

論文の内容の要旨

論文題目 血管内皮細胞由来スカベンジャー受容体SRECの分子機能

氏名 石井 淳子

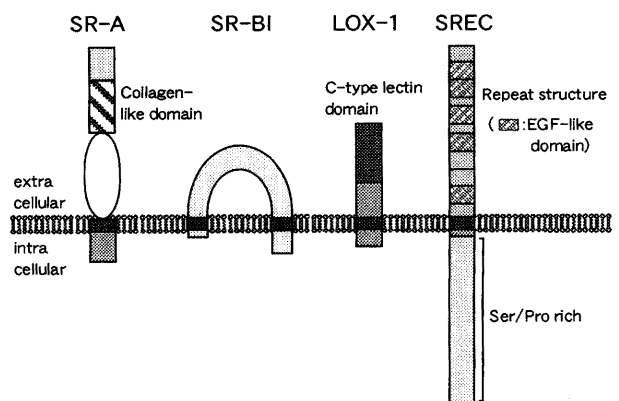
【序】

酸化等の変性を受けたLDLを選択的に認識する受容体をスカベンジャー受容体といい、現在までに構造の異なる複数の受容体が同定されている(Fig.1)。内皮細胞が変性LDLを取り込む性質を持つことが古くから知られていたが、当研究室では、ヒト臍帯静脈内皮細胞cDNAライブラリーより、新規スカベンジャー受容体SRECを同定した。

SRECは、これまでに報告されたスカベンジャー受容体と構造上の相同性を持たず、また、約400アミノ酸からなる大きな細胞内

ドメインを有していた。しかしながら、SRECの機能については、これまで全く解明されてこなかった。私は、SRECの生理機能を解明する糸口として、特に特徴的な細胞内ドメインに注目して解析を行った。

Fig.1 主なスカベンジャー受容体の構造



【方法と結果】

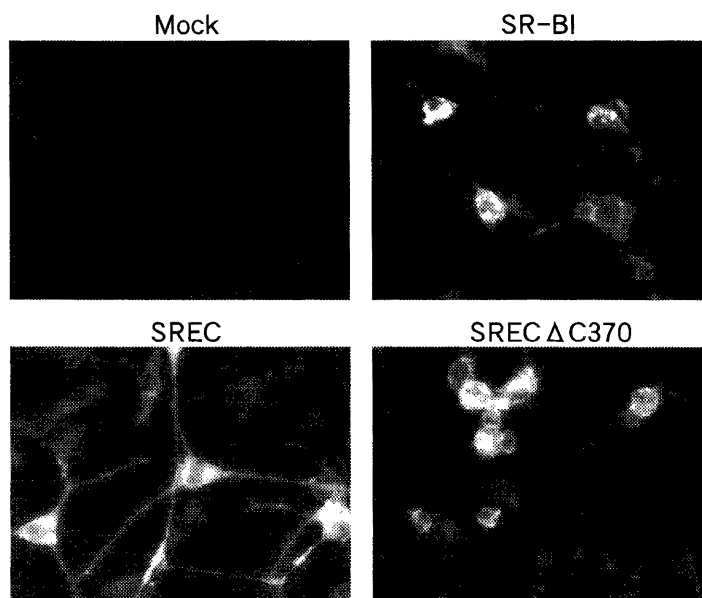
①SREC細胞内ドメインの機能解析

1. SREC発現細胞のフェノタイプの解析

SRECは、アセチル化LDL (AcLDL)を効率よく取り込むことがわかっている。そこでまず、この取り込みに対して細胞内ドメインが必要かを、CHO細胞にSRECの様々な細胞内ドメイン欠失体を発現させ検討した。その結果、細胞内ドメインを欠失させてもAcLDLの取り込みはほとんど変化せず、約400アミノ酸の細胞内ドメインはAcLDLの取り込みには必要ではないことがわかった。次に、様々な培養細胞にSREC

を発現させ、そのフェノタイプを調べた。その結果、CHO, COS等の細胞では大きなフェノタイプは現れなかったが、マウス線維芽細胞L細胞にSRECを発現させると、細胞の形態が大きく変化し、突起伸展を引き起こすことを見いだした(Fig.2)。他のスカベンジャー受容体を発現させてもこのような現象は見られず、また、非常に興味深いことに、細胞内ドメイン欠失体ではこのフェノタイプは全く観察されなかった。すなわち、突起伸展という現象にはSRECの細胞内ドメインが必要であることがわかった。

