

審査の結果の要旨

氏名 谷地 理恵子

スフィンゴミエリン (SM) は生体膜を構成するリン脂質の一つである。SM は細胞膜上で脂質ラフトと呼ばれるマイクロドメインを形成し、シグナル伝達において重要な役割を担っている。一方で、SM は細胞小器官にも存在するが、その詳細な細胞内分布や生理学的意義についてはこれまで明らかにされていなかった。シマミミズの体腔液に存在するライセニン は SM に結合する能力を有し、生体膜の SM を可視化するために利用されているが、生体膜中の SM の存在状態によっては検出できないという問題点がある。最近、SM と 1:1 で結合するイソギンチャク由来のタンパク質、エキナトキシン-II (EqII) が報告された (*J. Biol. Chem.* 283, 18665-77, 2008)。谷地はこの EqII を利用して SM の細胞内分布を観察し、リサイクリングエンドソーム (REs) の細胞質側の leaflet に SM が濃縮して存在していることを明らかにした。さらに、SM 合成酵素の一つである SMS1 によって REs の SM が供給される事を明らかにした。また、SMS1 のノックダウンによって REs に存在する SM が減少すると、リサイクル輸送を制御する低分子量 GTPase Rab11 が散在化し、トランスフェリン (Tfn) 及びトランスフェリン受容体 (TfnR) のリサイクル輸送が阻害されることを見出した。

谷地は、EqII-GFP 組み換えタンパク質を大腸菌から精製し、これを用いて細胞染色を行った。固定細胞の細胞膜を染色すると、ライセニン染色では観察されなかったドット状の染色が多数見られた。SM の合成酵素にはゴルジ体に局在する SMS1 と、主に細胞膜に局在する SMS2 の 2 つが存在する。細胞膜の EqII 染色は SMS2 を RNAi によってノックダウンすると劇的に減弱し、*in vivo* における EqII-GFP の SM 結合特異性を確認した。次に谷地は、固定細胞を界面活性剤で処理し細胞小器官の SM 染色を行った。ライセニンでは主に後期エンドソームやリソソームが染色されるのに対して、EqII ではこれらに加えてリサイクリングエンドソーム (REs) が強く染色されることを見出し、この結果から、REs に SM が濃縮して存在することを示唆した。REs の EqII 染色は、ゴルジ体に局在する SM 合成酵素 SMS1 のノックダウンや、SM 合成阻害剤である D609 の処理によって著しく減弱することを見出す一方で、細胞膜に局在する SMS2 をノックダウンしても細胞小器官の EqII 染色に影響は見られないことを示した。これらの結果から、REs に存在する SM は主に SMS1 による合成によって供給される事を明らかにした。

次に谷地は、EqII-GFP を細胞質に発現させて細胞質側の leaflet に存在する SM の分布を検討した。細胞質に発現させた EqII-GFP は核近縁部に強く集積し、TfnR と共局在した。一方、EqII-GFP は後期エンドソームやリソソームとはほとんど共局在しなかった。これらの結果から、REs 膜の細胞質側の leaflet に SM が豊富に存在すること、後期エンドソームやリソソームに局在する SM は、内腔側の leaflet に存在していることを示した。これま

で SM は、細胞膜の細胞外側 leaflet に存在することが知られていた。細胞質側 leaflet に SM が局在するという報告はこれまでに無く、谷地が見出した REs の細胞質側 leaflet への SM 局在は非常に特徴的であると言える。

SM が REs に濃縮して存在することから、次に谷地は REs における SM の機能解析を行った。主に REs に局在し、REs から細胞膜へ輸送（リサイクル）される代表的な分子として、トランスフェリン受容体（TfnR）が知られている。SMS1 をノックダウンした細胞では TfnR は細胞質中に散在化し、また、SM 合成阻害剤 D609 処理によっても、同様に TfnR の散在化が起こることを観察した。一方で細胞膜の SM 量を制御している SMS2 のノックダウンでは、TfnR の散在化が観察されなかった。次に、TfnR のリガンドである Tfn を細胞外から取り込ませて輸送を追跡したところ、SMS1 ノックダウン細胞では Tfn の一部が分解系の細胞小器官（後期エンドソーム、リソソーム）へ輸送されていることを示した。

Rab タンパク質の一つである Rab11 は REs に局在し、REs を介したリサイクル輸送を制御する事が知られている。予想されるとおり、Rab11 をノックダウンした COS-1 細胞で、SMS1 ノックダウンと同様に TfnR の局在異常を観察した。そこで谷地は、SMS1 ノックダウン細胞における Rab11 の局在を観察した結果、コントロール siRNA 処理細胞では Rab11 が核近縁部の REs に局在するのに対し、SMS1 をノックダウンした細胞では Rab11 が細胞質全体に分散していることを見出した。また、SMS1 ノックダウン細胞に Rab11 恒常活性化型変異体（Rab11 Q70L）を細胞に発現させても REs に局在せず、TfnR の局在異常もレスキューされなかった。これら結果から、Rab11 が REs 膜に局在するために REs 膜に存在する SM が必要であることを示唆した。

細胞膜から取り込まれた分子が、エンドソームを経由してゴルジ体へと輸送される逆行性輸送においても、REs を経由する事が報告されている。そこで谷地、REs を経由してゴルジ体へと逆行性輸送されるコレラ毒素の輸送に対する影響を検討した。その結果、コレラ毒素の逆行性輸送に対しては SMS1 ノックダウンによる影響が見られなかった。これらの結果から、REs に存在する SM は REs を介する物質輸送のうち、リサイクル経路に選択的に関与していることを明らかにした。

SM はこれまで、主に細胞膜の細胞外側の leaflet に存在する事が知られていた。本研究において、私は SM 特異的プローブ EqtII を用いて SM の細胞内局在を明らかにし、さらに EqtII を細胞質に発現することにより、REs 膜の細胞質側 leaflet に SM が豊富に存在しているというこれまでの常識を覆す知見を見出した。SM の合成酵素には SMS1 と SMS2 の 2 つが存在するが、REs に存在する SM は、主に SMS1 による合成で供給されることを示した。SMS1 ノックダウンによって REs の SM が減少すると、リサイクル輸送の制御分子である Rab11 が REs に局在出来なくなり、Tfn 及び TfnR のリサイクル輸送が阻害された。これらの結果は、REs 膜の細胞質側 leaflet に存在する SM がリサイクル輸送において重要な役割を担う事を

示唆している。以上の結果は、細胞内のSMが細胞内物質輸送に大きく関与する事を示すとともに、様々な疾患の原因ともなりうる可能性を示しており、谷地の研究は博士（薬学）に充分値すると判断した。