

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | マクロフェージスカベンジャー受容体のリガンド取り込みと遊離に関する分子生物学的研究   |
| Author(s)    | 森本, 和伸  |
| Citation     | 大阪大学, 1999, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/41355">https://hdl.handle.net/11094/41355</a>   |
| rights       |   |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

|            |  |
|------------|--|
| 氏名         | もりもとかずのぶ<br>森本和伸   |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(薬学)   |
| 学位記番号      | 第14574号  |
| 学位授与年月日    | 平成11年3月25日   |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当<br>薬学研究科薬品化学専攻                              |
| 学位論文名      | マクロファージスカベンジャー受容体のリガンド取り込みと遊離に関する分子生物学的研究                |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 今西 武<br><br>(副査)<br>教授 前田 正知 教授 土井 健史 教授 西原 力 |

#### 論文内容の要旨

近年、わが国でも食生活の欧米化に伴い、狭心症、心筋梗塞、脳卒中などが、成人病の中で大きな位置を占めるようになってきた。それによって、これらの発病のメカニズムの解明が望まれるようになってきている。それらの主な原因であるアテローム性動脈硬化は、病変の発症まで長い年月がかかるため、そのメカニズムについて不明な点が多かった。しかし、近年の疫学的調査、研究により、低比重リポタンパク質 (Low Density Lipoprotein: LDL) が動脈硬化を促進することが示された。Brown と Goldstein は、動物細胞に存在する LDL 受容体が、receptor mediated endocytosis とよばれる機構により、LDL を細胞内に運び込むことを発見した。彼等はまた、動脈硬化になりやすい家族性高コレステロール血症が、LDL 受容体の遺伝的異常により引き起こされることを示した。ここでは、LDL 受容体の欠損によりアテローム性病変が進み、コレステロールが蓄積する。そこで、Brown と Goldstein は、LDL 受容体以外にもコレステロールを取り込む受容体が存在し、これが動脈硬化につながるコレステロールの蓄積をもたらすという仮説をたてた。1979年に彼等は、単球が分化してできるマクロファージ細胞に、酸化、アセチル化などの修飾を受けた LDL を取り込む、後にスカベンジャー受容体と呼ばれる新たな受容体が存在することを提唱した。1988年、児玉、Krieger 等によりこの受容体タンパク質の精製がなされ、次いで児玉、Rohrer、Freeman 等によりウシの cDNA 二種のクローニングが成し遂げられた。これらの配列から予想される受容体タンパク質は、C末端部のみ異なる I 型と II 型の二種の分子により三量体を構成し、特徴的な 6 つの領域からなることが明らかとなった。つまり、選択的にスプライシングされることによって生じるタイプ特異的ドメイン、コラーゲン様構造をもつコラーゲン様ドメイン、N結合糖鎖が結合しうるスパーサー領域とコイルドコイル構造をとる  $\alpha$ -ヘリカルコイルドコイルドメイン、疎水性アミノ酸が連続している膜貫通ドメイン、そして N 末端である細胞質ドメインの 6 つの領域である。

動脈硬化の発症には、コレステロールの過剰摂取などにより、血液中に増加した LDL が、酸化などの修飾を受け、スカベンジャー受容体が、これを取り込むという一連のプロセスが関与している。したがって、スカベンジャー受容体のリガンドの結合、取り込み、エンドソームでの受容体からのリガンドの遊離について研究することは、動脈硬化の発症や抑止薬を研究する上で非常に重要であると考えられる。これまでに著者らのグループによりスカベンジャー受容体のリガンドの結合領域については研究されており、スカベンジャー受容体のコラーゲン様領域の正電荷を持つアミノ酸 (主にリジン) のクラスターがリガンドの認識、結合に関与していることを明らかにしている。そこで、著者は、リガンドの取り込みや遊離に関与することが予想される  $\alpha$ -ヘリカルコイルドコイルドメイン及び細胞質ドメ

