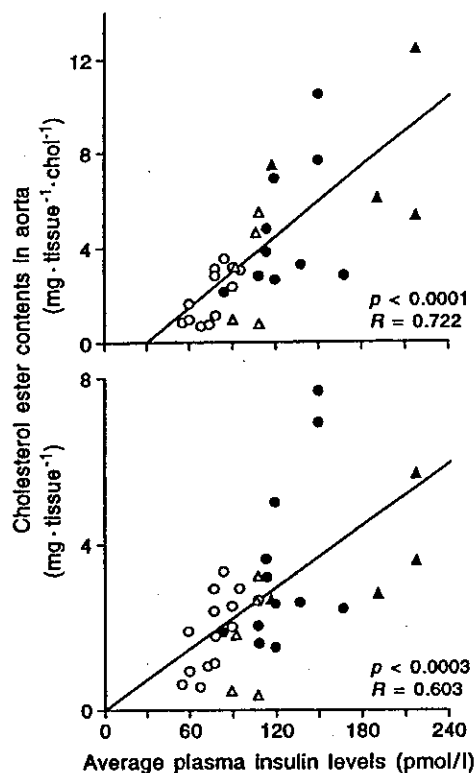


**Table 2 : Plasma lipid levels in IRS-1 deficient and wild-type mice**

		Body weight (g)	Triglyceride (mg/dl)	Cholesterol (mg/dl)	HDL (mg/dl)	FFA ( $\mu$ Eq/l)
<b>Homozygous mice</b>						
(months)	2-3	15.2 $\pm$ 1.6*	51.2 $\pm$ 23.8**	75.0 $\pm$ 12.9	—	—
	4-5	15.8 $\pm$ 1.3*	47.9 $\pm$ 19.3*	76.0 $\pm$ 11.3	—	—
	6-12	17.8 $\pm$ 2.3*	53.1 $\pm$ 22.5*	75.4 $\pm$ 6.4	54.7 $\pm$ 7.6	503.7 $\pm$ 122.5
		(n=17)	(n=17)	(n=17)	(n=9)	(n=21)
<b>Wild-type mice</b>						
(months)	2-3	21.0 $\pm$ 2.0	33.1 $\pm$ 19.8	80.4 $\pm$ 9.0	—	—
	4-5	23.8 $\pm$ 1.3	28.4 $\pm$ 8.0	81.9 $\pm$ 11.2	—	—
	6-12	24.5 $\pm$ 1.6	33.8 $\pm$ 6.7	79.6 $\pm$ 9.7	68.9 $\pm$ 8.5	529.7 $\pm$ 149.3
		(n=21)	(n=21)	(n=21)	(n=7)	(n=14)

Data were analyzed by the Mann-Whitney U-test and expressed as mean $\pm$ SD.

\*  $p < 0.01$ , \*\*  $p = 0.0105$  vs wild-type.



**Fig. 2, Relationship between cholesterol ester contents in aortas and plasma insulin levels in rats. Accumulation of cholesterol ester in aorta of WS control (○), WS transplanted (●), SHR control (△), and SHR transplanted rats (▲) is expressed as either cholesterol ester contents per gram dried tissue of aorta (lower) or the corrected values divided by average plasma cholesterol levels (upper).**

脂質代謝疾患に関係する遺伝子のクローニング及びアポEリポタンパクレセプター  
ノックアウトマウスの作製

山本徳男（東北大学遺伝子実験施設 教授）

要 旨

アポリポタンパクE（アポE）に特異的レセプターである超低密度リポタンパク質（VLDL）レセプターとアポEレセプター2を欠損するマウス、低密度リポタンパク（LDL）レセプターを欠損するマウスを解析し、以下のことを明らかにした。（1）脂肪細胞へのアポEリポタンパクの取り込みにはVLDLレセプターとLDLレセプターが共に必要で、2つのレセプターが欠損すると取り込みが失われること。（2）アポEレセプター2の欠損はマウスの発生や成長、行動、外観、繁殖に大きな影響を与えないが、血中中性脂肪を若干増加させることが示された。

また、新規LDLレセプター類似タンパク、LRP5、をクローニングし、解析した結果、LRP5アポEは肝臓やステロイド産生臓器に発現し、アポEを認識することが明らかになった。

A. 研究目的

血中の脂質輸送を担うリポタンパクは特異的なレセプターにより結合され、代謝される。主にコレステロール輸送を担う低密度リポタンパク（LDL）はLDLレセプターにより、結合されて、細胞内に取り込まれ代謝され、遊離したコレステロールは細胞膜合成やステロイドホルモン、胆汁酸の合成に利用される。LDLレセプターの異常は人類で最も頻度の高い遺伝病の一つである家族性高コレステロール血症の原因で、動脈硬化を伴っている（1, 2）。アポEは肝臓と脳に高く発現し、体内のコレステロールと中性脂肪の輸送を担っている。アポEはLDLレセプターにも結合されるが、家族性高コレステロール血症の解析から、アポE特異的レセプターの存在が示唆され、アポEに特超低密度リポタンパク質

