

## 論文の内容の要旨

### Studies on the Regulation of Plasma HDL Cholesterol Level by CLAMP – an HDL Receptor (SR-BI) Binding Protein

#### HDL 受容体 SR-BI 結合蛋白質(CLAMP)による血中の HDL cholesterol レベルの調節に関する研究

機能薬学専攻 馮 東東 (Dongdong Feng)

指導教官 新井 洋由

#### [序論]

HDL(High Density Lipoprotein,高比重リポ蛋白質)は“善玉リポ蛋白質”と呼ばれ、抗動脈硬化作用を有すると考えられている。これは、HDL が末梢組織に蓄積した過剰のコレステロールを肝臓へ運ぶことで、コレステロールを処理、排泄する機構、すなわちコレステロール逆転送系に重要な役割を担っていることによる。肝臓やステロイド生産臓器への HDL コレステロールの輸送機構は、LDL 受容体を介する LDL の取り込み機構 (エンドサイトーシス) とは全く異なる。つまり、LDL が LDL 受容体に結合すると、リポ蛋白質粒子全体が細胞内へ取り込まれ、リソソーム内で蛋白質成分、脂質成分と共に分解される。これに対し、肝臓やステロイド生産臓器では、HDL 中の脂質成分を選択的に細胞内に取り込む機構が想定され、「選択的脂質取り込み」という概念が提唱された。1996 年 Krieger らのグループは、「選択的脂質取り込み」機能を担う HDL 受容体として、はじめて SR-BI(Scavenger Receptor class B type I)分子を同定した。SR-BI の過剰発現マウス或いはノックアウトマウスを用いた解析から、SR-BI は、コレステロール逆転送系の最終段階である肝臓へ HDL コレステロールを受け渡すことにより、血清中のコレステロールレベルを調節したり、ステロイド生産臓器へステロイドホルモンの原料となるコレステロールを供給したりする役割を果たすことにより、生理的に HDL 受容体として機能していることが明らか

かとなった。当教室は、SR-BI の C 末端細胞質領域と結合する分子量が約 70KDa の蛋白質を、affinity column 法によりラットの肝臓膜画分から同定した。cDNA クローニングの結果、本蛋白質は PDZ ドメインを 4 個持つ新規蛋白質であることが明らかになり、CLAMP(C-terminal Linking And Modulating Protein)と命名された。本研究で私は、CLAMP の肝臓におけるの生理機能に注目し、特に CLAMP の血中 HDL cholesterol レベル調節への関与について調べ、以下の成果を得た。

## [実験・結果・考察]

### 1. SR-BI と CLAMP は肝臓内で結合している

ラットの肝臓ホモジネートを 10 万 g で遠心し、上清と沈殿に分画したところ、SR-BI も CLAMP も沈殿画分のみから回収されたことから、両者は肝臓膜画分に存在していることが分かった。それで、ラットの肝臓膜画分を Triton X-100 で可溶化した後、CLAMP のモノクローナル抗体で免疫沈降したところ、SR-BI が共沈してきたことから、SR-BI と CLAMP は生理的にも結合していることが示された。肝臓の形質膜は、リポ蛋白質代謝に関わるシヌソイド膜と胆汁排泄に関わるカナリキュラー膜の 2 つに大別される。従って、CLAMP の SR-BI に対する機能を調べるために、肝臓の形質膜をフラクショネーションし、シヌソイド膜とカナリキュラー膜を分画して、それぞれの膜画分における両蛋白質の分布を調べた。その結果、ラットの肝臓においても、SR-BI はシヌソイド膜とカナリキュラー膜との両方に存在することが分かり、リポ蛋白質代謝だけでなく、胆汁排泄にも関与していることが予想される。一方、CLAMP はそのほとんどがシヌソイド膜に局在していることから、肝臓における SR-BI の機能の中で、主にリポ蛋白質代謝の方に関わっていることが示唆された。

また、細胞内において SR-BI と CLAMP とが結合しているかどうかを調べた。CLAMP を恒常的に発現した CHO 細胞に、SR-BI 或いは SR-BI の C 末端の 15 アミノ酸を削った SR-BI $\Delta$ C15 を発現させ、CLAMP の抗体を用いて免疫沈降し、SR-BI 或いは SR-BI $\Delta$ C15 を SR-BI の細胞外ドメインに対する抗体で検出した。

その結果、CLAMP と共に SR-BI は沈降するが、SR-BI $\Delta$ C15 は沈降しないことが示され、細胞内においても CLAMP は SR-BI の C 末端と結合することが示唆された。

