

論文内容要旨

【結 論】

ヒト VLDL レセプターの全構造と遺伝子構造を明らかにした。VLDL レセプター遺伝子は LDL レセプター遺伝子と極めて類似しているが、その染色体位置は異なっていた。また、VLDL レセプター遺伝子は LDL レセプター遺伝子より種を越えて、よく保存されており、生理的には LDL レセプター遺伝子より重要であると考えられた。THP-1 細胞の LDL レセプター mRNA 量は培地に加えた LDL または β -VLDL で負の転写制御を受けたが、VLDL レセプター mRNA 量は負の転写制御を受けなかった。これらの知見は VLDL レセプターがリガンドによる負の転写制御を受けずにこれを取り込み続けるレセプターであり、マクロファージの泡沫化に関与している可能性を示唆する。

【目 的】

リポ蛋白質レセプターは血中脂質のホメオスタシスの維持に中心的役割を演じている。血中の主要コレステロール運搬体である LDL に対するレセプターの異常は高コレステロール血症を引き起こし、動脈硬化の原因となっている。最近、私達は中性脂肪代謝を担うと考えられるウサギ VLDL レセプターの構造を明らかにしたが、このレセプターの生理的役割は、現在の所、不明である。

VLDL レセプターの血中リポ蛋白質代謝における生理的役割とその調節を明らかにするために、ヒト VLDL レセプター cDNA を単離しその全構造を決定するとともに、VLDL レセプター遺伝子を単離し、その構造と調節を明らかにすることを目的とした。

【方 法】

ヒト単球マクロファージ cell line THP-1 細胞より作製した cDNA ライブラリーより VLDL レセプター cDNA を単離し、その全構造を決定した。またヒト VLDL レセプター遺伝子を単離し、エクソン/イントロン構成とプロモーター領域の塩基配列を決定した。転写開始点は S1-nuclease mapping 法、primer extension 法によって解析した。また human rodent hybrid cell の DNA を用い PCR 法によって VLDL レセプター遺伝子の存在する染色体を決定した。さらに THP-1 細胞の VLDL レセプター mRNA の発現がポリ蛋白質によりどのような調節を受けるかを検討するために、THP-1 細胞を 10% ウシ胎児血清培地 (10% FCS) で 4 日間培養した後、リポ蛋白除去 10% ウシ胎児血清培地 (10% LPDS) に、1) LDL も β -VLDL も添加しない、2) β -VLDL を添加 (最終濃度 200 μ g/ml)、3) LDL を添加 (最終濃度 200 μ g/ml)、の条件下で 48 時間培養し、THP-1 細胞における LDL レセプターおよび新たに単離された VLDL レセプター

mRNA の発現量をノーザンブロッティングにより解析した。

【結 果】

ヒト VLDL レセプターの全構造と遺伝子構造が明らかにされた。VLDL レセプターは LDL レセプター同様、N 末より、1) リガンド結合ドメイン、2) EGF 前駆体相同ドメイン、3) O-結合糖ドメイン、4) 細胞膜貫通ドメイン、5) 細胞質ドメインの5つのドメインから構築され、各ドメインは LDL レセプターとそれぞれ類似したアミノ酸配列を有していたが、リガンド結合ドメインの繰り返し配列は LDL レセプターの7回に対して VLDL レセプターでは8回繰り返していた。VLDL レセプター遺伝子は全長約40kbで19個のエクソンから構成されており、エクソン/イントロン構成はGT/AG則に一致していた。5'上流プロモーター領域にはSp1結合配列、sterol regulatory element-1 (SRE-1) モチーフ、CCAAT配列の相補配列等を有していた。VLDL レセプター遺伝子は LDL レセプター遺伝子と極めて類似しているが、その染色体位置は LDL レセプター遺伝子とは異なる染色体の第9番に存在していた。ヒト VLDL レセプターには O-結合糖ドメインを有する I 型と、このドメインを欠く II 型の2種類の cDNA が存在した。O-結合糖ドメインは単一エクソンから構成され、またヒトゲノムのサザンブロットからヒト VLDL レセプター遺伝子は単一コピーであることから、2種のレセプターは単一遺伝子から選択的なスプライシングにより生成されることが示された。また、VLDL レセプター遺伝子は LDL レセプター遺伝子より種を越えて、保存されていて、生理的には LDL レセプター遺伝子より重要であると考えられた。THP-1細胞の LDL レセプター mRNA 量は培地に加えた LDL または β -VLDL で負の転写制御を受けたが、VLDL レセプター mRNA 量は負の転写制御を受けなかった。すなわち LDL レセプターは細胞中のコレステロール濃度が増加するとともにレセプター数が減少し、リガンドが取り込まれなくなるのに対し、VLDL レセプターは、LDL レセプターとは異なり、リガンドが在る限りこれを取り込み続けるレセプターであることを示している。

