

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	Yiming Yu
論文題目	Molecular mechanisms of the asymmetric pit-closing in clathrin-mediated endocytosis		
(論文内容の要旨)			
<p>エンドサイトーシスは、細胞膜の変形、融合、切断を経て最終的に膜小胞が形成される過程であり、細胞外の物質や情報を細胞内へ取り込むのみならず、細胞張力の恒常性維持や細胞運動にも重要な役割を果たしている。クラスリン依存的エンドサイトーシスは、細胞表面受容体の取込みに関与しており、30種以上のタンパク質により一連の膜変形が引き起こされることがこれまでの研究により明らかになっている。しかし、最終段階で膜小胞が切り離される閉口過程に関しては、従来のダイナミンが膜を「括り切る」モデルに加え、アクチン依存的機構の存在が数多く報告され、近年盛んに議論がおこなわれている。本研究室を含む複数の研究グループからは、アクチン依存的な「非対称的な細胞膜の隆起」によりクラスリンピットが閉じること報告されていたが、その分子機構に関しては不明であった。これを踏まえて本申請者は、非対称的な膜隆起を伴う閉口過程の分子機構の解明を目的として研究をおこなった。</p> <p>まず、クラスリンピットに集積することが知られているタンパク質群の中から、アクチンとの関連性が強い F-BAR タンパク質ファミリーに着目し、siRNA によるノックダウンによる影響を、ライブセル観察用高速原子間力顕微鏡(HS-AFM)を用いて検証した。その結果、Cdc42-interacting protein 4 (CIP4)のノックダウンにより、膜の隆起が消失することを見出した。HS-AFM と共焦点レーザー顕微鏡との相関イメージングにより、CIP4 がピットに集積するタイミングと膜の隆起とが一致していること、さらには超解像顕微鏡を用いたライブセル観察により、CIP4 がクラスリンピットの中心ではなく、辺縁部に集積していることを明らかにした。次に、CIP4 の非対称的な集積に必要なドメインを同定するために、N 末端の BAR ドメイン、中央の天然変性領域 (IDR)、C 末端の SH3 ドメインをそれぞれ欠損した一連の変異タンパク質を作成し、ピット周辺への集積を調べたところ、BAR と IDR の両方のドメインが必要であることが分かった。興味深いことに、BAR ドメインは、同じファミリーに属する syndapin2 が持つ BAR ドメインと交換可能であるが、IDR に関しては交換不可であった。このことは、CIP4 中央部の IDR が非対称的な集積により重要な働きをしていることを示す。そこで、この IDR が自己集合により、液-液相分離する可能性を、大腸菌で発現・生成したタンパク質を用いて検証したところ、強い相分離能を示すことが分かった。また、相分離能を減弱させた変異タンパク質を培養細胞に発現させ、クラスリンピット周辺への集合を経時的に解析したところ、野生型に比べて集合速度が劇的に低下していることを見出した。このことは、IDR により駆動される自己集合が、ピット近傍への集合原理であることを示している。最後に、CIP4 の自己集合により形成される液相がアクチンの集積を促進する可能性を検証するために、蛍光標識したアクチンを CIP4 の液滴に添加し、蛍光顕微鏡下で経時観察したところ、液滴内へのアクチンの集積および重合促進が観察された。以上の結果および他の生化学的実験結果をもとに、CIP4 のクラスリンピット周辺への非対称的集合、およびアクチンの重合促進機構に関するモデルを提唱した。この成果は、クラスリン依存的エンドサイトーシス過程の閉口過程における分子機構を明らかにしたという重要性を持つのみならず、これまで多くの議論がなされてきたピット周辺部における非対称的アクチン集積機構に対する答えを与えたという点で大きな重要性を持つ成果である。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

動物細胞でのクラスリン依存的エンドサイトーシスにおけるアクチンの役割に関しては、近年多くの研究成果が報告され、多くの議論がおこなわれてきた。これを踏まえて本論文は、アクチンの一過的な集積による「非対称的な細胞膜の隆起」がクラスリンピットを閉じることに着目し、その分子機構を明らかにすることを目的としておこなわれた。細胞膜の隆起を引き起こす主要タンパク質として CIP4 を同定するとともに、非対称的な集合には、CIP4 内部の非構造領域 (IDR) により駆動される液-液相分離が重要な役割を担っていることを明らかにした。本論文の重要性として、以下の3点が挙げられる。(1) クラスリンピット周辺へのアクチン集積機構の解明。これまで、走査型電子顕微鏡、イオンコンダクタンス顕微鏡、超解像顕微鏡、原子間力顕微鏡などにより、クラスリンピット周辺にアクチンが集積することで細胞膜を隆起させることが報告されていたが、そのメカニズムは不明であった。本論文では CIP4 という分子を同定することに成功したという点で、当該研究分野に大きなインパクトを与えた。(2) 非対称性のメカニズム。本論文では、アクチン集積の原因タンパク質として CIP4 を同定するのみならず、液-液相分離が非対称的な集合の駆動力であることを解明した。CIP4 が偏った電荷分布の IDR を持つことに着目し、生化学・生物物理学的手法を用いて、その液-液相分離能を証明したことは、従来の stoichiometric な相互作用のみでは説明が困難な現象に、相分離現象が関与していることを示す重要な結果であると言える。(3) 細胞内における液-液相分離の時空間的制御。IDR の相互作用により駆動される液-液相分離は、その特異性の低さから、細胞内での時空間的制御機構が常に議論の対象となってきた。CIP4 は、N 末端の BAR と C 末端の SH3 という2つの立体構造ドメインと、中央部の IDR から構成されており、「構造ドメイン」と「非構造ドメイン」との機能的相互作用・協調性を理解する上で大変興味深いタンパク質である。本論文では、BAR ドメインによるピット周辺部の細胞膜への結合、IDR による強い自己集合、さらには SH3 ドメインによるアクチン重合タンパク質群の呼び込み、という一連の分子動態が CIP4 によりおこなわれていることを実験的に示している。これは、IDR を含むマルチドメインタンパク質の細胞内での挙動・動態を理解する上で重要な知見である。以上のように、本研究成果は、エンドサイトーシスの研究分野のみならず、細胞内におけるタンパク質の構造・動態に関する研究分野においても重要な知見を提供するものである。

本論文は優れた論理構成によって記載されており、申請者の生命科学に対する広範かつ高度な学識、及び専攻分野における研究能力の高さを示す内容となっている。以上のことから、本論文を博士(生命科学)の学位論文として高い価値があるものと認めた。

なお、令和5年10月4日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行なった結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日