

提出日:2024 年 4 月 8 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		細胞表面受容体の pH 依存的構造変化の観測	
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○)			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 教授	
<p>ヒトなどの高等生物は、末梢組織や肝臓などにおいて、受容体介在型エンドサイトーシスという現象によって細胞外から脂質やコレステロールを取り込むことが知られている。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、細胞表面受容体である LDL 受容体(LDLR)に特異的に結合し、エンドサイトーシスによって末梢組織や肝臓の細胞に取り込まれる。LDL と特異的に結合した LDL 受容体は、酸性環境であるエンドソーム内腔に輸送されると LDL 粒子を手放し、LDL のみがリソソームへと運ばれる。一方、LDL と解離した LDLR は、細胞表面に送り返されて、LDL を取り込むために再利用される。この LDL の取り込みと LDLR の再利用の調節には、PCSK9 というタンパク質も関わる。PCSK9 は、LDLR の細胞外領域に結合し、エンドサイトーシスによって細胞内へと取り込まれる。LDL はエンドソームで LDLR から解離する一方で、PCSK9 と LDLR 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せず、PCSK9 とともに LDLR はリソソームへと運ばれ、分解される。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 や PCSK9 の変異は、LDL の取り込み異常を引き起こし、高コレステロール血症等の脂質異常症に繋がることが知られている。</p> <p>LDLR は多数の球状ドメインが連なったマルチドメインタンパク質であるが、X 線結晶解析によって複数の立体構造が報告されている。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も決定されており、細胞表面に近い pH が中性の条件では、可動性が高い構造をとる一方、エンドソーム内腔に近い酸性の条件では、収縮し閉じた構造をとることが示唆されている。そして、この収縮し閉じた構造の形成が、LDL の解離を促進するという仮説も提唱されている。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 依存的にコンフォメーションが変化するかを検証した。本研究では、LDLR 細胞外領域断片の C 末端にビオチン化修飾を行い、アビジン様タンパク質を介してマイカ上に固定化して AFM 測定を行った。本年度は、高速 AFM で撮影したライブイメージの解析に加えて、LDLR の力学的性質の評価も行うことで、pH 依存的なコンフォメーション変化の検出に取り組んだ。研究代表者らは、本課題で得られたプレリミナリーな研究成果を 2023 年度日本生化学会でポスター発表した。</p>			