

審査の結果の要旨

氏名 平松 達史

α -Tocopherol は脂溶性ビタミンの一つであるビタミン E の別名である。食餌に含まれる α -tocopherol は、小腸から吸収され、キロミクロンによって肝臓へと取り込まれ、さらに肝臓から分泌される VLDL へと受け渡され、最終的に末梢の組織へと運ばれる。 α -tocopherol 輸送蛋白質 (α -TTP) は、 α -tocopherol を特異的に結合する蛋白質として、当教室において、精製・クローニングされた。この蛋白質は、主に肝臓に発現する分子量 30kDa の可溶性の蛋白質であり、体内の α -tocopherol 量を維持する重要な機能を担っている。特に、 α -TTP はヒトの先天性ビタミン E 欠乏症の原因遺伝子であることが判明し、 α -TTP の欠損が、重篤なビタミン E 欠乏症を招くことが明らかになっている。

これまでに α -TTP の生理的機能については比較的良く解析されていたが、実際に肝細胞において、細胞質に存在する α -TTP が、エンドサイトーシスにより取り込まれたキロミクロンから、どのように α -tocopherol を受け取り、さらにそれをどのように VLDL へと受け渡しているかについては、殆ど明らかになっていない。平松は肝細胞内で、 α -TTP がどのような分子メカニズムで α -tocopherol を輸送しているかについて、ヒトの遺伝病で見つかった一アミノ酸変異を利用して解明することを試みた。

正常人では、血中の α -tocopherol 濃度は、約 9 μ g/ml だが、486 番目の T が欠損して α -TTP をほとんど失うような変異を持つ患者の血中 α -tocopherol 濃度は、0.3 μ g/ml 以下と非常に低かった。一方、R59W 点変異の患者は一アミノ酸変異であるにも関わらず、 α -tocopherol 濃度は、同様に非常に低かった。また、日本で発見された H101Q 点変異の場合では、血中濃度はそれよりやや高い値を示した。平松は、R59W および H101Q 点変異が、 α -TTP の機能に関してどのような影響を及ぼすか、さらに解析した。

まず平松は、 α -TTP および変異型のリコンビナント蛋白質を作製して、その生化学的性質を *in vitro* で調べた。R59W および H101Q α -TTP は、wild-type の α -TTP と同様にリコンビナントがとれることが明らかとなり、これらの一アミノ酸変異によっても、蛋白質の安定性が大きくそこなわれているのではないことが示唆された。

次に平松は、wild-type および変異型の α -TTP の α -tocopherol に対する結合能を検討した。方法は、放射標識した α -tocopherol と α -TTP を 37°C でインキュベーションした後、ゲル濾過カラムで分画し、各フラクションの α -TTP および α -tocopherol の放射活性を調べた。その結果、void に溶出される放射活性に加えて、リコンビナント α -TTP が溶出される位置に、放射標識された α -tocopherol が同時に溶出されてきた。次に、H101Q α -TTP で同様の実験を行ったところ、蛋白質は分子量 30kDa の位置に溶出されるにも関わらず、この位置に溶出される α -tocopherol のピークは非常に低くなっており、H101Q α -TTP は、 α -tocopherol との結合能が著しく低下していることが示唆された。一方、R59W α -TTP では、興味深いことに、wild-type とほぼ同様の α -tocopherol のピークが観察され、wild-type と R59W α -TTP では α -tocopherol に対する結合能にほとんど差がないことが明らかになった。

続いて、平松は培養肝細胞レベルで wild-type および変異型の α -TTP の解析を行った。McARH7777 細胞に細胞外から放射標識した α -tocopheryl acetate を加えると、細胞内の非特異的エステラーゼにより細胞内に α -tocopherol が生成する。 α -TTP はこの α -tocopherol を細胞外へ放出する。そこで、McARH7777 細胞に wild-type および変異型の α -TTP を定常的に発現させ、細胞外に放出される α -tocopherol を測定することによって細胞レベルでの α -TTP の機能を評価し

た。親株の McARH7777 細胞でもある程度 α -tocopherol が細胞外へと放出されたが、そこに wild-type の α -TTP を導入することによって α -tocopherol の細胞外への放出が著しく促進された。一方、H101Q および R59W 変異型の α -TTP を導入した場合、蛋白質はほぼ同程度発現しているにも関わらず、放出の促進活性はほとんどみられなかった。

