



Title	Study on Liposome Membrane Design for Recognition of Biomacromolecules and Control of Their Conformation
Author(s)	Suga, Keishi
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/27498
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	菅 恵 嗣
博士の専攻分野の名称	博 士 (工学)
学 位 記 番 号	第 2 6 0 9 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 25 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 基礎工学研究科物質創成専攻
学 位 論 文 名	Study on Liposome Membrane Design for Recognition of Biomacromolecules and Control of Their Conformation (生体高分子認識のためのリボソーム膜デザインならびに高次構造の制御に関する研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 馬越 大 (副査) 教 授 田谷 正仁 教 授 平井 隆之 准教授 島内 寿徳

論 文 内 容 の 要 旨

リボソーム膜は、水中でリン脂質が自己組織的に形成する分子集合体であり、近年では、特定の条件において各種生体関連分子と相互作用する事が明らかになりつつある。本研究では、リボソーム膜を生体高分子の認識ならびにその機能誘導を実現するための「場」として活用する事を目的とする。

無細胞タンパク質合成系を利用して、遺伝子発現を構成する各素過程(i)転写, (ii)翻訳, (iii)Folding)に及ぼす各種リボソーム膜の共存効果を解析した。特に、GFP遺伝子発現において、リボソーム膜の相状態および表面電荷密度が制御

因子となる事を明らかにした。さらに、RNA分子およびUnfoldしたGFP分子は複数の相互作用を介してリボソーム膜と選択的に相互作用する事を示した。

各種蛍光プローブ(DPH, Laurdan, TNS)を用いて、リン脂質2成分から構成されるリボソーム膜の2次元界面にミクロ相分離構造が形成される事を示した。さらに、脂質膜界面上のナノ秩序構造(ナノドメイン)検出を目的とするDPH-TEMPO消光法を新たに開発し、約13-36 Åのナノドメインを検出する事を明らかにした。

一本鎖RNAとリボソーム膜との相互作用について検討した結果、液晶相(l_d)正電荷リボソーム膜と比較して、不均一相(l_d+l_o)正電荷リボソーム膜では、一本鎖RNAは高次構造を維持したままりボソーム膜と相互作用する事を明らかにした。膜の不均一性(ナノドメイン形成)が、各種生体高分子の選択的な相互作用の誘導において重要な役割を担う事を示した。生体高分子の選択的な相互作用(認識)には、(i)静電相互作用、(ii)疎水性相互作用、(iii)脱水和に伴う表層環境の変化、(iv)水素結合、(v)認識点のナノ構造の合致が必要であり、これらを最適に誘導するためのリボソーム膜表層デザイン手法を明らかにした。以上の知見に基づきデザインされたリボソーム膜が、生体高分子(Hammerhead ribozyme, 他)と選択的に相互作用し、さらにその高次構造を制御する事を示した。

本論文では、リボソーム膜の物理化学的特性の解析手法、ならびに、生体高分子との相互作用機構の解析手法を確立し、分子認識のためのリボソーム膜表層デザイン手法の一端を明らかにした。本研究で示した結果および方法論は、リボソーム膜を始めとする自己組織系界面における分子の振舞いの解明ならびにその応用へと展開できると期待される。

論文審査の結果の要旨

リボソーム膜は、水中でリン脂質が自己組織的に形成する分子集合体であり、生体高分子(核酸、タンパク質)と相互作用する事が明らかになりつつある。しかし、分子集合体(システム)としてのリボソーム膜の役割が明らかになりつつある一方、ミクロ(分子)視点からのリボソーム膜の振舞いならびに生体高分子の認識機構については未だ解明されていない。リボソーム膜を生体高分子認識のための「場」として活用するための、体系的な膜デザイン手法の確率が必要である。

本学位論文では、リボソーム膜と生体高分子(一本鎖RNA、ポリペプチド、他)との選択的な相互作用およびその高次構造の制御のための方法論について体系的に検討されており、生体高分子を認識するためのリボソーム膜デザイン手法ならびに高次構造を制御するための手法について提案した。第1章では、リボソーム膜共存下における生化学プロセスとして無細胞遺伝子発現系について、現象論的な解析によりプロセス全体を制御する鍵となる生体高分子を明らかにする手法が確立された。特に、無細胞GFP遺伝子発現系の翻訳およびFolding過程においてリボソーム膜が一本鎖RNA(mRNA, tRNA)およびポリペプチド分子と選択的に相互作用する事を示し、リボソームの膜特性(表面電荷密度、相状態)が各素過程反応を制御する因子である事を明らかにした。第2章では、リボソーム膜をはじめとするベシクル膜全般にも応用可能な膜特性解析手法について検討された。リボソーム膜の2次元界面におけるミクロ相分離状態およびナノ秩序構造(分子クラスタ構造)を解析する手法を確立した。ここでは、各種蛍光プローブ(DPH, Laurdan, TNS)を利用してリボソーム膜の物理化学的な特性を解析すると共に、新たに開発したDPH-TEMPO消光法によりナノサイズの脂質膜ドメイン構造の検出を行った。第3章では、ミクロな視点でのリボソーム膜と生体高分子との相互作用機構について検討された。リボソーム膜により生体高分子(一本鎖RNA、ポリペプチド)の選択的相互作用を誘導する手法を確立した。一本鎖RNA(mRNA, tRNA)分子に着目することで、これらRNA分子がリボソームの膜特性依存的に相互作用する事が明らかとなり、さらにリボソーム膜がRNA分子の高次構造ならびに機能を制御する事を見出した。第4章では、上記で得られた知見に基づいてデザインしたリボソーム膜による生体高分子(核酸・ポリペプチド、他)の認識ならびに構造・機能制御が検討された。ケーススタディとして、生体高分子であるHammerhead ribozymeならびにtRNAに着目し、各分子を認識するリボソーム膜をデザインし、さらにRNA分子の高次構造が制御される事を明らかにした。

以上の様に、本学位論文では、リボソーム膜のミクロ相分離ならびにナノドメイン構造を解析する手法を体系的に検討した上で、生体高分子(一本鎖RNA、ペプチドなど)を認識ならびにその高次構造を制御する手法について示されている。以上の知見は、自己組織系を「場」として活用するための新しい化学工学の基盤技術の創成に展開可能である事を示している。よって、博士(工学)の学位論文として価値のあるものと認める。