

氏 名	いし とう みわ こ 石 堂 美 和 子
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2378 号
学位授与の日付	平成 13 年 5 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 科 学 専 攻
学位論文題目	低密度リポタンパク質の細胞内輸送変異株群を用いたエンドサイトーシス後期過程の分子機構に関する研究

論文調査委員 (主 査)  
教 授 藤 吉 好 則 教 授 西 田 栄 介 教 授 七 田 芳 則

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文において申請者は、受容体媒介エンドサイトーシスの機構の重要な部分を解明した。エンドサイトーシスは、受容体を媒介して細胞外から物を取り込む基本機能であり、細胞外栄養物の取り込み、細胞表面受容体の制御、細胞極性の維持、抗原の提示などの重要な細胞機能の多くに関わっている。しかし、哺乳類細胞においてこれまで明らかになったエンドサイトーシスに関わる機能分子は、取り込み及び膜のターゲティング/融合過程に関わるごく一部分であった。

そこで、申請者は以下の2つの実現を目指して実験を行なった。

- (1)エンドサイトーシスにおける哺乳類細胞変異株群を単離するストラテジーを構築し、実際に変異株群を単離すること
- (2)単離した変異株を形態学的遺伝学的に解析することにより、エンドサイトーシスに関する新たな分子機構を明らかにすること

その結果、フローサイトメトリーを用いたスクリーニング法を確立し、3つの相補グループに分類される9個の変異株群の単離に成功した。また、単離された変異株群は、後期エンドソームに関する様々な輸送過程に変異を持っていること明らかにした。グループAの変異株は後期エンドソームとリソゾームの直接相互作用に変異を持ち、グループBの変異株は連続した様々な発達段階の液胞/MVBを持つ。また、グループCの変異株はゴルジ体から後期エンドソームへのマンノース6-リン酸受容体によるリソゾーム酵素輸送経路に変異を持つ。したがって、今回得られた変異株群は、今後哺乳類細胞での後期エンドソームに関する様々な方向への輸送の研究ツールとして使用出来るものである。

次に、申請者はグループBに属する変異株 LEX2 株について、詳細な解析を行なった。LEX2 株はマルチベシキュラーボディ (MVB) からゴルジ体及びリソゾームへの両方向の輸送に変異を持っていた。以前に単離した変異株 LEX1 株との比較解析から、LEX2 株の変異段階である肥大した MVB は、LEX1 株の変異段階である後期エンドソーム—リソゾーム相互作用過程と比較するとより早い段階であり、より成熟していない低分解性エンドソームであることが示唆された。また、LEX2 株の著しい分解性の低さから、MVB から後段階である後期エンドソーム—リソゾームとの相互作用可能な段階への移行は、リソゾームの分解機能にとって重要であることが示唆された。これらの結果から、LEX2 株と LEX1 株の変異段階に規定されるような、少なくとも2段階の後期エンドソーム過程があることを示唆した。

さらに、LEX2 株の肥大した MVB はコレステロールを補充することにより解消され、MVB からリソゾーム方向への輸送は修正されないがゴルジ体方向への輸送は回復することが明らかになった。また、このことから MVB からゴルジ体への輸送にコレステロールが必要であるという新たな知見を得た。また、LEX2 株のコレステロール要求性及び MVB からゴルジ体への輸送を回復させるサプレッサー分子として、コレステロール生合成に関わる酵素である NSDHL (NAD(P)H steroid dehydrogenase-like protein) を同定した。NSDHL の変異は、ヒトの胎児発生異常疾患である CHILD シンドロームと、マウスの胎児発生異常疾患の原因となることが知られている。発生に重要な受容体の機能が後期エンドソーム膜輸送と関係があるというモデルが最近提唱されているので、LEX2 株は今後後期エンドソーム—シグナル統合に関する研究の有益な

道具となり得るであろう。

以上のように、本論文は、エンドサイトーシスにより分子などが取り込まれた後の細胞内輸送経路のステップの詳細をはじめて明らかにした。

### 論文審査の結果の要旨

哺乳類の細胞は、低分子や高分子、粒子などを外界から取り込んで、細胞内の特定の組織に送り込む様々な機構を有している。これらの機構はエンドサイトーシスと総称されている。このエンドサイトーシスは細胞外栄養物の取り込み、細胞表面の受容体の発現調節、細胞極性の維持、細胞内コレステロールの恒常性や抗原の提示など多くの生理機能を担っている。申請者の研究は、このエンドサイトーシスの細胞内輸送経路に注目して、低密度リポ蛋白質 (LDL) のエンドサイトーシス、すなわち、クラスリンによる受容体を介したエンドサイトーシスの系を用いて研究と解析が進められた。

まず申請者は、エンドサイトーシスにおける哺乳類細胞変異株群を単離するために、フローサイトメトリーを用いたスクリーニング法を確立した。この方法を用いて、3つの相補グループに分類される変異株9個を単離し、これらの変異株を解析して、これらが後期エンドソームに関する様々な輸送過程に変異を持っていることを明らかにした。すなわち、グループAの変異は後期エンドソームとリソゾームの直接相互作用に変異を持ち、グループBの変異株は連続した様々な発達段階の液胞/マルチベシキュラーボディ (MVB) を持ち、グループCの変異株はゴルジ体から後期エンドソームへのマンノース6-リン酸受容体によるリソゾーム酵素輸送経路に変異を持つことを明らかにした。

次に、申請者はグループBに属する LEX2 変異株について、詳細な解析を行なった。この LEX2 株は MVB からゴルジ体及びリソゾームへの両方向の輸送に変異を持っていた。すでに単離されていた LEX1 変異株との比較解析から、LEX2 株の肥大した MVB は、成熟していない低分解性エンドソームであることを示唆した。また、LEX2 株の著しい分解性の低さから、MVB から後段階である後期エンドソーム—リソゾームとの相互作用可能な段階への移行は、リソゾームの分解機能にとって重要であることが示唆された。これらの結果から、LEX2 株と LEX1 株の変異段階に規定されるような、少なくとも2段階の後期エンドソーム過程があることを申請者は発見した。

さらに、LEX2 株の肥大した MVB はコレステロールを補充することにより解消され、MVB からリソゾーム方向への輸送は修正されないがゴルジ体方向への輸送は回復することをも明らかにした。また、このことから MVB からゴルジ体への輸送にコレステロールが必要であるという重要な発見を行った。また、LEX2 株のコレステロール要求性及び MVB からゴルジ体への輸送を回復させるサプレッサー分子として、コレステロール生合成に関わる酵素である NSDHL (NAD(P)H steroid dehydrogenase-like protein) を同定した。NSDHL の変異は、ヒトの胎児発生異常疾患である CHILD シンドロームと、マウスの胎児発生疾患の原因となることが知られており、発生に重要な受容体の機能が後期エンドソーム膜輸送と関係があるというモデルが最近提唱されていることと考え合わせると、LEX2 株は後期エンドソーム—シグナル統合に関する研究の有力な道具となり得るであろうことを示した。

このように、申請者は受容体を介したエンドサイトーシスの機構研究において、重要な貢献をしている。

よって、博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、主論分に報告されている研究業績を中心として、これに関連した分野について諮問した結果、合格と判定した。