

学 位 審 査 報 告 書

(ふ り が な) 氏 名	みつま ただのり 三 瀧 忠 典
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) 水チャネルアクアポリン-4 の構造と機能の研究	
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	三潑 忠典
論文題目	水チャネルアクアポリン-4 の構造と機能の研究		
(論文内容の要旨) 水チャネル、アクアポリン(AQP)は、ほぼ全ての器官での発現がみられており、ヒトには 13 種類ホモログが存在する。なかでも AQP4 は脳の主要な水チャネルで、細胞質側にあるループ D の Ser180 がリン酸化されることにより水透過率が低下するという発表がある。そこで、AQP4 の二次元結晶を作製し、電子線結晶構造解析による解析を行ったが、さらに進めて、申請者らは Ser180 のリン酸化を模倣した AQP4Ser180Asp 変異体 (S180D 変異体) の構造を 2.8Å 分解能で決定した。しかしながら S180D 変異体の構造には、野生型 AQP4 の 3.2Å 分解能の構造と比べて特筆すべき違いがなかった。タンパク質の部分で、完全な周期構造から乱れている領域は、高分解能密度図では一般的に見えなくなる。一方、電子顕微鏡像のデータを用いて計算された低分解能密度図ではそのような部分の密度が得られることがある。それゆえ、高分解能の解析だけでは周期性の低い構造体が水チャネルの水透過部分を塞いでいる可能性を否定することはできない。それゆえ、この乱れた構造体が水透過を阻害している可能性を確認するために、申請者らは S180D 変異体の構造を、電子顕微鏡像から 10Å 分解能で解析した。この 10Å 分解能の解析から得られた基本的な構造は 2.8Å 分解能の原子モデルと良く一致しており、変異の位置の細胞質側の水透過孔の入り口付近に障害物となりそうな密度は認められなかった。さらに、<i>in vitro</i> と <i>in vivo</i> 双方で行った水透過率測定の結果では、野生型 AQP4 と S180D 変異体の水透過率に変化がないことが確認された。このことから、S180D 変異体は構造変化を起こして水透過率が低下するわけでも、細胞質側のチャネルの入り口を塞ぐような構造体により水透過率が低下させられているというようなこともないと確認された。また、10Å 密度図の細胞質側では隣接する 4 つの四量体の間に、高分解能の解析では明らかでなかった密度が見られ、その密度は 4 つの N 末端が集合して形成されている。この発見は、AQP4 の N 末端がオーソゴナルアレイ安定化に決定的に重要な役割を果たしていることを構造的に示すとともに、N 末端が長い AQP4M1 アイソフォームでは、長い N 末端のシステイン残基が脂質修飾を受けてオーソゴナルアレイ形成が阻害されるという以前の報告を構造的に説明する。			

(論文審査の結果の要旨)

アクアポリン(AQP)と名づけられた水チャネルは、ほぼ全ての器官での発現がみられており、ヒトには 13 種類のホモログが存在することが知られているが、なかでも脳の主要な水チャネルは AQP4 であることが知られている。またこの AQP4 は、血管を取り巻く星状膠細胞の終末足などでは、オーソゴナルアレイとよばれる結晶性の構造体を形成している。脳ではドーパミンが放出されるが、そのドーパミンによって AQP4 の細胞質側にあるループ D の Ser180 がリン酸化されることにより、水透過率が低下するという結果が発表されている。

申請者らは、その Ser180 のリン酸化を模倣した AQP4Ser180Asp 変異体 (S180D 変異体) を昆虫細胞の発現系を構築し、二次元結晶を作製して、その変異体の構造を 2.8 Å 分解能で決定した。ところが、S180D 変異体の構造には、野生型の AQP4 の構造と比べて顕著な違いがないことが明らかになった。しかし、タンパク質の部分で、完全な周期構造から乱れている領域は、高分解能密度図では一般的に見えなくなることもあるので、申請者らは、低分解能部分の情報を含む電子顕微鏡像を多く撮影して、信頼度の高い低分解能密度図を計算した。すなわち、このような電子線結晶学の特徴を生かした解析を、10 Å 分解能で行った。この 10 Å 分解能の解析から得られた構造は、2.8 Å 分解能の原子モデルと良く一致しており、変異の位置の細胞質側の水透過孔の入り口付近に障害物となりそうな密度が無いことを確認した。このようにして申請者らは、水透過部分を塞いでいる周期性の低い構造体も無いことを証明した。さらに、*in vitro* と *in vivo* 双方で水透過率の測定を行い、野生型 AQP4 と S180D 変異体の水透過率に変化がないことも確認した。これらのことから、S180D 変異体は構造変化を起こして水透過率が低下するわけでも、細胞質側のチャネルの入り口を塞ぐような構造体により水透過率が低下させられているというようなこともないことを確認した。なお、10 Å 密度図の細胞質側では隣接する 4 つの四量体の間に、高分解能の解析では明らかなでなかった密度を明確に示し、その密度は 4 つの N 末端が集合して形成されていることを明らかにした。この発見は、AQP4 の N 末端がオーソゴナルアレイ安定化に決定的に重要な役割を果たしていることを構造的に示すとともに、N 末端が長い AQP4M1 アイソフォームでは、長い N 末端のシステイン残基が脂質修飾を受けてオーソゴナルアレイ形成が阻害されるという以前の報告に構造的な説明を与えた。

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