

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

新たな血管の老化予防法の開発をめざしたコレステロール逆転送系調節機構の解明
-肝細胞におけるHDLからのコレステロールエステルの取り込み機構-

分担研究者 新井 洋由 東京大学大学院 薬学系研究科 助教授

血漿リポ蛋白質の一つであるHDLは、心筋梗塞等の発症率と逆相関があり、抗動脈硬化作用を有することが知られている。最近、SR-BIと呼ばれる細胞表面受容体がHDLに対する受容体としてはじめて同定された。我々は、肝臓内においてSR-BIの細胞質ドメインに結合する新規蛋白質（CLAMP）を発見した。今年度の研究において、まず、CLAMPが肝臓内でシヌソイド膜において特異的にSR-BIと結合していることを明らかにした。さらに、CLAMPは、細胞内に取り込まれたコレステロールエステルの動態と代謝を制御している可能性を培養細胞を用いた実験から示唆した。

A. 研究目的

動脈硬化症は、動脈壁にコレステリルエステルに富むマクロファージが蓄積し、血管の閉塞を引き起こす病気である。善玉リポ蛋白質として知られるHDLの抗動脈硬化作用は、HDLが末梢組織の細胞に蓄積した過剰のコレステロールを引き抜き、これを肝臓へ輸送して処理・排泄する経路(reverse cholesterol transport)に重要な役割を果たしていることで説明される。最近、肝臓において、HDLからコレステロールを引き抜き、胆汁中に排泄する機能を有する細胞膜蛋白質（SR-BI）が同定された。申請者らは、この蛋白質の細胞質ドメインと結合する新規蛋白質を同定・クローニングすることに成功し、CLAMP(C-terminal Linking And Modulating Protein)と命名した。CLAMPはPDZドメインと呼ばれる蛋白質-蛋白質間相互作用に関わるドメインを4個持っている蛋白質である。本研究の目的は、CLAMPを手がかりにして、肝細胞内において、SR-BIを介して血液中のHDLから引き抜いたコレステロールエステルがいかんして代謝され、また、胆管側から排泄されているのか、その分子機構と制御機構を解明していくことである。

B. 研究方法

(1) 肝細胞内におけるSR-BIとCLAMPの結合

肝臓において、SR-BIとCLAMPが実際に結合しているかどうかを、免疫沈降法により解析した。具体的には、ラット肝臓膜画分をTriton X-100で可溶化後、CLAMPモノクローナル抗体で免疫沈降し、SR-BIの細胞外ドメインに対するポリクローナル抗体で検出した。また、細胞内においても

SR-BIとCLAMPがインターアクションしているかどうかを解析するために、CLAMPを恒常的に発現したCHO細胞(CHO-CLAMP細胞)を作製し、SR-BIを一過的に発現させ、同様に免疫沈降法により解析した。さらに、CHO-CLAMP細胞にSR-BIを一過的に発現させ、CLAMP抗体及びSR-BI抗体を用いた細胞免疫染色により、CLAMP及びSR-BIの細胞内分布を検討した。

(2) CHO細胞をモデル系に用いたCLAMPの機能解析

コントロールCHO細胞或いはCHO-CLAMP細胞に、SR-BI或いはSR-BI Iを一過的に発現させ、放射標識したアポ蛋白質及びCEを含むHDLを細胞と4時間インキュベーションし、HDLの細胞結合量、CEの選択的取り込み量、及び細胞内に取り込まれたCEの代謝を比較した。

次に、蛍光脂質であるDiIで標識したHDLと37℃、5分間インキュベーションを行い、細胞に結合しなかったDiIを除いた直後、あるいは2時間チェースインキュベーション後のDiIの細胞内分布について比較した。

(3) CLAMPに対するモノクローナル抗体の作製

CLAMPはSR-BIのC末端細胞質ドメインと結合する分子としてクローニングした新規蛋白質である。今後CLAMPを手がかりとして、肝細胞内のコレステロール輸送に関する分子機構を解明する研究を進めていく上で、CLAMP分子を特異的に認識する抗体が必要である。そこで、ラットCLAMP蛋白質を大腸菌に発現させ、これを抗原としてモノクローナル抗体を定法に従い作製した。

