org>) に基づく。全世界の 2504 人の全ゲノム解析結果から計算された、変異の発生率。

^b H54R と G87R は、低亜鉛母乳を引き起こすミスセンス変異として解析済み。

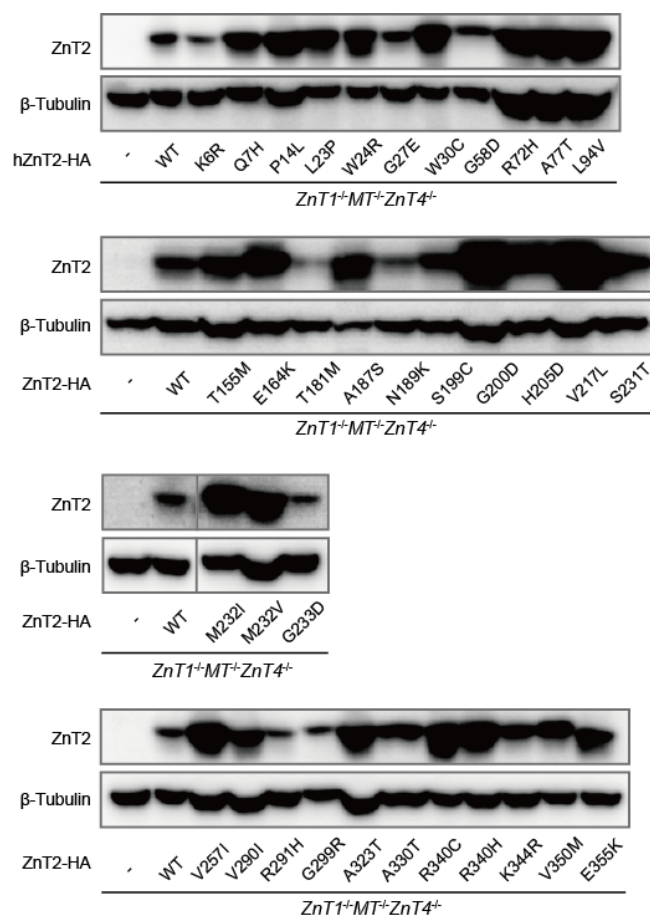


Figure 5-1. SNP による ZnT2 ミスセンス変異体の発現量

ZnT2-HA の各ミスセンス変異体を $ZnT1^{+/}MT^{+}/ZnT4^{-/-}$ 株にそれぞれ発現させ、ZnT2 抗体を用いてイムノブロットで確認した。コントロールとして β -Tubulin を用いた。

Table 5-2. SNP による ZnT2 ミスセンス変異体の亜鉛輸送活性評価

発現 ZnT2-HA	ZnSO ₄ (μM)						亜鉛輸送活性
	50	60	70	80	90	100	
-	+++	-		- (> 60 μM)			-
WT	+++	+++	+++	+++	+++	++	Full
K6R	+++	+++	+++	+++	++	+	Almost full
Q7H	+++	+++	+++	+++	++	+	Almost full
P14L	+++	+++	+++	+++	+++	++	Full
L23P	+++	+++	+++	+++	++	+	Almost full
W24R	+++	+++	+++	+++	+++	++	Full
G27E	+++	+++	+++	+++	+++	++	Full
W30C	+++	+++	+++	+++	+++	++	Full
G58D	+++	+++	+++	+++	++	+	Almost full
R72H	+++	+++	+++	+++	+++	++	Full
A77T	+++	+++	+++	+++	+++	++	Full
L94V	+++	+++	+++	+++	+++	++	Full
T155M	+++	+++	+++	+++	+++	++	Full
E164K	+++	+++	+++	+++	+++	++	Full
T181M	+++	-		- (> 60 μM)			Null
A187S	+++	+++	+++	+++	++	+	Almost full
N189K	+++	-		- (> 60 μM)			Null
S199C	+++	+++	+++	+++	+++	++	Full
G200D	+++	+++	+++	+++	+++	++	Full
H205D	+++	+++	+++	+++	++	+	Almost full
V217L	+++	+++	+++	+++	+++	++	Full
S231T	+++	+++	+++	++	+	-	Slightly reduced
M232V	+++	+++	+++	+++	+++	++	Full
M232I	+++	+++	+++	+++	+++	++	Full
G233D	+++	-		- (> 60 μM)			Null
V257I	+++	+++	+++	+++	+++	++	Full
V290I	+++	+++	+++	+++	+++	++	Full
R291H	+++	+++	+++	+++	++	+	Almost full

G299R	+++	+++	+++	++	+	-	Slightly reduced
A323T	+++	+++	+++	+++	+++	++	Full
A330T	+++	+++	+++	+++	+++	++	Full
R340C	+++	+++	+++	+++	+++	++	Full
R340H	+++	+++	+++	+++	+++	++	Full
K344R	+++	+++	+++	+++	+++	++	Full
V350M	+++	+++	+++	+++	+++	++	Full
E355K	+++	-			- (> 60 μ M)		Null

+++ : コンフルエントまで増殖 (100%)、++ : 増殖やや低下 (+++に対し 50-20%)、+ : 増殖大きく低下 (+++に対し 20%以下)、- : 完全に死滅、- (> 60 μ M) : 60 μ M 以上で死滅を示す。表記濃度の ZnSO₄ 存在下に細胞を同数ずつまき、72 時間培養後の細胞の生育状態を比較した。各発現株の高濃度亜鉛に対する耐性変化から、ミスセンス変異体の亜鉛輸送活性を、Full (ZnT2 WT と比べ変化なし)、Almost full (ZnT2 WT とほぼ同等)、Slightly reduced (100 μ M ZnSO₄ 存在下で死滅、ZnT2 WT よりわずかに低下)、Null (耐性なし) の 4 分類で示した。

以上から、発現株において、ZnT2 WT と同等か、ほとんど差異のない亜鉛耐性を示した 31 種類の SNP によるミスセンス変異体は、低亜鉛母乳を引き起こす可能性は低いと考えられた。

一方、亜鉛耐性を全く回復させなかった 4 種類の SNP ミスセンス変異体 (ZnT2 T181M, N189K, G233D, E355K) は、低亜鉛母乳を引き起こす可能性が高いと考えられたため、引き続き解析を行った。

5-2. ZnT2 T181M, N189K, G233D, E355K は亜鉛輸送活性をもたない

ZnT1^{-/-}*MT*^{-/-}*ZnT4*^{-/-}株において、高濃度亜鉛に対する耐性を回復させなかった 4 つの SNP ミスセンス変異体について、Zinpyr-1 を用いたフローサイトメトリー解析を行った。ZnT2-HA T181M, N189K, G233D, E355K 発現 *ZnT1*^{-/-}*MT*^{-/-}*ZnT4*^{-/-}株は、いずれも 30 μ M ZnSO₄ 存在下で Zinpyr-1 の蛍光強度の増加を示さなかった (Fig. 5-2, Table 5-3)。従って、各変異体 ZnT2 は細胞質から細胞小胞内への亜鉛輸送活性をもたないと考えられた。

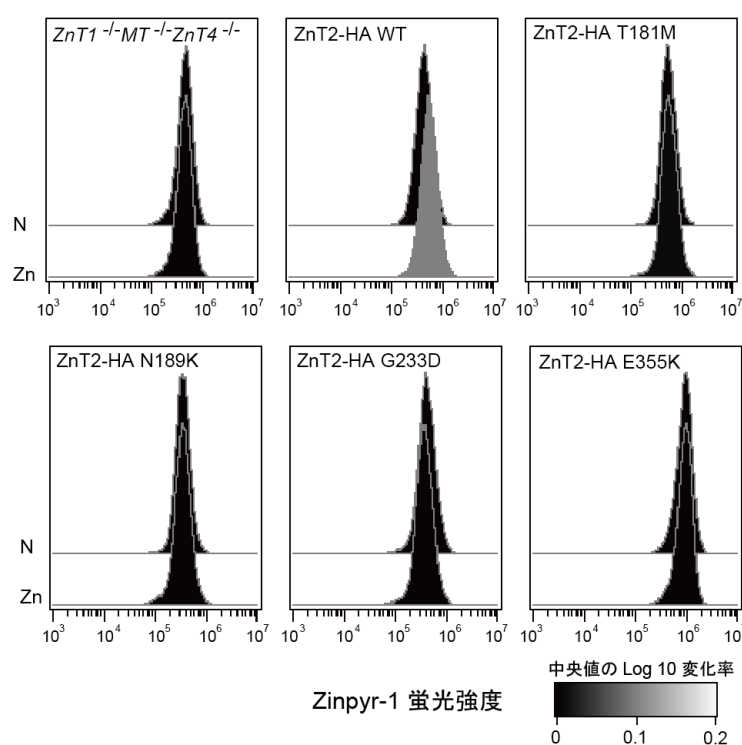


Figure 5-2. ZnT2 T181M, N189K, G233D, E355K の亜鉛輸送活性評価

各変異体の亜鉛輸送活性を、Zinpyr-1 を用いたフローサイトメトリーにより解析した。細胞株を通常培地 (N) または 30 μ M ZnSO₄ 添加培地 (Zn) で 48 時間培養後、 2.0×10^6 個の細胞を 5 μ M の亜鉛蛍光試薬 Zinpyr-1 で 30 分間処理し、フローサイトメーターを用いて蛍光を測定した。ZnT2-HA WT 発現株では、亜鉛添加による Zinpyr-1 の蛍光強度の増加を確認した。一方、ZnT2-HA T181M, N189K, G233D, E355K 発現株では、*ZnT1*^{-/-}*MT*^{-/-}*ZnT4*^{-/-}株と同じく、蛍光強度の増加はみられなかった。実験は 3 回行い、いずれも同様の結果を得た。

Table 5-3. ZnT2 T181M, N189K, G233D, E355K は亜鉛輸送活性を示さない

細胞	発現 ZnT2-HA	Zinpyr-1 蛍光強度の比率
<i>ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}</i>	-	0.93 ± 0.04
	WT	1.24 ± 0.01 *
	T181M	0.95 ± 0.04
	N189K	0.95 ± 0.02
	G233D	0.89 ± 0.03
	E355K	0.90 ± 0.08

Fig. 5-2 の解析結果から、各細胞株の 30 μ M ZnSO₄ 亜鉛添加培地での Zinpyr-1 蛍光強度の中央値を、通常培地での Zinpyr-1 蛍光強度の中央値で割り、蛍光強度の比率を求めた。ZnT2-HA WT 発現株における Zinpyr-1 蛍光強度の増加は、*ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株に比べて有意であったが、他の細胞株では有意な差はなかった。3 回行った実験の、平均比率と標準偏差を示す。(n = 3, *P < 0.05)

5-3. ZnT2 T181M, N189K, G233D, E355K はタンパク質が不安定になる

低亜鉛母乳を引き起こす ZnT2 変異体は、すべてタンパク質安定性が低下していた (Fig. 3-4, Fig. 3-6, Fig. 3-7, Fig. 4-5)。そこで、亜鉛輸送活性をもたない 4 つの SNP によるミスセンス変異体についても、シクロヘキシミド処理により、タンパク質安定性を評価した。その結果、ZnT2 T181M のタンパク質量は、処理後 4 時間で、開始時点の約 10%、また ZnT2 G233D のタンパク質量は、4 時間で開始時の約 25%と、顕著に減少し、ZnT2 N189K と E355K では、処理後 8 時間で開始時の約 25%まで減少した (Fig. 5-3)。従って、各変異体 ZnT2 のタンパク質安定性は、ZnT2 WT に比べ低下することが示された。

以上から、ZnT2 T181M, N189K, G233D, E355K の各変異体は、亜鉛輸送活性の消失と、タンパク質安定性の低下という、低亜鉛母乳の原因となる ZnT2 変異体において、共通して見られる特徴を有することが示された。従って、母親がこれらの変異をヘテロ接合体でもつと、低亜鉛母乳を引き起こす可能性が高いと考えられた。

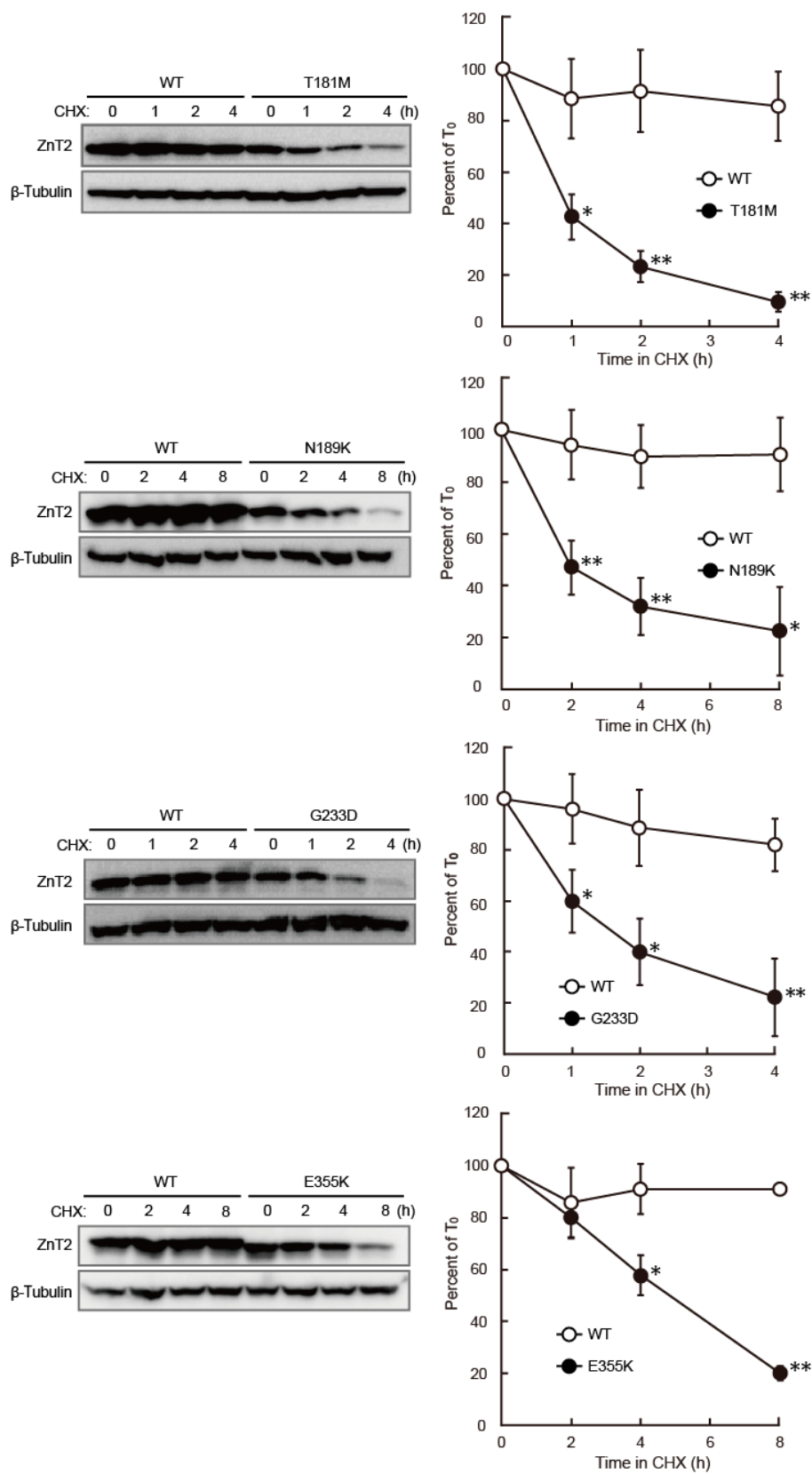


Figure 5-3. ZnT2 T181M, N189K, G233D, E355K のタンパク質安定性評価

(前頁 Fig. 5-3 の説明)

