

## 論文内容の要旨

申請者氏名 MAISARAH BINTI AB FATAH

脂質膜とタンパク質の相互作用は、代謝や細胞内シグナル伝達だけでなく、細胞内小器官の形成や変形を介した様々な生命現象に不可欠である。Bin-Amphiphysin-Rvs (BAR)ドメインを有するタンパク質は、脂質膜の曲率を形成あるいは検出するタンパク質として知られてきた。Extended Fes-CIP4 homology (EFC)/FCH-BAR (F-BAR)ドメインは、BARドメインのサブファミリーを形成する。CIP4タンパク質のF-BARドメインの研究などにより、BARドメインは、脂質膜にホモ二量体として結合し、さらに、多量体を形成することが明らかになっている。また、CIP4やPACSIN2タンパク質のF-BARドメインは、クラスリン被覆小孔やカベオラなどの高い曲率を持つ膜構造に局在する。それぞれのBARドメインタンパク質は、多量体の立体構造に依存し、脂質膜の曲率を形成あるいは検出すると考えられている。しかし、この多量体形成機構は、ほとんどのBARドメインにおいて未解明のままである。Growth-Arrest-Specific-Protein-7 (GAS7)は、SH3ドメイン、WWドメイン、F-BARドメインを持つタンパク質であり、ラメリポディアなどの比較的平面的な構造に局在することが知られていた。

本研究では、GAS7のF-BARドメインの立体構造に着目し、GAS7の脂質膜結合様式、特に、平面膜上での多量体形成機構を解析した。まず、脂質膜共沈降実験により脂質膜との結合が、塩基性アミノ酸と酸性脂質のあいだの静電的な相互作用によることを見出した。次に、GFP融合GAS7を巨大単層リポソーム(GUV)と結合させ、GAS7の局在を調べると、GUVの表面に平面状にGAS7が集合している様子が見られた。次に、クライオ電子顕微鏡によりGUVを観察したところ、GAS7タンパク質により、およそ19 nmと6 nmの周期を持つ特徴的な縞模様が見られた。この周期は、GAS7のF-BARドメインの大きさとほぼ一致する。したがって、この縞模様は、GAS7が脂質膜上で多量体を形成していることを示唆した。

GAS7 F-BARドメインの結晶中では、GAS7のF-BARドメインは、特徴的なループ構造を介して、互いに接し、F-BARドメイン分子の同じ表面が、同じ方向を向き整列していた。結晶中でのF-BARドメイン同士の相互作用が、脂質膜上でも保存されていると考え、結晶中で見られたF-BARドメインどうしのループ構造を含む接触部位に変異を導入した。その結果、ループを欠損した場合には、顕著な脂質膜結合の減少が見られた。さらに、ループ構造の安定に寄与するアミノ酸残基に変異を導入したところ、脂質膜結合の減少がみられた。また、結晶中でのGAS7多量体の形成する表面が、脂質膜結合面であることを、タンパク質表面の塩基性アミノ酸に変異を導入することで見出した。さらに化学架橋剤を処理することで、多量体形成を調べたところ、脂質膜の存在は、多量体形成を促進すること、また、ループ構造の安定性は、多量体形成に寄与することを見出した。

以上の結果は、GAS7は、そのタンパク質結晶中と類似の集合様式を持って、多量体を形成し、平面的な脂質膜に結合することを見出した。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名      MAISARAH BINTI AB FATAH

脂質膜とタンパク質の相互作用は、生命現象にとって不可欠である。特に、脂質膜の形状決定機構の解析は、ほとんどの生命現象が、脂質膜で形成された小器官によっていることを考えると、非常に重要である。BAR ドメインタンパク質は、脂質膜結合タンパク質である。BAR ドメインは高次集合する性質を持ち、高次集合したタンパク質表面形状によって、脂質膜の形状を制御あるいは検出すると考えられている。BAR ドメインは BAR、F-BAR、I-BAR の三種のサブファミリーに分けられる。F-BAR ドメインは、クラスリン被覆小孔などの高い曲率を持つ膜との結合機構が調べられているが、ラメリポディアなどの比較的低い曲率を持つ平面状の膜との相互作用はそれほど調べられてこなかった。本研究では、ラメリポディアやファゴサイトーシスカップなどの平面状の脂質膜に結合することが想定される F-BAR ドメインを持つ GAS7 タンパク質の脂質膜との結合を調べた結果、新規な F-BAR ドメインタンパク質の脂質膜上での平面状の集合機構を見出した。ラメリポディアやファゴサイトーシスカップなどの平面状の膜構造は、細胞の貪食機能や、細胞移動機構などの基礎であることから、本研究は、これらの構造形成を理解する上で重要である。

第一の発見は、GAS7 が、脂質膜上で周期的な多量体を形成し、 $10\text{-}100\ \mu\text{m}^2$  に達する平面状の集合体を形成することである。F-BAR ドメインは、多数知られているが、これまでに平面状に広がりを持って脂質膜に結合するものは知られていなかった。脂質膜共沈降実験、巨大単層脂質膜の蛍光顕微鏡観察およびクライオ電子顕微鏡観察により、脂質膜上に平面状で周期的な GAS7 の多量体を見出した。

第二の発見は、GAS7 の脂質膜での多量体が、タンパク質結晶中と同様の相互作用によって形成されていることである。具体的には、多量体形成は、GAS7 の表面の特徴的なループ構造に依存し、また、多量体としてのタンパク質表面が、脂質膜結合に寄与することを発見した。ここでは、クライオ電子顕微鏡により得られた周期構造は、GAS7 F-BAR ドメインのタンパク質結晶中で見られる F-BAR ドメインの周期構造とほぼ一致していたことから、結晶中での F-BAR ドメインどうしの接触部位に変異を導入し、作成された多数の変異体の脂質膜結合と多量体形成を、脂質膜共沈降実験、化学架橋剤を用いた実験でそれぞれ示すことで、結晶中のドメインどうしの接触部位が、脂質膜結合と、脂質膜上での多量体形成に寄与することを示した。また、細胞においても、変異体は細胞膜上で集合しなかったことから、試験管内と類似の機序で細胞内でも GAS7 は多量体を形成していると考えられた。

以上のように、本論文は、細胞移動や貪食作用に関わる脂質膜構造形成の基礎を提供するものであり、また、タンパク質結晶と同様のタンパク質の高次集合機構を脂質膜上で明瞭に示したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。