## 2. CLAMP と SR-BI との局在に細胞骨格系が関与している

CLAMP 蛋白質の細胞内分布を調べた。CLAMP 発現 CHO 細胞では、細胞質が一様に染まることから、CLAMP は細胞質全体に散在することが分かった。この細胞にさらに SR-BI を発現させると、細胞の形態が変化し、糸状突起のような構造が観察され、そのような部位や細胞の輪郭の一部などに CLAMP が分布するようになった。このことから、CLAMP は細胞内で SR-BI と結合することにより、細胞質から形質膜へと局在を変えることが示唆された。一方、SR-BI $\Delta$ C15 を発現された細胞では、そのような CLAMP の細胞内での局在の変化は見られなかった。

CLAMP 発現 CHO 細胞に SR-BI を発現されたときに観察される特徴的なフィラメンタスな細胞内分布から、両蛋白質の局在に細胞骨格系が関与している可能性が考えられた。そこで、CLAMP 発現 CHO 細胞にさらに SR-BI を発現された細胞で、マイクロフィラメント、中間系フィラメント、或いはマイクロチューブルをそれぞれ染色してみた。前述のような特徴的なフィラメンタスな構造はマイクロフィラメントの分布と一致することが分かった。以上の結果を考え合わせて、我々は次のような仮説を提案する。つまり、CLAMP は直接的或いは間接的にマイクロフィラメントと相互作用し、SR-BI を介して HDL から形質膜の内側に取り込まれたコレステロールエステルは、形質膜の直下にあるマイクロフィラメントに沿って細胞内を移動する。

## 3. SR-BI と結合する CLAMP のドメインの同定

CLAMP の 4 個の PDZ ドメインの中で、SR-BI の C 末端と結合するのに必要なドメインを yeast two-hybrid 法を用いて調べた。その結果、最も N 末端側の PDZ ドメイン(PDZ1)を含む約 100 アミノ酸からなる領域は SR-BI と結合するが、C 末端側の残りの 3 個の PDZ ドメイン(PDZ2,3,4)は SR-BI と結合しないこ

とが分かった。これらの C 末端側の 3 個の PDZ ドメインと結合する因子を同定することにより、SR-BI 受容体と細胞内のコレステロールプールとの間を結ぶ分子メカニズムを明らかにし、形質膜から細胞内へのコレステロール輸送系とのクロストークを分子レベルで解明することが今後の課題である。

#### 4. CLAMP の生理機能の解析

CLAMP 発現 CHO 細胞に、SR-BI また SR-BI $\Delta$ C15 を発現させると、SR-BI 蛋白質の発現が 2-3 倍上昇することが分かった。これと同時に、CLAMP 発現細胞に SR-BI をトランスフェクトした細胞では、HDL の細胞結合量及び CE の選択的取り込み量が共に 2-3 倍上昇した。このことから、CLAMP は SR-BI と結合して、おそらく SR-BI 蛋白質の安定性を高めることにより SR-BI の発現量を上昇させた、HDL の結合量及び CE の取り込み量を上昇させている可能性が考えられた。

PDZ ドメインを欠損させた mutant CLAMP 発現 CHO 細胞(CHO-PDZ12)に、SR-BI を発現させると、SR-BI 蛋白質の発現量及び HDL からの CE の取り込み量が、コントロール細胞のレベルまで減少することが分かった。そこで PDZ34 を欠損させた mutant CLAMP 蛋白質(PDZ-12-)の組替えアデノウイルス(Ad-12-)を作成し、CLAMP 及び SR-BI 両発現細胞に感染させたところ、CLAMP の分布が膜面分から細胞質面分に変化した。このことから PDZ-12-は CLAMP と SR-BI との結合を競合的に阻害し、ドミナントネガティブ効果を示すことがわかった。そこで、PDZ-12-をマウス肝臓に過剰発現させ個体レベルにおける CLAMP の生理機能の解析を試みた。その結果、SR-BI 蛋白質の発現量が減少することがわかった。また、血清中のトータルコレステロールレベルが有意的に上昇し、また、この増加したコレステロールはほぼ HDL 中にあることが分かった。さらに、マウス血清中の HDL コレステロールのクリアランスは、コントロールマウスに比べて遅いことが明らかになった。これらのことから、CLAMP は個体レベルにおいても、SR-BI を介する HDL からの CE 取り込みに重要な役割を果たしていることが示され、血清中の HDL コレステロールレベルを調節する新しい分子機能の存在が明らかとなった。