ZnT2-HA WT および ZnT2 T181M, N189K, G233D, E355Q 各変異体発現株を用い、シクロヘキシミド (CHX) 処理開始後、各時点におけるタンパク発現量を ZnT2 抗体によりイムノブロットで確認した。コントロールとして β -Tubulin を用いた。各時点の ZnT2-HA のバンド強度を、 β -Tubulin のバンド強度で割り、CHX 処理開始時の値 (T_0) を 100%として、比率を算出した。
($n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$)

5-4. ZnT2 T181M, N189K, G233D, E355K の二量体形成能の評価

続いて、各変異体をさらに詳しく評価するため、二量体形成能とドミナントネガティブ作用について解析を行った。各変異体が ZnT2 WT と二量体を形成するかどうかを確認するため、ZnT2 の WT と各変異体を $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株に二重発現させた細胞株を樹立し、免疫沈降 (IP) を行った。

ZnT2 WT と ZnT2 変異体の IP と同時に、コントロールとして ZnT2-HA WT と ZnT2-FLAG WT の IP を行った (Fig. 5-4 lane 2, lane 6)。ZnT2-FLAG WT と ZnT2-HA T181M の間 (Fig. 5-4 lane 3)、ZnT2-FLAG WT と ZnT2-HA N189K の間 (Fig. 5-4 lane 4)、ZnT2-FLAG WT と ZnT2-HA G233D の間 (Fig. 5-4 lane 7)、ZnT2-FLAG WT と ZnT2-HA E355K の間 (Fig. 5-5 lane 8)、いずれにおいても、二量体形成を確認した。

すなわち、これら 4 つのミスセンス変異体は、亜鉛輸送活性をもたないが、ZnT2 WT との二量体形成能を維持していることが明らかとなった。従って、ZnT2 T181M, N189K, G233D, E355K が、ZnT2 WT に対してドミナントネガティブ作用を有する可能性が示唆されたため、続いて解析を行った。

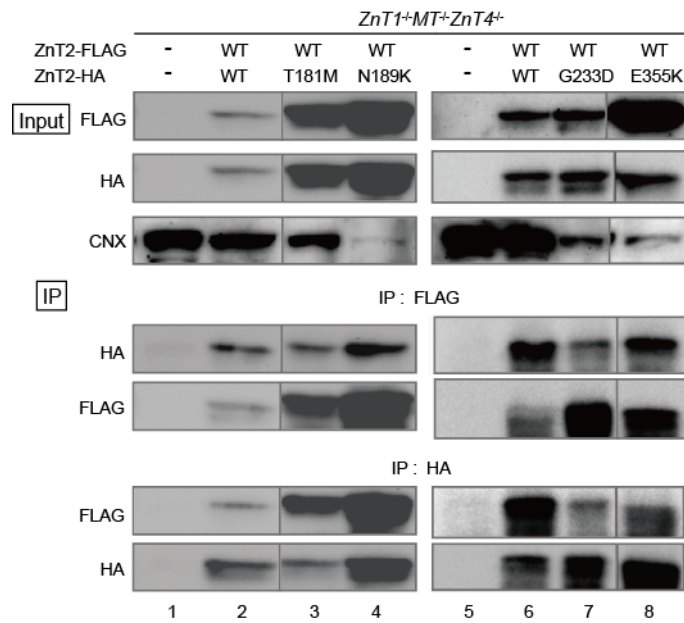


Figure 5-4. ZnT2 T181M, N189K, G233D, E355K の二量体形成能

亜鉛輸送活性を示さない SNP によるミスセンス変異体は、いずれも ZnT2 WT と二量体を形成した。WT および変異体の ZnT2-HA または ZnT2-FLAG を、*ZnT1⁻MT⁻ZnT4⁻* 株にそれぞれ二重発現させた。150 μ g の膜タンパク質を用いて、HA 抗体および FLAG 抗体によって免疫沈降 (IP) を行い、各抗体を用いてイムノブロットで確認した。7.5 μ g の膜タンパク質を用いて、各細胞株の ZnT2 の発現量をイムノブロットで確認し Input に示した。コントロールには Calnexin (CNX) を用いた。仕切り線は、画像が同じメンブレン上で同一のイムノブロットから得られたことを示す。実験は 3 回行い、代表例を示した。

5-5. ZnT2 T181M, N189K, G233D, E355K のドミナントネガティブ作用評価

亜鉛輸送活性を示さない ZnT2 T181M, N189K, G233D, E355K が、それぞれ ZnT2 WT に対してドミナントネガティブ作用を有するかどうかを、二重発現株を用いて解析した。既述の通り、ZnT2 G87R は ZnT2 WT に対しドミナントネガティブ作用をもち、両者の二重発現株 (G87R-HA+WT-FLAG) は、90 μ M ZnSO₄ 存在下で死滅した。一方、ZnT2 T181M と ZnT2 WT (T181M-HA+WT-FLAG)、ZnT2 N189K と ZnT2 WT (N189K-HA+WT-FLAG) の二重発現株は、どちらも 100 μ M ZnSO₄ 存在下まで生育可能となった。両株の亜鉛耐性は、ZnT2 WT 同士の二重発現株 (WT-HA+WT-FLAG) に比べほとんど変化がなかった。また、ZnT2 G233D と ZnT2 WT の二重発現株 (G233D-HA+WT-FLAG) と ZnT2 E355K と ZnT2 WT の二重発現株 (E355K-HA+WT-FLAG) は、高濃度亜鉛に対して、WT 同士の二重発現株 (WT-FLAG+WT-HA) と変わらない耐性を示した。すなわちこれらの4株は、いずれも ZnT2 G87R と ZnT2 WT の二重発現株 (G87R-HA+WT-FLAG) よりも、高濃度亜鉛に対してより強い耐性を示すことが明らかになった (Fig. 5-5, Table 5-4)。

ZnT2-HA N189K と ZnT2-FLAG WT の二重発現株では、ほかの二重発現株に比べて ZnT2-HA N189K の発現量が低く、ZnT2 N189K が、ZnT2 G87R の様に ZnT2 WT に対してドミナントネガティブ作用を示す可能性は否定できなかった。しかしながら、その他の二重発現株については、ZnT2-HA の各変異体と ZnT2-FLAG WT の発現量は比較的揃っており、ZnT2 T181M, G233D, E355K は、いずれも ZnT2 WT に対し、ZnT2 G87R のようなドミナントネガティブ作用を示さないと考えられた。

以上、SNP によって生じる 35 種類の ZnT2 ミスセンス変異体を解析し、そのうち 4 種類の変異体 (ZnT2 T181M, N189K, G233D, E355K) は、亜鉛輸送活性をもたず、低亜鉛母乳を引き起こす可能性が高いことを明らかにした。

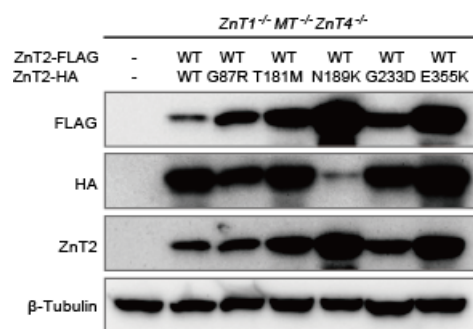


Figure 5-5. 二重発現株の ZnT2 タンパク質の発現量

各細胞株の ZnT2 WT と ZnT2 変異体の発現量を、FLAG 抗体、HA 抗体、ZnT2 抗体を用いてイムノブロットで確認した。コントロールとして β -Tubulin を用いた。

Table 5-4. ZnT2 を二重発現させた $ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$ 株の亜鉛耐性変化

細胞	発現 ZnT2	ZnSO ₄ (μ M)					
		50	60	70	80	90	100
	-	+++	-		- (> 60 μ M)		
	WT-FLAG + WT-HA	+++	+++	+++	+++	+++	++
	WT-FLAG + G87R-HA	+++	+++	++	+	-	-
$ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}$	WT-FLAG+T181M-HA	+++	+++	+++	+++	++	+
	WT-FLAG+N189K-HA	+++	+++	+++	+++	++	+
	WT-FLAG+G233D-HA	+++	+++	+++	+++	+++	++
	WT-FLAG+E355K-HA	+++	+++	+++	+++	+++	++

+++ : コンフルエントまで増殖 (100%)、++ : 増殖やや低下 (+++に対し 50-20%)、+ : 増殖大きく低下 (+++に対し 20%以下)、- : 完全に死滅、- (> 60 μ M) : 60 μ M 以上で死滅を示す。表記濃度の ZnSO₄ 存在下に細胞を同数ずつまき、72 時間培養後の細胞の生育状態を比較した。ZnT2 WT と ZnT2 T181M, N189K, G233D, E355K をそれぞれ二重発現させた株は、いずれも ZnT2 WT 同士の二重発現株とほとんど変わらない亜鉛耐性を示した。

考察

母親の *ZnT2* 遺伝子変異が低亜鉛母乳を引き起こす

本研究では、日本で見出された一過性乳児亜鉛欠乏症 (TNZD) の症例児の母親4人から、*ZnT2* 遺伝子に合わせて5つのミスセンス変異を見出した。変異のうち2つは、複合ヘテロ接合体 (エキソン4のc.454T>C, エキソン7のc.887T>C) で、残る3つはヘテロ接合体 (エキソン6のc.838G>A, エキソン7のc.935C>T, エキソン8のc.1063G>C) であった。

c.454T>C と c.887T>C の変異は、*ZnT2* タンパク質に、W152R と S296L のミスセンス変異を引き起こした。生化学的解析の結果、*ZnT2* W152R は亜鉛輸送活性をもたない機能欠失変異であり、また二量体形成能を持たず、ドミナントネガティブ作用を示さないと考えられた。一方、*ZnT2* S296L は、亜鉛輸送活性と二量体形成能をいずれも保っていた。しかしながら、これは本実験系で用いた強力な β -アクチンプロモーターの過剰発現の効果によるものと考えられたため、タンパク質安定性の解析を行ったところ、*ZnT2* WT に比べて著しい低下を示した。両変異はそれぞれ別のアレルから見出されたため、母親 *ZnT2* 遺伝子の複合ヘテロ変異が、乳児に出生直後に TNZD 発症を引き起こした、母乳中亜鉛量の著しい減少の原因として示された。

残る3つのヘテロ変異のうち、c.838G>A変異は、スプライシング効率の低下と、*ZnT2* タンパク質のG280Rのミスセンス変異を引き起こした。また、c.935C>T変異およびc.1063G>C変異は、それぞれT312MおよびE355Qのミスセンス変異を引き起こした。生化学的解析により、これらの3つの変異はいずれも亜鉛輸送活性を持たない機能欠失変異であり、二量体形成能を保っているが、ドミナントネガティブ作用を示さないことが明らかになった。従って、これらの症例では母親*ZnT2* 遺伝子のヘテロ変異によるハプロ不全が、乳児にTNZDを引き起こした、低亜鉛母乳の原因であると考えられた。

ZnT2 G280R, T312M, E355Qはドミナントネガティブ作用を示さない

既報の*ZnT2* G87Rは、低亜鉛母乳を分泌した母親からヘテロ接合体で見出され、亜鉛輸送活性をもたず、*ZnT2* WTと二量体を形成して、*ZnT2* WTに対しドミナントネガティブ作用を示すことが報告されていた[25]。

本研究では、ZnT2 G87Rと、ヘテロ接合体で新たに見出されたZnT2 G280R, T312M, E355Qを、各変異体とZnT2 WTを二重発現させた*ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}*株を用いて比較した。ZnT2 WTとG87Rの二重発現株では、ZnT2 WT同士の二重発現株よりも、高濃度亜鉛に対する耐性の低下がみられたが、ZnT2 WTとG280R、WTとT312M、WTとE355Q、の各二重発現株では、過剰亜鉛に対する耐性はZnT2 WT同士の二重発現株と比べ、ほとんど変化しなかった。従って、これら3つの変異体は、ZnT2 G87Rのようなドミナントネガティブ作用を示さないことが明らかになった。

上記の結果は、共同研究グループの、BiFC法を用いたZnT2の二量体形成と、細胞小胞内の亜鉛を特異的に認識する蛍光試薬Zinquinを用いた亜鉛蓄積量の解析によっても確認された[49,76]。ZnT2-YC G87RとZnT2-YN WTをMCF7細胞（ヒト乳腺細胞）に同時に一過的に発現させた時、ZnT2 G87RとZnT2 WTが二量体を形成し、YFP蛍光を確認できた細胞において、Zinquin蛍光強度の増加はみられず、小胞内への亜鉛蓄積は観察できなかった。従って、G87RとWTのZnT2二量体は亜鉛を輸送できず、ZnT2 G87RはZnT2 WTに対してドミナントネガティブ作用をもつと考えられた[49]。一方、ZnT2 G280R-YCとZnT2 WT-YN、またはZnT2 T312M-YCとZnT2 WT-YN、あるいはZnT2 E355Q-YCとZnT2 WT-YNの組み合わせで、一過的に二重発現させた細胞では、ZnT2各変異体とZnT2 WTが二量体を形成し、YFP蛍光を確認した細胞において、いずれもZinquin蛍光強度の増加がみられ、変異体とWTのZnT2二量体による、細胞小胞内への亜鉛蓄積が観察された。従って、G280R, T312M, E355Qの変異体とWTとからなるZnT2二量体は、亜鉛を輸送でき、各変異体はいずれもZnT2 WTに対してドミナントネガティブ作用をもたないと考えられた[76]。

