

(課程博士・様式9)

審 査 要 旨

専攻 バイオサイエンス 学籍番号 55044008 学生氏名 廣田 敦司

論文題目 ニホンアマガエル (*Hyla japonica*) の凍結耐性におけるグリセロールおよび

アクアグリセロポリンの生理学的役割

本博士論文は、無尾両生類の低温および凍結に対する抵抗性の分子機構をアクアグリセロポリンの観点から解析した研究報告である。本研究では、まず初めに冬眠をしているニホンアマガエルを用いて凍結後の生存率を調べ、本種が凍結耐性を有することを明らかにした。続いて、解凍群では冬眠群に比べてグルコースおよびグリセロールの血中濃度が高まること、組織中のグルコース含量は冬眠、凍結、解凍時において変動するがそのパターンは器官により異なること、組織中のグリセロール含量は肝臓以外の器官では冬眠群と比較して解凍群で増加することを明らかにした。これらの結果は、ニホンアマガエルがグリセロールおよびグルコースを耐凍物質として用いている可能性を示唆している。本研究では、グリセロール輸送に関わる分子を明らかにするために、アマガエル肝臓より哺乳類 AQP9 と相同な AQP-h9 をコードする cDNA のクローニングを行った。配列解析の結果、AQP-h9 のアミノ酸配列には 6 個の膜貫通領域や 2 つの NPA モチーフといった AQP ファミリーに特徴的な構造が含まれていること、および AQP-h9 は他の脊椎動物の AQP9 と高い類似性を持つことが判明した。さらにアフリカツメガエル卵母細胞を用いた swelling アッセイにより、AQP-h9 が水とグリセロールのいずれに対しても透過性をもつことを確かめた。これら結果等から、AQP-h9 は哺乳類 AQP9 と相同であり、アクアグリセロポリンとして機能することを証明した。

つぎに、冬眠、凍結、解凍時における組織構造の変化を調べるため、アマガエルの肝臓および骨格筋を対象として、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。その結果、冬眠時での凍結により肝臓において赤血球の凝集が生じること、および肝臓と骨格筋でエオジンの染色性が低下することが明らかとなった。さらに、抗 AQP-h9 抗体を用いて免疫染色を行い、冬眠群の肝臓中の赤血球に陽性シグナルが局在すること、およびこのシグナルは凍結群では強度を増し、解凍群ではほとんど消失することを見出した。一方、骨格筋では冬眠群の筋細胞の細胞質中にわずかな AQP-h9 シグナルが検出されること、このシグナルは凍結群で著しく増大し、解凍群では低下することを明らかにした。ただし、AQP-h9 mRNA の発現レベルは肝臓と骨格筋いずれにおいても凍結や解凍により変動しなかった。最後に研究結果を総合して、AQP-h9 はアマガエルの赤血球に発現し、冬眠時の凍結および解凍の際に赤血球にグリセロールを輸送することにより赤血球の保護に寄与する可能性、および骨格筋においては AQP-h9 が細胞内小器官に局在し、凍結の際にグリセロールの細胞内輸送に関わる可能性について考察した。

本研究は、ニホンアマガエルの凍結耐性にはグリセロールおよび AQP-h9 が関与することを初めて明らかにした点で意義深く、また、その研究内容は廣田氏が第一著者の論文として既に国際的学術雑誌に受理され、掲載予定である。以上のことから、本論文は博士（理学）の学位を授与するに値するものと認められる。