

《農芸化学奨励賞》



分子遺伝学的手法を用いた亜鉛トランスポーターの機能に関する研究

京都大学大学院生命科学科統合生命科学専攻 准教授 神戸大 明

はじめに

必須微量元素としての亜鉛の重要性は広く認識されている一方で、その作用機序や体内亜鉛ホメオスタシスの維持機構に関しては、漠然とした理解にとどまり、その詳細に関してはこれまでほとんど明らかにされてこなかった。しかしながら、近年、多数の亜鉛トランスポーターが同定され、亜鉛研究は急速な展開を見せている。本研究では、分子遺伝学的手法を用いてこれら亜鉛トランスポーターに着目した解析を実施し、亜鉛代謝機構を分子レベルで明らかにすることを試みた。特に、小腸上皮細胞における亜鉛吸収機構に関する解析と、相同組換え効率の高いニワトリ細胞を用いた分泌経路における亜鉛ホメオスタシス維持機構に関する解析から、さまざまな亜鉛トランスポーターの機能・制御機構を明らかにしてきた。その主な成果を以下に述べる。

1. 亜鉛トランスポーター・ZIP と ZnT

真核生物において、生理的条件下で機能する亜鉛トランスポーターは、ZIP (Zrt, Irt-like protein) と ZnT (Zn transporter) の二つのファミリーに分類される。ZIP は 14 種、ZnT は 9 種のタンパク質から構成されており、ZIP は細胞質の亜鉛を増加させる方向に、ZnT は細胞質の亜鉛量を減少させる方向に亜鉛を輸送する (図 1)。両亜鉛トランスポーターともに、ユビキタスに発現するもの、細胞・組織特異的に発現するものが知られており、これら多数の亜鉛トランスポーターが協調的に機能することで、生体内亜鉛ホメオスタシスや亜鉛の生理作用が制御されている。

2. 小腸上皮細胞において亜鉛吸収に機能する亜鉛トランスポーター

正常な亜鉛代謝では、腸管における亜鉛の出納が、体内亜鉛ホメオスタシスの維持に最も重要な調節段階となる。そのため、食事由来の亜鉛の吸収は、厳密に制御されており、亜鉛トランスポーター・ZIP4 が重要な役割を果たす。筆者は、マウス小腸上皮組織を用いて、ZIP4 の制御機構に関する詳細な解析を実施し、亜鉛十分時に速やかに分解される ZIP4 が、亜鉛欠

乏時には小腸上皮細胞頂端膜 (Apical 膜) に高度に蓄積することを明らかにした。さらに、培養細胞を用いた実験から、この頂端膜に蓄積した ZIP4 は、細胞外領域が除去されている (プロセッシングされる) ことを発見し、この制御が、腸管からの亜鉛吸収の効率化に極めて重要である可能性を示した。プロセッシング部位と予想される配列は、多くの他の亜鉛トランスポーターで保存されている領域であり、プロセッシングは、亜鉛トランスポーターの機能発現に重要な制御機構となると予想される。また、ZIP4 と高い相同性を有する ZIP5 が、亜鉛十分時に小腸上皮細胞側壁・基底膜 (Baso-lateral 膜) に蓄積する一方で、亜鉛欠乏時には速やかに消失するという ZIP4 と全く逆の制御を受けていることを示した (図 2)。この ZIP4 と ZIP5 の亜鉛量に依存した逆向き制御は、亜鉛ホメオスタシスを維持するうえで極めて重要な役割を果たすと考えられる。さらに、出芽酵母において、細胞内への亜鉛の取り込み必須の役割を果たしている亜鉛トランスポーターのオーソログ (ZIP1, ZIP2, ZIP3) すべてを欠損させた三重遺伝子欠損マウスを作成し、ZIP1~ZIP3 が哺乳類の亜鉛吸収においては必須とはならないことを明確に示すことで、哺乳類では、ZIP4 が亜鉛吸収において最も重要な亜鉛トランスポーターとなることを実証した。

