

氏 名(本籍)	飯 島 宏 明
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 5 2 1 号
学位授与年月日	平 成 8 年 3 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 農芸化学専攻
学位論文題目	ヒト超低密度リポ蛋白質レセプターとア ポリポ蛋白質Eレセプター2の性質と機 能に関する研究

論文審査委員(主査)	教 授 山 本 徳 男
	教 授 水 野 重 樹
	教 授 神 尾 好 是

論文内容要旨

第一章 序論

血漿リポ蛋白質は、細胞表面の特異的レセプターを介して細胞内に取り込まれ、代謝される。アポリポ蛋白質E (アポE) は、超低密度リポ蛋白質(VLDL)、中間密度リポ蛋白質(IDL)と、高コレステロール食により誘導される β -VLDLの主要成分で、低密度リポ蛋白質(LDL)レセプターとVLDLレセプターに結合され、代謝される。LDLレセプターとVLDLレセプターは、共に5つの機能ドメインを共有するが、LDLレセプターはアポB-100を有するLDLも結合する点異なる。LDLレセプターのリガンド結合ドメインは、7つの繰り返し配列から構成されるのに対し、VLDLレセプターは8個有している。VLDLレセプターは脂質代謝の活発な心臓、筋肉、脂肪組織、脳に大量に発現し、肝臓には検出されない。また鳥類では卵母細胞に主として局在し、肝臓で合成・分泌される卵黄前駆体VLDLとビテロゲニンを結合し、取り込む役割を担っている。このレセプターを欠損するR.O.(restricted ovulater)と呼ばれるミュータントは、VLDLとビテロゲニンの取り込みが著しく阻害されるため、卵形成障害を呈し、さらに高脂血症と動脈硬化を発症する。

ニワトリの卵母細胞に発現するVLDLレセプターは、選択的スプライシングにより、5つの機能ドメインのうちO-結合糖ドメインを欠いている。LDLレセプターとVLDLレセプターのO-結合糖ドメインは、共に単一エクソンによってコードされている。VLDLレセプターでは選択的スプライシングにより、O-結合糖ドメインを欠くレセプター(タイプ2レセプター)が発現しているが、LDLレセプターでは選択的スプライシングは見られない。VLDLレセプターのO-結合糖ドメインのアミノ酸は、種を越えて高度に保存されているが、LDLレセプターのこのドメインのアミノ酸同一性は乏しい。これより、VLDLレセプターのO-結合糖ドメインは何らかの重要な機能を担っていることが考えられる。VLDLレセプターのO-結合糖ドメインの機能を明らかにすることを、本研究の第一の目的とした。

最近、私たちはLDLレセプター、VLDLレセプターに構造が類似した蛋白質のcDNAをヒトから単離した。この蛋白質は、LDLレセプター、VLDLレセプターと同様に5つのドメインから構築されており、構造的にリポ蛋白質レセプターであることが示唆された。そのmRNAは脳に最も高く発現している。特に脳における発現はLDLレセプター、VLDLレセプターよりもはるかに高い。このレセプターを高発現する細胞を用いて、その性質を明らかにすることを本研究の第二の目的とした。その結果、このレセプターはアポEを特異的に認識することが明らかとなり、アポEレセプター2と命名された。

第二章 ヒトVLDLレセプターの機能解析

ヒトVLDLレセプターのO-結合糖ドメインの解析に先立ち、ヒトVLDLレセプターの性質を明らかにする必要がある。本章ではLDLレセプター欠損CHO細胞(*ldlA-7*細胞)にヒトVLDLレセプターを発現させ、リガンドの結合、細胞内への取り込み、細胞内での代謝機構を解析した。

^{125}I - β -VLDLを、VLDLレセプター発現細胞と共に4°Cで2時間培養し、細胞に結合した放射能を測定した。この条件では、 ^{125}I - β -VLDLは細胞内に取り込まれないために、細胞表面のリガンド結合量のみを解析できる。VLDLレセプター発現細胞に結合した放射

能から、pSV2-Neoだけを発現する細胞に結合した放射能を差し引いた値を、VLDLレセプターへの特異的結合として、Fig.1Aに示した。この結果をスキッチャード解析すると、解離定数が0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と計算された。同様にして求めたLDLレセプターの解離定数は0.27 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。以上の結果より、VLDLレセプターはLDLレセプターと同様に、 β -VLDLに対して高親和性を有することが示された。

