

審査の結果の要旨

氏名 堀 口 昌 邦

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ものである。 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、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。本論文では、 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。

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。そこで本論文では、 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ことを明らかにした。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ところ、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 依存的であることを示唆した。

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 と相同性を持つがクロロキン処理による局在

化は起こらないレチナール結合蛋白質 CRALBP とのキメラ蛋白質を作製して解析を行った。その結果、 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が明らかになった。また、この領域はビタミン E との結合には必要でないことから、この領域よりも 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. 非肝細胞内への 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で α -TTP の局在化が起こるかを、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 細胞株を樹立して解析した。その結果、Tetracyclin 除去により CHO 細胞に α -TTP の発現を誘導してクロロキン処理しても α -TTP の局在化は見られず、 α -TTP の局在化は肝細胞に特異的な現象であることが示唆された。更に、予期せぬことに、 α -TTP の発現により細胞の形態が細長く著しく変化することを見出した。このような形態変化は肝細胞系の培養細胞においては、全く観察されなかった。更に、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、リガンドでない脂質や別の脂溶性抗酸化剤では回復されず、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。

以上、本研究では通常は細胞質に存在する α -TTP が、酸性コンパートメントである後期エンドソームの内腔側 pH が中性化すると、後期エンドソーム膜に局在化するという非常に興味深い現象を見出した。この現象は、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。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。今回の知見は、これまでほとんど解明されていない脂質の細胞内輸送を知る手がかりとなると考えられ、博士（薬学）の学位論文として十分な価値があるものと認められる。