

## 審査の結果の要旨

氏名 小藤 智史

薬物トランスポーターは小腸、肝臓、腎臓などに発現し、薬物動態に大きな影響を与える細胞膜貫通型のタンパク質である。種々の薬物トランスポーターは、これら臓器の上皮細胞において特定の膜領域、管腔（アピカル）膜側及び基底（バソラテラル）膜側に局在化して、それぞれの役割を果たしている。これまでに薬物トランスポーターの基質特異性や輸送機構などについての研究は精力的に行われてきたが、膜局在化の分子機構については不明な点が多く残されている。「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」と題した本論文においては、線虫 *C. elegans* を用いて最もよく知られた薬物トランスポーターであるP糖タンパク質の細胞内局在を制御する因子群を探索し、その局在化機構の解析を行っている。

### 1. 線虫を用いたP糖タンパク質 (PGP-1) のアピカル膜局在化に関する因子群の RNAi スクリーニング

初めに、線虫のP糖タンパク質 (PGP-1) に GFP タグを付加した融合タンパク質を発現するトランスジェニック線虫を作出した。その結果、PGP-1 は線虫腸細胞のアピカル膜に局在化することを観察した。そこで、このトランスジェニック線虫を用いて PGP-1 の細胞内局在に異常を示す変異体をスクリーニングすることで、PGP-1 のアピカル膜局在化制御に関する因子群を解析できると考えた。線虫は RNAi 法によって遺伝子発現を容易に抑制し得るという利点があるので、生存に必須な遺伝子群、chromosome I 及び chromosome II に含まれる遺伝子群の総計 6,100 遺伝子（全遺伝子の約 30%に相当）に対してスクリーニングを進めた。その結果、PGP-1 のアピカル膜局在化制御に関する候補因子として 425 遺伝子を取得した。

### 2. PGP-1 のアピカル膜局在化にはダイニン/ダイナクチン複合体を介した微小管依存的な輸送系が介在する

スクリーニングにより取得された候補因子群の中には、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多く含まれていた。ダイニン/ダイナクチン複合体は多数の分子から構成される巨大な複合体であり、微小管のプラス端からマイナス端へ向けて小胞を輸送する機能を有している。何れの構成因子を発現抑制しても、PGP-1 が細胞内に散在化するという共通の表現型を認めた。この局在化異常の原因が、PGP-1 の輸送に特異的なものか、あるいは細胞の極性の崩壊、さらには細胞内輸送全般の破綻にあるのかについて検討を行った。その結果、細胞の極性形成に必要なアピカルジャンクションの形成に異常は見られず、極性形成も正常に行われていると考えられた。さらに、バソラテラル膜側に存在するタンパク質の局在への影響を検討した結果、その局在

にも異常は認められず、細胞内輸送全般の破綻が原因ではないことが明らかとなった。以上のことから、PGP-1 のアピカル膜局在化にはダイニン/ダイナクチン複合体を介した微小管に依存する輸送系が介在することが見出された。

### 3. SNARE タンパク質 PHI-28 は PGP-1 のアピカル膜局在化に必要である

さらに詳細な局在化機構を解析する目的から、他の候補因子の発現抑制では認められない表現型を示した PHI-28 という因子に着目した。スクリーニングで最も高頻度に見出された表現型は PGP-1 が細胞内に広く散在化するというものであったが、PHI-28 の発現抑制時にはアピカル膜近傍の細胞内に大きな固まりとして PGP-1 が蓄積する様子が再現よく観察された。PHI-28 はヒト SNAP29 の線虫ホモログであり、膜融合の際に重要な役割を担う SNARE タンパク質であると考えられている。PHI-28 の発現抑制効果についてさらに検討を行った結果、バソラテラル膜側のタンパク質局在には異常が認められず、細胞内輸送全般の破綻ではないことが見出された。

PHI-28/SNAP29 が関与する細胞内輸送について詳細に検討するため、培養細胞を用いてさらに検討を進め、SNAP29 が HeLa 細胞においてトランスゴルジ網、初期エンドソームなどの複数の膜オルガネラに存在することを見出した。一般に細胞内膜間の輸送において、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。そこで SNAP29 が各種 Rab と協調して機能するのではないかと考え、両者の細胞内局在を検討した。その結果、SNAP29 がゴルジ体に局在する Rab8 と強く共局在し、また両者が相互作用することが見出された。近年、Rab8 の欠損したマウス小腸細胞において、アピカル膜タンパク質が細胞内に大きな固まりとして蓄積する様子が観察され、Rab8 がアピカル膜輸送を制御することが報告された。線虫において PHI-28 を発現抑制した際にも類似の表現型が観察され、SNAP29 が Rab8 と共局在したことから、SNAP29 が Rab8 との相互作用を介して P 糖タンパク質のアピカル膜への局在化を制御する可能性が示された。

本論文では、線虫 *C. elegans* 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系を構築し、RNAi 法を用いて 425 の候補遺伝子を同定した。さらに、同定した因子群の解析を進め、P 糖タンパク質のアピカル膜局在化にはダイニン/ダイナクチン複合体を介した微小管依存的な輸送系が必要であることを見出し、さらに、細胞内の様々な膜オルガネラに存在する SNARE タンパク質 SNAP29 が、Rab8 との相互作用を介して P 糖タンパク質のアピカル膜への局在化を制御する可能性を提示した。以上を要するに、本論文は、これまで不明な点が多かった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の一端を明らかにしており、博士（薬学）の学位として十分な価値があるものと認められる。