次に、VLDLレセプター発現細胞を、 ^{125}I - β -VLDLと共に37 $^{\circ}\text{C}$ で5時間培養し、細胞内に取り込まれた放射能を測定した。細胞表面に結合した ^{125}I - β -VLDLはスラミンを用いて解離させ、残存する放射能を細胞内への取り込み量として計算した。Fig.1Bに示すように、レセプターに結合した β -VLDLは濃度依存的に細胞内に取り込まれた。次に、レセプターにより取り込まれた ^{125}I - β -VLDLの、細胞内での分解を解析した。VLDLレセプター発現細胞を、 ^{125}I - β -VLDLとともに4 $^{\circ}\text{C}$ で2時間培養し、培地交換後、37 $^{\circ}\text{C}$ で培養し、培地中の ^{125}I - β -VLDLの分解産物 (^{125}I -モノヨードチロシン) 量と、細胞に結合している放射能を経時的に測定した。細胞に結合した ^{125}I - β -VLDL量は経時的に減少するのに対し、培地中の ^{125}I -モノヨードチロシンは時間とともに増加した(Fig.1C)。次に、VLDLレセプター発現細胞を β -VLDLと共に5時間培養後、 ^{14}C -オレイン酸で細胞を標識し、さらに2時間培養し、コレステロールエステルへの ^{14}C -オレイン酸の取り込みを解析した。Fig.1Dに示すように、 β -VLDLの濃度依存的にコレステロールがエステル化される事が示され、細胞内に取り込まれた β -VLDLは分解されて、コレステロールが遊離し、再エステル化されることが示唆された。以上の結果より、VLDLレセプターは β -VLDLを結合し、細胞内に取り込み、細胞内でリガンドが分解されることが示された。

VLDLレセプターの細胞質ドメインに対するモノクローナル抗体IgG-C4と、リガンド結合ドメインに対するモノクローナル抗体IgG-6B6-2bを、合成ペプチドを抗原として作製した。ヒトVLDLレセプター発現細胞の細胞膜画分を、モノクローナル抗体IgG-C4と、IgG-6B6-2bを用いて免疫ブロッティングを行うと、153kDaの蛋白質が検出された。この153kDaの蛋白質はpSV2-Neoだけを発現するCHO細胞にも、LDLレセプター発現細胞にも検出されなかった (Fig.2A, B)。また、LDLレセプターに対するモノクローナル抗体IgG-C7は、ヒトVLDLレセプター発現細胞の153kDaの蛋白質を認識しなかった (Fig. 2C)。

リガンド結合ドメインに対するモノクローナル抗体IgG-6B6-2bを用いて、VLDLレセプター発現細胞を細胞化学的に解析した。抗体と細胞を4 $^{\circ}\text{C}$ で培養すると細胞表面が染色され(Fig.3 A, B)、37 $^{\circ}\text{C}$ で培養すると細胞内に取り込まれた(Fig.3 C, D)。リガンドである β -VLDLの場合と同様に、結合した抗体もインターナリゼーションすることが示された。

第三章 VLDLレセプターのO-結合糖ドメイン機能の解析

タイプ1とタイプ2レセプターの組織特異性を、RT-PCRで解析した。タイプ1とタイプ2レセプターは、それぞれ318 ntと234 ntのバンドとして検出された(Fig.4)。心臓、筋肉は主としてタイプ1レセプターが発現しているのに対し、副腎、精巣、小腸では主としてタイプ2レセプターが発現していた。

タイプ1とタイプ2レセプター発現細胞を用いて、4 $^{\circ}\text{C}$ での ^{125}I - β -VLDL結合実験を行な

った。2つのレセプターの細胞表面発現量を ^{125}I -IgG-6B6-2bを用いて定量し、 ^{125}I - β -VLDL結合量を補正した。Fig.5に示すように、タイプ2レセプターはタイプ1レセプターに比べ、著しく低い β -VLDL結合量を示した。タイプ1とタイプ2レセプターの β -VLDLに対するKd値は、それぞれ0.50、3.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。O-結合糖ドメインの欠損は、 β -VLDLに対する親和性を著しく低下させることが示された。

タイプ1とタイプ2レセプター発現細胞の、インタナリゼーション インデックス (37 $^{\circ}\text{C}$ での ^{125}I - β -VLDLの細胞表面結合量と細胞内への取り込み量の比)をFig.6に示した。2つのタイプのレセプターに大きな違いはみられず、O-結合糖ドメインの欠損は、リガンドの取り込みには影響を与えないことが示された。

