

氏名（本籍）	花館 有希		
学位の種類	博 士（理学）		
学位記番号	博 甲 第 9 0 4 2 号		
学位授与年月日	平成 3 1 年 3 月 2 5 日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	The Membrane Traffic from the Endoplasmic Reticulum to the Plasma Membrane in <i>Entamoeba histolytica</i> : The Analysis of Rab8A GTPase (赤痢アメーバにおける小胞体から細胞膜へのタンパク質輸送 Rab8A GTPase の解析)		
主査	筑波大学教授	学術博士	橋本 哲男
副査	筑波大学教授（連携大学院）	博士（医学）	永宗 喜三郎
副査	筑波大学教授	博士（理学）	稲垣 祐司
副査	筑波大学准教授（連携大学院）	博士（理学）	守屋 繁春

論 文 の 要 旨

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) は、アメーバ赤痢を引き起こす腸管寄生原虫であり、毎年5000万人もの新規感染者が報告されている。アメーバ赤痢は重要な寄生虫疾患であるにも関わらずその治療薬に乏しいため、新規薬剤の開発に向けた基礎研究の進展が望まれている。とくに病原性に関与する細胞機能の研究は重要である。真核細胞のメンブレントラフィックにおいて膜融合を制御するRabはGTPaseの一群であり、赤痢アメーバでは、現在までに病原性に関与するRab GTPaseが複数報告されている。本論文の著者は、それらの中で、宿主赤血球をはじめさまざまな対象物の貪食への関与が示唆されているEhRab8Aを対象に、小胞体から細胞膜へのタンパク質輸送に着目して研究を行った。

本論文の第1章で著者は、EhRab8Aが貪食に関与する細胞表面タンパク質の輸送を担っていることを確認するため、変異型EhRab8A株を用いて評価した結果について述べている。著者はまず、野生型・変異型それぞれの大量発現株を作製し、細胞表面へのタンパク質輸送を赤血球の貪食効率で評価することにより、EhRab8Aが貪食に必要な表面タンパク質を輸送していることを裏付けた。次に著者は、間接蛍光抗体法によりEhRab8Aの細胞内局在を探索し、EhRab8Aが、哺乳類や酵母のRab8Aとは異なる赤痢アメーバ特有の局在を示すことを明らかにした。また、複数のオルガネラマーカーを用いた解析から、小胞体シャペロンタンパク質であるBipとの共局在を確認する一方で、小胞体からの分泌タンパク質の詰込みに関与するCOP II 小胞のコンポーネントSec13との共局在がなく、小胞体の特定のコンパートメントに局在することを示した。これらのことから著者は、EhRab8Aが担う輸送経路が小胞体から細胞膜であることを明らかにした。

第2章で著者は、EhRab8Aの相互作用タンパク質の探索を行った結果について述べている。著者はまず、blue native PAGEによって、EhRab8Aが細胞内で約87kDaの複合体を形成していることを確認した。その後、mycRab8A大量発現株と抗myc抗体を用いた共免疫沈降法により、35kDaと40kDaのタンパク質の共沈を確認し、35kDaのバンドから、ヒトのリン脂質フリッパーゼP4-ATPaseの非触媒サブユニットであるHsCdc50と33%の相同性を示すCdc50ホモログ(Ehcdc50)を同定した。次に、EhCdc50の抗体を作製し細胞内局在の観察を行い、EhCdc50が細胞膜表面に局在していることを示した。一方、HA-EhCdc50大量発現株で、細胞内部への蓄積が認められたことから、著者は、ヒトで観察されている、Cdc50とP4-ATPaseが同レベルで発現していない場合に、本来の局在と異なるオルガネラへ輸送されるという現象がHA-EhCdc50大量発現株でも起こっていると考えた。さらに著者は、HA-EhCdc50大量発現株とEhRab8A発現抑制株を用い、細胞内への取り込みに細胞膜上のフリッパーゼ活性を必要とする抗原虫薬（ミルテホシン）への感受性を評価した。双方の株が対照群と比べてミルテホシンへの耐性を示したため、著者は、細胞膜上へのCdc50-P4-ATPase複合体の提示が低下している可能性を示唆した。これらのことから著者は、フォスフォコリンのフリップを担うCdc50-P4ATPase複合体が、EhRab8Aによって細胞膜へ輸送されている可能性が高いと結論した。

審 査 の 要 旨

哺乳類や酵母において Rab8 ホモログは、トランスゴルジネットワークから細胞膜への輸送を担うとされているが、食食への関与の報告はない。一方、赤痢アメーバの Rab8 ホモログ (EhRab8A) の機能として、病原性の発現において重要な食食への関与が示唆されていた。本論文の著者は、細胞生物学と生化学の手法を駆使して、EhRab8A が食食に関与する細胞表面タンパク質を小胞体から細胞膜へと輸送することを示し、とくに、フォスフォコリンのフリップを担う Cdc50-P4ATPase 複合体を細胞膜へ輸送する可能性を示唆した。著者が、一連の実験を論理的に構成して綿密に進め、膨大なデータに基づいて優れた成果を導き出した点は高く評価できる。また、哺乳類や酵母では知られていない新規の輸送経路の発見により、赤痢アメーバにおける独自の細胞機能進化の一端を示した意義は大きい。

平成31年1月29日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。