

審査の結果の要旨

氏名 馮 東 東

血漿リポ蛋白質は血液中で脂質を運ぶ役割を担っており、動脈硬化性心臓血管障害と密接に関わっている。LDL（低密度リポ蛋白質）は動脈硬化を促進するのに対し、HDL（高密度リポ蛋白質）は逆に阻害する。HDL コレステロールの細胞への受け渡しは、昔から知られている LDL 受容体を介する経路とは異なり、HDL の蛋白質成分を取り込んで分解することなく脂質を選択的に取り込むことが知られている。スカベンジャー受容体クラス B タイプ I (SR-BI) は分子レベルで初めて明らかになった HDL 受容体であるが、幾つかの動物実験の結果から HDL のコレステロールエステル (CE) を選択的に取り込むことが証明された。しかし、肝細胞内で SR-BI 受容体を介して取り込まれた CE がどのようにして、またどこへ運ばれるかについては明らかになっていない。彼女らは3年前に、SR-BI 結合蛋白質をラット肝臓膜画分から同定し CLAMP と命名した。CLAMP は PDZ 蛋白質ファミリーに属し、4個の PDZ ドメインを有する。肝臓における CLAMP の生理機能を明らかにすることを目的に、本研究は行われた。

1. ラット肝臓における SR-BI と CLAMP の結合の解析

SR-BI 及び CLAMP はともにラット肝臓膜画分に分画されたことから、Triton X-100 で可溶化後 CLAMP 抗体で免疫沈降された。その結果、SR-BI が共沈してきたことから、両者は肝臓内で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ド膜と胆汁酸排泄に関わるカナリキュラー膜に大別される。そこで、両蛋白質の分布が調べられ、SR-BI は両膜画分中に同程度見られるのに対し、CLAMP は殆どがシヌソイド膜に分布していることがわかった。このことから、CLAMP は SR-BI 分子をシヌソイド膜にターゲットしてシヌソイド膜上における SR-BI 分子の発現レベルを規定しているか、或いはまた SR-BI 分子をクラスタリングして受容体と下流の分子マシナリーを連結させている可能性などが示唆された。

2. 培養細胞を用いた CLAMP の機能解析

CLAMP の SR-BI に対する機能を調べる目的で、CLAMP を恒常的に過剰発現した CHO-CLAMP 細胞が作製された。CHO-CLAMP 細胞に SR-BI を発現さ

せると、CLAMP は細胞質画分から膜画分に分布を変えることがわかり、また免疫沈降法から両者は細胞内で結合することが確認された。CHO-CLAMP 細胞に SR-BI を発現させると、コントロール CHO 細胞に比べて SR-BI 蛋白質の発現量が 2 - 3 倍に上昇し、HDL からの CE 取り込み量が約 3 倍程度増加することがわかった。このことから、CLAMP は SR-BI に結合することにより SR-BI 蛋白質の安定性を高め、HDL からの CE の selective uptake を促進する作用があることが示唆された。次に、PDZ ドメインを欠損した様々な変異型 CLAMP を恒常的に過剰発現した CHO 細胞が作製され、これらの細胞に SR-BI 遺伝子を一過的に発現させたところ、CHO-CLAMP 細胞のときに見られるような SR-BI 蛋白質の発現増加及び HDL からの CE 取り込み亢進作用は見られなかった。

3. ドミナントネガティブ体を利用した CLAMP の生理機能の解析

PDZ ドメイン 3 と 4 を欠損した PDZ-12-をアデノウイルスに作らせ、CHO-CLAMP/SR-BI 細胞に感染させると、CLAMP と SR-BI の結合が競合的に阻害されて、大部分の CLAMP が膜画分から可溶性画分に遊離してくることが示された。細胞レベルで、PDZ-12-のドミナントネガティブ効果が観察されたので、次に PDZ-12-をアデノウイルスでマウスに感染させ、個体レベルでのフェノタイプが観察された。今回用いられたアデノウイルス感染システムでは目的蛋白質の 99%以上がマウス肝臓に発現する。まず、SR-BI 蛋白質の発現レベルが比較され、PDZ-12-を感染したマウスの肝臓ではコントロールマウスに比べて有意に発現量が減少していることが示された。次に、血清全コレステロール量を経時的に調べたところ、PDZ-12-を感染したマウスでは 7 日目にピークをむかえ、コントロールマウスに比べて有意に上昇することが示された。そこで、どのリポ蛋白質中のコレステロールが増加しているかを調べる目的で、ゲル濾過かラムで血清が分画され、PDZ-12-を感染したマウスでは主に HDL 画分中のコレステロールが増加していることがわかった。さらに、PDZ-12-を感染したマウスでは HDL コレステロールのクリアランスがコントロールに比べて有意に落ちていることが示された。

以上を要するに、本研究は、CLAMP は個体レベルにおいても SR-BI を介する HDL からの CE 取り込みにおいて重要な役割を果たすことが示されている。以上の知見は、HDL コレステロールレベルを調節する分子機構を考える上で意義深いものであり、博士（薬学）の学位として十分な価値があるものと認められる。