

論文の内容の要旨

論文題目 リポタンパク質を含んだエンドソーム輸送の実時間可視化解析

氏名 市川智光

リポタンパク質とは、トリアシルグリセロールやコレステロールエステルなどの中性脂質をコア(芯)とした小粒子であり、その表面は、固有のタンパク質(アポリポタンパク質)とリン脂質、およびコレステロールから構成される被膜で包まれている。リポタンパク質は、その粒子に含まれるタンパク質と脂質の比率によって規定される水和密度により、数種類に分類される。その中で低密度リポタンパク質(LDL)と呼ばれるリポタンパク質は、肝臓で合成されたコレステロールの回収を行うとともに、そのコレステロールは胆汁酸やステロイドホルモン、細胞膜成分として利用されることが知られている。LDLは、脳を含むほぼすべての器官で発現しているLDL受容体を介したエンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれた後、エンドソームによってリソソームへ運搬され、そこで分解される。しかし、エンドサイトーシス後初期段階で形成されるエンドソームから、リソソームへのエンドソームの輸送動態は不明な点が残されており、詳細な実時間追跡が必要とされていた。

本研究では、蛍光標識したLDLを使用し、エンドサイトーシス後のLDLを含むエンドソームを実時間で追跡することにより、エンドソームがどのように輸送されるのか、何によって輸送されるのか、を調べた。この結果、脂質の細胞内輸送に関する新しい知見を得ることができたので、ここに報告する。

本論文の第1章では、LDLを含むエンドソームを追跡する細胞として、ウシ副腎皮質細胞を選択した。副腎皮質細胞は、LDL受容体を豊富に発現していること、LDLに含まれるコレステロールをステロイドホルモン産生に用いていること、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)により刺激され、ステロイドホルモン産生が促進されること、といった細胞の性質に関する基礎的知見が蓄積されており、

観察結果の解釈が容易である。

LDL を含むエンドソームは、蛍光色素 DiI で標識した DiI-LDL を取りこませることによって可視化し、蛍光ビデオ顕微鏡を用いて観察した。エンドソームの運動解析は、VTR に記録された画像を、デジタル変換した後、単一エンドソーム解析法を用いて行った。

副腎皮質細胞内のエンドソームは、エンドサイトーシス終了後 30 分経過した時点から蛍光ビデオ顕微鏡上で直径 $0.7 \mu\text{m}$ 程度の粒状に観察された。1 時間経過すると、細胞内のエンドソームは活発に運動しており、取り込み後 3 時間で細胞の核周辺部に集合した。アクリジンオレンジによってリソソームの分布を可視化し、この LDL を含むエンドソームの分布を比較したところ、この集合状態はリソソームに相当することが分かった。単一エンドソーム解析を行ったところ、エンドソームは、主に $0.05 \sim 0.25 \mu\text{m}$ 毎秒の速度を持ち、前進/後退/停止という 3 種の運動モードを頻りに繰り返しながら微小管レール上を滑走していた。微小管レールの関与は微小管重合阻害剤ノコダゾールを加えると核周辺部への集合が観測されず、その後ノコダゾールを除去した培地中で保温すると再び集合が観察されることから判明した。

微小管上での LDL を含むエンドソームを輸送する機構を調べるため、サポニンによって細胞膜に小さな穴を開け、モータータンパク質の選択的阻害剤として知られるバナジン酸、AMP-PNP や運動阻害用抗体を細胞内に導入した。低濃度でダイニンを阻害するバナジン酸は、 $10 \mu\text{M}$ でおおよそ 26% の細胞に効果を示し、エンドソームは細胞周辺部へ集合する現象が観察された。一方、キネシン阻害剤として知られる AMP-PNP の場合、 1mM の濃度で細胞内エンドソームは核方向へも、細胞周辺部へも移動しないものと、核中心部へ集合するものが混在するという結果を得た。これらの阻害効果をさらに確認するため、モータータンパク質の運動阻害抗体(ダイニン抗体:クローン no.70.1、キネシン抗体:SUK-4)を用いたところ、ダイニン抗体では、細胞周辺部への集合が、またキネシン抗体では細胞核周辺部への集合が観察された。これらの結果より、エンドソームが前進/後退を繰り返すのは核中心方向、細胞周辺方向への運動を担う 2 種のモータータンパク質、細胞質ダイニン、キネシンが同一のエンドソームに結合していることによって、進行方向が切り替わるためであることがわかった。

