

京都大学	博士（生命科学）	氏名	西岡 照子
論文題目	蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)バイオセンサーによって可視化した、生細胞の形質膜でのホスファチジン酸のレベルと局在の多様性		
(論文内容の要旨)			
ホスファチジン酸は形質膜を構成するリン脂質の一種であり、細胞の生存や増殖、形態形成に関与することが知られている。本研究では、ホスファチジン酸の時空間制御機構を解析するために、生細胞の形質膜上でのホスファチジン酸の局在を検出する蛍光共鳴エネルギー移動（<u>f</u>luorescence <u>r</u>esonance <u>e</u>nergy <u>t</u>ransfer, FRET）の原理に基づくプローブを開発し、ホスファチジン酸の代謝制御機構を解析した。 申請者は、修士課程の研究として、イノシトールリン脂質群をモニターする Pippi (<u>P</u>hosphatidy<u>l</u>inositol <u>p</u>hosphat<u>e</u> <u>i</u>ndicator) シリーズと DAG をモニターする Digda (<u>D</u>iacylglycerol <u>i</u>ndicator) の開発に成功している。本研究ではこれらのプローブの基本構造を元に、ホスファチジン酸をモニターするプローブ、Pii(<u>P</u>hosphatidic <u>a</u>cid <u>i</u>ndicator) を作製した。このプローブは、N 末端よりシアン色蛍光蛋白質、PA 結合蛋白質の PA 結合領域、黄色蛍光蛋白質、K-Ras の形質膜局在化信号からなる。PA 結合領域には PA に結合することが既に報告されていた DOCK2 (<u>d</u>ownstream <u>o</u>f <u>C</u>rk) の C 末端領域をセンサーとして用いている。 Pii 発現細胞では、合成ホスファチジン酸の添加、ホスファチジン酸産生酵素であるホスホリパーゼ D あるいはジアシルグリセロールキナーゼの活性化により FRET 効率の変化が観察されたことから、Pii が PA の量変化を検出していることが示された。そして、形質膜上の PA の量は同じ細胞株でも個々の細胞によって異なるのと同様、異なる細胞株間でも多様であることも明らかにした。さらに興味深いことに、増殖因子によって増加する PA の量は刺激前の PA の量に逆相関したことから、形質膜には PA の濃度の上限があることが示唆された。また、細胞形質膜上の PA の局在は不均一であり、増殖因子刺激の前後ともに PA は細胞間接触領域よりも細胞の自由縁に集積していることも明らかになった。細胞間接触部位では、細胞運動や細胞増殖に関与する低分子量 G 蛋白質 Ras の活性が低いことが報告されている。低分子量 G 蛋白質は PLD を活性化することと、PLD の代謝産物である PA がリン脂質キナーゼ DAGK を活性化することも既に知られていた。したがって、細胞間接触領域で PA が十分に増加しないことは Ras の活性化が十分でないことに関連するかもしれない。以上の結果は、PA のバイオセンサーである Pii が、細胞の形質膜上の PA の量や局在を明らかにするための非常に有用な道具になりうることも示している。			

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、細胞増殖、形態形成等に関与することが知られているホスファチジン酸の時空間制御機構を解析するためにホスファチジン酸量を検出する蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) の原理に基づくプローブを開発し、ホスファチジン酸の代謝制御機構を解析したものである。

申請者は修士課程の研究として、イノシトールリン脂質群をモニターする Pippi (Phosphatidylinositol phosphate indicator) および DAG をモニターする Digda (Diacylglycerol indicator) の開発に成功した。この基本骨格をもとに、本研究ではホスファチジン酸をモニターするプローブ、Pii (Phosphatidic acid indicator) を新規に作製した。このプローブは、N末端よりシアン色蛍光蛋白質、DOCK2 タンパク質のホスファチジン酸結合領域、黄色蛍光蛋白質、K-Ras の形質膜局在化信号からなる。この Pii 発現細胞では、合成ホスファチジン酸の添加、ホスファチジン酸産生酵素であるホスホリパーゼ D あるいはジアシルグリセロールキナーゼの活性化によって FRET 効率の変化が観察されたことから、Pii がホスファチジン酸の量変化を検出していることを示した。さらに、Pii を用いて、細胞形質膜上のホスファチジン酸の局在は不均一であり、増殖因子刺激の前後ともにホスファチジン酸は細胞間接触領域よりも細胞の自由縁に集積していることを示した。細胞間接触部位では、低分子量 G 蛋白質 Ras の活性が低いこと、ホスファチジン酸が Sos を介して Ras を活性化されることにヒントを得て、細胞間接触領域でホスファチジン酸が十分に増加しないことが Ras の活性化が十分でないことに関連するというモデルを提唱した。

口頭試問においては、他のリン脂質のモニターは結合により FRET 効率が上昇するのに対し、Pii においては逆に減少することについて討論が行われた。現時点では、プローブにおいて FRET 効率の増減は予測できておらず、今後の検討課題と思われる。また、FRET 効率からホスファチジン酸の絶対値を測定することができるという問題、あるいは、ホスファチジン酸とプローブの親和性が測定結果に及ぼす影響等についても今後の検討課題として提起された。

以上のようにいくつかの問題点はあるにしても、本プローブがホスファチジン酸の時空間変化を示す優れたツールとなることは疑いがなく、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の原理に基づくホスファチジン酸のモニターを開発し、生細胞の形質膜でのホスファチジン酸のレベルと局在の多様性を解明した本論文は博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認めた。平成 23 年 2 月 4 日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、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。

要旨公開可能日： 年 月 日