

審査の結果の要旨

氏名 小 鮎 弘 幸

生体膜にはリン脂質やコレステロールなど様々な脂質が存在するが、各脂質の存在比は組織、細胞種、あるいは細胞内オルガネラによって異なっており、同一膜上においても脂質組成の異なる微小領域が存在する。コレステロールは膜の物理的性質の調節、生理活性物質の前駆体など様々な生命現象に関与しており、細胞内コレステロールについてもオルガネラにおける偏在性が確認されている。しかしながら、コレステロール偏在性を作り出す分子機構、およびその生物学的意義に関しては、依然不明な点が多い。

OSBP (oxysterol-binding protein) はコレステロールの酸化物であるオキシステロールと結合するタンパク質として精製、クローニングされた97kDaの可溶性タンパク質である。OSBPはN末端側にPHドメイン、C末端側に脂質結合ドメインを有するが、ヒトにはOSBPと相同性を有する分子がさらに11存在し、ORPファミリー(OSBP-related protein family)を形成している。最近、OSBPを含むいくつかのORPファミリー分子がコレステロールと結合することが報告され、結合したコレステロールを各オルガネラへ輸送するコレステロール輸送タンパク質としての可能性が示唆されてきた。

小鮎は、未だ明らかになっていない細胞内コレステロール輸送機構や各オルガネラにおけるコレステロール偏在性の意義を解明するため、線虫*C. elegans*におけるORP相同分子、*obr-1*~*obr-4*に着目し、これらの欠損変異体を樹立してきた。さらに、全ての組み合わせの*obr*多重変異体を作製し、*obr*四重変異体の一部において成長遅延(35%)や胚生致死(11%)の異常が生じることを見出した。本研究において小鮎は、*obr*分子と機能的に連関する遺伝子を探索するため、*obr*変異体の異常を増強させるエンハンサー遺伝子をスクリーニングし、ORP分子が後期エンドソームにおけるMultivesicular body形成において重要な機能をもつことを見出した。

1. *obr*四重変異体のエンハンサー遺伝子の同定

ORPファミリー分子はコレステロールやホスファチジルイノシチドと結合することが報告されているが、その生理機能や関連分子についてはほとんど明らかになっていない。そこでまず、線虫*obr*分子と機能的に連関する遺伝子を同定するため、*obr*四重変異体の胚致死性を増強させるエンハンサー遺伝子を探索した。小鮎の所属する研究室では線虫全遺伝子の約90%をカバーするfeeding RNAiライブラリーを有しており、網羅的な遺伝子発現抑制が可能である。このライブラリーを用い、野生株および*obr*四重変異体に対し、約2400遺伝子をRNAiした結果、*obr*四重変異体においてのみ胚致死率が上昇するエンハンサー遺伝子として28遺伝子を同定した。これらのエンハンサー遺伝子には、転写因子などの核内タンパク質、ユビキチン分解酵素、小胞輸送関連分子などが含まれていたが、中でも後期エンドソームにおける特徴的な膜構造であるMultivesicular body (MVB)の形成に関わる分子が最も多く含まれることが分かった(*vps2*, *vps4*, *vps20*, *vps27*, *vps28*, *vps34*の線虫相同遺伝子)。MVBは後期エンドソーム内腔に多数の小胞を持つ多胞体オルガネラであり、

膜タンパク質をエンドソーム内に取り込み、分解する機能を有している。以上の結果から、線虫 *obr* 分子が MVB 形成の何らかのステップに関与することが予想され、以後、MVB 形成関連遺伝子に着目し解析を行った。

2. コレステロール減少下における MVB 関連遺伝子の発現抑制

obr 四重変異体において MVB 関連遺伝子の発現を抑制すると致死性が著しく上昇することから、MVB 形成の過程にコレステロールが関与する可能性が考えられた。そこで、野生株におけるコレステロール含量を減少させた条件下で、MVB 関連遺伝子の発現を抑制し、MVB に対するコレステロールの影響を調べた。その結果、通常のコレステロール条件下では MVB 遺伝子を抑制しても致死性が見られなかったが、コレステロール減少下では発現抑制による胚致死性が著しく増強し、*vps27* や *vps4* の発現抑制ではほとんどの個体が致死となることが分かった。以上の結果から、*obr* 四重変異体やコレステロールが減少した膜環境下においては、MVB 形成の過程で何らかの異常が生じており、さらに MVB 関連分子の発現を抑制すると、個体レベルでも異常が生じるのではないかと推測した。そこで次に、*obr* 四重変異体における後期エンドソーム/リソソーム系の形態を観察した。

