

## 学位論文題名

## Imaging of Fas-FasL membrane microdomains during apoptosis in a reconstituted cell-cell junction

(Fas-FasL細胞膜マイクロドメインのイメージング)

## 学位論文内容の要旨

The Fas death receptor interacts with its ligand FasL and induces apoptosis. The Fas-FasL interaction occurs at the cell-cell interface in vivo, since both proteins are expressed in cell membranes. However, most studies on the Fas signal pathway have been performed in a nonphysiological manner by using antibodies or crosslinked soluble FasL (intracellular-truncated FasL) to stimulate Fas. The Fas-FasL interaction at the cell-cell contact site has only been studied recently, but the information derived from cell-cell interaction studies is still rather limited and not necessarily consistent with the past results. As cell-cell contact interface is perpendicular to focal plane of microscope, structure details of the molecular organization cannot be achieved. In this study, we develop a novel reconstituted system that mimics the Fas-FasL interaction at cell-cell contact sites for further examination of the physiological Fas-FasL signaling system.

In chapter 1, an overview of apoptosis has been introduced, including its characterization, function and measurements. Then the preliminary mechanisms of Fas receptor-mediated apoptosis have been described. The structure of Fas and FasL as well as two downstream signaling pathways were presented. As the main signaling unit, Fas enriched signaling clusters has been explained in details. Previous models for Fas-FasL interaction, Fas-FADD binding, and Fas clustering have been illustrated. Finally, the challenges for studying membrane Fas in living cells highlighted significance and innovation of our study.

In chapter 2, a novel reconstituted system that mimics the transmembrane FasL has been developed. By conjugating FasL extracellular domains to planar lipid bilayer through fluorescently labeled streptavidin, we created a FasL-bound membrane on which FasL proteins diffuse freely. Thus, Fas-expressing cells can be stimulated by FasL-bound membrane instead of FasL-expressing cell. In our system, expression of exogenous fluorescent Fas protein is not required, since we can image the Fas-FasL interaction at the cell-membrane junction through the fluorescence of labeled streptavidin. In this chapter, we optimized the preparation of lipid bilayer and monoliotinylation of FasL proteins, and ensured the uniform distribution of FasL on lipid bilayer.

In chapter 3, by using total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy, we observed that submicron-size Fas-FasL membrane microdomains emerged after the Fas-expressing cells were incubated with FasL-bound membrane. Cells no matter adhesion cell line or suspension cell line exhibit similar membrane microdomains when incubated with FasL-bound membrane. Furthermore, antibody-bound membrane can also stimulate Fas to form Fas-antibody membrane microdomains. This result demonstrates formation of Fas membrane microdomains is a common phenomenon during Fas activation. By culturing

the cells expressed Fas-GFP with FasL-bound membrane or antibody-bound membrane, we found that cells formed microdomains more frequently than cell with endogenous Fas protein alone. It suggests a specific threshold of Fas concentration may be required to induce Fas-FasL interaction and microdomains formation at the cell-cell interface.

In chapter 4, we observed dynamic binding of annexin V to the cells with microdomains by using time-lapse microscopy. This result demonstrates that the FasL-bound membrane can induces apoptosis and the progress can be monitored in real time by using our system. In addition, our system is proved to be useful to study series of apoptotic process from early stage to the end. The morphology of Fas-FasL microdomain was unchanged for hours, and no significant internalization of Fas proteins was observed. This result is consistent with the previous observation regarding cell-cell contact, where Fas-FasL clusters are stable for hours without any detectable Fas internalization.

In summary, we have successfully developed a novel reconstituted system to study the membrane Fas-FasL interaction at near physiological conditions. We found that Fas-FasL microdomains formation is primarily dependent upon Fas receptor clustering, and provided a direct evidence on the relation between membrane microdomains and apoptosis in living cells.

# 学位論文審査の要旨

主 査	客員教授	花 方 信 孝(連携分野)
副 査	教 授	出 村 誠
副 査	准教授	相 沢 智 康
副 査	客員准教授	山 崎 智 彦(連携分野)

## 学 位 論 文 題 名

### Imaging of Fas-FasL membrane microdomains during apoptosis in a reconstituted cell-cell junction

(Fas-FasL細胞膜マイクロドメインのイメージング)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

近年、Fas と Fas リガンド (FasL) の結合によるアポトーシス誘導シグナルには、細胞膜上のマイクロドメインの形成が重要であることが示唆されている。本学位論文において、張玲氏は細胞膜上で起こっている Fas - FasL 複合体形成過程の挙動を *in vitro* で観察できるイメージングシステムを開発し、そのマイクロドメイン形成過程を明らかにした。

現在まで細胞における Fas の活性化については、Fas 特異的抗体、膜結合部位を取り除いた水溶性 FasL、FasL 融合たんぱく質との Fas との相互作用を調べることにより明らかにされてきているが、実際の細胞膜上における Fas の活性化機構を模倣しておらず、これらの方法の解析には限界があった。また、細胞膜上における Fas - FasL 複合体形成過程についても、報告されている例はあるが解像度が低く、実際にマイクロドメインの形成過程を詳細に調べられた報告はない。張玲氏は本学位論文において、動物細胞を模した平面脂質二重膜を構築し、膜上に FasL の細胞外ドメインをストレプトアビジン修飾した脂質に固定することで、平面脂質二重膜上において FasL が自由に動き回れるようにし、細胞膜上に FasL がある状態を平面上に再現した。その平面脂質二重膜に Fas 発現細胞を添加することで、細胞間での Fas - FasL 複合体形成過程の挙動を平面上で観察することができるイメージングシステムを構築し、その最適化を行った。次に、構築したシステムと全反射蛍光顕微鏡を組み合わせることで、平面膜上で高解像度に Fas - FasL 複合体形成を観察した。その結果、Fas - FasL 複合体形成においては、サブマイクロンサイズのマイクロドメインが非常に短時間で形成されること、またマイクロドメイン形成は細胞での Fas の発現量に依存することを明らかとした。さらに各種アポトーシス指標と Fas - FasL 複合体形成との関係を調べ、本イメージングシステムにおいて、Fas - FasL 複合体形成が行われ、それに起因したアポトーシスの誘導が行われていることを明らかにした。本論文で構築されたシステムは、高速リアルタイム化や分子メカニズムの詳細な解析を通じて Fas - FasL 複合体形成からアポトーシスの誘導の解明ができることが示された。

これを要するに、筆者は Fas - FasL 複合体形成過程のイメージングシステムを開発し、高解像度に Fas - FasL 複合体形成過程を観察し、マイクロドメイン形成について新知見を得たものであり、アポトーシス誘導における Fas - FasL 複合体形成の役割についての解明に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士 (生命科学) の学位を授与される資格あるものと認める。