

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592239

研究課題名(和文) 新しい遺伝病の原因となる亜鉛トランスポーター Zip13 : その構造と機能を解明する

研究課題名(英文) Investigation of characteristics of zinc transporter ZIP13 protein

研究代表者

深田 俊幸 (Fukada, Toshiyuki)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：70373363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、骨軟骨・歯牙・皮膚などの硬組織や結合組織の形成に重要であり、その機能不全が新規エーラス・ダンロス症候群の原因になる亜鉛トランスポーターZIP13蛋白質の特徴解明を目標に実施された。本研究によってヒトZIP13蛋白質の基本的な生化学的特徴の解明に成功し(Bin, J. Biol. Chem. 2011)、さらに新規エーラス・ダンロス症候群の病原性変異ZIP13タンパク質はプロテオソーム依存的な経路によって分解を受けることを解明した(投稿中)。これら一連の研究によって、ZIP13蛋白質の特徴と当該疾患の発症メカニズムを提示することができた。

研究成果の概要(英文)：The zinc transporter protein ZIP13 plays critical roles in bone, tooth, and connective tissue development, and its dysfunction is responsible for the novel type of Ehlers-Danlos syndrome: Spondylocheirodysplastic form of Ehlers-Danlos syndrome (SCD-EDS). We have investigated the characteristics of human wild-type ZIP13 protein, and the pathogenic mechanism of SCD-EDS caused by mutant ZIP13 proteins. We found that ZIP13 protein is localized to Golgi and forms homo-dimer state (Bin, JBC 2011), and mutant ZIP13 proteins are degraded by proteasome pathway leading to imbalanced intracellular Zn homeostasis (submitted). Our findings suggest that physio-pathological mechanisms elicited by wild-type and mutant ZIP13 proteins.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、整形外科学

キーワード：亜鉛 亜鉛トランスポーター 亜鉛シグナル 骨軟骨代謝 歯 皮膚 結合組織 エーラス・ダンロス症候群

1. 研究開始当初の背景

亜鉛は、骨/歯/皮膚等の硬組織や結合組織に比較的多く存在する必須微量元素である。亜鉛の恒常性の異常は、骨量の低下、小児期における成長の遅れ、皮膚炎、歯や眼の異常などをもたらす。しかしながら、これらの組織における亜鉛や亜鉛トランスポーターの役割は解明されていなかった。

申請者らは、役割が不明であった亜鉛トランスポーターZIP13のノックアウトマウス(Zip13-KOマウス)を作製して解析した。このマウスは、骨量減少・成長遅延・歯牙形成不全・皮膚脆弱化を呈した。また、このマウスの表現型とよく似た病状(骨量減少・成長遅延・脊柱異形成・部分性無歯症・皮膚脆弱化)を発症した“新しいタイプのエーラス・ダンロス症候群”と診断された症例を見出し、その患者にZIP13遺伝子のG74D型1アミノ酸置換(現在の呼称はG64D型)が劣性遺伝的に継承されていることを明らかにした。さらに、ZIP13がBMP/TGF- β シグナル伝達に関わることを見出した。すなわち、ZIP13による細胞内の亜鉛分布の制御が硬組織と結合組織の形成とBMP/TGF- β シグナル伝達に必要であり、その異常が“新しいエーラス・ダンロス症候群”の原因になることが示された。また、他のグループは同様の病態を示す患者に別のZIP13変異体(3アミノ酸欠損型: Δ FLA型)を同定し、硬組織や結合組織におけるZIP13の重要な役割が強く示された。

2. 研究の目的

上述したように、ZIP13が骨関連の遺伝病の原因として同定されたことはZIP13の整形外科領域の研究対象としての重要性を示すものである。しかしZIP13とその疾患との関連は2008年に初めて発表されたものであり、ZIP13に関する未解決問題は多く残されていた。そこで、本研究は骨・軟骨・結合組織の新しい遺伝病の原因分子として同定されたZIP13蛋白質の特徴を明らかにすることを目的として設定した。

