

審査の結果の要旨

氏名 仁木 隆裕

我々の体を構成する細胞は、形質膜やオルガネラ膜といった多彩な膜構造を有する。これら生体膜は脂質の二重膜から構築され、各々の膜は多様でかつ特徴的な脂質組成・分布を有することで、シグナル伝達の場合やオルガネラ固有の機能等を提供していると考えられている。生体膜を作る多様な脂質の中でも、スフィンゴミエリン (SM) は約 1 割を占める主要なリン脂質であり、情報伝達の場合の構築あるいは神経の髄鞘形成など生命活動に必須の役割を担うことが知られている。例えば、SM の加水分解酵素の欠損はニーマン・ピック病 (脳等に SM が蓄積し不可逆的な神経障害を呈するヒト先天性代謝異常症) を引き起こすことが知られている。赤血球膜の研究から SM は一般的に形質膜の表層 (脂質二重層の外葉) に存在していると考えられている、しかしながら、細胞内、特に細胞質側の脂質層での SM は、技術的制約もあるためほとんど注目されていなかった。仁木は博士後期課程において、SM を可視化できるようなタンパク質性の新規プローブを作製し、生細胞内の SM の分布を調べ、細胞内、特に細胞質側脂質層に存在する SM の機能の解明を目指した。

まず、仁木は SM に選択的に結合する既知のタンパク質、エキナトキシン-II (Eqt-II) に着目した。Eqt-II は、脂質ラフト内などのクラスター化した SM のみならず、分散した SM にも結合することができ、生体膜での会合状態の異なる SM を可視化できると考えられている。しかしながら、Eqt-II は、生体膜に結合すると速やかに pore を形成する毒素であり、生細胞に対して強烈な毒性を示すという問題点があった。また、Eqt-II は全長で SM を認識すると考えられており、ポア形成部を除くことができず、生細胞内の SM の解析を困難にしていた。

そこで、仁木は Eqt-II の立体構造予測から毒性発揮に関与しうるアミノ酸残基をアラニンに置換するスクリーニングを行い、細胞毒性を軽減させる変異を探索したところ、二箇所のアミノ酸残基をアラニンに置換することで、Eqt-II の無毒化に成功した。この無毒型 Eqt-II は、野生型の Eqt-II と同様に SM 結合選択性を維持しており、生きた細胞に応用可能な SM プローブであることが期待された。

次に無毒型 Eqt-II に蛍光タンパク質を融合させたもの (以下、SM プローブ) を作製することで、細胞内での SM の詳細な分布を調べた。SM プローブを生きた細胞内の細胞質に発現させたところ、全く細胞毒性を示すことなく核近傍部への局在を示した。これらのオルガネラへの局在は、SM 合成酵素阻害剤、ならびに SM 分解酵素のマイクロインジェクションにより消失し、プローブは細胞質中に散在化した。さらに、このプローブに SM 結合能を欠失させる点変異を追加すると、核近傍部への局在は全く示さなくなり、細胞質に散在化した。以上のことから、この SM プローブは、細胞質発現においても細胞毒性を示すことなく細胞質側の SM を認識できるプローブであることがわかった。

次に細胞内オルガネラ局在が判別容易な COS-1 細胞を用いて、細胞質に発現した SM プローブの局在を観察したところ、リサイクリングエンドソーム、リソソーム、トランスゴルジという一部のオルガネラに限定して局在することがわかった。すなわち、上記一部のオルガネラ膜において、SM が細胞質側に露出していることが初めて明らかとなった。

次に仁木は、上記 SM の細胞内局在を可能とするタンパク質の同定を目指し、細胞質に発現させた SM プローブの局在異常を指標に、脂質輸送、および SM 合成・代謝に関連するタンパク質群の RNAi を行った。その結果、コレステロールの細胞内輸送に必須なタンパク質の発現抑制により、SM プローブが細胞質に顕著に散在化することがわかった。同様に、このタンパク質の機能阻害剤によっても SM プローブの散在化が確認された。一方、その他のコレステロール輸送タンパク質の発現抑制、機能阻害では、細胞質に発現した SM プローブの局在には影響がなかったことから、同定されたタンパク質がコレステロール輸送以外の機能により細胞質側脂質層の SM 局在化に機能していることが示唆された。

新規 SM プローブにより今回初めて明らかとなった細胞質側に存在する SM の機能を知るためには、SM に結合するタンパク質や近傍に存在するタンパク質群の情報が重要である。そこで最後に仁木は、SM プローブとビオチン化酵素とを融合させたものを細胞質に発現させることで、細胞質側脂質層 SM のごく近傍(~20 nm)に存在し SM と相互作用が予想されるタンパク質を網羅的にビオチン化した。その結果、LC-MS/MS 解析により 500 種類を超えるタンパク質を SM 近傍の候補分子として同定した。予想に即し、シグナル受容体や脂質修飾化タンパク質といった、脂質ラフトに存在するとされる膜タンパク質が多く含まれていた。一方、注目すべきことに、細胞内膜輸送を制御するタンパク質が数多く同定された。また、上記同定した細胞質側脂質層への SM 局在化に必要なタンパク質の機能阻害により、いくつかの細胞内膜輸送に異常が見られた。以上のことから、細胞質側脂質層に存在する SM は膜輸送の制御に関与している可能性が示唆された。

本研究によって仁木は、生細胞に応用可能な新規 SM プローブを作製することで、細胞質側脂質層に SM が存在すること、およびその詳細な細胞内分布を明らかにした。また、細胞内 SM の局在に必要なタンパク質を同定し、さらに、細胞内 SM 近傍に存在すると予想される候補タンパク質を網羅的に同定した。これにより、細胞質に存在する SM の機能、および細胞内 SM が関わる現象を探索できるようにした。今まで解析されてこなかった細胞内 SM の機能に迫る大きなブレイクスルーと言える。よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。