

新奇なモザイク構造を有するLDL受容体遺伝子,ファミリー受容体LR11に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/16403

氏名	山崎裕之
生年月日	
本籍	東京都
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博乙第230号
学位授与の日付	平成13年3月22日
学位授与の要件	論文博士(学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	新奇なモザイク構造を有するLDL受容体遺伝子,ファミリー受容体LR11に関する研究
論文審査委員(主査)	二階堂 修(薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	松永 司(薬学部・助教授) 正宗 行人(自然科学研究科・教授) 清水 栄(自然科学研究科・助教授) 米田 幸雄(薬学部・教授)

学位論文要旨

Normal cell development depends to a large part on multifunctional proteins that have evolved by recombination of proven modular elements. We now have discovered and characterized in rabbit, human, and chicken such a multi-domain protein, and classify it as novel member of the low density lipoprotein (LDL) receptor gene family. The extracellular portion of the ~250-kDa membrane protein, termed LR11, contains a cluster of 11 LDL receptor ligand binding repeats, a group of 5 LDL receptor "YWTD" repeats, a large hexarepeat domain of structural elements found in neural cell adhesion molecules, and a domain with similarity to a yeast receptor for vacuolar protein sorting, VPS10. The cytoplasmic domain exhibits features typical of endocytosis-competent coated-pit receptors. The mosaic, and presumably multifunctional, receptor is expressed abundantly in brain, in particular the hippocampus, dentate gyrus and cerebral cortex. Western blotting of tissues and ligand blotting of LR11-transfected cells demonstrated that the novel protein binds apolipoprotein E-containing lipoproteins. In contrast to the LDL receptor, hepatic expression of LR11 is unaffected by hyperlipidemia. During early development, murine LR11 expression levels are highly dependent on neural cell types, and peaks at 1-2 weeks. The expression pattern of LR11 in brain and the presence of elements found in neural adhesion molecules suggested a function(s) in the central nervous system. The identification of this highly conserved and superbly complex protein offers the opportunity to gain new insights into the emergence of multifunctional mosaic proteins akin to the ever expanding LDL receptor gene family.

近年、分子生物学的手法により、低比重リポ蛋白質(LDL)受容体遺伝子ファミリーに属するいくつかの新しい受容体が哺乳類以外より同定され^{1,2)}、全身のリポ蛋白質代謝は、LDL受容体、超低比重リポ蛋白質(VLDL)受容体等に加え、

これらの膜受容体により維持されている可能性が示唆されている (Fig. 1)¹⁻⁹。一方、その新たな受容体のいくつかは、リポ蛋白質代謝のみではなく、プロテアーゼ/プロテアーゼインヒビター複合体やある種の毒性物質、卵黄前駆物質等をリガンドとし、全く異なった機能も有していることが示され、特に卵生動物では、種の維持に必須であることが明らかになった^{10,11}。私たちは哺乳類における、これらの増大する LDL 受容体遺伝子ファミリーの生理学的意義を明らかにするために、新たな受容体の同定を試み、ウサギ、ヒトおよびニワトリより新規 LDL 受容体ファミリー受容体 LR11 を発見し、その解析を行った¹²⁻¹⁴。

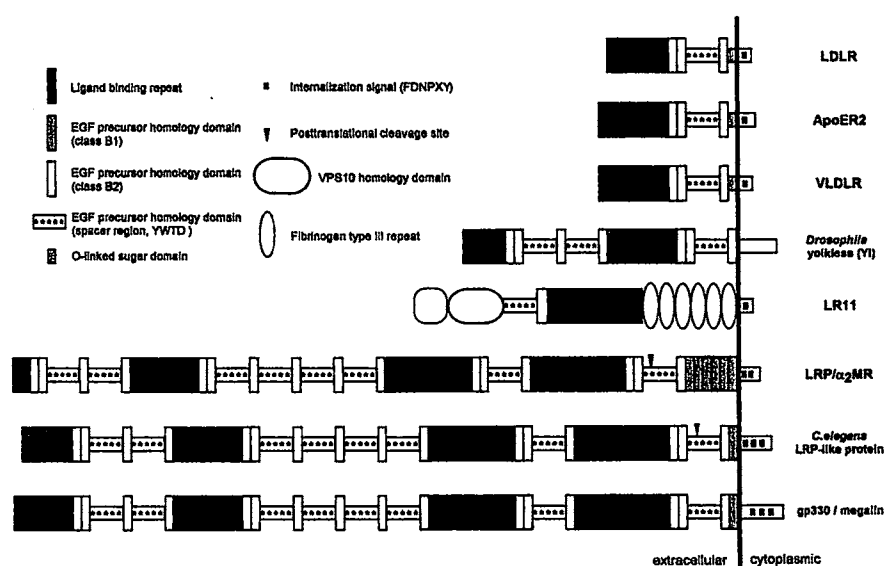


Fig. 1. The LDL receptor gene family. The diagram compares the functional domains in the LDL receptor, ApoE receptor2, VLDL receptor, *Drosophila* yolkless, LR11, LRP/ α 2-macroglobulin receptor(LRP/ α 2MR), *C. elegans* LRP-like protein and gp330/megalin. EGF:epidermal growth factor, VPS10:vacuolar protein sorting receptor 10.

まずウサギ肝臓 cDNA ライブラリーを、ウサギ LDL 受容体リガンド結合領域 cDNA プロブを用いてクロスハイブリダイゼーション法によりスクリーニングし、陽性クローンの塩基配列をジデオキシ法にて解読した。その結果、LDL 受容体と高い相同性を示す領域を有する全長約 7Kb の cDNA を得た¹²。さらに得られたウサギ cDNA をプロブとして、ヒト脳あるいはニワトリ脳 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、同様に LDL 受容体と高い相同性を示す領域を有する cDNA を得た^{13,14}。推定アミノ酸配列より、本蛋白質は巨大な細胞外領域、細胞膜貫通領域および 50 アミノ酸による細胞内領域により構成されていることが明らかになった (Fig. 2)。

