

# Development of a Methodology for Comprehensive Analysis of Lipid-Membrane Protein Interactions Using Lipid-Immobilized Beads

森藤, 将之

<https://hdl.handle.net/2324/7363589>

---

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 : 森藤 将之

論文名 : Development of a Methodology for Comprehensive Analysis of Lipid-Membrane Protein Interactions Using Lipid-Immobilized Beads  
(脂質固定化ビーズを用いた脂質 - 膜タンパク質相互作用の網羅的解析法の開発)

区 分 : 甲

## 論文内容の要旨

生体膜には多様な脂質が存在しており、これら膜脂質が膜タンパク質と相互作用することによって、膜タンパク質の機能や構造が制御されている。しかし、この制御の詳細は明らかにされておらず、脂質の多様性の重要性は依然として謎のままである。これらの解決には脂質-膜タンパク質相互作用解析が不可欠であるが、その方法論が欠如しているために当該分野の研究が進展していない。特に「脂質結合膜タンパク質」の解析法は「膜タンパク質結合脂質」の解析法と比べ方法論の不足が顕著であり、脂質結合膜タンパク質の解析法の開発が求められている。そこで本研究では、脂質結合膜タンパク質の網羅的かつ体系的な解析を目指し、「脂質固定化ビーズを用いた脂質 - 膜タンパク質相互作用の網羅的解析法の開発」を行った。

第 1 章では、脂質 - 膜タンパク質相互作用に関する研究背景および当該分野の状況についての説明を行った。

第 2 章では、脂質結合膜タンパク質の同定のために脂質固定化ビーズを開発した (図 1)。脂質固定化ビーズは、磁性ビーズ表面に脂質分子を共有結合で固定化して調製した。表面の脂質密度は脂質膜に匹敵するほど高く、ビーズ上に脂質膜構造が再現されている。また、膜タンパク質可溶化のための界面活性剤にも耐性である。スフィンゴ脂質であるスフィンゴミエリン (SM) とセラミド (Cer) を固定化したビーズを用いた各種検討の結果、このビーズが脂質結合タンパク質の取得に有用であることを確認した。その後、細胞ライセートから脂質結合タンパク質のスクリーニングを実施し、SM および Cer に結合するタンパク質を同定した。これにより、脂質固定化ビーズを用いた脂質結合タンパク質の解析を実現した。

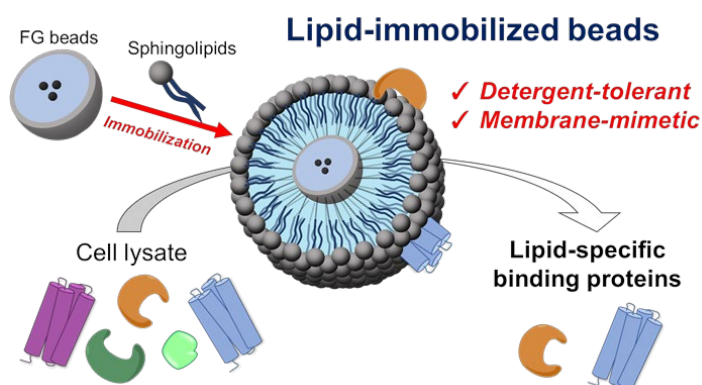


図 1. 脂質固定化ビーズを用いた脂質結合タンパク質の解析。

第3章では、より網羅的な脂質結合タンパク質の解析を実現するため、前章で開発した手法を3つの側面から発展させた(図2)。1) SDS-PAGE なしでの高深度プロテオミクス、2) 遺伝子オントロジーによるエンリッチメント解析の導入、3) ビーズに固定化した脂質種の拡張、を実施し、7種の脂質固定化ビーズを用いて計7000種類以上の脂質結合タンパク質を同定した。その後のエンリッチメント解析により、各脂質に対する結合タンパク質が関与する生物学的プロセスを示した。本研究によって脂質結合タンパク質の網羅的かつ系統的な解析プラットフォームが実現され、多様な脂質-膜タンパク質相互作用とそれらの生物学的プロセスにおける役割が明らかになった。

