

審査の結果の要旨

氏名 山田治彦

本研究はコリン作動性神経において重要な役割を担っている高親和性コリントランスポーター(CHT1)の活性制御機構を明らかにするため、ユビキチンリガーゼ Nedd4-2 に着目して CHT1 の活性と細胞表面への発現の影響を解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. FLAG タグを付加した CHT1 と Myc タグを付加した Nedd4-2 を HEK293 細胞に一過性に共発現させ、細胞を可溶化し共免疫沈降を行ったところ、両者が相互作用していることが示された。
2. Nedd4-2 と CHT1 を HEK293 細胞に一過性に共発現させ、 ^3H で標識したヘミコリニウム-3(^3H HC-3)の結合活性を調べた。HC-3 は細胞膜不透過性の CHT1 特異的阻害剤で、 ^3H HC-3 の結合実験により細胞表面の CHT1 発現量を定量できる。CHT1 に Nedd4-2 を共発現させると、共発現させないときに比べ ^3H HC-3 の最大結合量(B_{max})は約 50%減少したが、 K_d は殆ど変化がなかった。さらに、Nedd4-2 を共発現させると、共発現させないときに比べ ^3H コリン取り込みの最大速度(V_{max})は約 50%減少したが、 K_m は殆ど変化がなかった。これらの結果から、CHT1 に対する HC-3 とコリンの親和性は Nedd4-2 の共発現で影響されず、Nedd4-2 の共発現は細胞表面の機能的な CHT1 発現量を減少させることが示された。
3. CHT1 を安定的に発現する HEK293 細胞に、Nedd4-2 siRNA 発現ベクターをトランスフェクトしたところ、Nedd4-2 タンパク質の発現は減少し、 ^3H HC-3 結合活性、 ^3H コリン取り込み活性とも約 20%増加することが示された。内在性の Nedd4-2 は細胞表面の機能的な CHT1 発現量を負に制御していることが示された。
4. Nedd4-2 による CHT1 のユビキチン化が細胞表面で起きているかどうか検討するため、細胞膜不透過性のアミン反応性ビオチン化試薬を用いて細胞表面のタンパク質をビオチン化して分離・回収し、抗 CHT1 抗体でウエスタンブロッティングを行った。CHT1 のみを発現させたときには主に単一の分子種 (約 60 kDa) が検出されたが、Nedd4-2 の共発現によりこの分子種の量は減少し、高分子量側 (> 250 kDa) の分子種の量が増加した。CHT1 を免疫沈降すると、> 250 kDa のバンドは抗ユビキチン抗体で検出されたことから、細胞表面の CHT1 はユビキチン化されることが

示された。

5. 膜タンパク質の細胞内リジン残基はユビキチン化のターゲットとして知られている。CHT1 の活性制御に関わる細胞内リジン残基を明らかにするため、複数の細胞内リジンをアルギニンに置換した変異体系列を作製し HEK293 細胞に一過性に発現させたところ、リジン残基の置換数が増大するにつれ³H]HC-3 結合活性も³H]コリン取り込み活性も増加した。これらの活性上昇の原因が置換されたリジン残基のユビキチン化を阻害したことである可能性が示された。

以上、本論文は CHT1 の活性制御において、ユビキチンリガーゼ Nedd4-2 が細胞表面の機能的な CHT1 発現量を制御することを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、ユビキチン化による CHT1 の活性制御の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。