

提出日:2025 年 4 月 22 日

2024 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二重膜への結合動態解明とリン脂質二重膜の曲率との関連性	
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○)			原子分解能/3D-AFM
		○	高速 AFM
			SICM
			細胞測定 AFM
NanoLSI 受入担当教員名		古寺 哲幸	
申請者らは、前年度の課題にて、凝固因子のプロトロンビン (PT) が γカルボキシグルタミン酸 (Gla) ドメインを介して結合する様子を捉えることに成功している。今年度は、Gla ドメイン変異体のリン脂質結合動態の解析を行った。 【Gla ドメイン変異体のリン脂質結合数の解析】 Gla ドメイン変異体 PT Nijmegen (p.E50K) と PT Shanghai (p.E72G) のリン脂質結合動態を観察した。マイカ基板上にリン脂質二重膜を作製し、PT-野生型 (WT) および変異体 2 種を添加し、撮影した。リン脂質辺縁 1μm あたりの PT 結合数を算出したところ、平均値はそれぞれ、WT 19/μm、PT Nijmegen 6/μm、PT Shanghai 9/μm と、WT に比べ、Gla ドメイン変異体ではリン脂質膜結合数が有意に低下していた ($p < 0.001$)。PT を予め Buffer で十分に攪拌してプールに入れて観察する方法を試した結果、リン脂質周囲に存在する PT 分子数が均等になりやすいことが判明したため、現在この条件での再解析を進めている。 【Gla ドメイン変異体のリン脂質結合時間の解析】 マイカ基板上に固定したリン脂質二重膜に PT が結合していく過程を撮影した動画を用いて、結合時間を解析した。PT-WT および Gla ドメイン変異体 2 種それぞれ 166 分子の rPT がリン脂質膜に結合する時間を計測した。本解析では結合時間の上限を 20 秒とした。解析結果を中央値(四分位範囲)で示す。WT の結合時間は 20.0 秒(2.9–20.0)であったのに対し、PT Nijmegen は 1.5 秒(0.4–5.1)、PT Shanghai は 1.8 秒(0.4–20.0)と、いずれも有意に短かった ($p < 0.0001$)。ヒストグラム解析からは、結合時間が 20 秒以上の「長時間結合群」と、20 秒未満の「短時間結合群」が存在することが示された。この分類に基づいて各群の割合を比較した結果、20 秒以上結合した分子の割合は、WT が 54.2%、PT Nijmegen が 12.0%、PT Shanghai が 39.2%であり、両変異体ともにリン脂質膜への結合時間が短縮していた。本研究により、PT のリン脂質膜結合動態には結合時間の長短で異なる 2 つの挙動が存在することが示唆された。現在、結合時間上限を 100 秒に延長し、結合時間の再解析を進めている。			

※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:2025 年 5 月 9 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 国岡 E-mail: nanolsi_openf01@ml.kanazawa-u.ac.jp