(4) CLAMPモノクローナル抗体を用いた肝臓の形質膜におけるCLAMPの分布の検討

まず、CLAMPモノクローナル抗体を用いて、肝臓の組織染色を行った。次に、肝臓の形質膜をフラクショネーションし、シヌソイド膜とカナリキュラー膜を分画して両膜画分におけるCLAMPの分布を調べた。

(5) CLAMPモノクローナル抗体を用いた発現臓器分布及び免疫組織染色の検討

CLAMPモノクローナル抗体を用いて、CLAMPの発現臓器分布の検討を行った。さらに、肝臓以外の主要な発現臓器である腎臓、小腸の組織切片を作製し、免疫組織染色を行った。具体的には、まず、SET bufferを用いてラットの全身灌流を行い組織を摘出する。次にカミソリの刃を用いて、約5mm程度の厚さにスライスし、AMeX固定法により固定した。AMeX固定とは、アセトン、安息香酸メチル、キシレンの順に時間をかけて組織を浸していき、固定する方法である。これを、パラフィンで包埋し、マイクロームで6µmの厚さに薄切し、スライドガラスに貼り付け、これを試料として免疫組織染色を行った。

C. 研究結果

(1) まず、ラット肝臓ホモジネートを10万xgで遠心し上清と沈殿とに分画したところ、両蛋白質とも沈殿画分のみから回収されたことから、肝臓の膜画分に存在していることが分かった (Fig. 1)。そこで、ラット肝臓膜画分をTriton X-100で可溶化後、CLAMPモノクローナル抗体で免疫沈降したところ、SR-BIが共沈してきたことから、SR-BIとCLAMPは肝臓内で生理的に結合していることが明らかとなった。また、SR-BI或いはSR-BI Δ C15 (SR-BIのC末端15アミノ酸を削った遺伝子)を一過的に発現させたCHO-CLAMP細胞をCLAMP抗体で免疫沈降したところ、CLAMPとともにSR-BIは沈降するが、SR-BI Δ C15は沈降しないことから、細胞内においてもCLAMPはSR-BIのC末端に結合していることが示された (Fig. 2)。また、CHO-CLAMP細胞をCLAMPモノクローナル抗体で免疫染色すると、細胞質が一様に染まることからCLAMPは細胞質全体に分布していることが分かる。ところが、SR-BIを発現させたCHO-CLAMP細胞では、形質膜及びその周辺が強く染まっており、CLAMPの局在が細胞質から形質膜へと変化した。また、この細胞をSR-BIに対するポリクローナ

ル抗体で染色したところ、SR-BIも形質膜及びその周辺に強く局在しておりCLAMPの局在と一致した。

(2) SR-BIが単独で発現している細胞に比べて、SR-BIとCLAMPが共発現している細胞では、SR-BI蛋白質の発現レベルが上昇することにより、HDLの細胞結合量及びCEの選択的取り込み量がともに2-3倍上昇することが分かった (Fig. 3)。また、細胞内に取り込まれたCEのその後の代謝を解析した結果、SR-BI単独時と比べて、SR-BIとCLAMPが共発現している細胞では、細胞内でのCEから遊離型コレステロール (UC) への変換率が有為に抑制されることが明らかとなった (Fig. 4)。一方、SR-BI Iをトランスフェクトした細胞では、これらの作用は見られなかった。

DiI-HDLと37°C、5分間インキュベーションし、細胞と結合しなかったDiI-HDLを除いた直後では、何れの細胞も形質膜が同じように強く染まった。このあと、2時間チーヌインキュベーションすると、SR-BI発現細胞では形質膜の強い染色像がほとんど消失し、代わりに細胞質内に小さい斑点状の染色像が観察された。一方、SR-BIとCLAMPの両方を発現している細胞では、まだかなりの量のDiIが形質膜或いは形質膜付近に残っていることが分かった。一方、SR-BI IとCLAMPを発現した細胞ではこのようなDiIの局在は見られなかった。

