

93-3402

マクロファージ スカベンジャー受容体の構造と機能

代表研究者 東京大学医学部助手

児 玉 龍 彦

協同研究者 大阪大学薬学部助教授

土 井 健 史

株式会社蛋白工学研究部部長

中 村 春 木

東京大学医学部医員

和 田 洋一郎

研究目的

スカベンジャー受容体は変性 LDL の取込みを通じてアテローム性動脈硬化の発症の鍵となる泡沫細胞形成をになうマクロファージ特異の膜受容体で、本研究者らの手によりその遺伝子がクローニングされ、近年マクロファージのカチオン非依存接着因子がこれと同一であることが示された。本研究では、各ドメイン構造の蛋白構造の解析をすすめるとともに、翻訳後の修飾、高次構造、各ドメインの相互作用の解析を細胞および動物での発現を通じてすすめ、スカベンジャー受容体が分子全体としてどのように機能しているかを明らかにし、スカベンジャー受容体の異物処理機能と動脈硬化進展作用を解明し、新しい動脈硬化の予防治療の基礎の確立を目指した。

研究経過および成果

マクロファージのスカベンジャー受容体の構造と機能の解析から、この受容体がいかに変性 LDL の取込みと、マクロファージ接着因子としての2つの機能をになうかの検討をすすめ、実験計画に記載された、細胞への発現による解析、合成ペプチドなど蛋白工学による解析、スカベンジャー受容体欠損マウスの樹立、の3項目すべてに大きな成果をあげることができた。これらの各段階を総合的に検討しスカベンジャー受容体経路の抑制による動脈硬化の新しい治療法の基礎が解明され、治療薬物のプロトタイプがえられた。

1) 個体レベルでの解析

ES細胞 A3-1 における相同組み替えを用いてスカベンジャー受容体欠損マウスの作成にとりくみ、2系統のスカベンジャー受容体ノックアウトマウスを樹立した。これらマウスは、アセチル LDL や酸化 LDL の取込み低下とともに、バクテリアエンドトキシンの主要構造部分である LPS、糖尿病での組織障害への関与の想定されている AGE など大幅な低下を示し、スカベンジャー受容体が広範な異物、老廃物の処理に重要であることが証明された。またマクロファージの接着、分布の異常を示し、スカベンジャー受容体の二重の役割が検証された。現在このスカベンジャー受容体

ノックアウトマウスと動脈硬化好発マウスの交配が順調に進んでおり平成7年末までには、スカベンジャー受容体のアテローム形成における役割は明らかとなる予定である。

2) 変異受容体の細胞レベルでの解析

スカベンジャー受容体が、複数リガンドのエンドサイトーシス型受容体と、カチオン非依存性接着因子の2重の役割をはたす機構の解明がすすんだ。スカベンジャー受容体の細胞質ドメインがエンドサイトーシスに重要であること、この部分がマクロファージ特異の細胞内輸送経路をへて移送されることがわかった。さらにスカベンジャー受容体による接着を阻止する2F8は、リガンド結合ドメインであるコラーゲンドメインではなく、コイルドコイル構造を認識することが解明された。このコイルドコイル構造は pH 依存のリガンド解離に重要であることから、スカベンジャー受容体各ドメインの相互作用の解明がすすんだ。

3) スカベンジャー受容体と変性 LDL の結合機構の分子レベルでの解明

スカベンジャー受容体のリガンド結合部分のモデルペプチドが合成され、N 端側でクロスリンクすることにより3量体の形成に成功しこれを用いてリガンド結合構造の研究が進んだ。LDL の主要構造蛋白であるアポ B100 のアミノ酸配列より、スカベンジャー受容体と結合しうる可能性のある配列が選択されそのなかから、2つのアセチル化によりスカベンジャー受容体へ競合的に結合しうる配列が同定された。この合成変性ペプチドはスカベンジャー受容体を介する変性 LDL の取込み、分解をよく抑制し、スカベンジャー受容体抑制治療薬物のプロトタイプとなりうると思われた。

