

氏名	おおさき ゆうき 大崎 雄 樹
学位の種類	博士 (生命科学)
学位記番号	甲第41号
学位授与年月日	平成16年 9月30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	Reduced sensitivity of Niemann-Pick C1-deficient cells to $\theta$ -toxin(perfringolysin O): sequestration of toxin to raft-enriched membrane vesicles (NPC1 欠損細胞のシータ毒素感受性の減少：ラフトに富む膜小胞への毒素の集積)
学位論文審査委員	(主査) 佐藤 建三 (副査) 大野 耕策 畠 義郎

## 学位論文の内容の要旨

Niemann-Pick 病 C 型(NPC)は常染色体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 sterol sensing domain を持つ分子量 170-200kDa の 13-16 回膜貫通蛋白質であり、バクテリア脂質透過酵素 RND ファミリーに相同性を持ち、主に後期エンドゾームに局在して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表現型は後期エンドゾーム/ライソゾーム内の遊離型コレステロール(以下 CS)の蓄積であるが、これは LDL(low-density lipoprotein)由来 CS のこれらのコンパートメントから他の細胞内器官への輸送が障害されるために起こる。近年自然毒素が有効なプローブとして膜の脂質動態の解析に用いられている。NPC 細胞では細胞膜流動性が低下しており、自然毒素の一つ Filipin には低感受性を示すが、CS の細胞膜での動態は未だ不明である。本研究の目的は CS 結合能を持つ別種の自然毒素、シータ毒素に対する NPC 細胞の感受性を調べた上で、改変型シータ毒素をプローブとして用い NPC 細胞の細胞表面における CS の動態解析を通じて、毒素感受性のメカニズムを提唱することである。

## 方法

細胞毒性試験に用いたガス壊疽菌由来シータ毒素は、細胞表面のラフト内 CS に結合して多量体を形成し細胞膜に孔を開けてこれを障害する性質を持つ。CS 結合能を維持したまま細胞障害性を除いたビオチン化シータ毒素(BC $\theta$ )を CS のプローブとして用いた。主な観察対象細胞として

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、及び NPC1 を再導入しこれを恒常的に発現する NPC1(-) (knock in)を用いた。シータ毒素に対する感受性は細胞毒性 (LDH release assay) と生存率 (MTT assay) の測定により検討した。BC $\theta$  は FITC 標識アビジンにより可視化し、電子顕微鏡により細胞膜微細構造を観察した。ショ糖密度勾配遠心分画法を用いて BC $\theta$  の局在を NPC1(-)と野生株で比較検討した。

## 結 果

NPC1(-)は野生株に比べシータ毒素に対する感受性が低かった。蛍光顕微鏡観察において、BC $\theta$  は CHO 野生株及び knock in では細胞表面に一樣に結合したのに対し NPC1(-)では大型のドット状に集積していた。走査型、透過型電子顕微鏡観察により細胞表面あるいは細胞外空間に径 1  $\mu$ m 弱の BC $\theta$  陽性小胞が NPC1(-)においてより多く観察された。BC $\theta$  の結合は 1% Triton X-100 処理に耐性であり、ショ糖密度勾配遠心による分画では floating low density fractions (FLDF)に回収され、シクロデキストリン処理により消失した。これらの結果は BC $\theta$  がラフト中の CS に結合する事を示唆する。BC $\theta$  を結合する NPC1(-)の細胞表面膜小胞は LDL 除去培地 (LPDS) で培養して CS を枯渇させると消失し、薬理的に細胞内 CS 蓄積を誘導した野生株では同様の膜小胞が生じた。さらに、Rho A-GTPase のエフェクター分子である ROCK に対する阻害薬 Y-27632 を用いて細胞膜裏打ちアクチン繊維の重合を阻害すると、細胞内 CS の蓄積を残したまま BC $\theta$  陽性小胞が減少し、毒素感受性は野生型と同じ程度になった。

## 考 察

本研究以前より知られていた、コレステロールに結合する別種の自然毒素 Filipin に対する NPC 細胞の低感受性の原因としては、(1)細胞内に取り込まれた毒素がエンドゾーム内蓄積 CS に干渉されて活性を発揮できない (2)細胞膜へのコレステロール供給量が不足しており細胞膜への毒素結合量が減少する等が提唱されていた。シータ毒素に対する CHO NPC1(-)の低感受性の原因としては、(1)シータ毒素は細胞膜に留まり細胞内へ進入せず(2)シータ毒素の結合量はむしろ NPC 細胞で増えていたことから Filipin 低感受性についての上記説明(1)(2)は否定された。本実験の結果から新たに(3)NPC 細胞の細胞膜上では CS/ラフトが外向きに突出した膜小胞に偏って局在しており、これらに集中した毒素は細胞障害性が低い (膜に穴を開けにくい/細胞質の流出が起こりにくい) ためであるという説を提唱する。

## 結 論

NPC 細胞では細胞膜 CS に富んだラフトが増加し、生理的意義の未解明な小胞として排出されることが示唆された。また NPC 細胞で見られたシータ毒素低感受性は、細胞膜で形成が亢進した膜小胞に毒素が集積することが原因と示唆された。本研究は、今後モデル動物組織中で小胞の排出現象を確認した上で、特定細胞種のラフト局在分子の解析を通じて神経細胞死の機序解明に発展すると期待された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、コレステロール(CS)結合能を持つガス壊疽菌シータ毒素をプローブとして用いて NPC1 欠損細胞の細胞表面での CS 局在を調べたものである。その結果、NPC1 欠損細胞では細胞膜から CS を含むラフトに富んだ小胞を正常細胞に比べて優位に多く排出しており、毒素の小胞への集積が NPC1 欠損細胞のシータ毒素低感受性の原因であると示唆された。本研究により NPC 細胞の細胞膜では CS が集中したラフトの分布異常が明らかとなり、今後 NPC 病の病態を解明する上で新たな足がかりができたことから明らかに学術水準を高めたものと認める。