

氏名	さ 佐 とう 甲 やす 靖 し 志
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 博 第 1320 号
学位授与の日付	平 成 3 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 生 物 物 理 学 専 攻
学位論文題目	ラット肝細胞のエンドサイトーシス経路におけるエンドソーム の下位分画

(主 査)
論文調査委員 教 授 大 西 俊 一 教 授 高 橋 敏 教 授 竹 市 雅 俊

論 文 内 容 の 要 旨

この論文は、ラットの肝細胞のエンドサイトーシス経路において、アシアロ糖タンパク質受容体とリガンドを含むエンドソーム分画が、輸送と選別の過程に伴って変化させて行く様子を、各段階のエンドソーム分画を単離することによって明らかにし、エンドソーム下位分画の構造と性質を研究したものである。エンドソームは他の静的な細胞内小器官とは異なり、エンドサイトーシス経路の進行に連れて、構造と性質を動的に変えて行くであろうということは多くの研究から予想されていたが、エンドソームの分離と精製の困難さから、その変化の実態は明らかでなかった。特に、エンドサイトーシス経路の各段階におけるエンドソームを別々に単離し、その構成タンパク質を明らかにするといった研究はほとんど行われていなかった。

申請者は、高磁場勾配分画法によるリガンドに特異的なエンドソームの分画法を開発して、ラット肝細胞にアシアロ糖タンパク質を結合したフェライト超微粒子を投与し、そのエンドソームのみを磁石を用いて回収した。さらに、これを密度勾配遠心法により分画した。その結果、アシアロ糖タンパク質受容体と共に細胞に取り込まれたフェライト粒子リガンドが、細胞内を輸送されリソソームに至るまでの過程で、このリガンドを含む少なくとも2種類の異なった比重を持つエンドソーム分画が、経時的に生成してくることを明らかにし、これらエンドソームの下位分画を単離した。エンドサイトーシスの初期(5分)段階では、受容体とリガンドは共に低比重のエンドソーム内に含まれているが、リガンドの取り込みから15分後には、より比重の大きいエンドソームが新たに形成されてくる。このエンドソーム分画は、リガンドを含むが受容体を含んでいない。これは、この間にリガンドと受容体の選別が起こったことを示している。取り込みから30分後には、リガンドはさらに比重が大きく、糖鎖の分解酵素を含んだリソソーム内へ移行してゆく。

申請者は、各エンドソーム分画に含まれる膜分画・リガンド・受容体を定量し、リガンドと受容体の選別と輸送に伴ってリガンドが濃縮されて行く過程を明らかにした。また、得られた結果を成熟エンドソ

ームモデルと、定常エンドソームモデルというモデルに従って考察した。

なお、参考論文は、この研究の先駆けである高磁場勾配分画法によるエンドサイトーシス小胞の単離、時間分解顕微蛍光光度計の開発と、それを用いたエンドソーム膜融合の細胞内の個々のエンドソームについての測定である。

論文審査の結果の要旨

エンドサイトーシスは、いろいろな栄養物質の取り込みや、情報伝達物質に対する応答の制御等の細胞活動に必須の過程であり、その分子機構の解明は細胞生物学の中心的な課題の一つである。エンドサイトーシス経路を担う細胞内小器官であるエンドソームは、取り込まれた物質の複雑な処理過程に従って多種類の活性を順次発現し、形態的にも変化して行くことから、数種の異なった性質を持つ細胞内小胞の複合体であると考えられているが、その具体的な構成やそれらの間の関係は明らかでなく、それがエンドサイトーシスの分子機構の研究上の大きな問題点であった。

申請者は、新たに開発した高磁場勾配分画法によりエンドソームを単離し、ラット肝細胞のアシアロ糖タンパク質受容体とリガンドのエンドサイトーシス経路において、少なくとも2種類のエンドソーム分画が時間を追って生成することを明らかにし、それらを単離した。このように、エンドソーム下位分画の単離により、同一のエンドサイトーシス経路において、エンドソーム膜分画・受容体・リガンドを同時に追跡し測定することが初めて可能になり、それらのエンドソーム分画におけるリガンドと受容体の選別、リガンドの細胞内輸送、コレステロール／リン脂質比、各エンドソームの生理活性等を明らかにした。また、エンドソーム構成タンパク質が、エンドサイトーシス経路にもなって変化して行く様子を示し、各エンドソーム分画に特徴的なタンパク質を明らかにした。また単クローナル抗体の作成によって、細胞膜と細胞質に主として分布するタンパク質を明らかにした。これらの本論文の成果から、エンドサイトーシスにおけるエンドソームの構造や性質の変化が明らかになり、さらにエンドサイトーシスの分子機構が解明されていくことが期待され、細胞における小胞輸送の研究にとって重要な意味をもつと考えられる。

よって本論文は、理学博士の学位論文として価値あるものと認めた。

なお、主論文及び参考論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。