3. 分泌経路の亜鉛ホメオスタシス維持に機能する亜鉛トランスポーター

分泌生成経路において成熟し、細胞外に分泌される酵素の中には、亜鉛を補因子とするものが数多く存在する。これらの酵素は、分泌経路の初期の段階で亜鉛を獲得し、アポ酵素からホロ酵素へと変換される。そのため、分泌経路内に亜鉛を送り込む亜鉛トランスポーターは、亜鉛含有酵素を活性化するうえで必須の役割を果たすと予想されていたが、その実体に関しては全く明らかにされていなかった。筆者は、ユビキタスな発現パターンを示すが、膵臓ランゲルハンス島β細胞などの分泌細胞に強く発現する亜鉛トランスポーターとして ZnT5 を同定し、その局在がゴルジ体等の分泌経路にあることを明らかにした。分泌経路に発現する亜鉛トランスポーターには、ZnT5 以外に、ZnT6 と ZnT7 が存在することが確認されていたが、こ

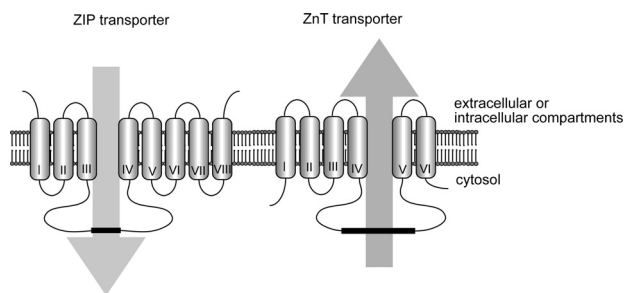


図 1 ZIP と ZnT のトポロジーと亜鉛輸送の方向性
ほとんどの ZnT は、6 回膜貫通タンパク質として、ZIP は、8 回膜貫通タンパク質として機能する。

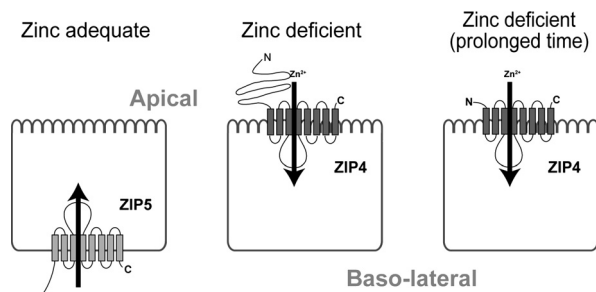


図 2 小腸上皮細胞における亜鉛レベルに応じた ZIP4 と ZIP5 の発現制御

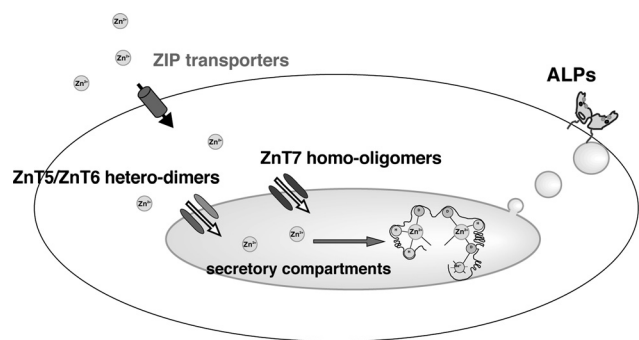


図3 分泌経路における ZnT5, ZnT6, ZnT7 の役割

ZnT5 と ZnT6 は、ヘテロ二量体を形成し、ZnT7 は、ホモ複合体を形成して、アルカリフォスファターゼ (ALP) などの亜鉛酵素に亜鉛を供給する。

これらの三つの ZnT の生理機能についての知見はほとんど皆無であった。そこで、高い相同組換え効率を示すニワトリ B リンパ球細胞株 DT40 を用いて各 ZnT の欠損株を作成し、詳細な解析を実施した。その結果、ZnT5, ZnT6, ZnT7 すべてが分泌経路に亜鉛を供給して分泌型亜鉛酵素アルカリフォスファターゼをアポ酵素からホロ酵素へ転換させていることを証明し、さらに、ZnT5 と ZnT6 は、ヘテロ二量体を形成することが、一方、ZnT7 は、ホモ複合体を形成することが、その亜鉛輸送活性に必要不可欠であることを明らかにした (図3)。なお、ZnT5 と ZnT6 によるヘテロ二量体形成は、他の ZnT では類を見ない新規の特徴である。さらに、ほとんど解析の進んでいなかった ZnT トランスポーターの亜鉛輸送機構に関する解析を実施し、ZnT5/ZnT6 ヘテロ二量体による亜鉛輸送は、プロトンと亜鉛の交換輸送の様式であることを証明した。

