

論文の内容の要旨

論文題目

薬物トランスポーターP糖タンパク質の 細胞内局在制御因子の探索

氏名 小藤 智史

極性上皮細胞は、隣り合った細胞との間にあるタイトジャンクションを境に、管腔側に面したアピカルドメイン、基底膜に接したバソラテラルドメインといった構造的、機能的に異なる二つの膜領域を有する。これらの膜領域に存在する膜タンパク質は、生合成された後に ER、ゴルジ体にて様々な修飾を受け、トランスゴルジネットワークを介して特定膜領域へと選別輸送される。さらに、膜への輸送後もエンドサイトーシスやリサイクリングなど様々な膜輸送システムによりその局在化が制御されている(図 1)。このような特定膜領域への局在化機構は上皮細胞の極性形成及びその維持だけでなく、イオンや栄養物の取り込み、排泄、

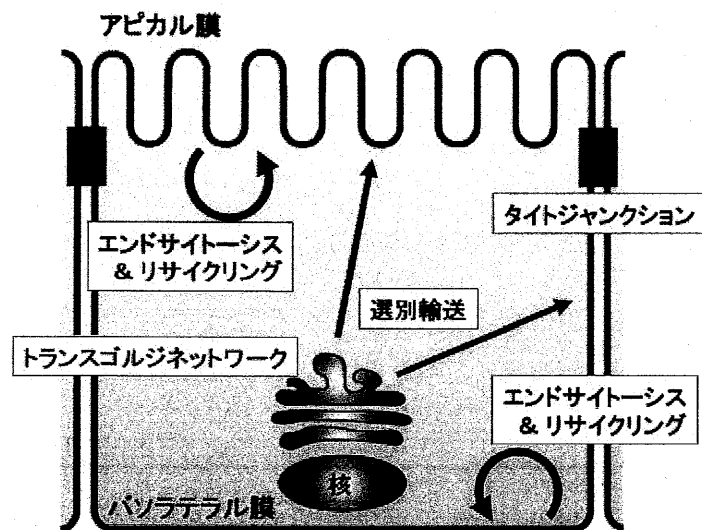


図1 極性上皮細胞における輸送

送システムによりその局在化が制御されている(図 1)。このような特定膜領域への局在化機構は上皮細胞の極性形成及びその維持だけでなく、イオンや栄養物の取り込み、排泄、

細胞間のシグナル伝達など各々の膜領域における機能の維持にも重要な役割を果たしている。

薬物トランスポーターである P 糖タンパク質は、小腸や腎臓などの極性上皮細胞のアピカル膜に局在し、薬物などの生体異物の排泄を行う膜タンパク質である。現在までに P 糖タンパク質の基質特異性に関しては数多くの研究がなされてきた。一方、P 糖タンパク質が正常な機能を果たすためにはアピカル膜への局在化が必須であるが、その膜への局在化に関する分子機構については不明な点が多い。そこで、私は P 糖タンパク質の細胞内局在がどのようにして制御されているのかの解明を目指して、その局在を制御する因子の探索を行った。

1. 線虫 *C. elegans* を用いた P 糖タンパク質の細胞内局在制御因子群のスクリーニング

P 糖タンパク質の細胞内局在制御因子を探索するにあたり、モデル生物である線虫 *C. elegans* を用いた。線虫における P 糖タンパク質 (PGP-1) は哺乳動物と同様に小腸上皮細胞のアピカル膜に局在し、生体異物の排出を通じて生体防御に寄与しているのではないかと考えられている。

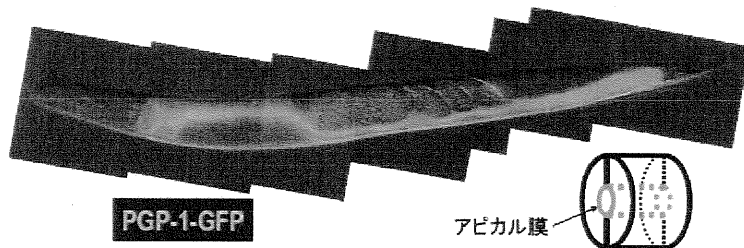
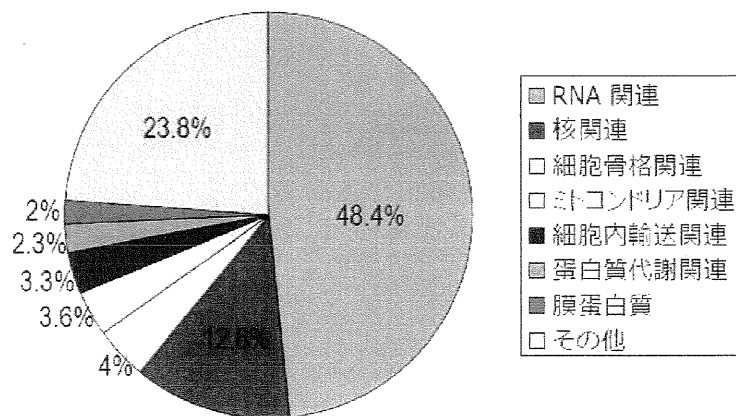


