



Title	Novel Phospholipid Probes for Exploring Biomembrane Functions and Their Behavior in Model Membranes
Author(s)	Cui, Jin
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52273
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name	(Jin Cui)
Title	Novel Phospholipid Probes for Exploring Biomembrane Functions and Their Behavior in Model Membranes (生体膜機能解明のためのリン脂質様プローブ分子の開発とモデル膜系での動態解析)
Abstract of Thesis Lipid rafts show a similar character to the lipid ordered (L_o) phase in artificial membranes, which are often represented by microdomains enriched with sphingolipids and cholesterol (chol). The physicochemical properties of the specific lipids are believed to be important for fulfilling the rafts' functions such as cellular signal transduction. To gain better insight into the role of lipid rafts in these processes, a direct optical visualization of these domains is essential. The Raman image can be generated by measuring a specific molecular vibration to locate the Raman-tagged molecules. Three Raman probes of sphingomyelin (SM) were synthesized and evaluated for their applicability to imaging experiments. One probe containing a hydroxymethyl-1,3-butadiyne moiety in the polar head group showed strong scattering. The solid-state deuterium nuclear magnetic resonance (^2H NMR) spectra of the probe revealed excellent compatibility with natural SM in phase behavior by indicating that the probe undergoes phase separation to form raft-like L_o domains in the raft-mimicking mixed bilayers. Uncovering the behavior of individual lipids in membranes is necessary for a better understanding of the molecular mechanisms underlying the biomedical functions of lipid rafts. Dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) is a typical liquid disordered (L_d) component in raft-model membranes, and has often been used to prepare a ternary mixture with SM and chol that forms L_o/L_d-co-existing bilayers. Although incorporation of unsaturated DOPC into L_d phases is energetically favorable, a small amount of DOPC is always found in L_o phases. However, this phase segregation is difficult to detect using a previously reported DOPC probe ($[\text{C}11-^2\text{H}_2]$ DOPC). $[\text{C}6-^2\text{H}_2]$ DOPC was designed based on molecular dynamics (MD) simulation and synthesized through a highly efficient synthetic route. $[\text{C}6-^2\text{H}_2]$ DOPC shows clear phase separation and characteristic phase behavior at various temperatures. It was successfully utilized for the comparison of membrane properties between SM and dihydrosphingomyelin (DHSM) membranes. It is of great biological significance to understand how the lipids and proteins interact in membranes. Bacteriorhodopsin (bR) is the only protein in the purple membrane (PM) of <i>Halobacterium halobium</i> and exists in trimer form with 6 lipids located within the trimer and 24 lipids surrounding the protein surface. Phosphatidylglycerophosphate methyl ester (PGP-Me) is the major phospholipid in PM. An analogue of	

PGP-Me with two simple straight side chains was selected to prepare the model membranes to mimic the native cellular environment for the *in situ* study of lipid-protein interactions. A stereoselective synthetic route to the analogue was developed using H-phosphonate chemistry. ^2H -labeled PGP-Me analogue was synthesized and used as an isotope probe for a mesoscopic investigation of lipid-protein interactions in membranes. Solid-state ^{31}P NMR spectra suggested the formation of multiple phases using the analogue in bilayer preparation on glass plates. ^2H NMR spectra provided useful information of lipid-bR interactions in multilamellar dispersions.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (Jin Cui)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	村田 道雄
	副 査	教 授	深瀬 浩一
	副 査	教 授	北條 裕信

論文審査の結果の要旨

脂質膜の可視化は、細胞膜に形成される機能性脂質ドメイン構造を解明するうえで非常に重要であり、近年、研究開発が盛んになりつつある。Jin 氏はユニークな発想に基づき、ラマン散乱を有するイメージング用分子プローブや、固体 NMR によるドメイン構造の評価に有用な重水素化脂質プローブなどを設計・化学合成した。さらに、これらの分子プローブを用いて、実際のイメージング実験や固体 NMR 測定を行い、他の実験手法では得られない新たな知見を得ることに成功している。

Jin 氏は、まず、細胞膜中にマイクロドメインを形成することで注目を集めているスフィンゴミエリンに注目した。この脂質はコレステロールとともに硬い膜ドメイン（脂質ラフト）を形成し、他の脂質と相分離することによって重要な細胞機能を担っていることが分かっているが、この脂質ラフト形成の分子機構が不明である。彼は、脂質を三重結合で標識したプローブ分子を化学的に合成した。共同研究者によって観測されたラマンイメージングの結果、従来提唱されていた脂質ラフトとは異なる相分離状態を示すことがわかった。また、天然脂質と若干構造の異なるこれらのプローブ分子について、脂質ラフトモデル膜を用いて、膜中での運動性などを詳細に検討した結果、この分子は母体のスフィンゴミエリンと、膜中運動性やドメイン分離能などが酷似しており、モデル系におけるプローブ分子として十分に使用できることを示した。この過程で、通常軟らかいドメインを形成する不飽和リン脂質が、ラフト様ドメインに分配されたときに示す挙動を、新たに合成した重水素化リン脂質を用いて精査した。その結果、従来研究対象となることがなかったこれらの不飽和リン脂質のラフト膜形成に対する影響を評価することができるようになった。

また Jin 氏は、独自に開発した化学合成法によって、好塩菌の細胞膜に特異的な脂質のモデル分子とその標識体を合成することに成功した。この過程で、彼はリン酸エステルを 2 つ有するグリセロールの光学活性体を立体配置選択的に合成する方法論を見つけ出し、広い範囲の脂質合成に適応できる可能性を示した。得られた標識脂質、およびモデル膜タンパク質としてバクテリオロドプシンを用いて、タンパク質-脂質相互作用を調べた。具体的には、本脂質の有する 2 つのリン酸エステル部位が、膜タンパク質と強く相互作用することを、重水素固体 NMR を用いて調べた結果、相互作用を示すシグナルの変化を観測することに成功した。これらの成果は、タンパク質-脂質相互作用を研究するうえで、現実的な実験手法を提案するものであり、今後の研究発展の契機となると期待される。

以上のように、本論文は博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。

