

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)			
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	堀 雄一郎
	副 査	九州大学	准教授	和泉 自泰 (生体防御医学研究院)
	副 査	群馬大学	准教授	木下 祥尚

論 文 審 査 の 結 果 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。

そこで本研究者はまず、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。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、培養神経細胞の抽出液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。

次に、本手法を酵母細胞に適用した。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 (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によって確認された。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。

さらに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、上で開発した手法を 3 つの側面から発展させた。1) 電気泳動による分離を伴わない高深度プロテオミクス、2) バイオインフォマティクス解析の導入、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。その後のバイオインフォマティクス解析により、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。

以上、本研究者は、脂質膜を模倣した脂質固定化ビーズを作成し、それを用いた脂質結合膜タンパク質の解析法を開発するとともに、その有用性および汎用性を自ら証明した。さらにその方法論に最先端プロテオミクスとバイオインフォマティクスを導入することで、脂質結合膜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構築を実現した。本手法によって脂質と膜タンパク質間の複雑なクロストークの解明が期待できることから、本研究は脂質ケミカルバイオロジー学理の発展に大きく貢献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。