

## 審査の結果の要旨

氏名 前川 大志

エンドサイトーシスは細胞外の粒子、液相、リガンド、細胞膜タンパク質、細胞膜脂質を内在化する機構であり、細胞外液中の栄養素の取り込み、抗原の貪食、膜タンパク質の分解及びリサイクル、シグナル伝達等に関わる重要な細胞機能である。マクロピノサイトーシスはエンドサイトーシスの一つの様式であり、刺激依存的に細胞骨格の再構築と細胞膜の隆起を伴って、広い範囲の細胞外液及び細胞膜を細胞内に一度に取り込む特徴がある。近年、ウイルスやバクテリアなどの宿主への侵入や樹状細胞における抗原の取り込みなどに、マクロピノサイトーシスが利用されていることが明らかにされ、その生理学的意義に注目が集まっている。しかしながら、マクロピノサイトーシスは非特異的な細胞外液の取り込み機構としてしか考えられてこなかったため、クラスリン依存的なエンドサイトーシスなどに代表される他の経路と比較して、分子機構の解明が大変遅れてきた。

本研究において、前川は線虫の細胞外液の取り込みを指標とした輸送アッセイ系に異常を示す遺伝子(*mtm-6*, *mtm-9*)に着目した。そして、動物細胞において *mtm-6*, *mtm-9* の哺乳動物ホモログである MTMR6, MTMR9 のマクロピノサイトーシスへの関与を検証した結果、MTMR6 と MTMR9 がマクロピノサイトーシスの新規制御分子であることを見出した。Coelomocyte uptake (CUP) assay は、線虫の体壁筋から擬体腔へと放出された GFP の coelomocyte における取り込みを指標とした液相性のエンドサイトーシスの輸送アッセイ系である。これまでに、17 遺伝子とその欠損により、CUP assay に異常を示すことが報告されている。前川は、CUP の一部をマクロピノサイトーシスが担っていると考え、CUP に異常を示す遺伝子に着目し、その哺乳動物ホモログがマクロピノサイトーシスに関与するかを検証した。まず、CUP に異常を示す遺伝子のうち、進化的に酵母からヒトまで保存されている PIPs (phosphoinositides) 3-phosphatase である、*mtm-6*/MTMR6、*mtm-9*/MTMR9 に着目した。*mtm-6* 変異体、*mtm-9* 変異体は、過去の報告の通り CUP に異常を示し、GFP が擬体腔に溜まる様子が観察された。また、摘出した *mtm-6* 変異体、*mtm-9* 変異体の coelomocyte は細胞外液中のデキストランを全く取り込めないことも分かった。以上の結果から、前川は *mtm-6*, *mtm-9* は coelomocyte における液相の取り込みに必要であることを明らかにした。

次に、前川は *mtm-6*, *mtm-9* のそれぞれ唯一の哺乳動物ホモログである MTMR6, MTMR9 がマクロピノサイトーシスを制御しているか、ヒト扁平上皮癌由来の A431 細胞を用いて検証した。A431 細胞は、EGF 刺激後数分間に一過的なマクロピノサイトーシスを引き起こすことが知られている。蛍光標識されたデキストランの取り込み量を FACS により定量したところ、EGF 刺激によってその取り込みが増大し、マクロピノサイトーシスの阻害剤であるアミロライドによって顕著に抑制された。このマクロピノサイトーシスの FACS によるアッセイ系を用いて、MTMR6 を発現抑制し、細胞のマクロピノサイトーシスを測定した結果、マクロピノサイトーシスを制御している事が示されているアクチン重合促進因子 PAK-1 を発現抑制した時と同程度に、マクロピノサイトーシス能が顕著に減少していることを確認した。以上の結果から、MTMR6, MTMR9 はマクロピノサイトーシスの新規制御分子であることが明らかになった。一方で、MTMR6, MTMR9 をそれぞれ発現抑制しても、クラスリン依存的に細胞に取り込まれるトランスフェリンの取り込みの抑制は見られなかったことから、前川は MTMR6, MTMR9 がマクロピノサイトーシスを特異的に制御している事を明らかにした。

マクロピノサイトーシスは、1) 刺激依存的なアクチン重合とラッフル膜の形成、2) 形成されたラッフル膜同士によるマクロピノソームの形成の2つのステップで構成されている。そこで、前川は MTMR6 がマクロピノサイトーシスの2つのステップのどちらで機能しているかを検討した。前者はファロイジン染色及び走査型電子顕微鏡観察により、後者は位相差顕微鏡による live cell imaging

