

## 論文内容の要旨

博士論文題目      Morphological change of vesicle and cell membranes by interaction with domain-swapped cytochrome *c* oligomers (ドメインスワップシトクロム *c* 多量体との相互作用によるベシクルおよび細胞膜の形態変化)

氏      名              Junedi, Sendy

(論文内容の要旨)

シトクロム *c* (cyt *c*) はミトコンドリアの呼吸鎖で電子を伝達するヘムタンパク質である。Cyt *c* は正に帯電しており、リポソームの負に帯電した領域と相互作用すると、リポソームの形態変化が誘起される。Cyt *c* は C 末端  $\alpha$  ヘリックスを交換するドメインスワッピング機構により多量体を形成することが報告されたが、cyt *c* の多量化が細胞に与える影響は未解明のままである。本論文では、ドメインスワップ cyt *c* 多量体がベシクルおよび細胞膜の形態に及ぼす影響を明らかにすることを目的としている。

第 1 章では、細胞とミトコンドリア、cyt *c* の構造と機能、cyt *c* と脂質の相互作用様式を説明し、本研究の位置づけを示している。

第 2 章では、アニオン性脂質 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG) と中性脂質 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycholine (混合比 1:1) で構成される、直径 100 nm 程度の大きな単層ベシクル(LUV) との相互作用によるタンパク質の沈澱量を調べ、高次 cyt *c* 多量体が単量体や小さな多量体よりも強くベシクル膜と相互作用することを明らかにした。Cyt *c* 2 量体や 12 量体を LUV に作用させると、脂質組成の異なる領域をベシクルに誘起することが示差走査熱量測定により明らかとなった。さらに、cyt *c* 12 量体を直径 1  $\mu$ M 以上の巨大単層ベシクルに添加すると、ベシクルの収縮および破壊が観察され、高次 cyt *c* 多量体がベシクル膜の形態変化を引き起こすことが明らかとなった。

第 3 章では、ドメインスワップ cyt *c* 多量体と HeLa 細胞の相互作用をポリアクリルアミドゲル電気泳動により調べ、高次 cyt *c* 多量体が cyt *c* 単量体や小さな多量体よりも強く HeLa 細胞の外膜表面と相互作用することが明らかとなった。Cyt *c* 12 量体を HeLa 細胞に添加すると、多くの細胞が培養皿表面から離れ、細胞表面に突起が観測された。同様の形態変化は cyt *c* 2 量体を HeLa 細胞に添加しても観察されたが、損傷する細胞は cyt *c* 12 量体のときより少なく、単量体では観察されなかった。これらの結果は、細胞形態変化が高次 cyt *c* 多量体を作用させたときの方が単量体や小さな多量体を作用させたときよりも大きいことを示している。

第 4 章では、本論文の総括が示されている。

以上のように、本論文では、ドメインスワップ cyt *c* 多量体がアニオン性リン脂質を含むベシクルや HeLa 細胞の外膜に強く結合することで膜の相分離と破壊が誘起され、cyt *c* 2 量体および 12 量体が HeLa 細胞膜に結合する強さに応じて細胞が損傷を受けることを明らかにし、ドメインスワップしたタンパク質多量体の新規機能を示した。

氏名	Junedi, Sedy
----	--------------

(論文審査結果の要旨)

タンパク質の構造と機能は密接に関係し、生体内で高度に制御されている。シトクロム *c* (cyt *c*) は、ミトコンドリアの呼吸鎖で電子を伝達し、細胞がアポトーシス刺激を受けるとミトコンドリアから細胞質ゾルへ放出される。Cyt *c* の表面は正に帯電しているが、内部は疎水的であり、cyt *c* はアニオン性脂質と静電的および疎水的に相互作用する。Cyt *c* は負に帯電した脂質を含むリポソームと相互作用すると、リポソームに形態変化を引き起こす。また、cyt *c* は C 末端  $\alpha$  ヘリックスを交換するドメインスワッピング機構により多量化することが報告されたが、cyt *c* 多量体が細胞へ与える影響は未解明のままである。

本論文では、cyt *c* の多量化が細胞膜の形態に与える影響を明らかにすることを目的としている。Cyt *c* 多量体のベシクル膜との相互作用を示差走査熱量測定および蛍光顕微鏡観察、HeLa 細胞膜との相互作用をポリアクリルアミドゲル電気泳動および顕微鏡観察により調べた。本論文で得られた成果は以下の通りである。

1. アニオン性脂質 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG) を含む、直径 100 nm 程度の大きな単層ベシクル(LUV)にドメインスワップ cyt *c* 多量体を作用させたときのタンパク質の沈澱量から、高次 cyt *c* 多量体が単量体や小さな多量体よりも強くベシクル膜の DPPG と相互作用することを明らかにした。DPPG を含む LUV に cyt *c* 2 量体や 12 量体を作用させると、脂質組成の異なる領域がベシクルに誘起されることを示差走査熱量測定により明らかにした。さらに、cyt *c* 12 量体を直径 1  $\mu$ M 以上の巨大単層ベシクルに添加すると、ベシクルの収縮および破壊が起こり、高次 cyt *c* 多量体がベシクル膜の形態変化を引き起こすことを明らかにした。

2. 高次 cyt *c* 多量体が cyt *c* 単量体や小さな多量体よりも強く HeLa 細胞の外膜表面と相互作用することをポリアクリルアミドゲル電気泳動により明らかにした。Cyt *c* 12 量体を HeLa 細胞に添加すると、多くの細胞が培養皿表面から遊離し、細胞表面に突起が観測された。形態変化する HeLa 細胞は、cyt *c* 2 量体を添加した場合、cyt *c* 12 量体のときより減少し、単量体を添加しても観察されなかった。以上の結果から、高次 cyt *c* 多量体が単量体や小さな多量体よりも強く HeLa 細胞と相互作用し、大きな細胞形態変化を引き起こすことを明らかにした。

以上のように、本論文では、ドメインスワップ cyt *c* 多量体がアニオン性リン脂質を含むベシクルや HeLa 細胞の外膜と強く結合し、膜の相分離と破壊を誘起することを明らかにした。Cyt *c* 2 量体および 12 量体が HeLa 細胞膜に結合する強さに応じて細胞に損傷を与えることも示した。これらの結果はタンパク質多量体に新しい知見を与えるものであり、本論文で得られた結果は生体分子科学分野、タンパク質科学分野の研究として高く評価でき、学術的に大きな意義がある。よって、審査委員一同は本論文が博士(理学)の学位論文として価値あるものと認めた。