

学 位 審 査 報 告 書

(ふりがな) 氏 名	やかた かや 館 佳 耶
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学位授与の日付	平成 年 月 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-11の水透過に関する研究	
論 文 調 査 委 員	(主査) 藤吉 好則 教授 平野 丈夫 教授 七田 芳則 教授

理 学 研 究 科

(続紙 1)

京都大学	博士 (理 学)	氏名	館 佳耶
論文題目	アクアポリン-11 の水透過に関する研究		
(論文内容の要旨) アクアポリン(AQP) は、生体膜における水の透過機能を担う水チャネルとして発見された膜タンパク質である。現在では植物から動物、細菌から哺乳類に亘る生物において多種多様な AQP が見つかっており、哺乳類では AQP0 から AQP12 までの 13 種類が同定されている。これらの AQP ファミリー間では、NPA モチーフと呼ばれるアミノ酸配列が非常に良く保存されており、速い水透過を実現する機能とプロトンの透過を阻害する機構に関連して重要であることが AQP1 の構造解析によって明らかにされている。 AQP11 は、最近見つかった哺乳類の新しいアクアポリンであり、NPA モチーフが一部保存されていないという例外的特徴を有する。また、AQP11 は細胞膜ではなく細胞内膜系に発現しており、AQP11 ノックアウトマウスが腎臓の近位尿細管細胞内に肥大した小胞を生じ多嚢胞性腎症を発症して死に至ることから、細胞内オルガネラにおいて重要な機能を担っていると考えられる。 それゆえ、AQP11 を脂質膜に再構成したプロテオリポソームを用いた実験を行い、AQP11 が水を透過するという結果を得た。しかし、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた他のグループからは、AQP11 は水透過性を持たないとする結果が報告された。リポソーム系では界面活性剤の影響が懸念され、卵母細胞系では AQP11 が細胞膜へ輸送されていない可能性がある。この水チャネルの機能を疑問の余地なく確認するためには、界面活性剤の影響の無い測定を行う必要がある。そのために、Sf9 細胞を破碎したベシクルを用いた実験系で AQP11 の水透過測定を行った。まず、速い水透過能を有することが確認されている AQP1 と AQP4 を用いて、細胞破碎ベシクルの測定系としての信頼性を評価した。AQP1 または AQP4 を含むベシクルは、ネガティブコントロールと比較して 24-30 倍程度の速い水の透過を示し、AQP1 と AQP4 の可逆的な阻害剤であることが知られている水銀によって可逆的な水透過の低下が確認された。これらの結果から、この Sf9 細胞を破碎したベシクルを用いた実験系の信頼性が確認された。この系を用いて AQP11 の水透過測定を行ったところ、AQP11 を含むベシクルはネガティブコントロールよりも 3 倍程度速い透過を示した。また、AQP11 が水銀による可逆的な阻害を受けると共に、AQP1 や AQP4 を含むベシクルよりも水の透過速度が 1 オーダー遅いことも確認された。さらに、他の AQP とのアライメント比較及びホモロジーモデリングによる構造予測から、AQP11 は遅い水透過性を持つ水チャネルと類似の分子構造を持つことが見出された。以上の結果から、AQP11 は遅い水透過能を有する水チャネルであると解明し、確認した。			

(論文審査の結果の要旨)

水チャネルはアクアポリン(AQP)と名づけられ、生体膜における水の透過機能を担う膜タンパク質である。現在では植物から動物、細菌から哺乳類に亘る生物において多種多様な AQP が見つかり、哺乳類では AQP0 から AQP12 までの 13 種類が同定されている。これらの AQP ファミリー間では、NPA モチーフと呼ばれるアミノ酸配列が非常に良く保存されており、速い水透過を実現する機能とプロトンの透過を阻害する機構に関連して重要であることが AQP1 の構造解析によって明らかにされ、さらに AQP4 の高分解能の解析で確認されている。

AQP11 は、最近見つかった哺乳類の新しいアクアポリンであり、他の水チャネルとは異なり、NPA モチーフが一部保存されていない。また、AQP11 ノックアウトマウスが腎臓の近位尿細管細胞内に肥大した小胞を生じ多嚢胞性腎症を発症して死に至ることから、細胞内オルガネラにおいて重要な機能を担っていると考えられて、興味をもたれるようになった。

申請者は、AQP11 を脂質膜に再構成したプロテオリポソームを用いた実験を行い、AQP11 が水を透過するという結果を得て、論文として発表した。しかし、他のグループがアフリカツメガエルの卵母細胞を用いた実験から、AQP11 は水透過性を持たないとする結果を報告した。卵母細胞系では AQP11 が細胞膜へ輸送されていない可能性があるが、リポソーム系では界面活性剤の影響が懸念されたので、この水チャネルの機能を疑問の余地なく確認する研究を進めた。そのためには、界面活性剤の影響の無い測定を行う必要があるので、Sf9 細胞を破碎したベシクルを用いた実験系で AQP11 の水透過測定を行える系を立ち上げた。その実験系の有効性を、速い水透過能を有することが確認されている AQP1 と AQP4 を用いて確認した。その結果、AQP1 または AQP4 を含むベシクルは、ネガティブコントロールと比較して 24-30 倍程度の速い水の透過を示し、AQP1 と AQP4 の可逆的な阻害剤であることが知られている水銀によって可逆的な水透過の低下を確認した。これらの結果から、この Sf9 細胞を破碎したベシクルを用いた実験系の信頼性を確認した。そして、この系を用いて AQP11 の水透過測定を行い、AQP11 を含むベシクルはネガティブコントロールよりも 3 倍程度速い透過を示すこと、AQP11 が水銀による可逆的な阻害を受けると共に、AQP1 や AQP4 を含むベシクルよりも水の透過速度が 1 オーダー遅いことも確認した。また、他の水チャネルと同じ NPA 配列に変異すると、水の透過性が減じることも確認した。さらに、他の AQP とのアライメント比較及びホモロジーモデリングから、AQP11 は遅い水透過性を持つ水チャネルと類似の分子構造を持つ特徴を見出した。このように、AQP11 は遅い水透過能を有する水チャネルであると疑問の余地なく解明した。

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、平成 23 年 1 月 25 日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。

要旨公開可能日： 年 月 日以降