

審査の結果の要旨

氏名 内田 安則

ホスファチジルセリン (PS) は生物界に広く保存された酸性リン脂質であり、アポトーシス時に細胞外部に露出し“eat-me”シグナルとして機能すること、また形質膜でプロテインキナーゼ C などのシグナル伝達分子の活性化に寄与することが知られている。PS は細胞内オルガネラにも存在するが、細胞内における PS の機能はこれまで知られていなかった。

リサイクリングエンドソーム (REs) は形質膜から取り込まれた受容体などが再び形質膜へ戻る (リサイクルする) 際に必要なオルガネラであり、当研究室での解析から、形質膜からエンドソーム、ゴルジ体へ輸送される逆行性膜輸送経路にも必須であることが示されている。また、脂質結合ドメインとして知られる Pleckstrin Homology (PH) ドメインを持つ *evectin-2* (*evt-2*) タンパク質が PH ドメインを介して REs に局在し、REs からゴルジ体への逆行性輸送に必要であることも分かっている。

内田は修士課程において、*evt-2* の PH ドメインが PS と特異的に結合することを見出した。さらに、細胞内の PS を可視化するプローブを用いて、REs が PS に富んだオルガネラであることを明らかにした。そこで博士課程においては、X 線結晶構造解析から *evt-2* による PS 認識機構を解明するとともに、PS との結合が *evt-2* の局在、機能に必要であることを示した。また、PS の逆行性輸送への関与をより直接的に検討するため、PS 合成酵素を欠損した変異細胞を用い、PS 減少下での表現型解析を行った。

まず、内田は共同研究者とともに *evt-2* の PH ドメインと PS の極性頭部であるリン酸化セリンを混合して共結晶化を試み、分解能 1.0 Å の共結晶構造を得ることに成功した。*evt-2* の PH ドメインは PH ドメインの典型的な構造である 7 本の β ストランドと、C 末端の α ヘリックスから構成されていた。リン酸化セリンは β ストランドの間のループに結合しており、*evt-2* の塩基性アミノ酸 (R11、R18、K20) と塩橋を形成していた。R11 はカルボキシル基、R18 はリン酸基、K20 はその両方と相互作用しており、これらのアミノ酸が PS の認識に必要であることが示唆された。

そこで、R11、R18、K20 をグルタミン酸に置換した R11E、R18E、K20E 変異体 (PH ドメインのみのコンストラクト) を作成し、REs の観察に適した COS-1 細胞に発現させ、局在を観察した。野生型の PH ドメインは、COS-1 細胞で REs が存在するゴルジ体マーカーの内部に局在するが、R11E、R18E、K20E 変異体は細胞全体に分散した。また、K20E 変異体は、*in vitro* で PS への結合能を失った。この結果から、これらのアミノ酸が REs への局在に必要であり、細胞内で PS を認識していることが支持された。この結果を受け、全長の *evt-2* に K20E の変異を導入し、PS 結合能を持たない変異体を作成した。K20E 変異体 (全長) を COS-1 細胞に発現させると、野生型で見られる REs への局在性を失い、細胞質中に分散して局在した。この結果から、PS との結合能が全長の *evt-2* の RE 局在に必要であることが分かった。

次に *evt-2* の機能に PS との結合が必要か検討した。*evt-2* の siRNA による発現抑制下では、逆行性

輸送でゴルジ体に運ばれる TGN46 タンパク質が、ゴルジ体からドット状に分散する。evt-2 の発現抑制下で、siRNA 耐性の mouse evt-2 を発現させ、表現型がレスキューするか検討したところ、野生型の evt-2 を発現させた場合は TGN46 のゴルジ体局在が回復した。一方で PS に結合できない K20E 変異体を発現させた場合は、回復が見られなかった。このことから、PS との結合が、evt-2 の機能 (TGN46 の逆行性輸送) に必須であることが分かった。

さらに、PS の逆行性輸送への関与をより直接的に示すために、PS 量が減少した条件で逆行性輸送が阻害されるか検討した。PS は哺乳動物細胞において、ホスファチジルコリン (PC)、及びホスファチジルエタノールアミン (PE) から合成され、CHO-K1 細胞を親株として PC から PS を合成する酵素が欠損した変異株 (PSA-3) が単離されている。この細胞では PE から PS を合成することができるため、培地中に PE の前駆体であるエタノールアミン (Eth) が十分に存在する場合は PS を合成することができるが、培地から Eth を除くと PS 量が減少する。

この PSA-3 細胞を用いて、TGN38 (TGN46 のげっ歯類相同分子で、逆行性輸送により形質膜からゴルジ体へ運ばれる) の局在を観察した。Eth が豊富に存在する場合は、TGN38 はゴルジ体に局在し、ゴルジ体マーカーと共局在する。しかし、Eth を除いて PS を減少させた条件では、TGN38 は細胞質中に分散した。さらに、この条件下で培地中に PS を添加すると、TGN38 のゴルジ体局在は回復した。この結果から、TGN38 のゴルジ体局在には PS が必要であり、PS 減少下では TGN38 のゴルジ体への輸送が阻害されていることが示唆された。

本研究において内田は、evt-2 の PH ドメインによる PS の認識機構をリン酸化セリンとの共結晶構造解析により明らかにした。PH ドメインのリガンドとしては PIPs (ホスファチジルイノシトールポリリン酸) が良く知られており、evt-2 の PH ドメインは PS を特異的に認識する初めての PH ドメインである。リン酸化セリンを認識するアミノ酸残基のうち、R11 は evt-2 に特徴的であり、PIP_s を認識する PH ドメインには保存されていないアミノ酸であった。R11 は PS に存在し、PIP_s には存在しないカルボキシル基を認識することから、evt-2 PH ドメインの PS 結合特異性を規定するアミノ酸である可能性がある。

次に、PS に結合できない evt-2 変異体を用いて、PS との結合が evt-2 による REs からゴルジ体への逆行性輸送制御に必要であることを示した。さらに、PS 合成酵素の変異細胞 (PSA-3 細胞) を用いて、PS 減少下では、逆行性輸送でゴルジ体に運ばれる分子 (TGN38) の局在が異常になることを見出した。以上の結果から、PS が evt-2 を介して、ゴルジ体への逆行性輸送を制御していることが明らかになった。

本研究は、PS に特異的に結合する分子の同定、PS 減少下の表現型解析を通じて、細胞内 PS の機能を膜輸送という観点から初めて明らかにしたものであり、細胞生物学的に重要な知見と考えられる。以上の点を鑑み、博士 (薬学) に充分値するものと判断した。