

論文の内容の要旨

論文題目 α -トコフェロール輸送蛋白質 (α -TTP) の
細胞内動態についての解析

氏 名 堀口 昌邦

【序】

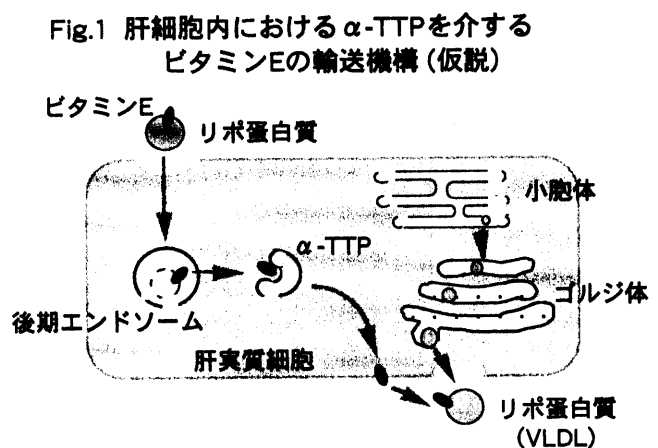
α -トコフェロール輸送蛋白質 (α -TTP) は、血中のビタミン E (α -トコフェロール) レベルを規定している蛋白質として当教室で発見された。 α -TTP は主に肝臓に発現しており、血液中から肝臓に取り込まれたビタミン E を再び血液中に分泌する過程に関与することが分かっている。ビタミン E を含む血漿リポ蛋白質が肝細胞にエンドサイトーシスされ、さらに後期エンドソームやライソソームといった酸性コンパートメントで分解された後、遊離したビタミン E が細胞質に存在する α -TTP へと受け渡される。その後、肝細胞内の何らかの輸送機構によって α -TTP に結合したビタミン E が血中へ分泌されるリポ蛋白質へと受け渡されると考えられるが (Fig.1)、これまでのところ、その具体的なメカニズムについてはほとんど分かっていない。

私は、 α -TTP によるビタミン E 輸送機構を解明する目的で、肝細胞系、非肝細胞系における α -TTP の動態や機能について解析した。

【方法と結果】

1. α -TTP の後期エンドソームへの局在化とその機構についての解析

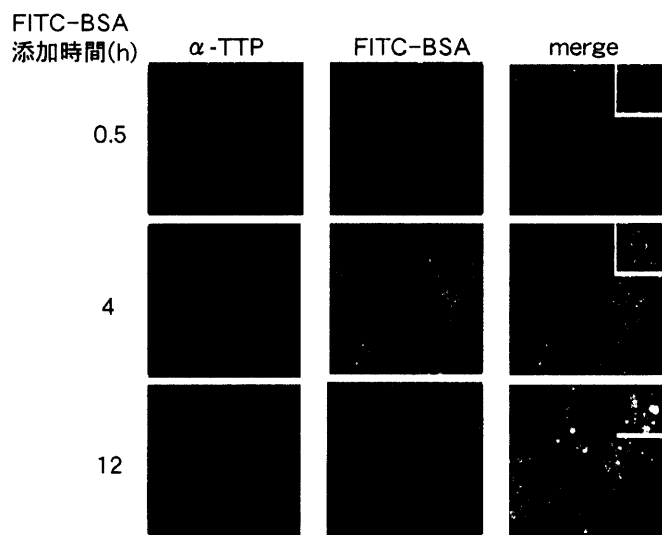
これまでに当教室では、ラット肝臓癌由来細胞株 McARH7777 に α -TTP を発現させた細胞



株 (McA-TTP 細胞) を用いて、 α -TTP がビタミン E の肝細胞からの放出を促進すること、この放出が細胞内酸性コンパートメントを中性化するクロロキンで阻害されること、及び、その際に通常は細胞質に一様に分布している α -TTP が細胞内で局在化することを見出していた。私は、 α -TTP の肝細胞内での挙動を解明する上でこの現象に着目し、クロロキン処理による α -TTP の細胞内局在化部位についてさらに検討した。

