

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29年度）

所属研究機関名称		奈良先端科学技術大学院大学	機関番号	14603
研究 代表者	部局	バイオサイエンス研究科		
	職	教授		
	氏名	末次 志郎		

1. 研究種目名 挑戦的研究（萌芽） 2. 課題番号 17K19529

3. 研究課題名 アンキリンリピートによるBARドメイン様の脂質膜の形態制御機構の研究

4. 補助事業期間 平成29年度～平成31年度

## 5. 研究実績の概要

2017年度の研究では、ANKHD1のアンキリンリピートドメインによる切断機序を解析した。立体構造予測によれば、多数のアンキリンリピートはらせん状の立体構造を形成する。ANKHD1の場合は、前半の15リピートおよび後半の10リピートに分けられる。タンパク質立体構造予測から、タンパク質表面の脂質膜と相互作用すると考えられるアミノ酸残基を推定し、これらに変異を導入したタンパク質断片、及び、野生型のタンパク質断片を大腸菌により発現精製し、試験管内での脂質膜との相互作用を調べた。脂質膜としては、PCとPEあるいはPCとPSを用いて再構成した人工膜、あるいは、粗精製脂質画分であるFolch脂質を用いて再構成した人工膜を用いた。超遠心により、比較的分子量の大きなリボソーム（人工膜）を沈殿させ、大きなリボソームの沈降に伴いタンパク質が沈殿するかどうか調べたことで、タンパク質と脂質膜の結合を調べた。ここで、リボソームが沈殿しなければ、脂質膜は小胞化したと考えられる。その結果、脂質膜を断片化するANKHD1のフラグメント及び、断片化に影響を与えるアミノ酸残基を同定した。超遠心による方法に加えて、さらに、ANKHD1による脂質膜の切断活性を電子顕微鏡解析により確認した。

次に、細胞内でのANKHD1の機能を明らかにするために、脂質膜の切断をおこなうANKHD1のタンパク質断片を発現させた細胞と、ANKHD1の発現をRNAiにより減弱させた細胞を用意した。これらの細胞の細胞内小器官の形成、消失を、オルガネラマーカータンパク質の抗体染色により調べ、ついでWestern blottingによりタンパク質量の増減を調べたことで、オルガネラの増加や減少を調べた。その結果、ある特定のオルガネラの減少が見られた。

## 6. キーワード

脂質膜結合タンパク質

## 7. 現在までの進捗状況

区分 (2) おおむね順調に進展している。

理由  
計画の通りに研究が進んでいるため。

2 版

## 8. 今後の研究の推進方策

2018年度の研究では、脂質膜と相互作用するアミノ酸残基をアミノ酸の点変異により同定し、試験管内での再構成実験により、脂質膜との相互作用および切断機序を同定する。また、これらのオルガネラの制御は、PI(4)Pなどのフォスホイノシタイドの制御下にあることが多いので、PI(4)Pなどを添加した人工膜を作成し、その効果も調べる。

ゴルジ体は、小胞体（ER）やエンドソーム、細胞膜へ小胞を放出し、またこれらのオルガネラから小胞を受け取っている。したがって、これらのオルガネラにおけるANKHD1の局在を調べるとともに、ANKHD1の過剰発現やRNAiによるノックダウンで、これらのオルガネラの形態がどのように変化するか調べる。

さらに、ANKHD1の全長での脂質膜切断活性を明らかにする。大腸菌を用いた発現系を用いて全長タンパク質の発現精製を試みる。ANKHD1は、大きなタンパク質で発現が難しいことも予想されるため、293細胞を用いたタンパク質の発現も試みる。得られた全長タンパク質を用いて、PCとPEあるいはPCとPSに加えて様々なフォスホイノシタイドを添加した再構成リボソームをもちい、脂質膜との結合と切断を検討する。

## 9. 次年度使用が生じた理由と使用計画

細胞染色に用いる抗体や培地などに用いる。

## 10. 研究発表（平成29年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nishimura T, Morone N, Suetsugu S	4. 巻 46
2. 論文標題 Membrane re-modelling by BAR domain superfamily proteins via molecular and non-molecular factors.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Soc Trans.	6. 最初と最後の頁 379-389
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/BST20170322	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tachikawa M, Morone N, Senju Y, Sugiura T, Hanawa-Suetsugu K, Mochizuki A, Suetsugu S	4. 巻 7
2. 論文標題 Measurement of caveolin-1 densities in the cell membrane for quantification of caveolar deformation after exposure to hypotonic membrane tension.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 7794
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-08259-5	査読の有無 有
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）	国際共著 該当する

1. 著者名 Takemura K, Hanawa-Suetsugu K, Suetsugu S, Kitao A	4. 巻 7
2. 論文標題 Salt Bridge Formation between the I-BAR Domain and Lipids Increases Lipid Density and Membrane Curvature.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 6808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-06334-5	査読の有無 有
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)	国際共著 -

1. 著者名 Dumont V, Tolvanen TA, Kuusela S, Wang H, Nyman TA, Lindfors S, Tienari J, Nisen H, Suetsugu S, Plomann M, Kawachi H, Lehtonen S	4. 巻 31
2. 論文標題 PACSIN2 accelerates nephrin trafficking and is up-regulated in diabetic kidney disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 3978-3990
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201601265R	査読の有無 有
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)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

1 1. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

計0件 (うち出願0件 / うち取得0件)

1 2. 科研費を使用して開催した国際研究集会

計0件

1 3. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

-

1 4. 備考

-