

京都大学	博士（生命科学）	氏名	福 中 彩 子
論文題目	亜鉛トランスポーターZnT5/ZnT6のヘテロ複合体の性状解析		
（論文内容の要旨） 分泌経路を介して成熟する亜鉛要求性酵素は、分泌生合成過程で亜鉛を獲得する。この過程には、亜鉛トランスポーターZnT5/ZnT6ヘテロ複合体が関与する。ほぼ全てのZnTトランスポーターが、ホモ複合体(二量体)を形成して機能することが明らかにされているため、ZnT5とZnT6のヘテロ複合体形成機構には非常に興味が集まっていたが、その詳細に関しての知見はほとんど得られていなかった。そこで、ZnT5とZnT6が形成するヘテロ複合体の形成機構について、輸送機構の特徴と合わせて解析を行った。 ZnTトランスポーターによる亜鉛の輸送には、膜貫通領域内に亜鉛結合部位が形成される必要がある。大腸菌のZnTホモログのX線結晶構造解析の結果等から、この亜鉛結合部位は、第二と第五膜貫通領域に二つずつ存在する保存された四つの親水性アミノ酸残基により形成されると考えられている。しかしながら、ZnT6では、この四つの親水性アミノ酸残基のうち、二つが疎水性アミノ酸残基となっているため、他のホモ二量体を形成するZnTと類似した膜貫通領域内の亜鉛結合部位を形成するには、二量体より大きい三量体以上の複合体を形成する必要がある可能性が考えられた。そこで、この可能性について、異なるタグで標識したZnT5とZnT6を様々な組み合わせで発現させ、形成される複合体を免疫沈降法にて解析することにより検討した。その結果、先の予想に反して、ZnT5とZnT6はヘテロ二量体を形成して機能することを証明した。さらに、ZnT6の第二と第五膜貫通領域に存在する二つの親水性アミノ酸残基を疎水性アミノ酸残基に置換した変異体、及び、二つの疎水性アミノ酸残基を親水性アミノ酸残基に置換した変異体においても、ともに分泌経路内への亜鉛を供給する活性を保持することを明らかにし、ZnT5/ZnT6ヘテロ二量体においては、ZnT6が膜貫通領域内の亜鉛結合部位の形成には関与しないことを示した。 次に、ZnT5/ZnT6ヘテロ二量体の形成に重要な領域の同定を試みた。ZnT5は他のZnTトランスポーターと異なり長いN末領域を有することを特徴とするが、この領域がヘテロ複合体の形成に重要であるかどうかについて解析を行った。N末領域を欠失させたZnT5は、全長のものと同じ細胞内局在やほぼ等しい分泌経路内への亜鉛供給活性を有することを明らかにし、ZnT5の特徴的なN末領域はヘテロ複合体の形成に必要でないことを示した。さらに、ZnT6との結合に必要なZnT5の領域を同定するために、ZnT5と相同性が高いZnT7とのキメラタンパク質を作成し、ZnT6との相互作用について免疫沈降法にて解析した。その結果より、ZnT5の最終膜貫通領域以降の細胞質側に位置するカルボキシル末端領域が、ZnT6との結合に必要であることを示した。カルボキシル末端領域は、他のZnTトランスポーターにおいても、二量体形成に重要な役割を果たすとされており、ZnTトランスポーターの複合体形成に必要不可欠な領域であると予想される。 最後に、ZnT5/ZnT6ヘテロ二量体の発現の有無が亜鉛要求性酵素、性特異的アルカリフォスファターゼ（TNAP）の成熟化へ与える影響についての生化学的解析を行った。ZnT5/ZnT6ヘテロ二量体を発現させた細胞は、TNAPをホロ酵素へ変換できるが、亜鉛欠乏下では、ほぼ全てのTNAPがアポ型タンパク質のまま存在する。一方、ZnT5/ZnT6ヘテロ二量体が機能しない条件では、ほぼ全てのTNAPは分解される。すなわち、ZnT5/ZnT6ヘテロ二量体が機能する細胞の亜鉛欠乏下での培養と、ZnT5/ZnT6ヘテロ二量体が機能しない細胞の培養とでは、どちらの場合もTNAPに亜鉛が供給されないことは同じであるにも関わらず、TNAPは全く異なる応答を示すことを明らかにした。この結果は、ZnT5/ZnT6ヘテロ二量体が分泌経路内に亜鉛を供給する以外に、亜鉛要求性酵素のフォールディングにも何らかの役割を果たすことを示唆するものと考えている。			

(論文審査の結果の要旨)

分泌経路を介して成熟する亜鉛要求性酵素は、分泌生合成過程で亜鉛を獲得する。この過程に亜鉛トランスポーターZnT5/ZnT6ヘテロ複合体が関与する。ほぼ全てのZnTトランスポーター、及びそのホモログは、ホモ複合体(二量体)を形成して機能することが明らかにされているため、このヘテロ複合体を形成するZnT5とZnT6の特徴には非常に興味が集まっていた。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)の活性と免疫沈降法を用いた相互作用についての解析をもとにして、このZnT5とZnT6が形成するヘテロ複合体の複合体形成機構や亜鉛輸送の特徴について解析を行っている。評価できる点は以下の点である。

1. 異なるタグで標識したZnT5とZnT6を様々な組み合わせで発現させ、その相互作用について免疫沈降法を用いて検討し、ZnT5とZnT6はヘテロ二量体を形成して機能することを示している。さらに、ZnT6の変異体を用いて、ZnT5/ZnT6ヘテロ二量体においては、ZnT6が膜貫通領域内の亜鉛結合部位の形成には関与しないことを示している。
2. ZnT5は他のZnTトランスポーターと異なり長いN末領域を有することを特徴とするが、この領域は、ヘテロ複合体の形成に必要でないことを示している。さらに、ZnT5と相同性が高いZnT7とのキメラタンパク質を作製して、免疫沈降法によりZnT6との相互作用を解析することで、ZnT5の最終膜貫通領域以降の細胞質側に面したカルボキシル末端領域が、ZnT6との結合に必要であることを示している。
3. 分泌経路に亜鉛が供給されない二つの条件下で、亜鉛要求性酵素特異的アルカリフォスファターゼ(TNAP)は異なる検出のされ方をすることを示した。即ち、ZnT5/ZnT6ヘテロ二量体が機能する細胞を亜鉛欠乏下で培養した場合は、亜鉛を含まないアポ型で存在するのに対して、ZnT5/ZnT6ヘテロ二量体が機能しない細胞を培養した場合は、TNAPが分解してしまうことを示し、ZnT5/ZnT6ヘテロ二量体が分泌経路内に亜鉛を供給する以外に、亜鉛要求性酵素のフォールディングにも何らかの役割を果たすことを示唆する結果を示している。

以上のように、本論文は分泌経路に局在する亜鉛トランスポーターZnT5/ZnT6ヘテロ二量体の性質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22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を行った結果合格と認めた。

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。

要旨公開可能日： 年 月 日