次に、ステロイド産性を促進させるホルモンである ACTH で細胞を刺激し、細胞内エンドソーム輸送に対する影響を調べたところ、濃度 100pM の ACTH 刺激により、LDL エンドソームの輸送は促進され、通常 3 時間必要とされる核周辺部への集合が、刺激を伴った細胞では 1 時間で完了することを発見した。1 時間の時点で、細胞内全エンドソームに対する細胞核周辺部のエンドソームの集合比率は、コントロールでは 26%、ACTH 刺激後の細胞では 65% であった。また、核方向への運動成分が、逆方向の運動成分を上回る比率が、コントロールでは 2% であったのに対し、ACTH 刺激後の細胞では 8% と増加していた。ACTH が細胞膜表面の ACTH レセプターに結合すると、 Ca^{2+} 信号が発生することが見つかっている。これらの関与を調べるために、細胞外液の Ca^{2+} 濃度を大幅に低下させた状態で ACTH 刺激を行ったところ、LDL エンドソームの集合を促進しなという結果を得た。また、膜透過性細胞内 Ca^{2+} イオン選択的キレート剤である BAPTA/AM により細胞内 Ca^{2+} 濃度を下げた状態においても、ACTH はエンドソーム輸送を促進しなかった。細胞内 cAMP を上昇させる条件のみではこの ACTH 効果が見られないことを考慮すると、ACTH 刺激が発生させる Ca^{2+} 信号を介して、互いに反対方向に運動する 2 種のモータータンパク質による

運動が調整され、それが LDL を含むエンドソームの輸送を促進させていると推測することができる。

本論文の第2章では、LDL を含むエンドソームを追跡する細胞として、ラット脳星状膠細胞(アストロサイト)を選択した。これまで、グリア細胞はニューロンが働くための環境を維持する静的な役割のみを持つと考えられていた。しかし近年、グリア細胞で LDL 受容体や多種類の神経伝達物質受容体、イオンチャネルが発現していること、及びステロイドホルモン様の作用を持つニューロステロイドが産生されていることが報告されるに至り、従来のグリア細胞像は訂正を余儀なくされている。このような状況にあるため、脳グリア細胞における脂質の細胞内輸送を調べることは、グリア細胞の役割に対する新たな視点を提供する可能性を持ち、同時に軸索輸送以外の脳細胞内オルガネラ輸送に関する理解を深めることができる。

第1章で用いた方法と同様に、LDL を含むエンドソームは、DiI-LDL を取りこませることによって可視化し、蛍光ビデオ顕微鏡を用いて観察した。エンドソームの運動解析は、VTR に記録された画像を、デジタル変換した後、単一エンドソーム解析法を用いて行った。

アストロサイト内のエンドソームは、LDL の取り込み後、1時間~1時間30分経過した時点から蛍光ビデオ顕微鏡上で観察され始め、約86%のものが直径0.5~1.0 μm 程度の粒状に観察された。3時間経過した時点では、細胞内のエンドソームは活発に運動しており、取り込み後6時間で細胞の核周辺部に集合した。アクリジンオレンジによってリソソームの分布を可視化し、このLDL を含むエンドソームの分布を比較したところ、この集合状態はリソソームに相当することが分かった。

エンドソームの運動を詳細に解析するために単一エンドソーム解析を行ったところ、約36%のエンドソームは、0.04 μm 毎秒以上の速度を持ち、微小管レール上を、前進/後退、あるいは停止するという3種の運動モードを頻繁に繰り返しながら滑走していた。微小管レールの関与は第1章で述べた方法と同様にノコダゾールを用いて行い、ノコダゾール中では核周辺部への集合が観測されず、その後ノコダゾールを除去した培地中で保温すると再び集合が観察されることから判断した。

次に、サポニンによってアストロサイトの細胞膜に小さな穴を開け、ダイニンモータータンパク質の選択的阻害剤として知られるバナジン酸と、第1章で用いたダイニン抗体を細胞内に導入した。10 μM 、および50 μM のバナジン酸によって、エンドソームが細胞周辺部へ集合する現象が観察された。ダイニン抗体によっても同様な細胞周辺部への集合が観察された。これらの結果より、アストロサイト内のエンドソームはダイニンにより核周辺部へ輸送されていることが分かった。第1章で得られた結果から類推するならば、エンドソームが前進/後退を繰り返すのは、核中心方向、細胞周辺方向への運動を担う2種のモータータンパク質、細胞質ダイニン、キネシンが同一のエンドソームに結合していることによって、進行方向が切り替わるためであると推測される。