タイプ1とタイプ2レセプターのプロセッシングを、パルス-チェイス法によって解析した(Fig.7)。1時間のパルスラベルとそれに続く2時間のチェイスの間に、タイプ1およびタイプ2レセプターは、それぞれ136kDa、123kDaの前駆体から、153kDa、129kDaの成熟体に変換された。タイプ1レセプターはチェイス2時間後に30%、10時間後でも15%の前駆体が存在するのに対し、タイプ2レセプターはチェイス2時間後にはすべて成熟体に移行した。これより、タイプ2レセプターのプロセッシングはタイプ1レセプターと比較して、約2倍速いことが明らかとなった。また、タイプ1レセプターの成熟体量はチェイス20時間後までほぼ一定であったが、タイプ2レセプターでは20%にまで減少していた。一方、タイプ2レセプター発現細胞では、培地中に121kDaの抗体反応物が検出された。この抗体反応物はN末抗体でのみ認識され、C末抗体では検出されなかった。成熟体より8kDa小さく、この差は細胞膜貫通ドメイン、細胞質ドメインに相当する。タイプ2レセプターの成熟体と培地中の121kDa蛋白質の和が、タイプ1の成熟体の安定性とほぼ一致する。従って培地中の121kDa蛋白質は、成熟体タイプ2レセプターが細胞膜の外側部分でプロテアーゼにより切断されて培地中に放出された結果と示唆された。

これらの結果より、VLDLレセプターのO-結合糖ドメインは、リガンド結合と、レセプターの安定性に貢献していることが示された。ニワトリ卵母細胞は、O-結合糖ドメインを欠損するVLDLレセプターを発現している。しかしながら、大量の卵黄前駆体を取り込んでいる。ニワトリ卵母細胞には、細胞表面でのレセプターを安定化する因子が存在している可能性が挙げられる。

タイプ1レセプター、タイプ2レセプターは前駆体から成熟体に変換されることが示された。タイプ1レセプター、タイプ2レセプターの細胞内プロセッシングをさらに明らかにするため、CHO細胞に発現するVLDLレセプターの糖鎖を解析した(Fig.8)。タイプ1レセプター発現細胞を、N-結合糖鎖の合成を阻害するツニカマイシンの存在下で培養すると、成熟体は153kDaから143kDaに変換された。さらにノイラミダーゼ、O-グリカナーゼによりO-結合糖鎖を分解すると、それぞれ136kDa、131kDaに変換された。これらの結果から、タイプ1レセプターは分子量10,000のN-結合糖と、分子量12,000のO-結合糖を持つことが示された (Table1)。同様の実験をタイプ2レセプター発現細胞で行なうと、タイプ2レセプターは分子量4,000のN-結合糖と、2,000のO-結合糖を有していることが示された (Table1)。

第四章 アポEレセプター2の性質の解析

新規レセプターのcDNAを*Id1* A-7 細胞に導入して高発現細胞を単離し、リガンド結合実験を行なった。LDLレセプターは、 β -VLDL、VLDL、LDLともに高い親和性を有し、細胞内に取り込むのに対し(Fig.9B、D)、この新しいレセプターは、アポEに富むリポ蛋白質である β -VLDLだけを結合し、細胞内に取り込んだ。アポE含量の低いVLDL、アポEを含まないLDLはほとんど結合しなかった(Fig.9A、C)。よって新たに単離されたレセプターは、アポEを特異的に認識することが明らかとなり、アポEレセプター2と命名された。アポEレセプター2、LDLレセプターの β -VLDLに対する*K_d*値は、それぞれ0.87、0.27 μ g/mlであった。アポEレセプター2のリガンド結合ドメインは、LDLレセプター同様に7つの繰り返し配列から構成されているが、繰り返し配列をつなぐリンカーの位置がLDLレセプターと異なっている。LDLレセプターは、第4と第5リピート間にリンカーが存在するのに対し、アポEレセプター2はVLDLレセプターと同様、第5と第6リピート間に存在する。LDLレセプターでは、このリンカーがLDL結合に重要であることが示されていて、リンカーの位置の違いがリガンド特異性を決定していることを示唆する。

