

様 式 F - 7 - 1

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成 2 8 年度）

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名 基盤研究(C)（一般） 4. 補助事業期間 平成 2 8 年度～平成 3 0 年度

5. 課題番号

1	6	K	0	7	3	5	1
---	---	---	---	---	---	---	---

6. 研究課題名 脂質膜突起形成 I-BAR タンパク質による新規分泌小胞形成機構の解明

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
4 0 3 9 1 9 9 0	スエツグ キョウコ 末次 京子（埴京子）	バイオサイエンス研究科	助教

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

B A R (Bin-Amphiphysin-Rvs161/167) タンパク質は脂質結合タンパク質である。B A R タンパク質は脂質膜の表面で B A R ドメイン同士が規則正しく重合することにより、脂質膜をチューブ様構造に誘導することができる。B A R タンパク質のサブファミリーの一つであり、細胞膜の突起構造を誘導する B A R タンパク質は、ラメリポディアやフィロポディアに代表される細胞膜の突起構造形成に関与していることが知られている。本研究では細胞膜突起構造に関与する B A R タンパク質は、これまで考えられてきたように単に脂質膜突起構造の誘導を行っているだけではなく、B A R タンパク質により誘導された細胞膜突起を切断し、細胞外分泌小胞形成を誘導しているのではないかと考え、その仮説を検証することを目的としている。

平成 2 8 年度は脂質膜突起構造を誘導する B A R ファミリータンパク質遺伝子を、タンパク質発現系である pGEX6p プラスミドにクローニングし、大腸菌による大量発現およびタンパク質精製を行うことが出来た。精製タンパク質を用いて、人工脂質膜との結合と脂質膜切断活性を調べたところ、これらの B A R タンパク質は脂質と結合し脂質膜切断活性を持つことが示唆された。また、電子顕微鏡観察により、人工脂質膜が B A R タンパク質により小胞化されていることも確認できた。さらに CRISPR/CAS9 システムを用いて頭頸部がん細胞、グリオーマ腫瘍細胞、HeLa 細胞の脂質膜突起構造を誘導する B A R 遺伝子のノックアウト細胞を作製することが出来た。

10. キーワード

- | | | | |
|---------|----------|--------------|-----------|
| (1) 脂質膜 | (2) 分泌小胞 | (3) BARタンパク質 | (4) 脂質膜切断 |
| (5) | (6) | (7) | (8) |

11. 現在までの進捗状況

(区分)(1) 当初の計画以上に進展している。

(理由)

申請書の研究計画に通り、脂質膜突起誘導型BARタンパク質の大量発現系の構築、およびタンパク質の精製を順調に行うことが出来た。それらの試料を用いて、精製タンパク質と人工脂質膜との結合および脂質膜切断実験も行い、脂質膜突起誘導型BARタンパク質の脂質膜結合活性と脂質膜切断活性を確認することが出来た。
脂質膜突起誘導型BARタンパク質による人工脂質膜切断は、特定の脂質組成および脂肪酸の飽和度などが切断活性に影響を与えていることを示唆するデータが得られてきた。脂質膜突起誘導型BARタンパク質の変異体を用いて検証を行ったところ、一部のBARタンパク質を持つ両親媒ヘリックスは脂質切断に影響を与えていないことも明らかになった。
また、CRISPR/CAS9システムを用いて、新たに頭頸部がん細胞、グリオーマ腫瘍細胞、HeLa細胞のIRSp53ノックアウト細胞を作製することが出来た。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

前年度に引き続き、脂質膜突起誘導型BARタンパク質による脂質膜切断機構を分子レベルで明らかにするため、新たに作成した脂質膜突起誘導型BARタンパク質ノックアウト細胞を用いて、脂質膜突起誘導型BARタンパク質により細胞外分泌小胞形成が誘導されているかを検証する。そのため、脂質膜突起誘導型BARタンパク質のGFP融合タンパク質の発現プラスミドを作成し、ノックアウト細胞にトランスフェクションする。それらの細胞の培養上清を回収し、超遠心法により細胞外分泌小胞を精製し、そこに脂質膜突起誘導型BARタンパク質が含まれていないかをウエスタンブロッティングによって検出する。また、回収した細胞外分泌小胞はマスマイクトル解析により調べる予定である。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

(使用計画)

(課題番号： 16K07351)

(注) ・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

13. 研究発表 (平成 28 年度の研究成果)

〔雑誌論文〕 計(1)件/うち査読付論文 計(1)件/うち国際共著 計(0)件/うちオープンアクセス 計(1)件

著者名		論文標題				
Itoh Y, Kida K, Hanawa-Suetsugu K, Suetsugu S.		Yeast Ivy1p Is a Putative I-BAR-domain Protein with pH-sensitive Filament Forming Ability in vitro.				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
Cell Struct Funct.	有	41	2016	1-11	-	
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)						
10.1247/csf.15014						
オープンアクセス						
オープンアクセスとしている(また、その予定である)						

〔学会発表〕 計(5)件/うち招待講演 計(1)件/うち国際学会 計(0)件

発表者名		発表標題	
多羅尾賢斗、塙京子、末次志郎		カドヘリンの局在化におけるI-BARタンパク質IRSp53の役割	
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本細胞生物学会(招待講演)	2016年06月15日～ 2016年06月17日	京都テルサ(京都府京都市)	

発表者名		発表標題	
塙京子、福永優也、清水亜里沙、末次志郎		新規結合タンパク質によるF-BARタンパク質CIP4の管状形成阻害機構の解明	
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本細胞生物学会	2016年06月15日～ 2016年06月17日	京都テルサ(京都府京都市)	

発表者名	発表標題	
久保田悟、塙京子、末次志郎	F-BARタンパク質GAS7と脂質膜の相互作用の解析	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本分子生物学会	2016年11月30日～ 2016年12月02日	パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

発表者名	発表標題	
大山拓也、木田和輝、北又学、塙京子、末次志郎	M I MのI-BARドメインと脂質との相互作用	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本分子生物学会	2016年11月30日～ 2016年12月02日	パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

発表者名	発表標題	
磯野早織、久保田悟、中原明香、塙京子、末次志郎	GAS7と相互作用する新規タンパク質の探索	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本分子生物学会	2016年11月30日～ 2016年12月02日	パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

〔図書〕 計(0)件

著者名	出版社		
書名	発行年	総ページ数	

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取得〕 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計(0)件

国際研究集会名	開催年月日	開催場所

16. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

(1) 国際共同研究：-

17. 備考

--