

【成果情報名】 変性LDL受容体はオリゴマーを形成して機能する

【要 約】 変性LDL（悪玉コレステロール）受容体(LOX-1)は、分子間S-S結合によるダイマーを基本単位として存在しているが、酸化LDLの認識には受容体濃度に依存したオリゴマー化が必須である。またLOX-1は、ビオチン化受容体としての認識能の再構築が可能である。

【部 署】 食品総合研究所・応用微生物部・生物変換研究室

【連絡先】 研究室名 029-838-8061

【成果区分】 参考

【キーワード】 受容体機能制御、認識能の活用、酸化 LDL 受容体、ビオチン化受容体、受容体チップ

【背景・ねらい】

受容体は、特異的かつ高感度に様々な分子を認識することから、その分子認識能の評価技術への利用、評価用素材としての活用が期待されるが、機能制御、安定性、安定供給などに問題があり活用に至っていない。食品産業における活用のためには、安定性の向上、機能制御などを可能にする基盤技術の開発に直結する受容体分子の機能発現制御機構に関する知見の蓄積が求められている。そのために必要な機能発現機構を明らかにすると同時に、機能の再構築を可能にする技術開発を推進する。

【成果の内容・特徴】

1. 変性LDL受容体(LOX-1)は、分子間S-S結合によるダイマーを基本単位としているが、細胞における存在形態を解析すると、LOX-1はオリゴマーを形成することによりリガンド(変性LDL)認識能を発現する(図1、2)。
2. 蛍光タンパク質(CFP)との融合タンパク質として発現させたLOX-1(CFP/LOX-1)の発現量と蛍光(DiD)標識したリガンド(DiD-AcLDL)の取り込み量を、各々の蛍光強度により定量化した(図3)。LOX-1発現量が閾値以下の細胞集団(緑の集団)では、リガンドの取り込みが観察されず、閾値以上の細胞集団においてLOX-1発現量に依存した取り込みが観察され(青の集団)、LOX-1の機能発現に必須のオリゴマー化は、受容体の密度に依存して生じる。
3. 1、2から再構築LOX-1の認識能の活用において、受容体の高密度集積が重要である。
4. LOX-1のリガンド認識に必須な領域は、N末端ビオチン化受容体として大腸菌を宿主として簡単に大量調製することが可能であり、調製されたビオチン化受容体はストレプトアビジンを介して、基板に方向性を維持した状態で固定化される。固定化された再構築LOX-1とリガンドとの相互作用を測定した所、リガンド濃度に依存した結合(図4.縦軸のRU値が結合量を示す)を示し、再構築LOX-1は、特異的認識能を維持していた。

【成果の活用面・留意点】

既に特許出願などを完了している受容体認識能の再構築を進展させ、受容体チップとしての活用を目指した研究への展開が可能である。チップ化においては、認識能の向上、安定化は極めて重要な課題であるが、LOX-1が生体内ではオリゴマーとして機能しているという知見は、再構築受容体の改変に積極的に活かすべき情報である。

[具体的データ]

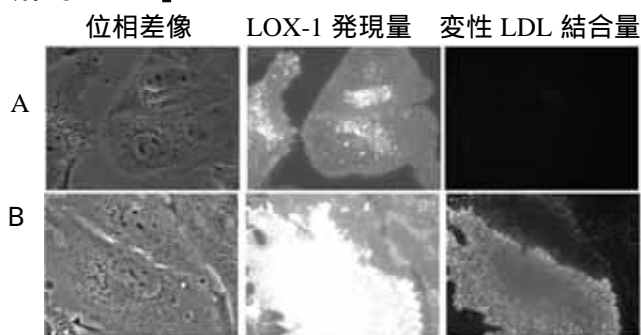


図 1 LOX-1 発現量が一定の値に達しないグループ A においては、変性 LDL の結合が観察されない。

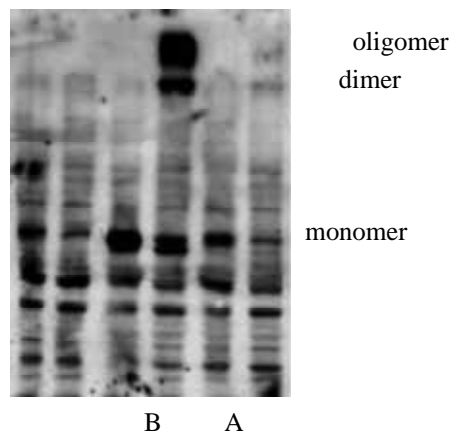


図 2 変性 LDL の結合能が検出されるレベルの細胞において相当量のオリゴマーが検出される。

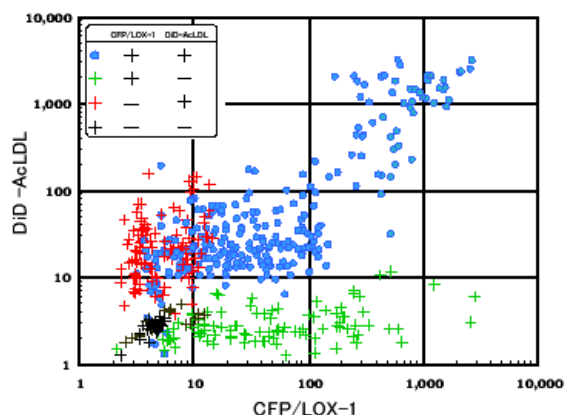


図 3 . 蛍光タンパク質融合 LOX-1(CFP/LOX-1)の発現量と蛍光標識リガンド(DiDAcLDL)の取り込み量の相関図。発現量が閾値以上の細胞集団 (青) においてのみ、発現量に応じた取り込みが観察され、閾値以下の集団 (緑) では取り込みが観察されない。

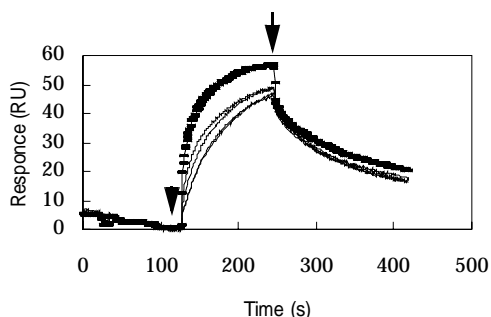


図 4 . 固定化 LOX-1 とリガンドとの相互作用。120 秒 ▼ で AcLDL を添加、250 秒 ▼ で洗浄を開始。AcLDL の結合に伴う RU 値の上昇と解離に伴う減少が観測される。

[その他]

研究課題名：スカベンジャー受容体会合体形成と機能発現機構の解析

予算区分：交付金「形態生理」、委託費「食品総合」

研究期間：2001～2005年度

研究担当者：町田幸子

発表論文等：

- 1) I. Ohki *et al.*, Crystal structure of human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 ligand binding domain and its ligand recognition mode to OxLDL, *Structure*, **13**(4), 905-917 (2005)
- 2) Q. Xie *et al.*, Human Lectin-like Oxidized Low-density Lipoprotein Receptor-1 Functions As a Dimer in Living Cells. *DNA and Cell Biology*, **23**, 111-117 (2004)
- 3) Q. Xie *et al.*, Refolding and Characterization of Functional Ligand-binding Domain of Human Lectin-like Oxidized LDL Receptor. *Protein Expression and Purification*, **32**, 68-74 (2003)
- 4) S. Machida *et al.*, A Methods to produce a receptor chip using biotinylated protein, USA 10-651,563、2003年8月28日
- 5) 町田幸子他：ピオチン化タンパク質を用いる受容体チップおよびその作製方法、特願 2003-304624 (2003年8月28日)