アポEは肝臓に次いで脳に高く発現し、脳内での脂質輸送や神経細胞の再生などに重要な役割を果たしている。アポEに特異的なレセプターが脳に高く発現していることは、生理的に意義があり、アポEレセプター2は脳内のアポE代謝の中心的役割を担っている、と考えられる。

要 約

VLDLレセプターは、 β -VLDLに高い親和性を有し、LDLレセプターと同様の経路でリガンドを細胞内に取り込み、分解し、代謝することが明らかになった。VLDLレセプターのO-結合糖ドメインの欠損は、 β -VLDLに対する親和性を著しく低下させた。また、O-結合糖ドメインを欠くタイプ2レセプターは、細胞膜の外側部分でプロテアーゼにより切断されて、培地中に放出されることが示唆された。これより、O-結合糖ドメインはリガンド結合と、細胞膜上でのレセプターの安定性に大きく貢献していることが示された。新たに見つけられたリポ蛋白質レセプターはアポEに富むリポ蛋白質 β -VLDLに高い結合親和性を有し、リガンドを細胞内へ取り込むことが明らかとなった。

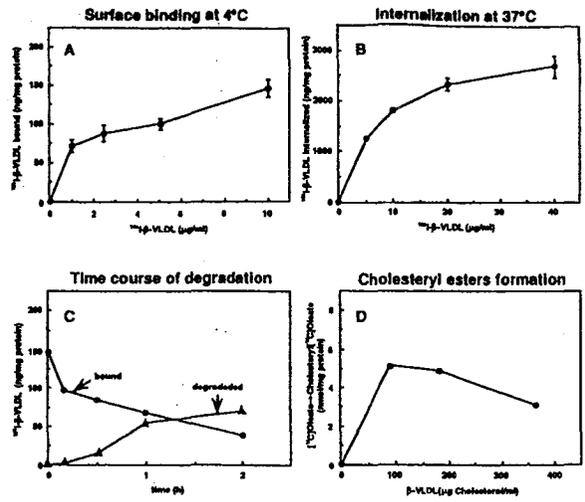


Fig. 1. Binding, internalization and degradation of ^{125}I - β -VLDL by CHO cells expressing human VLDLR.

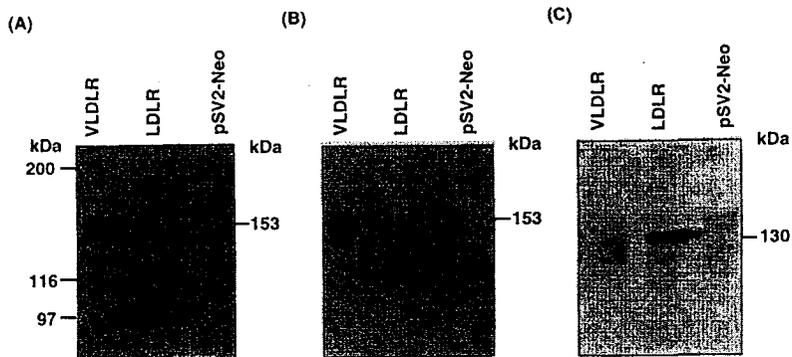


Fig. 2. Immunoblotting of human VLDL and LDLRs expressed in CHO cells with IgG-C4 (A), IgG-6B6-2b (B) and IgG-C7 (C).

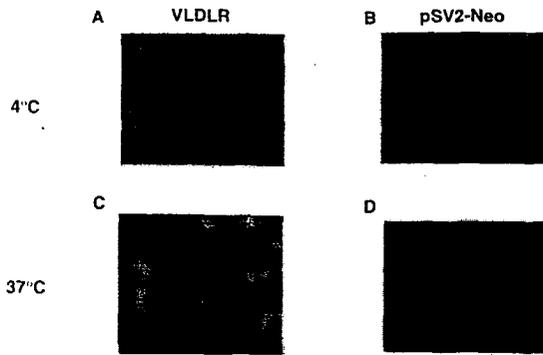


Fig.3. Immunostaining of humanVLDLR expressed in CHO cells with IgG-6B6-2b.