human	<u>MATRSSRRESRLPFLFTLVALLPFGALCEVWTRLHGGGAPLPLQGRGLVVOGDPRELRLWARGDARGASRADEKPLRNRSAALOPEPIKIVYGOVSLND</u>	100
rabbit	<u>MATRSSRRESRLPFLFTLVALLPFGALCEVWTRLHGGGAPLPLQGRGLVVOGDPRELRLWARGDARGASRADEKPLRNRSAALOPEPIKIVYGOVSLND</u>	100
chicken	<u>MATRSSRRESRLPFLFTLVALLPFGALCEVWTRLHGGGAPLPLQGRGLVVOGDPRELRLWARGDARGASRADEKPLRNRSAALOPEPIKIVYGOVSLND</u>	7
human	<u>SHNQVHVHWAGEKSNVIVALARDLSLALRFRKESDVVYSDYDGRSKFKRISKLNFCGHNHSEAVLAQFYHSPADNKRYIFADAYAQLWITTFDFCNTLGGF</u>	200
rabbit	<u>SHNQVHVHWAGEKSNVIVALARDLSLALRFRKESDVVYSDYDGRSKFKRISKLNFCGHNHSEAVLAQFYHSPADNKRYIFADAYAQLWITTFDFCNTLGGF</u>	200
chicken	<u>SHNQVHVHWAGEKSNVIVALARDLSLALRFRKESDVVYSDYDGRSKFKRISKLNFCGHNHSEAVLAQFYHSPADNKRYIFADAYAQLWITTFDFCNTLGGF</u>	107
human	<u>SIPFRAADLLHSHKASNLGLGDRSHFNKQLWKSDDFGQWTIMIQEHVKSFSWIGDPYDKPNTIYIERHEPSGYSTVFRSTDFQSSRENOEVILEEVRDF</u>	300
rabbit	<u>SIPFRAADLLHSHKASNLGLGDRSHFNKQLWKSDDFGQWTIMIQEHVKSFSWIGDPYDKPNTIYIERHEPSGYSTVFRSTDFQSSRENOEVILEEVRDF</u>	300
chicken	<u>SIPFRAADLLHSHKASNLGLGDRSHFNKQLWKSDDFGQWTIMIQEHVKSFSWIGDPYDKPNTIYIERHEPSGYSTVFRSTDFQSSRENOEVILEEVRDF</u>	207
human	<u>QLRDKYMFATKVVHLLGSPDQSSVQLWVSGFRKPMRAAQFVTRHPINEYYIADASEDOVFCVSHSNRNTNLYISEAEGLFKFSLSLENVLYYSPGGAGSD</u>	400
rabbit	<u>QLRDKYMFATKVVHLLGSPDQSSVQLWVSGFRKPMRAAQFVTRHPINEYYIADASEDOVFCVSHSNRNTNLYISEAEGLFKFSLSLENVLYYSPGGAGSD</u>	400
chicken	<u>QLRDKYMFATKVVHLLGSPDQSSVQLWVSGFRKPMRAAQFVTRHPINEYYIADASEDOVFCVSHSNRNTNLYISEAEGLFKFSLSLENVLYYSPGGAGSD</u>	307
human	<u>TLVRYFANEFFADFRHVEGLGGVYIATLINGSMNEENMRSVITFDKGGTWEFLQAPAFYGEKINCELSGCGSLHLAQRSLQLLNLQRRRMPILSKESA</u>	500
rabbit	<u>TLVRYFANEFFADFRHVEGLGGVYIATLINGSMNEENMRSVITFDKGGTWEFLQAPAFYGEKINCELSGCGSLHLAQRSLQLLNLQRRRMPILSKESA</u>	500
chicken	<u>TLVRYFANEFFADFRHVEGLGGVYIATLINGSMNEENMRSVITFDKGGTWEFLQAPAFYGEKINCELSGCGSLHLAQRSLQLLNLQRRRMPILSKESA</u>	407
human	<u>PGLIATGSGVGNLASKTNVYISSAGARWREALPGPHYYTWDGHHGIIAIAAGMETNELKYSTNEGETWKAFFFSSEKPVFVYGLLTFEPEKSTVFTIF</u>	600
rabbit	<u>PGLIATGSGVGNLASKTNVYISSAGARWREALPGPHYYTWDGHHGIIAIAAGMETNELKYSTNEGETWKAFFFSSEKPVFVYGLLTFEPEKSTVFTIF</u>	600
chicken	<u>PGLIATGSGVGNLASKTNVYISSAGARWREALPGPHYYTWDGHHGIIAIAAGMETNELKYSTNEGETWKAFFFSSEKPVFVYGLLTFEPEKSTVFTIF</u>	507
human	<u>GSNKENVHSLIQLQVNATDALGVFCTENDYKLSWSPDSEGNELCGHKTVPKRRTPHATCFNGEDFDRPVVSNCSCTREDYSCDFGFAMSEDLISLVCV</u>	700
rabbit	<u>GSNKENVHSLIQLQVNATDALGVFCTENDYKLSWSPDSEGNELCGHKTVPKRRTPHATCFNGEDFDRPVVSNCSCTREDYSCDFGFAMSEDLISLVCV</u>	700
chicken	<u>GSNKENVHSLIQLQVNATDALGVFCTENDYKLSWSPDSEGNELCGHKTVPKRRTPHATCFNGEDFDRPVVSNCSCTREDYSCDFGFAMSEDLISLVCV</u>	607
human	<u>PDGFSGKSYSPVPCPVGSGTYRTRGGRKISGDTCSGGDVEARLEGGVLPCCPLAENEFILYARKSIHRYDLASGTEQLPITGLRAAVALDFDYEHN</u>	800
rabbit	<u>PDGFSGKSYSPVPCPVGSGTYRTRGGRKISGDTCSGGDVEARLEGGVLPCCPLAENEFILYARKSIHRYDLASGTEQLPITGLRAAVALDFDYEHN</u>	799
chicken	<u>PDGFSGKSYSPVPCPVGSGTYRTRGGRKISGDTCSGGDVEARLEGGVLPCCPLAENEFILYARKSIHRYDLASGTEQLPITGLRAAVALDFDYEHN</u>	707
human	<u>CLYWSDLALDVIQRLCLNGSTGQEVIIINSGLTVEALAFEPLSOLLYNVVDAGFKKIEVANPDGDFRLTVNNSVLDPRRALVLPVQEGIMFWTDWGDLPK</u>	900
rabbit	<u>CLYWSDLALDVIQRLCLNGSTGQEVIIINSGLTVEALAFEPLSOLLYNVVDAGFKKIEVANPDGDFRLTVNNSVLDPRRALVLPVQEGIMFWTDWGDLPK</u>	899
chicken	<u>CLYWSDLALDVIQRLCLNGSTGQEVIIINSGLTVEALAFEPLSOLLYNVVDAGFKKIEVANPDGDFRLTVNNSVLDPRRALVLPVQEGIMFWTDWGDLPK</u>	807
human	<u>GIYRSNDGSAAYHLLVSEEDVKNPINGSVDDQNIYWDAYILDCIERITPSSGOORSVILDLPHPYAIYAVFKNEIYWDWSOLSIFRASKYSGSOMEIYAG</u>	1000
rabbit	<u>GIYRSNDGSAAYHLLVSEEDVKNPINGSVDDQNIYWDAYILDCIERITPSSGOORSVILDLPHPYAIYAVFKNEIYWDWSOLSIFRASKYSGSOMEIYAG</u>	999
chicken	<u>GIYRSNDGSAAYHLLVSEEDVKNPINGSVDDQNIYWDAYILDCIERITPSSGOORSVILDLPHPYAIYAVFKNEIYWDWSOLSIFRASKYSGSOMEIYAG</u>	907
human	<u>LTGLNDMKTFFYKKNVTSNACVPRPSCSLCLPKANNSRCRCPVSSSVLPSSGDMCDCCPQVQLKNNTCVKEENTCLRNOYRCNGNCSINISWCCDF</u>	1100
rabbit	<u>LTGLNDMKTFFYKKNVTSNACVPRPSCSLCLPKANNSRCRCPVSSSVLPSSGDMCDCCPQVQLKNNTCVKEENTCLRNOYRCNGNCSINISWCCDF</u>	1099
