

# 論文内容の要旨

申請者氏名 Wan Nurul Izzati Binti Wan Mohamad Noor

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膜構造に局在する。一方で、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、ファゴサイトーシスカップやラメリポディアなどの比較的平面的な構造に局在、多量体形成を行い、構造形成に関与することがわかっていた。このようにBARドメインタンパク質は、多量体として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。

一方で、ファゴサイトーシスカップや、そのほかのBARドメインの関与する構造形成には、アクチン細胞骨格が重要な役割を果たしている。ファゴサイトーシスでは、抗体を認識するFcγRIIなどの受容体の下流で、Cdc42などの低分子量Gタンパク質やSrcファミリーチロシンキナーゼが活性化し、また、シグナルリン脂質であるPIP2などが賛成され、さらにN-WASPなどのアクチン重合を誘導するタンパク質やNckなどのアダプタータンパク質が集合して、アクチン細胞骨格の再構成が生じることがわかっている。GAS7は、N-WASPと結合することは知られていたが、GAS7の分子集合にどのような役割を果たしているか、明らかではなかった。

本研究では、ファゴサイトーシスカップ形成に関わる上記アクチン制御タンパク質群によるGAS7の分子集合機構を調べた。まず、GAS7の分子集合を解析するために、YFPおよびCFPとの融合タンパク質としてGAS7を発現精製し、野生型のGAS7と同様の脂質膜結合能を有していることを見出した。次に、YFPとCFPの間の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)が、脂質膜との結合に依存して増加することを見出した。このFRETを用いた評価系により分子集合の程度を定量的に評価できるようになった。

次に、PIP2などのリン脂質やNck、N-WASP、Cdc42、FcγRII、WISH/NCKIPSD/DIP/SPIN90、Srcキナーゼの存在下でのFRETを評価した。その結果、これらの因子単独では、GAS7のFRETの増強することはできないが、全ての因子が共存したときに、FRETが最大となることがわかった。さらに、これらのタンパク質の変異体により、このFRET増強が、これらのタンパク質の相互作用に依存して入りことがわかった。またCdc42およびSrcキナーゼの阻害剤は、細胞におけるGAS7のFRETを減弱した。

以上の結果は、GAS7の分子集合に至るシグナル伝達様式が再構成できることを示した。

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 Wan Nurul Izzati Binti Wan Mohamad Noor

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。GAS7 の F-BAR ドメインは、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し、平面状に集合することがわかっていた。ファゴサイトーシスカップは低分子量 G タンパク質 Cdc42 の活性化や Src キナーゼにより制御を受けることが知られているが、これらの活性が膜構造に変換される仕組みは明らかでなかった。ファゴサイトーシスカップの構造形成、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 の脂質膜上での多量体形成を FRET を用いて検出することに成功したことにある。FRET は GAS7 の多量体形成を阻害する変異により減弱したことから、この FRET は GAS7 の多量体形成を示していると示された。

第二の発見は、GAS7 の脂質膜での多量体を促進する因子を見出したことである。GAS7 の結合タンパク質として、ファゴサイトーシスに関与する N-WASP や Nck の他、WISH/NCKIPSD/DIP/SPIN90 が知られていた。GAS7 の分子集合は、これらのタンパク質が共存した場合に増強された。これらのタンパク質は SH3 ドメインや WW ドメインとこれらに相互作用するプロリンに富むアミノ酸配列を持つことから、互いに、多価性相互作用によるタンパク質の複合体を形成する。いずれのタンパク質を欠いても FRET の増強は見られなかったことから、多価性相互作用が、FRET に重要であると考えられた。さらに、この中で N-WASP は Cdc42 の活性化型に結合し、Nck は、ファゴサイトーシスの受容体である FcγRII の Src によるリン酸化体に結合する。FcγRII の細胞内領域を脂質膜にアンカーさせ、活性化型 Cdc42 を存在させると、FRET はさらに増強された。FRET は細胞内においても見られ、ファゴサイトーシスを行うマクロファージ細胞株において Cdc42 や Src の抑制は GAS7 の FRET を減弱させた。

以上のように、本論文は、BAR ドメインを有するタンパク質の受容体の下流における分子集合の誘導機構を初めて詳細に明らかにし、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、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】