

論文内容の要旨

申請者氏名 木田 和輝

脂質膜の細胞質表面は、主に様々なリン脂質とコレステロールで構成されている。リン脂質の分類はリン脂質の親水性頭部基に依存しており、また、各リン脂質は2本の炭素鎖の長さおよび炭素間の不飽和結合の数が異なる脂肪酸を有することで、脂質膜の複雑さを生んでいる。膜変形タンパク質である Bin-Amphiphysin-Rvs (BAR) ドメインタンパク質は、ホスファチジルセリン (PS) などの負電荷を帯びた脂質を含む膜上で規則正しいオリゴマーに集合し、そのバナナ様形状によって膜をチューブ状に変形させる。N-BAR ドメインと呼ばれるいくつかの BAR ドメインは、N末端に存在する両親媒性ヘリックスが脂質膜に挿入され、さらに膜のチューブ形成を促進する。両親媒性ヘリックスの挿入は、膜脂質中のくさびとして機能し、おそらく膜の流動性または柔軟性を制限することによって膜の切断を促進すると考えられている。N-BAR ドメインを有する Endophilin A2 は、二量体構造の末端と中心に両親媒性ヘリックスを有し、細胞内では、クラスリン媒介エンドサイトーシスにおいて機能する。さらに、Endophilin A2 は豊富な PS などの負電荷脂質を含む膜を効果的に変形させることが知られている。興味深いことに、リン脂質が1つの飽和脂肪酸と1つの多価不飽和脂肪酸を有するとき、Endophilin A2 と膜切断タンパク質であるダイナミンの両方によって媒介される膜変形は非常に増強されることが、これまでに報告されている。

本研究では、まず、複数の異なる組織からいくつかの総脂質を抽出した。次に、それらから調製した様々な脂質膜を用いて、膜変形および膜切断における Endophilin A2 の膜変形作用様式について調べた。その結果、PS が多く含まれる牛脳の総脂質から作製した脂質膜に Endophilin A2 は結合し、かつ、チューブ状の変形が観察された。ところが、ヒト胎児腎細胞 (HEK293) の細胞膜から作製した脂質膜を含む、少量の PS を含有する脂質から作製した脂質膜は Endophilin A2 により小胞化した。したがって、脂質膜に含まれる負に荷電した PS の量が変化することによって、Endophilin A2 による膜変形作用である、チューブ形成と小胞形成が切り替わることを示唆した。

少量の PS を含む脂質膜は、不飽和脂肪酸によってもたらされた膜の隙間に応じて小胞化した。対照的に、不飽和脂肪酸による膜の隙間を有し、かつ、PS を多く含む脂質膜は、有意な小胞形成なしにチューブ化された。したがって、不飽和脂肪酸により生じた膜の隙間は、Endophilin A2 による膜の変形と相関してその変形の程度に影響を与えることを見出した。また、非膜結合表面の正に荷電したアミノ酸残基が、両親媒性ヘリックスの膜への挿入の深さに寄与していることを見出したが、その挿入の深さは、ほとんど膜の隙間とは無関係であった。

以上の結果より、負に荷電した PS の量および膜の隙間の量が、Endophilin による膜のチューブ形成または小胞形成という膜変形の誘起を決定すると結論した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 木田 和輝

膜変形タンパク質は、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。特に、膜変形タンパク質の機能解析は、ほとんどの生体内現象に関与している細胞小器官が脂質膜で形成されていることから、非常に重要である。脂質膜結合ドメインである BAR ドメインの脂質膜への結合やチューブ形成には、ホスファチジルセリン (PS) などの負電荷脂質が重要だと知られており、これまでの BAR ドメインを用いた *in vitro* 実験では、負電荷脂質を含む脂質膜が多く用いられてきた。しかし、これらの実験で使用されてきたリン脂質組成には、必ずしも BAR ドメインが機能する細胞小器官の膜組成は反映されず、リン脂質の脂肪酸の役割も注目されてこなかった。また、小胞化についての詳細は不明なままである。そのために、BAR ドメインによる膜変形様式と、用いるリン脂質の種類などを包括した実験は今までになかった。本研究では、BAR ドメインを含む Endophilin A2 と、PS 量や膜の隙間を変化させた脂質膜を用いた実験により、膜変形様式を調節する機構を見出した。膜変形タンパク質による膜変形は、脂質膜で形成されている細胞小器官が関与している生命現象などの基礎であることから、本研究は、生体内での膜変形機構を理解する上で重要である。

第一の発見は、脂質膜の PS 量によって、Endophilin A2 による膜変形作用がチューブ形成と小胞形成との間で切り替わることを見出したことである。具体的には、PS 量が多い脂質膜はチューブを形成し、少ない脂質膜は小胞を形成した。Endophilin A2 が、負電荷脂質を含む膜をチューブ化または小胞化することは知られていたが、これまでに Endophilin A2 を含む膜変形タンパク質が脂質膜の変形様式を変化させる要因は知られていなかった。脂質膜共沈実験、電子顕微鏡観察、薄層クロマトグラフィー実験により、PS 量が Endophilin A2 の膜変形様式を切り替えることを見出した。

第二の発見は、膜の隙間の程度が、Endophilin A2 による膜の変形と関連することで、膜変形の程度を増減させることである。具体的には、PS を少量含む脂質膜は、不飽和脂肪酸による膜の隙間に応じて小胞化し、膜の隙間、かつ、PS を多量に含む脂質膜は、チューブ化されることを発見した。また、両親媒性ヘリックスの膜挿入深度は正電荷アミノ酸残基によって調節され、脂質組成とは無関係だった。ここでは、脂質膜共沈実験や電子顕微鏡観察を行うことで、不飽和脂肪酸によって広がった膜の隙間の程度が、Endophilin A2 による膜の変形の増減を調節することを示した。

以上のように、本論文は、膜変形タンパク質の機能が脂質組成に大きく依存していることを明瞭に示したものである。脂質膜結合タンパク質の機能解析においては、実際に機能する細胞内小器官の膜組成に依存することを明瞭に示し、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。