The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	N-glycans of SREC-I(Scavenger receptor expressed by endothelial cells) : Essential role for ligand binding, trafficking and stability
Author(s)	佐野, 栄宏
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59021
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

【55】

氏　　名	佐　野　栄　宏（さ の まさ ひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医学）
学　位　記　番　号	第　２５１０１　号
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学　位　論　文　名	N-glycans of SREC-I(Scavenger receptor expressed by endothelial cells): Essential role for ligand binding, trafficking and stability **（血管内皮細胞スカベンジャー受容体 SREC-I の N 型糖鎖は、リガンド結合、膜輸送、安定性に不可欠である）**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　和田　芳直 （副査） 教　授　米田　悦啓　　教　授　金井　好克

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

血管内皮細胞スカベンジャー受容体(SREC)-I は、酸化 LDL や Ac-LDL といった、変性 LDL の除去に関わるマクロファージスカベンジャー受容体と同様のリガンド特異性を有することからアテロームプラーク形成に関与すると考えられているが、その機能は明らかになっていない。我々はこれまでに TGF-β、EGF、NGF などの増殖因子またはその受容体やインテグリンなどの接着分子の機能に糖鎖が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきており、その経験から SREC-I においても他の受容体同様、糖鎖が重要な役割を果たしていると考えた。本研究では、SREC-I が持つ糖鎖の構造機能相関解析を通じて、未だ不明な点が多いアテロームプラークの形成における SREC-I の糖鎖の重要性を解析・検討した。

〔　方法ならびに成績　〕

SREC-I はその細胞外ドメインに潜在的な N 型糖鎖付加部位を 3 箇所（Asn-289, Asn-382, Asn-393）持つ。まず、SREC-I の糖鎖修飾の有無を確認した。SREC-I 導入 CHO-K1 細胞(CHO-SREC)の糖鎖合成阻害（ツニカマイシン処理）および、SREC-I タンパク質の N-型糖鎖除去（PNGase 処理）により、SREC-I の分子量が減少することから、SREC-I が実際に N 型糖鎖を有する事が判明した。さらに前述の各糖鎖付加部位変異体も分子量の減少を示した事から、Asn-289, Asn-382 と Asn-393 の 3 箇所それぞれが糖鎖修飾を受けていることが明らかになった。
次に、野生型および変異体 SREC-I の細胞内局在を抗 SREC-I 抗体と抗 KDEL 抗体（小胞体マーカー）を用いた蛍光免疫染色法により比較解析を行った。その結果、Asn-393 変異を含む変異体は一様に小胞体に局在したことから、Asn-393 の糖鎖は SREC-I の細胞内局在に関与することが示された。この結果と一致して、Asn-393 変異体におけるリガンド分子（Ac-LDL）の取り込みが減少していることが共焦点顕微鏡及びフローサイトメーターによる解析から判明した。一方、Asn-382 変異体は Ac-LDL の取り込みが増加していた。これは、Asn-382 変異体のリガンド結合親和性の増加によることが、Ac-LDL を用いた結合カイネティクスの解析により明らかとなった。この結果から、Asn-382 の糖鎖はリガンド親和性を調節することが判明した。次に、免疫沈降法で精製した野生型および変異型 SREC-I 標品

をトリプシンで処理し、その分解感受性をウエスタンブロットで解析した。その結果、Asn-289 変異体においてトリプシンに対する感受性の上昇が観察された。このことから、Asn-289 の糖鎖はトリプシン抵抗性を高めることが示唆された。これらの解析の結果から、3 箇所の糖鎖はそれぞれ個別の機能を有していることが明らかとなった。さらに個々の糖鎖の構造機能相関を解析するために、質量分析及びレクチンブロットによる糖鎖構造解析を行った。その結果、Asn-289 の糖鎖は多分岐型からなり、Asn-382 と Asn-393 の糖鎖は 2 本鎖で bisecting GlcNAc 型の糖鎖を持つことが明らかになった。さらに、コンピューターによる SREC-I の分子モデリングにより Asn-289 の糖鎖は EGF 様ドメイン 4 とドメイン 5 の間に位置し、Asn-382 と Asn-393 の糖鎖はドメイン 6 の末端付近に位置する事が示された。以上の結果は、これら糖鎖が SREC-I の分子内および分子間相互作用を調節することにより、その安定性やリガンド結合親和性、細胞内局在を制御していることを意味している。

〔　総　　括　〕

Asn-289の糖鎖はプロテアーゼに対する抵抗性に関与し、Asn-382の糖鎖はAc-LDLとの結合親和性を制御し、Asn-393は細胞内局在を制御していることから、SREC-Iの糖鎖はアテロームプラークの形成を正または負に制御する重要な役割を担っている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

SREC-I は異物を認識し細胞内に取り込み、抗原提示や炎症性サイトカインを分泌し感染防御に働くことや、変性 LDL を取り込み、アテロームプラークの形成に関与することが報告されております。

先ず、SREC-I は、3ヶ所の N 型糖鎖の付加部位を持ち、その全てが、糖鎖修飾を受けていることを証明しました。さらに、それぞれの糖鎖には固有の機能があり、Asn^{289}の糖鎖は、その分岐構造の複雑化にともなってプロテアーゼ抵抗性を発揮すること、Asn^{382}の糖鎖は SREC-I のアセチル化 LDL に対する親和性を制御すること、Asn^{393}の糖鎖は適切な SREC-I の細胞内輸送を制御していることを明らかにしました。 SREC-I は変性 LDL を取り込むことによりアテロームプラークの形成に関与しており、しかも細胞での糖鎖修飾は細胞微小環境により規定されていることから、生態環境を反映した SREC-I の糖鎖構造変化が、アテロームプラーク形成過程に深く関与していると考えられる。

審査の結果、学位に値するものと認める。