

## 審査の結果の要旨

氏名 長谷川 純 矢

Recycling Endosome (RE)は、エンドサイトーシスされた Transferrin Receptor (TfR)などを再び形質膜へ戻す細胞内小器官として認識されてきた。しかしながら近年、細胞外への分泌過程で RE を通過すること、また RE を機能的に欠損させてしまうと分泌が全く起こらなくなること、さらに逆行輸送過程にも RE の重要性を示唆する報告がなされてきており、RE はエンドサイトーシス及びエキソサイトーシス過程の中継地点として機能しているという認識が徐々に高まりつつある。しかし、RE に局在する分子について、RE からの輸送を制御する分子等の知見は殆どないのが現状である。

Evectin-2 (Evt-2)は N 末に PH domain、C 末に疎水性領域を有する機能未知のタンパク質である。Evectin には Evt-1 及び Evt-2 があり、Evt-1 は脳に発現が限局しており、Evt-2 はユビキタスな発現分布を示す。Evt に関して細胞内局在を示した報告があり、post-Golgi 周辺に局在することが示唆されているものの、その詳細な局在や機能解析は全くなされていない。そこで長谷川は、ユビキタスに発現が認められる Evt-2 に注目し、培養細胞での細胞内局在は RE であること、また発現抑制によって、形質膜から Endosome を経由し Golgi へと輸送される Cholera Toxin の RE から Golgi への逆行輸送が強く阻害されること、RE を通過するが形質膜へ戻る Transferrin のリサイクリングには影響が生じないことを見出した。

## 1. HeLa 及び COS-1 細胞における Evt-2 の細胞内局在

Myc-tag を付加した Evt-2 (Myc-Evt-2)を HeLa 細胞に導入し、様々なオルガネラマーカーと共染色したところ、RE マーカーである TfR と *trans*-Golgi network (TGN)マーカーである TGN46 と一部共局在したものの、Evt-2 の局在ははっきりと決められなかった。一方、COS-1 細胞は Golgi が Ring 状 (Golgi Ring) に分布し、その中心に RE が局在するという非常にユニークなオルガネラの局在を示す細胞である。そこで COS-1 細胞を用いて同様な検討を行った結果、TGN46 や他の Golgi マーカー(e.g. GM130)とは局在は一致せず、TfR と高い共局在性を示した。このことから、Evt-2 は RE 及びその近傍に局在することが示唆された。

## 2. COS-1 細胞での Evt-2 発現抑制系

次に Evt-2 の機能を解析する目的で、Evt-2 に対する特異的なモノクローナル抗体の作製、また発現抑制系 (RNAi)の構築を試みた。その結果、抑制効率の高い系の構築ができた。その条件下でまず、各種オルガネラマーカーの変動を観察したところ、形質膜 / Endosome / TGN 間をサイクルしている TGN46 の局在に異常が生じたが、GM130 などの Golgi マーカー等には大きな影響はなかった。

### 3. COS-1 細胞での Evt-2 RNAi における Cholera Toxin の逆行輸送

Evt-2 RNAi によって TGN46 に影響が出たことから、形質膜と Endosome 間、もしくは Endosome と TGN 間の輸送に異常が生じていることが予想された。そこで、形質膜からエンドサイトーシスされ Endosome を経由し、TGN まで輸送される Cholera Toxin B subunit (CTxB) を指標にして、Evt-2 RNAi でその輸送過程に影響が出るか検討した。CTxB の輸送はこれまで HeLa を用いて検討することが多かったため、そのオルガネラ局在の特性上、RE を通過するかどうか疑問が残っていた。しかし、COS-1 細胞を用いることによって、CTxB が Golgi Ring の中心、つまり RE を通ることを見出している。まず、Control RNAi において検討したところ、37°C で 60min incubate すると CTxB は GM130 と共局在、すなわち Golgi に到達していた。しかしながら、Evt-2 RNAi においては、CTxB は RE にとどまっていた。さらに incubate (90min) しても Golgi への移行は観察できなかった。また、他の細胞株でも同様なことが起こるか検討するため、HeLa 細胞において CTxB の輸送を観察したところ、Evt-2 RNAi で Golgi への移行は遅れていた。このことから、Evt-2 は RE からの出芽もしくは TGN への fusion 過程に重要な役割を担っていることが示唆された。

### 4. COS-1 細胞での Evt-2 RNAi における Transferrin のリサイクリング

次に他の輸送過程に影響はないか、エンドサイトーシス後 Early Endosome (EE) 及び RE を通過し、形質膜に戻ることが知られている Transferrin (Tf) の輸送について検討した。<sup>125</sup>I-Tf を用いた定量的な解析を行った結果、Control、Evt-2 RNAi において、リサイクリングされる kinetics に大きな違いは認められなかった。これらのことから、Evt-2 は Tf のリサイクリング過程には関与していないことが示された。以上のことから、Evt-2 は RE に局在し、RE から形質膜ではなく、RE から Golgi への小胞輸送を制御していることが強く示唆された。

### 5. Evt-2 の関与するメカニズムの解析

CTxB の逆行輸送に関与する分子として、SNARE が良く知られている。そこで、Evt-2 と SNARE が interaction するかどうか免疫沈降実験を行った。その結果、Golgi に局在することが知られている target (t)-SNARE である Syntaxin6 と相互作用することが示された。また、Syntaxin6 RNAi で CTxB の輸送がどうなるか検討したところ、完全ではないが CTxB の輸送が RE で阻害された。

以上、本研究において、Evt-2 が RE に局在すること、また CTxB の逆行輸送に極めて重要な分子であることを見出した。また、Tf のリサイクリングには影響がないことも示しているため、Evt-2 は RE を通過する全ての cargo 分子の sorting に関与しているのではなく、おそらく Golgi へと移行する分子特異的に作用するものと思われる。さらに、Evt-2 は SNARE の一つである Syntaxin6 と相互作用し、CTxB の輸送を制御していることが示唆された。しかし、Syntaxin6 RNAi では CTxB の輸送が部分的にしか阻害されていなかった。これは、Endosome から TGN への逆行輸送に他の補償経路が働いているため

かと思われる。REが注目されてきたのはここ数年で、これまでGolgiに局在すると考えられていた分子が実はREに局在しているという報告も多々出てきている。これまでの小胞輸送研究は、そのほとんどがHeLa細胞を用いて行われてきた。今後COS-1細胞を用いることによって、REに局在する分子の発見やこれまで曖昧だった輸送過程を明確にできるものと思われる。これらの成果は、博士(薬学)の値するものと評価できる。