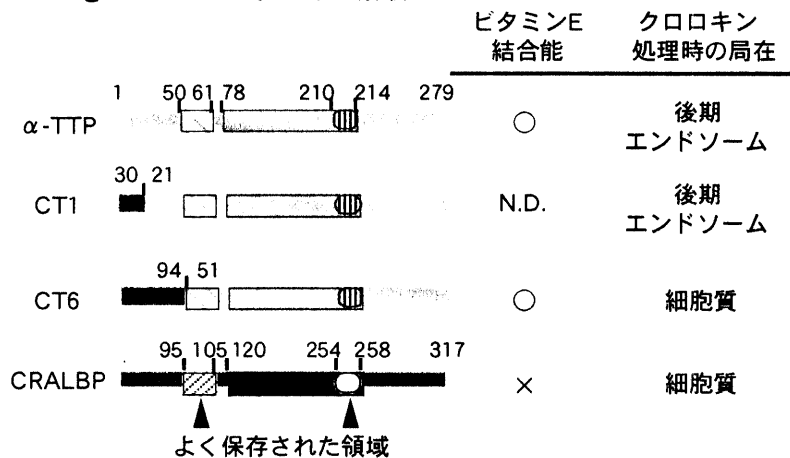
McA-TTP 細胞に蛍光標識蛋白質 FITC-BSA をエンドサイトーシスさせ、経時的に α -TTP との二重蛍光染色を行ったところ、エンドサイトーシス開始から 4 時間程度まではクロロキンによる α -TTP の局在化部位は FITC-BSA とは一致しなかったが、12 時間後にはこれらがほぼ完全に一致してきた。こうした結果から、 α -TTP の細胞内局在化部位は後期エンドソームであると考えられた (Fig.2)。

Fig.2 α -TTPはクロロキン処理により後期エンドソームに結合する



次に α -TTP の後期エンドソームへの局在化の機構について解析した。クロロキンとは別の機構で酸性オルガネラを中性化する V- type ATPase 阻害剤バフィロマイシン A1 でも、クロロキンと同様の α -TTP の局在化が観察された。このことから、 α -TTP の後期エンドソームへの局在化は、酸性コンパートメントの内腔側酸性 pH が中性化することで引き起こされていることが強く示唆された。また、 α -TTP の後期エンドソームへの局在化に対する様々な因子の影響について調べたところ、2-deoxy-D-glucose と NaN3 を細胞に添加して細胞内の ATP を枯渇させると α -TTP の局在化が見られず、この現象が ATP 依存的事であることが示唆された。

Fig.3 α -TTPのドメイン解析



2. α -TTP の局在化に必要なドメインについての解析

次に、 α -TTP 分子中における後期エンドソームへの局在化に必要なドメインの同定を試みた。 α -TTP 分子を単純に deletion すると、ほとんどのコンストラクトが不安定になった。そこで、 α -TTP と相同性を持つが McARH7777 細胞ではクロロキン処理によっても細胞質に留まったままの性質を持つレチナル結合蛋白質 CRALBP とのキメラ蛋白質を作製し、後期エンドソームへの局在化、及びビタミン E 結合能について検討した。

その結果、N 末端から 21 アミノ酸を CRALBP に置き換えたキメラ蛋白質 CT1 では、クロロキン処理による局在化が見られたが、N 末端から 50 アミノ酸を CRALBP に置き換えたキメラ蛋白質 CT6 ではビタミン E 結合能を有するが、クロロキン処理による局在化は見られなかった。(Fig.3)。このことから、 α -TTP の後期エンドソームへの局在化には、 α -TTP の N 末端から 21~50 番目までの極性アミノ酸に富んだ領域が必要であること、それよりも C 末端側の疎水性アミノ酸に富んだ領域がビタミン E との結合に必要なことが明らかになった。