低亜鉛母乳を引き起こす*ZnT2*遺伝子変異は多様である

低亜鉛母乳の原因となる*ZnT2*遺伝子の変異は、本研究で新たに見出されたものを合わせて計9種類となり、*ZnT2*遺伝子変異の多様性が示唆された（Table 6-1, Fig. 6-1）。また、母親からヘテロ変異で見出された、G280R, T312M, E355Qの各変異は、ドミナントネガティブ作用ではなく、ハプロ不全によって低亜鉛母乳を引き起こしたことが示された。これにより、母親の*ZnT2*遺伝子の片方のアリルが機能欠失変異を起こすと、乳腺上皮細胞において母乳中に亜鉛を輸送するZnT2タンパク質が不足し（ハプロ不全）、母乳中に分泌される亜鉛量が減少す

ることが示唆された。本研究の実施中、他の研究グループから、低亜鉛母乳を引き起こす *ZnT2* 遺伝子変異として、ヘテロ接合性フレームシフト変異 (p.F221LfsX4) とヘテロ接合性ナンセンス変異 (p.K4X) が報告された (Table 6-1) [27,77]。これらのナンセンス変異やフレームシフト変異の存在も、低亜鉛母乳が、母親 *ZnT2* 遺伝子のハプロ不全によって起こることを支持する。

Table 6-1. 低亜鉛母乳を引き起こす母親 *ZnT2* 遺伝子の変異

症例 No.	報告国 (報告年)	遺伝子変異	変異型	引用
1.	アメリカ (2006)	c.161A>G, p.H54R	ミスセンス変異 ヘテロ接合体	[23]
2.	イスラエル (2012)	c.259G>A, p.G87R	ミスセンス変異 ヘテロ接合体	[25]
3. (I)	日本 (2013)	c.454T>C, p.W152R c.887C>T, p.S296L	ミスセンス変異 複合ヘテロ接合体	本研究
4.	スイス (2013)	c.259G>A, p.G87R	ミスセンス変異 ヘテロ接合体	[26]
5.	スペイン (2014)	c.663delC, p.F221LfsX4	フレームシフト変異 ヘテロ接合体	[27]
6.	日本 (2015)	c.10A>T, p.K4X	ナンセンス変異 ヘテロ接合体	[77]
7. (II)	日本 (2016)	c.838G>A, p.G280R	ミスセンス変異 ヘテロ接合体	本研究
8. (III)	日本 (2016)	c.935C>T, p.T312M	ミスセンス変異 ヘテロ接合体	本研究
9. (IV)	日本 (2016)	c.1063G>C, p.E355Q	ミスセンス変異 ヘテロ接合体	本研究

TNZZD 症例児の母親から見出された *ZnT2* 遺伝子変異を報告順に示す。このうち、No.3 (症例 I)、No.7 (II)、No.8 (III)、No.9 (IV) が、本研究で見出された。

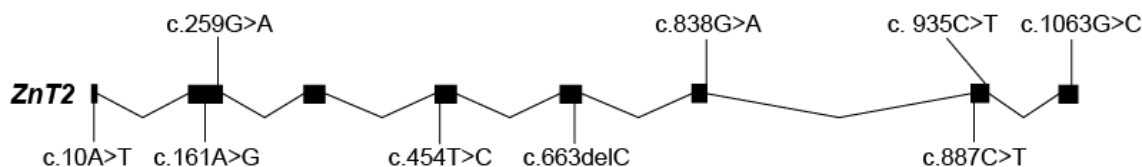


Figure. 6-1 低亜鉛母乳を引き起こす母親 *ZnT2* 遺伝子の変異

ZnT2 遺伝子のエクソンに見出された各変異の位置を示す。本研究の症例 I から見出された、複合ヘテロ接合体変異の c.454T>C と c.887C>T を除き、すべてヘテロ接合体で見出された。

***ZnT2* 遺伝子変異と TNZD の症状との関係**

本研究の症例Iにおいて、母親*ZnT2*遺伝子はミスセンス変異の複合ヘテロ接合体 (W152R・S296L) となっており、乳児は生後13日目から亜鉛欠乏症状を呈し、母乳中亜鉛量は通常値に対し約90%減少していた (Table 1-1)。続いて解析した症例II, III, IVでは、母親*ZnT2*遺伝子はドミナントネガティブではないミスセンス変異 (G280R, T312M, E355Q) のヘテロ接合体となっており、乳児亜鉛欠乏の発症は生後1.5~5ヶ月で、母乳中亜鉛量は通常より70%程度減少していた (Table 1-1)。また、既報のドミナントネガティブのミスセンス変異 (G87R) をヘテロ接合体でもつ母親の症例では、乳児亜鉛欠乏の発症は生後2~2.2ヶ月で、母乳中亜鉛量は通常より75%以上減少していた[25]。

複合ヘテロ変異であった症例Iにおいて、乳児のTNZDの発症が特に早く、母乳中亜鉛量も著しく減少していたことから、*ZnT2*タンパク質が母乳中への亜鉛輸送の主力を担っているのは明らかである。しかしながら、TNZDの発症時期は、乳児が出生までに体内に蓄積した亜鉛量に依存し[78]、母乳中亜鉛濃度も個人差が大きく、授乳開始後に大きく減少する (Fig. 0-1) [30]。従って現状では、*ZnT2* 遺伝子変異の特性と、母乳中亜鉛量やTNZDの発症時期との関係を明らかにするのは困難であり、さらなる症例情報の蓄積と変異の詳細な解析が必要である。

ZnT2遺伝子上流領域配列とZnT2 mRNAの転写制御

現在までに、ZnT2 遺伝子上流領域の変異が、低亜鉛母乳を引き起こす例は報告されていない。本研究では、ZnT2 遺伝子のプロモーター領域に MRE を 1 カ所確認し、また ZnT2 遺伝子上流領域の-3.3kb から-1.9kb の範囲に、活性化した STAT5 の結合が予想される STAT5-RE を 4 カ所確認した。先行研究において、プロラクチン刺激によって活性化される JAK2/STAT5 経路により、Znt2 の mRNA の発現制御が行われることを示した実験は、マウスのゲノム配列から、Znt2 遺伝子上流の-0.8kb までの位置に、STAT5-RE を見出し解析していた[41]。Genbank の配列情報から、マウスやラットの Znt2 遺伝子上流領域と、ヒトの ZnT2 遺伝子上流領域のアラインメントを試みたが、プロモーター領域の MRE 周辺の配列を除いて、相同性は認められなかった。従って、本研究で ZnT2 遺伝子上流に見出した、STAT5-RE と予想される配列に、実際に活性化した STAT5 が結合し、ZnT2 mRNA の発現を制御するかどうかは不明である。本研究で解析した 4 症例において、母親 ZnT2 遺伝子上流の MRE を含むプロモーター領域と、4 カ所の STAT5-RE の可能性のある配列に変異は見出されなかった。また、中国の研究グループにより実施された、母乳中亜鉛量と母親 ZnT2 遺伝子変異との関連を調べた多型解析において、ZnT2 遺伝子上流、c.-697G>T (rs117153535) の変異が、母乳中亜鉛量を平均値から 10%程度減少させることが報告されていた[75]。本研究でも、母親 ZnT2 遺伝子上流領域を解析したが、同変異は見出されなかった。以上から、本研究の 4 症例において、ZnT2 の mRNA 転写段階で異常が発生し、低亜鉛母乳を引き起こした可能性はないと考えられた。

本研究により、低亜鉛母乳は母親ZnT2遺伝子のハプロ不全によって生じることが示唆された。従って今後、低亜鉛母乳を分泌する母親から、ZnT2遺伝子のプロモーター領域などに位置し、ZnT2 mRNAの転写量を減少させる変異の発見が予想される。

ZnT2 のミスセンス変異は亜鉛輸送機能にどのように影響するか

母親から見出したミスセンス変異の解析と、データベースに登録されていた SNP によるミスセンス変異の解析により、計 7 種類の ZnT2 変異体 (W152R, T181M, N189K, G233D, G280R, E355Q, E355K) が亜鉛輸送活性を失うことがわかり、このうち W152R 以外は、二量体を形成することが示された。各変異体のタンパク質は、いずれも ZnT2 WT のタンパク質と比べ不安定になっていたが、

ZnT2 S296L のタンパク質が、ZnT2 WT に比べて著しく不安定になりながらも、ZnT2 WT と同等の亜鉛輸送活性を維持していたことから、タンパク質安定性の低下が、亜鉛輸送活性の消失の直接の原因とは考え難い。

そこで、見出したミスセンス変異が、ZnT2 の亜鉛輸送機能にどのように影響したのかを理解するため、ZnT のオースログである大腸菌 YiiP の解析、酵母 Zrc1 やシロイヌナズナ AtMTP1 の変異体解析、YiiP のタンパク質構造に基づく ZnT2 タンパク質のモデリングによる解析[49,76]との比較を行った。

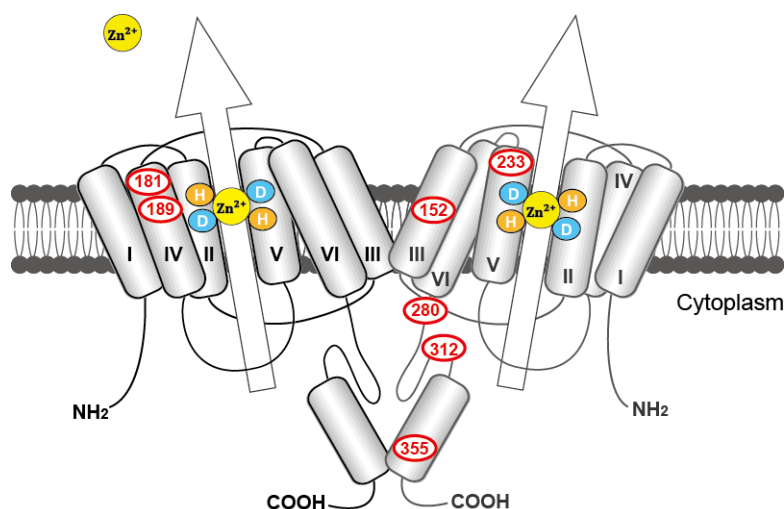


Figure. 6-2 ZnT2 タンパク質二量体におけるアミノ酸変異位置

YiiP のタンパク質二量体の結晶構造を元に、本解析で見出した ZnT2 の機能失活変異のアミノ酸変異位置を示す。W152R は TMD III に、T181M と N189K は TMD IV に、G233D は TMD V に、G280R, T312M, E355Q, E355K は細胞質の C 末端領域にそれぞれ位置した (Fig. 1-3)。TMD II と TMD V には、4 アミノ酸 (His-106, Asp-110, His-223, Asp-227) から成る亜鉛結合部位があり、実際の二量体構造では、TMD IV は TMD V に隣接している。

TMD III の ZnT2 Trp-152 の側鎖は、ZnT2 の二量体形成時に、相手側の単量体に相対する面の中心に位置すると予想される[49,51]。従って、ZnT2 W152R が二量体形成能を失うのは、疎水性のトリプトファンから親水性のアルギニンへの変異により、二量体形成に支障をきたすためと考えられる。また、ZnT2 と AtMTP1 をアラインメントした時、ZnT2 Trp-152 の 1 残基隣に位置する ZnT2 Ile-151 と相同位置のアミノ酸が変異した AtMTP1 は、輸送活性を失う (AtMTP1 I135F) [59]。同じく ZnT2 と Zrc1 をアラインメントした時、ZnT2 Ile-151 と相同位置のアミノ酸が変異した Zrc1 L87H も、輸送活性を失う[79]。さらに、ZnT2

Ile-151, AtMTP1 Ile-135, Zrc1 Leu-87 と相同位置にある YiiP Ile-90 は、亜鉛とプロトンの対向輸送を調節すると予想される、TMD V にある疎水性ゲートとの相互作用が報告されている[62]。これらを考え合わせると、ZnT2 W152R の変異は、ZnT2 の二量体形成を阻害するとともに、隣接するアミノ酸である ZnT2 Ile-151 の関与が予想される、亜鉛輸送の制御に必須の疎水性ゲートに影響し、亜鉛輸送活性を失わせたと考えられる。

ZnT2 Asn-189 は、立体構造上、二量体の形成相手から最も離れた TMD IV に位置するため、二量体形成には関係しないと考えられる。ZnT2 と AtMTP1 をアラインメントした時、ZnT2 Asn-189 と相同位置のアスパラギンが変異した AtMTP1 N173A は、輸送活性を失う[60]。また、TMD IV の Asn-189 は、ZnT2 タンパク質の立体構造モデルにおいて、TMD V の亜鉛結合部位である Asp-227 に隣接している。従って ZnT2 N189K の変異は、TMD II と TMD V の亜鉛結合に何らかの影響を与え、亜鉛輸送活性を失わせたと考えられる。

TMD IV の ZnT2 Thr-181 と TMD V の ZnT2 Gly-233 は、両方とも ZnT2 タンパク質の立体構造モデルにおいて、分泌小胞側のループの根元付近に位置すると予想される。YiiP の結晶構造解析から、6 つの TMD と TMD 間のループは、亜鉛輸送時に相互の位置関係を大きく変化させると予想されている[51,52,62]。従って、T181M と G233D の変異は TMD の構造変化に影響を及ぼし、ZnT2 の亜鉛輸送活性を失わせたと考えられる。また、Gly-233 は TMD II と TMD V の亜鉛結合部位の直上に位置しており、ZnT2 タンパク質から分泌小胞内への亜鉛の移動に支障する可能性も考えられる。

ZnT2 Gly-280 は、TMD VI と細胞質 C 末端領域を結ぶループに位置する。Gly-280 を様々なアミノ酸に置換した解析の結果、同部位のアミノ酸側鎖は、小さく、非極性で、非疎水性、非電荷が必要なことが示された。また、ZnT2 と ZnT10 をアラインメントした時、ZnT2 Gly-280 の 1 残基隣に位置するアミノ酸が変異した、機能欠失と予想されるミスセンス変異 (ZnT10 Q308T) が、高マンガン血症患者から見出されている[80]。さらに、ZnT2 とアミノ酸配列相同性の高い ZnT3 においても、ヒトのてんかん患者から、アラインメントした際に 3 残基隣に位置するアミノ酸が変異した、機能欠失となったミスセンス変異 (ZnT3 R298C) が報告されている[81]。従って、Gly-280 が位置するループは、細胞質 C 末端領域と TMD の相互位置を調節し、ZnT2 をはじめとする ZnT の亜鉛輸送活性に関与していると予想される。

