

提出日:2020 年 5 月 8 日

2019 年度 Bio-SPM 技術共同研究事業

研究成果の概要

実験課題名		1 回膜貫通型受容体のコンフォメーション変化の検証	
申請者 (実験責任者)	氏名	禾 晃和	
	所属機関名・部局名	横浜市立大学・大学院生命医科学研究科	
	職名	准教授	
利用した Bio-SPM 技術 (該当の技術の右欄に○)		<input type="checkbox"/>	超解像 AFM (FM-AFM 及び、3D-AFM)
		<input checked="" type="checkbox"/>	高速 AFM
		<input type="checkbox"/>	SICM
NanoLSI 受入担当教員名		古寺哲幸教授	
<p>末梢組織や肝臓などの細胞が細胞外から脂質やコレステロールを取り込む方法として、受容体介在型エンドサイトーシスという現象が知られている。脂質とコレステロールの会合体である低密度リポタンパク質 (LDL) が、細胞表面に発現する LDL 受容体 (LDLR) に結合し、エンドサイトーシスによって細胞に取り込まれる。酸性でかつ低カルシウム濃度の環境であるエンドソーム内腔に輸送された LDL と LDLR の複合体は解離し、LDL のみがリソソームへと運ばれる。一方で、LDL と解離した LDLR は、再利用されて新たな LDL を取り込むために、細胞表面に逆送される。この LDLR による LDL の取り込みのサイクルは、PCSK9 という分泌タンパク質によって調節されることも知られている。PCSK9 は、LDLR の細胞外ドメインに結合し、LDL などのリガンドと同様にエンドサイトーシスによって細胞内へと取り込まれる。しかしながら、LDL との結合と異なり、PCSK9 との結合はエンドソームの環境で増強され、LDLR は PCSK9 とともにリソソームへと輸送されて分解される。これら LDLR の再利用と分解のバランスは、血中コレステロール濃度の維持に重要であり、PCSK9 の変異によって LDLR との親和性が向上すると、LDLR の過剰な分解が起きることによって高コレステロール血症が発症することが知られている。</p> <p>LDLR については、モジュラー状の細胞外ドメイン全長についても構造解析が進展しており、細胞表面やエンドソーム内腔での状態を反映した立体構造が決定されている。一連の解析から、LDLR は pH が中性の細胞表面では、揺らいだ構造をとる一方、酸性のエンドソーム内腔では、収縮し閉じた (contracted-closed 型) 構造をとることが示唆され、この contracted-closed 型構造の形成が、LDL やリールンなどのリガンドの解離を促進するという仮説が示された。しかしながら、この仮説は分子同士のパッキングの影響を強く受ける結晶構造に基くものであったことから、高速 AFM を用いて、pH 依存的な構造変化が見られるかを検証した。本研究の研究対象である LDLR 細胞外ドメインは、多数の糖鎖修飾を受けることから、動物細胞を用いて実験試料を発現精製した。本課題では、マイカ上への分子の固定方法の検討を重点的に進めた結果、細胞表面の環境を模した中性条件とエンドソームの内腔の環境を模した酸性条件で分子の形状や運動性に関する情報を取得することができた。</p>			