

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	武田 貴成
論文題目	亜鉛欠乏が細胞外ATP代謝に与える影響に関する解析		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>必須微量元素である亜鉛は、生体内で様々な機能を発揮する。亜鉛が欠乏すると、皮膚炎、脱毛、発育障害、貧血など、多様な症状が引き起こされるが、これらの症状の詳細な発症メカニズムは不明である。亜鉛欠乏症は、亜鉛の不足により何らかの代謝系が十分に機能しないことで発症すると考えられている。このような代謝系として、複数の亜鉛要求性酵素が機能する細胞外 ATP 代謝があげられ、その異常は炎症やアレルギーなど亜鉛欠乏症と類似した症状を引き起こすことが知られている。本研究では、細胞外 ATP 代謝の遅延が、亜鉛欠乏症と関連があるのではないかと考え、培養細胞およびラットを用いて解析を実施した。</p> <p>細胞外 ATP 代謝には、亜鉛を活性中心に持つ三つの亜鉛要求性酵素、alkaline phosphatase; ALP、cluster of differentiation 73; CD73、ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase; ENPP が機能することが知られている。本研究では、まずこれらの酵素に着目し、亜鉛欠乏による細胞外 ATP 代謝への影響について解析した。その結果、種々の培養細胞における膜画分中、および膜から切り出されてラット血漿中に存在する ALP、CD73、ENPP の活性が亜鉛欠乏によって大きく低下することを明らかにした。次に、亜鉛欠乏によるこれらの酵素活性の低下が実際の細胞外 ATP 代謝に与える影響について検討した。培養細胞から調製したこれらの酵素を含む膜画分や、ラット血漿を用いて、細胞外 ATP 代謝を測定するため、ATP を分解させ、残存する ATP と生じた ADP、AMP、アデノシンの量を、高速液体クロマトグラフィーを用いて定量した結果、いずれにおいても亜鉛欠乏によって、細胞外 ATP 代謝に関わるこれらの酵素による ATP 代謝は遅延しており、測定系に加えた ATP の残存量や生成した ADP 量の増加、アデノシン量の減少などが引き起こされていることを見出した。</p> <p>続いて、ALP、CD73、ENPP の亜鉛トランスポーターを介した亜鉛獲得による活性化機構について、ニワトリ B リンパ球由来 DT40 細胞の亜鉛トランスポーター欠損株、を用いた解析を実施した。その結果、CD73 は、先行研究で示されている ALP の一種である tissue nonspecific alkaline phosphatase (TNAP)と同様に、亜鉛トランスポーター ZNT5-ZNT6 複合体及び ZNT7 複合体 (以下、ZNT 両複合体) に依存した機構で活性化されていることが明らかになった。一方、ENPP は、ZNT5, 6, 7 を欠損する三重欠損 (TKO) 株での発現によっても酵素活性は低下せずにタンパク質も安定に存在しており、ZNT 両複合体に依存しない経路で亜鉛を獲得していることを明らかにした。この ENPP における ZNT 両複合体への依存性の違いを、様々な ENPP 変異体を用いて解析し、ENPP の活性中心近傍に位置する領域の存在が ZNT 複合体への依存性の有無の違いに関わる可能性を提示した。</p> <p>本研究の結果から、亜鉛欠乏症は亜鉛要求性酵素の活性低下を介した細胞外 ATP 代謝の遅延によって引き起こされる可能性が示唆された。さらに、これら亜鉛要求性酵素の活性化機構は、三つの細胞外 ATP 代謝に関わる亜鉛要求性酵素で様でなく、酵素によって、異なる機序によって亜鉛を獲得し活性化されていることが明らかにされた。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

生体内で様々な機能を発揮する必須微量元素である亜鉛は、欠乏すると皮膚炎、脱毛、発育障害、貧血など、多様な症状が引き起こすが、この詳細な発症メカニズムは不明である。本研究は、亜鉛を活性中心に持つ複数の亜鉛要求性酵素が機能する細胞外 ATP 代謝に着目し、細胞外 ATP 代謝の遅延が亜鉛欠乏症の発症と関連する可能性について、培養細胞およびラットを用いて解析した結果をまとめたものである。以下の知見を得ている。

- 1) 種々の培養細胞において、細胞外ATP代謝に関わる三つの亜鉛要求性酵素 ALP、CD73、ENPPが存在する膜画分、またはそれらの酵素が膜から切り離されて存在するラット血漿を用いて、亜鉛欠乏によってこれらの酵素活性が大きく低下することを示した。
- 2) 亜鉛欠乏によるこれらの酵素活性の低下が、細胞外ATP代謝に与える影響について検討するため、高速液体クロマトグラフィーを用いた細胞外ATP代謝における代謝産物(ATP、ADP、AMP、アデノシン)の分離・定量系を樹立した。実際に、培養細胞から調製した膜画分、およびラット血漿において、亜鉛欠乏によって細胞外ATP代謝が遅延し、細胞外ATP量やADP量の増加、アデノシン量の減少などが引き起こされていることを明らかにした。
- 3) ALP、CD73、ENPPの亜鉛獲得による活性化機構について解析を実施し、CD73は、先行研究で示されているALPの一種であるTNAPと同様に、亜鉛トランスポーターであるZNT5-6、ZNT7両複合体に依存した機構で活性化されていることを示した。一方、ENPPは、両複合体が欠損したTKO株で発現させても酵素活性は低下せず、タンパク質も安定に存在していることから、ZNT両複合体に依存しない経路で亜鉛を獲得していることが示唆された。
- 4) ENPPにおけるZNT両複合体への依存性の違いを、様々なENPP変異体を用いて解析し、ENPPの活性中心近傍に位置する領域の存在がその違いに関わる可能性を提示した。

以上より、細胞外ATP代謝と亜鉛欠乏症の関連については、亜鉛要求性酵素の活性低下を介して、欠乏症の発症につながる可能性を示唆するとともに、これら亜鉛要求性酵素の亜鉛による活性化機構が一様でなく、これらの酵素は異なる機序によって亜鉛を獲得し、活性化されていることを明示した。

以上のように、本研究は、亜鉛欠乏症の発症に関わる分子レベルでの新しい知見を明示した成果として、生化学や栄養学分野に大きく貢献するものである。また、記載内容から、申請者は生命科学に関する高度で幅広い知識、専攻分野における優れた研究能力を有し、生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見と概念を提示していると判断できる。また、本論文は、論理的かつ一貫性をもって記述されていた。よって、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。

また、令和2年1月21日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、申請者を合格と認めた。

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

要旨公開可能日： 年 月 日