

審査の結果の要旨

氏名 堀 裕 次

繊毛は細胞膜から突出した特徴的な構造体で、様々な疾患の原因となる重要な細胞内小器官である。生体内において繊毛は、細胞外環境を感知して細胞内にシグナルを伝達するアンテナとしての役割を担っており、チャネルや受容体などが繊毛に密集して存在していることが明らかとなっている。しかし、繊毛局在性の膜タンパク質がどのようにして繊毛内に輸送されるかに関しては未解明な点が多く残されていた。「G 蛋白質 Arl13b の繊毛局在化におけるパルミトイル化修飾の役割」と題した本論文においては、G 蛋白質 Arl13b の繊毛特異的な局在にパルミトイル化修飾と RVxP モチーフと呼ばれる 4 アミノ酸からなるモチーフが必要である点に着目し、パルミトイル化修飾を介したゴルジ膜への係留が、RVxP モチーフが認識されて繊毛へと輸送されるために重要であることを見出している。

1. Arl13b はゴルジ体に局在する酵素群によってパルミトイル化される

細胞内でのパルミトイル化を担う DHHC ファミリーパルミトイル化酵素は、現在までに 23 種類存在することが知られており、様々な細胞内オルガネラに局在する。Arl13b のパルミトイル化が細胞内のどこで起きるかを調べる目的で、Arl13b のパルミトイル化酵素の探索を行った。その結果、DHHC3、7、15、21 が Arl13b のパルミトイル化酵素である可能性を見出した。次にこれらの酵素の細胞内局在を観察した結果、どの酵素もゴルジ体に局在することを見出した。したがって Arl13b がゴルジ体でパルミトイル化されることが示唆された。

2. Arl13b はゴルジ体を經由して繊毛に輸送される

Arl13b が実際にゴルジ体を經由して繊毛に輸送されるかを検討した。まず、生合成後の Arl13b の細胞内局在を経時的に観察する目的で、ドキシサイクリン依存的に Arl13b-GFP を発現する細胞株を樹立した。過去の報告から、細胞培養温度を 19 °C にすると、ゴルジ体からの物質輸送が阻害されることが知られていた。そこで前述の細胞株にドキシサイクリン添加して Arl13b を発現させた後、37 °C または 19 °C で細胞を培養した際の Arl13b の細胞内局在を観察した。その結果、37 °C では Arl13b は繊毛に局在したが、19 °C では Arl13b がゴルジ体に蓄積する様子が観察された。この結果から、Arl13b はゴルジ体を經由した後に、小胞輸送により繊毛に運ばれていることが示唆された。

3. RVXP モチーフの選別はゴルジ体以降の過程で起こる

RVxP モチーフをアラニン置換した RVEP/AAEA 変異体は繊毛に局在せず、細胞膜に局在する。そこで RVEP/AAEA 変異体がゴルジ体を經由するかどうかを野生型の際と同様の方法

で調べた。その結果、RVEP/AAEA 変異体もゴルジ体からの小胞輸送を阻害した際に、ゴルジ体に蓄積する様子が観察された。したがって RVEP/AAEA 変異体では、ゴルジ体までは野生型と同様に局在するものの、ゴルジ体から先において、挙動が異なっていることが示唆された。このことは、RVxP モチーフの選別がゴルジ体以降の過程で起きていることを示唆していると考えられた。

4. Arl13b の繊毛への局在は Arf4, Rab8A 依存的である

次に Arl13b のゴルジ体から繊毛への輸送過程にどのような因子が関わっているか探る目的で、これまでにゴルジ体から繊毛への輸送過程に関与していることが明らかになっている GMAP210、Arf4 および Rab8A を発現抑制した際に Arl13b の繊毛への局在に影響が出るかどうか検討した。その結果、Arf4 および Rab8A の発現抑制により Arl13b の繊毛への局在が減弱したことから、Arl13b が Arf4 および Rab8A による小胞輸送によってゴルジ体から繊毛へと運ばれることが示唆された。RVxP モチーフが繊毛への局在に必要なことを考え合わせると、この結果は RVxP モチーフの認識および選別がゴルジ体で起こっている可能性を示唆していると考えられた。

5. ゴルジ膜局在化 DHHG7 に RVxP モチーフを付加すると繊毛局在能を獲得する

RVxP モチーフの認識および選別がゴルジ体で起きている可能性をさらに検証するため、パルミトイル化を受けてゴルジ膜に局在する DHHG7 に Arl13b の RVxP モチーフを含む領域を付加したキメラ蛋白質を作製して局在を観察した。その結果、キメラ蛋白質はゴルジ体への局在に加えて一部繊毛にも局在する様子が観察された。前項の結果と合わせると、ゴルジ体において RVxP モチーフが選別されている可能性が示唆された。

本論文から、細胞質で合成された G 蛋白質 Arl13b がゴルジ体に局在する酵素群によってパルミトイル化を受けてゴルジ膜に係留され、このパルミトイル化依存的なゴルジ膜への係留が、RVxP モチーフの認識とそれに付随する繊毛への小胞輸送に重要であることが明らかとなった。これまで RVxP モチーフをはじめとする Cilia Targeting Signal (CTS) が、細胞内のどこでどのように認識・選別されるかについては不明な点が多く残されていた。本論文のように、パルミトイル化が CTS の認識・選別に重要な役割を示すという報告は初めてである。また、Arl13b はジュベール症候群と呼ばれる遺伝性疾患の原因遺伝子産物である。本論文によるこれらの重要な知見は、繊毛局在性の分子機構に加えて、ジュベール症候群の発症メカニズムの理解やそれに基づく創薬への応用へと繋がる可能性も含んでおり、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。