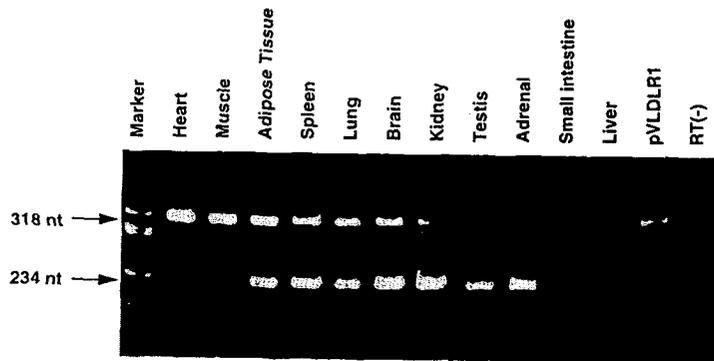


Fig.4. Tissue distribution of type-1 and -2 VLDLR mRNAs in rabbit.

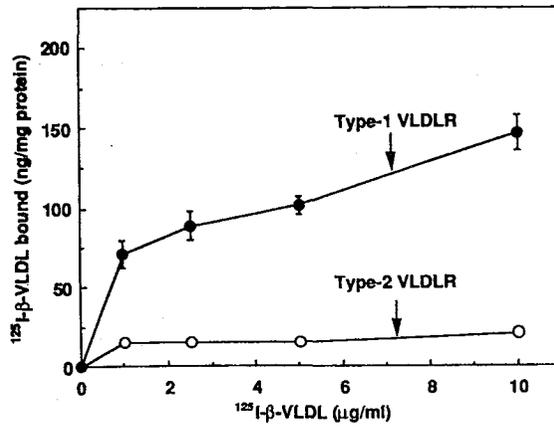


Fig.5. Surface binding of ¹²⁵I-β-VLDL to type-1 and -2 VLDLRs expressed in CHO cells.

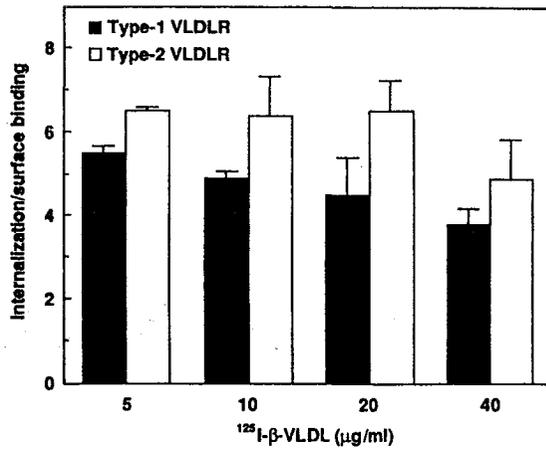


Fig.6. Internalization index of type-1 and -2 VLDLRs expressed in CHO cells.

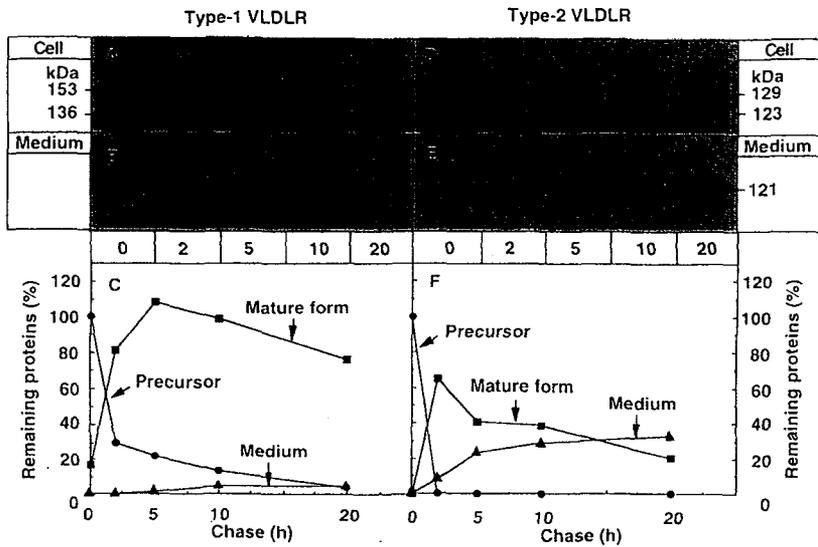


Fig.7. Pulse-chase analysis of type-1 and -2 VLDLRs expressed in CHO cells.

