

Development of analytical methods for the facile and rapid determination of membrane protein-specific lipids by gold nanoparticles

ワングアムヌイポン, スパコーン

<https://hdl.handle.net/2324/7363585>

出版情報 : Kyushu University, 2024, 博士 (理学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :



氏 名	ワングアムヌイボン スパコーン			
論 文 名	Development of analytical methods for the facile and rapid determination of membrane protein-specific lipids by gold nanoparticles (金ナノ粒子を用いた迅速な膜タンパク質特異的脂質スクリーニング法の開発)			
論文調査委員	主 査	九州大学	教授	松森 信明
	副 査	九州大学	教授	松島 綾美
	副 査	九州大学	准教授	有馬 祐介
	副 査	九州大学	准教授	川井 隆之

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

生体膜は脂質分子が集積した脂質二重膜を基本とし、膜タンパク質や糖鎖を表面および内部に伴った構造体である。『流動モザイクモデル』では、脂質膜は細胞やその小器官を区分する隔壁、もしくはタンパク質を浮かべる二次元媒質として認識されてきた。一方、近年では、生体膜中の多様な脂質分子は膜タンパク質と相互作用することで、膜タンパク質の構造を維持するのみならず、膜タンパク質の機能を制御することが解明され、脂質の生理的重要性が認識されている。しかし、この相互作用がどのように膜タンパク質の構造および機能の制御に関与するのか、その詳細は明らかになっていない。これは、膜タンパク質と脂質の相互作用を定量化する簡便かつ実用的な方法が存在しないためである。当研究室では、表面プラズモン共鳴（SPR）技術を応用した膜タンパク質－脂質相互作用解析法を開発した。この手法では、SPR 金センサーチップ表面を自己組織化単分子膜（SAM）で修飾し、そこに膜タンパク質を固定化することで脂質との定量的相互作用解析を可能とした。しかし、SPR を基盤とした手法は、脂質精製の煩雑さが主な制約であった。したがって、数万種にわたる多様な膜脂質の生理機能の解明は進展していないのが現状である。

そこで本研究者はまず、SPR 金センサーチップの代わりに金ナノ粒子（AuNPs）を用いた革新的な膜タンパク質特異的脂質分析プラットフォームを開発した。AuNPs 表面を SAM で修飾し、ここに膜タンパク質を共有結合で固定化法することで膜タンパク質官能化 AuNPs を開発した。この膜タンパク質官能化 AuNPs を脂質混合物と混合し、回収した脂質を LC-MS で分析することで膜タンパク質－脂質相互作用を評価した。本手法の開発にあたり、古細菌由来のバクテリオロドプシン（bR）を膜タンパク質として用いた。bR の固定化条件を最適化するとともに、動的光散乱と電子顕微鏡を用いて bR の効率的な固定化を確認した。さらに、プルダウン実験の洗浄プロトコルを改良することで、bR 固定化 AuNPs と脂質との非特異的相互作用を最小限に抑えた。bR に対する既知の脂質親和性を再現するようにバインディングインデックス（BI）を導入することで、膜タンパク質特異的脂質の同定が可能となった。その結果、S-TGD-1 が bR 特異的脂質であることを再現することができ、さらに、希少で研究例の少ない糖脂質 S-TeGD を bR 特異的候補脂質として新たに同定した。この方法により、従来の SPR 実験で必要な手間のかかる脂質精製が省略でき、膜タンパク質特異的脂質のスクリーニング効率が大幅に向上した。

次に、前章で開発した膜タンパク質固定化 AuNPs の強赤色を利用し、これに TLC Blotting による

脂質分離を組み合わせた新しいスクリーニング法を開発した。高性能薄層クロマトグラフィー（HPTLC）プレート上で分離された脂質をポリフッ化ビニリデン（PVDF）膜に転写し、これに膜タンパク質官能化 AuNPs を作用させることで、PVDF 膜上の脂質の可視化に成功した。HPTLC または PVDF 膜上の脂質種は、エレクトロスプレーイオン化-質量分析（ESI-MS）を用いて同定できた。次に、PVDF 膜上での特異的脂質の検出を最適化するために、AuNPs のサイズ、ウシ血清アルブミンによるブロッキング、界面活性剤による洗浄といった条件を最適化した。この方法により、**S-TGD-1** および **S-TeGD** が **bR** 特異的脂質であることが再現され、従来の知見と一致する結果が得られた。また、この手法をカリウムチャンネル **KcsA** に適用した結果、カルジオリピンが強く染色され、同脂質が **KcsA** 特異的脂質であることが再現された。

以上、本研究者は、金ナノ粒子表面を自己組織化単分子膜で修飾し、ここに膜タンパク質を共有結合で固定化することで膜タンパク質固定化金ナノ粒子を開発した。これにより、膜タンパク質の膜環境下での担体への固定化が実現できた。さらにこれを用いて簡便かつ迅速な膜タンパク質特異的脂質探索法の開発を達成した。本手法は種々の膜タンパク質に適用可能であり、膜タンパク質に特異的に結合する脂質の探索研究を大いに推進するものと期待される。したがって、本研究は膜タンパク質-脂質相互作用の生理機能解明に資する革新的な内容を含むと判断される。

よって、本研究者は博士（理学）の学位を受ける資格があるものと認める。