

Title	Dynamics of chemotactic signaling molecules on the cell membrane : Single-molecule measurement of living cells and a use of cells with alterations in the lipid composition of the cell membrane
Author(s)	松岡, 里実
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45656">https://hdl.handle.net/11094/45656</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;大阪大学の博士論文について&lt;/a&gt;</a> をご参照ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	まつおか 松岡 里実
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 19214 号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	Dynamics of chemotactic signaling molecules on the cell membrane : Single-molecule measurement of living cells and a use of cells with alterations in the lipid composition of the cell membrane (走化性情報伝達分子の細胞膜上でのダイナミクス生細胞内 1 分子計測 ならびに細胞膜脂質組成を変化させた細胞を用いた解析)
論文審査委員	(主査) 教授 荻原 哲  (副査) 助教授 前田ミネ子 教授 滝澤 温彦 教授 小倉 明彦

#### 論文内容の要旨

粘菌細胞は cAMP に対して正の走化性を示す。このとき、細胞外の cAMP 濃度勾配に従って明確な細胞極性が存在し、進むべき方向に 1 つの仮足を形成して運動する。また、cAMP の濃度勾配の方向が変わると、運動方向を変えるために、すでにある仮足を壊し別の場所で新しい仮足を形成することができる。このように、細胞極性は、明確なものであると同時に、濃度勾配の急激な変化にも柔軟に対応できるものでなければならない。これまでに、走化性情報伝達に関与する分子が数多く発見されており、情報伝達カスケードが明らかになりつつある。しかしながら、このような性質を可能にする原理はまだ解明されていない。これは、カスケードを構成する 1 つ 1 つの情報伝達反応について、その特性が不明であるためではないだろうか。

まず、1 分子可視化技術を用いて、個々のタンパク質が担う素反応を明らかにすることを試みた。仮足を形成すべき場所では、細胞膜の PI(3, 4, 5)P<sub>3</sub> レベルが上昇する。このシグナルを細胞膜直下の細胞骨格系に伝達するのが、PH ドメイン含有タンパク質である。そこで、これらの分子による情報伝達時間、すなわち PH ドメイン含有タンパク質 1 分子の細胞膜結合時間について解析した。その結果、PH ドメインと PI(3, 4, 5)P<sub>3</sub> の間の相互作用は、解離の時定数が約 100 ミリ秒であり、ごく短時間しか続かないものであることがわかった。つまり、仮足形成部位への局在は、ターンオーバーによって動的に維持されるといえる。このような性質は、仮足形成シグナルの不活化を速やかに細胞骨格に伝達する上で重要なのではないだろうか。

また、仮足形成部位のシグナルである PI(3, 4, 5)P<sub>3</sub> を、仮足以外の部分で分解する酵素に PTEN がある。この活性および膜移行のメカニズムを理解するために、PTEN-YFP 分子の細胞膜結合時間の解析を行った。その結果、細胞膜に結合した PTEN は何らかの中間段階を経た後に細胞膜から解離することが示唆された。さらに、PTEN は、PI(4, 5)P<sub>2</sub> 結合部位を介して細胞膜へ移行し、細胞膜上を側方拡散して PI(3, 4, 5)P<sub>3</sub> と結合、脱リン酸化反応を触媒した後細胞膜から解離することを明らかにした。このように、PTEN の活性は自身の反応生成物である PI(4, 5)P<sub>2</sub> によってポジティブフィードバックをうけていると考えられる。この性質は、PTEN の細胞後部への安定した局在や PI(3, 4, 5)P<sub>3</sub> 合成の仮足形成部位への限定に、重要な役割を担うのではないだろうか。

さらに、情報伝達の起こる場である細胞膜脂質の性質を変えることで、情報伝達反応に現れる影響について解析した。脂質組成の異常な細胞を得るために、脂質代謝遺伝子の破壊株を作成した。この破壊株において、確かにリン脂質の脂肪酸組成が異常になることを確認した。この細胞では、仮足形成シグナルへの変換がうまくおこらないことを発見した。しかしながら、走化性には影響はなかったことから、仮足形成シグナルと運動方向シグナルの伝達経路は独立に存在することを明らかにした。

### 論文審査の結果の要旨

松岡さんの博士論文は次の3つのパートから構成されています。

生細胞を用いた1分子計測による細胞外シグナルから細胞内シグナルへの変換初期過程の解析

生細胞におけるPIP3脱リン酸化酵素PTENの反応過程の1分子計測による解析

脂質代謝異常株の作成と表現型および脂質組成の解析

生物に普遍的に認められる走化性という現象は古典的なテーマですが、その仕組みが新しい解析のメスにより今漸く明らかにされつつあります。松岡さんが用いた全反射顕微鏡による観察と1分子計測による解析は、細胞外シグナルが細胞内シグナルへ変換され、これにカップルして起こる細胞の指向的な運動の仕組みを理解する上で、新規性の高い興味深い知見を与えるものと言えるでしょう。走化性物質の濃度勾配が高い方向への指向的な運動は、後部をお尻にして前部に仮足を形成するという細胞極性によって効率的に持続されています。この細胞極性の形成は、PIP3の存在が仮足形成部に限定されていることと関係しています。PIP3の脱リン酸化酵素であるPTEN分子の細胞後部に存在し、その活性が反応産物であるPIP2によってポジティブフィードバックを受けることによって実現されているものと思われます。また、松岡さんは脂質代謝の異常株を作成し、その解析からPIP3の局在に膜脂質が影響を与えるという知見も既に得ております。これに関連して既に論文を2報出版していますが、その1報は広く引用されるインパクトの高いものです。

以上の解析によって得られた質の高い成果と業績は、松岡さんが博士の学位を取得するに相応しいことを示しています。