chicken	<u>LTGLNDMKTFFYKKNVTSNACVPRPSCSLCLPKANNSRCRCPVSSSVLPSSGDMCDCCPQVQLKNNTCVKEENTCLRNOYRCNGNCSINISWCCDF</u>	1007
human	<u>NDCGDMSEKNCPTTCDLDTQFRCEGSGTCIPLSYKCDLEDDCGDSDSESHCEMHCQRSDSEYNCSSGMCIRSSWVCDGNDRCRWSDEANCTAIYHTC</u>	1199
rabbit	<u>NDCGDMSEKNCPTTCDLDTQFRCEGSGTCIPLSYKCDLEDDCGDSDSESHCEMHCQRSDSEYNCSSGMCIRSSWVCDGNDRCRWSDEANCTAIYHTC</u>	1198
chicken	<u>NDCGDMSEKNCPTTCDLDTQFRCEGSGTCIPLSYKCDLEDDCGDSDSESHCEMHCQRSDSEYNCSSGMCIRSSWVCDGNDRCRWSDEANCTAIYHTC</u>	1106
human	<u>EASNFCQNGHCIPORWACDGDADDCDQSDSEDEPANCEKCKNGRCPNCTIYPSKHCDDHDCSDGSDGQHCPLCTRFMDVFCNKRQOCLFHSWVCDG</u>	1298
rabbit	<u>EASNFCQNGHCIPORWACDGDADDCDQSDSEDEPANCEKCKNGRCPNCTIYPSKHCDDHDCSDGSDGQHCPLCTRFMDVFCNKRQOCLFHSWVCDG</u>	1297
chicken	<u>EASNFCQNGHCIPORWACDGDADDCDQSDSEDEPANCEKCKNGRCPNCTIYPSKHCDDHDCSDGSDGQHCPLCTRFMDVFCNKRQOCLFHSWVCDG</u>	1206
human	<u>LIQCRDGSDEDAFAFGCSDEPFHFVKCDEFGFCQNGVCISLIWKCDDGMDCCGSDYSEANENPTEAPNCSRYFOFRCDNGHCIPNRWCRDRENDCCGWS</u>	1398
rabbit	<u>LIQCRDGSDEDAFAFGCSDEPFHFVKCDEFGFCQNGVCISLIWKCDDGMDCCGSDYSEANENPTEAPNCSRYFOFRCDNGHCIPNRWCRDRENDCCGWS</u>	1397
chicken	<u>LIQCRDGSDEDAFAFGCSDEPFHFVKCDEFGFCQNGVCISLIWKCDDGMDCCGSDYSEANENPTEAPNCSRYFOFRCDNGHCIPNRWCRDRENDCCGWS</u>	1306
human	<u>DEKDCGSDHLPSTFCPSTCLPNYYRCSEGLVMDTVCDGYRDCADGSDSEACPLDANVTANSHPIQLERCDFEFECCHOPKICIPNWRCDGHQDCQ</u>	1498
rabbit	<u>DEKDCGSDHLPSTFCPSTCLPNYYRCSEGLVMDTVCDGYRDCADGSDSEACPLDANVTANSHPIQLERCDFEFECCHOPKICIPNWRCDGHQDCQ</u>	1497
chicken	<u>DEKDCGSDHLPSTFCPSTCLPNYYRCSEGLVMDTVCDGYRDCADGSDSEACPLDANVTANSHPIQLERCDFEFECCHOPKICIPNWRCDGHQDCQ</u>	1406
human	<u>DGDEANCPHTSILTCMSHEDCEGDEACIVLSERCDFGLDCSDSEDEKACSDLLTVYKVNLOWTADFSGNTLFWMRPKKMPASCVYVNVYRVVGS</u>	1598
rabbit	<u>DGDEANCPHTSILTCMSHEDCEGDEACIVLSERCDFGLDCSDSEDEKACSDLLTVYKVNLOWTADFSGNTLFWMRPKKMPASCVYVNVYRVVGS</u>	1597
chicken	<u>DGDEANCPHTSILTCMSHEDCEGDEACIVLSERCDFGLDCSDSEDEKACSDLLTVYKVNLOWTADFSGNTLFWMRPKKMPASCVYVNVYRVVGS</u>	1505
human	<u>IWKLTETHSNKNTVILKVLKPDITYQVQVQVCLSKVNTNDFVTLRTPPEGLPDAFNQLQSLDREAGVIVGHMPPHTHGLIREYVEYSRSGSKM</u>	1698
rabbit	<u>IWKLTETHSNKNTVILKVLKPDITYQVQVQVCLSKVNTNDFVTLRTPPEGLPDAFNQLQSLDREAGVIVGHMPPHTHGLIREYVEYSRSGSKM</u>	1697
chicken	<u>IWKLTETHSNKNTVILKVLKPDITYQVQVQVCLSKVNTNDFVTLRTPPEGLPDAFNQLQSLDREAGVIVGHMPPHTHGLIREYVEYSRSGSKM</u>	1592
human	<u>ASGRAASNFETIKNLLVNTLYTVRAAVTSRIGNWSDSKSIITTKGRVLPPELHLIDHSYENMLSFLLTMSDILKRVNGVYVNLFWAFDTHKQKRLNF</u>	1798
rabbit	<u>ASGRAASNFETIKNLLVNTLYTVRAAVTSRIGNWSDSKSIITTKGRVLPPELHLIDHSYENMLSFLLTMSDILKRVNGVYVNLFWAFDTHKQKRLNF</u>	1797
chicken	<u>ASGRAASNFETIKNLLVNTLYTVRAAVTSRIGNWSDSKSIITTKGRVLPPELHLIDHSYENMLSFLLTMSDILKRVNGVYVNLFWAFDTHKQKRLNF</u>	1592
human	<u>RGSLSLHKVGNLTAFTSVEISAWAKTDLGDSPLAFEHVITRGRVPPAPSLKAKAINQTAVECTWTGPRNVVYGI FYATSFIDLRYNFKLTSLEHNKTVI</u>	1898
rabbit	<u>RGSLSLHKVGNLTAFTSVEISAWAKTDLGDSPLAFEHVITRGRVPPAPSLKAKAINQTAVECTWTGPRNVVYGI FYATSFIDLRYNFKLTSLEHNKTVI</u>	1897
chicken	<u>RGSLSLHKVGNLTAFTSVEISAWAKTDLGDSPLAFEHVITRGRVPPAPSLKAKAINQTAVECTWTGPRNVVYGI FYATSFIDLRYNFKLTSLEHNKTVI</u>	1592
human	<u>VKDEQYLFVLRVVVYQGGSSDYVVKMIPDSRILPPRHLLVHTGKTSVVIKVESPYDSDPDDILYATAVKDLIRKTRDSYKVKSRNSTVEYITLTKLEP</u>	1998
rabbit	<u>VKDEQYLFVLRVVVYQGGSSDYVVKMIPDSRILPPRHLLVHTGKTSVVIKVESPYDSDPDDILYATAVKDLIRKTRDSYKVKSRNSTVEYITLTKLEP</u>	1997
chicken	<u>VKDEQYLFVLRVVVYQGGSSDYVVKMIPDSRILPPRHLLVHTGKTSVVIKVESPYDSDPDDILYATAVKDLIRKTRDSYKVKSRNSTVEYITLTKLEP</u>	1592
human	<u>GGKYHLVQLGNMSKDSKITTVLSAPDALKITENDHVLFWKSLALKRHNFNESRGYIHNFDMSAMNITAYLGNNTDNFKISNLMGHNYTFTVQ</u>	2098
rabbit	<u>GGKYHLVQLGNMSKDSKITTVLSAPDALKITENDHVLFWKSLALKRHNFNESRGYIHNFDMSAMNITAYLGNNTDNFKISNLMGHNYTFTVQ</u>	2097
chicken	<u>GGKYHLVQLGNMSKDSKITTVLSAPDALKITENDHVLFWKSLALKRHNFNESRGYIHNFDMSAMNITAYLGNNTDNFKISNLMGHNYTFTVQ</u>	1592
human	<u>ARCLFENICGEPALLLYDELGSGFDASAOAARSTD</u>	2198
rabbit	<u>ARCLFENICGEPALLLYDELGSGFDASAOAARSTD</u>	2197
chicken	<u>ARCLFENICGEPALLLYDELGSGFDASAOAARSTD</u>	1592
human	<u>APMITGSDVPMVIA</u>	2214
rabbit	<u>APMITGSDVPMVIA</u>	2213
chicken	<u>APMITGSDVPMVIA</u>	1592

