

氏名	Bhat Hema Balakrishna		
博士の専攻分野の名称	博士（理学）		
学位記号番号	博理工甲第 916 号		
学位授与年月日	平成 25 年 9 月 20 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
学位論文題目	IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEINS THAT BIND SPECIFIC LIPID DOMAINS (特異的脂質ドメインに結合するタンパク質の同定と解析)		
論文審査委員	委員長	連携教授	小林 俊秀
	委員	教授	森安 裕二
	委員	連携教授	鈴木 匡
	委員	連携准教授	堂前 直

論文の内容の要旨

Background:

Membrane rafts are transient and unstable membrane microdomains that are enriched in sphingolipids, cholesterol, and specific proteins. These microdomains can be stabilized on binding ligand molecules. They have been shown to exist as nanoscale clusters of various sizes. The membrane rafts have been implicated in a huge range of cellular processes, and are therefore under intense study. Some examples of where rafts are thought to play a role includes, T-cell activation and the T-cell synapse, B-cell activation, focal adhesions and cell migration, the life cycle of the influenza and HIV viruses, hormone signaling and membrane trafficking in polarized epithelial cells. The existence and function of these membrane rafts/domains are often demonstrated by indirect biochemical methods such as using nonionic detergent at low temperature or cholesterol depletion by methyl- β -cyclodextrin. However, some problems with these techniques have been pointed out. Recent development of proteins and peptide probes that bind specific lipids, together with advanced optical and electron microscopy techniques have opened up the studies to clarify the distribution and dynamics of the lipids. Although useful, one has to carefully use these protein probes to avoid the toxicity to cells and the rearrangement of lipids during observation.

Aim of this study:

The aim of my study was to isolate a non-toxic protein binding to specific lipid domains from mushroom extracts and further characterize the protein.

Summary of results:

The present study reveals that the proteins belonging to aegerolysin family are new lipid raft probes for both mammalian and insect cells.

In my study two sphingomyelin (SM) probes, lysenin and equinatoxin II were used to know the subcellular

distribution of SM, and the behavior of these two proteins with respect to it. The SM pool distribution in the plasma membrane of COS-1 cells was studied, followed by examining the intracellular distribution of SM and SM synthases involved in the generation of the intracellular SM pools.

Further screening for sterol and sphingolipid enriched membrane domain binding protein was carried out using mushroom as protein source, with various combinations of artificial liposome mixture. In the process of screening three proteins were isolated. One from *H.marmoreus* (bunashimeji mushroom) binding specifically to GM1. The other two proteins were from *P.eryngii* (eryngii mushroom), were one bound to GM1/cholesterol(Chol) and the other bound to SM/Chol.

These proteins were identified by peptide sequencing and mass spectrometry analysis. But the various approaches followed to purify GM1 and GM1/Chol binding protein failed. Whereas, SM/Chol binding protein was successfully purified both in natural and recombinant form.

This newly isolated protein was identified as an ortholog of pleurotolysinA. Therefore naming the protein as pleurotolysinA2 (PlyA2). NCBI database search revealed that PlyA2 belongs to aegerolysin family and exhibits a high homology to other family members, erylysinA (EryA) and ostreolysin (Oly) (80 % identity). The recombinant PlyA2 conjugated to enhanced green fluorescent (EGFP) was expressed in *E.coli* and the fluorescent protein was used to characterize its lipid specificity in model and cellular membranes. Further the binding affinity of aegerolysin family proteins to SM substituent, ceramide phosphorylethanolamine (CPE) which is found in insects like *Drosophila* and parasitic pathogens like *Trypanosomes* was carried out.

Conclusion:

SM probes, lysenin and equinatoxin II revealed different SM pools with distinct affinity for both the toxins. The study revealed that SMS2 and SMS1 enzymes are responsible for the synthesis of SM in the plasma membrane and endomembrane, respectively, in COS-1 cells. The use of these two SM-binding probes may provide more insights into various SM mediated processes in different topological domains.

