

審査の結果の要旨

氏名 皆川 徹也

イノシトールリン脂質は細胞内で生理機能制御に重要な働きを果たしていることが示されており、Sac ドメインはそのホスファターゼドメインとして認知されつつある。本研究は哺乳類の新規 Sac ドメインの含有タンパク質(rSac1、hSac2、hSac3)についてホスファターゼ活性を中心として解析を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. ラットの脳から Sac1p のホモログと考えられるタンパク質 rSac1 をクローニングした。このタンパク質は 587 アミノ酸から成り、Sac1p とは 35.4% の homology を有していた。ノーザンブロット解析により rSac1 の組織分布を調べたところ、調べた全ての組織において発現が見られ特に腎臓、心臓、脳、骨格筋に強いバンドが見られた。種々のリン脂質に対する活性を調べたところ rSac1 は PI(3)P , PI(4)P , PI(3,5)P₂ に対するホスファターゼ活性を有していた。中でも PI(3)P に対する活性が最も強く、その Km 値は 19.86 μM であった。活性の pH による依存性を調べたところ 7.5 付近で最大の活性を示した。また、EDTA や陽イオンの活性に対する影響を調べたところ、いずれも活性には大きな影響を及ぼさないことがわかった。COS7 細胞に発現させたところ、小胞体とシスゴルジに局在することが明らかになった。また、EGF 刺激を行うとシスゴルジのみに局在するようになり小胞体が不安定化することが明らかになった。この現象が rSac1 のホスファターゼ活性によるものであるか確かめるため、ホスファターゼ活性を欠失させた変異体(D391A)を作製し同様に発現させ EGF 刺激後の局在を検討した結果、野生型と同様にシスゴルジに局在したが小胞体の不安定化は観察されなかった。このことから、rSac1 を過剰発現させ、EGF 刺激をした際に観察される小胞体の不安定化は rSac1 のホスファターゼ活性によるものであることが明らかになった。

2. hSac2 は 1132 アミノ酸からなり、ノーザンブロット解析では調べた全ての組織において発現が見られ、特に腎臓、心臓、脳、骨格筋に強いバンドが見

られた。また、各種リン脂質に対する活性を調べた結果、hSac2 は PI(4,5)P₂、PI(3,4,5)P₃ に対するホスファターゼ活性を有しており PI(4,5)P₂ に対する活性が最も強く、その Km 値は 14.29 μM であった。活性の pH による依存性を調べたところ 6.0 付近で最大の活性を示した。次に、EDTA や陽イオンの活性に対する影響を調べたところ、5mM Mg²⁺、25mM K⁺ 存在下で最も高い活性を示したものの、EDTA 存在下やこれら陽イオンの非存在下においても活性が完全に失われることはなかった。COS7 細胞に発現させたところ、サイトソル画分およびトランスゴルジに発現が認められ、細胞の退縮が観察された。また、hSac2 のホスファターゼ活性を欠失させた点変異体を作製し発現させたところ、野生型と同様の局在を示したが、細胞が退縮することはなかった。このことから hSac2 を過剰発現させたときに細胞が退縮するのは hSac2 のホスファターゼ活性によること、また局在にはホスファターゼ活性は必要ないことが明らかになった。

3. hSac3 は 907 アミノ酸から成り、ノーザンブロット解析では hSac3 は腎臓、心臓、骨格筋、肝臓に発現が見られた。また、各種リン脂質に対する活性を調べたところ、どのイノシトールリン脂質に対してもホスファターゼ活性を示さなかった。COS 7 細胞に発現させたところサイトソル画分に局在することが明らかとなった。また、EGF 刺激により細胞質画分及び細胞膜のラッフリング部位に局在することが明らかになった。

以上、本論文は 3 種類の新規 Sac ドメイン含有タンパク質の酵素活性、細胞内局在等を明らかにした。本研究はこれまでほとんど解析されていなかった哺乳類の Sac ドメイン含有タンパク質について新しい知見を与え、これはイノシトールリン脂質代謝経路の解明に重要な貢献をなすものであり、学位の授与に値するものと考えられる。