ZnT2 Thr-312 は細胞質の C 末端領域に位置し、タンパク質の立体構造モデルにおいて、細胞質側から TMD II と TMD V の亜鉛結合部位に向かって続く空隙の、直下に位置すると予想される[76]。アミノ酸置換体の解析から、Thr-312 部位のアミノ酸側鎖の求核性が、亜鉛輸送活性に関係していることが示された。従って ZnT2 Thr-312 は、細胞質から TMD II と TMD V の結合部位へと向かう、亜鉛の捕捉と配位に関係すると予想される。

ZnT2 Glu-355 は、YiiP のタンパク質立体構造解析から、ZnT の細胞質 C 末端領域に広く保存されている亜鉛結合部位と考えられた[51]。Glu-355 の YiiP の相同位置 (YiiP Asp-285) のアスパラギン酸への置換は、亜鉛の結合には影響しないと予想され、ZnT2 E355D は亜鉛輸送活性を維持することが期待されたが、実際には変異体の亜鉛輸送活性は著しく低下した。これにより、C 末端領域の亜鉛結合部位が、ZnT2 の亜鉛輸送活性に重要なことが明らかになり、加えてこの部位の亜鉛結合の様式が、YiiP と ZnT2 との間で異なる可能性が示唆された。

今後、ミスセンス変異と ZnT2 の亜鉛輸送機能との関係をさらに詳細に理解するために、細胞質 N 末端領域や His-rich loop を含む、ZnT2 のタンパク質立体構造の解明が望まれる。

ZnT2 Ser-296 のタンパク質安定性低下について

TNZD 症例児の母親から見出した ZnT2 ミスセンス変異体のうち、ZnT2 S296L は亜鉛輸送活性を維持していた。ZnT2 Ser-296 は、細胞質の C 末端領域に位置し、タンパク質立体構造モデルにおいて、その側鎖は二量体のタンパク質表面を向くと予想された[49]。NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) や Phospho Motif Finder (http://www.hprd.org/PhosphoMotif_finder) といったタンパク質のリン酸化部位予測サイトによって、Ser-296 はリン酸化を受ける可能性が示唆された。これにより、ZnT2 タンパク質は PTEN (Phosphatase and tensin homolog) タンパク質などと同様に、リン酸化によりタンパク質の安定性が制御される可能性が考えられた[82]。そこで、Phos-tag SDS-PAGE を行い[83]、リン酸化タンパク質と非リン酸化タンパク質の分離を目指したが、ZnT2 WT と S296L の間でバンドの変化は見出せず、ZnT2 タンパク質のリン酸化の有無は解析できなかった (データ省略)。従って、ZnT2 S296L タンパク質の不安定化は、親水性のセリンから疎水性のロイシンへのアミノ酸変化により、細胞質 C 末端領域の構造変化によって生じたと考えられた。

また、他の研究グループから、HC11 細胞（マウス乳腺上皮細胞）を用いた解析で、ZnT2 タンパク質は恒常的にリン酸化されているが、細胞外からの TNF- α 刺激に応答し、Ser-296 部位に脱リン酸化が起こることを示唆する報告がなされたが、この報告でもリン酸化 ZnT2 タンパク質そのものは検出されていない[84]。

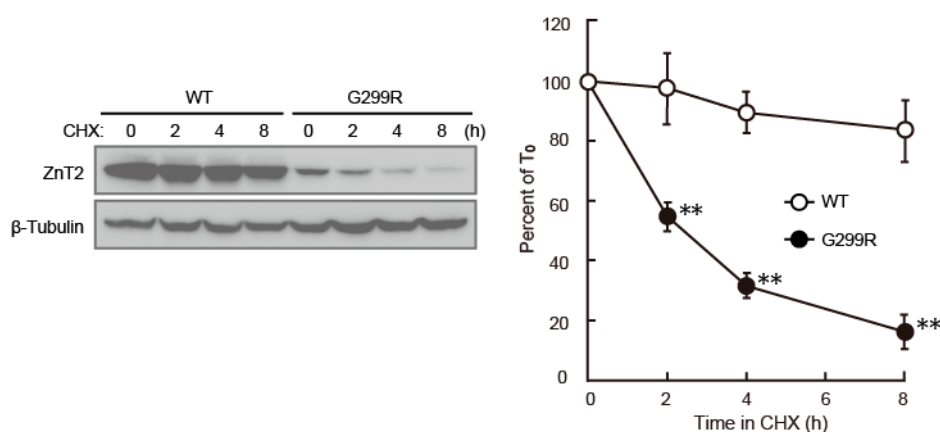


Figure 6-3. ZnT2 G299R のタンパク質安定性は低下する

ZnT2-HA WT および G299R の各発現株を、シクロヘキシミド (CHX) で処理した。各時点におけるタンパク質量を免疫ブロットで確認し、コントロールとして β -Tubulin を用いた。ZnT2-HA のバンド強度を、コントロールの β -Tubulin のバンド強度で割り、CHX 処理開始時の値 (T₀) を 100%として、各時点の比率を算出した。(n = 3, **P < 0.01)

SNPデータベースに登録されていた、Ser-296の近傍に位置するアミノ酸が変異したZnT2 G299Rは、亜鉛輸送活性がZnT2 WTよりもわずかに減少し、ZnT2 S296Lと同等になり (Table 5-2)、タンパク質安定性も低下していた (Fig. 6-3)。このことから、Ser-296やGly-299が位置する、細胞質C末端領域の α -Helix周辺の構造は、ZnT2の亜鉛輸送活性にはあまり影響しないが、ZnT2のタンパク質安定性の維持に大きく影響すると考えられる。

ZnT2 タンパク質の分解経路と翻訳後修飾について

プロテアソーム阻害剤 MG132 とリソソーム阻害剤バフィロマイシン A1 のいずれも、ZnT2 S296L タンパク質の分解を阻害した。従って、ZnT2 はプロテアソーム経路とリソソームを介したタンパク質分解経路の両方で分解されていると考えられた。本実験系では、強力な β -アクチンプロモーターを用いて、ZnT2 タンパク質を過剰発現させているため、ZnT2 の分解経路は生理的条件と異なる可

能性がある。従って、生体において ZnT2 が両経路により分解されているのか、それともどちらか一方の経路のみで分解されているのかは断定できない。

MG132 処理により ZnT2 S296L の分解が抑制されたことから、ZnT2 タンパク質がユビキチン修飾を受けて分解される可能性が示唆された。そこで、MG132 処理を行った ZnT2 発現 *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株の免疫沈降を行い、イムノブロットによりユビキチン化された ZnT2 タンパク質の検出を目指したが、有意なバンドは確認できなかった (データ省略)。他の研究グループからは、HC11 細胞に ZnT2 とユビキチンを一過的に共発現させると、細胞へのプロラクチン刺激により、ZnT2 の N 末端領域に位置する 2 つのリジン (Lys-4, Lys-6) がポリユビキチン化され、ZnT2 タンパク質が分解されるとの報告がなされている[85]。

本研究では解析できていないが、乳腺上皮細胞の ZnT2 タンパク質は、細胞外からの刺激によって様々な翻訳後修飾 (ユビキチン化やリン酸化など) を受け、制御されている可能性がある。

SNP による ZnT2 ミスセンス変異体の解析の意義

本研究では、TNZD 症例児の母親から、複数の ZnT2 遺伝子変異を同定するとともに、SNP データベースに登録されていた多数のミスセンス変異の解析も行った。その結果、ZnT2 の亜鉛輸送活性を失わせ、低亜鉛母乳を引き起こす可能性の高い SNP を 4 種類 (rs148861822, p.T181M; rs200520278, p.N189K; rs201084300, p.G233D; rs377192955, p.E355K) 見出した。

また、解析したミスセンス変異のうち、3 種類 (rs 35235055, L23P; rs 35623192, p.R340C; 登録なし, p.K344R) は、亜鉛輸送活性に影響し、母乳中亜鉛量を低下させる可能性がこれまでに示されていた[75,86]。しかし、*ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}* 株を用いた解析の結果、各変異体の亜鉛輸送活性は、ZnT2 WT と比較して顕著な差異を示さず (Table. 5-2)、タンパク質安定性についても、ZnT2 L23P において低下 (処理 8 時間で開始時の約 40% に減少) がみられたが (Fig. 6-4)、ZnT2 R340C と K344R では変化はなかった (データ省略)。従ってこれらの 3 種類の変異が、低亜鉛母乳を引き起こす可能性はほとんど無いと考えられた。

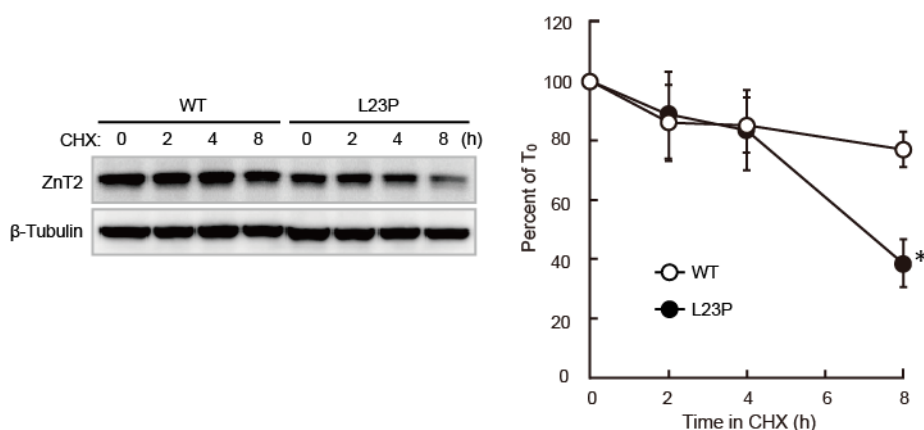


Figure 6-4. ZnT2 L23P のタンパク質安定性

ZnT2-HA WT および L23P の各発現株を、シクロヘキシミド (CHX) で処理した。各時点におけるタンパク質量をイムノブロットで確認し、コントロールとして β -Tubulin を用いた。ZnT2-HA のバンド強度を、コントロールの β -Tubulin のバンド強度で割り、CHX 処理開始時の値 (T_0) を 100% として、各時点の比率を算出した。(n = 3, * $P < 0.05$)

本解析では、ZnT2 の亜鉛輸送活性を強める変異は見出せなかったが、アメリカにおいて 54 人の母親の ZnT2 遺伝子を解析し、母乳中亜鉛量との関連を調査した研究では、母乳中亜鉛量が平均より少ない、あるいは多い母親から、ZnT2 の亜鉛輸送活性を低下、あるいは増加させるミスセンス変異が複数見出された[87]。従って、本解析において、ZnT2 WT に比べて亜鉛輸送活性がわずかに低下した SNP ミスセンス変異は、母乳中への亜鉛分泌を著しく低下させ、低亜鉛母乳の原因となることは無いにしても、母乳中亜鉛量に多少の影響を与える可能性が考えられる。

低亜鉛母乳を引き起こす ZnT2 遺伝子変異の多様性が明らかになり、今後もさらに多くの変異の報告が続くと予想される。本研究において、SNP による 35 種類のミスセンス変異が、ZnT2 の亜鉛輸送活性に与える影響を解析した結果は、今後同定されるミスセンス変異が低亜鉛母乳を引き起こすリスクを評価する上で、有益な情報になる。

乳腺上皮細胞における ZnT2 以外の亜鉛トランスポーターの機能

本研究によって、ヒトの ZnT2 タンパク質が母乳中への亜鉛輸送を担うことは確定的になったが、ZnT2 の他に、ZnT5 と ZnT6 が、母乳中への亜鉛分泌に関係するとの報告がある[88]。低亜鉛母乳によって乳児が亜鉛欠乏に陥った症例で、母

親の *ZnT2* 遺伝子に変異は無く、母親の *ZnT5* と *ZnT6* の mRNA の発現量の低下が確認された。このことから、ヘテロダイマーを形成する亜鉛トランスポーター *ZnT5* と *ZnT6* が、ゴルジ体や小胞体への亜鉛輸送や分泌経路の恒常性維持機構を介して [45,89]、*ZnT2* とは異なる機序により、母乳中亜鉛量の維持に関わる可能性がある。また、マウスの乳腺上皮細胞において、ゴルジ体に亜鉛が多く含まれるとの報告や [42]、マウスやラットの乳腺上皮細胞における、母乳分泌時の亜鉛トランスポーターの発現量の変化を追った報告もあるが [90,91]、細胞外からの亜鉛の取り込み経路をはじめ、乳腺上皮細胞に発現する亜鉛トランスポーターが、どのように協調して、母乳中への亜鉛分泌を行っているのかについては、今後の研究課題である。

母乳中への亜鉛分泌以外の *ZnT2* の生理的機能

現在までのところ、*ZnT2* 遺伝子に変異をもつヒトの母親において、母乳中亜鉛量の減少以外の表現型は確認されていない。しかしながら、ヒトの *ZnT2* mRNA は、乳腺以外にも小腸、大腸、膵臓、腎臓、胎盤といった組織で高発現している [92]。*Znt2* ノックアウトマウスの解析では、*lethal milk* (*Znt4*-null) マウスと同様の、マウス母乳中の亜鉛濃度の低下が確認され、加えて、乳腺組織の分化、成長、退縮にも、*Znt2* が関与することが報告された [93,94]。さらに乳腺以外にも、小腸パネート細胞の分泌小胞内へ、マウスの *Znt2* が亜鉛輸送を行うことが示された [95]。従ってヒトの *ZnT2* も、母乳中への亜鉛輸送以外にも、生理的機能を有している可能性がある。

TNZD の症例数と母乳栄養乳児の増加

日本国内で、低亜鉛母乳を原因とする TNZD は、1981～2006 年に 17 症例 [34]、2007～2015 年に 23 症例が報告された (Table 0-1)。近年の TNZD 報告数の増加の一因として、母乳のみで乳児を育てる母親の増加が考えられる。乳児への母乳哺育は、WHO (World Health Organization) により世界的に推進されており [96]、日本国内でも、厚生労働省の乳幼児身体発育調査によれば、乳児を生後 5 ヶ月まで、母乳栄養のみで育てる母親は、2000 年では全体の 35.9%であったが、2010 年では全体の 55.8%と、明らかに増加している [97]。市販の乳児用の粉ミルク (人工乳) には亜鉛が添加されているため、人工乳のみ、あるいは母乳と人工乳の混合栄養を与えられた乳児は、母親が低亜鉛母乳を分泌していたとしても、亜

鉛欠乏症には陥らないと考えられる。従って、母乳栄養のみで育てられる乳児が今後さらに増加すると、低亜鉛母乳によって TNZD に陥る乳児もまた、増加することが予想される。

