

提出日:2024 年 4 月 26 日

2023 年度 Bio-SPM 技術共同研究事業

研究成果の概要

実験課題名		凝固関連因子のリン脂質膜結合過程および複合体形成過程の動的解析	
申請者 (実験責任者)	氏名	森下 英理子	
	所属機関名・部局名	金沢大学 医薬保健研究域 保健学系	
	職名	教授	
利用した Bio-SPM 技術 (該当の技術の右欄に○)		<input type="checkbox"/>	原子分解能/3D-AFM
		<input checked="" type="checkbox"/>	高速 AFM
		<input type="checkbox"/>	SICM
		<input type="checkbox"/>	細胞測定 AFM
NanoLSI 受入担当教員名		古寺 哲幸	
<p>血管が傷害されると凝固因子が次々に活性化され、最終的にはフィブリノゲンからフィブリンが形成されて、フィブリン血栓となり止血が完了する。これら凝固因子の活性化反応は生体膜の基本構造であるリン脂質二重膜上で効率的に進むことが明らかとなっており、凝固因子とリン脂質膜の結合動態や、リン脂質膜上での凝固因子活性化複合体形成過程を理解することは、凝固因子関連疾患の病態解明において重要である。本研究では凝固因子のプロトロンビンに着目し、プロトロンビン 1 分子レベルでの可視化、プロトロンビンがリン脂質二重膜上に結合する過程のリアルタイム観察を目的とした。</p> <p>【プロトロンビン 1 分子レベルでの可視化】</p> <p>リコンビナントプロトロンビンを高純度精製し、HS-AFM にてマイカ基板上でのプロトロンビンを観察した。その結果、全長 0.8-1.0 nm のタンパク質が多く確認された。Bio AFM viewer を用いて作製したプロトロンビンの予測撮像モデルから全長は約 0.9 nm と推測され、HS-AFM にて確認されたタンパク質とほぼ同様の長さや形状をしており、1 分子レベルでのプロトロンビンの撮影に成功した。</p> <p>【プロトロンビンがリン脂質二重膜に結合する過程の可視化】</p> <p>マイカ基板上に生体膜を模したリン脂質二重膜を作製し、観察した。そこにプロトロンビンを添加して、添加前に観察したのと同じリン脂質膜を確認したところ、リン脂質膜辺縁部に結合したプロトロンビンを可視化することに成功した。さらに、経時的に観察を続け、プロトロンビンがリン脂質膜辺縁部に結合する過程をリアルタイムで撮影することにも成功した。</p> <p>【リン脂質膜結合異常を有すると推測されるプロトロンビン変異体とリン脂質二重膜の相互作用解析】</p> <p>プロトロンビンは N 末端側の Gla ドメインを介してリン脂質膜と結合する。この部位に変異を有する 2 種類の異常プロトロンビンを精製し、リン脂質二重膜への結合動態を野生型と比較した。その結果、2 種類の異常プロトロンビンは野生型に比べてリン脂質膜辺縁に結合する分子数が少なく、画像解析から算出したリン脂質膜単位長さあたりの結合数 (μm)も野生型より低値を示し、リン脂質との結合能低下を示すことができた。今後は、プロトロンビンがリン脂質の曲率を認識しているのかを解明するため、凹凸基板での検討を進める。</p>			

※本様式 3 は、“事業成果報告”として、NanoLSI Web サイトにて公開させていただく予定です。

※必ず A4 用紙 1 枚におさめて下さい。 ※提出期限:2024 年 5 月 10 日(金) ※提出の際は PDF 変換して下さい。

※提出先:金沢大学 WPI-NanoLSI Bio-SPM 技術共同研究事業担当係 山崎 E-mail: nanolsi_openf01@ml.kanazawa-u.ac.jp