

| | |
|----------|--|
| 氏名 | すずきともゆき 鈴木智之 |
| 学位(専攻分野) | 博士(生命科学) |
| 学位記番号 | 生博第62号 |
| 学位授与の日付 | 平成18年3月23日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 研究科・専攻 | 生命科学研究科統合生命科学専攻 |
| 学位論文題目 | 亜鉛トランスポーター ZnT5 と ZnT6 と ZnT7 による亜鉛要求性酵素アルカリフォスファターゼの活性化に関する研究 |
| 論文調査委員 | (主査) 教授 永尾雅哉 教授 山本憲二 教授 佐藤文彦 |

論文内容の要旨

亜鉛は生体の必須微量元素であり、生体内には亜鉛を補因子として要求する酵素が数多く知られている。しかし、生体において亜鉛要求酵素に亜鉛が供給される仕組みは不明であった。近年、分泌経路に存在する亜鉛トランスポーターの存在が明らかになり、これらの亜鉛トランスポーターによって分泌経路を介して成熟する亜鉛要求性酵素に亜鉛が供給される可能性が考えられた。そこで、分泌経路に存在する亜鉛トランスポーター ZnT5, 6 および 7 についてトリ DT40 細胞を用いてこれらの遺伝子の欠損株を作製し、細胞膜に局在する亜鉛要求性酵素アルカリフォスファターゼ (ALP) の活性を指標にして、これらの亜鉛トランスポーターの機能解析を行った。

まず、ZnT5, ZnT6, ZnT7 単独欠損させた DT40 細胞株における ALP 活性が、それぞれ野生株と比較して 45%, 25%, 75% 程度に減少することを見出した。またこれらの欠損株にそれぞれの遺伝子のヒトのオソログ遺伝子を導入することで、いずれの細胞でも ALP 活性の回復が見られることを示した。これらの結果から、ZnT5, ZnT6, ZnT7 は分泌経路内腔に亜鉛を輸送し、内腔でアポ型 ALP に亜鉛を供給して、ホロ型 ALP への成熟に関与することを示した。

次に 2 重欠損株や 3 重欠損株を樹立して ALP 活性について検討したところ、ZnT5 と ZnT6 は同じ経路で、ZnT7 は ZnT5, ZnT6 とは異なる経路で ALP を活性化することを明らかにした。さらに免疫沈降法を用いた解析を行い、ZnT5 と ZnT6 はヘテロ複合体を形成すること、ZnT7 はホモ複合体を形成することを明らかにした。また ZnT7 は ZnT5 や ZnT6 とは相互作用せず、また ZnT5 や ZnT6 はホモ複合体を形成しなかったことから、ZnT5/ZnT6 ヘテロ複合体と ZnT7 ホモ複合体はそれぞれ独立して ALP を活性化することを示した。

さらに ZnT5/ZnT7 ヘテロ複合体に関し、解析を進め、亜鉛結合部位と考えられる ZnT5 のヒスチジン残基に富んだ領域は、この複合体の亜鉛輸送機能に必須であるのに対して、ZnT6 において亜鉛結合部位と予想されたセリン残基に富んだ領域は、この複合体の亜鉛輸送機能に必須ではないことを明らかにした。また、ZnT5 は他の亜鉛トランスポーターと高い相対性を有する C 末端側の 6 回膜貫通領域のみで ZnT6 との複合体形成は可能であり、ALP を活性化出来ることを示した。

また ZnT5 と ZnT7 のキメラタンパク質を解析して、ZnT5 の 5 番目の膜貫通領域から C 末端側の部分に、ZnT6 との相互作用に必要な部位が存在することを示した。

以上、分泌経路に局在する亜鉛トランスポーター ZnT5, ZnT6 及び ZnT7 の複合体形成による、分泌経路での機能について明らかにした。

論文審査の結果の要旨

生体の必須微量元素である亜鉛の輸送に関わる分子のうち、分泌経路に存在することが知られるようになった亜鉛トランスポーター ZnT5, ZnT6 および ZnT7 に注目し、分泌経路を介して成熟する亜鉛要求性酵素であるアルカリフォスファターゼ (ALP) を指標にして、これらの亜鉛トランスポーターの機能について解析を行っている。手法として遺伝子破壊が

容易に行えるトリ DT40 細胞を用いて単独, 2重, 3重欠損株を作成することで, これらの3種類の亜鉛トランスポーターの役割について解析している。評価できる点は以下の点である。

1. ZnT5, ZnT6, ZnT7 単独欠損させた DT40 細胞株における ALP 活性が, 野生株と比較して減少することを見出している。またこれらの欠損株にそれぞれの遺伝子のヒトのオーソログ遺伝子を導入することで, いずれの細胞でも ALP 活性の回復が見られることを示し, ZnT5, ZnT6, ZnT7 が分泌経路内腔に亜鉛を輸送し, アポ型 ALP に供給して, ホロ型 ALP へ成熟させることに関与することを示している。
2. 次に2重欠損株や3重欠損株を樹立して, ALP 活性について検討し, ZnT5 と ZnT6 は同じ経路で, ZnT7 は ZnT5 や ZnT6 とは異なる経路で ALP を活性化することを明らかにしている。さらに免疫沈降法を用いた解析を行い, ZnT5 と ZnT6 はヘテロ複合体を形成すること, ZnT7 はホモ複合体を形成することを明らかにしている。また ZnT7 は ZnT5 と ZnT6 とは相互作用せず, また ZnT5 や ZnT6 はホモ複合体を形成しなかったことから, ZnT5/ZnT6 ヘテロ複合体と ZnT7 ホモ複合体はそれぞれ独立して ALP を活性化することを示している。
3. ZnT5/6ヘテロ複合体について解析を進め, 亜鉛結合部位と予想された ZnT5 のヒスチジン残基に富む領域は, この亜鉛輸送複合体の機能に必須であるのに対して, ZnT6 のセリン残基に富む領域は必須でないことを明らかにしている。さらに ZnT5 と ZnT7 のキメラタンパク質を解析し ZnT5 は5番目の膜貫通領域から C 末端側に ZnT6 との相互作用部位が存在することを示している。

以上のように, 本論文は分泌経路に存在する亜鉛トランスポーターの構造, 機能について明らかにしたものであり, 細胞生物学に寄与するところが大きい。よって本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。

なお, 平成18年1月25日, 論文内容とそれに関連した分野にわたり口頭試問した結果, 博士(生命科学)の学位を授与される学力が十分にあるものと認めた。