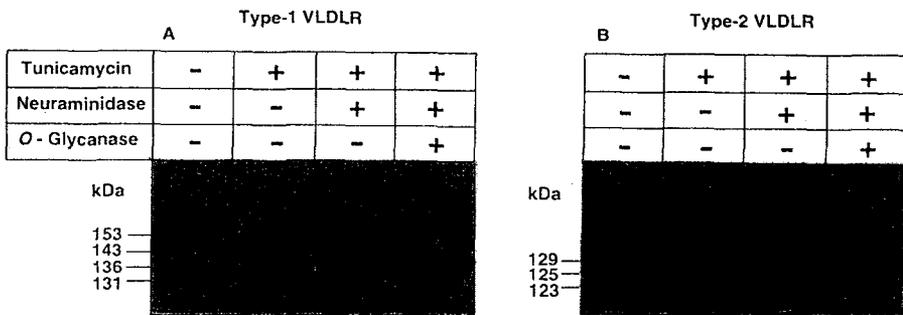


Fig.8. N- and O- glycosylation of type-1 and -2 VLDLRs expressed in CHO cells.

Table 1. Molecular weight of the *N*- and *O*- linked sugars of type-1 and -2 VLDLRs expressed in CHO cells

	Type-1	Type-2
<i>N</i> - linked sugars	10,000	4,000
<i>O</i> - linked sugars	12,000	2,000

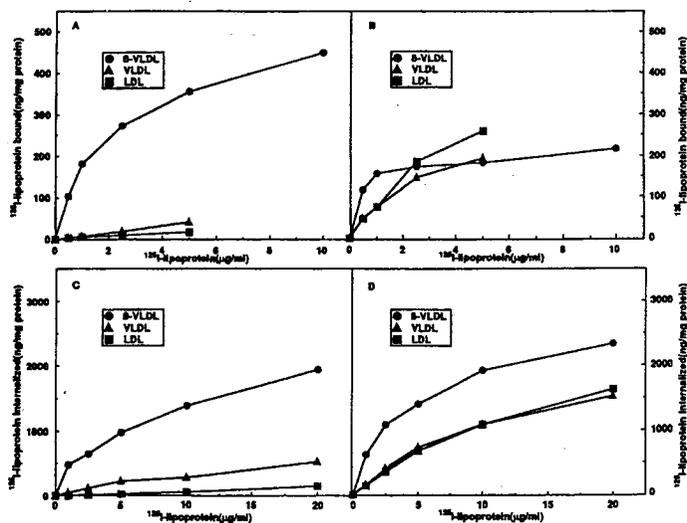


Fig.9. Surface binding and internalization of ¹²⁵I-lipoproteins to ApoER2 (A,C) and LDLR (B,D).

論文審査の要旨

リポ蛋白質レセプターは脂質代謝に中心的役割を果たしている。アポリポ蛋白質E（アポE）を特異的に結合する超低密度リポ蛋白質（VLDL）レセプターは心臓、筋肉や脂肪組織に高く発現し、中性脂肪の供給を担うと考えられているが、その役割は実証されていない。VLDLレセプターには選択的スプライシングにより、O-結合糖ドメインを欠くサブタイプが存在する。本研究ではVLDLレセプターのO-結合糖ドメインの機能を明らかにすることを第一の目的とした。

また、最近、本研究室で脳に特異的に発現しているリポ蛋白質レセプターcDNAが単離された。この新しいレセプターはVLDLレセプターと構造が類似し、脳以外の組織に発現は見られない。このレセプターの性質を明らかにすることが本研究の第二の目的である。

ヒトVLDLレセプターをCHO細胞に発現させ、リガンド結合実験、抗体を用いた解析を行った結果、VLDLレセプターはアポEが豊富な β -VLDLを高親和性に結合し、細胞内に取り込み、分解し、代謝することが明らかになった。O-結合糖ドメインを欠くレセプター発現細胞を用いて、リガンド結合実験、細胞内プロセッシングの解析を行った結果、VLDLレセプターのO-結合糖ドメインは、リガンド結合とレセプターの安定性に大きく貢献していることが示された。

同様に脳特異的に発現する新しいレセプターcDNAをCHO細胞に発現させ、リガンド結合実験を行なった。その結果、新たに単離されたレセプターはアポEが豊富な β -VLDLを高親和性に結合し、細胞内に取り込むことが示された。

本研究によりヒトVLDLレセプターのO-結合糖ドメインの機能が明らかにされた。また、脳に特異的に発現する新しいリポ蛋白質レセプターのリガンド特異性も明らかにされた。これらの結果はリポ蛋白質研究に新しい知見を提供するものである。よって、審査員一同は本論文提出者は博士（農学）の学位を受けるに値すると判定した。