Fig. 2. Comparison of amino acid sequences of the human, rabbit, and chicken LR11. Amino acids are numbered from *N*-terminus of human and rabbit precursor LR11s and from first identified amino acid of chicken LR11, respectively. The amino acid residue numbers are shown on the *right*. Gaps (-) have been introduced to optimize alignment. Identical residues in three proteins are *boxed*. Potential *N*-linked glycosylation sites are marked by *triangles* and F/YWXD tetrapeptide motifs by *asterisks*. Putative internalization sequence is indicated by a *heavy underline*. The RGD tripeptide is *double underlined*. The signal sequence and the presumptive transmembrane segment are *shaded*.

その細胞外領域には、本蛋白質に特異的なアミノ酸配列を有する領域に加えて、LDL 受容体ファミリー受容体にみられるリガンド結合領域、EGF 前駆体相同領域を有していた。さらに本蛋白質は、神経細胞接着分子及び酵母細胞内蛋白質輸送受容体 VPS10 と類似したアミノ酸配列も有していた。また、細胞内領域にはインターナリゼーションシグナル類似配列が認められた。本蛋白質は細胞膜貫通領域を含めて 7 つの特徴的な領域より構成されていた。本蛋白質が LDL 受容体リガンド結合相同領域に 11 回の繰り返し配列を有することから、これを LR11 と命名した (Fig. 3)。同定した 3 種の動物の LR11 アミノ酸配列は高く保存されていた¹²⁻¹⁴⁾。

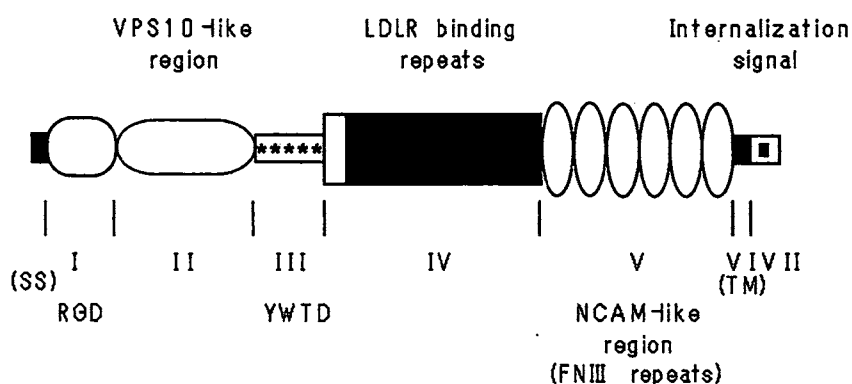


Fig. 3. Schematic diagram of the proposed multidomain structure of the LR11 protein. Seven domains are defined, characterized by: domain I, no particular similarity to other proteins; domain II, homology to a yeast receptor for vacuolar protein sorting, VPS10; domain III, five repeats with F/YWXD consensus sequences found in the EGF-precursor; domain IV, 11 tandemly arranged complement-type ligand binding repeats highly homologous to those constituting the ligand binding domain of the LDLR; domain V, 6 copies of FNIII repeats; domain VI, a putative membrane spanning region; and domain VII, the cytoplasmic domain. The signal sequence (SS) and the transmembrane domain (TM) are indicated by *black boxes*.

LR11 mRNA の組織分布をノーザンブロッティングにより検討したところ、主に脳に強く発現していた¹²⁻¹⁴⁾。Fig. 4 にヒト組織における LR11 mRNA の発現分布を示した。

