

機関番号：15401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20390012

研究課題名 (和文)

酸化 LDL 受容体蛋白質 LOX-1 のリガンド認識機構の精密解明と診断技術への応用

研究課題名 (英文)

Exploring the details in LOX-1 ligand recognition mode and its application to diagnosis

研究代表者

楯 真一 (Tate, Shin-ichi)

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：20216998

研究成果の概要 (和文)：

酸化 LDL 受容体蛋白質 LOX-1 の基質認識機構を分子レベル・細胞レベルで解析した。LOX-1 はホモ二量体で 1 つの受容体を構成するが、受容体 1 分子では十分な酸化 LDL 認識能をもたず酸化 LDL 認識には多量体形成が必要であることを明らかにした。細胞上では、膜貫通部にある cysteine 残基がパルミトイル化されることでリポドラフト上に局在し集積構造を形成することを明らかにした。細胞毒性の低い鉄を使った MRI 造影技術も開発した。酸化 LDL よりも強く LOX-1 に結合するリポソームの調製も本研究で可能とし、このリポソームを利用する血管上の LOX-1 造影法の基盤技術を確立した。

研究成果の概要 (英文)：

In this project, we found that LOX-1 clustering is essential to exert its specific binding to oxidized LDL (OxLDL). We also revealed that each LOX-1 molecule in the cluster is required to maintain the proper homo-dimeric form, otherwise the clustered LOX-1 do not bind to OxLDL. On the cell surface, LOX-1 clustering was found to be mediated by its preferential localization on the lipid-raft, which localization is regulated by the palmitoylation to two cysteine residues in the trans-membrane region. We also devised non-toxic MRI imaging reagent which will be applied to see the location of LOX-1 in vein, which should be the marker for the early-stage atherosclerosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：構造生物学

## 1. 研究開始当初の背景

酸化 LDL は、動脈硬化発症の原因物質である。酸化 LDL は血管内皮細胞の機能不全 (dysfunction) を誘導し、その結果、LDL の血管壁中への流入を促進する。抗酸化物質の少ない血管壁中の LDL は容易に酸化される。マクロファージは、血管壁中で生成した酸化

LDL を取り込み泡沫化細胞へと変化する。泡沫化細胞は血管壁中で 1 カ所に集合する性質をもち、その結果プラークを形成する。この一連の過程を経て動脈硬化発症が確立する。

LOX-1 は血管内皮細胞上にある主要な酸化 LDL 受容体であり、酸化 LDL と結合し内皮細胞中に酸化 LDL を取りこむ過程に関与

している。取り込まれた酸化 LDL は、内皮細胞内で分解され代謝される。この際生成する酸化 LDL 由来の代謝産物が、血管内皮細胞に機能不全を誘導する。また、機能不全状態の血管内皮細胞は、細胞上への LOX-1 の発現誘導を行う。このため、LOX-1 を大量に発現している血管内皮細胞は、動脈硬化発症の初期過程状態にあることを示すと考えられる。

LOX-1 の酸化 LDL 結合ドメインの立体構造は、申請者が世界に先駆けて発表している。申請者は、この立体構造に基づいて LOX-1 の基質認識機構モデルを提唱していたが研究開始時点では、その実験的裏付けは乏しかった。このため、どのようにして LOX-1 が酸化 LDL に対して高い親和性を発揮するか基質認識機構に詳細については多くが不明の状態であった。申請者ら、*in vitro* の実験に加えて細胞上での様々な実験を組み合わせ、まずは LOX-1 の酸化 LDL 認識機構の精密解析を目標として研究を始めた。また、基質認識機構の詳細が解明できれば人工的な酸化 LDL 粒子をデザインして MRI 造影剤とすることで、動脈硬化発症初期過程にある血管部を画像化する早期診断技術につながると考え、本研究中では MRI 造影剤開発に向けた基盤技術開発も進めた。

## 2. 研究の目的

LOX-1 の酸化 LDL 認識機構の詳細を解明するために、主に細胞膜上での LOX-1 の存在状態の重要性に着目して研究を進めた。分子レベルでの認識機構を明らかにするために、表面プラズモン共鳴法、NMR、結晶構造解析を用いて研究を進めた。一方で、細胞上での LOX-1 の存在状態とその状態を維持するための機構を明らかにするための細胞生物学的研究も平行して進めた。

酸化 LDL よりも強く LOX-1 に結合する人工粒子を作製し、LOX-1 を大量に発現する部位を選択的に MRI イメージとして可視化するための造影分子の作製を目指して研究もすすめた。この目的のために、従来 MRI 法によく使われる  $Gd^{3+}$  イオンを用いた方法ではなく、細胞毒性の少ない鉄イオンを含むフェリチンタンパク質を用いた高感度・高度定量的な MRI 計測法を開発した。