総括

本研究では、TNZDに陥った4人の症例児の母親から、*ZnT2*遺伝子に5種類の変異を見出し、DT40細胞遺伝子欠損株を用いた実験系により、生化学的解析を行った。その結果、母乳中亜鉛量減少の原因が各変異にあることを示すとともに、低亜鉛母乳が母親*ZnT2*遺伝子のハプロ不全によって起こることを示唆した。さらに、SNPデータベースに登録されていた35種類のミスセンス変異を解析した結果、4種類の機能失活変異を見出し、低亜鉛母乳を引き起こす可能性が高いことを示した。本研究の結果から、*ZnT2*遺伝子変異は多数存在し、低亜鉛母乳によって乳児がTNZDに陥る可能性は、これまでの予想よりも大きいことが示唆された。今後、疾患の認知度の向上と、症例と*ZnT2*遺伝子変異の情報の蓄積が進み、TNZDの予防と乳児の健全な成長に繋がることを期待したい。

材料と方法

ZnT2 と *ZnT4* の遺伝子解析

本研究は、京都大学医学部医の倫理委員会から承認（承認番号 G352 号および G573 号）を得て行った。母親の血液から NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel) または QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen) を用いてゲノム DNA を回収した。*ZnT2* 遺伝子と *ZnT4* 遺伝子のスプライシングサイトを含む全エクソンのコーディング領域と、*ZnT2* 遺伝子上流領域、STAT5 結合配列の領域を KOD Plus (TOYOBO) または KOD FX (TOYOBO) を用いて PCR し、得られた断片をシーケンスした。用いたプライマーの一覧を Table S1, S2, S3 に示した。症例 I のエクソン 4 とエクソン 7 に見られた 2 つのミスセンス変異が、どの接合子に位置するのかを明らかにするため、TOPO TA Vector pCR II (Invitrogen) にエクソン 4 からエクソン 7 までを含んだ領域をサブクローニングし、シーケンスした。

細胞培養とトランスフェクション

DT40細胞は、RPMI 1640 Medium (Nacalai Tesque)、10% Foetal Bovine Serum (BioTrace、56°C 30分 で非働化)、1% Chicken serum (Gibco)、0.1% 2-Mercaptoethanol、100 units/mL Penicillin・100 µg/mL Streptomycin (Nacalai Tesque) で調製した培地を用いて、39.5°C、5% CO₂の条件下で培養継代維持した。

DT40細胞へのプラスミド導入には、エレクトロポレーション法を用いた。2.0×10⁷個の細胞と25~30 µgの直鎖状にしたプラスミドDNAを、幅0.4 mmのキューベット (Greiner) 内で500 µLのPBSに懸濁し、氷上で10分間静置したのち、Gene Pulser (Bio-Rad) で550 V 25 µFまたは600 V 25 µFの条件でエレクトロポレーションを行った。再び氷上で10分間静置し、培地中で16~20時間培養した後、各薬剤を適切な濃度 {Blasticidin S (Invitrogen) : 25 µg/mL、Histidinol (Sigma) : 1 mg/mL、Puromycin (Sigma) : 0.5 µg/mL、Geneticin (Invitrogen) : 2 mg/mL} で加えた80 mLの培地に懸濁し、96 well plateに1 wellあたり200 µLずつ分注した。およそ10日後、薬剤耐性を獲得し生育してきたクローンのコロニーを24 well plateに移し、さらに2日間培養した後、目的のタンパク質安定発現株、あるいは遺伝子欠損株であることを確認し、実験に用いた。

HeLa細胞は、DMEM (Wako) に非働化10 % Foetal Bovine Serum、100 units/mL Penicillin・100 µg/mL Streptomycin (Nacali Tesque) を添加した培地を用いて、37.0°C、5% CO₂の条件下で培養継代維持した。

HeLa細胞へのプラスミド導入は、Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) による、リポフェクション法を用いた。6 well plateにまいた対数増殖期のHeLa細胞に、Lipofectamine 2000 4 µLとDNA 4 µg を混和したOpti-MEM (Thermo Fisher Scientific) 200 µLを添加し、24時間培養後、回収してイムノブロットあるいはRT (reverse-transcription) -PCRに用いた。

プラスミド作成

DT40 細胞の遺伝子欠損に用いたプラスミドは、Blasticidin あるいは Histidinol 耐性遺伝子の両端に loxP サイトを付けた薬剤カセットの前後に、ニワトリ *ZnT1*、*MT-1,2*、*ZnT4* 遺伝子のエキソンを欠損させるようにアームを付けて作成した。

過剰発現に用いたプラスミドは、N末端にFLAGタグを融合したヒト *ZnT1* (FLAG-*ZnT1*)、マウス *Mt-1* (*Mt-1*)、C末端にHAタグを融合したヒト *ZnT4* (*ZnT4*-HA)、タグを融合していないヒト *ZnT2* (*ZnT2*)、およびC末端にHAタグまたはFLAGタグを融合した *ZnT2* (*ZnT2*-HA、*ZnT2*-FLAG) のcDNAをpA-puroまたはpA-Neoベクターに組み込んで作成した。タグの付加および *ZnT2* の変異の導入には、KOP Plusによる2-step PCRを用いた。*ZnT2* の変異体発現プラスミドの作成に用いたプライマーの一覧をTable S4, S5に示した。いずれのプラスミドも、シーケンスにより全長の配列が正しいことを確認した。プラスミド作成時の形質転換には、大腸菌DH5α株 (TOYOBO) を用いた。プラスミドは指定の制限酵素により直鎖状にし、DT40細胞へ導入した。

ルシフェラーゼアッセイ (後述) には、プロモーター領域に5つのMREをもつ、マウス *Mt-1* プロモータールシフェラーゼ発現プラスミド (摂南大学 木村朋紀博士から分与頂いた) とウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミドを用いた。

ZnT2 遺伝子のイントロン6配列を含むWT (c.838G) またはmut (c.838A) の *ZnT2*-HA発現プラスミドの作成には、Table S6に示したプライマーを用いた。一過的な発現に用いたプラスミドは制限酵素処理をせず、DT40細胞あるいはHeLa細胞に導入した。

亜鉛耐性実験

DT40 細胞株の過剰亜鉛に対する耐性実験は、以下のように行った。ZnSO₄ 添加培地に、細胞を 1.0×10⁴ 個/mL ずつまいて 72 時間培養後、十分懸濁した培養液から 10 μL 取り、トリパンブルー染色により、生細胞数を計数した。遺伝子欠損株の亜鉛耐性実験では、72 時間後の 40 μM ZnSO₄ 添加培地における各株の生細胞数を 100%とし、各濃度における生細胞数をプロットして耐性グラフを作成した。各遺伝子を発現させた *ZnT1*⁻/*MT*⁻/*ZnT4*⁻ 株の亜鉛耐性実験では、72 時間培養後に、コンフルエント:+++ (100%)、増殖やや低下:++ (+++に対し 50-20%)、増殖大きく低下:+ (+++に対し 20%以下)、完全に死滅:-とし、一覧表にした。

タンパク質安定性実験

ZnT2 タンパク質安定性の評価には、以下の方法を用いた。培地中にタンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド (Sigma) を終濃度 50 μg/mL で加えた。プロテアソーム阻害薬 MG132 (タンパク質研究所) は終濃度 30 μM、リソソーム阻害剤バフィロマイシン A1 (Sigma) は終濃度 30 nM、またコントロールには等量の DMSO (Wako) を、それぞれシクロヘキシミドを加える 2 時間前に培地中に加えた。シクロヘキシミド投入後、表記の時間 (0, 1, 2, 4, 8 hr) で細胞株を回収し、イムノブロットに用いた。

サザンブロット

DT40 細胞からゲノム DNA を抽出し、10 μg を指定の制限酵素で一晩処理し、0.7%アガロースゲルを用い 80 V で電気泳動した。泳動後、ゲルを 0.25 M HCl で 15 分間、次に 0.4 M NaOH で 15 分間処理した。DNA の泳動を FAS-II (TOYOBO) で撮影して確認し、トランスファータワーを作り、Byodyne B 0.45 μm メンブレン (PALL) に 20×SSC (3 M NaCl, 0.3 M Sodium citrate) で一晩転写した。転写後、メンブレンを 2×SSC で洗浄し、30 分間、80°C で熱処理し、Hybrisol I (Invitrogen) 中で 5 時間、42°C でプレハイブリダイゼーションした。これに、PCR で取得したゲノム DNA 断片を鋳型とし、Random Primer Kit (Amersham) を用いて [³²P] dCTP で標識したプローブを加え、一晩、42°C でハイブリダイゼーションした。次にメンブレンを、Wash solution 1 (2×SSC, 0.05% SDS) により 15 分間、42°C で 2 回、Wash solution 2 (0.1×SSC, 0.1% SDS) により 15 分間、50°C で 2 回洗浄した後、Imaging plate (Fujifilm) に露光し、BAS2000 (Fujifilm) で撮影した。

ノザンブロット

DT40 細胞の全 RNA を、Sepasol 1 (Nacalai Tesque) を用いて回収した。10 μ g 分の RNA を 1×MOPS バッファー (Nacalai Tesque)、6.5%ホルムアルデヒド (Nacalai Tesque)、50%ホルムアミド (Nacalai Tesque) に溶解し、15 分間、56 °C で熱処理した。このサンプルを、1×MOPS バッファーで作成した 1%アガロースゲルを用い 80 V で電気泳動した。泳動後、ゲルを 10 mM リン酸バッファーで 5 分間平衡化し、これに適量のエチジウムブロマイド (Nacalai Tesque) を加えて 2 分間処理した後、純水で 2~5 回洗浄した。FAS-II で撮影して RNA の分解がないことを確認し、トランスファータワーを作り、Byodyne B 0.45 μ m メンブレンに 20×SSC で一晩転写した。以降の処理、RI 標識、検出の方法は、サザンブロットと同様である。プローブの鋳型には、RT-PCR により取得した mRNA 断片の cDNA を用いた。

膜タンパク質回収

細胞を PBS で洗浄し、細胞のペレットを 0.25 M HES バッファー (0.25 M sucrose, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA) に溶かし、ホモジナイザーで 40 回処理し均質化した。これをスイングローターで 2,300×g、5 分間、4°C で遠心し、上清のみを新しいチューブに移し、スイングローターで 20,400×g、30 分間、4°C で遠心した。上清を捨て、PBS で洗浄し再びスイングローターで 20,400×g、10 分間、4°C で遠心した。上清を捨て、膜タンパク質のペレットを得た。

免疫沈降

膜タンパク質のペレットを、NP40 バッファー (100 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1% NP40, 0.5% Deoxycholate, 0.1% SDS) に溶解し、2 時間、4°C で混和した後、13,000×g で 5 分間、4°C で遠心し、不溶成分をのぞいた上清のみを細胞抽出液として用いた。DC Protein assay Kit (Bio-Rad) により濃度決定し、150~200 μ g を免疫沈降に用いた。マウスモノクローナル抗 FLAG M2 抗体 (1:200; Sigma) またはマウスモノクローナル抗 HA 抗体 HA-11 (1:200; Covance) を加え、1 時間、4°C で混和させた後、10 μ l の Protein G-Sepharose beads (GE Healthcare) を添加しさらに 2 時間、4°C で混和させた。20,400×g、5 分間、4°C で遠心して上清を完全に除いた後、ビーズを NP40 バッファー (SDS 非含有) で 5 回洗浄した。ビーズに 2.5 μ L の 5×Ling's バッファー (150 mM sucrose, 50 mM Tris-HCl, 20 mM

dithiothreitol, 5 mM EDTA, 10 % SDS) と 12.5 μ L の 2×Urea バッファー (8 M urea, 30 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, 4 mM dithiothreitol, 2% SDS) を加えて 30 分間、37°C で静置した後、20,400×g、5 分間、20°C で遠心し、上清のみをイムノブロットに用いた。

イムノブロット

回収した細胞を PBS で洗浄し、可溶化液 (10 mM Tris-HCl, 0.5 mM MgCl₂, 0.1% SDS) に溶解し、超音波ホモジナイザーで処理した。プロテインアッセイ CBB 溶液 (Nacalai Tesque) によりタンパク質濃度を決定し、10~20 μ g のタンパク質を含む溶解液に 6×サンプルバッファー (250 mM Tris-HCl, 10% SDS, 5% glycerol, 0.5 M DTT, 0.02% Bromophenol blue) を加え、30 分間、37°C で静置した後、サンプルを 8%アクリルアミドゲル、10~20mA で SDS-PAGE した。分子量スタンダードにはプレシジョン Plus プロテイン 2 色スタンダード (Bio-Rad) を用いた。トランスファーバッファー (Tris 50 mM, glycine 40 mM, 0.04% SDS, 20% EtOH) で 10 分間平衡化後、トランスブロット Turbo システム (Bio-Rad) を用い、15 V、30 分間の条件で、PVDF 0.45 μ m メンブレン (Millipore) に転写した。メンブレンは転写前に EtOH で 5 分間の親水化とトランスファーバッファーで 10 分間の平衡化をした。転写後、メンブレンをブロッキング液 (5%スキムミルク PBS) で 1 時間ブロッキングし、1 次抗体 {マウスモノクローナル抗 HA 抗体 HA-11 (1:4000; Covance)、マウスモノクローナル抗 FLAG M2 抗体 (1:4000; Sigma)、ウサギポリクローナル抗 HA 抗体 (1:4000; MBL)、ウサギポリクローナル抗 FLAG 抗体 (抗 DDDDK; 1:4000; MBL)、マウスモノクローナル抗チューブリン抗体 (1:10000; Sigma)、ウサギポリクローナル抗カルネキシン抗体 (1:4000; Stressgen)、マウスモノクローナル抗 ZnT2 抗体 (1:4000)、あるいはマウスモノクローナル抗メタロチオネイン抗体 (1:500; Dako)} をそれぞれブロッキング液に加え、室温で 1 時間、あるいは 4°C で一晩反応させた。T-PBS (0.1% Tween-20 PBS) で 10 分間 3 回洗浄し、2 次抗体 {HRP 標識抗マウス抗体 (1:4000; GE Healthcare) または HRP 標識抗ウサギ抗体 (1:4000; GE Healthcare)} をブロッキング液に加えて 1 時間、室温で反応させ、再び T-PBS で 10 分間 3 回洗浄し、Immoblin Western (Millipore) または Chemi-Lumi One L (Nacalai Tesque) で発光させ、LAS1000 Plus image analyzer (Fujifilm) で画像を得た。バンド強度の定量化には、Image Gauge (Fujifilm) または ImageQuant (GE Healthcare) を用いた。