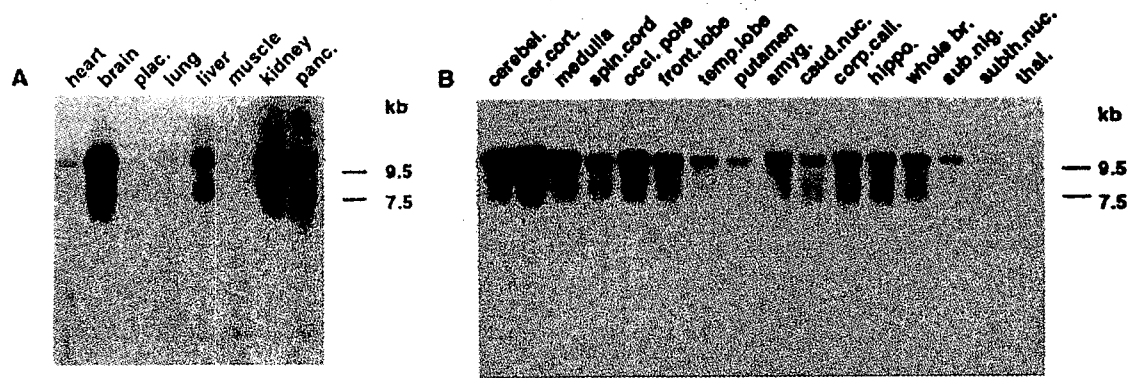


Fig. 4. Northern blot analysis of LR11 expression in human tissues. Poly(A)⁺ RNA of different human tissues (A) and brain sections (B) (2 μ g/lane) were subjected to Northern analysis with HB201 and HB104. *Plac.* indicates placenta; *panc.*, pancreas; *cerebel.*, cerebellum; *cer. cort.*, cerebral cortex; *spin.*, spinal; *occi.*, occipital; *front.*, frontal; *temp.*, temporal; *amyg.*, amygdala; *caud. nuc.*, caudate nucleus; *corp. call.*, corpus callosum; *hippo.*, hippocampus; *br.*, brain; *sub. nig.*, substantia nigra; *subth. nuc.*, subthalamic nucleus; and *thal.*, thalamus.

また、LR11 蛋白質の発現をイムノブロッティングにより検討したところ、ウサギ脳の膜画分中に約 250kDa の 1 本のシグナルとして検出されたことから、LR11 は組織において約 250kDa の蛋白質として発現していることが示唆された (Fig. 5)。

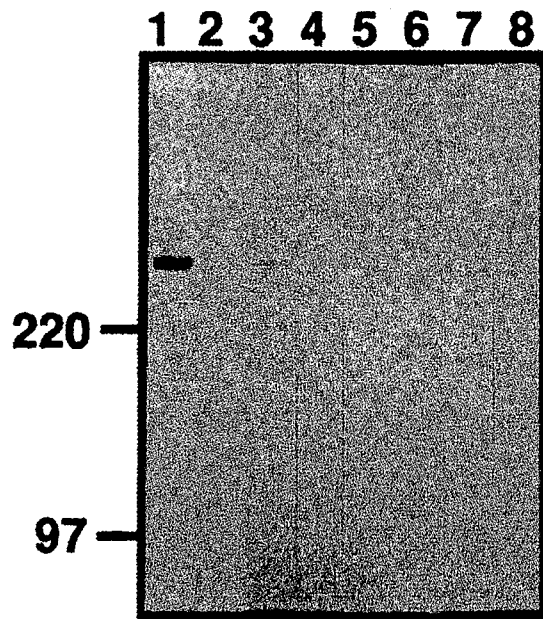


Fig. 5. Immunoblotting analysis of LR11. Membrane extracts of brain (40 μ g; lanes 1 and 5) and heart (40 μ g; lanes 2 and 6) from adult rabbits, pBKCMLR11-transfected CHO cells (100 μ g; lanes 3 and 7), and pBKCMV-transfected CHO cells (100 μ g; lanes 4 and 8) were subjected to 5% SDS-PAGE under reducing conditions and processed for immunoblotting with the IgG directed against synthetic peptide of rabbit LR11 (lanes 1-4) or a control antibody (lanes 5-8) as described under "Experimental Procedures." The positions of migration of molecular weight standards (kDa) are indicated on the left.

また、LR11 はリガンドブロッキングにより、LDL 受容体ファミリー受容体の多くがリガンドとするアポリポ蛋白質 E (アポE)-rich リポ蛋白質である β -VLDL と、*in vitro* において結合することが明らかになった (Fig. 6)。

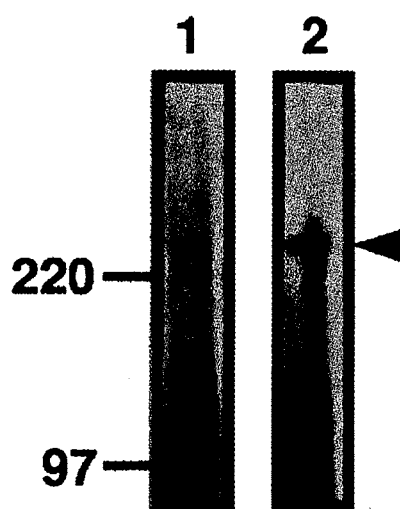


Fig. 6. Ligand blotting of LR11 in transfected cells. Membrane extracts (200 μ g of protein each) from pBKCMLR11-transfected CHO cells (lane 2) and control-transfected cells (lane 1) were subjected to ligand blotting with 125 I - β -VLDL (10 μ g/ml; specific activity, 350 cpm/ μ g). Autoradiography was for 24 h.

LR11 が脳において強く発現していたことから、ウサギ脳における発現の分布をイムノブロッティングにより検討したところ、大脳において最も強く発現していた (Fig. 7A)。