3. 研究の方法

本申請研究では(1)ZIP13の構造解析,(2)病原性変異型ZIP13の特徴解明,(3)ZIP13に結合する分子の同定と機能解析について行った。

(1)ZIP13の構造解析

ZIP13リコンビナント蛋白質の大量調製

ZIP13蛋白質の特徴を明らかにすることを目的として、ヒトZIP13リコンビナント蛋白質の産生系と精製系を開発し、ZIP13リコンビナント蛋白質を大量調製する方法を確立した。ZIP13リコンビナント蛋白質を用いて生化学的な特徴を解析し、さらに細胞内における性状解析を行った。

ZIP13リコンビナント蛋白質の結晶化

ZIP13の構造学的特徴を解析するために、ZIP13リコンビナント蛋白質を用いて蛋白質濃度/温度/塩濃度/界面活性剤の種類と濃度を調整した条件下において結晶化を試行した。

(2)病原性変異型ZIP13の特徴解明

新規エーラス・ダンロス症候群患者から同定された病原性変異型ZIP13(G64D型, Δ FLA型)について、生化学的な特徴を解析した。申請者は予備実験からこれらの変異体は不安定である結果を得ていたため、ユビキチン-プロテアソーム系、オートファジー-リソソーム系、カルパイン系の阻害剤を用いて、どの経路によって分解が促進されているのか検討した。さらに、ZIP13に様々な変異を導入して、どのようなアミノ酸置換がZIP13蛋白質の不安定化要因になるのか精査した。

(3)ZIP13に会合する分子の同定と機能解析

免疫沈降とYeast two hybrid systemを用いてZIP13結合分子を単離し、ZIP13におけるZIP13結合分子の役割を解析した。

Yeast two hybrid systemと免疫沈降法

ZIP13を高発現させた細胞株や線維芽細胞を用いて、免疫沈降用のcell lysateとYeast two hybrid system用のcDNA libraryを調製した。抗ZIP13抗体で免疫沈降された蛋白質は、MALDI-TOFMS網羅的質量分析によって同定した。

ZIP13結合蛋白質の同定と機能解析

同定されたZIP13結合蛋白質は、ZIP13の亜鉛輸送能への関与と蛋白質安定性への影響について検討した。

4. 研究成果

本研究によって、「ヒトZIP13リコンビナント蛋白質の産生系と精製系の構築」と「ヒトZIP13蛋白質はホモ二量体を形成する」ことを初めとするヒトZIP13蛋白質の基本的な特徴を見出した(Bin, J. Biol. Chem. 2011)。さらに、病原性変異ZIP13の検討から、亜鉛トランスポーターファミリー間で膜ドメインに保存されているアミノ酸に生じた変異はZIP13蛋白質の安定性には致命的であり、このような変異はプロテオソーム系の蛋白質分解を介して発現量を減少させ、結果的に細胞内亜鉛量の制御機構が破綻することが判明した。また、valosin-containing protein (VCP)がZIP13蛋白質に会合し、ZIP13蛋白質の恒常性に重要である知見を得た(投稿中)。

一方で、病原性変異型ZIP13はプロテオソーム阻害剤MG132処理によって回復し、同様の結果は医薬品として用いられているBortezomibでも得られた。今回示された病原性変異型ZIP13の特徴は、本疾患の発症メカニズムと治療指針に重要な示唆を与えると思われるが、「病原性変異ZIP13は亜鉛輸送能を保持しているのか」「プロテオソーム関

連薬剤は本疾患の治療薬になりうるのか」についてはまだ明確な結論に至らず、今後の重要な検討課題である。野生型 ZIP13 蛋白質とその変異体の立体構造を解くことが抜本的な問題解決につながると考えられ、今後は野生型 ZIP13 蛋白質の結晶化の最適条件の設定を進め、結晶構造条件が整った場合はその方法と条件を病原性変異型 ZIP13 の構造解析に応用していきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計10件)

