

(様式 1-2)

提出日：2020 年 4 月 30 日

2019 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

(2) 研究成果の概要

課題名	生体内の微小小胞を構成する脂質分子種の NMR 解析		
研究代表者	氏名	花島 慎弥	
	所属機関名・部局名	大阪大学・理学研究科	
	職名	講師	
事業名 (該当の事業名の右欄に○)	<input type="radio"/>	共同研究員	
	<input type="radio"/>	超高磁場 NMR 共同利用研究課題	
	<input type="radio"/>	クライオ電子顕微鏡共同利用研究課題	
	<input type="radio"/>	客員フェロー	
蛋白研受入担当教員名	宮ノ入 洋平		
<p>100 μm 程度の微小な小胞であるエクソソームは、ガンの特定部位への転移に関与するなど近年、大きな注目を集めている。エクソソームなどの微小な小胞を包む膜には、スフィンゴミエリンやスフィンゴ糖脂質、コレステロールといった細胞膜に存在する脂質ラフトを構成する脂質分子種が豊富に含まれている。しかしながら、その詳細な包む膜構造に関しては、内葉と外葉を構成する脂質の組成に細胞膜のような非対称性があるのか、脂質ラフトのような機能ドメインを有するかどうか等々、よくわかっていない。そこで、生体中の微小小胞ならびに人工の微小リポソームの脂質膜を構成する脂質分子を高感度 NMR を用いて膜破壊をとまなうことなく直接観測して、脂質分子の種類と表裏の膜の脂質組成を調べる。2. エクソソームの標的部位との融合に関与する膜タンパク質インテグリンのヘテロ二量体とガングリオシド GM3 の相互作用を NMR を用いて解析する。</p> <p>本年度は PC-3 細胞を培養して PC 3 細胞由来エクソソームを精製して超遠心または TIM4 ビーズによる精製を経て取得した。95 nm 程度のサイズで純度の高いエクソソームが回収された。</p> <p>エクソソームの脂質頭部のコリン基を観測するため、溶液 $^1\text{H-NMR}$ を測定した。さらにシグナル帰属のため、リン脂質を用いて粒形がエクソソームと同様な 100 nm 程度のリポソームを作成して比較をおこなった。シグナルの帰属は固体 NMR を用いて 5 kHz マジックアングルスピニング (MAS) 条件下で $^{13}\text{C-}^1\text{H}$ 相関を測定することで行った。その結果、コリン基由来のシグナルは $\text{C}\alpha$ と $\text{C}\beta$ 上のプロトンの信号のみが観測された。そこで、固体 NMR で 12 kHz 以上の MAS 条件下で ^1H NMR 測定するとトリメチルアンモニウム由来の広幅なシグナルが観測できた。</p> <p>CF_3 基を有する GM3 プローブを共同研究グループより供与いただき、リン脂質リポソームに導入して static 条件下で固体 NMR を測定した。CF_3 基のフッ素間の同種核双極子相互作用と化学シフト異方性により幅の広い三重線が観測された。脂質膜中にコレステロールが共存している条件下では、三重線の間隔が狭くなった。CF_3 基を有する脂質頭部が傾いていることが示唆され、成果を論文にまとめて報告した。</p>			