

審査の結果の要旨

氏名 松平 竜之

動物細胞において、細胞膜および細胞内オルガネラ膜はそれぞれ特有の膜リン脂質組成を有する。この膜環境は、オルガネラ膜の融合・分裂といった動的機能の構造基盤となるのみでなく、各オルガネラの特有の機能発揮に重要な役割を果たす事も報告されてきている。ホスファチジルセリン (PS) は、極性頭部にセリンを有する負電荷のリン脂質であり、細胞内全リン脂質の約 5-10%を占める。PS は細胞膜において、アポトーシス時の貪食の誘起や、PKC などのシグナル伝達分子の活性化に関与している。近年、当研究室における解析から、PS が細胞膜だけでなくリサイクリングエンドソーム (RE) にも豊富に存在することが明らかになった。RE はエンドサイトーシスによって細胞外から取り込まれた物質を細胞膜へ送り返す機能をもつオルガネラとして同定されたが、最近では、RE がゴルジ体への逆行性物質輸送や、オートファゴソームへの物質輸送にも関与することが報告されており、その多彩な機能が明らかになりつつある。しかしながら、RE は生化学的単離が困難なために、RE に局在するタンパク質に関する知見が非常に限られている。加えて、RE における PS の細胞生物学的な機能も未だ十分に解明されていない。

松平は本研究においてまず、RE に PS が濃縮しているという性質を利用し、PS 近傍タンパク質を解析することによって、RE における PS の役割や、RE が関与する新たな現象の解明を試みた。始めに、大腸菌由来のビオチン化酵素の変異体と PS 特異的プローブを用いて、PS の近傍に位置するタンパク質を網羅的にビオチン化し、質量分析によって解析した。その結果、興味深いことに、小胞輸送に関与する既知の RE 局在分子だけでなく、組織・器官のサイズを規定するシグナル伝達系である Hippo/YAP signaling pathway に関わる分子が数多く同定された。その中には Hippo/YAP signaling pathway の肝となる分子である転写コアクチベーター YAP も同定されており、YAP に着目して解析を進めたところ、低密度培養時、すなわち細胞増殖時に YAP が RE と核に局在することが明らかになった。また、RE に局在する 2 つのタンパク質、PS フリッパーゼ ATP8A1、PS 結合分子 *evectin-2* の発現抑制や、PS プローブの過剰発現などによって、YAP の RE および核局在や下流シグナルが減弱することを見出した。さらに、YAP が RE/PS によって制御される分子メカニズムとして、*evectin-2* 結合分子として同定された Nedd4 family E3 ligases が、*evectin-2* との結合によって活性化され、YAP をリン酸化し抑制する Lats1 を分解することによって、YAP signaling を正に制御することが明らかになった。さらに、ATP8A1/*evectin-2*/Nedd4 family E3 ligases という分子群が、悪性乳がん細胞である MDA-MB-231 細胞においても、YAP signaling を正に制御し細胞増殖を促進していることを、松平は明らかにした。

YAP の活性化は細胞膜および細胞質で進行すると考えられているが、松平は本研究によって、細胞内オルガネラ RE も YAP の活性化の場として機能しうることを初めて明らかにした。また本研究は、周辺分子を非特異的にビオチン化する酵素と脂質プローブの組み合わせによって、脂質近傍分子を網羅的に同定した初の例であり、この実験系の有用性・汎用性が大いに期待される。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。