

審査の結果の要旨

氏名 菊香 順史

リソソームは多種の加水分解酵素を有し、細胞内における多くの蛋白質分解において重要な役割を担うオルガネラである。これまでの研究から、リソソームは直接、後期エンドソーム・ファゴソーム・オートファゴソームなどの分解基質を含む膜オルガネラと融合し、これらの融合によって形成された“ハイブリッドオルガネラ”において基質の分解が進行すると考えられている。したがって、リソソームによる適切な蛋白質分解のためには、リソソームと標的オルガネラとの融合が時空間的に厳密に制御されていることが必要であるが、その制御機構に関しては未だ明らかにされていない。「エンドサイトーシス後期過程に介在する低分子量 G 蛋白質 Arl8 の機能解析」と題した本論文においては、エンドサイトーシスされた EGF (Epidermal growth factor) の分解過程における低分子量 G 蛋白質 Arl8 の機能的役割の解析を行うことにより、Arl8 が未成熟な後期エンドソームとリソソームの融合に抑制的に機能し、適切な蛋白質分解に重要な役割を果たすことを見出している。

1. Arl8 の発現抑制によりエンドサイトーシス初期における EGF の分解が亢進する

EGF の分解過程における Arl8 の関与を検討するために、siRNA により Arl8 を発現抑制した HeLa 細胞における ^{125}I -EGF の分解量を経時的に測定した。その結果、Arl8 の発現抑制により、約 60 分までの EGF の分解量が有意に増加することを見出した。さらに共焦点顕微鏡により蛍光標識した EGF の輸送過程を観察した結果、Arl8 発現抑制細胞では、取り込み後 30 分において後期エンドソーム/リソソームマーカーである Lamp1 と共局在する EGF の割合が増加していた。以上より、Arl8 を発現抑制した細胞では、取り込まれた EGF が速やかに後期エンドソーム/リソソームに移行することにより分解が亢進していることが示唆された。

2. Arl8 は後期エンドソームとリソソームの融合制御に関与する

Arl8 の発現抑制により生じる EGF の分解の亢進が、後期エンドソームとリソソームの融合を介したものであるかを検討した。後期エンドソームとリソソームの融合過程は、まず低分子量 G 蛋白質 Rab7 による両者の近接化及びドッキングにより開始し、その後、SNARE 分子の働きにより膜融合が進行すると考えられ

ている。まず、この融合に関与することが報告されている SNARE 分子の一つである syntaxin7 の寄与を検討した。その結果、Arl8 発現抑制時におけるエンドサイトーシス初期段階（取り込み後約 30 分）の EGF の分解亢進は syntaxin7 の発現抑制により有意に減弱した。よって、Arl8 の発現抑制による EGF の分解亢進は後期エンドソームとリソソームの融合を介していることが示唆された。次に Rab7 の寄与に関しても同様の検討を行ったところ、興味深いことに Arl8 発現抑制時におけるエンドサイトーシス初期段階の EGF の分解亢進は、Rab7 の発現抑制により減弱しなかった。一方、通常 EGF の分解が進行するエンドサイトーシス後期段階（取り込み後 120 分）においては、Rab7 の発現抑制により EGF の分解は減弱した。以上の結果より、Arl8 の発現抑制は、エンドサイトーシス初期段階における後期エンドソームとリソソームの融合を引き起こし、その融合は既存の Rab7 依存的な様式とは異なることが示唆された。

3. Arl8 の発現抑制により後期エンドオルガネラ/リソソームの形態異常が引き起こされる

次に Arl8 の機能抑制時における、リソソーム/後期エンドソームの形態を観察した。まず、共焦点顕微鏡により Lamp1 陽性小胞を観察したところ、対照の正常細胞において細胞質に均一に分散して存在する Lamp1 陽性小胞が、Arl8 発現抑制細胞においては核近傍に集積する様子が観察された。そこで、この核近傍に集積した Lamp1 陽性小胞がどのような形態のオルガネラであるかを電子顕微鏡により検討した。その結果、Arl8 発現抑制細胞において、コントロール細胞には見られない電子密度の高い異常なオルガネラが核近傍に多数存在しており、これらが核近傍に集積した Lamp1 陽性小胞であると考えられた。さらに、Percoll を用いた密度勾配遠心法による細胞内オルガネラの分画を行ったところ、Arl8 発現抑制細胞において、初期/後期エンドソームとリソソームの中間程度の密度を有するオルガネラ画分に回収される Lamp1 やリソソーム酵素カテプシン D 量が顕著に増加していることが明らかとなった。

本論文から、Arl8 が後期エンドソームとリソソームの融合を抑制している可能性が示唆された共に、Arl8 が正常なリソソーム形成に必須な分子であることが明らかとなった。以上を要するに、本論文は、エンドサイトーシス後期過程の膜輸送機構について、新たに重要な知見を提示しており、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。