

論文審査の結果の要旨

氏名：奥 寺 紀 智

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Ionomycin が vesicular stomatitis virus glycoprotein の小胞体—ゴルジ体間のタンパク質輸送に与える影響

審査委員：(主査) 教授 鈴木 直 人

(副査) 教授 浅野 正 岳 教授 落合 邦 康

教授 白川 哲 夫

Vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSV-G) は小胞体内で正しく折りたたまれ、3量体を形成したのちに小胞体から輸送される。正しく折りたたまれなかった VSV-G はプロテオソームでの分解を受ける。これは、タンパク質の品質管理システムと呼ばれ、シャペロン分子が主体的な役割を演じている。小胞体において VSV-G と結合するシャペロン分子は immunoglobulin heavy chain binding protein と calnexin であり、この結合にはカルシウムイオンが極めて重要と考えられているが、小胞体内のカルシウムイオンの強制的な放出と VSV-G のゴルジ体への輸送については詳細な報告はない。そこで本研究では、calcium ionophore である ionomycin の小胞体—ゴルジ体間の VSV-G 輸送に対する影響について検討することにした。

Baby hamster kidney (BHK) 細胞およびヒト線維芽細胞 HeLa に recombinant vaccinia virus を用いて VSV-G plasmid の transfection を行い、transfection 後の細胞を、Tran-³⁵S-label により metabolic labeling した。この細胞を培養し、経時的な VSV-G の糖鎖修飾の違いを免疫沈降法とこれに続く endoglycosidase H での消化実験によって検出することで VSV-G の輸送の状況について観察した。また、ionomycin の影響については細胞を ionomycin 存在下または非存在下に培養し、同様の方法で検討した。シャペロン分子との結合状態の検討は、免疫沈降実験と Western blot 法を用いて行った。また、VSV-G の細胞内輸送状況の形態学的な観察は、VSV-G の温度感受性変異体である tsO45 に green fluorescence protein (GFP) を標識し、これを transfection することにより観察した。さらに、多量体免疫グロブリン分子の結合に関与する joining (J)-chain の小胞体からの輸送に対する ionomycin の影響については、上記と同様の方法により検討した。

その結果、以下の結論を得た。

1. Ionomycin は BHK, HeLa 両細胞において、小胞体—ゴルジ体間の VSV-G 輸送を濃度依存的に阻害した。
2. Ionomycin 濃度 5 μ M において VSV-G 輸送は約 50% 抑制された。
3. 阻害効果は、VSV-G の細胞質内領域には依存しなかった。
4. GFP-tsO45 mutant を用いて検討し、形態学的にも ionomycin の VSV-G 輸送阻害効果が確認された。
5. 培養液中に EGTA を添加すると、ionomycin 存在下においてのみ VSV-G 輸送を著しく抑制した。
6. HeLa 細胞においては、ionomycin は VSV-G と calnexin の結合を遷延させた。
7. J-chain は ionomycin により細胞外に分泌された。

本研究は、小胞体—ゴルジ体間タンパク質輸送がカルシウムイオン濃度に依存していることを明らかにしたもので、シャペロン分子と輸送されるタンパク質の相互作用に新たな知見を加えたものであり、細胞生物学分野に寄与するところが大きいと考えられた。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成27年12月24日