

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 高橋 美和

多彩な機能を担うコレステロールは、細胞レベルにおいては、生合成、エステル化、低密度リポタンパク質（LDL）を介した細胞内へのコレステロールの流入、高密度リポタンパク質（HDL）及び apo-AI を介した細胞外への流出等によって制御されている。リポタンパク質を介した血漿中におけるコレステロール輸送とその細胞における受容の研究は進んでいるが、細胞内におけるコレステロール輸送経路や輸送制御の機構には不明な点が多い。本研究はコレステロールの細胞内輸送機構の解明を目的として行われたものである。

第一章は分裂期 Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を用いたコレステロールエステル合成が細胞周期によって変動することを見出し、その変動の細胞内小胞輸送との関わりについて論じている。

分裂期の細胞では小胞輸送が停止する。それゆえ、もしコレステロールの輸送が小胞輸送に依存するならば、分裂期の細胞では形質膜から小胞体へ送られてエステル化されるコレステロールの量が減少することが予想された。分裂前期に同調した細胞と分裂間期の細胞に、コレステロールエステルの前駆体となる $[^{14}\text{C}]$ オレイン酸または $[^{14}\text{C}]$ コレステロールを投与して $[^{14}\text{C}]$ コレステロールエステルの合成量を測定したところ、分裂期細胞のコレステロールエステルの単位時間当たりの合成量は間期の細胞と比べて10分の1以下に減少していることを見出した。しかしながら、小胞輸送が再開するG1期の細胞でコレステロールのエステル化を測定したところ、コレステロールエステル合成は回復せず、結果として、コレステロールのエステル化は細胞周期によって変動するが、この変動は小胞輸送の有無によってのみでは説明困難であることを示唆することとなった。

第二章では培養密度に依存したコレステロールの細胞内動態を解析している。

同一の培養由来の同数のCHO細胞を径の異なるペトリ皿に撒いて一定時間培養し、異なる培養密度を設定した。低培養密度（30-40% confluent）の時と高培養密度（100% confluent）の時の細胞のコレステロール、コレステロールエステル量を測定したところ、高培養密度細胞はコレステロールについては約1.8倍、コレステロールエステルについては約2.6倍、低培養密度細胞よりも多かった。続いて、 $[^{14}\text{C}]$ オレイン酸を2時間取り込ませてコレステロールエステル合成を比較したところ、高培養密度細胞のコレステロールエステル合成は低密度培養細胞の約2.8倍であった。さらに、コレステロールに特異的に結合するFilipinによる染色では、高密度培養細胞は強く染色され、低密度培養細胞でも見られたゴルジ体と核近傍の部位に加えて、形質膜も染色されていた。コレステロール特異的に膜に結合して膜に穴を開ける毒素であるStreptolysin Oに対する高密度培養細胞の感受性は、低密度培養細胞に比べて約6倍高く、高密度培養細胞の形質膜のコレステロール量が多いことを示唆した。

蛍光標識脂質をプローブとして用いて、脂質の細胞内分布が培養密度に依存して変化するかを検討した。蛍光コレステロールプローブと蛍光スフィンゴミエリンプローブが、低密度培養細胞

ではリサイクリングエンドソームに分布したのに対して、高密度培養細胞では初期エンドソームに分布していた。また、蛍光スフィンゴミエリンプローブの形質膜へのリサイクリングを測定したところ、低密度培養細胞では高密度培養細胞よりも速度が速かった。さらに、コレステロール含量の制御や細胞内輸送に関わるとされる低分子量 G タンパク質 Rab11 の細胞内分布を蛍光抗体法および GFP-Rab11 によって検討したところ、低密度培養細胞では Rab11 がゴルジ体に局在したのに対して、高密度培養細胞ではリサイクリングエンドソームに局在した。また、短時間の methyl- β -cyclodextrin 処理によって高密度培養細胞の形質膜のコレステロール量を減少させると、上記蛍光脂質プローブと Rab11 は低密度培養細胞の場合のような分布を示した。さらに、GFP-Rab11 の構成的活性型を高密度培養細胞に発現させると、蛍光脂質プローブがリサイクリングエンドソームに分布するようになった。

以上及びその他の結果から、申請者は、Rab11 は形質膜のコレステロール量に応じて局在を変化させ、コレステロールなどの膜脂質成分の細胞内輸送を調節するというモデルを提案した。

これらのことから、本研究で得られた知見は、学術上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。