

氏名	井上弘樹
授与した学位	博士
専攻分野の名称	工学
学位授与番号	博甲第1625号
学位授与の日付	平成9年3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生物資源科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文題目	イオン輸送性タンパク質の構造と機能： 大腸菌Na ⁺ /H ⁺ 逆輸送担体およびマウス液胞型H ⁺ 輸送性ATPaseの分子遺伝学的研究
論文審査委員	教授 金澤 浩 教授 虎谷 哲夫 教授 大森 齊 教授 尾坂 明義 教授 土屋 友房

学位論文内容の要旨

細胞質および内膜系オルガネラ内腔を含めた細胞内空間のpHを調節する中心的な因子であるNa⁺/H⁺逆輸送担体とV-ATPaseについて構造ならびに生理機能を分子レベルで解析した。大腸菌Na⁺/H⁺逆輸送担体NhaAについて、PCRを用いたランダム変異導入、部位特異的変異導入によりイオン輸送機構、活性調節機構を解析した。分離および作製した変異体の活性測定の結果、NhaAの10回膜貫通構造中の7～10番目の膜貫通領域の構造および4～5番目の膜貫通領域中の3つのアスパラギン酸が機能に必須であること、また、活性調節には6番目と7番目の膜貫通ヘリックス間のループ領域の残基が寄与していることを明らかにした。一方、ジーンターゲット法によりV-ATPaseの主要サブユニットであるプロテオリピッドの遺伝子を特異的に破壊し、V-ATPaseの機能を欠失したマウス個体の作製を目指した。作出したヘテロ欠損マウスは17週齢までに外見的な異常は認められなかった。ヘテロ欠損マウス間の交配により作出した子孫マウスに、ホモ欠損マウスは認められず、それらが胎生致死となることが示唆された。よって、V-ATPaseは哺乳動物の発生においても必須の役割を果していることが明かとなった。本研究により、細胞内空間のpHを調節するH⁺輸送担体の分子構造および生理機能の一端が明かとなった。

論文審査結果の要旨

細胞質および内膜系オルガネラを含めた細胞内空間のpHは、それらを取り囲む細胞膜に存在するイオン輸送性膜タンパク質により調節されている。Na⁺/H⁺逆輸送担体と液胞型ATPase (V-ATPase)の2種のイオン輸送タンパク質はこの調節を行う上で重要な役割を果たすことが明らかになって来た。しかし、これら2種を含むイオン輸送性タンパク質のいずれにおいてもイオン輸送機構および活性調節機構の分子メカニズムは明らかになってはいない。そこで本研究の第1点として、大腸菌のNa⁺/H⁺逆輸送担体に着目してそのイオン輸送の分子機構をイオン輸送と調節に関わるアミノ酸残基を明らかにすることに焦点を当てて解析した。一方、液胞型ATPaseは、真核生物細胞内の小胞内を酸性化する機能を有していることは明らかなものの、小胞内酸性化のもたらす分化した細胞の特殊な機能との相関については未解明な部分が多く残されている。そこで本研究の第2点目として、このイオン輸送性タンパク質については、新たな細胞機能との関係を見いだす出発点としてこのタンパク質の遺伝子を欠失したマウス個体の作製を目指した。まず、Na⁺/H⁺逆輸送担体欠損株のNaClおよびLiClに対する感受性を相補しないことを指標に、41株の変異体を分離し14の異なる残基のイオン輸送機能との相関を解析した。この結果これらの残基がイオン輸送に重要な働きをしていること、またH⁺濃度のセンサーの役割を持つ2つの残基が存在すること、3つのアスパラギン酸が機能に必須であることを明らかにした。この成果によりイオン輸送と調節解明の手がかりを得たことは、高く評価される。液胞型V-ATPaseについては、ジーンターゲティング法によりV-ATPaseの主要サブユニットであるプロテオリピッドサブユニットの遺伝子を特異的に破壊し、V-ATPaseの機能を欠失したマウス個体の作製を目指した。ターゲティングベクターを作製し、これをマイクロインジェクションし、25個体のキメラマウスを作出した。うち1個体のキメラマウスが生殖系列キメラであり、このマウスと野生型マウスとの交配により本遺伝子ヘテロノックアウトマウスを作出することに成功した。次に、ヘテロノックアウトマウス間の交配によりホモノックアウトマウスの作出を行ったが、その子孫マウスにホモノックアウトマウスは認められなかった。よって、本遺伝子を欠失したホモノックアウトマウスは胚生致死になることが強く示唆され、哺乳動物の発生・分化においてもV-ATPaseが必須であることが示された。哺乳動物の生殖、発生・分化におけるV-ATPaseの関与は、これまでほとんど報告されておらず、その点で本研究はV-ATPaseが関与する細胞機能を理解する上で重要な知見になるものと言える。

以上の成果は160頁からなる博士論文としてまとめられており、その一部はすでに2編の英文論文として発表されている。また現在2編の論文を投稿または執筆中である。本学位論文審査会は以上の内容を検討した結果、本研究は博士学位を授与するに値する内容を有すると判断した。