

令和元年6月13日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15071

研究課題名(和文)脂質輸送粒子リポホリンの分子基盤

研究課題名(英文)Molecular basis for lipid transfer particle, lipophorin

研究代表者

喜多 俊介(Kita, Shunsuke)

北海道大学・薬学研究院・特任助教

研究者番号：10702003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の脂質輸送はリポホリンと呼ばれる蛋白質複合体によって担われている。リポホリンによる脂質輸送機構は、昆虫独自のシステムであり、脂質を輸送した後にリサイクルされるなどの特徴を持っている。本研究では昆虫のリポホリンの脂質輸送機構を解明するため、カイコのリポホリンの立体構造解析を行った。本研究で用いたリポホリンは、カイコ幼虫の体液から精製して調製した。精製したリポホリンを電子顕微鏡で観察したところ、均一な大きさの球形の粒子が観察された。さらにリポホリンと協力して脂質を輸送するLTPについても電子顕微鏡を用いて観察を行い、エビのようにくの字に折れ曲がった粒子であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて、昆虫の脂質輸送を担うリポホリンやLTPの立体構造情報を部分的ではあるが解明した。昆虫の脂質輸送機構はヒトを含む高等生物とは異なり、独自のシステムとなっており立体構造も特徴的であるため、これまで知られてきた脂質輸送システム概念をアップデートしたと言える。今後は昆虫の脂質輸送機構を模倣して、幅広く膜タンパク質やリポタンパク質の研究に応用していきたい。

研究成果の概要(英文)：The lipid transportation of insects are carried out by protein complex, lipophorin. Lipophorin-mediated lipid transportation is an insect specific system and has a unique feature that lipophorin is recycled after lipid transportation. In order to reveal the lipid transportation mechanism of lipophorin, structure analysis of silkworm lipophorin was performed. Lipophorin proteins used in this study were purified from hemolymph of silkworm larvae and was observed by electron microscope. The observed lipophorin particles showed uniform-sized spherical shape. Further LTP proteins which work together with lipophorin were also prepared and observed by electron microscope. The result showed that LTP particles bended in a middle like shrimp.

研究分野：構造生物化学

キーワード：脂質輸送 電子顕微鏡 昆虫 タンパク質 脂質 リポタンパク質

様式 C-19, F-19-1, Z-19, CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リポホリンは、apolipoprotein (apoLp) - I (291 kDa), apoLp - II (75 kDa), apoLp - III (18 kDa) の3種類の蛋白質によって構成される蛋白質複合体で、カイコの脂肪体と呼ばれる組織から体表・筋肉への脂質輸送を担っている(図1)。リポホリン自身は、体表や筋肉へ脂質を輸送した後、積み荷である脂質をおろし再利用されると考えられている。脂質を積込んだ状態のリポホリンを低密度リポホリン (LDLp)、空の状態を高密度リポホリン (HDLp) と呼ぶ。哺乳類における脂質輸送系では担体であるリポ蛋白質は、受容体を介したエンドサイトーシスによりリポ蛋白質自体が取り込まれ代謝される。他方、リポホリンは脂質を受け渡した後リサイクルされる。リポホリンが輸送する脂質はジアシルグリセロール、コレステロールや脂肪酸などで、哺乳類のリポ蛋白質が輸送するトリアシルグリセロールやコレステロールエステルは輸送しない。これらのことから、昆虫は哺乳類のリポ蛋白質とは異なる、独自の脂質輸送機構を有していると考えられる。

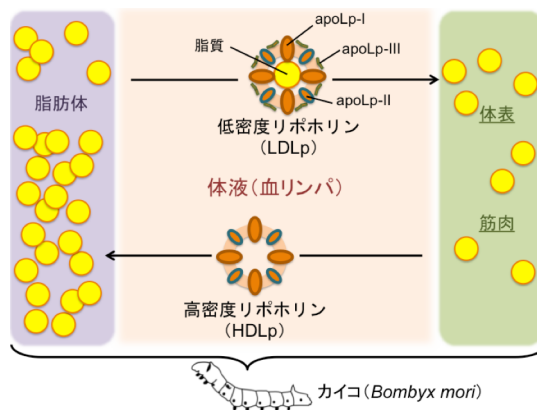


図1 リポホリンによる脂質輸送の模式図。

リポホリンは、1969年に茅野らによってジアシルグリセロールを輸送する粒子として発見された。その後、リポホリンを構成する蛋白質、輸送する脂質の解析を中心に研究が展開された。最近の研究では、リポホリンは脂質輸送だけでなく、その他の様々な生命現象と関わっていることが示されている。昆虫の自然免疫においては、リポホリンは細菌の細胞壁構成成分であるリポ多糖と結合することで、細菌の増殖を抑制することが知られている (Andreas W. et al., *J. Insect Physiol.*, 1997)。また、昆虫の胚発生の過程では、パターン形成に関わる Wingless ファミリーや Hedgehog ファミリー蛋白質の輸送を行うことが報告された (Daniela P. et al., *Nature*, 2005)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、リポホリンの立体構造解析、リポホリンの輸送する脂質の解析、立体構造に基づいたリポホリンの蛋白質、創薬研究への応用である。リポホリンは脂質輸送を始め、様々な生命現象に関わる非常に興味深い生体分子であるが、その構造生物学的側面はほとんど明らかになっていなかった。そこで本研究の主軸を立体構造解析とした。また、リポホリンの輸送する脂質を抽出・同定し、リポホリンの脂質置換を自由自在に行う系を確立することで、将来的にはドラッグデリバリーシステム等へ応用することが可能となると考えた。さらにリポホリンが脂質だけでなく蛋白質も輸送することから、膜蛋白質の機能解析、構造解析用ツールとして応用することを視野に入れ研究に着手した。