以上の結果から、スカベンジャー受容体経路を介するコレステロール蓄積、アテローム進展抑制について、(1) LDL の酸化の抑制、(2) スカベンジャー受容体への変性 LDL の結合抑制、(3) マクロファージ細胞内でのコレステロール蓄積抑制、(4) マクロファージの接着抑制の可能性が示され、その治療薬物のプロトタイプが発見、合成され大きな成果をあげた。本研究

助成はスカベンジャー受容体欠損マウスの樹立の最も困難な時期に提供され、その成功の原動力となった。

主な発表や論文

- 1) Y. Wada, T. Doi, T. Kodama et al : Structure and function of macrophage scavenger receptors, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 748, 226-239 (1995).
- 2) T. Tanaka, A. Nishikawa, Y. Tanaka, H. Nakamura, T. Kodama, T. Imanishi and T. Doi : Synthetic collagen-like domain derived from the macrophage scavenger receptor binds acetylated low density lipoprotein in vitro, submitted to *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.
- 3) Y. Kawabe, T. Shimokawa, A. Matsumoto, M. Honda, Y. Wada, Y. Yazaki, A. Endo, H. Itakura and T. Kodama : The molecular mechanism of the induction of the low density lipoprotein receptor by chenodeoxycholic acid in cultured human cells, *Biochem. Biophys. Res. Comm* (1995, in press).
- 4) T. Mori, K. Takahashi, M. Naito, T. Kodama, H. Hakamata, M. Sakai, A. Miyazaki, S. Horiuchi and M. Ando : Endocytic pathway of scavenger receptor via trans-Golgi system in bovine alveolar macrophages, *Lab. Invest.* 71, 409-416 (1994).
- 5) T. Doi, M. Kurasawa, K. Higashino, T. Imanishi, T. Mori, M. Naito, K. Takahashi, Y. Kawabe, A. Matsumoto and T. Kodama : The histidine interruption of an α -helical coiled coil allosterically mediates a pH dependent ligand dissociation from macrophage scavenger receptors, *J. Biol. Chem.* 268, 25598-25604 (1994).
- 6) Y. Kawabe, M. Honda, Y. Wada, Y. Yazaki, T. Suzuki, Y. Ohba, H. Nabata, A. Endo, A. Matsumoto, H. Itakura and T. Kodama : Sterol mediated regulation of SREBP-1a, 1b, 1c and SREBP2 in cultured human cells, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 202, 1460-1467 (1994).
- 7) O. Cynsi, Y. Takashima, T. Suzuki, Y. Kawabe, Y. Ohba and T. Kodama : Characterization of aggregated low density lipoprotein induced by copper-catalyzed oxidation, *J. Atheroscler. Thromb.* 1, 87-97 (1994).
- 8) Y. Kawabe, O. Cynsi, Y. Takashima, T. Suzuki, Y. Ohba and T. Kodama : Oxidation-induced aggregation of rabbit low-density lipoprotein by azo initiator, *Arch. Biochem. Biophys.* 310, 489-496 (1994).
- 9) Y. Geng, T. Kodama and G. Hansson : Differential expression of scavenger receptor isoforms during monocyte-macrophage differentiation and foam cell formation *Arterioscler. Thromb.* 14, 798-806 (1994).
- 10) J. Luoma, T. Hiltunen, T. Sarkioja, K. S. Moestrup, J. Gliemann, T. Kodama, T. Nikkari and S. Yla-Herttua-

la : Expression of $\alpha 2$ -macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor related protein and scavenger receptor in human atherosclerosis *J. Clin. Invest.* 93, 2014-2021 (1994).

- 11) Y. Kurihara, H. Kurihara, H. Suzuki, T. Kodama, K. Maemura, R. Nagai, H. Oda, T. Kuwaki, W.H. Cao, N. Kamata, K. Jishage, Y. Ouchi, S. Azuma, Y. Toyoda, T. Ishikawa, M. Kumada and Y. Yazaki : Disruption of mouse endothelin-1 gene results in lethality and craniofacial anomaly in homozygotes and elevated blood pressure in heterozygotes, *Nature*, 368, 703-710 (1994).