

## *Amoeba proteus*の収縮胞の水集積におけるアクアポリンの役割

西原 絵里, 横田 悦雄, 新免 輝男, 園部 誠司

(兵庫県立大学大学院・生命理学研究科)

## Role of aquaporin in the contractile vacuole of *Amoeba proteus*

Eri NISHIHARA, Etsuo YOKOTA, Teruo SHIMMEN, and Seiji SONOBE

(Department of Life Science, Graduate School of Life Science, University of Hyogo)

### SUMMARY

Based on the measurement of water permeability, we have hypothesized the presence of aquaporin in the membrane of the contractile vacuole (CV) of *Amoeba proteus*. In the present study, we cloned an aquaporin gene from *A. proteus* (ApAQP), which encodes a protein composed of 295 amino acids. The protein has six putative transmembrane domains and two NPA (Asn-Pro-Ala) motifs, which are conserved among aquaporins of other species. Expression analysis using *Xenopus* oocytes demonstrated that the gene encodes an aquaporin that is functional as a water channel. Immunofluorescence microscopy with anti-ApAQP antibody showed the localization of ApAQP on the CV membrane and the vesicles around CV. This is the first success in explaining the high water permeability of the CV membrane.

**[目的]** すべての生物において細胞の浸透圧調節は大変重要であり、生物種によってそれぞれの浸透圧調節機構が進化している。淡水産原生動物である *Amoeba proteus* は収縮胞と呼ばれる特殊な細胞小器官によって浸透圧調節を行う。収縮胞は細胞内へ流入した水を細胞外へ排出する役割を持ち、細胞の体積を維持するために必要不可欠である。しかしながら、収縮胞への水の集積機構は全く解明されていない。収縮胞内への水の集積機構を調べるために、*Amoeba proteus* から取り出した収縮胞を用いて解析し

た。さらに、水チャネルであるアクアポリンの関与が示唆されたため、*A. proteus* からアクアポリン遺伝子の単離を試み、収縮胞との関連を調べた。

**[材料と方法]** 材料には *Amoeba proteus* を用い、*Tetrahymena pyriformis* を餌として与えた。実験には2日以上飢餓状態にした細胞を用いた。

等張液 (1) で20分間処理した細胞をスライドガラスとカバーガラスの間に挟み、押しつぶして収縮胞を単離した (2)。この収縮胞周辺に高張液を灌流し、続

いて、等張液を灌流した。その際の収縮胞の体積変化を測定した。さらに、この結果より、収縮胞膜の水透過係数を求めた。

分子学的手法を用いて*A. proteus*からアクアポリン遺伝子 (*ApAQP*) のクローニングを行った。続いて、*ApAQP*をもとにアミノ酸配列を決定し、C末側に対するポリクローナル抗体を作製した。*A. proteus*のtotalタンパク質を用いて抗*ApAQP*抗体に対するウェスタンブロットを行った。さらに、この抗体を用いて細胞染色を行い、分布を調べた。

**[結果と考察]** 収縮胞内への水集積機構を調べるために、単離した収縮胞周辺の外液の浸透圧を変化させ、その時の体積変化を調べた。高張液を灌流すると、その体積は急速に減少した。続いて、等張液を灌流すると、膨張したが、もとの体積には戻らず破裂した。このことから、収縮胞膜が半透性であることがわかった。*Paramecium*において収縮胞内の無機イオン活性が高いことが報告されている(3)。これらのことより、浸透圧差を利用した収縮胞内への水の集積が示唆される。さらに、前述した結果より、収縮胞膜の水透過係数を求めると、 $1.06 (\mu\text{m}/\text{sec} \cdot \text{OsM})$ であった。これは赤血球やカエル卵における細胞膜の水透過係数に近い値であった(4)。これらの細胞膜には水チャネルであるアクアポリンが存在することが知られており、*A. proteus*の収縮胞の膜にもアクアポリンが存在する可能性が示唆された。

そこで、分子学的手法を用いて*A. proteus*からアク

アポリン遺伝子 (以下*ApAQP*) の単離を試みた。その結果、*AQP*様遺伝子が得られ、それから推測されるアミノ酸配列には*AQP*に特異的に存在するNPAモチーフを2ヶ所もち、6回膜貫通型タンパク質であることがわかった。さらに、単離した*ApAQP*のmRNAを顕微注射した*Xenopus*卵において、水輸送活性が上昇したことから、今回単離した遺伝子は水チャネルとして機能する*AQP*をコードしていることが示された。さらにこの*ApAQP*のC末側の配列をもとに抗体を作製し、免疫学的解析を行った。抗*ApAQP*抗体を用いてイムノブロットを行った結果、32 kDa付近にシングルバンドが確認できた。これは*ApAQP*遺伝子から推定される分子量と一致した。さらに、抗*ApAQP*抗体を用いて細胞染色を行った結果、収縮胞膜のみに蛍光が確認できた。これらのことから、*ApAQP*は収縮胞への水の集積に関与していることが考えられた。

#### [文献]

1. Shimmen, T. and MacRobbie, E. A. C. (1987) *Plant Cell Physiol.*, 28: 1023-1037
2. Nishihara, E., Shimmen, T., and Sonobe, S. (2004) *Cell Struct. Funct.*, 29: 85-90
3. Stock, C., Gronlien, H.K., Allen, R.D., and Naitoh, Y. (2002) *J. Cell Sci.*, 115: 2339-2348
4. Tazawa, M., and Shimmen, T. (1981) *Regulation of water and ions*. Kumazawa, K. Asakusashoten, Tokyo Japan. p.p. 18-77.