1. Munemasa, T., Y. Idaira, **T. Fukada**, S. Shimoda, and Y. Asada. Histological Analysis of Dentinogenesis Imperfecta in Slc39a13/Zip13 Knockout Mice *Journal of Hard Tissue Biology* 23: 163-168, 2014
<http://dx.doi.org/10.2485/jhtb.23.163> 査読有
2. Tamaki, M., Y. Fujitani, A. Hara, T. Uchida, Y. Tamura, K. Takeno, M. Kawaguchi, T. Watanabe, T. Ogihara, A. Fukunaka, T. Shimizu, T. Mita, A. Kanazawa, M. O. Imaizumi, T. Abe, H. Kiyonari, S. Hojyo, **T. Fukada**, T. Kawauchi, S. Nagamatsu, T. Hirano, R. Kawamori, H. Watada. The diabetes susceptible gene SLC30A8/ZnT8 regulates hepatic insulin clearance. *J. Clin. Invest.* 123: 4513-4524, 2013
[doi:10.1172/JCI68807](http://dx.doi.org/10.1172/JCI68807) 査読有
3. Nam, H, C-Y. Wang, L. Zhang, W. Zhang, S. Hojyo, **T. Fukada**, and M. Knutson. ZIP14 and DMT1 in the liver, pancreas, and heart are differentially regulated by iron deficiency and overload: implications for tissue iron uptake in iron-related disorders. *Haematologica.* 98: 1049-1057, 2013
[doi: 10.3324/haematol.2012.072314](http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2012.072314) 査読有
4. **Fukada T.**, S. Hojyo, and T. Furuichi. Zinc Signal: A New Player in Osteobiology *J. Bone. Miner. Metab.* 31:129-135, 2013
[doi: 10.1007/s00774-012-0409-6](http://dx.doi.org/10.1007/s00774-012-0409-6) 査読有
5. Yamasaki S., A. Hasegawa, S. Hojyo, W. Ohashi, **T. Fukada**, K. Nishida, T. Hirano. A Novel Role of the L-Type Calcium Channel α 1D Subunit as a Gatekeeper for Intracellular Zinc Signaling: Zinc Wave *PLoS ONE* 7, e39654, 2012 査読有 [doi: 10.1371/journal.pone.0039654](http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0039654)
6. Bin BH., **T. Fukada**, T. Hosaka, S. Yamasaki, W. Ohashi, S. Hojyo, T. Miyai, K. Nishida, S. Yokoyama, T. Hirano. Biochemical characterization of human ZIP13 protein: a homo-dimerized zinc transporter involved in the spondylocheiro dysplastic Ehlers-Danlos syndrome. *J. Biol. Chem.* 286: 40255-40265, 2011
[doi:10.1074/jbc.M111.256784](http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.256784) 査読有
7. **Fukada T.**, S. Yamasaki, K. Nishida, M. Murakami, and T. Hirano. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. *J. Biol. Inorg. Chem.* 16: 1123-1134, 2011
[doi:10.1007/s00775-011-0797-4](http://dx.doi.org/10.1007/s00775-011-0797-4) 査読有
8. **Fukada T.**, Y. Asada, K. Mishima, S. Shimoda, and I. Saito. Slc39a13/Zip13: A Crucial Zinc Transporter Involved in Tooth Development and Inherited Disorders. *J. Oral Biosciences.* 53: 1-12 2011
<http://dx.doi.org/10.2330/jorallbiosci.53.1> 査読有
9. **Fukada T.**, and Kambe T. Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis *Metalomics.* 3: 662-674, 2011
[doi:10.1039/c1mt00011j](http://dx.doi.org/10.1039/c1mt00011j) 査読有
10. Hojyo S, **T. Fukada**, S. Shimoda, W. Ohashi, BH. Bin, H. Koseki, T. Hirano. The zinc transporter SLC39A14/ZIP14 controls G-protein coupled receptor-mediated signaling required for systemic growth. *PLoS ONE.* 6: e18059, 2011
[doi: 10.1371/journal.pone.0018059](http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0018059) 査読有

[学会発表](計17件)

1. **深田俊幸**(座長および企画) 亜鉛イオンの生命医科学：恒常性・疾患・シグナル伝達における新展開 第91回日本生理学会大会シンポジウム 鹿児島 2014年3月16日
2. **Toshiyuki Fukada**(座長および企画) Basic and Clinical aspects in Zinc and Degenerative diseases of Aging 10th International Society of Trace Element Research in Humans (ISTERH) 2013 Symposium 東京 2013年11月19日
3. **深田俊幸** 亜鉛トランスポーター 第28回日本薬物動態学会年会シンポジウム 東京 2013年10月10日
4. **深田俊幸**(座長および企画) 亜鉛シグナル研究の最前線 金属材料バイオサイエンス研究会 2013 静岡 2013年9月26日