（VLDL）レセプター（3）とアポEレセプター2（4, 5）と名づけたレセプターがcDNAクローニングにより明らかにされた。VLDLレセプターは筋肉細胞や脂肪細胞に、アポEレセプター2は脳に最も高く発現するが、2つのレセプターは共に肝臓に発現しない。また、2つのレセプターの遺伝子構造はアポEとアポB100を共に結合するLDLレセプターとほぼ同一で、共通の祖先から由来したと予測されている。

鳥類ではVLDLレセプターは主として卵巣の卵母細胞に検出され、肝臓で合成分泌される卵黄前駆体

の取り込みを担うことがニワトリミュータントの解析により明らかにされた（6）。また、ヒトの家族性高コレステロール血症同様に、ニワトリミュータントは重篤な高脂血症を引き起こすことも明らかにされた。

ニワトリのVLDLレセプター異常が重篤な高脂血症と動脈硬化を伴うのに対し、VLDLレセプターを欠損するノックアウトマウスでは、リポ蛋白プロファイルや血中コレステロール、中性脂肪濃度は正常と変わりなく、繁殖の異常もみられない（7）。唯一観察される異常は脂肪細胞の脂質含量の顕著な減少で、VLDLレセプターを介した脂肪細胞への脂質の取り込みが示唆されている。本研究では脂肪細胞におけるVLDLレセプター機能を明らかにすることを目的の1つとしている。

脳に特異的なアポEレセプター2は脳の中樞神経系におけるコレステロール輸送を担うことが示唆されている。アポEレセプター2の個体レベルの役割を明らかにするために、ノックアウトマウスを作製する必要がある、これを第二の目的とした。

また、VLDLレセプターとアポEレセプター2は共に肝臓には検出できず、リガンドであるアポEを欠損するノックアウトマウスが重篤な高脂血症を引き起こすのに対し、LDLレセプターと

VLDLレセプターを共に欠損するマウスの血中コレステロールの増加は比較的マイルドで、肝臓に未知のアポEレセプターの存在が示唆される。未知のアポEレセプターの同定とその役割を明らかにするために、新しいLDLレセプターファミリーに属する3つのタンパクを解析した。その結果、LRP5と名づけた新しいLDLレセプターファミリーメンバーがアポEを認識することが明らかになった。

## B. 実験方法

Sambrookらの常法(8)に従ってcDNAと遺伝子を単離し、解析した。レセプター活性はLDLレセプター欠損JDLA-7細胞にcDNAを発現し、<sup>125</sup>I、もしくは蛍光DII 標識リポタンパクを用いて解析した(9)。総RNAはGTC/CsCl法を用いて調製し、mRNA量はノザンプロテイングにより解析した。PCRは常法に従い(10)、反応産物はアガロースゲルを用いた電気泳動により解析した。免疫化学的方法は常法に従った(11)。

## C. 結果

### 1. VLDLレセプター機能の解析

野性型[VLDLDR(+/+), LDLR(+/+)]及びVLDLレセプター欠損[VLDLDR(-/-), LDLR(+/+)], LDLレセプター欠損[VLDLDR(+/+), LDLR(-/-)], VLDLレセプター/LDLレセプターを共に欠損する[VLDLDR(-/-), LDLR(-/-)]ノックアウトマウスの胎児より初代繊維芽細胞を調製し、実験に用いた。4種の遺伝型を持つマウス由来の初代繊維芽細胞を調製し、脂肪細胞へ分化能を解析した結果、VLDLレセプターとLDLレセプターの欠損はin vitroでの脂肪細胞への分化に全く影響を与えないことが示された。蛍光色素DIIで標識したβ-VLDLの細胞内への取込みを解析した結果、VLDLレセプターとLDLレセプターのそれぞれの欠損はβ-VLDLの細胞内への取込みに大きな影響

を与えないが、両者が共に欠損するとほとんど取り込みが見られなくなることが示され、アポEリポタンパクとそのレセプターにより、脂肪細胞へ中性脂肪が供給されるメカニズムが明らかになった。

### 2. アポEレセプター2機能の解析

アポEレセプター2の役割を明らかにするために、ノックアウトマウスを作製した。マウス遺伝子を用いてターゲッティング・ベクターを作製し、ES細胞に導入したのちにアポEレセプター2遺伝子を部分欠損するES細胞を得、これを用いてキメラマウスを作製し、最終的にアポEレセプター2遺伝子を部分欠損するノックアウトマウスを作製し、確立することに成功した。アポEレセプター2の欠損はマウスの発生や成長、行動、外観、繁殖に大きな影響を与えないが、血中脂質の解析の結果、血中中性脂肪が若干増加することが示された。