インに興味をもち、研究を行った。

受容体のN末端に存在する細胞質ドメイン機能に関しては未だ明らかにされていないが、LDL受容体やトランスフェリン受容体と同様にリガンド取り込み、つまり、receptor mediated endocytosis に関与するシグナル配列が存在すると予想される。そこで著者は、この領域における様々な変異体を作製し、それらの活性を調べることによりそのアミノ酸配列を明らかにすることを試みた。その際、著者は、リガンド取り込み効率のみを見る assay 系を構築した。また、今回構築した assay 系は細胞表面に発現された受容体量についても同時に調べられる系であり、種々の変異体の細胞表面での発現量についても調べた。その結果、リガンドの取り込み効率には、細胞質ドメインのN末端より21番目のバリン、23番目のフェニルアラニン、24番目のアスパラギン酸及び26番目のアルギニンから29番目スレオニンの間のアミノ酸が関与していることが明らかになった。これまで多くの膜タンパク質のエンドサイトーシスモチーフが明らかにされているが、スカベンジャー受容体におけるエンドサイトーシスに関与するこのアミノ酸配列は、そのどの配列にも当てはまらない新規なものであった。このモチーフ配列はエンドサイトーシスされる際、コーティッドピットに受容体を集めるために必要なシグナル配列と考えられ、この配列を何らかの因子が認識することにより、受容体をコーティッドピットに集めているものと考えられる。また、受容体の細胞表面への発現に関しては21番目のバリンから24番目のアスパラギン酸までのアミノ酸配列が深く関与していることが示唆される結果が得られた。詳細な研究を行った結果、これらの細胞表面への発現に関与するアミノ酸の変異による細胞表面への発現量の低下は、受容体タンパク質の小胞輸送による輸送能力の低下、もしくは missorting (誤った選別輸送) であることが示唆された。また、この配列は今まで知られている小胞輸送に関与するモチーフ配列と異なり、新規なアミノ酸配列であった。

スカベンジャー受容体におけるこれらの機能とリン酸化との関連性についても調べた。天然型及び種々の変異体に対しリン酸化を調べた結果、受容体のリガンド取り込み及び細胞表面への発現と受容体のリン酸化との間には関連性はみられなかった。

$\alpha$ -ヘリカルコイルドコイルドメインには、ロイシンジッパー様構造をとりうる配列が二カ所存在し、コイルドコイル構造をとっていると考えられる。この二カ所には、その疎水性アミノ酸の繰り返し配列を中断するように、ヒスチジン残基が1つずつ存在し、これらは種間で保存されている。スカベンジャー受容体はエンドサイトーシスによりリガンドを取り込んだ後、エンドソーム内でのpH低下に伴いリガンドを遊離するが、このヒスチジンの一つのpKaが6.0であることから、このリガンドの遊離にヒスチジンが関与していることが考えられた。つまり、エンドソーム内でのpHの低下に伴い、ヒスチジンがプロトネーションされ、これにより構造変化が生じ、この変化がリガンド結合領域の構造に影響を及ぼし、リガンドを遊離すると考えた。そこで、これらヒスチジンをロイシンに変換した点変異体を作製し、これらのリガンド遊離能などについて調べた。その結果、N末端から260番目のヒスチジンがエンドソーム内でのpH低下にともなうpH依存性のリガンドの遊離に重要な役割を果たしていることが示唆された。このコラーゲン様ドメインに近い260番目のヒスチジンの存在するロイシンジッパー様構造は、ヒスチジンのエンドソーム内でのpH低下にともなうプロトネーションにより不安定化し、それに隣接するリガンド結合領域の構造に影響をうけ、リガンドが遊離したと推察される。

今回得られた研究成果は、スカベンジャー受容体のエンドサイトーシス、細胞表面への輸送、リガンドの遊離過程を動脈硬化抑制策の標的とした場合、その作用点について重要な情報を与えるものと考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

狭心症、心筋梗塞、脳卒中などの主原因であるアテローム性動脈硬化の発症には、酸化などで化学修飾された低比重リポタンパク質 (LDL) のマクロファージスカベンジャー受容への取り込み過程が強く関与している。したがって、本受容体の構造と機能について分子レベルで明らかにすることにより動脈硬化の予防や治療法の開発に結びつけられるものと大いに期待されている。しかし、その詳細は十分には解明されていない。

このような背景の下、申請者は酸化などの化学修飾を受けたLDL (リガンド) の取り込みや細胞質内での遊離に関与することが予想されるスカベンジャー受容体の $\alpha$ -ヘリカルコイルドコイル領域及び細胞質領域の構造と機能と

の相関について本受容体の点変異体，欠失変異体を用いる分子生物学的研究を行った。その結果，リガンドの取り込み効率を評価する新しいアッセイ系を構築し，本系を用いて，細胞質領域の中でリガンド取り込みに関与するアミノ酸残基を明らかにするとともに，本受容体の細胞表面への発現に関与するアミノ酸残基についても強く示唆する知見を得ることに成功した。更に， $\alpha$ -ヘリカルコイルドコイル領域の中の260番目のヒスチジン残基がエンドソーム内でpH依存性のリガンド遊離に重要な役割を果たしていることを示唆する結果を得ている。

以上の成果は博士（薬学）の学位論文として十分価値あるものと認める。