Fig.2 L細胞にSRECを発現させると突起進展を引き起こす



2. SREC細胞内ドメイン結合蛋白質の探索-1

そこで次に、SRECの細胞内ドメインの機能を解析するために、Yeast Two-Hybrid systemを用いて、細胞内ドメインと結合するタンパク質の探索を行った。その結果、約40個の陽性クローンの中でProtein Phosphatase 1 α (PP1 α)が8クローン得られた。実際、SRECとPP1 α をCOS-1細胞に発現させ、免疫沈降を行ったところ、両者が共沈することがわかり、確かにSRECとPP1 α が細胞内で結合することもわかった。

3. PP1 α 結合部位の解析

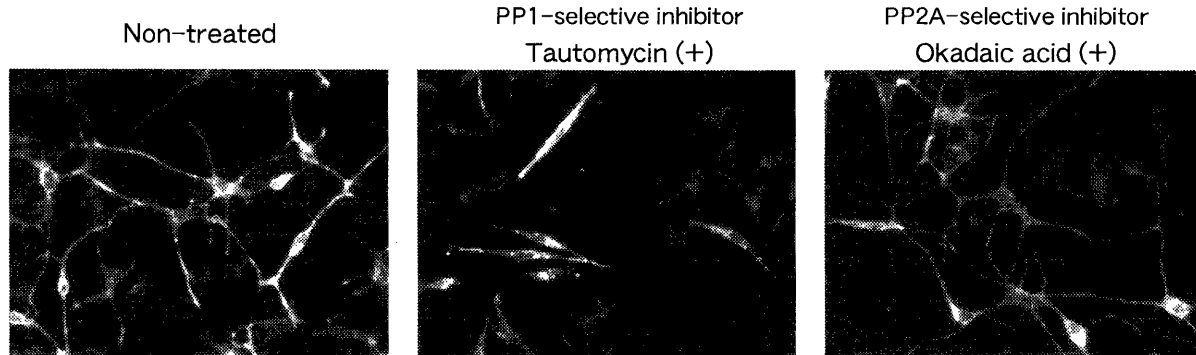
次に、SRECの細胞内ドメインのどこにPP1 α が結合するかについて、GSTフュージョンタンパク質を用いたアフィニティーカラムにより解析した。L細胞の可溶性画分をカラムに流し調べた結果、可溶性画分中のPP1 α はSREC細胞内ドメインの前半約半分 (C1部分)には結合せず、中央部 (C2部分)に結合することがわかった(Fig.3)。このことから、PP1 α はC2部分のうちC1部分を含まない部位、アミノ酸でいうと約640~750番目付近の領域に結合す

るものと予想された。

4. SRECによるL細胞の突起伸展現象におけるPP1 α の関与

上の結果より、L細胞においてSRECによる突起伸展にPP1 α が関与している可能性が考えられた。そこで、PP1 α がSRECの細胞内ドメインの機能に本当に関わっているかについて、phosphataseの選択的阻害剤を用いて解析を行った。その結果、SRECによる突起伸展はPP1選択的阻害剤であるタウトマイシン100nMで、著しく阻害された(Fig.4)。一方、protein phosphatase 2Aの阻害剤であるオカダ酸では突起伸展は全く阻害されなかった。これらの結果から、SRECによる突起伸展にPP1 α が関与していることが示唆された。

Fig.4 SRECによって引き起こされる突起伸展はPP1選択的阻害剤によって阻害される

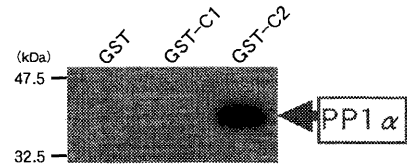


5. SREC細胞内ドメイン欠失体を用いた解析

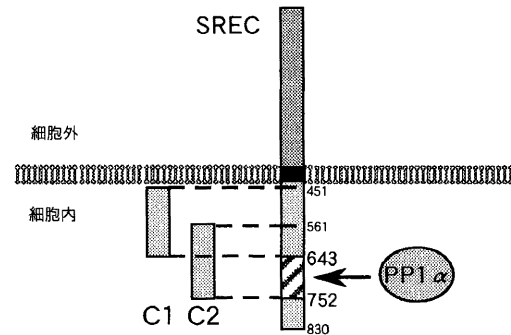
SRECによるL細胞の突起伸展は、細胞内ドメインが全く存在しないと起こらないことを見いだしていたが、様々な細胞内ドメイン欠失体を発現させると、突起伸展は引き起こさず、細胞が細長く伸びたような形態になることを見いだした。この形態は、タウトマイシンを加えてPP1 α を阻害した状態で、細胞内ドメイン全長を含むSRECを発現したときの形態(Fig.4)と非常に似ていた。このことから、SRECによるL細胞の突起伸展には、細胞が細長く伸びる段階と、さらにその後突起伸展が起こる段階があり、それぞれの段階には細胞内ドメインの中でも別々の領域が関与しているものと考えられた。PP1 α は、後者の段階に関与すると予想され、結合部位の解析結果もこの仮説を支持している。

