

2022年 2月 24日

豊橋技術科学大学長 殿

応用化学・生命工学専攻

学位審査委員会

委員長

齊戸 美弘



論文審査及び最終試験の結果報告

このことについて、博士学位論文審査を実施し、下記の結果を得ましたので報告いたします。

学位申請者	MELVIN GOH WEI SHERN		学籍番号	第 153444 号
申請学位	博士 (工学)	専攻名	大学院工学研究科博士後期課程 応用化学・生命工学専攻	
博士学位 論文名	Non-raft submicron domain formation in lipid bilayers induced by polyunsaturated lipids and its application to reconstitution of membrane proteins (多価不飽和脂質が誘起する脂質二重膜中の非ラフト微小ドメイン形成と膜タンパク質再構成への応用)			
論文審査の 期間	2022年 1月 13日 ~ 2022年 2月 22日			
公開審査会 の日	2022年 2月 8日	最終試験の 実施日	2022年 2月 8日	
論文審査の 結果※	合格		最終試験の 結果※	合格
審査委員会(学位規程第6条)				
学位申請者にかかる博士学位論文について、論文審査、公開審査会及び最終試験を行い、別紙論文内容の要旨及び審査結果の要旨のとおり確認したので、学位審査委員会に報告します。				
委員長	岩佐 精二			
委員	沼野 利佳		手老 龍吾	
		印		印
		印		印

※論文審査の結果及び最終試験の結果は「合格」又は「不合格」の評語で記入すること。

論文内容の要旨

本論文は、細胞膜における信号伝達・物質輸送反応の要因である膜内ドメインの形成過程と物性について、多価不飽和脂質の役割に着目し、新規現象の発見とその機構解明ならびに膜タンパク質研究への応用展開に関する研究成果をまとめたものである。本論文は7章より構成されており、第1章に本研究に関する背景と目的、第2章に実験手法、第3章から第6章に研究成果、第7章にまとめと結論および将来展望が記されている。各章の概要は以下の通りである。

第1章では本研究の背景として、細胞膜とその基本構造である脂質二重膜の生命活動における重要性、その構成要素である脂質と膜タンパク質が形成する集合体が細胞内外の物質輸送・情報伝達に果たす役割と機能についての記述、そして細胞膜反応の詳細な機構を理解するための実験系として人工脂質二重膜系の概論と、その中で特に本研究で主に用いる支持脂質二重膜系についての解説がされ、続けて本博士論文研究で達成すべき目的が述べられている。

第2章において本研究で用いた脂質二重膜試料の作製方法や蛍光顕微鏡・原子間力顕微鏡 (AFM) 観察といった実験手法とその原理が述べられているのに続き、第3章から第6章では多価不飽和脂質が誘起する脂質二重膜内の新規ドメイン形成現象と膜タンパク質研究への応用展開についての研究成果が4つの項目に分けて記述されている。

第3章では、卵白由来の phosphatidylcholine と phosphatidylethanolamine (PE)、および cholesterol (Chol) からなる3成分混合脂質二重膜中に形成される脂質ドメインについて、蛍光顕微鏡を用いた構造観察と流動性計測およびAFMを用いた形状観察により調べた結果が述べられている。AFM観察により脂質二重膜内に周囲の領域よりも膜厚の小さい微小ドメインが存在することを明らかにした。AFM形状像からえられたドメインの面積率とそのPE濃度依存性から、このドメイン形成が多価不飽和PEによって誘起される新規現象であることを示した。

第4章では、この新規ドメイン形成について、アシル鎖の種類を網羅的に変えて観察した蛍光顕微鏡像およびAFM形状像から、不飽和度が高いほど、また *sn*-1, *sn*-2位の両方に不飽和アシル鎖が存在する場合ほどドメインが形成されやすいことが明らかにされた。AFMフォースカーブ計測によるナノ機械物性計測の結果からドメインの成分が推定され、これらの結果に基づいて、脂質の疎水性部位と親水性部位それぞれに由来する膜内での脂質分子間相互作用によってドメイン形成が誘起される機構が説明された。

第5章では、このドメインを利用した膜タンパク質再構成技術への応用展開として、培養細胞から取得した細胞膜成分(プロテオリポソーム)の人工脂質二重膜系への融合と、その効率を多価不飽和脂質の添加によって著しく向上させた成果が示されている。

