

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	甲	第	号
------	---	---	---	---

氏 名 Sharmin Aktar

論 文 題 目


A new electron microscopic method to observe the distribution of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate

(ホスファチジルイノシトール3,4-二リン酸の局在観察のための新しい電子顕微鏡法)

論文審査担当者

名古屋大学教授

主 査 委員

門松 健治 


名古屋大学教授

委員

宮田 卓程 

名古屋大学教授

委員

木山 博資 

名古屋大学教授

指導教授

藤本 豊士 

論文審査の結果の要旨

ホスファチジルイノシトール 3,4-二リン酸 (PI(3,4)P₂)の細胞内局在はこれまで蛍光標識脂質結合プローブの発現あるいは化学固定した細胞を用いた蛍光免疫染色により解析されてきた。しかし前者は人工的であり後者は脂質分子がアルデヒド固定されないという理由で、真の脂質局在同定には至らなかった。本研究で申請者は急速凍結・凍結活断レプリカ標識法 (QF-FRL 法)を用いて PI(3,4)P₂ の真の細胞内局在の解明を試み、過酸化水素水処理した細胞では細胞膜のカベオラを除く領域のリン脂質二重層の細胞質側葉に同脂質の分布が増加することを見出した。





本研究に対し、以下の点を議論した。

1. PH ドメインを通じて PI(3,4)P₂ と結合することによりアクチン骨格の構成を変化させ、クラスリン依存性エンドサイトーシス、ファゴサイトーシス、小胞膜輸送、B 細胞活性化と自己抗体産生などを制御するとされる。
2. 二種類の大きさの異なる金コロイド顆粒を二次抗体として用いることで、二つの分子の同時検出は可能である。
3. 同方法による膜の活断は細胞内の全領域の平面で起こりうるので、明瞭なオルガネラ以外の場所で形成される新規構造を同定するのは難しい。特定の構造をレプリカ法で観るためには、その構造の形成を増やす等して観察したい対象の活断面を観る確立を上げる、明瞭なオルガネラ分子の染色を同時に行なうなどが重要である。
4. PI(3,4)P₂ が細胞膜の細胞質側様に偏在することが初めて同定された。カベオラ以外の細胞膜領域に一様に標識され、特定の膜ドメイン局在を示唆する高密度分布は観られず、エンドソームなど細胞内構造の膜での分布もほぼ皆無であった。
5. 従来の蛍光観察法で PI(3,4)P₂ が局在すると示唆されるラップリング構造は電子顕微鏡ではチューブ構造として観察される報告がある。しかし今回のレプリカ電顕観察では項目 3 の理由でラップリング構造を同定できなかった。一方細胞膜上に規則的な高密度の標識が観られたので、本手法では PDGF 刺激による PI(3,4)P₂ の細胞膜における新たな集積箇所を検出できた可能性があり、どういう膜ドメインに増加しているか、今後の課題である。

本研究は、PI(3,4)P₂ の真の細胞内局在解析法を確立する上で、重要な知見を提供した。

以上の理由により、本研究は博士（医学）の学位を授与するに相応しい価値を有するものと評価した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※甲第	号	氏名	Sharmin Aktar
試験担当者	主査 門私健治  宮田 卓穂  木山博資  指導教授 藤 五 豊 			

(試験の結果の要旨)

主論文についてその内容を詳細に検討し、次の問題について試験を実施した。

1. TAPP-1の機能について
2. QF-FRL法での二つの分子の共局在解析について
3. QF-FRL法による脂質標識法の技術的に注意すべき点について
4. 過酸化水素水による刺激の際のPI(3,4)P₂標識結果について
5. PDGF刺激の際のPI(3,4)P₂標識結果について

以上の試験の結果、本人は深い学識と判断力ならびに考察力を有するとともに、分子細胞学一般における知識も十分具備していることを認め、学位審査委員合議の上、合格と判断した。