LOX-1 基質認識機構の分子レベルでの解明から、その細胞生物学的な裏付けに関する研究、さらに分子認識機構の詳細な情報に基づいた動脈硬化発症初期の病巣の MRI 可視化までの広範囲な研究を進めた。

## 3. 研究の方法

(1) LOX-1 の集積構造の酸化 LDL 認識への必要性の解明

表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いて、特

異的な酸化 LDL 認識に必要な LOX-1 の存在状態を明らかにするために、以下の実験を進めた。

- ① Apo-B100 抗体を介して酸化 LDL をセンサー表面に固定化して、LOX-1 基質認識ドメイン単量体、およびホモ二量体の結合能を観測した。
- ② LOX-1 の基質結合ドメインをビオチン化しストレプトアビジンを用いてセンサー表面に集積構造を模した構造を実現した。このセンサーを用いて、酸化 LDL の結合能を解析した。
- ③ 自己組織化膜 (self-assembly monolayer membrane: SAM) 上での LOX-1 細胞外ドメイン全長を用いて、酸化 LDL との相互作用解析を行った。上記ではストレプトアビジンを介して細胞表面での集積構造を模したセンサーで結合強度解析を行ったが、SAM を用いることで形態的にはより細胞表層に近い状態での相互作用解析を実現した。
- ④ LOX-1 のホモ二量体構造の安定性と酸化 LDL への結合活性の関係を、ホモ 2 量体結合界面変異体 (W150A) を用いて解析した。

(2) LOX-1 ホモ二量体界面構造変異体の立体構造解析

上記の SPR を用いた解析から LOX-1 の界面部変異が LOX-1 二量体形成能を大きく低下させ、そのことが基質認識能の低下につながっていることを見いだした。結晶構造解析から、W150A 変異がどのようにして二量体構造形成を阻害しているかを解明した。

(3) LOX-1 に対する高い親和性をもつリポソームの調製

DOPG を用いて単層膜リポソーム (single uni-lamellar vesicle: SUV) を調製して表面に強い負電荷を帯びたリポソームの酸化 LDL に対する相対的な結合能を解析した。MRI 造影剤キャリアーへの利用を目的として調製した。

(4) LOX-1 の細胞膜上でのクラスター形成機構の解明

私たちは細胞膜上で LOX-1 がクラスター構造を形成している可能性を指摘していた。予備的研究からリポドラフト上に LOX-1 クラスターが形成される可能性を見いだしていたため、この点をさらに深く探求した。

(5) フェリチンを用いた MRI 造影法の開発  
実験室系で MRI 測定を行う場合には  $Gd^{3+}$  イオンが良く使われるが、 $Gd^{3+}$  イオンは細胞毒となるために診断に利用することはできない。本研究では最終的に診断応用を目的とするために  $Gd^{3+}$  イオン以外の生体毒性が少ない MRI 造影剤の開発とその特徴づけを行った。

#### 4. 研究成果

(1) LOX-1 の集積構造の酸化 LDL 認識への必要性の解明

LOX-1 はホモ 2 量体として存在するが、今回の研究から、ホモ 2 量体単独では  $K_D = 10^{-5}$  M 程度の親和性しか示さず、細胞上で観測される LOX-1 の酸化 LDL に対する親和性を実現できない。さらに、基質結合ドメイン単独ではほとんど親和性を示さないことが分かった (図 1)。

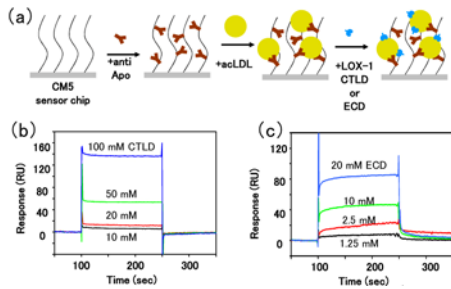


図 1: 酸化 LDL に対する LOX-1 基質結合ドメインの単量体・二量体の結合力

一方で、ストレプトアビジンを介してクラスター構造を模したセンサーにより LOX-1 の酸化 LDL に対する結合能を解析したところ、 $K_D = 10^{-10}$  M であり、細胞上で観測された LOX-1 の酸化 LDL に対する親和性と同等のレベルが実現できた (図 2)。

