The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	マクロファージスカベンジャー受容体の細胞質領域の機能に関する研究
Author(s)	中村, 肇伸
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43349
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【18】

氏　　名	中村肇伸（なかむらとしのぶ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　16971　号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科生命情報環境科学専攻
学　位　論　文　名	**マクロファージスカベンジャー受容体の細胞質領域の機能に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　土井　健史 （副査） 教　授　前田　正知　　教　授　田中　慶一　　教　授　西原　　力

論文内容の要旨

現在の日本において、欧米化した食生活が浸透するに伴って、虚血性心疾患や脳血管障害が増加し問題となっている。それらの原因となるアテローム性動脈硬化の成因の解明と予防、治療法の開発は、高齢化しつつある社会状況において重要な課題となっている。アテローム性動脈硬化の発症において、プラークと呼ばれる血管病変がみられ、そこにはコレステロールを多量に蓄積した泡沫細胞が形成されている。これらの泡沫化した細胞は、マクロファージ系の細胞に発現するスカベンジャー受容体により変性LDLが取り込まれることによって形成されることが知られている。スカベンジャー受容体は、特徴的な6つの領域から構成され、各領域の機能が明らかにされつつあるが、細胞質領域に関しては、エンドサイトースに関与することが示唆されているが、その機能には不明な点が多く残されている。そこで著者は、エンドサイトーシス及び細胞内シグナル伝達に関与することが予想される細胞質領域に注目して研究を行った。

まず、スカベンジャー受容体の細胞質領域に相当するペプチド（C17A）とC17Aをリンカーを用いて束ねた三量体C17Aを作製した。C17Aと三量体C17AのCDスペクトルを測定した結果、細胞内環境に近い条件（0.1Mリン酸バッファー（pH7.0）中）ではC17A及び三量体C17Aともに特定の二次構造をとらないことが示唆された。しかし、ペプチドの周りに疎水的な環境をつくり、二次構造を誘起するTFE溶液中では、いずれもヘリックス構造をとる傾向がみられ、それぞれ約20%及び30%であった。このことから、細胞内ではヘリックス構造をとる傾向にある可能性が示唆された。また、C17Aと三量体C17Aの間に二次構造に特に変化が見られなかったため、三量体の状態は二次構造に特に影響を与えないことが示唆された。さらに、同様の理由から三量体の状態がヘリックス構造を誘起する因子ではないことが示された。仮にヘリックス構造が受容体機能に重要な役割を果たしているとすれば、細胞内では何らかの因子が結合し、これが細胞質領域のヘリックス構造を誘起することが考えられた。

現在までに、スカベンジャー受容体についてはその細胞質領域を認識するようなアダプタータンパク質が同定されていない。そこで、C17Aを樹脂に固定したアフィニティーカラムを作製し細胞抽出液から結合タンパク質の精製を行った。その結果、約90kDaの未知のタンパク質の他に、GAPDH、S-adenosylhomocysteinase、Leucine aminopeptidase、HSP70及びHSP90が細胞質領域と結合することが示唆された。これらのタンパク質の中で、エンドサイトーシスや細胞内シグナル伝達に関連した知見の得られているGAPDH、HSP70、HSP90について、GST pull down assay及び免疫沈降実験を行い、*in vitro*及び*in vivo*での相互作用について検討した。その結果、これらのタン

パク質が実際に細胞内でスカベンジャー受容体と相互作用していることが示唆された。

HSP70とHSP90は分子シャペロンとしてタンパク質の高次構造形成を促進することが知られている。また、HSP90はチロシンキナーゼ及びセリン/スレオニンキナーゼと複合体を形成し、細胞内シグナル伝達において重要な役割を果たしていることが明らかにされている。さらに、分子シャペロンが膜タンパク質の輸送に関与するという報告があり、HSP70及びHSP90は細胞内輸送に関与する可能性も示唆された。一方、GAPDHは細胞内の基礎的な代謝機能に関与する酵素として知られているが、最近になり、GAPDHの変異体を発現しているCHO細胞においては、正常なCHO細胞と比較してそのエンドサイトーシスに異常が観察されたという報告がある。これらの報告などから、これらの結合タンパク質がスカベンジャー受容体の高次構造形成、小胞輸送、シグナル伝達及びエンドサイトーシスに関与するのではないかと予測した。

次に、スカベンジャー受容体を介した細胞内シグナル伝達について、上記のタンパク質の関与の可能性も含めて検討した。その結果、スカベンジャー受容体特異的なリガンドであるフコイダンにより、iNOSが活性化され、マクロファージからの一酸化窒素産生が誘導されることが明らかになった。また、そのシグナル伝達経路の詳細について調べたところ、フコイダンによるマクロファージからの一酸化窒素産生のシグナルは、p38及びNF-κB依存したシグナル経路により伝達されることが示された。また、p38及びNF-κBの経路は独立して機能するが、両方の経路でHSP90が必須であることが示された。従って、HSP90はスカベンジャー受容体の細胞質領域と結合し、AP-1やNF-κBの上流で機能していることが予想された。しかし、HSP90は単独での酵素活性がないため、何らかのキナーゼと複合体を形成することでマクロファージからの一酸化窒素産生の細胞内シグナル伝達に機能していることが示唆された。

本研究で、スカベンジャー受容体のリガンドによりマクロファージからの一酸化窒素産生が誘導されることが明らかになった。このことから、スカベンジャー受容体は酸化LDLを取り込むという点では動脈硬化巣形成を促進するが、一酸化窒素産生に関与するという点では動脈硬化巣形成に抑制的に働く可能性が示唆された。実際に、スカベンジャー受容体欠損マウスを様々な動脈硬化モデルマウスにかけあわせたところ、むしろ動脈硬化を進展させたという報告がある。また、動物種によってもスカベンジャー受容体のパラドキシカルな機能が示されている。このように、スカベンジャー受容体は、予想よりはるかに複雑なメカニズムにより動脈硬化に関与していると考えられる。今後、さらなる研究により、スカベンジャー受容体の機能が明らかになり、この受容体に関わる疾患に対する治療薬の開発がなされることが期待される。

論文審査の結果の要旨

中村君は、アテローム性動脈硬化発症や生体防御に関与するマクロファージスカベンジャー受容体の細胞質領域について、生化学的、分子生物学的手法を用いてその機能を明らかにすることを検討し、以下の知見を得た。

1、細胞質領域単独では特定の二次構造を形成しなかった。

2、細胞質領域に結合するタンパク質として、HSP90、HSP70、LAP、GAPDH、S-adenosylhomocysteinaseをアフィニティカラムを用いることにより同定した。

3、HSP90、HSP70、GAPDHについては、*in vitro*のみならず*in vivo*でも相互作用することを明らかにした。

4、マクロファージスカベンジャー受容体に特異的なリガンドであるフコイダンが、マクロファージからの一酸化窒素の産生を誘導することを明らかにした。

5、フコイダンによるマクロファージからの一酸化窒素産生のシグナルは、p38およびNF-κBに依存した経路で行われ、いずれもHSP90が必須であることを明らかにした。

以上の研究成果は、マクロファージスカベンジャー受容体の細胞質領域と相互作用する分子を初めて明らかにし、さらにこの内、HSP90が受容体を介するシグナル伝達に直接関与することを明らかにしたことより、受容体の生理作用の分子機構を解明する上で大きく貢献することが考えられる。したがってこの成果は、博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。