In the process of screening for protein binding to sphingolipid/sterol enriched domain, a SM/Chol binding protein was isolated which was named as pleurotolysinA2. PlyA2-EGFP was successfully characterized via *in vitro* and *in vivo* assays. PlyA2-EGFP *in vitro* studies revealed the protein binding is based on direct protein-lipid headgroup interaction and not due to the liquid ordered state of the membrane. While *in vivo* studies showed that PlyA2-EGFP selectively binds to a SM/Chol complex on the cell surface, rendering it a suitable probe to label SM/Chol rich membrane domains. The behavior of PlyA2-EGFP with other recombinant aegerolysin family proteins was compared and only PlyA2-EGFP retained its SM/Chol binding activity.

This study issued a question of the lipid target of these aegerolysin family proteins, since they have 80% identical amino acids. Previous reports have revealed about the substitution of SM into ceramide phosphorylethanolamine (CPE) in insects like *Drosophila*, and parasitic pathogens like *Trypanosomes*, *Leishmania*. Henceforth promising an interesting study on the binding of aegerolysin family proteins to CPE-rich or CPE/Chol-rich domains. The *in vitro* and *in vivo* assays of the aegerolysin family proteins acknowledged, PlyA2 to be able to bind CPE/Chol- and CPE-enriched domains whereas, EryA and Oly bound to CPE/Chol-enriched domains.

In essence, PlyA2-EGFP is a non-toxic lipid binding protein capable to selectively associate either with SM/Chol-rich membrane domains or CPE-rich membrane domains, alongside other aegerolysin family proteins EryA and Oly capable of selectively associating with CPE/Chol-rich membrane domains. In conclusion, PlyA2-EGFP is a complementary addition to the lipid probe toolkit to study lipid distribution and dynamics *in situ*.

論文の審査結果の要旨

生体膜上の機能ドメイン、脂質ラフトについて調べるためには、それらを検出できるプローブが必要である。Bhat氏は、ラフトを構成する主要脂質、スフィンゴミエリン (SM) とコレステロールの複合体を認識するタンパク質をキノコ抽出液よりスクリーニングした。その結果、pleurotolysinA2という新奇タンパク質を得、その脂質結合性を詳細に調べた。また既に報告されているSMプローブ、lyseninおよびequinatoxin IIを用いて、細胞膜やオルガネラのSMプールに違いがあることを示唆した。

学位論文は以下の構成となっている：

1章：細胞膜の脂質構造の概説

脂質の構造と膜の基本構造の概説

2章：スフィンゴ脂質/ステロール結合タンパク質のスクリーニング

脂質ラフト構成成分、スフィンゴミエリンや糖脂質 GM1 と、コレステロール複合体に結合するタンパク質のスクリーニングを、キノコ抽出液より行った。その結果、合計3種類のタンパク質を得たが、大腸菌で発現させたりコンビナントタンパク質で活性を保持していたのは、SM/コレステロールに結合性を示すタンパク質一種類であった。このタンパク質は、aegerolysin familyのpleurotolysinA (PlyA)というタンパク質と2つのアミノ酸残基が異なっていたため、pleurotolysinA2 (PlyA2)と名づけた。リコンビナントタンパク質として発現させる際、N末端にタグをつけると活性はなくなり、C末端タグのPlyA2は活性を保持していた。他の2種類のリコンビナントタンパク質は脂質結合性を示さなかったため、PlyA2の研究を進めた。

3章：pleurotolysinA2の解析

これまでにPlyAがSM/コレステロールに結合するという報告はあるが、詳細な特徴付けは行われていない。本研究で新しく単離したPlyA2について、脂質結合性を詳細に調べた。またPlyA2-EGFPは、哺乳類細胞の細胞膜をSM/コレステロール依存的に染色することを示し、このタンパク質が脂質ラフト (SM/コレステロール) のプローブとして有用であることを示した。またPlyA2の脂質結合性に必要なトリプトファン残基を明らかにし、MDシミュレーションによって、なぜトリプトファン残基が重要なのかを議論した。

