

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ゼブラフィッシュ塩類細胞に発現するトランスポーター関連タンパク質の機能とその局在
Title(English)	Functional assembly of ion transporters in ionocytes of zebrafish
著者(和文)	伊藤雄介
Author(English)	Yusuke Ito
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9239号, 授与年月日:2013年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:中村 信大
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9239号, Conferred date:2013/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:Nobuhiro Nakamura
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第	号	学位申請者氏名	伊藤 雄介	
		氏名	職名		
論文審査 審査員	主査	中村 信大	准教授		梶川 正樹 講師
	審査員	岩崎 博史	教授	審査員	広瀬 茂久 学外審査員
		駒田 雅之	准教授		
		田中 幹子	准教授		

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は「Functional assembly of ion transporters in ionocytes of zebrafish (ゼブラフィッシュ塩類細胞に発現するトランスポーター関連タンパク質の機能とその局在)」と題し、淡水魚がいかんしてイオンの濃度勾配に抗して、 Na^+ イオンを取り込み、体液浸透圧を一定に保っているかを明らかにするために、 Na^+ イオンの輸送に関わると推定される輸送体を同定し、それらの役割と局在部位及び存在様式を明らかにしたものである。

序論では、本研究の背景、また本研究に至った経緯、目的と意義、研究の概略及び位置付けについて述べている。魚類の多くは、体液と異なる組成の環境水中で生息しており、様々な手段で体内のイオン恒常性を維持していること、淡水魚はその体液に比べて非常に希薄な淡水中で生息しているため、環境水中のイオンをエラから能動的に取り込む必要があること、そのためにイオン輸送に特化した特殊な細胞（塩類細胞）を発達させていること、及びこの塩類細胞は ATP を多量に消費しイオンの能動輸送をおこなうことからミトコンドリアが多く含まれており Mitochondrion-rich cell (MRC) と呼ばれていること、さらに MRC には Vacuolar-type H^+ -ATPase (H-ATPase) を豊富に含む H-MRC と Na^+/K^+ -ATPase を豊富に含む NaK-MRC の 2 種類があることを簡潔に説明した上で、これら MRC の働きを分子レベルで明らかにする必要があると述べている。分子レベルでイオン輸送体の解析を行うには、ゲノム情報が有力な助けとなることから、ゲノムデータベースが利用可能で様々な実験手法が確立されているゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を用いて MRC における Na^+ の取り込みに関係する輸送体の同定、局在部位の決定、機能解析及び存在様式の解析を試みることにした旨が述べられている。

本論では、先ずそれまでの研究で示唆されていた Na^+ イオンの取り込みに関わると推定される輸送体とその関連分子、すなわち Na^+/H^+ exchanger (Nhe), Carbonic anhydrase (CA2a & CA15a), 及びアンモニア輸送体 (Rhcg1) に対するポリクローナル抗体を作製し、免疫染色を行うことによってそれぞれのタンパク質の局在部位を決定している。その結果、Nhe3b と CA15a は H-MRC の頭頂膜に特異的に発現していること及び CA2a は H-MRC の細胞質と一部頭頂膜に局在していることを見出している。

次に CA15a の詳細な局在を決定するために、FLAG タグ付の CA15a (CA15-FLAG) を COS7 細胞で発現させ、膜透過処理を行わずに抗体免疫染色を行うことによって、CA15a は細胞膜外に局在していることを明らかにしている。CA15a は C 末端に GPI アンカーモチーフを持っていることから、細胞膜の外側に串刺しになる形で配置されていると推定されていたが、実験的に証明した例は少なく意義深い成果といえる。さらに、CA の Na^+ 取り込みに及ぼす役割について詳しく調べるために、外界中の塩濃度を変えたときの CA2a と CA15a の mRNA の発現量をリアルタイム qPCR によって調べ、低 Na^+ 環境水中では、両者ともに発現量が増加すること、Morpholino antisense oligonucleotide (MO) によって CA2a と CA15a の翻訳阻害を行い発現量を減少させると、それに応じて、 Na^+ の取り込みも阻害されることを示している。

続いて、タンパク質複合体を可視化する新しい方法、すなわち *In-situ* proximity ligation immunoassay (PLA) を用いて Nhe3b と CA2a, Nhe3b と CA15a, さらに Nhe3b と Rhcg1 が近位

に局在しているか否かを調べ、何れの組み合わせにおいてもこれらのタンパク質が近接して存在しているという結果を得、それに基づいて CA2a-Nhe3b-CA15a-Rhcg1 がスーパーランスポー トソームとも言うべき高度な複合体を作って機能しているという魅力的な仮説を提唱している。

最後に Nhe3b の活性をアフリカツメガエルの卵母細胞を用いて電気生理学的測定し、 Na^+ と H^+ の交換比率がこれまで仮定されてきた 1:1 ではなく、 $n:1$ で起電性であるという驚くべき発見を報告している。Nhe3b が起電性ならば、濃度勾配に逆らって Na^+ を取り込む際のエネルギーバリアは比較的容易に克服することができることになり、生物学上の大きな課題として残されていた淡水適応機構をほぼ解明したことになり、意義は大きい。

以上を要するに、本論文はイオン輸送に特化した塩類細胞のうちの H-MRC の働きをイオン輸送体の同定、それらの局在部位の決定、及び存在様式と機能解析により明らかにしたもので、理学上貢献するところが大きい。よって本論文は博士（理学）の学位論文として十分な価値があるものと認められる。