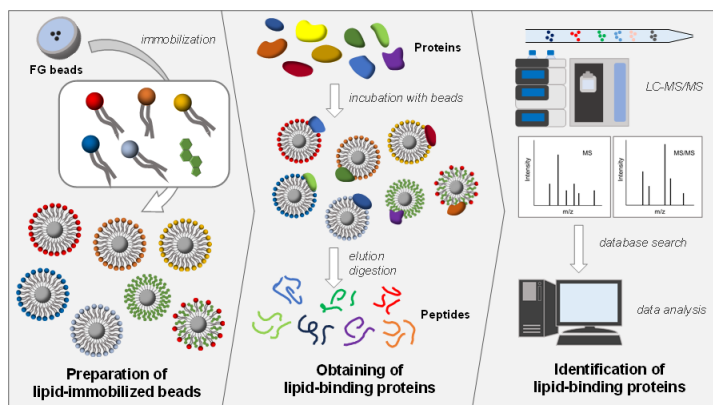


図2. 本研究で実現された脂質結合タンパク質の網羅解析プラットフォーム。

第4章と第5章では、本手法で同定された脂質-膜タンパク質相互作用に対して、その後の詳細な相互作用解析および機能解析についても検討を行った。第4章では、タンパク質ソースとして酵母細胞を用いて脂質結合タンパク質のスクリーニングを行った。酵母細胞は動物細胞と比較して遺伝学的手法および生化学的手法を容易に適用でき、スクリーニングによって同定された脂質-膜タンパク質相互作用の解析に適した系である。酵母由来のセラミド種をビーズに固定化し、結合タンパク質のスクリーニングを行った。その結果、液胞型ATPase

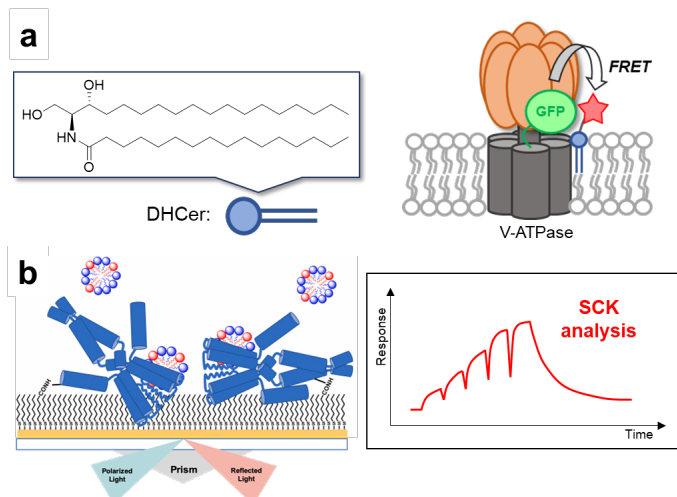


図3. 4章(a)および5章(b)の概略図。

(V-ATPase)がジヒドロセラミド(DHCer)結合タンパク質として同定された。DHCerとV-ATPaseとの特異的な相互作用は、蛍光共鳴エネルギー移動法(FRET)によって確認された(図3a)。この結果は、DHCerがV-ATPase活性を調節している可能性を示唆している。第5章では、脂質-膜タンパク質相互作用の定量解析法を検討した。当研究室で開発された表面プラズモン共鳴を用いたSAMPLIA法に対して、新たにsingle-cycle kinetics解析を導入することで改良を行った(図3b)。この手法の脂質-膜タンパク質相互作用の評価に対する有用性を示すため、カリウムチャネルKcsAと脂質分子との相互作用の定量解析を行った。その結果、カルジオリピンとKcsAの相互作用がアロステリックにKcsAの開閉状態を安定化させることが示唆され、この改良型SAMPLIA法が脂質-膜タンパク質相互作用の定量解析に有用であることが示された。

本研究では、脂質固定化ビーズを用いて脂質結合タンパク質の網羅的解析を実現した。今後、この方法論をより広範な脂質種に適用することで、脂質の多様性の生理学的役割が明らかにされることできる。さらに、相互作用解析や機能解析などの多面的アプローチを統合することにより、脂質-膜タンパク質相互作用解析の網羅的かつ体系的なプラットフォームが確立され、脂質機能および脂質-タンパク質相互作用の理解が進展することが期待される。