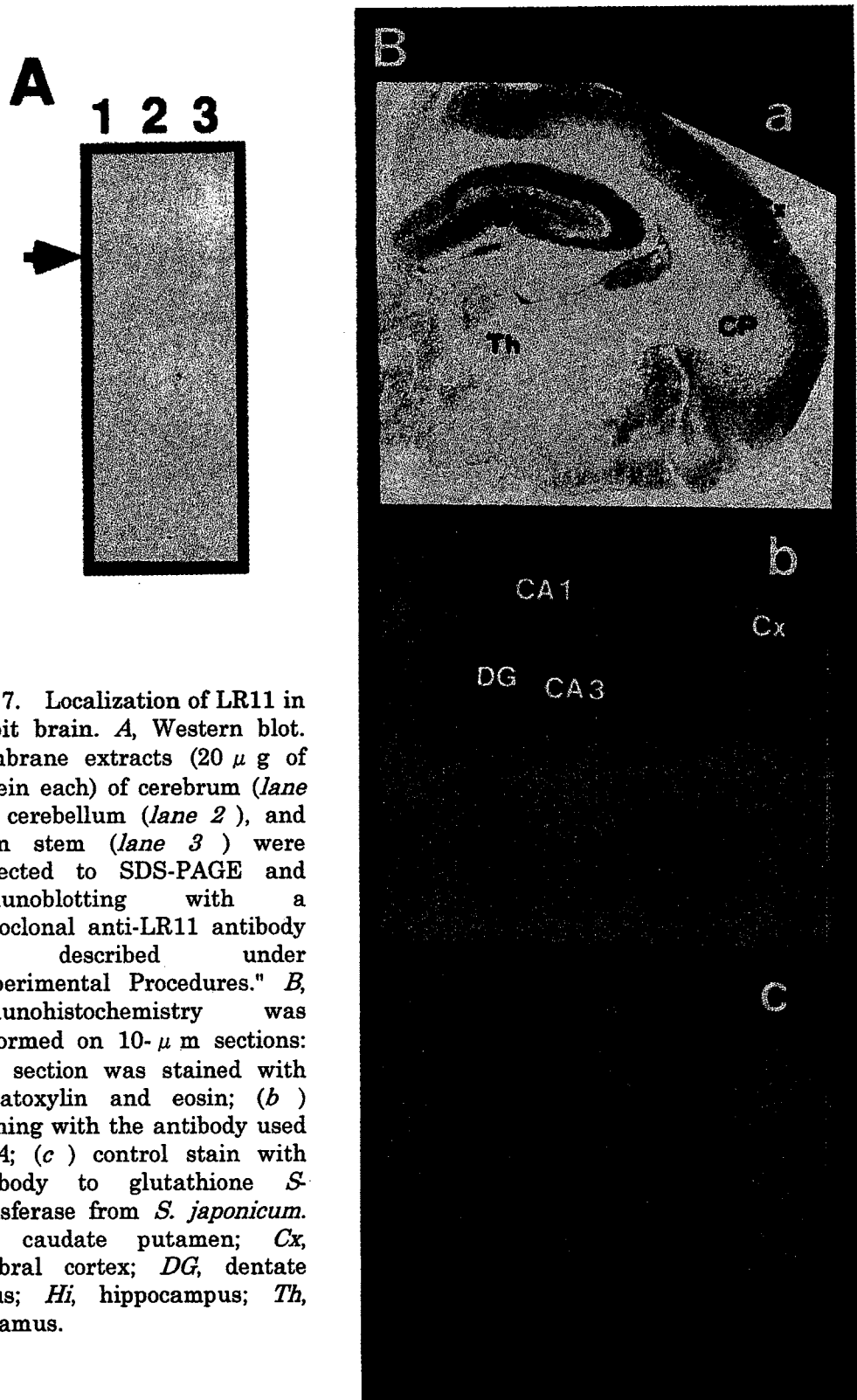


Fig. 7. Localization of LR11 in rabbit brain. A, Western blot. Membrane extracts ($20 \mu\text{g}$ of protein each) of cerebrum (lane 1), cerebellum (lane 2), and brain stem (lane 3) were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with a monoclonal anti-LR11 antibody as described under "Experimental Procedures." B, immunohistochemistry was performed on $10\text{-}\mu\text{m}$ sections: (a) section was stained with hematoxylin and eosin; (b) staining with the antibody used in A; (c) control stain with antibody to glutathione S-transferase from *S. japonicum*. CP, caudate putamen; Cx, cerebral cortex; DG, dentate gyrus; Hi, hippocampus; Th, thalamus.

また、ヒト脳組織における LR11 mRNA の発現分布をノーザンブロッティングにより解析したところ、大脳皮質および小脳に強く発現していた (Fig. 4B)。さらにウサギ大脳における発現の局在を免疫組織染色により検討したところ、主に海馬及び歯状回に局在し、さらに大脳皮質にも発現が認められた (Fig. 7B)。LR11 mRNA の脳における発現の局在を、*in situ* ハイブリダイゼーションによりさらに詳細に検討したところ、主に神経細胞内に局在し、大脳皮質、海馬錐体細胞、歯状回顆粒細胞、小脳においてはプルキンエ細胞、顆粒細胞に強い発現が認められ、LR11 は脳において代謝レベルの高い細胞に発現していた (Fig. 8)¹²⁻¹⁵⁾。

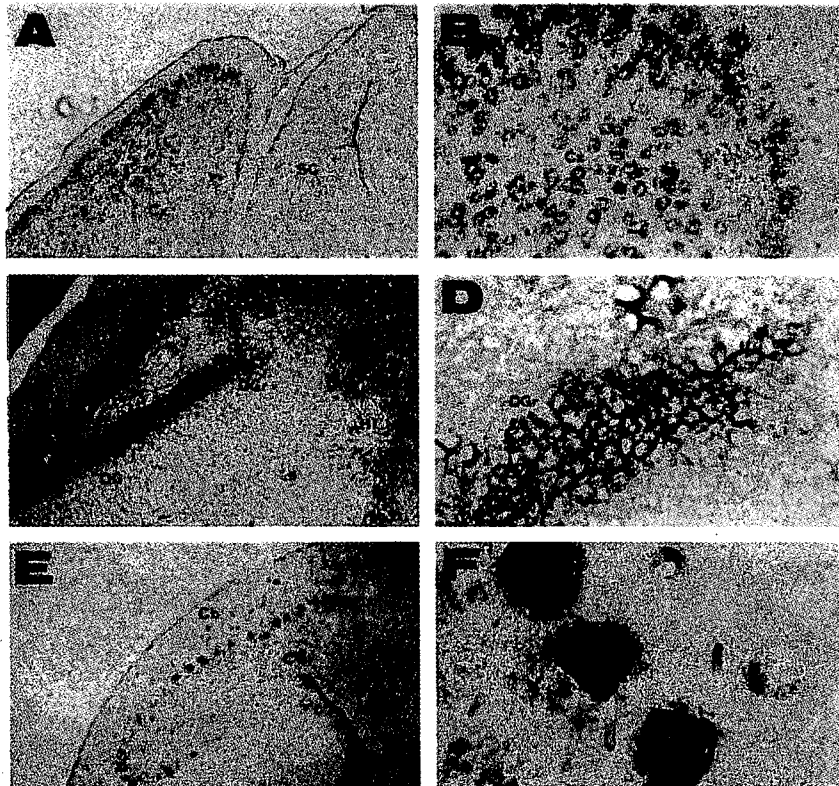


Fig. 8. Localization of the LR11 transcripts in murine brain by *in situ* hybridization. Cryostat sections ($5\ \mu\text{m}$) of adult (12 weeks old) mouse brains were subjected to *in situ* hybridization with digoxigenin-labeled cRNA probes corresponding to LR11 cDNA. The sections represent cerebral cortex (A and B), hippocampal formation (C and D), and cerebellar cortex (E and F). Cx, cerebral cortex; DG, dentate gyrus; Hi, hippocampus; Cb, cerebellar cortex; Pj, Purkinje cell layer; Mol, cerebellar molecular layer; CGr, cerebellar granular layer; DGr, dentate gyrus granular layer; Py, hippocampal pyramidal layer; SC, superior colliculus. Magnifications: A, C, E, $\times 30$; B, D, $\times 150$; F, $\times 300$. (Kanaki *et al.* 1998)

LR11 の発現調節を検討するため、遺伝的に LDL 受容体機能を欠損し高コレステロール血症を呈する Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) ウサギ肝臓における mRNA 発現量を検討したが、正常ウサギとほとんど変わらなかった (データは記載せず)。LDL 受容体や VLDL 受容体の発現量は、エストロゲンによって増大することが報告されている。LR11 mRNA の発現量に対するエストロゲンの効果を、ニワトリ肝細胞株 LMH 細胞を用いて RT-PCR 法により検討したが、LR11 発現量はほとんど影響を受けなかった (Fig. 9)¹²⁻¹⁴。

