

氏名(国籍)	ビスワ ナス ミトラ (バングラデシュ)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第2472号		
学位授与年月日	平成13年2月28日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生物科学研究科		
学位論文題目	Molecular Analysis of a Developmentally Regulated Water Channel Gene, <i>aqpA</i> , in <i>Dictyostelium discoideum</i> (細胞性粘菌の発生的に制御された水チャンネル遺伝子の分子レベルの解析)		
主査	筑波大学教授	農学博士	田 仲 可 昌
副査	筑波大学教授	理学博士	白 岩 善 博
副査	筑波大学教授	理学博士	平 林 民 雄
副査	筑波大学助教授	理学博士	漆 原 秀 子

論 文 の 内 容 の 要 旨

細胞膜を介した様々な物質の移動は、移動する高分子やイオンに特異的な輸送体やチャネルタンパク質によって調節されている。しかし、動植物において水チャンネル分子の変異体解析が比較的困難であることや、酵母や細菌を用いた遺伝子破壊において表現型に変化が見つからないことなどから水チャンネルの詳細な機能についての知見は少ない。細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は通常、単細胞アメーバとして分裂増殖を行い、飢餓状態に陥ると約10万個のアメーバが集合し多細胞体制をとり、最終的に胞子と柄からなる子実体を形成する。胞子を形成する時には細胞から水分の放出が起こり、胞子が発芽する時には逆に急速な水分の取り込みが見られるので、この過程に関与する水チャンネル遺伝子の存在が予想される。本研究では *Dictyostelium* cDNA データベースを利用した相同性検索により、新奇の水チャンネル遺伝子 *aqpA* を同定し、遺伝子破壊などによる機能解析を行った。

Dictyostelium cDNA データベース中において、水チャンネル分子であるアクアポリンに高い相同性を示した cDNA クローン SSA562 について、全長の塩基配列を決定し、つづいて、この遺伝子のゲノム DNA を解析した。*aqpA* と命名したこの遺伝子は104bpのイントロンを含み、279アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしていた。膜貫通領域予測プログラム SOSUI を用いて解析したところ、*AqpA* は他のアクアポリン同様、6回膜貫通タンパク質であることが予想された。*aqpA* は染色体に1コピーのみ存在しており、ノザンプロット解析の結果、発生開始12時間後から1kbの mRNA の発現が見られ、発生開始20時間後まで発現が持続していた。また、発生過程での多細胞体内における mRNA の分布を *in situ* ハイブリダイゼーションにより解析し、*aqpA* は予定胞子細胞領域にのみ発現が見られ、予定柄細胞では全く発現していなかった。以上の結果から、*aqpA* は *D. discoideum* の別の水チャンネルタンパク質遺伝子である *wacA* 同様発生過程においてその発現が調節を受けており、予定胞子細胞特異的な遺伝子であることが分かった。

相同組換え法を用いて、この遺伝子を破壊し、得られた遺伝子破壊株について解析したところ、子実体形成1週間後には *aqpA*⁻ 株では80%の胞子が位相差顕微鏡下で黒く見えるのに対し、野生株ではこの割合は10%にとどまった。野生株と *aqpA*⁻ 株の子実体形成1週間後の胞子について発芽実験を行ったところ、発芽率は野生株、*aqpA*⁻ 株でそれぞれ60%、20%であった。さらに、死んだ細胞のみを染色する色素 propidium iodide で子実体形成8日後の胞子を染色したところ、野生株では10%以下であるのに対し、*aqpA*⁻ 株では75%染色された。子実体形成後

の胞子について電子顕微鏡観察を行ったところ、8日後の胞子では、ミトコンドリアの形態の異常、胞子外被からの細胞膜の剥離、細胞内オルガネラの断片化などが観察された。

胞子に関するこれらの特徴は、*wacA* 破壊株では観察されていない。そこで *wacA*⁻ 株で *aqpA* を破壊した両遺伝子の破壊株を作製した。*wacA*⁻ 株、*aqpA*⁻ 株は共に増殖速度、発生過程における形態には異常が見られないが、*wacA*⁻/*aqpA*⁻ 株は細菌との二員培養における増殖が著しく速かった。また、子実体形成過程において、野生株では通常1つの集合体からは一つの乳頭突起が生じ、移動体も1個体であるのに対し、*wacA*⁻/*aqpA*⁻ 株では集合体から平均14個の乳頭突起が生じ、複数の移動体が基部を共有するという著しい形態の変化が観察された。

以上の結果から、本研究において新たに同定された水チャネルタンパク質遺伝子 *aqpA* は粘菌の胞子形成や胞子の生存の維持に重要な機能を持つものと考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

水チャネルタンパク質は、これまでに動植物、カビ類、細菌に約100種の存在が報告されている。しかし、酵母や細菌での遺伝子破壊株に表現型の変化がみつからないことなどから、その機能の解析は限られたものであった。水チャネル分子が形態形成や生命維持に直接的に関与するという報告は今回が初めてである。本研究から得られた知見は、細胞性粘性の発生機構や胞子の生存維持についての新しい視点を与えると同時に、水チャネル分子の機能解析についての糸口を提供した点やその機能の多様性を考える上でも重要なものと結論できる。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。