(3) CLAMPに対するモノクローナル抗体を作製した結果、9クローンのポジティブクローンが得られたが、ウエスタンブロッティングをはじめ、免疫細胞染色、免疫組織染色、免疫沈降などに使用できるものは最終的に1クローンしか残らなかった。本抗体のサブクラスはIgG1(kappa)で、エピトープはCLAMPのC末側 (PDZドメイン3-4)に存在することがわかった。また、種間における交叉性を検討したところ、マウスCLAMPとは交叉するが、ヒトCLAMPとは交叉しないことがわかった。

(4) 肝臓の組織切片を作製し、CLAMPの免疫組織染色を行った。しかし、おそらく発現量が低いために、CLAMPの顕著な細胞内局在はみられなかった。そこで、ラット肝臓の形質膜を調製し、シヌソイド膜とカナリキュラー膜に分画したところ、CLAMPの大部分はシヌソイド膜に分布することが分かった。一方、SR-BIは両膜画分中に存在することがわかった。

D. 考察

今年度は、CLAMPのモノクローナル抗体を作製し、肝臓内においてSR-BIとCLAMPが生理的に結合していることを示した。肝臓のコレステロールは、VLDLにのって血清中に分泌されるプールと、胆汁酸合成に利用されるプールの2つにコンパートメント化されているといわれている。我々の結果によると、CLAMPはSR-BIを介して肝臓内に取り込まれたコレステロールエステルの細胞内輸送・代謝経路を決定している可能性が考えられる。CLAMPの4つのPDZドメインのうち、SR-BIはN末端側の1つのPDZドメイン(PDZ1)に結合するが、残りの3つのPDZドメイン(PDZ2, PDZ3, PDZ4)には全く結合しない。したがって、残りのPDZドメインは肝臓内で何らかの他の蛋白質と結合している可能性が考えられ、そのような因子を同定していくことにより、SR-BI受容体と細胞内コレステロールプールとの間をつなぐ分子装置を明らかにし、形質膜から細胞内へのコレステロール輸送系とのクロストークを分子レベルで解明していきたいと考えている。また、我々は現在、PDZ234或いはPDZ1を欠損させた変異型CLAMP蛋白質を組み替えアデノウイルスによりマウスの肝臓に過剰発現させる系を作成中である。この系を用いて、変異型CLAMP蛋白質が、血清中のHDLコレステロールレベル、胆汁中のコレステロールレベル、及びそれらのキネティクスに及ぼす影響を解析する予定である。このようなアプローチにより、本蛋白質の個体レベルでの生理的機能が解明できるのではないかと期待している。

E. 結論

本年度の研究において我々はHDL受容体結合蛋白質(CLAMP)に関して、以下の点を明らかにした。

(1) CLAMPのモノクローナル抗体を作製し、SR-BIとCLAMPが肝臓のシノソイド膜側で生理的に結合していることを明らかにした。

(2) CLAMPはSR-BIの安定性を高めると同時に、レセプターを介して取り込まれたCEの細胞内輸送及び代謝経路を決定するという、2つの役割を果たしている可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Structure-Specific Inhibition of Cholesteryl Ester Transfer Protein by Azaphilones.

Hiroshi Tomoda, Chikako Matsushima, Noriko Tabata, Ichiji Namatame, Haruo Tanaka, Mark J. Bamberger, Hiroyuki Arai, Masayoshi Fukazawa, Keizo Inoue, Satoshi Omura J. Antibiotics, 52, 160-170 (1999)

2) Complete Inhibition of Mouse Macrophage-Derived Foam Cell Formation by Triacsin C.

Ichiji Namatame, Hiroshi Tomoda, Hiroyuki Arai, Keizo Inoue, Satoshi Omura J. Biochem., 125, 319-327 (1999)

3) Inhibition of Cholesteryl Ester Formation in Macrophages by Azole Antimycotics.

Kazuhiro Aikawa, Yuji Sato, Takemitsu Furuchi, Mamoru Ikemoto, Yoshinori Fujimoto, Hiroyuki Arai, Keizo Inoue. Biochem. Pharmacol., 58, 447-453 (1999)

4) Role of Class B Scavenger Receptor Type I in Phagocytosis of Apoptotic Rat Spermatogenic Cells by Sertoli Cells.