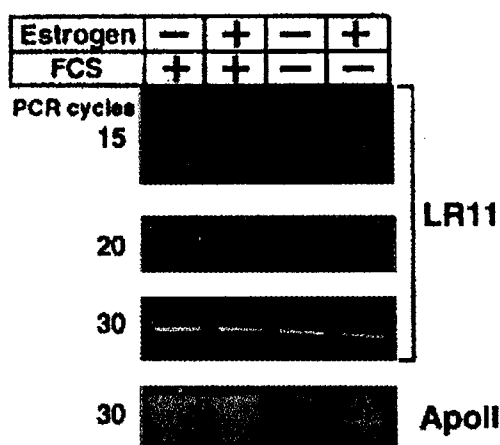


Fig. 9. Effect of estrogen on LR11 expression in LMH/2A cells. LMH/2A cells were cultured in serum-free medium in the absence (-) or presence (+) of moxestrol for 24 hours before harvest and preparation of poly(A)⁺ RNA as described in "Experimental Procedures." RT-PCRs for the indicated number of reaction cycles were performed for LR11 and apo-VLDL- II (*Apo II*), respectively.

マウス脳の発達過程における LR11 mRNA の発現様式をノーザンブロットイング及び RT-PCR 法により検討したところ、LR11 はユニークな発現様式を示していた (Fig. 10)¹⁵。すなわち、マウス脳において LR11 mRNA は生後 1-2 週間に強く発現し、4 週間には一旦発現が減少し、生後 8-12 週に再び発現するという様式を示した。このような LR11 の発現様式は、同時に解析した LDL 受容体や VLDL 受容体の mRNA 発現様式とは異なっていた。また、マウス胎児における LR11 mRNA は、早期より発現していることが明らかになっており、LR11 mRNA はマウス胎児期及び新生児早期のような、中枢神経系の発達する時期に、強く発現することが示唆された。

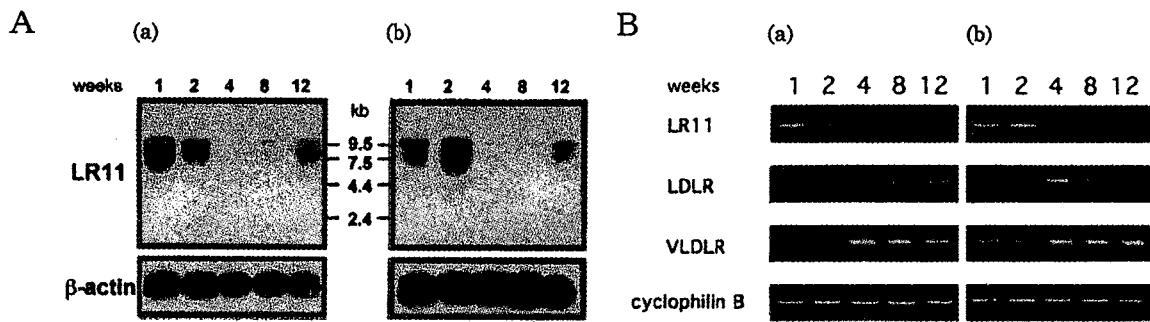


Fig. 10. The expression of LR11, LDLR, and VLDLR transcripts during murine CNS postnatal development. *A*, Poly(A)⁺ RNA isolated from mouse cerebrum (*a*) and cerebellum (*b*) (1, 2, 4, 8, and 12 weeks old, as indicated) were subjected to Northern analysis with LR11-specific probe. Control hybridization with a mouse β -actin probe is shown below. *B*, Single-stranded cDNA was synthesized from poly(A)⁺ RNA isolated from mouse cerebrum (*a*) and cerebellum (*b*) (1, 2, 4, 8, and 12 weeks old, as indicated). The cDNA was subjected to PCR with primers specific for mouse LR11, LDLR, VLDLR, or cyclophilin B, generating fragments of 265 bp (LR11), 222 bp (LDLR), 225 bp (VLDLR), and 375 bp (cyclophilin B). The PCR products were resolved on a 2.0% agarose gel. (Kanaki *et al.* 1998)

LDL 受容体遺伝子異常により、著明な動脈硬化症を伴う遺伝性疾患、家族性高コレステロール血症 (FH) が引き起こされることが知られている¹⁶⁾。さらに、動脈硬化巣におけるリポ蛋白質受容体の発現調節や受容体欠損細胞の遊走能亢進などの新知見から、動脈硬化進展過程における LDL 受容体ファミリー受容体の生理的役割が注目されている¹⁷⁾。動脈硬化巣における LDL 受容体の発現は、他のファミリー受容体と比較してそれほど強くはない (Table 1)。

Table 1. 血管壁における LDL 受容体遺伝子ファミリーの発現とその調節因子。

	正常血管	動脈硬化巣		発現調節因子
		早期	進展後	
LDL受容体	-	-	-	マクロファージ分化↑ TGF- β ↑
VLDL受容体	+	++	+	細胞内コレステロール↓ 顆粒球マクロファージ コロニー刺激因子↑
LRP/ α_2 MR	(内皮細胞) ++ (平滑筋細胞)	(内皮細胞, マクロファージ, 平滑筋細胞) ++ (マクロファージ, 平滑筋細胞)	++	マクロファージ分化↑ マクロファージコロニー 刺激因子↑ リポ多糖類↓
LR11	-	++	++ (平滑筋細胞)	

(Ylae-Herttuala *et al.* 1996)

一方、LDL 受容体関連蛋白質 (LRP) や VLDL 受容体は、動脈硬化巣でマクロファージや平滑筋細胞に発現し、これらの細胞の泡沫化に関与する可能性がある¹⁷⁾。これらのファミリー受容体が正常血管においても発現しているのに対して、LR11 は正常血管ではほとんど発現が認められず、動脈硬化巣内膜平滑筋細胞に発現が局在していた¹⁸⁾。動脈硬化巣形成過程において、平滑筋細胞の増殖・遊走は重要である。LR11 の動脈硬化巣内膜平滑筋細胞における特異的発現は、この平滑筋細胞の増殖、分化あるいは遊走に関与する可能性を示唆するものと考えられた。

今回同定した全く新しい LDL 受容体関連遺伝子 LR11 は、LDL 受容体遺伝子ファミリーの共通基本構造に加え、神経細胞接着分子や酵母細胞内蛋白質輸送受容体と類似の構造を有するモザイク構造を示した。LR11 はその発現量の多い脳において、特に代謝レベルの高い細胞に発現していた。また、LR11 は血中脂質レベルやエストロゲンにより、その発現量が変わらなかったことから、LDL 受容体等とは異なる発現調節を受けている可能性が示唆された。LR11 の生体におけるリガンド特性は、今のところ明らかではないが、 β -VLDL が結合したことから、他のファミリー受容体と同様に、多様なリガンドと結合する多機能受容体である可能性が示唆された。特に、LR11 の神経細胞や動脈硬化巣内膜平滑筋細胞における特異的発現様式は、その構造的特徴から推測された細胞間の接着、細胞の増殖・分化・遊走あるいは神経軸索の伸長への関与を示唆していた^{12-15, 18, 19)}。LR11 はこれまでに明らかにされているファミリー受容体の生体機能に加え、新たな生物学的意義を有している可能性が示唆された。

