

氏 名	宮 部 真 司
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1089 号
学位授与の日付	平 成 12 年 1 月 24 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	農 学 研 究 科 食 品 工 学 専 攻
学位論文題目	Studies on Zinc Homeostasis by <i>ZRC1</i> in Yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> における <i>ZRC1</i> による亜鉛恒常性維持に関する 研究)

論文調査委員 (主 査) 教 授 木 村 光 教 授 熊 谷 英 彦 教 授 江 崎 信 芳

論 文 内 容 の 要 旨

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の *ZRC1* (Zinc Resistance Conferring) 遺伝子は亜鉛の毒性に対するマルチコピー サプレッサーとして取得された。Zrc 1 p は重金属の解毒に関与する CDF (Cation Diffusion Facilitator) ファミリーに属する。*zrc1* 遺伝子破壊株は亜鉛に対して感受性を示すことから、本遺伝子産物も酵母細胞における亜鉛の解毒に重要な役割を演じていると考えられているが、その詳細な機構については明らかではない。著者は *ZRC1* 遺伝子の発現制御機構、Zrc 1 p の細胞内局在性、および細胞内亜鉛含量の解析を通して、*ZRC1* 遺伝子産物による細胞内亜鉛の恒常性維持機構について研究を行った。その結果、Zrc 1 p は亜鉛の解毒のみならず亜鉛飢餓を回避させる機能をも有することを明らかにした。本論文の主な内容は以下のとおりである。

第 1 部 第 1 章 *ZRC1* 遺伝子の亜鉛制限条件下における発現誘導

ZRC1 遺伝子の発現条件を明らかにするため、*ZRC1-lacZ* レポーター遺伝子を用いて検討した結果、本遺伝子は亜鉛耐性を賦与する遺伝子であるにも拘らず、その発現は金属イオンキレート剤である EDTA によって誘導された。この発現誘導は、EDTA を含む培地に対して亜鉛を添加しておくことによって特異的に抑制された。また、亜鉛を含まない最少合成培地を用いた場合にも、*ZRC1* 遺伝子の発現が誘導された。一方、これらの発現誘導は亜鉛制限条件下で 6 時間から 8 時間培養した後に観察された。細胞内亜鉛含量を経時的に測定した結果、亜鉛制限条件下での増殖に伴い細胞内亜鉛含量は減少していた。まだ、亜鉛の取り込み系トランスポーターを欠失した株での EDTA による *ZRC1* 遺伝子の発現誘導は亜鉛によって抑制されなかったことから、本遺伝子の発現は細胞内の亜鉛含量の低下に応答していることを明らかにした。

第 1 部 第 2 章 *ZRC1* 遺伝子の発現制御に及ぼす Zap 1 p の影響

亜鉛制限条件下では転写因子 Zap 1 p が亜鉛取り込み系トランスポーターをコードしている遺伝子の発現を誘導することが知られている。そこで、*ZRC1* 遺伝子の発現制御に及ぼす Zap 1 p の影響を調べるために、*zap1* 遺伝子破壊株を構築し、*ZRC1* 遺伝子発現量を測定した。その結果、EDTA に応答した発現誘導は認められず、さらに、*ZRC1* 遺伝子のプロモーター領域に保存されている Zap 1 p の結合領域 (ZRE: Zinc-Responsive Element) と相同性の高い領域を欠失させた場合も EDTA に応答した発現誘導は認められなかった。これらの結果から、亜鉛制限条件下における *ZRC1* 遺伝子の発現誘導は Zap 1 p により制御されていることを明らかにした。

第 2 部 *ZRC1* 遺伝子破壊が細胞内亜鉛の動態に及ぼす影響

Zrc 1 p の細胞内局在性を Zrc 1 p-GFP 融合タンパク質を用いて検討した結果、液胞膜に局在していることを見出した。また、対数増殖期の *zrc1* 遺伝子破壊株を亜鉛制限培地で培養した後の細胞数は、野生株の約 55% であった。そこで、Zrc 1 p は亜鉛制限条件下において液胞から細胞質への亜鉛輸送に関与するのではないかと考え、細胞質の亜鉛濃度を検討するためにグリオキサラーゼ I 活性及び *ZRC1* 遺伝子発現量を測定した。グリオキサラーゼ I は活性発現に亜鉛を必要とする細胞質