第6章では、脂質二重膜中に、心筋の拍動に関わる膜タンパク質の1つであるhERGチャネルを再構成し、AFMによる分子像観察から会合状態を調べた成果が述べられている。無細胞タンパク質によって調製されたhERGチャネルは単量体としての純度は高いものの、チャネル活性を示す四量体がどの程度の効率で形成されるかについて、本研究の成果によって初めて明らかにされた。

第7章では本研究で得られた各章の研究成果を総括すると共に、本博士論文研究成果をイオンチャネルを含む膜タンパク質の研究へと発展させる将来展望、および波及効果について述べられている。

審査結果の要旨

細胞膜に代表される生体膜の基本構造は脂質二重膜であり、人工脂質二重膜系は生体膜反応に関わる脂質やタンパク質の物理化学的性質を調べるための実験系として有用である。細胞膜で行われる物質輸送・信号伝達や環境認識は、神経伝達や代謝、また感染など生命活動に関わる反応である。タンパク質に作用する医薬品の約60%が細胞膜に存在するいわゆる膜タンパク質に作用していることから、細胞膜内での分子挙動の詳細を知ることは、化学のみならず生物および医薬分野においても重要な研究課題であることは明らかである。これらの細胞膜反応においては、特定の脂質や膜タンパク質が局所的な集合体を形成することが反応の進行や効率を決める要因であり、その形成過程を理解することは重要な研究課題である。

本論文では、多価不飽和脂質によって誘起される脂質二重膜内での新規ドメイン形成現象の機構解明、ならびにこの現象の膜タンパク質研究への応用展開について行われた研究成果が述べられている。これまで細胞膜内に存在する代表的なドメインとされる「ラフト」のモデル系として、飽和脂質・不飽和脂質・cholesterol (Chol)からなる3成分系脂質二重膜内での相分離に関して多くの研究が行われてきた。一方で、docosahexaenoyl基に代表される多価不飽和アシル基を持つ脂質は、神経シナプスや網膜などに数10%の高い割合で存在するにもかかわらず、ドメイン形成についての実験的研究はほとんどされてこなかった。第3章で述べられているように、本論文で対象とした多価不飽和脂質が誘起するドメイン形成は、従来のラフトモデル系での相分離とは異なる特異的な現象である。実験環境下で流動相にある低相転移温度(Low- T_m)脂質2種とCholの混合系すなわち”LLC”系での相分離という新たな概念を提示した点で高い価値がある。第4章で述べられているドメインの形成機構は、多価不飽和脂質、低不飽和脂質とCholの3者間に働く分子間相互作用を駆動力とするもので、実験結果を良く説明しかつ科学的に妥当なものであり、分子の自己組織化現象の物理化学としても興味深い。また、脂質濃度依存性とナノ機械物性計測の結果からドメインがphosphatidylethanolamine (PE)を多く含む流動状態にあることを示したことが、第5章で述べられている膜タンパク質再構成手法への応用展開に繋がっている。PEが持つ膜融合作用と多価不飽和脂質の特徴である高い流動性を備えたドメインを、プロテオリポソームの融合を介した膜タンパク質再構成手法に応用する着想は秀逸であり、その試みが見事に成功した。第6章では、人工脂質二重膜に再構成した膜タンパク質の個々の分子をAFMにより観察して得られた成果が述べられている。hERGチャネルは心筋の拍動に必須のイオンチャネルであり、様々な種類の薬剤の影響を受けて不整脈を誘発することから、新規薬剤の副作用検査が義務づけられている。単量体で150 kDaとイオンチャネルの中でも大きな分子質量を持ち、四量体を形成して機能することから、重要な研究対象であるにもかかわらず構造と機能の関連について不明な点が多い。本研究においてhERGチャネルを人工脂質二重膜に再構成し、その会合状態を分子レベルで直接評価しうることを示したことは、新たな手法開発への展開を期待させる。これらの成果は、様々な細胞膜反応に関与する脂質と膜タンパク質の集合体の挙動を分子レベルで理解するための実験系および評価手法として、重要な基盤となる価値あるものである。

以上の博士論文の内容および最終試験の評価から、学位申請者は博士(工学)の学位を授与するにふさわしい研究能力と学識を備えていると判定した。