

氏 名	むら せ たか とし 村 瀬 孝 利
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	論医博第 1843 号
学位授与の日付	平成 16 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Identification of soluble forms of lectin-like oxidized LDL receptor-1 (可溶型レクチン様酸化LDL受容体-1の同定)

論文調査委員 (主 査) 教授 横 出 正 之 教授 野 間 昭 典 教授 北 徹

論 文 内 容 の 要 旨

LOX-1 (lectin-like oxidized LDL receptor-1) は、血管内皮細胞に発現する酸化LDL受容体として最初にクローニングされた分子で、N末端が細胞質内、C末端が細胞質外に出る細胞膜1回貫通型の糖蛋白質である。各種培養細胞を用いた検討から、LOX-1はTNF α やLPSのような炎症性の刺激、シェアストレス、更に酸化LDL自身などにより発現が強く誘導されることが明らかになってきた。また組織化学的解析により、ヒトの初期動脈硬化病変部位の血管内皮細胞や、進行した動脈硬化巣のマクロファージや平滑筋細胞にLOX-1が強く発現していることが明らかとなり、動脈硬化の進行におけるLOX-1の関与が示唆されている。

1回膜貫通型蛋白質の中には、細胞外ドメイン近傍でプロテアーゼにより切断を受け、可溶化した分子が存在するものがある。我々は本研究において、スカベンジャーレセプターファミリー分子の中で初めてLOX-1に可溶型分子を見出すと共に、可溶型LOX-1の分子構造及び生成機序につき解析を行った。

TNF α 刺激した培養血管内皮細胞とその培養上清について、LOX-1の細胞外ドメインを認識する抗体を用いてウエスタンブロットを行ったところ、細胞側に分子量約50kDの膜結合型LOX-1が誘導されると共に、その培養上清には、分子量約35kDの可溶型LOX-1と推定される分子が検出された。膜結合型LOX-1はTNF α 刺激4時間で検出可能となり、その後36時間以上に渡り発現が持続した。一方、可溶型LOX-1は膜結合型に遅れて産生され、TNF α 刺激8時間後に検出可能なレベルに達した。また、可溶型LOX-1は、LOX-1を安定発現させたLOX-1-CHO細胞においても同様に産生されたことから、膜結合型LOX-1の切断酵素自体は種々の細胞に存在すると推測された。そこで次に、TNF α 刺激した血管内皮細胞及びLOX-1-CHO細胞から、可溶型LOX-1の切り出しに関わるプロテアーゼの性質につき検討した結果、本酵素はPMSF感受性のセリンプロテアーゼの1種であることが示唆された。また、LOX-1-CHO細胞表面蛋白質をビオチン標識し、その後培養上清中に放出されたビオチン化蛋白質の解析を行った結果、培養上清中にビオチン標識された可溶型LOX-1分子が検出されたことから、可溶型LOX-1は膜表面に発現したLOX-1がプロテアーゼにより切断され、培地中に放出されたものであることが示された。

さらに、LOX-1-CHO細胞の培養上清から可溶型LOX-1の精製と切断部位の決定を行った。培養上清中の蛋白質を硫酸沈殿させた後、陰イオン交換カラム、陽イオン交換カラム、ヘパリンセファロースカラム、ブルーセファロースカラムを通して精製し、可溶型LOX-1を銀染色上ほぼ単一蛋白質として得た。精製した可溶型LOX-1のアミノ酸配列をエドマン分析法により分析したところ、可溶型LOX-1は2種類存在し、その切断部位をそれぞれ膜貫通領域近傍の細胞外ドメインにあるArg⁸⁶-Ser⁸⁷とLys⁸⁹-Ser⁹⁰間であると決定した。

今後、ヒト血中可溶型LOX-1濃度と、動脈硬化症やその他病態の程度との関連が明らかになれば、可溶型LOX-1は病態の診断や予知のマーカーとして有用になると考えられる。

論文審査の結果の要旨

粥状動脈硬化の発生には、酸化LDLによる血管壁細胞の機能的変化が重要な役割を果たしている。酸化LDLの細胞への作用を媒介する分子として見出されたレクチン様酸化LDL受容体（LOX-1）は、動脈硬化病変において選択的な発現が認められている。本研究において申請者らは、スカベンジャーレセプターファミリー分子の中で初めてLOX-1に可溶性分子を見出すと共に、可溶性LOX-1の分子構造及び生成機序を明らかにした。

TNF α 刺激した培養血管内皮細胞及びLOX-1を安定発現させたLOX-1-CHO細胞の培養上清中に、分子量約35kDの可溶性LOX-1を見出した。LOX-1-CHO細胞表面蛋白質のビオチン標識実験から、可溶性LOX-1は膜結合型LOX-1に由来する事が示された。可溶性LOX-1の産生に関与するプロテアーゼは、各種阻害剤を用いた検討から、PMSF感受性のセリンプロテアーゼの一種であると推測された。更に、各種カラムクロマトグラフィーにより可溶性LOX-1を精製しN末端アミノ酸配列を解析することにより、その切断部位は膜貫通領域近傍の細胞外ドメインにあるArg⁸⁶-Ser⁸⁷とLys⁸⁹-Ser⁹⁰の2箇所があると決定した。

以上の研究は、動脈硬化の発生機序の解明に貢献するとともに、動脈硬化性疾患のマーカーや新たな診断法の開発にも寄与するところが多い。

従って、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16年1月5日実施の論文内容とそれに関連した研究分野ならびに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。