図2 線虫 PGP-1-GFP は腸上皮細胞のアピカル膜に局在する

実際、PGP-1 の C 末端に GFP タグを付加した PGP-1-GFP を発現するトランスジェニック線虫を作製したところ、確かに PGP-1-GFP は腸のアピカル膜に特異的に局在する事が確認された(図 2)。よって、線虫においても哺乳動物と同様に PGP-1 をアピカル膜に局在化させる分子機構が存在すると考えられる。また、線虫は体が透明であるため、生きた個体のまま実体顕微鏡下で蛍光タンパク質の局在などが容易に観察でき、順遺伝学のみならず逆遺伝学も用いることができるため、遺伝学的手法を用いた P 糖タンパク質の細胞内局在制御因子群のスクリーニングには非常に適したモデル生物であると考えられる。

これまでの報告から、極性形成や輸送において重要な役割を担う因子の機能を欠損した線虫は致死性を示す事が知られている。そこで、遺伝子発現抑制により致死性を示す因子(1170 個)に焦点を当て、PGP-1 の細胞内局在に影響を与える因子のスクリーニングを行った。PGP-1-GFP を発現するトランスジェニック線虫に対して、feeding RNAi

表1 スクリーニングにより取得された因子の分類



法を用いて遺伝子発現抑制を行い、PGP-1-GFP の腸細胞内での局在を蛍光実体顕微鏡下で観察した。その結果、PGP-1-GFP の局在に影響を与える計 302 個の候補クローンを同定した(表 1)。これらの因子を発現抑制すると、腸管のアピカル膜に選択的に局在していた PGP-1-GFP が細胞質内にも散在するなどの様子が観察された。本スクリーニン

グでは、RNA 関連因子が多数取得されているが、これは転写、翻訳といった機能が欠損したことによる二次的な影響がみられたためであると考えられた。そこで以降の解析には、細胞内小胞輸送に関すると考えられる因子群に焦点を当てて解析を行った。

2. ダイニン/ダイナクチン複合体は PGP-1-GFP のアピカル膜への局在化に必要なである

今回のスクリーニングで得られた候補因子群の中には微小管に沿って小胞を輸送するモータータンパク質であるダイニン/ダイナクチン複合体の構成因子が複数存在した(図 3)。これらの因子の発現抑制の際には、極性形成に必要なアピカルジャンクション(タイトジャンクション)及びバソラテラル膜に局在する蛋白

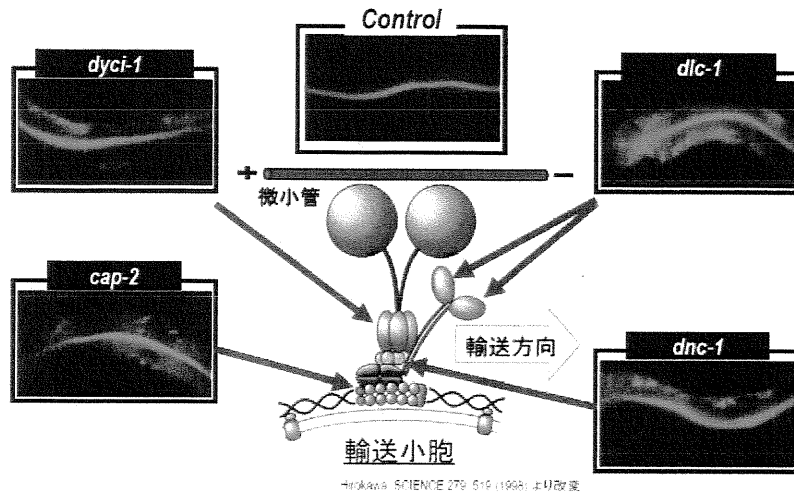


図3 ダイニン/ダイナクチン複合体の機能抑制は PGP-1-GFP の局在に異常をきたす

質の局在には変化は見られなかったことから、細胞の極性形成自体は維持されていると考えられた。極性細胞においては、非極性細胞と異なり、微小管のプラス端からマイナス端への極性がバソラテラル側からアピカル側へと向いている。ダイニン/ダイナクチン複合体は微小管のプラス端からマイナス端へと小胞を輸送することから、PGP-1 のアピカル膜への局在化は、ダイニン/ダイナクチン複合体を介した微小管依存的な小胞輸送系が重要な役割を果たしていると考えられた。

3. ヒト SNAP29 ホモログ PHI-28 は PGP-1-GFP のアピカル膜への局在化に必要なである

私は、候補因子群の一つである PHI-28 の機能を抑制した際に、PGP-1-GFP が細胞内に異常に蓄積するという特徴的な表現型を示す事を見出した(図 4)。PHI-28 は膜融合の際に重要な役割を果たす SNARE であり、ヒトにおけるホモログは SNAP29 である。近