3. *obr* 四重変異体における後期エンドソーム/リソソーム系の形態解析

酵母や動物細胞において、MVB 関連分子の機能を阻害すると、後期エンドソームにおける内腔の小胞形成が抑制され、後期エンドソームやリソソームが膨張することが知られている。そこでまず、後期エンドソームマーカーおよびリソソームマーカーを発現したトランスジェニック線虫に対し、MVB 関連遺伝子を RNAi したところ、いずれの発現抑制においても酵母や動物細胞と同様に後期エンドソームやリソソームが膨張することがわかった。次に、これらのトランスジェニック体と *obr* 四重変異体を交配し、四重変異体における後期エンドソーム/リソソーム系の形態を調べたところ、MVB 関連分子を RNAi した場合と同様に、後期エンドソームやリソソームが膨張していることが明らかになった。一方、初期エンドソームやリサイクリングエンドソームなど他のオルガネラの形態には異常が認められず、また、エンドサイトーシスなど他の膜動態についても異常は見られなかった。

次に、MVB 形成にどの *obr* 分子が関与するかを調べるため、*obr* 四重変異体に *obr-1* から *obr-4* をそれぞれ導入し、リソソームの形態を調べた。その結果、*obr-1*、*obr-3*、*obr-4* の発現ではリソソームの形態はほとんど回復しなかったが、*obr-2* を発現させるとリソソーム膨張の表現型が有意に抑制された。以上の結果から、*obr* 分子自身が MVB 形成に関与しており、この現象には *obr-2* の寄与が大きいことが示唆された。

4. *obr* 四重変異体における膜タンパク質分解の機能解析

MVB 形成に異常をきたすと膜タンパク質の分解が抑制されることが報告されている。*obr* 四重変異体が MVB 形成に関わることが示唆されたので、次に、*obr* 四重変異体において MVB の機能に異常は無いか、膜タンパク質である caveolin の分解を指標に解析を行った。まず、caveolin を発現したトランスジェニック線虫に MVB 関連遺伝子を RNAi したところ、

caveolin の蓄積が観察された。次に、このトランスジェニック体と *obr* 四重変異体を交配したところ、*obr* 四重変異体でも MVB 形成関連遺伝子を RNAi したときと同様に、caveolin の分解が抑制されていることがわかった。以上の結果から、*obr* 四重変異体では、MVB の機能に異常をきたした結果、膜タンパク質の分解が抑制されていることが明らかとなった。

5. 哺乳動物 ORP 分子の機能解析

以上の結果を動物細胞において検証した。小鮒の所属する研究室ではすべてのヒト ORP 分子の細胞内局在を解析しており、*obr-2* の相同分子の 1 つである ORP1 のみが後期エンドソームに局在することを見出していた。そこで、HeLa 細胞において ORP1 の発現を抑制し、細胞内オルガネラを電子顕微鏡で解析した結果、大きく膨張した異常な後期エンドソームが生じること、また、後期エンドソーム内の小胞が有意に減少し、MVB の形成が阻害されていることが明らかになった。以上の結果から、*obr-2* の機能は進化的に保存されており、哺乳動物においても ORP 分子 (ORP1) が MVB 形成に関与することが明らかになった。

以上、本研究において小鮒は、線虫 *obr* 四重変異体を用いたエンハンサー遺伝子のスクリーニングにより、ORP 分子が MVB 形成に関わることを初めて見出した。ORP 分子がどのような機構で MVB 形成に関与するかは現在のところ不明であるが、コレステロールを欠乏した条件下においても同様の現象が認められたことから、一つの可能性として「MVB 形成にはコレステロールを豊富に含む膜環境が必要である」という仮説を想定している。ヒト ORP1 の PH ドメインには後期エンドソームに豊富に存在する PI(3,5)P2 が結合し、また、脂質結合ドメインにはコレステロールが結合することが報告されている。従って、ORP 分子の脂質結合ドメインにコレステロールが結合し、PI(3,5)P2 の存在する後期エンドソーム膜にコレステロールが供給されるというモデルが考えられる。MVB における小胞形成時はエンドソーム膜の内側に陥入するため、クラスリン等のコートマー蛋白は介在しえず、別の曲率形成機構が想定されているが、これまでにそのメカニズムは全く解明されていない。ORP 変異体のエンハンサースクリーニングは、この経路に関わる新規分子を同定するための新しい方法論になるのではないかと考えられる。これらの成果は、博士(薬学)の値するものと評価できる。