

[別紙2]

## 審査の結果の要旨

氏名 篠原 健太郎

細胞外に分泌されるタンパク質は、小胞体 (ER) の内腔で合成された後、ER 上の特殊なドメインである ER exit site において COP II 被覆小胞に積み込まれて出芽し、細胞膜側に向かう。ER exit site は細胞質全体に分布するが、その細胞内局在には特徴があり、核近傍側ではお互いに密集して局在するのに対し、細胞質側では離散して局在する。特に、核近傍側で密集した ER exit site は、巨大分子コラーゲンの分泌に必要であることを示唆する知見が報告され、ER exit site は細胞内局在によって機能や分泌動態が異なることが示唆されている。しかし、ER exit site の細胞内局在の違いに着目した研究は少なく、機能や分泌動態の違いがどのような分子機構に起因するのか不明であった。「小胞体上の分泌タンパク質出芽部位 ER exit site の局在制御機構」と題した本論文では、細胞内の ER exit site を核近傍側に密集した群と細胞質側に点在した群とに分類し、それぞれの局在制御に介在する分子機構を解析することで、核近傍側に密集した群ではモータータンパク質 Dynein-1 の局在制御が機能している可能性を見出している。

### 1. pH 変化に伴う ER exit site の細胞内局在変化

異なる pH の培養液 D-MEM で HeLa 細胞を培養して ER exit site の細胞内局在を免疫染色法によって評価した結果、その局在が pH に応じて大きく変化することを見出した。酸性条件 (pH 6.8) では核近傍側に密集した ER exit site が消失し、細胞質側全体に主に点在して局在するのに対し、塩基性条件 (pH 7.8) では主に核近傍側に密集して局在し、中性条件 (pH 7.4) では両群に局在していた。さらに本現象は、pH 変化に伴って両群の間で可逆的に変化することを明らかにしており、ER exit site の局在制御機構の解析を行うための有効な手段であることが提示された。

### 2. ER exit site の局在変化機構の解析

ER exit site は小胞体膜上を移動することによって局在を変化させるか評価するために、酸性条件から塩基性条件に培養条件を変更させたときの局在変化を経時的に観察した。その結果、核近傍側に密集する ER exit site が時間経過に伴って細胞質側全体に移動する様子が観察された。さらに、ER exit site に局在する

小胞体膜タンパク質 Sec12 の局在変化を評価した結果、pH の変化に伴って Sec12 も同様に核近傍側と細胞質側の両群の間で大きく局在を変化させる様子が観察された。したがって、ER exit site はそれを形成するタンパク質が小胞体膜上を移動することによって局在を変化させることが示された。

### 3. ER exit site の局在変化に対するモータータンパク質の関与の検討

ER exit site の局在変化に対する微小管の関与を検討するために、微小管脱重合剤 Nocodazole を処理した HeLa 細胞での局在変化を評価した。その結果、Nocodazole 処理によって塩基性条件による ER exit site の核近傍側への集積が大きく抑制された。さらに、モータータンパク質の関与を検討するために KIF5B、Dynein-1 をそれぞれ発現抑制した HeLa 細胞での局在変化を解析した。その結果、KIF5B を発現抑制しても ER exit site の局在変化に影響は生じなかったが、Dynein-1 を発現抑制した場合には、塩基性条件による ER exit site の核近傍側への集積が抑制され、その集積機構に Dynein-1 が関与することが示された。

### 4. ER exit site と Dynein-1 との関連性の解析

Dynein-1 は Dynactin と複合体を形成し、その構成タンパク質 p150Glued は Sec23A と直接結合することで小胞体からの効率的な輸送に関与することが報告されている。ここから、Dynein-1 は p150Glued と Sec23A の結合を介して ER exit site を核近傍側へ集積する可能性を考え検討した。Sec23 と p150Glued をそれぞれ発現抑制した HeLa 細胞では、塩基性条件による ER exit site の核近傍側への集積が大きく抑制された。さらに、別の被覆タンパク質 Sec31A を発現抑制した場合には、その局在変化に影響は生じなかった。以上から、Dynein-1 は p150Glued と Sec23A との結合を介して ER exit site を核近傍側に集積させる可能性が示された。

本論文から、ER exit site は pH に応じて局在を可逆的に変化させ、塩基性条件では、p150Glued と Sec23A の結合を介した Dynein-1 による分子機構によって核近傍側に集積することが明らかとなった。したがって、p150Glued と Sec23A の結合を介した効率的な分子機構が核近傍側の ER exit site で優位に作動する可能性が提示された。COP II 被覆小胞の形成因子である Sec23A が、ER exit site の局在制御にも関与することは興味深い。また、ER exit site の細胞内局在の違いに着目した研究は少なく、その局在制御機構を明らかとした点で、本研究は新規性が高いものである。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。