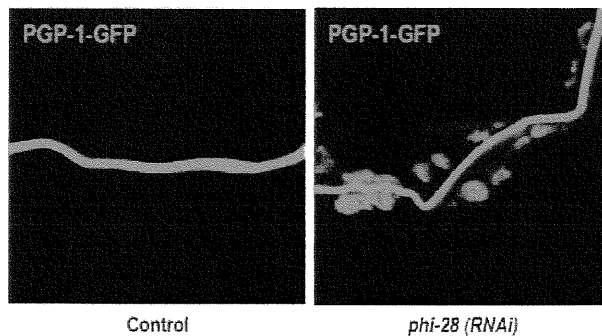


図4 PHI-28 の機能抑制により PGP-1-GFP は細胞内に著しく蓄積する

年、神経症状と角化異常症を示す CEDNIK 症候群の原因遺伝子として SNAP29 が同定されており、SNAP29 の発現が低下した患者の皮膚では分泌小胞の細胞内蓄積が見られることが報告されているものの、SNAP29 がどのような細胞内小胞輸送系を制御するかに関しては未解明である。そこで SNAP29 の機能解析を通じて PGP-1 のアピカル膜への局在化機構を明らかにできるのではないかと考え、以下の検討を行った。

4. ヒト培養細胞において SNAP29 は Rab8 と相互作用する

線虫において PHI-28 の機能を抑制した際に観察された、PGP-1 の局在異常の表現型が種を超えて保存されているかを検討する目的で、ヒト培養細胞系を用いて、以下の実験を行った。まず、HeLa 細胞において PHI-28 のヒトホモログである SNAP29 の局在を検討したところ、トランスゴルジ網を含むいくつかの膜オルガネラのマーカートンパク質と SNAP29 は共局在したことから、SNAP29 は細胞内の様々なオルガネラ膜間輸送に関与することが示唆された。

一般に細胞内輸送においては低分子量 G タンパク質である Rab ファミリーが重要な役割を担っている。

私は、SNAP29 が Rab ファミリーと協調して機能している可能性を考え、SNAP29 と各種 Rab との共局在性及び相互作用の有無を検討した。その結果、細胞内で SNAP29 と Rab8 が共局在し、

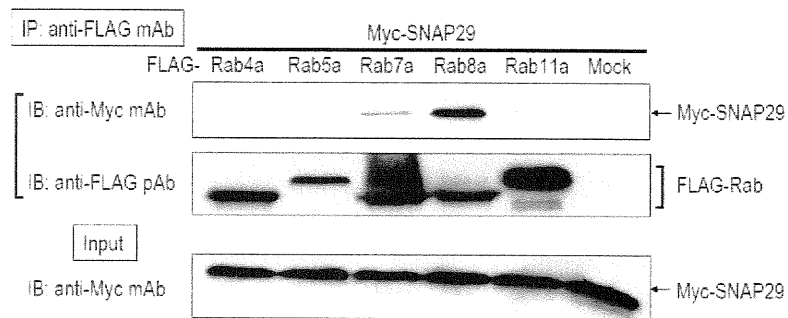


図5 SNAP29 は Rab8 と相互作用する

他の Rab と比較して強く相互作用することを見出した(図 5)。近年 Rab8 はアピカル膜への輸送過程に関与することが示されており、以上の結果を考え合わせると SNAP29 が Rab8 との相互作用を介して PGP-1 のアピカル膜への局在化制御に関与する可能性が考えられた。

[考察]

これまでの細胞内選別輸送の研究においては、培養細胞を用いた生化学的・分子生物学的手法により、膜タンパク質の細胞膜移行に必要なドメインの絞り込みや結合タンパク質の同定といった解析が主として用いられている。しかし、選別輸送が多段階からなる複雑なステップで制御されていることを考えると、このような実験系に加えて選別輸送を体系的に解析するアプローチが必要である。本研究では、線虫を用いて P 糖タンパク質の細胞内局在を制御する因子群の遺伝学的スクリーニングを行い、ダイニン/ダイナクチン複合体などのモータータンパク質を含む多数の候補因子群を同定した。その中でも、ヒト SNAP29 のホモログである PHI-28 の機能抑制は独特な PGP-1 局在異常の表現型を示し、さらにヒト培養細胞を用いた実験系により、SNAP29 と Rab8 が相互作用することを見出した。近年 Rab8 欠損マウスにおいて、腸細胞でアピカル膜タンパク質が細胞内に蓄積し、その局在異常を引き起こすことが示された。これは、線虫において PHI-28 の機能を抑制した際に観察された PGP-1-GFP の局在異常と類似している。よって、腸細胞において PHI-28/SNAP29 と Rab8 の相互作用により、PGP-1 のアピカル膜への局在化が制御されている可能性が考えられる。PGP-1 のアピカル膜局在化は、ゴルジ体からの輸送過程だけでなく、アピカル膜から陥入された後のリサイクリング過程も重要な役割を果たしている。今後、PHI-28/SNAP29 と Rab8 がどのような輸送段階を制御しているかを明らかにすることにより、PGP-1 のアピカル膜局在化の分子機構が明らかになることが期待される。