

|          |                      |          |
|----------|----------------------|----------|
| 氏名       | かざわだ<br>鎌和田          | さとし<br>聡 |
| 学位(専攻分野) | 博士 (理 学)             |          |
| 学位記番号    | 理 博 第 1472 号         |          |
| 学位授与の日付  | 平成 5 年 3 月 23 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   | インビトロでのゴルジ体の膜融合活性の解析 |          |

論文調査委員 (主査) 教授 大西俊一 教授 高橋 敬 教授 竹市雅俊

### 論 文 内 容 の 要 旨

真核細胞では小胞体で合成されたタンパク質や脂質は、ゴルジ体に運ばれ糖鎖の修飾などを受けた後、それぞれの目的地(形質膜やリソゾーム, 細胞外)に膜小胞に包まれて輸送されていく。この細胞内小胞輸送は、膜小胞の形成、目的のオルガネラへの輸送および小胞とオルガネラとの膜融合といった過程に分けられる。輸送を確実にを行うために、これらの過程は巧妙に制御されていると考えられているが、その制御機構を構成する分子は、特に膜融合に関しては、ほとんど同定されていないのが現状である。

細胞内のオルガネラの中でも、ゴルジ体は、その機能を果たすうえで膜融合が特に重要な過程となっている。なぜなら、ゴルジ体は細胞内の膜小胞輸送経路の中心に位置し、小胞体から出芽した膜小胞と絶えず融合する必要があるからである。そのうえ、ゴルジ体の各層板間の輸送も膜小胞に担われているため、ゴルジ体内部でも頻繁に膜融合が起こっていると考えられている。本論文の研究は、ゴルジ体の膜融合活性を、これまで多くのインビトロ膜融合測定に使われてきたリポソームを使用して測定し、ゴルジ体の膜融合を制御する因子を解明することを目的として行われた。

ゴルジ体はウサギの肝臓からショ糖密度勾配法で調製し、リポソームは、主として、中性のリン脂質であるジオレオイルホスファチジルコリンを使用して作成した。融合した膜がゴルジ体由来であることは、西洋ワサビペルオキシダーゼを封入したリポソームと融合させた後のゴルジ体の電子顕微鏡観察と、新たに作成したゴルジ体特異的モノクローナル抗体による免疫沈降を行うことにより示した。

膜融合を定量的・経時的に測定するために、蛍光性脂質を含んだリポソームとゴルジ体の脂質混合測定と、蛍光標識デキストランを封入したリポソームとゴルジ体の内水相混合測定を中性緩衝液中で行った。これらの方法により、以下のような結果が得られた。融合は、温度・イオン強度・ゴルジ体の膜内在性タンパク質依存的に起こる。特に、ショ糖の存在下では起こらない。直径の大きい(約200nm)リポソームの融合活性は、小さい(約30nm)リポソームに比べるとやや減少したが、両者に本質的な差は見られなかった。ホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルセリンをモル比で50%含むリポソームは、

ホンファチジルコリンのみからなるリポソームに比較して約2倍の融合活性を持つ。ゴルジ体以外のオルガネラ膜である、形質膜、粗面小胞体膜、滑面小胞体膜とリポソームとの膜融合は、ゴルジ体とは異なる反応速度で進行した。これまで多くのインビトロ再構成系で細胞内小胞輸送に必要であると報告されてきた、アデノシン三リン酸や細胞質タンパク質は融合活性に影響を与えなかった。

膜融合測定のほか、ゴルジ体と会合したリポソーム量を測定した。その結果、低温や低イオン強度下では、融合は阻害されるが、会合は阻害されないこと、会合から融合に至る過程が律速段階であることがわかった。

### 論文審査の結果の要旨

膜融合は受精、エンベロープウイルスの細胞内侵入、筋芽細胞の多核体形成、エンドサイトーシス、エキソサイトーシス、細胞内小胞輸送といったさまざまな生命活動において、本質的な役割を果たしている。これらの生命活動を理解するうえで、膜融合の分子機構の解明は避けて通ることのできないものであり、生物学の基本的課題の一つといえる。申請論文は、細胞内小胞輸送経路に位置するゴルジ体の膜融合を制御する因子を解明することを目的として、インビトロでのゴルジ体の膜融合活性を解析したものである。

インフルエンザウイルスの膜融合については、膜融合タンパク質であるヘマグルチニンの同定を始めとした多くの知見が得られているのに対して、細胞内の膜融合に関与する因子はほとんど同定されていない。この原因の一つに、膜融合測定法の問題がある。これまでにインビトロで再構成された細胞内膜融合測定法は、未分画の膜分画同士を混合し、融合に伴う最終産物の生成量を測定するものであり、膜融合そのものを直接測定することはできなかった。本論文では、ゴルジ体の膜融合の相手膜としてリポソームを使用し、この問題を克服している。リポソームは生体内に存在しないという不利な側面もあるが、蛍光を利用した定量的・経時的な膜融合測定を可能にできる利点は非常に大きいと考えられる。

申請者は、リポソームと融合した膜がゴルジ体由来であることを示すために、酵素活性・電子顕微鏡観察・ゴルジ体特異的モノクローナル抗体による免疫沈降・他のオルガネラ膜とリポソームとの融合測定といった独立した4つの実験を行い、膜融合測定も脂質混合法と内水相混合法の2つの方法で行っている。これらの結果から、ゴルジ体とリポソームとの融合が、非特異的現象ではなく、ゴルジ体に特異的な因子に制御された現象であることが十分に示されている。また、膜融合に影響を与える因子を調べた結果、膜融合は低イオン強度と低温下では阻害されることを明らかにしている。この知見は、これまで報告された細胞内小胞輸送現象の多くに共通して観察されるものである。申請者はさらに解析を進め、これらの条件下では融合は阻害されるが、リポソームとゴルジ体との会合は阻害されないことを明らかにした。これは、膜融合そのものを即時的に測定する方法で初めて検出可能になる知見であり、これまでに報告された例はない。このほか、細胞内小胞輸送に必須であると考えられるアデノシン三リン酸や細胞質タンパク質は融合活性に影響を与えなかったことから、これらの因子が細胞内小胞輸送のうち膜融合以外の過程に関与している可能性を示唆している。このことも大きな成果の一つといえる。さらに本論文では、ゴルジ体の膜内在性タンパク質が融合に関与していることが示されている。現時点では、このタンパク質が細胞内で実際に膜融合を司っていると断定できないが、本論文で用いた測定法を利用すれば、タンパク質の同定と生

体内での機能の解明も実現可能と思われる。以上の成果を基にして、ゴルジ体の膜融合活性を制御する因子が明らかになり、さらには膜融合の分子機構が解明されていくことが期待されるので、本論文は細胞内小胞輸送研究にとって重要な意義をもっと考えられる。

よって、本論文は博士（理学）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。