

提出日：平成 29 年 5 月 19 日

平成 28 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

(2) 研究成果の概要

課題名	脂質輸送粒子リポホリンのクライオ電子顕微鏡での形状観察		
研究代表者	氏名	前仲 勝実	
	所属機関名・部局名	北海道大学・大学院薬学研究院	
	職名	教授	
事業名 (該当の事業名の右欄に○)		共同研究員	
		超高磁場NMR 共同利用研究課題	
	○	クライオ電子顕微鏡共同利用研究課題	
		客員フェロー	
蛋白研受入担当教員名	岩崎 憲治		
<p>リポホリンは、昆虫の体内で脂質や炭化水素の輸送を担う粒子である。昆虫は体外から取り込んだ脂質を脂肪体と呼ばれる組織に貯蔵し、リポホリンを利用して筋肉や体表へと輸送した後、エネルギー源や生体の構成成分として利用する。リポホリンは、アポリポホリン(apoLp)-I(291 kDa)、apoLp-II(75 kDa)、apoLp-III (18 kDa) の 3 種類の蛋白質と積み荷である脂質や炭化水素によって構成される蛋白質複合体である。リポホリンの立体構造は、最も小さい apoLp-III のみ明らかになっており、他の構成要素、および全体構造は未解明である。本研究では、カイコのリポホリンを研究対象として、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析によってリポホリン粒子の立体構造を解析し、脂質の認識機構を解明することを目的とする。</p> <p>本年度は、クライオ電子顕微鏡での単粒子構造解析に向けて、リポホリンの精製条件の検討とネガティブ染色法による観察を行った。リポホリンは、カイコ幼虫から体液を回収し、超遠心機を用いた浮上分画法とゲルろ過クロマトグラフィーで精製を行った。精製後の純度については、SDS-PAGE で確認し、リポホリンの構成蛋白質 (apoLp-I, II と III) のみが存在することを確認した。ゲルろ過クロマトグラフィーの精製条件については、複数の緩衝液を試し、北海道大学の電子顕微鏡でネガティブ染色法による粒子の観察・均一性の評価を行った。その結果、中性付近の緩衝液を使用した場合は、ゲルろ過で二峰性ピークが得られ、電子顕微鏡で観察すると粒子同士が不均一な多量体を形成していることが判明した。他方、少し酸性側の緩衝液を使用すると、ゲルろ過のピークは単峰性となり、均一な粒子が分散して存在することが電子顕微鏡で観察された。上記の酸性側の条件で精製したリポホリンを用いて、大阪大学にてネガティブ染色法による観察を行ったが、北海道大学で観察されたものに較べると、形状が不均一であった。サンプル調製から大阪大学での観察まで 2 週間が経過していたことから、リポホリンの分解、もしくはリポホリン構成要素の解離が疑われた。今後は、リポホリン粒子の安定性を経時的変化を追って解析し、必要であれば長期的に安定に存在できる条件を探索する。大阪大学での観察は、精製後速やかに行い、まずはネガティブ染色法で単粒子構造解析を行う。その結果をもとに、サンプル調製方法の更なる改善を行い、クライオ電子顕微鏡での観察へと移行したい。</p>			

※本様式は、“拠点事業成果報告”として、拠点ホームページにて公開させていただく予定です。

※必ず A4 用紙 1 枚におさめて下さい。 ※提出期限：平成 29 年 5 月 19 日（金） ※提出の際は PDF 変換して下さい。

※提出先：大阪大学蛋白質研究所拠点プロジェクト班 E-mail: tanpakuken-kyoten@office.osaka-u.ac.jp