分泌経路では、細胞の全タンパク質の約3割が生合成されると目されており、その制御にかかわる分子の中には亜鉛が重要な機能を担うものも少なくない。そのため、分泌経路に亜鉛を供給する ZnT5, ZnT6, ZnT7 は、分泌経路ホメオスタシスを正常に維持させるうえでも極めて重要な分子となることが予想された。実際、この予想に合致するように、亜鉛欠乏下で野生型 DT40 細胞に弱い小胞体ストレスを誘導すると、その感受性が增大することが認められ、同様の感受性の増大は、ZnT5/ZnT6 ヘテロ複合体と ZnT7 ホモ複合体を欠損させた細胞においても観察された。同時に、ZnT5 遺伝子の転写が小胞体ストレスに応じて誘導されることを見だし、その誘導が、小胞体ストレスにより活性化される転写因子 XBP1 により制御されていることを見いだした。これらの結果は、脊椎動物細胞では、分泌経路内亜鉛ホメオスタシスを厳密に維持するために、ZnT5/ZnT6 ヘテロ複合体を介したフィードバック制御機構が備わっており (図4)、分泌経路を正常に保つために機能していることを示している。ZnT5 遺伝子プロモーター内の XBP1 結合配列は、生物種間で高度に保存されているため、この制御機構は、極めて重要な役割を果たすことが示唆され、特に、ZnT7 ホモ複合体を発現していない細胞においては、分泌経路のホメオスタシスの維持に不可欠な制御となると予想される。一方、筆者

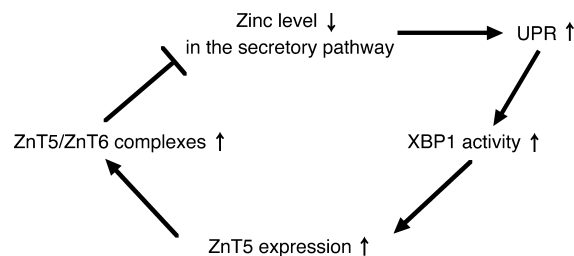


図4 分泌経路内亜鉛ホメオスタシスの維持に機能するフィードバック制御機構

らは、分泌経路に局在する ZIP トランスポーターとして、ZIP9 を同定しており、ZIP9 が分泌経路の亜鉛ホメオスタシス維持に調節的役割を果たすことを証明している。

おわりに

以上、本研究では、分子遺伝学的手法を用いて、さまざまな亜鉛トランスポーターの生理機能やその制御機構について明らかにしてきた。現在、亜鉛トランスポーターは、神経疾患や糖尿病等の疾患と密接にかかわりあることが明らかにされており、個々の亜鉛トランスポーターの生理機能やその制御機構に関する理解の重要性は、ますます高まってきている。さらに、亜鉛トランスポーターの機能解析の結果、亜鉛のもつ新規な生理作用が相次いで発見されてきており、現在の亜鉛研究は、必須微量栄養素研究という枠組みを超えたホットな研究分野となりつつある。生体内には20種を超える亜鉛トランスポーターが存在するため、その全容解明には、さらなる解析が必要となる。今後も、亜鉛トランスポーターの研究を通して、亜鉛の新規生理作用の発見や亜鉛欠乏に予防効果のある食品成分の探索などにつなげていきたいと考えている。

本研究は、京都大学大学院生命科学研究所統合生命科学専攻生体情報応答学分野、および、カンザス大学メディカルセンターにおいて実施したものです。学生時代のエリスロポエチン研究から、亜鉛研究を開始するまで終始ご指導賜りました京都大学名誉教授・佐々木隆造先生に心より御礼申し上げます。また、カンザス大学メディカルセンター・Glen K. Andrews 教授には、亜鉛研究の新たな方向性を与えていただいたことを深謝いたします。京都大学教授・永尾雅哉先生には、自由な研究環境を与えていただき、また、研究のご支援を賜りましたことを感謝いたします。京都女子大学教授・成田宏史先生、京都大学准教授・増田誠司先生には、多くのご助言をいただきましたことを感謝いたします。また、研究の厳しさについて温かくご指導いただきました京都大学准教授・故 岩井裕子先生には、心より御礼申し上げますとともに、ご冥福をお祈りいたします。本研究成果は、共に研究を行った卒業生・在学生の協力によって成し遂げたものであり、また、多くの方々のご指導の賜物であります。この場を借りて、深く感謝いたします。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関西支部長の井上國世先生ならびにご支援賜りました諸先生に厚く御礼申し上げます。