Akiko Shiratsuchi, Yuki Kawasaki, Mamoru Ikemoto, Hiroyuki Arai, Yoshinobu Nakanishi. J. Biol. Chem., 274, 5901-5908 (1999)

5) Identification of a PDZ Domain-Containing Protein That Interacts with the HDL Receptor SR-BI.

Mamoru Ikemoto, Hiroyuki Arai, Dongdong Feng, Kazumi Tanaka, Junken Aoki, Naoshi Dohmae, Koji Takio, Hideki Adachi, Masafumi Tsujimoto, Keizo Inoue. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, in press (2000)

2. 学会発表

1) HDL受容体 SR-BI 結合蛋白質 池本守、辻本雅文、Dong Dong Feng、田中和美、新井洋由、井上圭三 第72回生化学会大会 1999.10.8 横浜

2) HDL受容体 SR-BI、SR-BII の機能的相違 田中和美、池本守、新井洋由、井上圭三 第72回生化学会大会 1999.10.8 横浜

3) HDL受容体 SR-BI、SR-BII の性質の相違について 田中和美、池本守、新井洋由、井上圭三 第21回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 1999.11.18 岡山

4) HDL受容体 SR-BI の発見から最近の進歩まで 新井洋由 平成11年度日本動脈硬化学会冬季大会 1999.11.25 大阪

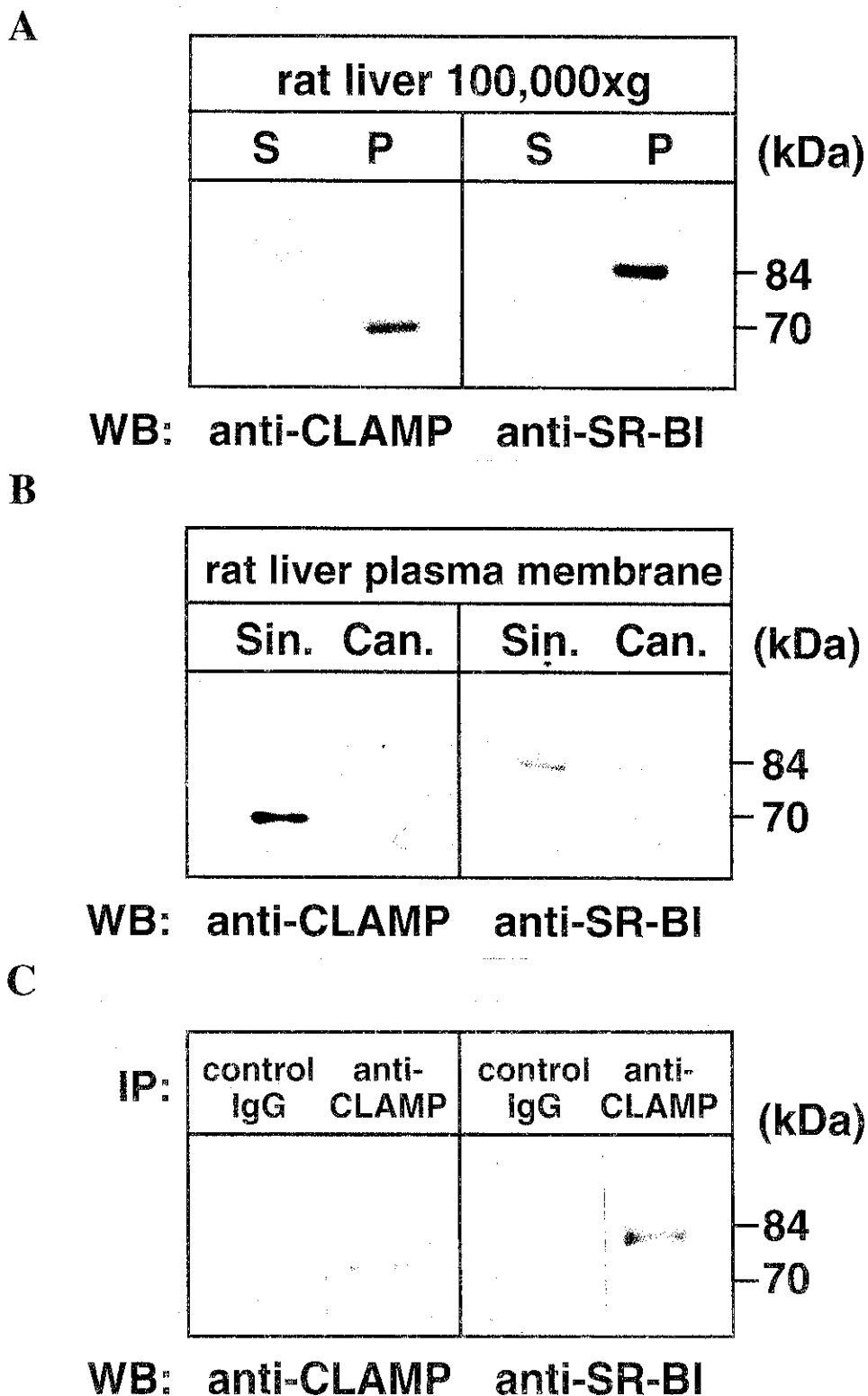


FIG. 1. CLAMP interacts with SR-BI in rat liver sinusoidal membrane. (A) Presence of SR-BI and CLAMP in the membrane fraction. Rat liver homogenate was separated by centrifugation into a soluble fraction (S) and an insoluble membrane pellet fraction (P). Equal fractions (not equal protein) were separated by SDS-PAGE and processed for Western