### 3. 新規LDLレセプター類似タンパク、LRP5

未知のアポEレセプターの同定とその役割を明らかにするために、新しいLDLレセプターファミリーに属する3つの新規LDLレセプターファミリータンパクLRP3-5のcDNAを単離し、解析した結果、LRP5がアポEを有意に結合することが示された。LRP5は1615アミノ酸からなりタイプ細胞膜蛋白質で、リガンド結合ドメインとEGF前駆体相同ドメインを有しているが、アポEレセプター2やLDLレセプター、VLDLレセプターとは逆の配置、すなわちEGF前駆体相同ドメインがN-末に存在し、それに続く細胞膜のすぐ外側にリガンド結合ドメインが存在することが示された。LRP5は肝臓を含む多くの組織に検出され、特にステロイド産生臓器に高い発現が見られた。

## D. 考察

本研究により、VLDLレセプターはほ乳動物

において、脂肪細胞へのアポEリポタンパク由来の脂質の取り込みを担うことが示された。また、脳に発現するアポEレセプター2の異常はマイルドな高脂血症を引き起こすことが示され、脳への一般循環からの中性脂肪の輸送経路がアポEレセプターに担われる可能性とヒトにもミュータントが存在する可能性が示された。

また、新規LDLレセプター類似タンパクLRP5は肝臓に発現する新しいアポE結合タンパクである可能性が示された。

#### E. 結論

2つのアポEレセプターの機能の一部が明らかにされると共に、新たに肝臓に発現するアポE結合タンパクが明らかにされた。

#### F. 引用文献

1. Brown, M. S. & Goldstein, J. L. : A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34-47, 1986
2. Yamamoto, T., Davis, C. G., Brown, M. S., Schneider, W. J., Casey, M. L., Goldstein, J. L., and Russell, D. W.: The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* 39, 27-38, 1984
3. Takahashi, S., Kawarabayasi Y., Nakai T., Sakai J., and Yamamoto T.: Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9252-9256 (1992)
4. Kim, D. H., Iijima H., Goto K., Sakai J., Ishii H., Kim H. J., Suzuki H., Kondo H., Saeki S., and Yamamoto T.: Human apolipoprotein E receptor 2. A novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain. *J Biol Chem* 271, 8373-8380 (1996)
5. Kim, D. H., Magoori K., Inoue T. R., Mao C. C., Kim H. J., Suzuki H., Fujita T., Endo Y., Saeki S., and Yamamoto T. T.: Exon/Intron Organization, Chromosome Localization, Alternative Splicing, and Transcription Units of the Human Apolipoprotein E Receptor 2 Gene. *J Biol Chem* 272, 8498-8504 (1997)
6. Bujo, H., Yamamoto, T., Hayashi, K., Hermann, M., Nimpf, J. and Schneider, W. J. Mutant oocyte LDL receptor gene family member causes atherosclerosis and female sterility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92: 9905-9909
7. Frykman, P. L., Brown, M. S., Yamamoto, T., Goldstein, J. L. and Herz, J. Normal plasma lipoproteins and fertility in gene-targeted mice homozygous for a disruption in the gene encoding very low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92: 8453-8457.
8. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY), 2nd Ed.
9. Goldstein, J. L., Basu S. K., and Brown M. S.: Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymol* 98, 241-260 (1983)
10. Saiki, R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., and Erlich H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491 (1988)
11. Harlow, E., and Lane D.: *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Hrtbor, NY (1988)

## G. 研究発表

1. Kim, Hyoun-Ju. et al. Evolution of the Apolipoprotein E Receptor 2 Gene by Exon Loss. J. Biochem.124.451-456(1998)
2. Iijima, Hiroaki. et al. Expression and Characterization of a Very Low Density Lipoprotein Receptor Variant Lacking the O-Linked Sugar Region Generated by Alternative Splicing. J. Biochem.124.747-755(1998)
3. Tomita, Yasuhiro. et al. A Novel Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein with Type II Membrane Protein -Like Structure Is Abundant in Heart. J. Biochem.124.784-789(1998)
4. Oikawa, Eisaku. et al. A Novel Acyl-CoA Synthetase, ACS5, Expressed in Intestinal Epithelial Cells and Proliferating Preadipocytes. J. Biochem.124.679-685(1998)
5. Kim, Dong-Ho. et al. A New Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein, LRP5, Is Expressed in Hepatocytes and Adrenal Cortex, and Recognizes Apolipoprotein E. J. Biochem.124.1072-1076(1998)
6. Ishii, Hirofumi. et al. cDNA Cloning of a New Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein and Mapping of Its Gene (LRP3) to Chromosome Bands 19q12-q13.2. Genomics.51.132-135(1998)