

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	脊椎動物におけるホウ酸チャンネルの同定と輸送基質選択機構の解析
Title(English)	
著者(和文)	潮和敬
Author(English)	Kazutaka Ushio
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11713号, 授与年月日:2022年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:加藤 明,一瀬 宏,本郷 裕一,田中 幹子,中戸川 仁
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11713号, Conferred date:2022/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

## 論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース: Department of, Graduate major in	生命工学 生命工学	系 コース	申請学位(専攻分野): Academic Degree Requested	博士 Doctor of (理学)
学生氏名: Student's Name	潮 和敬		指導教員(主): Academic Supervisor(main)	加藤 明
			指導教員(副): Academic Supervisor(sub)	

### 要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

生命の構成には炭素、水素、酸素および窒素などの主要な元素から準主要元素、微量元素、それよりもさらに微量な超微量元素が関わっている。ホウ素は植物や動物の生存に不可欠な超微量元素のひとつである。植物にとってホウ素は細胞壁の成分等として特に重要で、ホウ酸輸送体として水チャネルファミリーに属する NIP5;1 等が知られる。一方、哺乳動物におけるホウ素の分子機能の詳細は明らかになっておらず、ホウ酸の輸送機構も明らかでない。そこで本研究ではヒトにおけるホウ酸の輸送機構を明らかにすることを旨とし、ヒトのホウ酸チャネルの同定と輸送基質選択機構の解析を行った。

まず、植物 NIP5;1 の哺乳動物ホモログであるアクアポリン (AQP) がホウ酸を輸送するかどうかを調べるため、ヒト AQP ファミリーをアフリカツメガエル卵母細胞に網羅的に発現させ、ホウ酸輸送活性を解析した。その結果、ヒト AQP3、7、8、9、10 発現卵母細胞をホウ酸含有培地に曝すことによる細胞体積の増加が swelling assay により認められ、また細胞内ホウ素量の増加が誘導結合プラズマ質量分析法により認められた。水素イオン選択性微小電極を用いた電気生理学的解析によりホウ酸の細胞内への流入を細胞内 pH の変化として解析したところ、ヒト AQP3、7、8、9、10 発現卵母細胞をホウ酸含有培地に曝すことにより、細胞内 pH の低下が観察された。この時、膜電位の変化は観察されなかった。これらのことから、ヒト AQP3、7、8、9 および 10 はホウ酸輸送活性を持つこと、またホウ酸を B(OH)<sub>3</sub> の状態で輸送することが初めて示された。

所属研究室の先行研究においてトラフグ AQP10b は水、グリセロールを輸送するものの尿素やホウ酸を輸送しないことが確認されていたが、ヒト AQP10 は、水、グリセロール、尿素、ホウ酸を輸送したことから、生物種によって AQP10 の輸送基質選択性が異なることが明らかになった。そこで、この違いが種特異的なものなのか系統特異的なものなのかを明らかにするため、アフリカツメガエル AQP10 とゼブラフィッシュ AQP10b の活性を調べた。脊椎動物ゲノムデータベースを用いた分子系統解析及びシンテニー解析から、脊椎動物 AQP10 遺伝子は共通祖先に由来する ortholog であり、多くの四肢動物や魚類で進化的に保存されていることが明らかとなった。また真骨魚類には真骨魚類特異的な 3 回目の全ゲノム重複によって生じた paralog として AQP10a、10b を有することが示された。またアフリカツメガエル AQP10 の発現器官を調べたところ、腸と腎臓において発現が認められた。続いて swelling assay により輸送活性を測定したところ、アフリカツメガエル AQP10 はヒト AQP10 と同様に水、グリセロール、尿素およびホウ酸の輸送活性を持つことが示された。一方、ゼブラフィッシュ AQP10b はトラフグ AQP10b と同様に水とグリセロールを輸送するものの尿素やホウ酸の輸送活性は認められず、ヒトやアフリカツメガエルなど四肢動物の AQP10 と異なる輸送基質選択性を示すことが明らかとなった。これらの結果から、四肢動物の AQP10 と真骨魚類の AQP10b の輸送基

