

氏名	すぎもと ゆうこ 杉本 優子
学位の種類	博士 (生命科学)
学位記番号	甲第37号
学位授与年月日	平成16年 3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Accumulation of cholera toxin and GM1 ganglioside in the early endosome of Niemann-Pick C1-deficient cells (NPC1 欠損細胞初期エンドゾームでのコレラ毒素と ganglioside GM1 の蓄積)
学位論文審査委員	(主査) 佐藤 建三 (副査) 大野 耕策 島 義郎

## 学位論文の内容の要旨

Niemann-Pick 病 C 型 (NPC) は、常染色体性劣性遺伝の脂質代謝異常症である。主要原因遺伝子産物 NPC1 は、分子量 170~200kDa の 13~16 回膜貫通蛋白質であり、主に後期エンドゾームに局在し、このコンパートメントからの脂質の外向きの輸送に関わる。NPC1 欠損細胞の最も顕著な特徴は後期エンドゾーム/ライソゾームに遊離型コレステロール (CS) が蓄積することであるが、これは LDL (low-density lipoprotein) 由来の CS がこれらのコンパートメントから他の細胞内器官へ輸送されない為である。NPC1 欠損細胞では CS の他に、リン脂質、スフィンゴ脂質や糖脂質なども蓄積する。NPC 患者/NPC1 欠損マウスの脳では CS よりもむしろ糖脂質の蓄積が顕著であることから、その蓄積のメカニズムが注目されてきた。この研究の目的は、コレラ毒素 (CT) をプローブとして用い、NPC 細胞における GM1 の蓄積の部位とその機序を明らかにすることである。CT は A と B の 2 つのサブユニットから成る。B サブユニットは細胞表面の GM1 に特異的に結合する活性を持つ一方、A サブユニットは ADP-ribosyltransferase であり Gs タンパクを活性化する。

## 方法

実験にはレトロウイルスジーントラップ法により NPC1 を欠損した CHO 細胞 [NPC1(-)] とその野生株、および NPC1-flag を恒常的に発現する NPC1(-)(knock in 細胞)を用いた。蛍光色素標識コレラ毒素 [Cy5 標識ホロ毒素、FITC 標識 B サブユニット (CTB)] を作製し、NPC1(-)における CT の局在を抗 GM1 抗体および小胞マーカーに対する抗体を用いて解析した。また <sup>125</sup>I 標識 CT の細胞内での代謝を、野生株と比較検討した。

## 結果

NPC1(-)ではホロ毒素だけでなく、CTB も細胞内小胞に蓄積した。この小胞は主に細胞辺縁に存在し、抗 GM1 陽性だった。さらにこの小胞は Rab5 を含んでいることから初期エンドゾームであることが示さ

れた。NPC1(-)における CTB の蓄積は野生型 NPC1 を発現させると消失したが、変異型 NPC1 の発現では全く変化しなかった。発現させた変異型 NPC1 蛋白の一部は、CTB 蓄積小胞上に局在した。U18666A は NPC1 かその近縁の蛋白の機能を阻害することで NPC 細胞の表現型を誘導する。knock in 細胞をこの薬剤で処理すると、CTB の蓄積が生じ NPC1 の一部が CTB 蓄積小胞上に存在した。以上の結果は、NPC 1 が初期エンドゾームからの CT/GM1 複合体の輸送に直接に関与する可能性を示している。細胞膜表面の GM1 に結合した CT は初期エンドゾームへ輸送され、ホロ毒素のまま細胞膜へと運ばれ細胞外に排出されるか、逆行性輸送によりゴルジ体/小胞体へと運ばれる。どちらの経路が NPC1 依存性であるかを明らかにするために、<sup>125</sup>I 標識 CT のトレーサー実験を行った。正常細胞と比較すると、NPC1(-)では細胞内に取り込まれた <sup>125</sup>I-CT のクリアランスが遅延しており、その遅延は <sup>125</sup>I-CT が細胞外へ排出される量の減少と対応していた。これに加えて NPC1(-)では、A サブユニットの細胞内での産生量が正常細胞よりも多く、これと一致して、CT の cAMP 産生刺激効果は NPC1(-)で顕著に亢進していた。これらの結果は、初期エンドゾームから細胞膜への CT/GM1 の輸送が NPC 1 の機能に依存することを示している。

## 考 察

この研究により見出された初期エンドゾームでの GM1 の蓄積は、NPC 細胞の新しい表現型である。NPC1 は後期エンドゾームに局在し、このコンパートメントからの脂質の排出に関わるとされてきたが、本研究により、この蛋白質はエンドゾーム 系のより広い部分からの脂質の排出に関わることが明らかとなった。発現させた NPC1 の一部が CT を蓄積した小胞上に局在したことは、NPC1 が初期エンドゾームからの GM1 の排出に直接にかかわる可能性を示している。しかし、この局在は NPC1 の機能を分子生物学的（変異の導入）または薬理的（U18666A）方法により阻害した時にのみ明らかであり、定常状態で NPC1 が初期エンドゾームに存在するという証拠はない。従って、初期エンドゾームでの GM1 の蓄積は後期エンドゾーム/ライソゾームでの CS の蓄積に二次的なものであるという可能性も残されている。

## 結 論

NPC(-)では、初期エンドゾームに CT/GM1 が蓄積するが、これは初期エンドゾームから細胞膜への輸送が正常に比べて遅延しているためであることが示された。NPC1 は後期エンドゾームに局在し、このコンパートメントからの脂質の排出に関わるとされてきたが、本研究により、この蛋白質はエンドゾーム系のより広い部分からの脂質の排出に関わることが示唆された。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、コレラ毒素をプローブとして用い、NPC1 欠損細胞におけるガングリオシド GM1 の細胞内局在や代謝を正常細胞と比較、検討したものである。その結果、初期エンドゾームから細胞膜への GM1 の輸送が NPC1 蛋白依存的に行われているが、ゴルジ体/小胞体への輸送は独立していることを示した。NPC1 は後期エンドゾームからの脂質の排出に関わるとされてきたが、本研究により、この蛋白質はエンドゾーム 系のより広い部分からの脂質の排出に関わることが示唆された。本論文の内容は、NPC における細胞内脂質輸送の分野で、新たな NPC1 蛋白機能を示唆するものであり、明らかに学術水準を高めたものと認める。