R59W 変異体は α -tocopherol と結合できるにも関わらず、細胞からの α -tocopherol の放出を行えないことが分かった。そこで、平松は R59W 変異体が α -TTP のどのような機能に欠損があるのかさらに追求した。彼は、 α -TTP と PI(3,4)P₂ の beads が結合し、さらにこの結合が α -TTP と PI(3,4)P₂ をプレインキュベーションすることで阻害されることを示した。次に、R59W α -TTP が PI(3,4)P₂ beads に結合できるかどうか、同様に検討し、beads への結合が全くみられないことを明らかにした。

次に平松は、 α -TTP の機能における PI(3,4)P₂ の役割について、さらに解析を行った。In vitro で、 α -TTP による α -tocopherol の膜間の輸送能に対する PI(3,4)P₂ の効果について検討した。Acceptor 側の liposome は PC 及び PE を加えて作製し、donor 側の liposome には、それらの他に lactosylceramide 及び基質となる放射標識された α -tocopherol を加えた。これらに α -TTP を加え、一定時間 incubation した後、RCA-120 を加え、lactosylceramide を含む donor 側の liposome のみを特異的に沈殿させ、上清中の acceptor liposome に移行した α -tocopherol 量を測定した。このアッセイ系を用いて acceptor あるいは donor 側の liposome に PI(3,4)P₂ を加えた場合の、 α -TTP による α -tocopherol の輸送活性に対する影響を調べた。まず、PI(3,4)P₂ を全く加えない場合、R59W α -TTP は wild-type α -TTP より輸送活性はむしろ高かった。次に、donor 側に PI(3,4)P₂ を加えた場合、wild-type の α -TTP でも R59W α -TTP でも変化は見られなかったが、acceptor 側に PI(3,4)P₂ を加えた場合は、wild-type の α -TTP では α -tocopherol の輸送が促進されたのに対して、R59W α -TTP においては、 α -tocopherol の輸送が逆に阻害されることが分かった。そこで、この促進効果に対する他の PIPs の特異性を検討した。七種類ある PIPs、PI および PS について輸送活性に対する影響を調べたところ、PI(3,4)P₂ より PI(4,5)P₂ の方が促進活性が高く、ほかに PI(4)P、PI(3,5)P₂ にも促進活性があることが分かった。

平松の研究によって、R59W 変異型 α -TTP が、肝細胞から α -tocopherol を放出する活性を示さないのは、この変異体が PIPs (ホスファチジルイノシトールリン酸) への結合能が無いことが原因であることが示され、言い換えれば、肝細胞からの α -tocopherol の放出には、 α -TTP と PIPs との相互作用が重要であることが示唆された。

これまでの解析から、 α -TTP による肝細胞からの α -tocopherol の放出は、VLDL の放出を阻害する brefeldin A という試薬では全く阻害されず、ABC トランスポーターの阻害剤である glyburide で有意に阻害されることが明らかになっている。これらのことから、肝細胞において、 α -TTP は、分泌過程にある VLDL に α -tocopherol を受け渡しているのではなく、まず形質膜に α -tocopherol を輸送し、そこで何らかの ABC トランスポーターを介して細胞の外側で α -tocopherol を VLDL へと受け渡していることが示唆されていた。

平松は、肝細胞からの α -TTP による α -tocopherol の放出における PIPs の重要性を明らかにし in vitro での α -tocopherol 輸送促進活性は PI(4,5)P₂ が最も高いことを示した。PIP_s の中で定常状態の細胞においては PI(4,5)P₂ が最も多く、そのほとんどが形質膜に存在している。平松は彼の研究によって、形質膜上に多く存在する PI(4,5)P₂ に R59W を介して α -TTP が結合し、そこで、 α -tocopherol を形質膜に受け渡し、続いて細胞膜上に存在する何らかの ABC transporter によって α -tocopherol を細胞外へと放出する、全く新しいメカニズムを示唆することに成功した。

従って、平松達史は審査の結果、博士(薬学)の学位を授与できると認める。