blotting (WB) with an antibody against CLAMP or SR-BI. (B) Localization of SR-BI and CLAMP in the liver sinusoidal and canalicular membranes. Rat liver membranes were separated into a sinusoidal (Sin.) and a canalicular (Can.) membrane fraction. Equal amounts of protein were separated by SDS-PAGE and processed for Western blotting with an antibody against CLAMP or SR-BI. (C) Co-immunoprecipitation of CLAMP with SR-BI. The rat liver membranes were extracted with Triton X-100, and CLAMP was immunoprecipitated with either an anti-CLAMP antibody or a control IgG. The immunoprecipitates were then analyzed by Western blotting with an antibody against CLAMP or SR-BI.

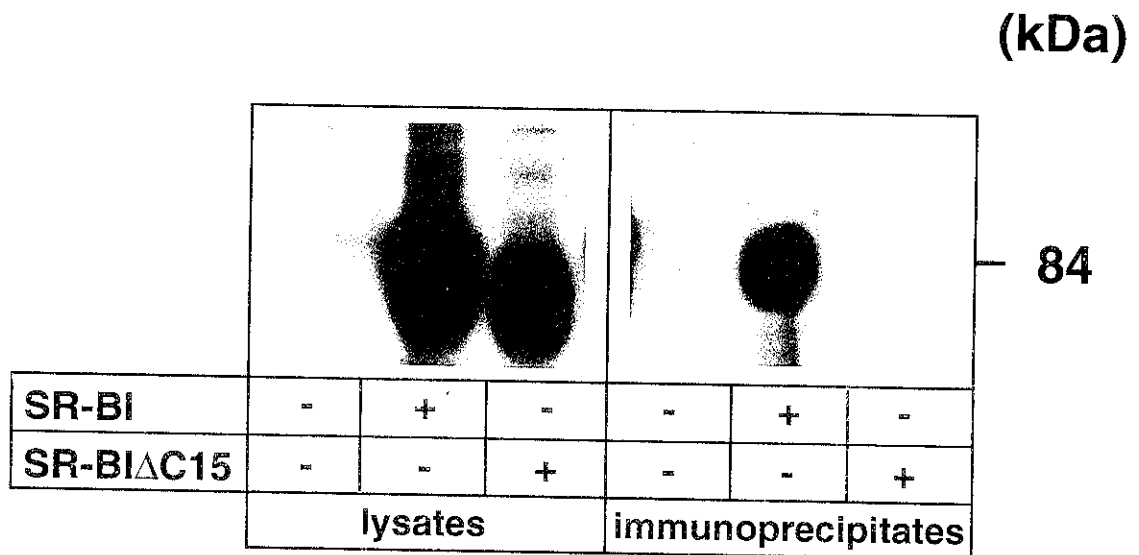


FIG. 2. CLAMP interacts with SR-BI in CHO cells. CHO-CLAMP cells were transiently transfected with (lanes denoted with +) or without (lanes denoted with -) either SR-BI or SR-BI Δ C15 (a deletion mutant without C-terminal 15 amino acids). The cells were then solubilized with Triton X-100, and the CLAMP was immunoprecipitated with an anti-CLAMP antibody. The lysates and the resulting immunoprecipitates were then analyzed by Western blotting with an anti-SR-BI antibody.

