

## 論文審査の結果の要旨

氏名 西 賢二

本論文は4章からなる。第1章はイントロダクション、第2章は実験方法、第3章は結果、第4章は総合討論と結論である。

細胞内に任意のタンパク質を導入する手法は、遺伝子操作によらず一過的に gain-of-function 変異を作出できるので、生命科学の研究面のみならず、医療面からも重要である。ここ 10 数年の研究により、細胞の中に生体高分子などを導入することができるペプチドやタンパク質ドメインが同定され、それらは CPP や PTD と呼ばれている。最もよく研究されているの CPP は、HIV ウイルスの転写活性化因子由来の TAT であり、10 アミノ酸程度の、塩基性アミノ酸に富んだ配列である。そして、CPP と導入したい物質を共有結合させたり、混ぜることで、細胞内に取り込ませ、機能発現できるようになってきている。

CPP に関する初期の研究では、細胞への取り込みはエンドサイトーシスとは異なる機構でおこると考えられてきた。しかし、その後の研究により、現在ではエンドサイトーシスが関与することが分かってきた。短いペプチド型の CPP だけでなく、長いタンパク質型の PTD も存在する。その中で最もよく使われている PTD は、単純ヘルペスウイルスの VP22 タンパク質由来のものである。VP22 は、テグメントと呼ばれる領域の主要な構造タンパク質である。VP22 の C 末端側半分 (VP22.C1) は、細胞に取り込まれ、融合タンパク質の生理機能を誘発する能力を有すると報告されている。ところが、今日まで、VP22.C1 のような高分子量 PTD の細胞への取り込み機構についての詳細な解析はなされていない。

本論文では、VP22.C1 に GFP を融合したタンパク質 (VP22-GFP) を用いて、その取り込み機構を解析した。まず、142 アミノ酸からなる VP22 領域の様々な欠失変異体や、VP22.C1 の全塩基性アミノ酸を一つずつアラニンやグルタミン酸に置換した変異体をつくり、細胞表面への吸着と細胞内への取り込みを調べた。その結果、VP22.C1 の全領域が細胞への吸着、取り込みに関わっていることが示唆された。

次に、VP22-GFP の取り込みに対するグリコサミノグリカンの役割をコンドロイチナーゼ処理、ヘパリチナーゼ処理及び CHO-K1 のヘパラン硫酸合成変異株を用いて調べた。さらに、抗ヘパラン硫酸抗体との二重染色により、ヘパラン硫酸と VP22-GFP との細胞表面での共局在性を調べた。その結果から、ヘパラン硫酸が、VP22-GFP のレセプターかあるいはコレセプターとして機能していることが示唆された。

エンドサイトーシスにはクラスリン依存的、カベオラ依存的、クラスリン/カベオラに非依存的で脂質ラフトを介するものなど様々な経路ある。そこで、ドミナントネガティブ

型のタンパク質の過剰発現、RNAi、薬剤処理などの方法を用いて、VP22-GFP がいかなるエンドサイトーシス経路によって細胞に取り込まれるのかを解析した。その結果、VP22-GFP はクラスリン／カベオラ非依存的に、ダイナミンに依存して脂質ラフトを介するエンドサイトーシスにより取り込まれることが分かった。この経路ではこれまで Rho family GTPase がその取り込みに関わることが知られている。ところが、VP22-GFP の取り込みは Rho family GTPase の阻害剤である *Clostridium difficile* のトキシシン B によって阻害されなかった。さらに、Rho family GTPase に属する RhoA、Cdc42 に対する RNAi によっても、ドミナントネガティブ型の Rac1 を細胞に発現させても、VP22-GFP の取り込みは阻害されなかった。また、Arf family GTPases の一つである Arf6 に対する RNAi により、VP22-GFP の取り込みが抑えられた。これらの結果から、VP22-GFP は Rho family GTPase 非依存的／Arf6 依存的な新規機構によって細胞に取り込まれることが判明した。

さらに、細胞に取り込まれた後の VP22-GFP の局在を調べた。その結果、取り込み初期においては初期エンドソームのマーカー EEA1 と、後期においてはリソソームマーカー LAMP1 と共局在することが分かった。さらに、VP22-GFP とトランスフェリンを細胞に同時に取り込ませたとき、取り込みの定常状態で両者の共局在が観察され、VP22-GFP の一部はリサイクリングエンドソームにも入っていることが示唆された。

本論文は、タンパク性の PTD による細胞への取り込み機構の詳細を初めて明らかにし、かつそれが全く新規のエンドサイトーシスにより行われることを示したもので、プロテイントランスダクションの分子機構の解明に大きな寄与をしているといえる。

なお、本論文は、西郷 薫との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

従って、博士（理学）の学位を授与できると認める。