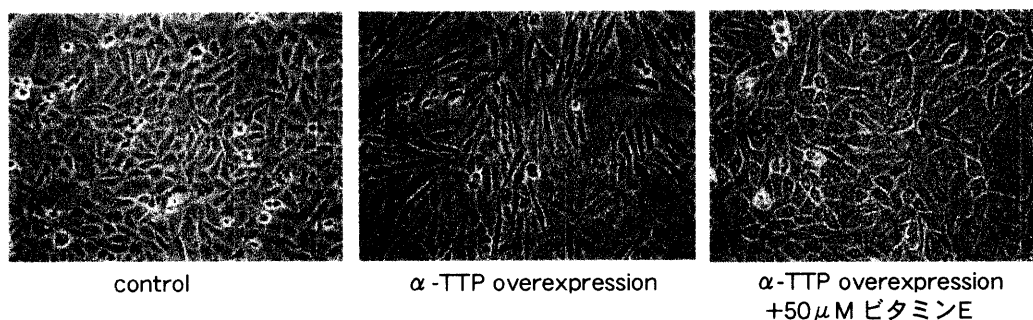
3. クロロキンの *in vivo* 投与による血中ビタミン E レベルの変化

肝細胞レベルでクロロキンが α -TTP を介するビタミン E の放出を阻害することから、クロロキンの *in vivo* における血中ビタミン E レベルへの影響について検討した。クロロキン (300mg/kg) をマウスに経口投与し、6 時間後における血中ビタミン E レベルを測定したところ、正常値に比べて約半分に低下することが明らかになった。

4. 非肝細胞への α -TTP の強制発現とその作用の解析

通常 α -TTP を発現していない肝臓系以外の培養細胞に、一過的に α -TTP を発現させてクロロキン処理しても局在化は全く見られず、 α -TTP の局在化は肝細胞に特徴的な現象であると考えられた。さらに、非肝臓系細胞の CHO 細胞に α -TTP を恒常的に発現する細胞株の樹立を試みたが、そのような細胞は全く単離できなかった。そこで、Tetracyclin-off システムを用いて α -TTP の発現を条件的に誘導できる CHO 細胞株を樹立し、 α -TTP の細胞内作用について解析した。

Fig.4 α -TTP 発現誘導による CHO 細胞の形態変化



その結果、Tetracyclin 除去により CHO 細胞に α -TTP の発現を誘導すると、予期せぬことに細胞の形態が細長く著しく変化することを見出した (Fig.4)。このような形態変化は肝細胞由来の培養細胞においては、 α -TTP の発現レベルによらず全く観察されなかった。さらに、CHO 細胞における α -TTP による形態変化は、リガンドであるビタミン E を培地中に添加することで完全に回復されたが、リガンドでないコレステロールや別の脂溶性抗酸化剤では抑制されなかった。すなわち、単に α -TTP がビタミン E を放出して細胞内の脂溶性抗酸化物質が枯渇したために起こる現象ではないことが示唆された。

【まとめと考察】

α -TTP が細胞質蛋白質にも関わらずビタミン E を細胞外に放出する機能を有することを考えると、肝細胞内において α -TTP が何らかの他の因子 (おそらく蛋白質) と相互作用してい

ることは疑いない。肝臓系培養細胞では α -TTP の局在化が見られるが、非肝臓系の細胞では見られないことから、肝細胞特異的な標的が後期エンドソーム上に存在することが示唆される。 α -TTP が後期エンドソーム膜上に局在化することの生理的意義は現在のところ不明であるが、エンドサイトーシスによって肝細胞内に取り込まれたビタミン E を酸性コンパートメントから α -TTP へと受け渡す過程を一過的に静止させた状態を見ている可能性も考えられる (Fig.1 参照)。本研究により、この過程における α -TTP 分子上のドメインが特定されたことで、後期エンドソーム膜上の標的分子の同定の手がかりになるものと考えられる。また、今回樹立した CHO 細胞への肝臓由来の遺伝子導入等の手法で、エンドソーム膜の α -TTP のターゲット分子を単離できる可能性がある。

非肝臓系細胞では α -TTP の強制発現により形態異常等の毒性を発揮するが、ビタミン E が α -TTP に結合しているところから現象は起こらない。すなわち、ビタミン E が結合していない α -TTP は細胞内の何らかの因子との相互作用して毒性を示していると予想されるが、そのような因子が何であるのか、またなぜ肝細胞ではこのような現象が起こらないのかという点は、今後の興味深い問題である。