

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30年度）

			機関番号	14603
所属研究機関名称 奈良先端科学技術大学院大学				
研究 代表者	部局	先端科学技術研究科		
	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～令和元年度

5. 研究実績の概要

アンキリンリピートドメインは、33アミノ酸のユニットが繋がって、バナナのような湾曲した構造をとることが多い。ANKHD1は全体で25リピートを持つことから、アンキリンリピートドメインの部分のみで1500アミノ酸を超える大きなタンパク質である。他の膜変形ドメインとしてよく解析されているBARドメインタンパク質は、250-300アミノ酸であることを考えると、1分子で、BARドメイン数分子に相当する大きさとなる。立体構造予測をもとに、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した。具体的には、立体構造予測において、バナナ状の大きな足場部分とその近傍の両親媒性ヘリックス部分の両方が脂質膜との相互作用に重要であることがわかった。

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た。その結果、エンドソームの形態に異常がみられた。

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たところ、全長から立体構造を取らないと思われるIDP領域を除いた部分の精製に成功した。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調べたところ、脂質膜を切断する活性を遠心分析により見出した。

6. キーワード

細胞生物学

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	概ね研究計画どおりに進捗し、ANKHD1の脂質膜切断機序および機能するオルガネラを同定しつつあるため。

2 版

8. 今後の研究の推進方策

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、様々なマーカータンパク質に対する抗体を用いるなどして調べる。また、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、局在する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ることで、オルガネラの増加や減少を調べる。予備的な実験結果から、エンドソームにおける機能を見出しているため、特にエンドソームマーカータンパク質であるRab5やEEA1などとの共局在を調べる。また昨年度精製に成功したANKHD1の様々なタンパク質断片を用いて、脂質膜の切断機序を詳しく解析し、また、電子顕微鏡を用いて、脂質膜の切断を確かめる。

9. 次年度使用が生じた理由と使用計画

抗体の使用が想定より少なかったが、次年度には局在解析を予定するため、研究期間全体においては過不足なく支出する予定である。

10. 研究発表（平成30年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Putri DDP, Kawasaki T, Murase M, Sueyoshi T, Deguchi T, Ori D, Suetsugu S, Kawai T.	4. 巻 -
2. 論文標題 PtdIns3P phosphatases MTMR3 and MTMR4 negatively regulate innate immune responses to DNA through modulating STING trafficking	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.005731	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 西村 珠子, 末次 志郎	4. 巻 69
2. 論文標題 BARドメインタンパク質と細胞骨格による細胞膜の構造構築	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 203-207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.2425200794	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 —

1. 著者名 北又学、木田和輝、末次 志郎	4. 巻 36
2. 論文標題 リポクオリティの違いを生み出し識別する機構 6.生体膜のリポクオリティとタンパク質ドメインによる認識	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 1659-1666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 —

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Maisrah Ab Fatah、塙 京子、末次 志郎
2. 発表標題 F-BARタンパク質GAS7の細胞内高次構造形成
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 末次 志郎
2. 発表標題 細胞膜の陥入構造と突起構造の共通性について
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masashi Tachikawa、Shiro Suetsugu
2. 発表標題 Measurement of caveolin-1 densities in the cell membrane for quantification of caveolar deformation after exposure to hypotonic membrane tension.
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会 第51回日本発生物学会合同大会
4. 発表年 2018年

2 版

1. 発表者名 M.Ab Fatah、Hanawa Kyoko、Shiro Suetsugu
2. 発表標題 The assembly of GAS7 in cells and in vitro
3. 学会等名 ASCB EMBO Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西村 珠子、末次 志郎
2. 発表標題 I-BARドメインタンパク質IRTKSの細胞間接着における役割
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Manabu Kitamata、Hanawa Kyoko、Kohei Maruyama、Shiro Suetsugu
2. 発表標題 Membrane vesiculation by ANKHD1 protein regulates enlargement of the early endosome.
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会 第51回日本発生生物学会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大菅 光雄、西村 珠子、末次 志郎
2. 発表標題 固定耐性を持つ点滅蛍光タンパク質の開発の試み
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔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

—