

氏名	さかい 堺	たつ 立	や 也
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)		
学位記番号	理 博 第 1340 号		
学位授与の日付	平 成 3 年 9 月 24 日		
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 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	微 小 管 脱 重 合 剤 存 在 下 で の ト ラ ン ス フ ェ リ ン の 細 胞 内 輸 送 と 形 質 膜 へ の 復 帰		
論文調査委員	(主 査) 教 授 大 西 俊 一	教 授 高 橋 敞	教 授 柳 田 充 弘

論 文 内 容 の 要 旨

この論文は、エンドサイト-シスされたトランスフェリンの取り込みから再び形質膜へ復帰するまでの細胞内輸送の過程を、生化学的および形態学的な手法を用いて研究したものである。トランスフェリンは、その受容体により細胞内にエンドサイト-シスされるが、エンドソーム内の酸性環境下での Fe イオンを解離し、アポトランスフェリンは受容体と結合したまま形質膜へ戻り、外液へ放出される。そこでこのタンパク質を蛍光標識あるいは酵素標識し、それを細胞内に取り込ませれば、このリガントおよび受容体の細胞内過程を研究することができる。

申請者は、この方法を用いて、エンドサイト-シスの過程における細胞骨格、特に微小管の役割に関する研究を行った。実験は、ヒト上皮由来の培養細胞である FL 細胞を用い、微小管を脱重合させる薬剤ノコダゾールで処理し、その状態でのトランスフェリンの細胞内過程を追跡し、正常な細胞での結果と比較した。トランスフェリンの蛍光標識としてはローダミンを用い、酵素標識としては西洋ワサビ過酸化酵素を用いた。

得られた主な結論は、微小管を脱重合させても、トランスフェリンの取り込み効率、細胞外液への放出には、何の影響もないことが明らかにされた。後者の半時間は生理的温度 (37°C) では12分であったが、それより低温側の15°C までの温度でも変わらない。その転移温度も25°C で同じであり、それより高温側及び低温側での活性化エネルギーも、5.5kcal/mol および29kcal/mol と同じであった。また、エンドソームでの Fe イオンの解離と細胞質への移行も同じ様に生じた。

一方、形態学的観察によれば、トランスフェリンをふくむエンドソームの細胞内分布は著しく異なり、ノコダゾール処理細胞では常に形質膜附近に分布しているが、正常の細胞では始め形質膜附近に分布し、その後微小管に沿った跳躍運動で核附近に移る。エンドソームの形態は、球状および管状の小胞、マルチベジキュラーボディであり、ノコダゾール処理および正常細胞の両者で殆ど同じであった。

微小管の存否によりエンドソームの分布は著しく異なるが、トランスフェリンの取り込みと放出は同じ

結果が得られた。微小管のない場合、形質膜附近のエンドソームは再び形質膜に遭遇し、それと融合することでトランスフェリンを復帰させると考えられる。正常の細胞では、このような形質膜付近からの復帰と、核附近に移動したエンドソームからの復帰が考えられよう。ノコダゾール処理により微小管を脱重合させると、この二つの経路のうち前者のみになると考えられる。その時間が核附近からの復帰時間と同じ12分ということになる。核附近へのエンドソームの移動などに要する時間が、トランスフェリンのリサイクリングの時間に対して十二分に短いことを示唆している。トランスフェリンの復帰の律速段階として、エンドソームの融合、分裂、酸性化、および形質膜との融合などが考察されている。

論文審査の結果の要旨

細胞内では多くのタンパク質が膜小胞により特定の器官に輸送されている。この膜小胞の輸送は細胞内膜器官の分化、機能維持の基盤となる重要な細胞内活動であり、その分子機能の解明は細胞生物学の中心的な課題の一つである。受容体媒介エンドサイトーシスにおけるタンパク質リガンドと受容体の輸送の現象は、細胞内での膜小胞輸送の重要な研究対象である。これまで、受容体媒介エンドサイトーシスにおいて、リガンドの細胞内輸送機構に関しては、微小管とその関連のタンパク質による膜小胞輸送機構が示唆されている。しかし、受容体に関しては適当な標識法が少ないという理由から、細胞内輸送と形質膜への復帰や経路やその分子機構に関し不明な点が多く、また得られている知見も間接的な測定によっている場合が多い。

申請者は、トランスフェリンが形質膜へ復帰するリガンドであるが、細胞内で受容体と解離しないことに着目し、これを蛍光および酵素で標識することにより、エンドサイトーシスされた受容体の細胞内挙動を直接観察することに成功している。その結果、正常なFL細胞と微小管脱重合剤存在下の細胞では、エンドサイトーシスのいくつかの素過程であるトランスフェリンの取り込みとエンドソームの形成、Feイオンの細胞質への移行、リガンド間の選別、トランスフェリンの放出の過程が、いずれもほぼ同様に起きることを見出した。一方エンドソームの細胞内存在部位は著しく異なっており、微小管脱重合状態では形質膜近辺に存在しているが、正常細胞でははじめ形質膜近辺から次第に核付近に移行してくる。しかしトランスフェリンの取り込み及び細胞外への放出は、正常と微小管脱重合細胞では差が見られなかった。

このような結果から、微小管脱重合状態では、形質膜付近のエンドソームは再び形質膜と遭遇し融合してトランスフェリンを復帰させると考えられる。一方、正常な細胞では、形質膜付近からと核附近のエンドソームからの二経路が存在すると考えられる。この両者の時間が同じという結果になった。また、トランスフェリンの放出の速度論的解析から、形質膜への復帰を制御する段階に関し活性化エネルギー等のいくつかの特徴を明らかにした。

本論文ではリガンドと受容体のエンドサイトーシスの解析から、受容体の形質膜への復帰における細胞内経路とその特徴が明らかとなり、さらにこれらの知見から膜小胞輸送の制御機構が解明されていくことが期待され、今後の細胞内のタンパク質輸送の研究にとって重要な意味をもつものと考えられる。よって本申請論文は、本学理学博士の学位論文として価値あるものと認めた。

なお、主論文の研究業績を中心として、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。