

論文内容の要旨

申請者氏名 Aini Gusmira Amir

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。PACSIN2タンパク質などの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細胞膜構造に局在する。ところが、これらの膜構造は、特有の脂質膜組成を持っていると考えられるが、F-BARドメインの脂質膜組成に依存した膜結合および変形能の調節は調べられてこなかった。

本研究では、PACSIN2とその機能するカベオラに注目した。カベオラを構成する主な脂質には、コレステロール、スフィンゴ脂質、フォスファチジルセリン、フォスファチジルコリンが含まれる。スフィンゴ脂質は、細胞膜の細胞質側には存在しないため、細胞質に存在するPACSIN2と相互作用する脂質は、コレステロール、フォスファチジルセリン、フォスファチジルコリンの3種である。一方で、コレステロールは、カベオラの形成に必要不可欠であることが知られている。PACSIN2の膜結合におけるコレステロールの役割を調べるために、フォスファチジルセリンとフォスファチジルコリンにより再構成した脂質膜と、フォスファチジルコリン、フォスファチジルセリン、コレステロールにより再構成した膜に対する結合を調べた。興味深いことに、PACSIN2の脂質膜の結合は、コレステロールの存在によって減弱することがわかった。このコレステロールによるPACSIN2の結合調節は、PACSIN2のF-BARドメインによって担われていることが、PACSIN2のF-BARドメイン断片とPACSIN2の全長タンパク質の膜結合をそれぞれ調べることによりわかった。

次に、PACSIN2による脂質膜の形態形成がコレステロールに依存しているか、電子顕微鏡を用いて、PACSIN2存在下での再構成膜の形態を観察することにより調べた。その結果、コレステロールを含まない脂質膜は、PACSIN2によって直線上のチューブ構造に変換されたが、コレステロールを含む脂質膜はPACSIN2によって、カベオラに類似した大きさの小胞が繋がったような形態に変換されることがわかった。すなわち、コレステロールの存在は、PACSIN2による脂質膜の形態形成を変化させることがわかった。

さらに、カベオラを持つ培養細胞株を用いて、コレステロール依存的なPACSIN2の膜変形を調べた。培養細胞株の細胞膜に含まれるコレステロールをメチル- β -シクロデキストリンを添加することによって除去すると、PACSIN2の局在するチューブ構造の形成が観察された。また、このチューブ構造にはカベオラの構成タンパク質であるcaveolin-1が含まれていた。このチューブ構造は短時間でcaveolin-1と同時に消失することから、コレステロールの非存在下でカベオラを細胞膜から除去する働きを、PACSIN2が担っていることが示唆された。

やむを得ない事由[図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他()]により本要旨を非公表とする。

【 該当する事由に 印をすること】

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Aini Gusmira Amir

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やカベオラ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、これらの膜構造における脂質成分が、BAR ドメインの脂質膜結合や変形に及ぼす役割はそれほど調べられてこなかった。本研究では、カベオラにおいて機能することが知られている PACSIN2 の脂質膜結合における役割を、カベオラに多く含まれる脂質を用いて再構成した脂質膜を用いて調べた結果、PACSIN2 の膜結合能の新規なコレステロールによる負の制御機構を明らかにした。カベオラは、エンドサイトーシス装置であるばかりでなく、細胞における張力を緩和するためのオルガネラと考えられ、その破綻は、収縮が機能に重要な血管内皮細胞や筋肉細胞の異常を引き起こすことが知られている。カベオラ形成にはコレステロールが必要不可欠であることが知られていたことから、本研究は、カベオラの構造形成を理解する上で重要である。

第一の発見は、PACSIN2 による膜結合が、コレステロールによって負に制御されることをカベオラに含まれる脂質を用いて再構成した脂質膜を用いた試験管内再構成実験によって示したことである。これまでに PACSIN2 に限らず、F-BAR ドメインは、多数知られているが、コレステロールにより、脂質膜への結合が制御されている例はこれまで知られていなかった。用いた脂質膜の性質を、物理化学的な測定により確認しつつ、PACSIN2 と脂質膜の結合を脂質膜共沈降実験などにより調べることで、コレステロールによる PACSIN2 の脂質膜の結合の調節を見出した。

第二の発見は、PACSIN2 による脂質膜の形態形成が、コレステロールにより変化することを、試験管内の再構成実験および、培養細胞を用いた実験により示したことである。脂質膜共沈実験に用いた脂質膜を電子顕微鏡で観察した結果、PACSIN2 はコレステロールにより、その脂質膜の変形様式を変化することを見出した。具体的にはコレステロールは、PACSIN2 が形成する膜を直線上のチューブ構造から、カベオラに類似しているとも考えることができる湾曲した構造に変化させた。また、細胞において、細胞膜からコレステロールを除去すると、PACSIN2 はチューブ構造を形成するようになり、また、これらの PACSIN2 の局在するチューブ構造は、カベオラの消失に関与していると推定された。したがって、コレステロールによる PACSIN2 と脂質膜の結合の負の制御は、コレステロールが存在しない場合にカベオラを除去する役割を持っていることが示唆された。

以上のように、本論文は、細胞の張力応答や物質輸送に関わる脂質膜構造形成の基礎を提供するものであり、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。

やむを得ない事由[図書出版、学術雑誌等への掲載、特許・実用新案出願、個人情報等の保護、その他()]により本要旨を非公表とする。

【 該当する事由に 印をすること】