引用文献

- (1) Schonbaum CP, Lee S, and Mahowald AP: The *Drosophila* *yolkless* gene encodes a vitellogenin receptor belonging to the low density lipoprotein receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:1485-1489, 1995
- (2) Yochem J, and Greenwald I: A gene for a low density lipoprotein receptor-related protein in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:4572-4576, 1993
- (3) Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, and Stanley KK: Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J*, 7:4119-4127, 1988

- (4) Saito A, Pietromonaco S, Loo AKC, and Farquhar MG: Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:9725-9729, 1994
- (5) 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 USA*, 89:9252-9256, 1992
- (6) Bujo H, Hermann M, Kaderli MO, Jacobsen L, Sugawara S, Nimpf J, Yamamoto T, and Schneider WJ: Chicken oocyte growth is mediated by an eight ligand binding repeat member of the LDLR family. *EMBO J*, 13:5165-5175, 1994
- (7) Novak S, Hiesberger T, Schneider WJ, and Nimpf J: A new LDL Receptor homologue with 8 ligand binding repeats in brain of chicken and mouse. *J Biol Chem*, 271:11732-11736, 1996
- (8) Kim DH, Iijima H, Goto K, Sakai J, Ishii H, Kim HJ, 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
- (9) Brandes C, Novak S, Stockinger W, Herz J, Schneider WJ, and Nimpf J: Avian and murine LR8B and human apolipoprotein E receptor 2: differentially spliced products from corresponding genes. *Genomics*, 42:185-191, 1997
- (10) Bujo H, Yamamoto T, Hayashi K, Hermann M, Nimpf J, and Schneider WJ: Mutant oocytic low density lipoprotein receptor gene family member causes atherosclerosis and female sterility. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:9905-9909, 1995
- (11) Bujo H, and Yamamoto T: VLDL receptor in health and disease: interview with a receptor in avian oocytes and mammalian muscle and fat cells. *J Atheroscler Thromb*, 2:71-75, 1996
- (12) Yamazaki H, Bujo H, Kusunoki J, Seimiya K, Kanaki T, Morisaki N, Schneider WJ, and Saito Y: Elements of neural adhesion molecules and a yeast vacuolar protein sorting receptor are present in a novel mammalian low density lipoprotein receptor family member. *J Biol Chem*, 271:24761-24768, 1996
- (13) Mörwald S, Yamazaki H, Bujo H, Kusunoki J, Kanaki T, Seimiya K, Morisaki N, Nimpf J, Schneider WJ, and Saito Y: A novel mosaic protein containing LDL receptor elements is highly conserved in humans and chickens. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17:996-1002, 1997
- (14) Yamazaki H, Bujo H, and Saito Y: A novel member of the LDL receptor gene family with eleven binding repeats is structurally related to neural adhesion molecules and a yeast vacuolar protein sorting receptor. *J Atheroscler Thromb*, 4:20-26, 1997
- (15) Kanaki T, Bujo H, Hirayama S, Tanaka K, Yamazaki H, Seimiya K, Morisaki N, Schneider WJ, and Saito Y: Developmental regulation of LR11 expression in murine brain. *DNA Cell Biol*, 17:647-657, 1998
- (16) Brown MS, and Goldstein JL: A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 232:34-47, 1986

- (17) Ylae-Herttuala S: Expression of lipoprotein receptors and related molecules in atherosclerotic lesions. *Curr Opin Lipidol*, 7:292-297, 1996
- (18) Kanaki T, Bujo H, Hirayama S, Ishii I, Morisaki N, Schneider WJ, and Saito Y: Expression of LR11, a mosaic LDL receptor family member, is markedly increased in atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19:2687-2695, 1999
- (19) Hirayama S, Bujo H, Yamazaki H, Kanaki T, Takahashi K, Kobayashi J, Schneider WJ, and Saito Y: Differential expression of LR11 during proliferation and differentiation of cultured neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 275:365-373, 2000

学位論文審査結果の要旨

本論文は、血清脂質の代謝に関わる低比重リポタンパク質 (LDL) 受容体遺伝子ファミリーの生理学的意義を明らかにするために、ウサギおよびヒトにおいて新たなファミリー受容体の同定を試みた成果をまとめたものである。本研究において同ファミリーに属する受容体 LR11 が世界で初めて発見された。LR11 は LDL 受容体ファミリーに共通する基本構造に加え、神経細胞接着分子のフィブロネクチン Type III 型繰り返し構造や酵母細胞内蛋白質輸送受容体 VPS10 類似の配列を有し、7 つの特徴的な領域により構成されるモザイク蛋白質であることが判明した。しかもウサギで同定された LR11 のアミノ酸配列がヒトにおいても見出されるなど、種を超えて保存されていたことから、生体の維持に必須な受容体の一つであることが示唆された。また、LR11 は *in vitro* において LDL 受容体ファミリーの多くがリガンドとする β -VLDL と結合したことから、他のファミリー受容体と同様、多様なリガンドと結合する多機能受容体である可能性が示唆された。LR11 の mRNA は LDL 受容体と同様にリポ蛋白質代謝の盛んな脳、肝臓、副腎に多く発現していた。最も強く発現していた脳では、海馬、大脳皮質、小脳に分布し、その発現は神経細胞内に局在していた。さらに LR11 の発現が動脈硬化巣内膜平滑筋細胞にも観察された。一方、LR11 mRNA の発現量は、LDL 受容体とは異なってコレステロール、エストロゲン、血清添加により影響を受けなかったため、LDL 受容体とは異なる機能をも併せ持つことが示唆された。

以上の結果から、LR11 は新たなリポ蛋白質代謝を担う膜受容体である可能性に加え、その特異的組織発現と神経細胞接着分子や酵母細胞内蛋白質輸送受容体との類似性から、細胞間の接着や細胞の増殖・分化・遊走あるいは神経軸索の伸長などに関与する可能性が示唆された。

以上に述べた研究は、血清脂質代謝に関わる LDL 受容体の新しいファミリー遺伝子 LR11 の発見とともに、遺伝子解析から LR11 の機能のスペクトルが LDL 受容体のそれと一致する他に、神経系の分化に関わるなど全く新しい機能を担っている可能性を示したものである。従って本論文が生体の維持に必須な機能を担う LR11 の同定と機能解明に資した点を評価し、博士(薬学)論文に値するものと判定する。