4章：Ceramide phosphorylethanolamine(CPE)/ステロール結合タンパク質の解析

aegerolysin familyタンパク質、ostreolysin、erylysinA、PlyA2にCPE/ステロール結合活性があることを見出した。SM/ステロールに結合するタンパク質PlyA2は、CPE/ステロールだけでなく、CPEのみにも結合する。このPlyA2の性質を用いて、ショウジョウバエの培養細胞 (CPEが存在し、SMおよびステロールは存在しない)の細胞染色を行ったところ、PlyA2はCPE依存的に細胞膜を染色することが示された。またこれらプローブにより、トリパノソーマの宿主血流中に寄生した血流型 (Blood stream form、CPEが存在することが報告されている) が染色された。

5章：二つのSMプローブを用いたSM局在の違いについて

SM結合タンパク質lyseninとequinatoxin IIを用いて、COS-1細胞のSMの局在部位を調べた。両タンパク質によって細胞表面はドット上に染色され、その局在部位は一部しか重ならなかった。また、

equinatoxin II は、リサイクリングエンドソームと後期エンドソームを染色し、lysenin は後期エンドソームのみを染色した。これらの結果から、細胞膜およびオルガネラ上に異なる SM のプールがあることが示唆された。

脂質ラフトはスフィンゴ脂質とコレステロールの複合体がその基本構造となっていると考えられる。これまでスフィンゴミエリンとコレステロールの複合体に結合するタンパク質の報告はいくつか報告されているものの、その特異性や結合の強さは脂質複合体の検出に用いられるレベルのものではなかった。本研究では SM/コレステロールに結合する新奇タンパク質、PlyA2 をスクリーニングし、蛍光タンパク質との融合タンパク質として発現、精製に成功した。また本研究により、脂質ラフトプローブとしての PlyA2 の有用性を示せたことは、大変評価でき、今後新規脂質ラフトプローブとしての応用が期待できる。

脂質の一つの大きな特性はその多様性にあり、SM は動物細胞の主要スフィンゴ脂質であるのに対して CPE は昆虫や寄生虫に見出されるが動物細胞にはほとんどないスフィンゴ脂質である。CPE および CPE/ステロールに結合するタンパク質は、これまでに報告例がない。Aegerolysin family タンパクが CPE に結合することを見出したことによりこれまでほとんどわかっていない CPE の分布、動態に関する研究が進むとともに、トリパノソーマの診断、治療にも道を開く可能性がある。

細胞膜のスフィンゴミエリンラフトはこれまでほとんど lysenin を用いて解析されてきた。今回 lysenin と equinatoxin II の比較により 2 つのタンパク質の SM 結合性の違いがあることが示唆され、これら SM プローブが脂質ドメインの heterogeneity を示すために有用であることが示された。

Bhat 氏の業績によりこれまで唯一のスフィンゴミエリンプローブであった lysenin に加え、equinatoxin II と PlyA2 を用いて脂質ラフトを解析する道が開けた。また erylysinA や ostreolysin を使って昆虫や寄生虫のラフトの解析のみならず、診断、治療の可能性を示唆したことは大きく評価できる。

なお、PlyA2 のスフィンゴミエリン/コレステロールドメインへの結合、lysenin と equinatoxin II の比較については以下の 2 つの論文に掲載されている。

1. Balakrishna BH, Kishimoto T, Abe M, Makino A, Inaba T, Murate M, Dohmae N, Kurahashi A, Nishibori K, Fujimori F, Greimel P, Ishitsuka R, Kobayashi T. (2013) Binding of a pleurotolysin ortholog from *Pleurotus eryngii* to sphingomyelin and cholesterol-rich membrane domains. *J Lipid Res.* 54, 2933-2943.
2. Yachi R, Uchida Y, Balakrishna, BH, Anderluh G, Kobayashi T, Taguchi T, Arai H. (2012) Subcellular localization of sphingomyelin revealed by two toxin-based probes in mammalian cells. *Genes Cells* 17, 720-727.

以上、Bhat 氏は学位授与に値する能力を十分に有すると考えられ、学位論文の審査は合格とする。