【考 察】

VLDL レセプターは筋肉組織や脂肪組織等の脂肪酸代謝の活発な組織に高く発現しているが、単球マクロファージ系の細胞である THP-1細胞にも発現していた。単球由来マクロファージの泡沫化は粥状動脈硬化初期病巣の形成に重要である。マクロファージは通常の LDL では泡沫化しないが、 β -VLDL や、アセチル LDL 等の変性 LDL を積極的に取り込むことによって泡沫化することが知られている。このレセプターが動脈硬化惹起性の強い β -VLDL をよいリガンドとし、LDL や β -VLDL により負の転写制御を受けないことは、 β -VLDL の増加を伴う高脂血症におけるマクロファージの泡沫化にも関与していることを示唆する。また VLDL レセプターは脂肪細胞にも多く発現することから肥満の成因にも深く関与することが考えられる。

審査結果の要旨

1980年代におけるゴールドスタインとブラウンらによる LDL レセプターの発見は、家族性高コレステロール血症の発症メカニズムを分子生物学的に明らかにし、さらに血清脂質のホメオスタシスを解明する突破口となるものであった。その後、LDL レセプターを欠損した WHHL 家兎や家族性高コレステロール血症患者を対象とした研究、さらにマクロファージの泡沫化実験などから、アポ E に特異的に結合する第 2 のリポ蛋白レセプターの存在が示唆されていた。最近、山本らは、アポ E リポ蛋白を特異的に結合する家兎 VLDL レセプターの存在を cDNA の単離により明らかにした。

著者はこのレセプターの血中リポ蛋白質代謝における生理的役割とその調節機序を明らかにするため、ヒト単球マクロファージ cell line THP-1 細胞よりヒト VLDL レセプターの cDNA 及び遺伝子を単離し、プロモーター領域を含む全構造を明らかにし、同レセプターの生理的機能とその調節を明らかにした。

その成績では、ヒト VLDL レセプター遺伝子は LDL レセプター遺伝子と極めて類似しているが、LDL レセプターとは異なる第 9 染色体に局在し、それぞれ独立した遺伝子によりコードされていた。ヒト VLDL レセプターには O-結合糖ドメインを有する I 型と、このドメインを欠く II 型の 2 種類の cDNA が存在し、これら 2 種のレセプターは単一遺伝子から選択的スプライシングにより生成されることが明らかにされた。VLDL レセプター遺伝子は LDL レセプター遺伝子に比べて、種を越えてよく保存されており、生理的に重要な役割を果たしていることが示唆された。LDL レセプターの調節機序としてコレステロールによる負の転写制御が重要であるが、VLDL レセプターにおけるリポ蛋白による mRNA 発現量の変化を THP-1 細胞を用いノーザンブロッティング法により解析したところ、LDL レセプターは培地に加えた LDL または β -VLDL で負の転写制御を受けたが、VLDL レセプターはこれらにより負の転写制御を受けなかった。

以上のように、本研究はヒト VLDL レセプター遺伝子の全構造とその調節機序を明らかにし、脂質代謝に新たな経路があることを示した。本研究は、動脈硬化や肥満などの病因を解明する上で極めて重要な新知見を報告したもので、十分学位論文に値するものと認める。