Osaka University Knowledge Archive

Title	カチオン非依存性マンノース６リン酸受容体（CIMPR）のポストゴルジ輸送 ： 細胞質外ドメインの影響に関する研究
Author(s)	富山, 雄人
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45163
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【35】

氏　　名	富山雄人（とみやま ゆうじ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学位記番号	第　18606　号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学位論文名	**カチオン非依存性マンノース6リン酸受容体（CIMPR）のポストゴルジ輸送：細胞質外ドメインの影響に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　恵比須繁之 （副査） 教　授　由良　義明　　助教授　大倉　正也　　助教授　西村　理行

論文内容の要旨

【研究目的】

哺乳類細胞において、リソソームは分解代謝活性を担う主要な細胞内小器官であり、細胞の恒常性維持に深く関わる。リソソーム酵素群はゴルジ体でマンノース6リン酸（M6P）の付加を受けるが、この修飾をM6P受容体（MPR）が認識し、トランスゴルジネットワーク（TGN）からエンドソームへ輸送される。ここでMPRはリソソーム酵素を遊離し、遊離した酸素はリソソームへ送られる。一方、輸送を終えたMPRはエンドソームから再度TGNへ戻り、次のリガンドを輸送する。

主要なMPRであるカチオン非依存性MPR（CIMPR）は細胞質外、膜貫通、および細胞質ドメインからなるタイプI膜タンパク質であり、細胞質ドメインに含まれる種々のアミノ酸配列が同受容体の細胞内輸送を決定することが報告されている。一方、細胞質外ドメインの細胞内輸送への関与は明らかではない。

本研究ではこの問題を解決するため、全長のCIMPR、細胞質外ドメインを欠くCIMPR、および点変異によりリソソーム酸素との結合能を欠失させたCIMPR、のそれぞれをGFP（green fluorescence protein）に融合させたタンパク質を構築した。そして、これらをヒト子宮頚癌由来のHeLa細胞に発現させ、様々な解析法を用いて比較検討を行い、CIMPRの細胞内輸送における細胞質外ドメインの役割を検討した。

【研究方法】

1．GFP-CIMPR融合タンパク質の作製と細胞培養

GFPのC′末端側にCIMPRの膜貫通および細胞質ドメイン（GFP-CIMPRtail）、あるいは全長のCIMPR（GFP-CIMPRfull）を融合させたキメラタンパク質、および変異導入によりGFP-CIMPRfullのM6P-リガンド結合能を欠失させたタンパク質（GFP-CIMPR（R426/1325A））を構築し、これらを一過性にHeLa細胞に発現させた。

また、これら細胞をU18666A（3μg/ml）存在下にて20時間培養、あるいはクロロキン（100μM）存在下で4時間培養し、以下の解析を行った。

2．免疫蛍光法

3％パラホルムアルデヒド/PBSで固定した細胞を、様々な細胞内小器官マーカーに対する抗体を用いて免疫染色

を行った。また、トランスフェリン-Alexa594 やデキストラン-TexasRed をトレーサーとして細胞に取り込ませ、種々のエンドソームを標識した。これらを共焦点レーザー顕微鏡にて観察し、GFP-CIMPR 融合タンパク質の詳細な局在を解析した。

3．FRAP（Fluorescence Recovery After Photobleaching）解析

生細胞において、TGN 領域の GFP-CIMPR の蛍光を高出力レーザー光にて消退させ、その後の同領域の蛍光回復過程を低出力のレーザー光によって経時的に観察した。TGN とそれ以外の領域のシグナル量の変化を 2-コンパートメントモデルによって解析し、1分間あたりに各コンパートメント間を移動する GFP-CIMPR の割合を算出した。

【結果】

1．GFP-CIMPR 融合タンパク質の細胞内分布様式と輸送動態の相違

核近傍の TGN 領域において、GFP-CIMPRfull および GFP-CIMPRtail は内在性 CIMPR と共局在を示した。しかし細胞末梢領域では、一部の GFP-CIMPRtail が内在性 CIMPR と共局在を示さなかった。また、FRAP 実験の結果、GFP-CIMPRfull は GFP-CIMPRtail に比べ、末梢コンパートメントに滞留する傾向のあることが分かった。

2．クロロキンによる局在変化の相違

酸性細胞内小器官の pH を上げる薬剤であるクロロキンで細胞を処理すると、内在性 CIMPR および GFP-CIMPRfull は、粗大なトランスフェリン受容体陽性の顆粒状構造物に局在を示すようになった。しかし、GFP-CIMPRtail はこのような局在変化を示さなかった。

3．U18666A による局在変化の相違

疎水性アミンである U18666A は後期エンドソーム/リソソームにコレステロールを蓄積させ、CIMPR の局在変化を誘導する。細胞を U18666A 存在下で培養すると、内在性 CIMPR および GFP-CIMPRfull は、特徴的な TGN シグナルを示さず、核周囲の散在する点状シグナルとして観察された。しかし GFP-CIMPRtail はこのような局在変化を示さなかった。

4．U18666A により誘導される特異的細胞内小器官の同定

U18666A により誘導された CIMPR 陽性の点状シグナルを、免疫染色法により詳細に解析したところ、これらは TGN、後期エンドソーム、およびリソソームではなく、その約 50%がトランスフェリン陽性のリサイクリングエンドソームに相当する事が示唆された。

5．M6P-リガンドの結合の有無が CIMPR 輸送に及ぼす影響について

M6P-リガンドとの結合能を欠く GFP-CIMPRfull（R426/1325A）は GFP-CIMPRfull と異なり、U18666A による局在変化を起こさなかった。しかし、FRAP 解析とクロロキン投与実験では GFP-CIMPRfull と同様の挙動を示した。

【考察および結論】

以上の結果から、1）CIMPR の細胞内輸送には細胞質外ドメインに依存した経路があり、同ドメインの存在により CIMPR が細胞末梢領域により長く滞留するようになること、2）CIMPR の輸送には、細胞質外ドメインに依存した経路に加え、M6P-リガンドの結合に依存した輸送ステップがあること、そして同過程はコレステロールの機能と関連すること、が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、リソソーム酵素の輸送を担うカチオン非依存性マンノース 6 リン酸受容体（CIMPR）の細胞内輸送における細胞質外ドメインの役割について解析したものである。その結果、CIMPR の細胞内輸送には細胞質外ドメインおよびリガンド（マンノース 6 リン酸を有するリソソーム酵素）に依存した経路があり、前者は細胞末梢領域での滞留時間を増加させ、後者はコレステロールの機能と関連すること、が示された。

以上の研究結果は、CIMPR の新たな細胞内輸送過程を提唱するものであり、同受容体の複雑な細胞内輸送の理解に寄与することから、本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。