メタロチオネインのイムノブロット

30 μg のタンパク質を含む溶解液に 6 \times SDS サンプルバッファーを加え、5 分間、95 $^{\circ}\text{C}$ で静置した。これに 1 M ヨードアセトアミド (Sigma) を 10 分の 1 量加え、遮光し 30 分間、室温で静置後、加えたヨードアセトアミドと等量の 1 M Tris-HCl (pH 8.8) を加え、3 分間、室温で静置した。サンプルを 12% アクリルアミドゲル、20 mA で SDS-PAGE した。メンブレンに転写後、メンブレンを 2.5% グルタルアルデヒド (Nacalai Tesque) で 30 分間処理した。純水で 5 分間 3 回、T-PBS で 5 分間 1 回洗浄し、ブロッキング液でブロッキングした。以降の処理は上記のイムノブロットと同様である。

ルシフェラーゼアッセイ

Dual-Luciferase Reporter assay system (Promega) を用いた。5.0 $\times 10^6$ 個の DT40 細胞株を、K-PBS (5 mM MgCl₂ PBS) で 2 回洗浄し、ホタルルシフェラーゼの上流にマウスの *Mt-1* プロモーターを組み込んだプラスミド (レポーター) 20 μg と ウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミド (コントロール) 4 μg とともに K-PBS 500 μL に懸濁し、600 V 25 μF の条件でエレクトロポレーションした。通常培地で 4 時間培養したのち、0 μM 、25 μM 、50 μM ZnSO₄ 添加培地で 24 時間培養した。各培地から細胞を回収して PBS で洗浄し、1 \times Passive Lysis Buffer 25 μL に溶解させ、20,400 $\times g$ 、5 分間、20 $^{\circ}\text{C}$ で遠心した。溶解液 20 μL を Luciferase Assay Solution 100 μL に加えてよく懸濁し、ルミノメーター LB9501 (Berthold) を用いて、ホタルルシフェラーゼの蛍光を測定した。次に、STOP&Glo Solution 100 μL を加え、よく懸濁してウミシイタケルシフェラーゼの蛍光を、同じく LB9501 により測定した。いずれも 3 連で測定し、細胞質亜鉛濃度に応答するホタルルシフェラーゼ蛍光の値を、コントロールであるウミシイタケルシフェラーゼ蛍光の値で割り、トランスフェクション効率を正規化した。マウスの *Mt-1* プロモーター領域には MRE (Metal Response Element) が 5 つあり、細胞質の亜鉛濃度の上昇に応答して核内に移行する転写因子 MTF-1 (Metal response element-binding Transcription Factor-1) の結合により、活性化される。従ってこのアッセイにおいて、ホタルルシフェラーゼ活性の値は、細胞質の亜鉛濃度の指標となる。

スプライシング効率解析のための RT (reverse-transcription) -PCR

上記のルシフェラーゼアッセイの条件で、イントロン6を含むZnT2-HA発現プラスミド 20 μg とウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミド 4 μg を、DT40細胞ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}株にエレクトロポレーションした。24時間培養後、細胞の全RNAを、Sepasol 1により回収した。回収した全RNA 1 μg 分を用いて、ReverTra Ace (TOYOBO) で逆転写を行い、KOD PlusによりTable 4-1に示したプライマーを用いてPCRした。3%アガロースゲルで分離した、PCR産物のバンド濃度の定量化にはImageQuant (GE Healthcare) を用いた。トランスフェクション効率の正規化には、ウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定して用いた。

イントロン6を含むZnT2-HA発現プラスミド 3 μg とFLAG-マウスZnT5発現プラスミド 1 μg をリポフェクションしたHeLa細胞からも、同様に全RNAの回収、逆転写、PCR、産物の3%アガロースゲルを用いた分離を行った。

Zinpyr-1 を用いたフローサイトメトリー解析

通常培地または30 μM ZnSO₄添加培地に、 1.0×10^5 個/mLのDT40細胞株をまき、48時間培養後、 2.0×10^6 個を回収してPBSで洗浄し、5 μM Zinpyr-1 (Santa Cruz Biotechnology) を溶解したPBSで、30分間、遮光、室温で静置した。PBSで1回洗浄したのち、20 mM EDTAを添加したPBSで5分間静置して細胞外の亜鉛を除去後、200 μL の1% BSA PBSで懸濁し、35 μm フィルターを通した後、BD Accuri C6 フローサイトメーター (BD Biosciences) でZinpyr-1蛍光強度を測定した。Cytobank (<http://www.cytobank.org/>) を用いて、通常培地における細胞株のZinpyr-1蛍光強度の中央値と、亜鉛添加培地における中央値を算出し、30 μM ZnSO₄亜鉛添加によるZinpyr-1の蛍光強度の変化を確認した。Zinpyr-1は、細胞小胞内の亜鉛イオンを特異的に認識する亜鉛蛍光試薬であるため、その蛍光強度の増加は、細胞小胞内の亜鉛量の増加を示す。

統計処理

定量化したデータは平均値を示し、エラーバーで標準偏差値を表記した。*t* 検定により、 $P < 0.01$ あるいは $P < 0.05$ を、統計的に有意差ありとした。

Table S1. *ZnT2* 遺伝子の PCR とシーケンスに用いたプライマー

Exon	Primer	塩基配列 (5' - 3')	Exon	Primer	塩基配列 (5' - 3')
1, 2	ZnT2-ex1-Fw	GAGACACGGGAGCGCTTGGCACGCGGAGCC	1	ZnT2-ex1-Rv	CTGGGCTGCGCCCAAGGAGAGACGGTCC
2	ZnT2-ex2-Rv	CCATGTGAGAACACAGGTGTTGTTAGACC	3, 4	ZnT2-ex3-Fw	GCCTGTGGTTCCTGCTGCACACACAGTC
4	ZnT2-ex4-Fw	GTGGGAGGTGGGTGGGAGGATCCTGAAGG	3, 4	ZnT2-ex4-Rv	GCAGACATAGGTGTGGGTGTGAGAGCGGG
5, 6	ZnT2-ex5-Fw	GGGGCTTGAGATTTTGCCTACAAGTTGG	5, 6	ZnT2-ex6-Rv	CTGGCTCCCCGCCATGTGCTAGGATGCC
7, 8	ZnT2-ex7-Fw	GACACCTGAGGATCAGGAGCCAGCCCTGCA	7	ZnT2-ex7-Rv	ACCTGGACCCGTGGGGATGGCACTAGGCC
8	ZnT2-ex8-Fw-II	GAATCTGGGGCTTCTCCATGTTATGGTC	8	ZnT2-ex8-Rv-III	GACCTGGTTTACAACACAGCTGGGGTAGGC
8	ZnT2-ex8-Rv	GTGCCTATTGCTATAGGCAGATGGAGGGCC	8	ZnT2-ex8-Fw	GGGCCAACTCTGTTCCTACCTGGCCTGAC
8	ZnT2-ex8-Rv-II	ACTTGGCCAACCTGGCTCTTGTCTCAACCC			

Table S2. *ZnT4* 遺伝子の PCR とシーケンスに用いたプライマー

Exon	Primer	塩基配列 (5' - 3')	Exon	Primer	塩基配列 (5' - 3')
1, 2	ZnT4-ex1-Fw	GCAGGGCGGGAGAGCGGTGGCTGTGGGC	1	ZnT4-ex1-Rv	GCCGCTGGCGCGGGTCGCAGGGCCGACCC
2	ZnT4-ex2-Rv	CGGTAGATGACAGTGGTTGAACAACATAGAA	3	ZnT4-ex3-Fw	GGCAGAGGTTGCACTGAGCTGAGATTGCAC
3	ZnT4-ex3-Rv	TTCTGATGATATCTTACAGGACATAGGGAGC	4, 5	ZnT4-ex4-Fw	GTTGGTATGAAGTGTAGTAACCATGCTGAA
4, 5	ZnT4-ex5-Rv	CTGATATGACAATCAGCCTTAGTTTTTCATG	6, 7	ZnT4-ex6-Fw	GGGACATATTCCTTGCTTTGCTTTGCACTC
6, 7	ZnT4-ex7-Rv	GCCTTTTGTTTAAGGCTGTTAACAAAAGCC	8	ZnT4-ex8-Fw	CCCAGTATATTCAGTTGTTTTTTCCCTG
8	ZnT4-ex8-Fw-II	CTCGACACCCAGCTTCTGGAATTGCTGCTT	8	ZnT4-ex8-Fw-III	CCCACCTTTCACATATAGTTCAACAACATT
8	ZnT4-ex8-Rv-II	CTCGAGGGATACTTCCACCTTTGCTCCCC	8	ZnT4-ex8-Fw-IV	CTGCAGCCTGAGTAACAAAATGAGACCCTA
8	ZnT4-ex8-Rv	TTTTTAAGGAACAGGTCGATACAAAAGCG			

Table S3. *ZnT2* 遺伝子上流領域の PCR とシーケンスに用いたプライマー

Primer	距離領域	塩基配列 (5' - 3')	Primer	距離領域	塩基配列 (5' - 3')
MRE-Fw	-1425 ~ -1396	AGCAGAGAGGCACTCAGTGAGGACCCAAGC	MRE-Rv	-32 ~ -61	AGCCGCCCGCCGAGTGCCTGAAAGTT
Prom1-Fw	-3347 ~ -3318	CCCTACAACCTCTGCCATTTCACTTCT	Prom1-Rv	-2360 ~ -2389	GAGATCATGCCATGCACTCCAGCGTGGGC
Prom2-Fw	-2497 ~ -2468	TCCATGGGTGCTACATCAGAATTGCCAGG	Prom2-Rv	-1269 ~ 1298	CACAGAGCCAAGAGTCAGAGGTGCAGGCCT
Prom4-Fw	-2765 ~ 2736	CAGCCCCGTATCTTGTCACCTATGGAAGAG	Prom4-Rv	-1835 ~ 1864	GGATTACAGGTGCCACGACCATGCCAAGC

Table S4. 第2節, 第3節, 第4節の ZnT2 変異体の作成に用いたプライマー

Primer	塩基配列 (5' - 3')	Primer	塩基配列 (5' - 3')
ZnT2 H106A Fw	TGACGCAGCAgeCCTGCTCA	ZnT2 H106A Rv	TGAGCAGGgeTGCTGCTCA
ZnT2 D227A Fw	TGATCGGCgeCTTTATGCAG	ZnT2 D227A Rv	CTGCATAAAgCGCCGATCA
ZnT2 H54R Fw	ATCACTGCCgTGCTCAGAA	ZnT2 H54R Rv	TTCTGAGCAcGGCAGTGAT
ZnT2 G87R Fw	TTCATGATCaGAGAAGTCGTT	ZnT2 G87R Rv	AACGACTTCTCtGATCATGAA
ZnT2 W152R Fw	TACTGTCCATCgGGGTCGTG	ZnT2 W152R Rv	CACGACCCgGATGGACAGTA
ZnT2 S296L Fw	ATCTGTCTGTgTGGTGGAG	ZnT2 S296L Rv	CTCCACCaACAGCAGCAGAT
ZnT2 G280R Fw	GTGTTGATGGAAaGGACCCCAAGGGC	ZnT2 G280R Rv	GCCCTTGGGGTCCtTTCCATCAACAC
ZnT2 G280A Fw	GTGTTGATGGAAgeACCCCAAGGGC	ZnT2 G280A Rv	GCCCTTGGGGTgTagCTTCCATCAACAC
ZnT2 G280T Fw	GTGTTGATGGAAacGACCCCAAGGGC	ZnT2 G280T Rv	GCCCTTGGGGTcgtTTCCATCAACAC
ZnT2 G280L Fw	GTGTTGATGGAActgACCCCAAGGGC	ZnT2 G280L Rv	GCCCTTGGGGTcaGTTCCATCAACAC
ZnT2 G280Q Fw	GTGTTGATGGAAeaGACCCCAAGGGC	ZnT2 G280Q Rv	GCCCTTGGGGTcigTTCCATCAACAC
ZnT2 G280K Fw	GTGTTGATGGAAaaGACCCCAAGGGC	ZnT2 G280K Rv	GCCCTTGGGGTchtTTCCATCAACAC
ZnT2 T312M Fw	ATCTGGGCACTGAtGGTGGCCAGCCT	ZnT2 T312M Rv	AGGCTGGGCCACCaTCAGTGCCAGAT
ZnT2 T312A Fw	ATCTGGGCACTGgCGGTGGCCAGCCT	ZnT2 T312A Rv	AGGCTGGGCCACCGcCAGTGCCAGAT
ZnT2 T312S Fw	TGGGCACTGAgeGTGGCCAG	ZnT2 T312S Rv	CTGGGCCACgeTCAGTGCCCA
ZnT2 T312C Fw	ATCTGGGCACTGtgcGTGGCCAGCCT	ZnT2 T312C Rv	AGGCTGGGCCACgeaCAGTGCCAGAT
ZnT2 T312E Fw	TGGGCACTGgaGGTGGCCAG	ZnT2 T312E Rv	CTGGGCCACcCtcCAGTGCCCA
ZnT2 T312D Fw	TGGGCACTGgaeGTGGCCAG	ZnT2 T312D Rv	CTGGGCCACgCtcCAGTGCCCA
ZnT2 E355Q Fw	GTGACCATCCAGATCgAGGACTACTCGGAG	ZnT2 E355Q Rv	CTCCGAGTAGTCTgGATCTGGATGGTCA
ZnT2 E355A Fw	ACCATCCAGATCgeGACTACTCGGAG	ZnT2 E355A Rv	CTCCGAGTAGTcagCGATCTGGATGGT
ZnT2 E355D Fw	ACCATCCAGATCgaGACTACTCGGAG	ZnT2 E355D Rv	CTCCGAGTAGTcGTCGATCTGGATGGT

