

氏 名 よし だ ひろ ゆき
吉 田 浩 之

学位(専攻分野) 博 士 (医 学)

学位記番号 医 博 第 2132 号

学位授与の日付 平 成 11 年 3 月 23 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 医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻

学位論文題目 Compensated endocytosis of LDL by hamster cells co-expressing the two distinct mutant LDL receptors defective in endocytosis and ligand binding
(エンドサイトーシス欠損及びリガンド結合という異なる二種類の変異型低比重リポ蛋白受容体とともに発現したハムスター細胞においては低比重リポ蛋白のエンドサイトーシスの補填的な改善が認められる)

(主査)
論文調査委員 教 授 中 尾 一 和 教 授 西 川 伸 一 教 授 北 徹

論 文 内 容 の 要 旨

動脈硬化症の最大のリスクファクターであるコレステロールは、主に低比重リポ蛋白(以下LDL)粒子に含まれて血液中を運搬されている。LDLはLDL受容体により血中から主に肝臓に取り込まれ、LDL受容体は血中コレステロール値を制御する上で最も主要な分子である。LDL受容体の変異による疾患である家族性高コレステロール血症(以下FH)は、著明な高コレステロール血症をきたす疾患として最も高頻度で、日本人の心筋梗塞患者の内の十数パーセントがFHを基に発症すると考えられている。従来の研究から、細胞表面においてLDL受容体は多量体として存在する可能性が示唆されている。多量体が形成されるのであれば、FHにおいては異なるLDL受容体分子間にヘテロ多量体が形成される可能性が考えられるが、その病態に及ぼす影響はいまだ不明である。異なるLDL受容体分子間に多量体が形成されることを示し、それがLDLの取り込みに及ぼす影響を検討することが本論文の目的である。

LDL受容体欠損細胞株ldlA7に二種類の変異ヒトLDL受容体遺伝子をリン酸カルシウム法で導入して永久発現株を作成した。一方の変異は第807アミノ酸がチロシンからシステインに置き換わりエンドサイトーシスが障害されている(以下Y807C受容体)。他方の変異は第189アミノ酸がイソロイシンからアスパラギン酸に置き換わりLDLの結合が障害されており、さらにY807C受容体と異なる抗体で区別する目的で受容体機能に影響のない部位をラット配列に置き換えたキメラである(以下I189D h/r受容体)。LDLのエンドサイトーシス効率、125I標識したLDLのInternalization Index (I.I.: 分解+取り込み/表面結合)で評価した。蛍光免疫組織法で二種類のLDL受容体を二重染色し、蛍光および共焦点顕微鏡でその細胞内と表面における分布を検討した。

単独で発現した時、I189D h/r受容体は野生型受容体と同様に細胞内の核周辺に集中していたが、Y807C受容体は細胞表面にび漫性に散在し核周辺には見られなかった。一方、このY807C受容体がI189D h/r受容体とともに発現した時、細胞表面のび漫性の分布とともに核周辺の強い集中が見られた。これを共焦点顕微鏡で観察したところ、核周辺において二つの変異受容体の局在は一致していた。野生型受容体のI.I.を100%としたとき、Y807C受容体のみを発現した細胞株のI.I.は31%であった。二つの変異受容体とともに発現した細胞株のI.I.は平均55%であり、I189D h/r受容体の発現レベルが同程度ならばY807C受容体の発現レベルが低い細胞株ほどI.I.が高い傾向が見られた。二つの変異受容体とともに発現した細胞株においてLDLの結合量はY807C受容体の発現レベルに正比例し、I189D h/r受容体の発現レベルとは無関係であった。

Y807C受容体はI189D h/r受容体と共に発現した時エンドサイトーシスが改善される。この際LDLのエンドサイトーシスも改善されるが、これはLDLの受容体への結合親和性の変化によらず、Y807C受容体のエンドサイトーシスの増加に伴うものと考えられた。I189D h/r受容体とY807C受容体の発現レベル比とI.I.との関係は、Y807C受容体のエンドサイトーシスの

改善の機序がヘテロ多量体形成による可能性を示唆すると考えられた。従来のLDL受容体の研究は単一の変異受容体を細胞やマウスに導入するものがほとんどであり、異なるLDL受容体分子が共存した場合に起こりうる現象については見過ごされてきた。FHヘテロ接合体および複合型ヘテロ接合体患者の遺伝子診断を行うにあたり、異なるLDL受容体分子間の相互作用について考慮する必要があると考えられた。

論文審査の結果の要旨

低比重リポ蛋白（以下LDL）受容体の変異による疾患、家族性高コレステロール血症において、異なるLDL受容体分子間にヘテロ多量体が形成される可能性があるがその病態に及ぼす影響は不明である。LDL受容体欠損細胞株に二種類の変異ヒトLDL受容体遺伝子を導入して永久発現株を作成した。一方の変異（以下Y807C受容体）はエンドサイトーシスが障害されている。他方の変異（以下I189D h/r受容体）はLDLを結合できず、一部をラット配列に置き換えたキメラ分子である。LDLのエンドサイトーシス効率、¹²⁵I標識したLDLのInternalization index (I.I.: 分解+取り込み/表面結合) で評価した。蛍光免疫組織法で二種類の変異受容体を二重染色し分布を検討した。単独で発現したY807C受容体は細胞表面にびまん性に散在し細胞内には見られず、I.I.は野性型受容体の31%であった。このY807C受容体がI189Dh/r受容体とともに発現した時、細胞内へ分布が移行し、I.I.は平均55%であった。LDLの結合量はY807C受容体の発現レベルに正比例し、I.I.の改善はLDLと受容体との親和性に関係なく、Y807Cの受容体のエンドサイトーシスの増加によると考えられた。I189D h/r受容体の発現レベルが同程度ならばY807C受容体の発現レベルが低い細胞株ほどI.I.が高く、改善の機序がヘテロ多量体形成による可能性が示唆された。

以上の研究は単一の変異分子を用いた従来の研究では見過ごされてきた分子間相互作用が病態に影響を与え得ることを示し、今後診断する際に意義をもつと思われる。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成11年3月1日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。