質選択性は各系統間で異なる輸送基質特異性を有し、またそれは各系統内において保存されていることが示唆された。

最後に、各系統によって異なる AQP10 の輸送基質選択性に着目し、点変異型ヒト AQP10 および点変異型トラフグ AQP10b 発現卵母細胞を用いて尿素とホウ酸の輸送選択性に影響を及ぼす一次構造の特定を試みた。系統間でアミノ酸の疎水性度および極性を含め特性の大きく変化したアミノ酸残基が 10 か所見出されたため、ヒト AQP10 に対する点変異導入による水、グリセロール、尿素及びホウ酸輸送活性の変化を調べたところ、特にヒト AQP10<sup>M89L</sup>、AQP10<sup>K183T</sup> および AQP10<sup>L250C</sup> の輸送基質選択性が変化した。そこで、トラフグ AQP10b<sup>L83M</sup>、AQP10b<sup>T177K</sup> および AQP10b<sup>C244L</sup> 点変異体を作製し、グリセロール輸送活性あたりの相対的基質輸送活性を解析したところ、トラフグ AQP10b<sup>L83M</sup>、AQP10b<sup>T177K</sup> および AQP10b<sup>C244L</sup> において尿素およびホウ酸の相対的輸送活性の上昇が認められた。これらのことからトラフグ AQP10b の L83、T177、C244 の 3 か所が尿素およびホウ酸の輸送基質選択性に関わっていることが示唆された。他のグループにより報告されているヒト AQP10 の立体構造データを用いて立体構造モデリングを行ったところ、トラフグ AQP10b の L83、T177、C244 が尿素やホウ酸の輸送を制限する selective filter の構築に関与する可能性が示唆された。

以上の結果から、ヒト AQP ファミリーがホウ酸チャンネルとして機能することを明らかにした。また AQP10 の種間の輸送基質選択の違いに着目した研究を通して、アクアグリセロポリンが pore を様々な仕組みにより構造変化させることで尿素やホウ酸の selective filter を構築している可能性を見出した。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note: Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ (T2R2) にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)  
Doctoral Program

## 論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース  
ス :

Department of,  
Graduate major in

学生氏名 :

Student's Name

生命理工学

生命理工学

系  
コース

潮 和敬

申請学位 (専攻分 博士  
野) :

Academic Degree of

指導教員 (主) :

Academic  
Supervisor(main)

指導教員 (副) :

Academic  
Supervisor(sub)

博士  
Doctor  
( 理学 )

加藤 明

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Boron is one of the ultra-trace elements essential for the survival of animals. However, in animals, the molecular function of boron has not been clarified in detail, and the transport mechanism of boric acid is also unclear. To clarify the transport mechanism of boric acid in animals, I identified human boric acid channels in AQP family, and analyzed the mechanisms for the transport substrate selectivity. Human AQPs were expressed in *Xenopus* oocytes, and the boric acid transport activity was analyzed by swelling assay, inductively coupled plasma mass spectrometry, and electrophysiology. As a result, human AQP3, 7, 8, 9, and 10 expressing oocytes showed boric acid transport activity without any change in membrane potential, suggesting that human AQP3, 7, 8, 9, and 10 act as B(OH)<sub>3</sub> channels. The urea and boric acid transport activities of human AQP10 and fugu (*Takifugu rubripes*) AQP10b were different. Phylogenetic and synteny analyses indicated that *AQP10* genes in tetrapods and teleost fishes were evolutionarily related. Analysis of oocytes expressing *Xenopus* AQP10 and zebrafish AQP10b suggested that AQP10 in tetrapods and AQP10b in teleost fishes had different transport substrate specificity. Then, I analyzed the functions of point-mutated human AQP10 and fugu AQP10b expressed in oocytes by swelling assay. Relative boric acid transport activities of human AQP10<sup>M89L</sup>, AQP10<sup>K183T</sup>, and AQP10<sup>L250C</sup> were decreased, and those of fugu AQP10b<sup>L83M</sup>, AQP10b<sup>T177K</sup>, and AQP10b<sup>C244L</sup> were increased. These results and three-dimensional structural modeling of human AQP10 suggested that the transport of substrates such as urea and boric acid can be regulated by L83, T177 and C244 of fugu AQP10b through modulating the structure of the pore. These results indicate that AQP3, 7, 8, 9, and 10 act as boric acid transport systems in humans and suggest that the transport substrate selectivity is regulated by modulating the structure of the pore.

備考 : 論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意 : 論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).