

京都大学	博士（薬科学）	氏名	益田 俊博
論文題目	両親媒性ペプチドによる細胞膜との相互作用を介した細胞機能制御		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>細胞機能の制御にはリガンドと細胞膜受容体の結合によるシグナル伝達だけではなく、細胞膜の物理的な性質（物性）も重要な役割を担っていることが明らかになってきた。しかしながら細胞膜の物性に注目して細胞機能を制御しようとした試みはほとんど報告されていない。そこで本研究では、細胞膜の物性（膜張力および膜曲率）を変化させることで細胞機能を制御する新規ツールの開発を目指した。新規ツールの候補として、細胞膜と相互作用することが期待される両親媒性ペプチドに注目した。両親媒性ペプチドが細胞膜と相互作用することで細胞膜の物性を変化させ、物性の変化に応じた細胞機能に影響を与えると考えた。</p> <p>本研究ではまず、インフルエンザウイルスのM2タンパク質に存在する両親媒性領域由来のペプチドM2[45-62]による膜張力の変化を介した細胞運動・細胞形態への影響を検討した(第一章)。次いで、ArgとTrpから構成される人工的に設計された両親媒性ペプチドR6W3による細胞膜曲率の誘導に伴うエンドサイトーシス誘起能について調べた(第二章)。</p> <p><b>第一章 膜張力の変化を介する細胞の運動と形態の制御</b></p> <p>細胞膜にかかる張力（膜張力）は様々な細胞現象に関わっていることが明らかになってきた。特に、細胞運動や細胞形態は膜張力によって制御される細胞現象の一つである。両親媒性化合物の膜への挿入により膜張力が減少することが報告されていることから、細胞膜に挿入される両親媒性ペプチドを用いることで膜張力を変化させ、細胞運動や細胞形態を制御できるのではないかと考えた。</p> <p>細胞内において、小胞の形成やウイルスの出芽などに関わる膜変形活性を有するタンパク質の両親媒性領域から、7種類の両親媒性ペプチドを選択し、Fmoc固相合成法により合成した。各ペプチド処理によるF-actin分布変化への影響を評価したところ、M2[45-62]処理によりlamellipodiaの形成が多方向に生じることが認められた。光ピンセットを用いた膜張力測定の結果、M2[45-62]が細胞膜の膜張力を減少させていることを確認した。膜張力のセンサータンパク質であるFBP17をノックダウンした際にM2[45-62]によるlamellipodia形成能が減少したことから、FBP17がM2[45-62]によるlamellipodia形成に関与していることが示唆された。Wound healing assayおよびTranswell migration assayにより細胞運動能への影響を評価した結果、M2[45-62]が細胞運動能を阻害することが確認された。初代培養神経細胞へのM2[45-62]処理により軸索長の伸長や神経突起数の増加といった細胞形態変化が誘起されることを確認した。</p>			

## 第二章 細胞膜曲率の誘起を介するエンドサイトーシス制御の試み

細胞膜が湾曲した際に生じる細胞膜の曲率は、細胞機能の制御において重要な役割を果たしている。また、細胞膜との相互作用を介して膜曲率を誘導する両親媒性ペプチドが知られている。このことから、膜変形活性を有する両親媒性ペプチドを用いることで細胞膜の曲率に関わる細胞機能を制御できるのではないかと考えた。

細胞膜の曲率を制御する両親媒性ペプチドとして、ArgとTrpから構成される人工的に設計された両親媒性ペプチドR6W3に注目した。R6W3はGiant Unilamellar Vesicle (GUV)に膜の陥入構造を誘起することが報告されている。R6W3を用いることで、細胞膜の変形を伴う細胞現象であるエンドサイトーシスを制御できるのではないかと考えた。

細胞膜の陥入を感知するタンパク質であるAmphiphysinのYFP融合タンパク質 (Amp-YFP) を細胞に強制発現し、R6W3を加えた際の局在変化を観察した。R6W3処理によりAmp-YFPのドット上のシグナルが増加したことから、R6W3が細胞膜に陥入を引き起こしていることが示唆された。R6W3による蛍光標識デキストランの細胞内取り込み量への影響をフローサイトメーターによって評価した。R6W3処理により蛍光標識デキストランの細胞内取り込み量が増加したことから、R6W3がエンドサイトーシスを誘起することが示された。R6W3の変異体を用いた検討により、R6W3の細胞膜変形活性およびエンドサイトーシス誘起能には、R6W3の両親媒性の二次構造が重要な役割をはたしている可能性が示唆された。

本研究における両親媒性ペプチドによる細胞膜との相互作用を介した細胞機能制御の試みは、細胞膜の物性の変化を介した新規細胞制御ツールの開発やメカノバイオロジー分野における細胞膜の物性変化と細胞機能の関連の解明に寄与するものと考えられる。

( 論文審査の結果の要旨 )

近年、細胞機能の制御には、細胞膜の物理的な性質（物性）が重要な役割を担っていることが明らかになってきた。しかしながら細胞膜の物性に注目して細胞機能を制御しようとした試みはほとんど報告されていない。申請者は、細胞膜の物性と細胞機能の関連に注目し、両親媒性ペプチドの細胞膜との相互作用による細胞膜の物性の変化を介した細胞機能制御に取り組んだ。

第一章では、膜変形活性を有するタンパク質の両親媒性領域に注目することで、多方向にラメリポディア形成を誘起するペプチドM2[45-62]を得た。M2[45-62]は細胞膜の膜張力を低下させることを確認し、膜張力が関連する細胞機能である細胞運動や細胞形態変化に影響を与えることを見出した。

第二章では、ArgおよびTrpからなる人工的にデザインされた両親媒性ペプチドであるR6W3に注目し、R6W3が細胞膜への曲率の誘導を引き起こすことを示唆する結果を得た。また、R6W3が細胞膜の変形に伴い誘導されることが期待されるエンドサイトーシスを誘起可能であることを明らかにした。

このように両親媒性ペプチドが細胞膜の物性の操作を介した細胞機能制御のうえで有用なツールとなりうることを示した。両親媒性ペプチドを用いて細胞膜の膜張力、膜曲率を操作可能であるという知見は、細胞膜の物性を変化させる新規ツールの開発や細胞膜の物性と細胞機能の関連の解明に寄与するものと考えられる。

よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和2年2月19日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。