

審査の結果の要旨

氏名 大森 聡子

生体は脳脊髄液・消化液・尿など様々な臓器で大量の水輸送を行っており、水輸送は個体の生命活動維持にとって非常に重要な機能である。水輸送機構にはイオン交換に關与する数多くのポンプやチャネルが重要な役割を示している。陰イオン交換に關与するチャネルでは、気道上皮や汗腺等で水分分泌が著しく低下する嚢胞性線維症の原因遺伝子である CFTR(Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)や電位依存性塩素イオンチャネル(CLC)ファミリーの CLC2・CLC3 があげられる。しかし CFTR 及び CLC2・3 が水輸送組織全てに発現しているとはいいがたく、これらのチャネルが水分分泌活動普遍的に機能しているとは考えにくい為、未知の陰イオンチャネルの存在が想定されている。

当研究室でウサギよりクローニングされた parchorin は、6つのサブタイプから成り、C末端に高い相同性を持つ chloride intracellular channel(CLIC)ファミリーの一員である。parchorin は水を輸送する組織に特異的に発現し、水輸送活性の変化により発現量が変化する。また、他のサブタイプが膜に強く局在するのに対して、親水性の長いN末端を持つ parchorin は細胞質に多く局在し、刺激により細胞質から形質膜へ移動する。陰イオンチャネルと推定されている、CLICファミリー内でも parchorin は水輸送組織特異的に発現していること、また発現量が水輸送活性変化の影響を受けていることにより、parchorin は水輸送の調整において重要な役割を担っていることも期待されるが、活性化のメカニズムや膜移行をはじめとした詳細な生理的機構は未だ明らかになっていない。

本論文では、parchorin の機能解析を通じて水輸送機構の解明をすることを目的に、ノックアウトマウス作製に必要なマウス parchorin のクローニング及び、活性化メカニズムの解明へ向けて parchorin 結合蛋白質の探索及び、parchorin 結合蛋白質の parchorin への影響を検討したものである。

[第一章]

第一章では、parchorin のクローニングを行い、組織分布及び機能について検討している。

マウス parchorin のクローニングは、ウサギ parchorin に相似な部分を mouse genome から検索した後 primer を設定し、マウス脈絡叢由来 RNA を鋳型に RT-PCR 及び 3'RACE、5'RACE を用いて行っている。ウサギ parchorin とマウス parchorin の相同性はC末端側の CLIC 相同領域では 93%と高いものの、parchorin 特異的配列である N 末端側では 36%と低く、またウサギ配列では特徴的であった「GGSVDA」の 15 回繰り返し配列及びリン酸化部位はマウス配列では保存されていなかった。また、マウス parchorin 配列をもとに抗体を作製し、ウエスタンブロット法により、ウサギ parchorin と同様に胃粘膜及び脈絡叢に高発現していることを示している。更に MDCK 細胞に一過性に GFP-mouse-parchorin を発現させ、刺激により細胞質から形質膜へと移行することを明らかにしている。

[第二章]

第二章では、parchorin と結合する分子として syntenin を同定し、parchorin との関連を検討している。

Parchorin の活性化機構及び細胞質から形質膜への移行機構は明らかになっておらず、移行メカニズムには、1 . Parchorin は単独で細胞質に存在しており、刺激により形質膜へと移行する。2 . Parchorin には結合蛋白質が存在しており、刺激により結合または乖離をすることによって形質膜へ移行する。ことが考えられる。しかし細胞種によっては刺激による parchorin の移行が見られないことから、parchorin 以外の何らかの分子による関与が推測されていた。現在までに報告されている parchorin との結合蛋白質にはドーパミン D2 受容体があるが、parchorin の機能への関与は不明なままであり、更なる分子の存在が期待されていた。

本論文では、parchorin 結合蛋白質の探索法として酵母 two-hybrid 法を用い、parchorin の特異的配列である N 末端と結合する蛋白質をマウス全脳由来の cDNA ライブラリーから探索し、syntenin の全長 cDNA を含む 14 種の陽性クローンが同定されている。本論文では、PDZ ドメインを介して他の蛋白質と結合する、膜上の蛋白質複合体の構成蛋白質の一つであることが報告されている syntenin と、parchorin との関与を解析している。

HEK293 細胞に一過性に Flag-syntenin と GFP-parchorin を発現させ、抗 Flag 抗体を用いた免疫沈降法により、parchorin の N 末端側 (CLIC 相同領域以外) と PDZ ドメインを含む syntenin の C 末端側が結合することを明らかにしている。このことより、parchorin の N 末端にヘアピンカーブ様の構造が存在し、syntenin の C 末端側の PDZ ドメインと結合している可能性及び、parchorin 特異的配列である N 末端側と syntenin が結合することにより、CLIC ファミリー普遍的ではなくて parchorin 特異的な機能制御に syntenin が関与していることが期待される。

続いて、syntenin の sh RNA を発現させるアデノウイルスを作製し、RNAi 法により初代培養脈絡叢の内因性 syntenin を knockdown することにより、parchorin の局在が変化することを明らかにしている。初代培養脈絡叢での内因性 parchorin は核を除く細胞質及び形質膜へ局在しているが、syntenin knockdown 時には形質膜への局在が減弱していることより、syntenin は parchorin を形質膜へ留めることに関与している可能性を示している。

更に、細胞外に neomycin を投与することにより形質膜上の PIP₂ 濃度を低下させた場合に parchorin が形質膜から細胞質へと移行することを明らかにしている。このことは、syntenin の PDZ ドメインに結合することが報告されている PIP₂ が parchorin の細胞内局在に関与する可能性を示している。

以上、本論文は水輸送に関わる陰イオン輸送体に関する研究として、マウス parchorin のクローニングを行い、ノックアウトマウス作製に寄与し、かつ結合蛋白質として syntenin を同定し、parchorin の局在に syntenin が関与することを示している。

クロライドチャンネルは生体内のイオン調整に深く関与しており、水輸送に関わる陰イオン輸送体に関する研究は生命現象の更なる理解を深めると共に、創薬ターゲットとしても非常に興味深い。Parchorin が属する CLIC ファミリーはクローニングされて日が浅く、最近になってクロライドチャンネルであると判明したために病態に関連する解析はなされておらず、こ

れからの展開に興味を持たれている。本論文は生命薬学の分野に貢献するところ大であり、博士（薬学）の学位に値するものと判定した。