

様 式 C - 7 - 1

平成 2 7 年度科学研究費助成事業（科学研究費補助金）実績報告書（研究実績報告書）

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 新学術領域研究（研究領域提案型） 4. 研究 期 間 平成 2 7 年度～平成 2 8 年度

5. 課 題 番 号 1 5 H 0 1 6 4 1

6. 研究課題名 タンパク質ポリマー形成による動的膜形態形成の直接可視化による解明

7. 研究代表者

研究 者 番 号	研究 代 表 者 名	所 属 部 局 名	職 名
7 0 3 4 5 0 3 1	スエツグ シロウ 末次 志郎	バイオサイエンス研究科	教授

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

試験管内のBARドメインタンパク質による脂質膜チューブ形成の開始と伸長過程の可視化
 endophilinについては、安藤班と共同で、原子間力顕微鏡によりチューブ形成の可視化に成功した。しかし、チューブ形成は非常に短時間で生じることがわかった。この急速なチューブ形成のため、原子間力顕微鏡の走査速度では、脂質膜表面のタンパク質の粒子は観察できず、従って、チューブ形成の過程の可視化には成功していない。そこで、チューブ形成を緩やかに生じさせるために、脂質膜の組成を検討した。endophilinと様々な組成の再構成膜を反応させ、再構成膜の形態を負染色により電子顕微鏡で観察した。その結果、脂質膜の脂肪酸の飽和度や電荷を持ったホスファチジルセリンの含量によってチューブ形成能が変化することを見出した。
 細胞内のBARドメインタンパク質による脂質膜チューブ形成の開始過程の可視化
 BARドメインタンパク質を培養細胞において観察するために、GFP融合タンパク質の安定発現株の樹立を試み、またレトロウイルスによる安定発現を行った。次にGFPの一分子局在を解析するために、GFPに対する組み換え抗体（nanobody）を用いた。Nanobodyは分子量が通常の抗体よりも小さいために、浸透がよく、GFPの標識密度を上げることが可能であると考えられる。GFPに対するnanobodyをAlexa647で標識し、超解像観察を行った結果、分子局在を細胞内で検出することに成功した。その際近接距離は、タンパク質分子の大きさと近く、BARドメインタンパク質の膜上での整列が示唆された。BARドメインを直接ラベルする抗体については適切な抗体を見出せなかったため引き続き抗体を検討する予定である。

10. キーワード

(1) 生物物理学	(2)	(3)	(4)
(5)	(6)	(7)	(8)

11. 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)

すでに目的としているBARドメインタンパク質の一定の可視化に成功しているため。

12. 今後の研究の推進方策

(今後の推進方策)

ホスホイノシタイドの集積が、BARタンパク質による脂質膜チューブ形成のきっかけとなる可能性が考えられるので、ホスホイノシタイドを添加して作製したリボソームを用いて膜チューブ形成を観察する。ホスホイノシタイドの位置は、特異的に結合するPHドメインなどを用いて可視化することを検討する。また、超解像解析をさらに推し進め、細胞内における分子数に対する観察分子数を推定することで、多量体形成を結論づける。さらに、構造解析により同定したコンタクトサイトのアミノ酸残基に変異をいれ、変異体タンパク質を発現精製して、試験管内での脂質膜の形態形成における影響を調べる。また、細胞における膜構造形成における役割も、変異体を発現させることにより調べる。

13. 研究発表(平成27年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(5)件/うち査読付論文 計(5)件/うち国際共著論文 計(1)件/うちオープンアクセス 計(5)件

著 者 名	論 文 標 題				
Senju Y, Rosenbaum E, Shah C, Hamada-Nakahara S, Itoh Y, Yamamoto K, Hanawa-Suetsugu K, Daumke O, Suetsugu S.	Phosphorylation of PACSIN2 by protein kinase C triggers the removal of caveolae from the plasma membrane.				
雑 誌 名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著
J Cell Sci.	有	128	2015	2766-2780	該当する
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1242/jcs.167775					
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)					

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)					

著 者 名	論 文 標 題				
Senju Y, Suetsugu S.	Possible regulation of caveolar endocytosis and flattening by phosphorylation of F-BAR domain protein PACSIN2/Syndapin II.				
雑 誌 名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著
Bioarchitecture	有	5	2015	70-77	-
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1080/19490992.2015.1128604.					
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)					

著 者 名		論 文 標 題				
Suetsugu S.		Higher-order assemblies of BAR domain proteins for shaping membranes.				
雑 誌 名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著
Microscopy (Oxf)		有	IN PRESS	2 0 1 6	IN PRESS	-
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)						
10.1093/jmicro/dfw002						
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)						

著 者 名		論 文 標 題				
末次志郎, 高橋重成, 伊藤弓弦, 竹村和浩, 嶋田 陸, 北尾彰朗, 森 泰生		TRPV4イオンチャネルのアンキリンリピート ドメインとPI(4,5)P2の相互作用による新たな制御機構				
雑 誌 名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著
生物物理		有	55	2 0 1 5	262-265	-
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)						
10.2142/biophys.55.262						
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(1)件

発 表 者 名		発 表 標 題	
末次 志郎		The identifaciton of the ankyrin repeat domain as a novel lipid-binding module	
学 会 等 名		発表年月日	発 表 場 所
第53回日本生物物理学会年会(招待講演)(国際学会)		2015年09月14日	金沢大学(石川県、金沢市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
千住 洋介、末次 志郎	PACSIN2のリン酸化によるカベオラ細胞膜局在の負の制御	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会)	2015年12月04日	神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
木田 和輝、北又 学、塙 京子、末次 志郎	BARタンパク質エンドフィリンの膜切断活性とがんにおける変異	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会)	2015年12月01日	神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
福永 優也、塙 京子、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	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会)	2015年12月01日	神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
多羅尾 賢斗、塙 京子、末次 志郎	IRSp53の上皮間葉転換における役割	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会)	2015年12月01日	神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市)

〔図書〕 計(0)件

著 者 名		出 版 社	
書 名		発行年	総ページ数
		<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border-bottom: 1px dashed black; width: 20px;"></div> <div style="border-bottom: 1px dashed black; width: 20px;"></div> <div style="border-bottom: 1px dashed black; width: 20px;"></div> </div>	

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

--