Table S5. 第5節の SNP ミスセンス ZnT2 変異体の作成に用いたプライマー

Primer	塩基配列 (5' - 3')	Primer	塩基配列 (5' - 3')
ZnT2 K6R Fw	GCCAAGGAGAgGCAGCATCTG	ZnT2 K6R Rv	CAGATGTGcCtTCTCTGGC
ZnT2 Q7H Fw	AAGGAGAAGCAcCATCTGTTG	ZnT2 Q7H Rv	AAGGAGAAGCAcCATCTGTTG
ZnT2 P14L Fw	TTGGACGCCAGGcGGCAATCCGGTCA	ZnT2 P14L Rv	TGACCCGATTGCCaGCCTGGCGTCCAA
ZnT2 L23P Fw	CGGGATCTCgGTGGCAGG	ZnT2 L23P Rv	CCTGCCACgGAGATCCCG
ZnT2 W24R Fw	GATCTCTGcGGCAGGAAG	ZnT2 W24R Rv	CTTCTGCCcGAGAGATC
ZnT2 G27E Fw	GCAGGAAGaGGCTGGCTGGA	ZnT2 G27E Rv	TCCAGCCAGCCtCTCTCTGC
ZnT2 W30C Fw	GGGGCTGGTGeATTCTCTG	ZnT2 W30C Rv	CAGAGGAATgCAGCCAGCCCC
ZnT2 G58D Fw	GCTCAGAAGGaTCCTGACAGT	ZnT2 G58D Rv	ACTGTCAGGAiCCTTCTGAGC
ZnT2 R72H Fw	GGGAAGCCAGCaCCAGCTGTATGTA	ZnT2 R72H Rv	TACATACAGTGGgGCTGGGCCTTCCC
ZnT2 A77T Fw	CTGTATGTAAcCTCTGCCATC	ZnT2 A77T Rv	GATGCCAGAGGiTACATACAG
ZnT2 L94V Fw	GTTGGTGGTACgTGGCACACAGCTTG	ZnT2 L94V Rv	CAAGCTGTGTGCCaGTACCCCAAC

ZnT2 T155M Fw	ATCTGGGTCGTGAtGGGGTACTGGTG	ZnT2 T155M Rv	CACCAGTACCCCaTCACGACCCAGAT
ZnT2 E164K Fw	CTGGCTGTGaAGCGGCTGATC	ZnT2 E164K Rv	GATCAGCCGTtCACAGCCAG
ZnT2 T181M Fw	ATGCTGATCaTcGGGCTGC	ZnT2 T181M Rv	GCAGCCCGACaTGATCAGCAT
ZnT2 A187S Fw	TGCGCTGTGtGTGAACATC	ZnT2 A187S Rv	GATGTTCACAGaCACAGCGCA
ZnT2 N189K Fw	GTGGCTGTGAaATCATAATG	ZnT2 N189K Rv	CATTATGATtTTCACAGCCAC
ZnT2 S199C Fw	TTCACCAGTgTGGCCATG	ZnT2 S199C Rv	CATGGCCaACTGGTGAA
ZnT2 G200D Fw	CACCAGCTGaCCATGGGCAC	ZnT2 G200D Rv	GTGCCATGGtCAGACTGGTG
ZnT2 H205D Fw	CATGGGCACAGcACGGCACCAAC	ZnT2 H205D Rv	GTTGGTGGTCCCGtGCTGTGCCCATG
ZnT2 V217L Fw	GAGAACCcCAGcTCCGAGCTGCCTC	ZnT2 V217L Rv	GAAGCGAGCTCGGAgGCTGGGGTTCTC
ZnT2 S231T Fw	GACTTTATGCAGAcCATGGGTGCCTA	ZnT2 S231T Rv	TAGGACACCCATGgTCTGCATAAAGTC
ZnT2 M232V Fw	ATGCAGAGcTGGGTGCCTA	ZnT2 M232V Rv	TAGGACACCCaGCTCTGCAT
ZnT2 M232I Fw	ATGCAGAGCaTaGGTGCCTA	ZnT2 M232I Rv	TAGGACACCaTGTCTGCAT
ZnT2 G233D Fw	CAGAGCATGGaTGTCTAGTG	ZnT2 G233D Rv	CACTAGGACaTCCATGTCTGTG
ZnT2 V257I Fw	ATCTGCACCTTCaTCTTCTCCATCTG	ZnT2 V257I Rv	CAGGATGGAGAAGaGAAGGTGCAGAT
ZnT2 V290I Fw	GACTTCACAGCTaTTCGTGATCTGCTG	ZnT2 V290I Rv	CAGCAGATCACGAaAGCTGTGAAGTC
ZnT2 R291H Fw	ACAGCTGTTCaTGATCTGCTG	ZnT2 R291H Rv	CAGCAGATCaTGAACAGCTGT
ZnT2 G299R Fw	TCGGTGGAGaGGGTAGAAGCC	ZnT2 G299R Rv	GGCTTCTACCCtTCCACCGA
ZnT2 A323T Fw	TCTGTCCACATCaCCATTGTCTCAGAAT	ZnT2 A323T Rv	ATTCTGAGCAATGGtGATGTGGACAGA
ZnT2 A330T Fw	AATACAGACaCCCAGGCTGTG	ZnT2 A330T Rv	CACAGCCTGGGtGTCTGTATT
ZnT2 R340C Fw	CAGCAGcGCCTCCAAG	ZnT2 R340C Rv	CTTGGAGGCaGCTGCTG
ZnT2 R340H Fw	GCCAGCAGCCaCTCCAAGGG	ZnT2 R340H Rv	CCCTTGGAGGtGGTGTGCGC
ZnT2 K344R Fw	CTCCAAGGGAgGTTCCACTTC	ZnT2 K344R Rv	GAAGTGGAAcTCCCTTGGAG
ZnT2 V350M Fw	TTCACACCaTGACCATCCAG	ZnT2 V350M Rv	CTGGATGGTcAIGGTGTGGAA
ZnT2 E355K Fw	ACCATCCAGATCaAGGACTACTCGGAGG	ZnT2 E355K Rv	CCTCCGAGTAgTCTtGATCTGGATGGT

Table S6. イントロン 6 を含む発現プラスミド作成に用いたプライマー

Primer	塩基配列 (5' - 3')	Primer	塩基配列 (5' - 3')
exon 6-intron 6 WT Fw	ATCCTGGTGTGATGGAAGGTAACCTGGGC	exon 6-intron 6 WT Rv	GCCCAGGTTACCTTCCATCAACACCAGGAT
exon 6-intron 6 mut Fw	ATCCTGGTGTGATGGAaGTAACCTGGGC	exon 6-intron 6 mut Rv	GCCCAGGTTACtTCCATCAACACCAGGAT
intron 6-exon 7 Fw	TGTCCTGCCGTCCTCAGGGACCCCAAGG	intron 6-exon 7 Rv	CCTTGGGGTCCCTGAGGACGGCAAGGACA

引用文献

1. Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A (2006) Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res* 5: 196-201.
2. Vallee BL, Falchuk KH (1993) The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* 73: 79-118.
3. Maret W, Li Y (2009) Coordination dynamics of zinc in proteins. *Chem Rev* 109: 4682-4707.
4. Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, Itsumura N (2015) The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism. *Physiol Rev* 95: 749-784.
5. 厚生労働省 日本人の食事摂取基準 (2015年版) .
6. Gallaher DD, Johnson PE, Hunt JR, Lykken GI, Marchello MJ (1988) Bioavailability in humans of zinc from beef: intrinsic vs extrinsic labels. *Am J Clin Nutr* 48: 350-354.
7. Krebs NF (2000) Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *J Nutr* 130: 1374S-1377S.
8. Hambidge M (2000) Human zinc deficiency. *J Nutr* 130: 1344S-1349S.
9. Krebs NF (2013) Update on zinc deficiency and excess in clinical pediatric practice. *Ann Nutr Metab* 62 Suppl 1: 19-29.
10. Aggett PJ, Atherton DJ, More J, Davey J, Delves HT, et al. (1980) Symptomatic zinc deficiency in a breast-fed preterm infant. *Arch Dis Child* 55: 547-550.
11. Zimmerman AW, Hambidge KM, Lepow ML, Greenberg RD, Stover ML, et al. (1982) Acrodermatitis in breast-fed premature infants: Evidence for a defect of mammary zinc secretion. *Pediatrics* 69: 176-183.
12. Kiechl-Kohlendorfer U, Fink FM, Steichen-Gersdorf E (2007) Transient symptomatic zinc deficiency in a breast-fed preterm infant. *Pediatr Dermatol* 24: 536-540.
13. Barbarot S, Chantier E, Kuster A, Hello M, Roze JC, et al. (2010) Symptomatic acquired zinc deficiency in at-risk premature infants: high dose preventive supplementation is necessary. *Pediatr Dermatol* 27: 380-383.
14. Kienast A, Roth B, Bossier C, Hojabri C, Hoeger PH (2007) Zinc-deficiency dermatitis in breast-fed infants. *Eur J Pediatr* 166: 189-194.
15. Park CH, Lee MJ, Kim HJ, Lee G, Park JW, et al. (2010) Congenital zinc deficiency from mutations of the SLC39A4 gene as the genetic background of acrodermatitis enteropathica. *J Korean Med Sci* 25: 1818-1820.

16. Cheng HC, Wang JD, Chen CH, Yang CS (2014) A young infant with periorificial and acral dermatitis. *J Pediatr* 165: 408-408 e401.
17. Kury S, Dreno B, Bezieau S, Giraudet S, Kharfi M, et al. (2002) Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica. *Nat Genet* 31: 239-240.
18. Wang F, Kim BE, Dufner-Beattie J, Petris MJ, Andrews G, et al. (2004) Acrodermatitis enteropathica mutations affect transport activity, localization and zinc-responsive trafficking of the mouse ZIP4 zinc transporter. *Hum Mol Genet* 13: 563-571.
19. Kambe T, Andrews GK (2009) Novel proteolytic processing of the ectodomain of the zinc transporter ZIP4 (SLC39A4) during zinc deficiency is inhibited by acrodermatitis enteropathica mutations. *Mol Cell Biol* 29: 129-139.
20. Schmitt S, Kury S, Giraud M, Dreno B, Kharfi M, et al. (2009) An update on mutations of the SLC39A4 gene in acrodermatitis enteropathica. *Hum Mutat* 30: 926-933.
21. Kasana S, Din J, Maret W (2015) Genetic causes and gene-nutrient interactions in mammalian zinc deficiencies: acrodermatitis enteropathica and transient neonatal zinc deficiency as examples. *J Trace Elem Med Biol* 29: 47-62.
22. Roberts LJ, Shadwick CF, Bergstresser PR (1987) Zinc deficiency in two full-term breast-fed infants. *J Am Acad Dermatol* 16: 301-304.
23. Chowanadisai W, Lonnerdal B, Kelleher SL (2006) Identification of a mutation in SLC30A2 (ZnT-2) in women with low milk zinc concentration that results in transient neonatal zinc deficiency. *J Biol Chem* 281: 39699-39707.
24. Murthy SC, Udagani MM, Badakali AV, Yelameli BC (2010) Symptomatic zinc deficiency in a full-term breast-fed infant. *Dermatol Online J* 16.
25. Lasry I, Seo YA, Ityel H, Shalva N, Pode-Shakked B, et al. (2012) A dominant negative heterozygous G87R mutation in the zinc transporter, ZnT-2 (SLC30A2), results in transient neonatal zinc deficiency. *J Biol Chem* 287: 29348-29361.
26. Miletta MC, Bieri A, Kernland K, Schoni MH, Petkovic V, et al. (2013) Transient neonatal zinc deficiency caused by a heterozygous G87R mutation in the zinc transporter ZnT-2 (SLC30A2) gene in the mother highlighting the importance of Zn²⁺ for normal growth and development. *Int J Endocrinol* 2013: 259189.
27. Lova Navarro M, Vera Casaño Á, Benito López C, Fernández Ballesteros MD, Godoy Díaz DJ, et al. (2014) Transient neonatal zinc deficiency due to a new autosomal dominant mutation in gene SLC30A2 (ZnT-2). *Pediatr Dermatol* 31: 251-252.
28. Krebs NF, Reidinger CJ, Hartley S, Robertson AD, Hambidge KM (1995) Zinc

- supplementation during lactation: effects on maternal status and milk zinc concentrations. *Am J Clin Nutr* 61: 1030-1036.
29. Dorea JG (2000) Zinc in human milk. *Nutr Res* 20: 1645-1687.
 30. Yamawaki N, Yamada M, Kan-no T, Kojima T, Kaneko T, et al. (2005) Macronutrient, mineral and trace element composition of breast milk from Japanese women. *J Trace Elem Med Biol* 19: 171-181.
 31. Hambidge KM, Krebs NF, Westcott JE, Miller LV (2006) Changes in zinc absorption during development. *J Pediatr* 149: S64-68.
 32. Kelleher SL, Seo YA, Lopez V (2009) Mammary gland zinc metabolism: regulation and dysregulation. *Genes Nutr* 4: 83-94.
 33. Donangelo CM, King JC (2012) Maternal zinc intakes and homeostatic adjustments during pregnancy and lactation. *Nutrients* 4: 782-798.
 34. 平部 千恵, 細川 知聡, 高原 正和, 柴田 智子, 竹内 聡, et al. (2008) 低亜鉛母乳による後天性亜鉛欠乏症の1例. *西日皮膚* 70: 402-405.
 35. Ackland ML, Michalczyk A (2006) Zinc deficiency and its inherited disorders -a review. *Genes Nutr* 1: 41-49.
 36. Kelleher SL, McCormick NH, Velasquez V, Lopez V (2011) Zinc in specialized secretory tissues: roles in the pancreas, prostate, and mammary gland. *Adv Nutr* 2: 101-111.
 37. Huang L, Gitschier J (1997) A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse. *Nat Genet* 17: 292-297.
 38. Michalczyk AA, Allen J, Blomeley RC, Ackland ML (2002) Constitutive expression of hZnT4 zinc transporter in human breast epithelial cells. *Biochem J* 364: 105-113.
 39. Michalczyk A, Varigos G, Catto-Smith A, Blomeley RC, Ackland ML (2003) Analysis of zinc transporter, hZnT4 (Slc30A4), gene expression in a mammary gland disorder leading to reduced zinc secretion into milk. *Hum Genet* 113: 202-210.
 40. Palmiter RD, Cole TB, Findley SD (1996) ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration. *EMBO J* 15: 1784-1791.
 41. Qian L, Lopez V, Seo YA, Kelleher SL (2009) Prolactin regulates ZNT2 expression through the JAK2/STAT5 signaling pathway in mammary cells. *Am J Physiol - Cell Physiol* 297: C369-C377.
 42. McCormick N, Velasquez V, Finney L, Vogt S, Kelleher SL (2010) X-ray fluorescence microscopy reveals accumulation and secretion of discrete intracellular zinc pools in the lactating mouse mammary gland. *PLoS One* 5: e11078.

