

氏 名	すずき ひろし 鈴 木 博 視
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 3309 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 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	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	アクアポリン4の格子状配列形成を制御する要因の研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 藤 吉 好 則 教 授 七 田 芳 則 教 授 岡 穆 宏

論 文 内 容 の 要 旨

脳が機能する上で水の恒常性は重要な問題である。ニューロンおよびグリア細胞が高密度に詰まった脳内では細胞間隙が非常に狭く、そのわずかな体積変化はイオン濃度の急激な変化に繋がる。また、神経活動に応じてイオン恒常性を維持するための細胞膜間でのイオンの移動には、それによる浸透圧変化を緩衝するような水の移動が伴っているはずである。そのような効率的かつ局所的な水の輸送には、膜タンパク質である水チャネルが重要なはたらきをしており、その脳内での局在様式や機能制御は解明すべき問題である。哺乳類の脳で優位に発現している水チャネルの一つであるアクアポリン4 (AQP4) は血液-脳境界面に多く局在して双方向的な水の輸送を担っており、その四量体は細胞膜中でsquare arrayと呼ばれる直交格子状の配列集合体を形成している。また遺伝子は2つのスプライスバリエントを発現しており、N末端の短いAQP4M23だけがsquare arrayへと集合できるのに対し、それよりN末端が22残基だけ長いAQP4M1はsquare array形成を制限することが知られている。

本論文では、AQP4M1のN末端領域がどのようにしてsquare array形成を阻害しているのかを理解するために、N末端を段階的に欠損させた変異体を作製し、凍結切断レプリカ免疫電子顕微鏡法を用いてチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞中での各変異体のsquare array形成能を丹念に調べた。その結果、16番目まではN末端アミノ酸残基を欠損させても、AQP4M1と同様にsquare arrayを形成せず、AQP4分子に対する免疫金粒子標識も細胞膜上に散在していた。一方、それより多くN末端を欠損させた変異体では免疫金粒子で標識されるsquare arrayの形成が見られた。さらに、N末端中に存在する13番目と17番目の2つのシステイン残基を置換した全長AQP4M1変異体においても顕著なsquare arrayの形成が見られた。生化学的手法と代謝標識法を用いた解析から、CHO細胞中で発現したAQP4M1はその2つのN末端システインにおいて、パルミチン酸修飾されている事が明らかになった。

以上の結果から、N末端のパルミチン酸修飾が原因でAQP4M1はsquare arrayを形成できない事が示され、水チャネルの機能を制御する機序の存在が新たに示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

脳は頭蓋骨に囲まれて制限された空間に、ニューロンおよびグリア細胞などが高密度に詰まっている。それゆえ、細胞間隙が非常に狭く、細胞にわずかな体積変化が生じて、イオン濃度の急激な変化に繋がる可能性がある。また、神経活動に応じたイオンの移動や脳活動に必須のグルコースの濃度変化などによって、浸透圧が著しく変化する。この様な、浸透圧変化から、脳内の細胞を守るためには、水の移動制御が不可欠である。効率的かつ局所的な水の輸送には、膜タンパク質である水チャネルが重要な働きをしており、その脳内での局在様式や機能制御機構は解明すべき重要問題であるが、これまではほとんど解明されてこなかった。哺乳類の脳で優位に発現している水チャネルの一つであるアクアポリン4 (AQP4) は血液-脳境界面に多く局在して双方向的な水の輸送を担っており、その四量体は細胞膜中でsquare arrayと呼ばれる直交格

子状の配列集合体を形成していることがわかっていた。また、この水チャネルは、N末端の短いAQP4M23だけがsquare arrayへと集合できるのに対し、それよりN末端が22残基だけ長いAQP4M1はsquare array形成を阻害することが知られていた。本論文では、このAQP4M1のN末端領域によるsquare array形成阻害機構を、N末端を段階的に欠損させた変異体を作製し、凍結切断レプリカ免疫電子顕微鏡法を用いることで丹念に研究した。その結果、16番目まではN末端アミノ酸残基を欠損させても、AQP4M1と同様にsquare arrayを形成せず、細胞膜上に散在していることを解明した。一方、それより多くN末端を欠損させた変異体ではAQP4分子がsquare arrayを形成することが明らかになった。さらに、N末端中に存在する13番目と17番目の2つのシステイン残基を置換した全長AQP4M1変異体においても顕著なsquare arrayの形成が見られることが確認された。生化学的手法と代謝標識法を用いた慎重な解析から、AQP4M1のN末端に存在する2つのシステインがパルミチン酸修飾されていることを明らかにした。なお、この水チャネルは電子線結晶学による構造解析から、弱い細胞接着機能を有することが解明されていた。本論文で、N末端のパルミチン酸修飾がsquare arrayの形成を制御している機構が解明され、この水チャネルが結晶性のアレイ構造の大きさを制御することによって、細胞膜接着の強さを制御する分子機構が示唆された。なお、本研究によって、はじめて水チャネルの脂質修飾が明らかにされ、水チャネルの生理的機能に新しい研究課題を提示した。

以上のように、本論文は博士（理学）の学位論文として十分に価値あるものと認める。また、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。