

提出日:2025 年 4 月 8 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		AFM を用いた LDLR ファミリー受容体の構造特性の評価	
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	
脂質の一種であるコレステロールは生命維持に欠かせない成分の一つであり、食事から摂取される他、肝臓などの組織で合成される。コレステロールはリン脂質などとともにアポリポタンパク質 B-100 と会合し、低密度リポタンパク質 (LDL) と呼ばれる粒子を形成し、血中を運搬される。LDL は、末梢組織に到達すると、細胞表面受容体である LDL 受容体 (LDLR) と結合し、細胞内へと取り込まれる。細胞表面で LDL と特異的に結合した LDLR は、エンドサイトーシスによって酸性環境であるエンドソーム内腔に輸送されると LDL 粒子を解離する。LDL は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、新たな LDL を取り込むためにリサイクルされる。この LDL の取り込みと LDLR のリサイクルは、PCSK9 という糖タンパク質によっても制御される。PCSK9 は、LDLR の細胞外領域の EGF モジュールに結合し、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、LDLR はリソソームへと誘導され、分解される。LDLR のリサイクル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、遺伝性の LDLR や PCSK9 の変異は、若年時からコレステロール濃度が異常に高い値を示して循環器疾患の発症を引き起こす、家族性高コレステロール血症の原因となる。 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り、X 線結晶解析やクライオ電子顕微鏡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、伸びた構造をとって可動性が高い一方で、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、この仮説は静的な構造情報に基づくものであることから、高速 AFM を用いて動的構造解析を行うことで、pH 依存的なコンフォメーション変化が起きるかを検証することとした。本研究では、ビオチン化修飾を施した LDLR 細胞外領域断片を動物細胞で発現させ、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、特に、高速 AFM を用いた LDLR の力学的性質の評価の実験系の最適化に取り組んだ。本課題で得られたプレリミナリーな研究成果について、共同実験者である石田は 2024 年度日本生化学会でポスター発表し、研究代表者である禾は日本結晶学会の招待講演で紹介した。			