［別紙２］

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏　名　　相田 健佑

Sorting Nexin 27 (SNX27)は、PX domain を有すことを特徴とする Soring Nexin (SNX) family に属するタンパク質である。当研究室では、これまでに Multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4)との相互作用タンパク質群に SNX27 が含まれることを見出し、本タンパク質が MRP4 の細胞膜からの内在化抑制に働くことを明らかにしている(1)。この研究により、SNX27 の細胞膜近傍における機能が見出されたが、その一方で、SNX27 は主に early endosome(EE)に局在することから、SNX27 が EE を起点とする細胞内輸送において、役割を有すことも推測された。EE から始まる細胞内小胞輸送として、細胞膜へのリサイクリング、ESCRT 機構を介したリソソーム分解、ゴルジ体への逆行性輸送などが知られている。相田は本研究において、細胞内小胞輸送における SNX27 の重要性を明らかにするために、蛍光標識コレラ毒素 B サブユニット(CTxB)を用い、SNX27 の逆行性輸送に対する寄与を検討し、以下の知見を得た。

1. SNX27 のノックダウン(KD)により、CTxB の recycling endosome(RE)からゴルジ体への輸送が遅延する

CTxB は、EE から RE を経由してゴルジ体に移行する(2)。COS-1 細胞は、RE とゴルジ体を構造的に区別しやすく、CTxB 局在の経時変化の観察に適していることから(2)、本研究では、COS-1 細胞を用いて解析を行った。COS-1 細胞に取り込まれた CTxB は、5 分後に、EE マーカーである EEA1、90 分後にゴルジ体マーカーである TGN46 との共局在が観察された。RE はゴルジ体の内側に存在するが、CTxB は 15 分後には TGN46 の内側に局在することが観察された。また、CTxB の逆行性輸送に伴い、SNX27 も CTxB と共局在しながら、EE から RE を経由してゴルジ体まで逆行性輸送されることが確認された。一方、SNX27 を KD した細胞では、コントロール細胞と比して、15 分後までは、CTxB の逆行性輸送に明確な差は認められなかったが、90 分後においては、CTxB はゴルジ体ではなく、15 分後と同様に RE 局在を示した。CTxB の逆行性輸送に対する SNX27 の作用は、SNX27 が通常時に存在する EE から生じる膜輸送ではなく、RE からゴルジ体への膜輸送で観察されたことから、本作用発現においては、SNX27 が EE から RE へと移行し、機能発現していることが推測された。

2. CTxB の逆行性輸送には、SNX27 の FERM like domain を介した機能が必要である

SNX27 は PX domain に加え、PDZ domain、FERM like domain など機能性ドメイン

を複数持つ。CTxB の逆行性輸送に関与しているドメインを明らかにするため、各ドメインの機能欠損変異体を構築し、SNX27 KD 細胞において、CTxB の逆行性輸送に対するレスキュー効果を評価した。PDZ domain の変異体である SNX27-H114A、SNX27-Δ67-77 を発現させた場合には、レスキュー効果が確認され、細胞内に取り込まれた CTxB は 90 分後にゴルジ体に存在した。また、両変異体は、野生型と同様に、CTxB の取り込みに伴い、EE からの逆行性輸送を受け、90 分後には CTxB とともにゴルジ体局在を示した。一方、FERM like domain の変異体である SNX27-W477A は、CTxB と共に RE までは逆行性輸送を受けるもののレスキュー効果は示さず、細胞内に取り込まれた CTxB は 90 分後も RE に存在した。

以上のように、CTxB の逆行性輸送において、SNX27 が局在移行し、RE において SNX1 と協奏的に機能することを明らかにした。これまでに SNX family のタンパク質において、機能発現のために局在が変化するタンパク質の報告はなかった。近年 SNX family の機能解析が進んでいるため、本知見が SNX family の機能の理解に役立つと考えられる。また、本研究においては、不明な点の多い、CTxB の逆行性輸送の分子メカニズムについても新たな知見が得られたことも意義深いと考えられる。

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。