43. Liuzzi JP, Bobo JA, Lichten LA, Samuelson DA, Cousins RJ (2004) Responsive transporter genes within the murine intestinal-pancreatic axis form a basis of zinc homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14355-14360.
44. Guo L, Lichten LA, Ryu MS, Liuzzi JP, Wang F, et al. (2010) STAT5-glucocorticoid receptor interaction and MTF-1 regulate the expression of ZnT2 (Slc30a2) in pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 2818-2823.
45. Suzuki T, Ishihara K, Migaki H, Ishihara K, Nagao M, et al. (2005) Two different zinc transport complexes of cation diffusion facilitator proteins localized in the secretory pathway operate to activate alkaline phosphatases in vertebrate cells. *J Biol Chem* 280: 30956-30962.
46. Murgia C, Devirgiliis C, Mancini E, Donadel G, Zalewski P, et al. (2009) Diabetes-linked zinc transporter ZnT8 is a homodimeric protein expressed by distinct rodent endocrine cell types in the pancreas and other glands. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 19: 431-439.
47. Salazar G, Falcon-Perez JM, Harrison R, Faundez V (2009) SLC30A3 (ZnT3) oligomerization by dityrosine bonds regulates its subcellular localization and metal transport capacity. *PLoS One* 4: e5896.
48. Fukunaka A, Suzuki T, Kurokawa Y, Yamazaki T, Fujiwara N, et al. (2009) Demonstration and characterization of the heterodimerization of ZnT5 and ZnT6 in the early secretory pathway. *J Biol Chem* 284: 30798-30806.
49. Lasry I, Golan Y, Berman B, Amram N, Glaser F, et al. (2014) In situ dimerization of multiple wild type and mutant zinc transporters in live cells using bimolecular fluorescence complementation. *J Biol Chem* 289: 7275-7292.
50. Lu M, Fu D (2007) Structure of the Zinc Transporter YiiP. *Science* 317: 1746-1748.
51. Lu M, Chai J, Fu D (2009) Structural basis for autoregulation of the zinc transporter YiiP. *Nat Struct Mol Biol* 16: 1063-1067.
52. Coudray N, Valvo S, Hu M, Lasala R, Kim C, et al. (2013) Inward-facing conformation of the zinc transporter YiiP revealed by cryoelectron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 2140-2145.
53. Tuschl K, Clayton PT, Gospe SM, Jr., Gulab S, Ibrahim S, et al. (2012) Syndrome of hepatic cirrhosis, dystonia, polycythemia, and hypermanganesemia caused by mutations in SLC30A10, a manganese transporter in man. *Am J Hum Genet* 90: 457-466.
54. Quadri M, Federico A, Zhao T, Breedveld GJ, Battisti C, et al. (2012) Mutations in SLC30A10 cause parkinsonism and dystonia with hypermanganesemia, polycythemia,

- and chronic liver disease. *Am J Hum Genet* 90: 467-477.
55. Nishito Y, Tsuji N, Fujishiro H, Takeda TA, Yamazaki T, et al. (2016) Direct comparison of manganese detoxification/efflux proteins and molecular characterization of ZnT10 as a manganese transporter. *J Biol Chem* 291: 14773-14787.
 56. Ohana E, Hoch E, Keasar C, Kambe T, Yifrach O, et al. (2009) Identification of the Zn²⁺ binding site and mode of operation of a mammalian Zn²⁺ transporter. *J Biol Chem* 284: 17677-17686.
 57. Shusterman E, Beharier O, Shiri L, Zarivach R, Etzion Y, et al. (2014) ZnT-1 extrudes zinc from mammalian cells functioning as a Zn²⁺/H⁺ exchanger. *Metallomics* 6: 1656-1663.
 58. Kawachi M, Kobae Y, Mimura T, Maeshima M (2008) Deletion of a histidine-rich loop of AtMTP1, a vacuolar Zn²⁺/H⁺ antiporter of *Arabidopsis thaliana*, stimulates the transport activity. *J Biol Chem* 283: 8374-8383.
 59. Podar D, Scherer J, Noordally Z, Herzyk P, Nies D, et al. (2012) Metal selectivity determinants in a family of transition metal transporters. *J Biol Chem* 287: 3185-3196.
 60. Kawachi M, Kobae Y, Kogawa S, Mimura T, Kramer U, et al. (2012) Amino acid screening based on structural modeling identifies critical residues for the function, ion selectivity and structure of *Arabidopsis* MTP1. *FEBS J* 279: 2339-2356.
 61. Chao Y, Fu D (2004) Kinetic study of the antiport mechanism of an *Escherichia coli* zinc transporter, ZitB. *J Biol Chem* 279: 12043-12050.
 62. Gupta S, Chai J, Cheng J, D'Mello R, Chance MR, et al. (2014) Visualizing the kinetic power stroke that drives proton-coupled zinc(II) transport. *Nature* 512: 101-104.
 63. 奥村 さやか, 寺川 敏郎, 横路 征太郎, 宮田 章子 (2009) 低亜鉛母乳による亜鉛欠乏症の1乳児例. *外来小児* 12: 221-225.
 64. 安池 理紗, 奥沢 康太郎, 峠岡 理沙, 中島 久和, 加藤 則人 (2013) 低亜鉛母乳による亜鉛欠乏症の1例. *日小児皮膚会誌* 32: 153-156.
 65. Buerstedde J-M, Takeda S (1991) Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell* 67: 179-188.
 66. Fujimoto S, Itsumura N, Tsuji T, Anan Y, Tsuji N, et al. (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.
 67. Palmiter RD, Findley SD (1995) Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J* 14: 639-649.
 68. Suzuki T, Ishihara K, Migaki H, Matsuura W, Kohda A, et al. (2005) Zinc transporters,

- ZnT5 and ZnT7, are required for the activation of alkaline phosphatases, zinc-requiring enzymes that are glycosylphosphatidylinositol-anchored to the cytoplasmic membrane. *J Biol Chem* 280: 637-643.
69. Fukunaka A, Kurokawa Y, Teranishi F, Sekler I, Oda K, et al. (2011) Tissue nonspecific alkaline phosphatase is activated via a two-step mechanism by zinc transport complexes in the early secretory pathway. *J Biol Chem* 286: 16363-16373.
 70. Palmiter RD, Huang L (2004) Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflugers Arch* 447: 744-751.
 71. Kimura T, Li Y, Okumura F, Itoh N, Nakanishi T, et al. (2008) Chromium(VI) inhibits mouse metallothionein-I gene transcription by preventing the zinc-dependent formation of an MTF-1-p300 complex. *Biochem J* 415: 477-482.
 72. Turunen JJ, Niemela EH, Verma B, Frilander MJ (2013) The significant other: splicing by the minor spliceosome. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4: 61-76.
 73. Woodroffe CC, Masalha R, Barnes KR, Frederickson CJ, Lippard SJ (2004) Membrane-permeable and -impermeable sensors of the Zinpyr family and their application to imaging of hippocampal zinc in vivo. *Chem Biol* 11: 1659-1666.
 74. Falcon-Perez JM, Dell'Angelica EC (2007) Zinc transporter 2 (SLC30A2) can suppress the vesicular zinc defect of adaptor protein 3-depleted fibroblasts by promoting zinc accumulation in lysosomes. *Exp Cell Res* 313: 1473-1483.
 75. Qian L, Wang B, Tang N, Zhang W, Cai W (2012) Polymorphisms of SLC30A2 and selected perinatal factors associated with low milk zinc in Chinese breastfeeding women. *Early Hum Dev* 88: 663-668.
 76. Golan Y, Itsumura N, Glaser F, Berman B, Kambe T, et al. (2016) Molecular basis of transient neonatal zinc deficiency: Novel ZnT2 mutations disrupting zinc binding and permeation. *J Biol Chem* 291: 13546-13559.
 77. 六戸 大樹, 中野 創, 澤村 大輔 (2015) Transient neonatal zinc deficiency. *臨皮* 69: 27-30.
 78. Dórea JG (2002) Zinc deficiency in nursing infants. *J Am Coll Nutr* 21: 84-87.
 79. Lin H, Burton D, Li L, Warner DE, Phillips JD, et al. (2009) Gain-of-function mutations identify amino acids within transmembrane domains of the yeast vacuolar transporter Zrc1 that determine metal specificity. *Biochem J* 422: 273-283.
 80. Quadri M, Kamate M, Sharma S, Olgiati S, Graafland J, et al. (2015) Manganese transport disorder: novel SLC30A10 mutations and early phenotypes. *Mov Disord* 30: 996-1001.

81. Hildebrand MS, Phillips AM, Mullen SA, Adlard PA, Hardies K, et al. (2015) Loss of synaptic Zn²⁺ transporter function increases risk of febrile seizures. *Sci Rep* 5: 17816.
82. Vazquez F, Ramaswamy S, Nakamura N, Sellers WR (2000) Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol* 20: 5010-5018.
83. Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Takiyama K, Koike T (2006) Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol Cell Proteomics* 5: 749-757.
84. Hennigar SR, Kelleher SL (2015) TNF α post-translationally targets ZnT2 to accumulate zinc in lysosomes. *J Cell Physiol* 230: 2345-2350.
85. Seo YA, Lee S, Hennigar SR, Kelleher SL (2014) Prolactin (PRL)-stimulated ubiquitination of ZnT2 mediates a transient increase in zinc secretion followed by ZnT2 degradation in mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 289: 23653-23661.
86. Seo YA, Kelleher SL (2010) Functional analysis of two single nucleotide polymorphisms in SLC30A2 (ZnT2): implications for mammary gland function and breast disease in women. *Physiol Genomics* 42A: 219-227.
87. Alam S, Hennigar SR, Gallagher C, Soybel DI, Kelleher SL (2015) Exome sequencing of SLC30A2 identifies novel loss- and gain-of-function variants associated with breast cell dysfunction. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 20: 159-172.
88. Kumar L, Michalczyk A, McKay J, Ford D, Kambe T, et al. (2015) Altered expression of two zinc transporters, SLC30A5 and SLC30A6, underlies a mammary gland disorder of reduced zinc secretion into milk. *Genes Nutr* 10: 1-16.
89. Ishihara K, Yamazaki T, Ishida Y, Suzuki T, Oda K, et al. (2006) Zinc transport complexes contribute to the homeostatic maintenance of secretory pathway function in vertebrate cells. *J Biol Chem* 281: 17743-17750.
90. Kelleher SL, Velasquez V, Croxford TP, McCormick NH, Lopez V, et al. (2012) Mapping the zinc-transporting system in mammary cells: molecular analysis reveals a phenotype-dependent zinc-transporting network during lactation. *J Cell Physiol* 227: 1761-1770.
91. Kelleher SL, Lönnerdal B (2003) Zn transporter levels and localization change throughout lactation in rat mammary gland and are regulated by Zn in mammary cells. *J Nutr* 133: 3378-3385.
92. Hogstrand C, Maret W (2016) Genetics of Human Zinc Deficiencies. *eLS*. 1-8.
93. Lee S, Hennigar SR, Alam S, Nishida K, Kelleher SL (2015) Essential role for Zinc Transporter 2 (ZnT2)-mediated zinc transport in mammary gland development and

- function during lactation. *J Biol Chem* 290: 13064-13078.
94. Hennigar SR, Seo YA, Sharma S, Soybel DI, Kelleher SL (2015) ZnT2 is a critical mediator of lysosomal-mediated cell death during early mammary gland involution. *Sci Rep* 5: 8033.
95. Podany AB, Wright J, Lamendella R, Soybel DI, Kelleher SL (2016) ZnT2-mediated zinc import into Paneth cell granules is necessary for coordinated secretion and Paneth Cell function in mice. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2: 369-383.
96. WHO (2014) Global Nutrition Targets 2025 Breastfeeding Policy Brief.
97. 厚生労働省 平成 22 年乳幼児身体発育調査.

謝辞

本研究を進めるにあたり、多くの方にお世話になりました。

はじめに、私が学部 4 回生で研究室に配属されて以来、指導教員として大変熱心なご指導を賜っております、京都大学大学院生命科学研究科生体情報応答学分野准教授の神戸大朋 博士に、特に深甚なる謝意を表します。

生体情報応答学分野教授の永尾雅哉 博士から大変多くのご指摘を、同助教の宮前友策 博士から多数のご助言を頂きました。心より感謝申し上げます。副指導教員としてご指導頂いた、京都大学大学院生命科学研究科教授の佐藤文彦 博士、同准教授の吉村成弘 博士、同助教の伊福健太郎 博士からは、厳しい指摘や有益なアドバイスを頂き、励みとなりました。誠にありがとうございました。

帝京平成大学教授の児玉浩子 博士、日本大学医学部准教授の稲毛康司 博士、鳥取大学医学部附属病院の福嶋健志 先生、さいわいこどもクリニック院長の宮田章子 先生、京都府立医科大学学内講師の峠岡理沙 博士、京都府立医科大学教授の加藤則人 博士には、医師として本研究にご協力頂き、見出された症例の臨床データのご提供や、大変有益なご指摘を頂きました。深く御礼申し上げます。

龍谷大学講師の岡崎史子 博士、京都女子大学教授の成田宏史 博士には、本研究の実施に欠かせない、ZnT2 抗体を作成して頂きました。心から感謝いたします。また、摂南大学准教授の木村朋紀 博士には、プラスミドを分与頂きました。ありがとうございました。

イスラエル工科大学教授の Yehuda G. Assaraf 博士率いるグループとの共同研究により、本研究の内容に非常に意義のある結果を加えることができました。厚く御礼を申し上げます。

本研究の内容には、生体情報応答学分野の先輩・同期・後輩の手によって得られたデータを多く含んでいます。皆様の協力がなければ、本研究は完成しませんでした。中でも、変異体の大量の解析結果を出して頂いた、黍原祥恵氏、本研究に最初に着手された、寺西文恵氏、本研究の後半の実験に協力して頂いた、福江和久氏、西藤有希奈氏、石田理湖氏、データを提供頂いた、辻徳治氏に、特に御礼を申し上げます。本当に助かりました。

加えて、研究室の日々の手続きその他で大変お世話になりました、事務補佐官の嶋林かほる氏にも、謝意を表します。

最後に、研究に専念できる環境を与えてくれた家族に、感謝します。

2016年7月15日

逸村直也

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Naoya Itsumura, Yasuji Inamo, Fumiko Okazaki, Fumie Teranishi, Hiroshi Narita,
Taiho Kambe and Hiroko Kodama

Compound Heterozygous Mutations in *SLC30A2/ZnT2* Results in Low Milk Zinc Concentrations: A Novel Mechanism for Zinc Deficiency in a Breast-Fed Infant

PLOS ONE, 8(5), e64045, 2013

Naoya Itsumura, Yoshie Kibihara, Kazuhisa Fukue, Akiko Miyata, Kenji Fukushima,
Risa Tamagawa-Mineoka, Norito Katoh, Yukina Nishito, Riko Ishida, Hiroshi Narita,
Hiroko Kodama and Taiho Kambe

Novel mutations in *SLC30A2* involved in the pathogenesis of transient neonatal zinc deficiency

Pediatric Research, advance online publication, doi: 10.1038/pr.2016.108, 2016