酵素であり、また、*ZRC1* 遺伝子の発現は細胞内亜鉛含量の低下によって Zap 1 p 依存的に誘導されることから、どちらも細胞質の亜鉛濃度を反映していると考えられる。通常の培地で培養した場合、野生株と *zrc1* 遺伝子破壊株でグリオキサラーゼ I 活性、および *ZRC1* 遺伝子発現量に差は認められなかったが、亜鉛を制限した培地で培養した場合、*zrc1* 遺伝子破壊株のグリオキサラーゼ I 活性は野生株よりも低く、また *ZRC1* 遺伝子発現量は野生株よりも高かった。一方、通常の培養条件での *zrc1* 遺伝子破壊株の細胞内亜鉛含量は野生株の約 60% であった。以上の知見から、Zrc 1 p は通常の亜鉛濃度では液胞における亜鉛プールの形成、つまり細胞質から液胞への亜鉛輸送に関与する一方、亜鉛制限条件下では液胞から細胞質への亜鉛輸送に関与することで細胞質の亜鉛濃度の低下を防いでいるものと考察した。

論文審査の結果の要旨

本論文では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の亜鉛耐性賦与遺伝子として単離された *ZRC1* (Zinc Resistance Confering) 遺伝子の発現が亜鉛ではなく亜鉛制限条件下で誘導されることを見出し、従来、亜鉛の解毒にのみ機能すると考えられてきた Zrc 1 p が亜鉛飢餓を回避させる方向にも機能していることを示した。評価すべき点は以下のとおりである。

1. *ZRC1* 遺伝子の発現条件を検討した結果、本遺伝子の発現は金属イオンキレーターである EDTA によって誘導されることを見出した。また、EDTA による *ZRC1* 遺伝子の発現誘導は培地中の亜鉛が制限されたことに起因していることを明らかにした。

2. EDTA 含有培地における *ZRC1* 遺伝子の発現量と細胞内亜鉛含量を経時的に測定した結果、本遺伝子の発現は亜鉛を制限した培地での増殖に伴う細胞内亜鉛含量の低下にตอบสนองしていることを明らかにした。

3. 転写因子 Zap 1 p は細胞内亜鉛含量の低下にตอบสนองして標的遺伝子の発現を誘導することが知られているが、亜鉛制限条件下における *ZRC1* 遺伝子の発現も Zap 1 p によって制御されていることを明らかにした。

4. Zrc 1 p の局在性を明らかにするために、*ZRC1*-GFP 融合遺伝子を *zrc1* 遺伝子破壊株に導入し蛍光顕微鏡観察を行った結果、Zrc 1 p は液胞膜に局在することを明らかにした。

5. *zrc1* 遺伝子破壊株を亜鉛制限条件下で培養した場合、野生株の 55% の細胞数であることを明らかにした。

6. 活性発現に亜鉛を必要とする細胞質酵素であるグリオキサラーゼ I 活性を野生株と *zrc1* 遺伝子破壊株で比較したところ、基底レベルでの活性に差はみられないものの、亜鉛制限条件下で培養した場合、野生株ではコントロールの約 50% にまで活性が低下したのに対し、*zrc1* 遺伝子破壊株では約 70% の活性が消失していることを明らかにした。

7. *zrc1* 遺伝子破壊株における *ZRC1* 遺伝子の基礎発現量は野生株のそれとくらべ差は認められないが、亜鉛制限条件下では野生株よりも強く誘導されていることを明らかにした。

8. 細胞内亜鉛含量を原子吸光分析により測定した結果、*zrc1* 遺伝子破壊株の亜鉛含量は野生株の約 60% であることを明らかにした。これらの結果から通常の培養条件下では Zrc 1 p は細胞質から液胞への亜鉛輸送に関与する一方、亜鉛制限条件下では Zrc 1 p は液胞から細胞質への亜鉛輸送に関与することで細胞質の亜鉛濃度の低下を防いでいることを示した。

以上のように、本論文は従来、亜鉛の解毒にのみ機能すると考えられてきた Zrc 1 p が亜鉛制限条件下において、細胞質の亜鉛濃度の低下を防ぐために機能していることを明らかにしたものである。細胞にとって必須金属である亜鉛の新規な恒常性維持機構を明らかにしたことは応用微生物学、分子生物学、微生物生理学などの発展に寄与するところが大い。よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 11 年 12 月 14 日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が充分あるものと認めた。