Fig.3 PP1 α のSREC細胞内ドメインとの結合

◆Western blottingによるPP1 α の検出



◆予想されるPP1 α 結合部位



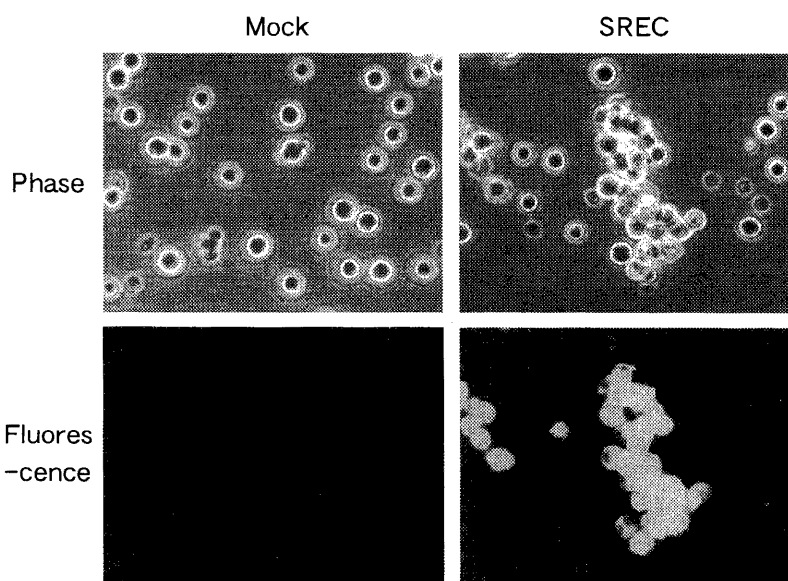
6. SREC細胞内ドメイン結合タンパク質の探索-2

さらに、SRECによるシグナル伝達機構を解明すべく、GSTフュージョンタンパク質を用いたアフィニティーカラムにより、SRECの細胞内ドメインと結合するタンパク質を探索していたところ、SREC細胞内ドメイン(C2部分)に特異的に結合する、PP1 α とは別のタンパク質を見いだした。このタンパク質は、アミノ酸シーケンスによる解析の結果、アクチン結合タンパク質advillinであることがわかった。このことから、SRECからのシグナルがadvillinに伝わり、アクチンフィラメントの再構成を引き起こしている可能性が考えられた。

②SREC細胞外ドメインの機能解析

SRECはAcLDLをリガンドとするが、生理的なりガンドが何なのかは全く不明である。私は、SREC発現細胞を樹立している過程で、SREC同士がホモフィリックに結合しうることを見いだした。すなわち、SRECを発現させたL細胞をTrypsin-EDTAではがし浮遊細胞状態にし、37℃、1時間インキュベーションした後、顕微鏡により観察した。その結果、SRECを発現

Fig.5 SRECを発現した細胞同士は凝集する

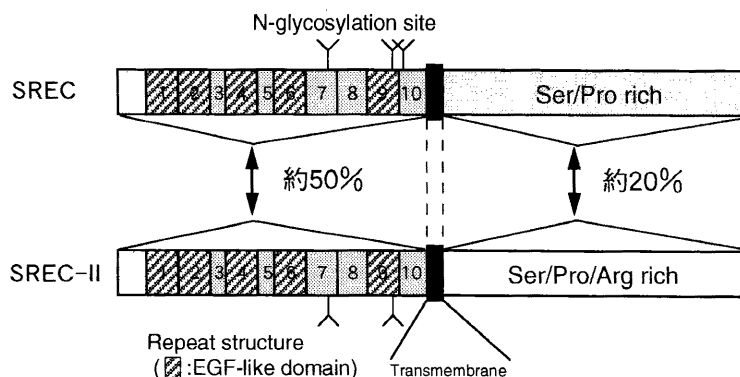


した細胞同士の凝集塊が観察された(Fig.5)。SRECの細胞外ドメインはEGF様リピートを含む繰り返し配列よりなっていることから、SRECはホモフィリックな結合のみならず、他のEGF様リピートを含む蛋白質と相互作用する可能性も考えられた。

