

提出日:2021 年 5 月 7 日

2020 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 pH 依存的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○)			超解像 AFM(FM-AFM 及び、3D-AFM)
		○	高速 AFM
			SICM
NanoLSI 受入担当教員名		古寺哲幸教授	
<p>ヒトなどの高等生物が、末梢組織や肝臓などにおいて、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。この現象では、脂質とコレステロールが会合した低密度リポタンパク質 (LDL) と呼ばれる粒子が、末梢組織や肝臓の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。LDL 受容体は、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ると LDL 粒子と解離し、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、再度 LDL を取り込むために、細胞表面に送り返される。この LDLR による LDL の取り込みのサイクルの調節には、PCSK9 というタンパク質も関わることが知られている。PCSK9 は、LDLR の細胞外領域の EGF モジュールに結合し、LDL 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酸性環境で安定化されるため解離が起きず、LDLR は PCSK9 とともにリソソームの分解系へと運ばれる。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、LDLR への変異のみでなく、PCSK9 への変異によっても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、X 線結晶解析によって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、可動性が高い構造をとる一方、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 などのリガンドの解離を促進するという仮説が提唱されている。しかしながら、この仮説は結晶構造に基づくものであることから、高速 AFM を用いて、pH 依存的なコンフォメーション変化が観測されるかを検証した。本研究の研究対象である LDLR 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。さらにビオチン化修飾を行うことで、アビジン様タンパク質を介してマイカ上に固定化し、AFM 測定を行った。測定結果から、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顕著な違いが見られることが明らかになった。本研究の成果は、学会発表でも高く評価されており、本研究に参画した大学院生は、第 58 回日本生物物理学会でポスター発表を行い、学生発表賞を受賞した。</p>			