3. 研究の方法

カイコのリポホリンは、カイコの体液(血リンパ)に大量に含まれているため、カイコ幼虫の体液(血リンパ)から精製した。精製には密度勾配遠心法、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー、イオンクロマトグラフィーを用いた。リポホリンの立体構造解析はクライオ電子顕微鏡による単粒子構造解析を行った。脂質の解析ではリポホリンから抽出したカイコの内在性脂質を TLC で展開し、標準脂質と比較した。

4. 研究成果

カイコのリポホリンはカイコ5齢幼虫の体液から高純度に精製して立体構造解析、脂質の解析に用いた。本研究の予備実験として英国 Oxford 大学にてクライオ電子顕微鏡 Polara でデータセットの収集を行っており、二次元再構成を行ったところハート型を特徴とする複数の明瞭な投影像が得られていた。さらに三次元再構成を行ったところ、中空の容器のような構造が得られた。この中空構造はらせん状に巻かれたベルトによって形成されていた。このデータセットの分解能は約 12Å であったために、分子機構を考察するためには、より高分解能のデータが必要であった。そこで本研究では、まずリポホリンの溶液条件を検討した。これまでリポホリンの精製には中性条件の Tris-HCl pH8.0 を用いていた。

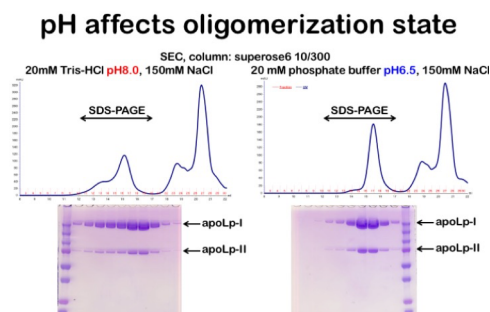


図2 リポホリンのゲルろ過クロマトグラフィーにおける pH の効果。

しかしカイコの体液は pH6.5 付近であることから、リポホリンの精製に MES-NaOH pH6.5 を用いて両条件でのゲルろ過クロマトグラフィーのクロマトグラムを比較したところ、pH8.0 では二峰性のピークとなるのに対して pH6.5 では単峰性のピークが得られた(図2)。さらに pH8.0 と pH6.5 の条件でネガティブ染色を行い、電子顕微鏡で粒子を観察したところ、pH8.0 では凝集体が観察されたが、pH6.5 では粒子は単分散であった(図3)。これらのことから単粒子構造解析には pH6.5 の条件が適していると考えられたため、クライオ電子顕微鏡での観察を行った。今回の観察は、高エネルギー加速器研究機構の Talos Arctica で行った。グリッドは Quantifoil R1.2/1.3, 試料は濃度 $A_{280}=0.5$ を $3\mu\text{l}$

pH affects oligomerization state

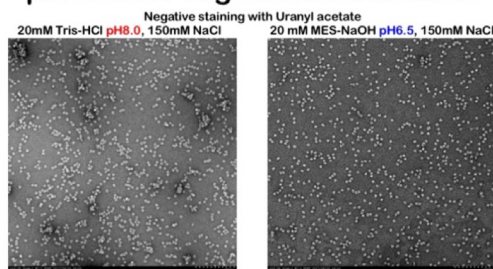


図3 リポホリンのネガティブ染色像。

用いて作製した。データセットを収集し二次元再構成を行ったが、前回と同様にドメインの境界はわかるものの、二次構造を示唆する像は得られなかった。また、今回は粒子の向きが偏っており、三次元再構成まで進めることはできなかった。脂質の解析では、精製したリポホリンから脂質を抽出し、TLCで展開したところ、リン脂質、スフィンゴミエリン、脂肪酸等の脂質が含まれていることが判明した。現在、詳細に解析する準備を進めている。

本研究ではカイコのリポホリンと協同して働く Lipid transfer particle (LTP)についても精製し、電子顕微鏡を用いた観察を行った。LTPは apoLTP-I (350 kDa), apoLTP-II (80 kDa), apoLTP-III (60 kDa) の3種類の蛋白質によって構成される蛋白質複合体でリポホリンへの脂質の受け渡し、及びリポホリンから筋肉や体表への脂質受け渡しを担っている。LTPはカイコ5齢幼虫の体液からリポホリン同様に精製し、ネガティブ染色した試料を電子顕微鏡で観察した。LTPの粒子形状は、くの字の折れ曲がったエビのような形をしており、頭部と尾部の配置が粒子ごとに異なっていたことから、尾部は頭部に対して動的に構造変化していることが示唆された。LTPについても現在クライオ電子顕微鏡での観察準備を進めている。

本研究で昆虫の脂質輸送を担うリポホリンと LTP について、構造生物学的知見を得ることに成功した。しかし詳細な分子機構を理解するためには、更なるデータの収集と試行錯誤が必要である。本研究で得られた知見をもとに、引き続き昆虫の脂質輸送機構解明に向けて研究を進めたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

- ① 喜多 俊介, 日下裕規, 前仲勝実, カイコ脂質輸送蛋白質の機能解析, 日本生化学会, 2018

〔図書〕(計1件)

- ① Kita S et al., CRC press, Silkworm Biofactory: silk to biology, 2018, 308

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：

取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。