

Title	小胞輸送におけるオルガネラ型Na ⁺ /H ⁺ 交換輸送体(NHE6)の役割
Author(s)	婁, 欣瀚
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/2701
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【50】

氏名	妻 欣 瀚
博士の専攻分野の名称	博士 (理学)
学位記番号	第 25212 号
学位授与年月日	平成24年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	小胞輸送におけるオルガネラ型 Na ⁺ /H ⁺ 交換輸送体 (NHE6) の役割
論文審査委員	(主査) 教授 金澤 浩 (副査) 教授 倉光 成紀 教授 米崎 哲朗 助教 松下 昌史

論文内容の要旨

1、研究の背景と目的

ほ乳類の細胞質とオルガネラ内は固有のイオン環境が維持されている。この維持にはそれぞれの膜に存在し、イオン輸送を行う膜タンパク質が関わっている。その中の一つである Na⁺/H⁺交換輸送体(NHE)は、細胞質とオルガネラ内の Na⁺と pH 環境の制御に重要な役割を果たしている。ほ乳類細胞には9種類の NHE アイソフォームが知られており、NHE1から NHE5は形質膜に、NHE6 から NHE9はそれぞれ特定のオルガネラ膜に局在する。しかし、オルガネラ型 NHE によるオルガネラ pH の調節の分子機構や、細胞生理学上の役割について、まだ不明な点が多く残されている。

オルガネラ型 NHE のうち、NHE6 は大部分がエンドサイトーシス、リサイクリング経路上のエンドソームに局在するが、一部は細胞膜にも局在し、オルガネラと細胞膜との間を行き来している。このエンドソームと細胞膜との間の局在バランスの制御には、C 末端領域に結合する RACK1 (receptor of activated C kinase 1) が関与することを、我々は先行研究により発見している。さらに RACK1 の発現抑制時には、細胞膜の NHE6 量の減少と、細胞外からのトランスフェリンの取り込み阻害が観察された。この結果から NHE6 は小胞輸送の制御に関与する可能性が考えられたが、直接的な証明はなされていない。そこで、本研究では小胞輸送を介した細胞の物質の取り込み経路における NHE6 の機能に注目し、小胞輸送制御への関与を実証すること、さらに関与の機構を解明することを目的として研究を行った。

2、結果

1) NHE6 はトランスフェリンのエンドサイトーシスに関与する

NHE6の欠損による物質の取り込みへの影響を調べるため、物質の取り込みモデル細胞として代表的な HeLa 細胞を用い、NHE6の発現抑制を行った。その結果、NHE6の発現量は、無処理の対照細胞に比べて、約 15%まで抑えることができた。この樹立した NHE6 発現抑制 HeLa 細胞を用い、エンドサイトーシスへの影響を検討した。その結果、NHE6 発現抑制細胞ではクラスリン依存性のエンドサイトーシスによって取り込まれるトランスフェリンの取り込みの速度が著しく遅くなることを見出した。トランスフェリン取り込み量の経時変化をみると、NHE6 発現抑制細胞では取り込み初期の段階からコントロール細胞の約 50%程度に低下していた。一方、NHE6 発現抑制細胞では、トランスフェリンと同じクラスリン依存性である EGF と LDL のエンドサイトーシスには影響が見られなかった。また、クラスリン非依存性である CTxB とデキストランのエンドサイトーシスにも影響が見られなかった。

2) NHE6 のイオン輸送能がトランスフェリンのエンドサイトーシスに重要である

野生型 NHE6 と、イオン輸送機能のない変異体 NHE6 の過剰発現細胞を樹立し、これらの細胞のエンドサイトーシスを検討したところ、野生型過剰発現株ではトランスフェリンの取り込みが増加していた。一方、変異体では取り込みの増加は見られなかった。また、EGF と LDL 及び CTxB のエンドサイトーシスへの影響は、どちらの株でも観察されなかった。

3) NHE6 はエンドサイトーシス初期のクラスリン被覆小胞形成に重要な機能を果たす

トランスフェリンの取り込みの各段階における、NHE6 発現抑制の影響について、詳細に調べた。その結果、

取り込みをはじめる前の細胞膜上でのトランスフェリン結合量は、NHE6 発現抑制細胞とコントロール細胞ではほぼ同じレベルを示していた。しかし、NHE6 発現抑制細胞では取り込み初期(開始 2 分後)において、トランスフェリンとクラスリンの共局在が少なくなることがわかった。このとき、クラスリンの細胞膜への結合量も発現抑制細胞では減少することがわかった。これらの結果は、NHE6 発現抑制細胞ではトランスフェリン取り込み初期のクラスリン被覆小胞の形成が減少していることを示唆している。

3、本研究の位置づけ

本研究で、初めて NHE6 の pH 制御機能がエンドサイトーシスにおいて重要な役割を果たすことを証明できた。細胞には、様々なエンドサイトーシスによる物質取り込み系の存在が知られているが、NHE6 による制御がトランスフェリンの取り込み系に特異的に関与するという知見は、エンドサイトーシスの過程の多様性を示唆するとともに、その詳細な機構の理解につながると考えられる。

論文審査の結果の要旨

妻さんは、博士後期課程 3 年を私の研究室で研究し、本年 9 月に第一著者論文(下記)が、米
国生理学会の会誌(細胞生物学部門)に掲載を認められました。

研究課題は、ほ乳類細胞内のオルガネラ小胞に局在する Na⁺/H⁺交換輸送体の一種である NHE6 について、その細胞にとっての生理的役割を初めて明らかにした物です。方法は、ヒトの HeLa 細胞を主として材料とし NHE6 の遺伝子過剰発現や、発現抑制により細胞が示す鉄結合タンパク質 transferrin の細胞内取り込み(エンドサイトーシス)の以上を解析することです。その結果、NHE6 がこのタンパク質の細胞内取り込みにイオン輸送機能を通じて寄与することを初めて明らかにしました。NHE6 と同様に細胞内のオルガネラ小胞に局在する NHE 7, 8, 9 と 3 種存在することが示されていますが、いずれもその細胞生理学的役割は明らかにされておらず、NHE6 がエンドサイトーシスという小胞輸送系に関与することを示したことは、他の NHE の機能解明にも貢献すると考えられます。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として、十分価値のあるものと認められます。