③SRECファミリー分子のクローニング

SRECアミノ酸配列を用いてデータベースの検索を行ったところ、SRECと相同性の高い分子の遺伝子断片を見いだした。そこで、マウス肺cDNAライブラリーよりこの新規cDNAをクローニングし、全配列を決定し、SREC-IIと命名した(Fig.6)。SREC-IIの約400アミノ酸からなる細胞外ドメ

Fig.6 SRECとSREC-IIの相同性



インは、SRECと同様にEGF様ドメインからなる繰り返し構造をとっており、SRECとは約50%の相同性を持っていた。一方、約400アミノ酸からなる細胞内ドメインは、SRECとの相同性は約20%とやや低いが、やはりSRECと同様にセリン、プロリンに富んでおり、さらにSREC-IIはアルギニンにも富んでいるという特徴を持っていた。SRECとSREC-IIのヒトの臓器分布をノーザンブロットングにより解析したところ、両者の分布は類似しており、主に心臓、胎盤、肺、腎臓、脾臓、卵巣に発現していた。

【まとめと考察】

本研究において私は、L細胞にSRECを発現させると突起伸展を引き起こすという機能があること、また、この現象にはSREC細胞内ドメインが必要であることを見いだした。さらに、SRECによるこの細胞骨格系の制御にはPP1 α が関与している可能性を示した。加えて、SREC細胞内ドメインには、アクチン結合タンパク質であるadvillinが結合することも見いだした。このadvillinがSRECの下流の分子として働き、アクチンフィラメントの再構成を行っている可能性が考えられた(Fig.7)。また、L細胞にSRECを発現させると細胞同士が凝集することから、SRECは細胞外ドメインを介して互いに結合しうることが明らかとなった。また、新しく同定したSREC-IIの細胞外ドメインもSRECとの相同性が高いことより、SRECとSREC-IIが結合する可能性も考えられる。

ところで、ごく最近、内皮細胞に新たに見いだされた低分子量Gタンパク質Gesを内皮細胞に発現させると、L細胞においてSRECを発現させたときに見られた形態と似たような細胞の形態変化を引き起こすことがイギリスのグループにより報告された。彼らは、Gesのドミナントネガティブ体を用いて、このGesによる形態変化が血管新生時の内皮細胞のtube formationに必要であることを示した。このGesとSRECファミリーとの臓器分布も非常によく似ていることがわかった。これらの結果から、SRECファミリーは内皮細胞においてはGesとともに細胞骨格制御を介して血管新生に関与している可能性も考えられた。

今後は、生体内でSRECファミリーが実際にどのようなリガンドと結合し、どのような機構でシグナルを伝え、いかなる細胞機能を誘発しているか解析する必要がある。

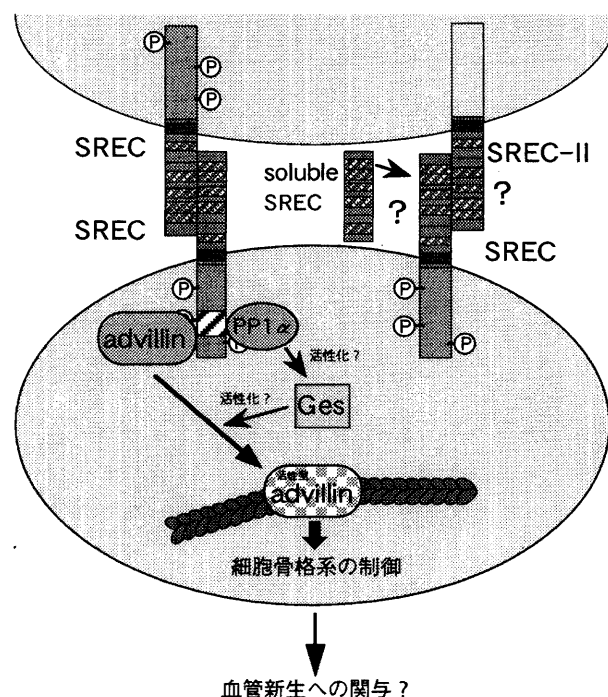


Fig.7 SRECファミリーの細胞内情報伝達 (仮説)