5. **深田俊幸** (座長および企画)
New Horizon of Zinc Biology in Signaling,
Homeostasis and Diseases
第 86 回日本生化学会大会 インターナシ
ョナルセッション 横浜 2013 年 9 月 11
日
6. **深田俊幸**
亜鉛シグナル: 亜鉛イオンのネットワーク
による生体恒常性の制御の意義
第 8 回トランスポーター研究会シンポジ
ウム熊本 2013 年 6 月 16 日
7. **深田俊幸** 亜
鉛によるシグナル伝達: その分子基盤と生
理的意義 平
成 25 年度生化学会中部支部例会シンポジ
ウム 名古屋 2013 年 5 月 25 日
8. **深田俊幸** (座長および企画)
亜鉛シグナルの生理作用と病気への関わ
り 第
86 回日本薬理学会年会 シンポジウム
福岡 2013 年 3 月 22 日
9. **Toshiyuki Fukada** (座長および企画)
Zinc signal: A new regulatory system in bone
and immunity
第 85 回日本生化学会大会シンポジウム
福岡 2012 年 12 月 14 日
10. **深田俊幸**
亜鉛シグナル研究とメタロミクス: その可
能性・期待・課題について
第 23 回日本微量元素学会学術大会ワーク
ショップ 東京 2012 年 7 月 5 日
11. **深田俊幸**
新規エーラス・ダンロス症候群に関わる亜
鉛トランスポーターZIP13 の生化学的解
析 - ヒト ZIP13 蛋白質はホモ 2 量体を形
成する第 23 回日本微量元素学会学術大会
リサーチシンポジウム 1 東京 2012 年 7
月 5 日
12. **深田俊幸** (座長および企画)
『亜鉛シグナル』: 全身成長と骨代謝に関
わる新しいシグナル伝達機構
第 12 回日本抗加齢医学会・総会 シンポジ
ウム 横浜 2012 年 6 月 25 日
13. **深田俊幸**
亜鉛シグナルと成長・骨代謝 第 66 回日
本栄養・食糧学会大会 シンポジウム 仙
台 2012 年 5 月 20 日
14. **深田俊幸**
亜鉛生物学概論: 細胞と個体の運命決定
に関わる『亜鉛トランスポーター Zn²⁺』

基軸 日光シンポジウム
日光 2011 年 12 月 17 日

15. **Toshiyuki Fukada**, Shintaro Hojyo, Shinji
Shimoda, Haruhiko Koseki, Shiro Ikegawa,
Andrea Superti-Furga, and Toshio Hirano.
How does the zinc homeostasis system
control mammalian growth? Lessons from
molecular and genetic studies of zinc
transporters Zip13 and Zip14.
The 5th International Conference on Metals
and Genetics (ICMG2011)
神戸 2011 年 9 月 4 日
16. **深田俊幸** (座長および企画)
全身成長と GPCR シグナル伝達を制御する
亜鉛トランスポーター-Zip14
亜鉛と生命科学・医学
第 84 回日本生化学会大会 シンポジウム
京都 2011 年 9 月 21 日
17. **深田俊幸** (座長および企画)
亜鉛トランスポーター-Zip14: 全身成長と
GPCR シグナル伝達への関与
亜鉛生物学の基礎医学と臨床医学におけ
る新展開
第 22 回日本微量元素学会学術大会 シン
ポジウム 京都 2011 年 7 月 1 日

〔図書〕(計 1 件)

1. **深田俊幸**, 北條慎太郎
亜鉛シグナルによる成長と骨代謝制御
亜鉛の機能と健康, 建帛社
169-187, 2013
248 ページ

〔その他〕

ホームページ等

http://www.researchgate.net/profile/Toshiyuki_Fukada/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深田 俊幸 (Fukada Toshiyuki)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学

研究センター・上級研究員

研究者番号: 70373363