

# 論文審査の結果の要旨

氏名 北又 学

本論文は4章から構成されており、新規脂質膜変形タンパク質である ANKHD1 について述べている。

第1章の序論では、既知の脂質膜変形タンパク質の膜変形機構や作用する細胞小器官について述べている。細胞小器官の形態は、その脂質膜の形態であり、脂質膜変形タンパク質によって制御されている。しかし、既知の脂質膜変形タンパク質は少なく、他にも脂質膜変形能を有するタンパク質が存在することが考えられる。そこで論文提出者は新規脂質膜変形タンパク質を同定するのにアンキリンリピートドメイン(ARD)に注目した。ARDはアンキリンリピートと呼ばれる33アミノ酸の繰り返し配列から構成されており、その繰り返し回数はタンパク質ごとに異なることから、構造の多様性を有している。さらに一部のARDが脂質結合能を有することが明らかになっている。加えて、ARDの中には、カーブ状の立体構造を持つものも知られており、それらは脂質膜変形タンパク質ドメインである Bin-Amphiphysin-Rvs (BAR) ドメインの立体構造と

類似している。BAR ドメインはそのカーブ状の立体構造において、カーブの内側に偏在する塩基性アミノ酸と負電荷を帯びている脂質膜との静電的相互作用によってタンパク質の立体構造に合わせて脂質膜を変形することで、脂質膜の曲率を制御する。また一部の BAR ドメインタンパク質は両親媒性ヘリックスを持ち、両親媒性ヘリックスが脂質膜へ挿入され、くさびとして機能することで小胞を形成する。そのため、ARD が脂質膜変形ドメインとして機能することが予想された。

第 2 章では本論文で用いられた実験方法と解析方法について述べている。本論文では、ARD を持つタンパク質が *in vitro* で脂質膜を変形することを生化学的手法を用いて解析した。さらにタンパク質が機能する細胞小器官を、培養細胞を用いた実験によって同定した。

第 3 章では実験結果について記されている。新規脂質膜変形タンパク質を同定するにあたり、ARD を含むタンパク質のうち、発現量の高いタンパク質を組み替えタンパク質として発現させ、精製し、これらを用いて、脂質膜の変形活性を検討した。その結果、ANKHD1 の ARD が最も高い脂質膜変形活性を持ち、脂質膜を小胞化することが見出された。また ANKHD1 の ARD は、15 ア

ンキリンリピートと 10 アンキリンリピートの二つの部分に分けられる。この 10 アンキリンリピートは立体構造予測によればカーブ状の構造をしており、その内側は塩基性アミノ酸が多く含まれる。さらに 10 アンキリンリピートに隣接して両親媒性ヘリックスが存在する。塩基性アミノ酸を酸性アミノ酸に置換した変異と両親媒性ヘリックスの欠損した変異を組み合わせた変異体の脂質膜小胞化活性は、野生型と比べて大きく低下していた。また 15 アンキリンリピートは、二量体形成に関与していることがわかり、さらに、15 アンキリンリピートは 10 アンキリンリピートの脂質膜小胞化活性を増加させた。これらのことから ANKHD1 の小胞化の機構は BAR ドメインと類似していると思われた。

培養細胞を用いた ANKHD1 のノックダウン実験により、ANKHD1 のタンパク質量が減少すると細胞内で初期エンドソームの数とその大きさが増加すること、また ANKHD1 は初期エンドソームの小胞形成の部位に局在することが示された。さらに ANKHD1 ノックダウン細胞に ANKHD1 の小胞化形成能が減弱した変異体を発現させても初期エンドソームの形態が回復しないことが示された。以上のことから ANKHD1 はその小胞形成能によって初期エンドソームの形態を制御することが明らかになった。

第4章では ANKHD1 の膜変形機構とその制御について、また初期エンドソームの膜の小胞形成について考察が述べられている。

本論文で記されている ANKHD1 の ARD に見られるような脂質膜変形能は、これまでに他の ARD を含むタンパク質では明らかにされておらず、ANKHD1 以外にも膜変形活性を持つ ARD 含有タンパク質が存在すると考えられる。また、ANKHD1 の結合タンパク質などの解析から、小胞輸送、細胞小器官の分裂等の新規制御機構の発見が期待される。

本論文の第3章については末次京子、丸山耕平、末次志郎との共同研究であるが、論文提出者が主体となって全ての実験及び解析を行っており、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士 (理学) の学位を授与できると認める。