により検証した。その結果、MTMR6 発現抑制下でも、EGF 刺激依存的なアクチン重合及び、細胞表面のラッフル膜の形成は正常であり、異常は見られなかったが、MTMR6 を発現抑制した細胞では、細胞膜の隆起は起きるものの、その後のマクロピノソームの形成が殆ど起きていないことが分かった。コントロール細胞では、EGF 刺激 12.5 分後にはマクロピノソームが透明度の高い小胞（白く観察される）として観察されたが、MTMR6 を発現抑制した細胞では、このマクロピノソームの形成が全く見られなかった。以上の結果から、前川は MTMR6 がマクロピノサイトーシスの過程において、刺激依存的なラッフル膜の形成後の膜の融合に関与していることが明らかにした。これまで、マクロピノサイトーシスにおけるラッフル膜の融合に関わる分子は殆ど同定されておらず、本研究は大変新規性の高いものである。

MTMR6 は PI3P を PI に変換する酵素である。これまで、マクロピノサイトーシス時における PIPs 動態について、ラッフル膜上で一過的に PI345P3、PI34P2 が産生、消失されることが分かっており、その産生酵素も分かっている。前川は、このラッフル膜上で一過的に産生される PI345P3 が、PI34P2、PI3P、PI へと代謝されていく事がマクロピノサイトーシスのラッフル膜の融合に必要であるという仮説を立てた。これまでに、PI34P2 を PI3P に変換する酵素として、INPP4B が同定されている。そこで、前川は INPP4B がマクロピノサイトーシスの制御分子かどうかを発現抑制実験により検証した。その結果、MTMR6、MTMR9 と同様に、INPP4B を発現抑制することでマクロピノサイトーシスが顕著に抑制されることが明らかになった。また、その作用点も MTMR6 と同様に、ラッフル膜の形成ではなく、その後のラッフル膜の融合過程であることを明らかにした。さらに、クラスリン依存的なトランスフェリンの取り込みには異常が無いことも確認している。以上の結果から、前川は INPP4B もマクロピノサイトーシスの新規制御分子である事を明らかにした。さらに、INPP4B、MTMR6 の発現抑制下で、EGF 刺激 10 分後において、ラッフル膜に PI34P2、PI3P が蓄積していることも明らかにしている。

最後に、前川は近年、MTMR6 が負に制御していると報告された KCa3.1 に着目した。KCa3.1 は Ca 依存性の K チャネルであり、PI3P によって活性化することが知られている。前川はマクロピノサイトーシス時において、ラッフル膜上で一過的に産生、消失する PI3P による、このチャネルの不活性化がマクロピノサイトーシスのラッフル膜の正常な融合に必要であると考えた。そこで、前川は KCa3.1 の特異的な阻害剤である TRAM-34 を処理した所、マクロピノサイトーシスが特異的に抑制され、ラッフル膜の融合に異常が生じることを明らかにした。以上の結果から、KCa3.1 が PI3P のエフェクターとしてマクロピノサイトーシス時において機能していることが明らかにされた。

本研究では、線虫での coelomocyte におけるエンドサイトーシス異常（CUP 異常）という現象を哺乳動物細胞のマクロピノサイトーシスに応用し、その結果マクロピノサイトーシスを特異的に制御する新規分子として MTMR6、MTMR9 を同定した。この結果は、線虫の CUP assay が哺乳動物細胞におけるマクロピノサイトーシスを解析する為の強力な遺伝学的ツールになり得ることを示すものである。今後、網羅的 RNAi スクリーニングによる新規 CUP 遺伝子の同定や、*mtm-6* 変異体、*mtm-9* 変異体の CUP 異常のサプレッサー遺伝子の同定等により、哺乳動物細胞におけるマクロピノサイトーシスを制御する分子基盤の更なる解明が期待される。また、MTMR6、MTMR9、KCa3.1 のノックアウトマウスの解析などを通して、マクロピノサイトーシスの生理学的及び、病理学的意義が明らかになることが期待される。本研究は、ウイルスやバクテリアの侵入機構や、樹状細胞での抗原の取り込み機構として着目されているマクロピノサイトーシスの制御分子を多数同定したという点で、大変意義深く、博士（薬学）に充分値するものと判断した。