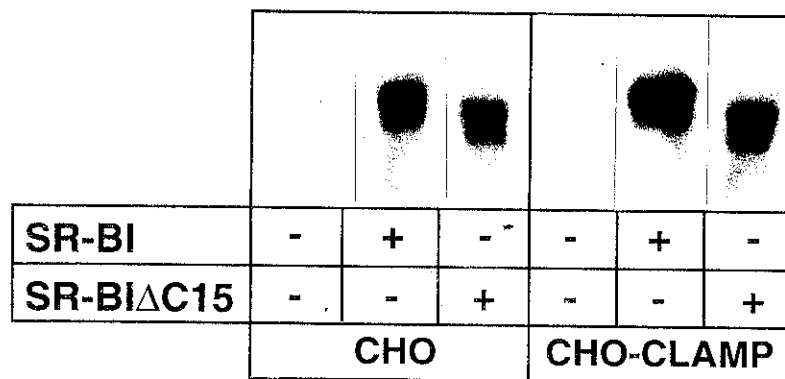


FIG. 3. CLAMP modulates the stability of SR-BI protein. CHO cells and CHO-CLAMP cells were transiently transfected with or without either SR-BI or SR-BI Δ C15. Western blotting (WB) analysis was performed in the corresponding cellular lysates and immunodetected with an anti-SR-BI antibody. Bands corresponding to SR-BI were quantified by using LAS-1000 (FUJIFILM). Data represent samples from a typical experiment.

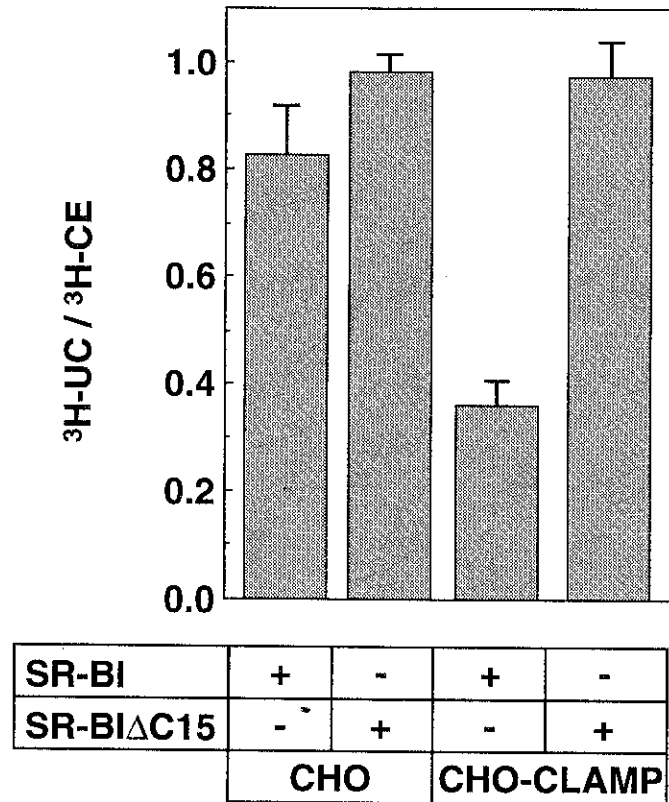


FIG. 4. Effect of CLAMP on the cellular metabolism of HDL-CE taken up via SR-BI. CHO cells and CHO-CLAMP cells were transiently transfected with either SR-BI or SR-BI Δ C15 and incubated at 37°C for 4 h with [¹²⁵I/³H-CE]HDL. The efficiency of conversion of HDL-CE into UC was determined by dividing the amount of cellular ³H-UC by the amount of cellular ³H-CE. Prior to calculating the ratios, the specific values for each construct were corrected by subtracting the specific background values from cells transfected with the control plasmid pcDNA3. Values represent the mean +/- S.E. (n=3).