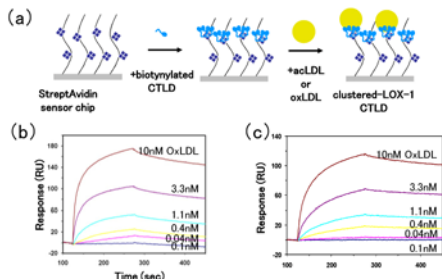


図 2: クラスター化した LOX-1 による酸化 LDL 認識を示す SPR センサーグラム

上記の一連の結果から、LOX-1 はホモ 2 量体を単位としながらも細胞表面層上に集積し、酸化 LDL に対して多価の相互作用をすることで高い親和性を実現していることを明らかにした。これは、過去に私たちが発表した LOX-1 基質認識部位の立体構造に基づいて提案した LOX-1 の酸化 LDL 認識機構を支持するものである。

LOX-1 の細胞表面層上での集積構造の必要性が明らかになったため、より細胞表面での LOX-1 の存在状態を忠実に模したセンサーを作製して LOX-1 の相互作用解析の定量化を目指した。SAM 上に His-tag を介して LOX-1 細胞外ドメイン全長を固定化して、細胞上で LOX-1 が存在しているのと同様な状態を実現した。この状態でも  $K_D = 10^{-10}$  M の親和性を

実現できており、細胞上での LOX-1 の集積構造の重要性が確認できた (図 3)。

SAM を使ったセンサーは、より定量的な LOX-1 の基質認識機構の解明に利用可能である。

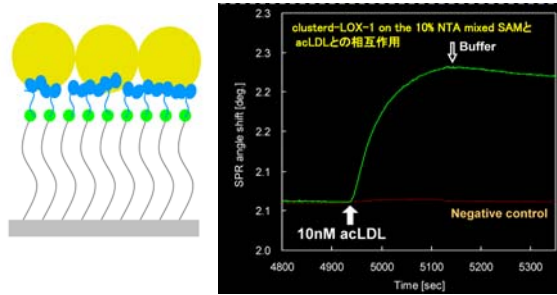


図 3: SAM 上で LOX-1 細胞外ドメインを配置させた時 (左図イメージ) の酸化 LDL モデル化合物としてのアセチル化 LDL (acLDL) との相互作用解析例。(株) オプトクエスト社との共同研究)

上記の一連の解析から、LOX-1 の細胞膜上での集積構造形成が酸化 LDL 認識には本質的に重要であることがわかった。では、個々の LOX-1 蛋白質のホモ二量体構造はどのような機能上の意味を持つかが疑問となる。単に基質結合ドメインが細胞表面で集積するだけで機能上は十分なのか、ホモ二量体構造としての構造を保つことが必要なのかを確認するために LOX-1 二量体界面部のアミノ酸変異体である W150A-LOX-1 を用いて SPR 解析を行った。

細胞上で発現させた W150A 変異体は劇的に酸化 LDL に対する結合能が低下していることを私たちは以前報告している。しかし、W150 は基質結合部に対して分子構造上ほぼ正反対の位置にある残基であり、なぜ大きな活性低下が生じるかは立体構造からは説明がつかなかった。本研究では、ホモ二量体形成能という観点から活性低下の機構を探った。

ゲルろ過を用いて、細胞外領域全長のフラグメントに対して、野生型と W150A 変異体の二量体形成能を調べた。その結果、W150A には明らかなホモ二量体形成能の低下が認められた。さらに、図 2 示す酸化 LDL を固定化したセンサーを用いて W150A 変異体の細胞外ドメイン (二量体) の酸化 LDL に対する結合能を調べた結果、ほとんど結合を確認できなかった。

以上の結果から、ジスルフィド結合を介して形成されるホモ二量体中に存在する基質結合ドメインの自己会合性が活性維持には重要であることが示唆された。すなわち、野生型では、二量体中で 2 つの基質結合ドメインが安定な自己会合体を形成するのに対して、W150A 変異体では界面部の変異のため、自己会合性が低下しジスルフィド結合を介

した二量体形成はしても、安定な基質結合に必要な自己会合構造を維持できないと考えることができる。このことから、LOX-1の基質認識においては、単に基質結合ドメインが細胞表層上に密集していればよいという訳ではなく、個々のLOX-1は結晶構造で見られる二量体構造を安定保つ必要があると考えられる。つまり、LOX-1基質認識における構造的な階層性が存在していることが指摘できる。

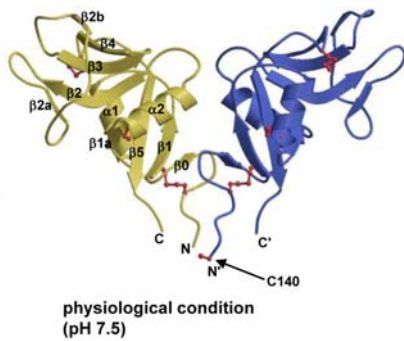


図 4: LOX-1 の基質結合ドメインの二量体構造。安定にこの二量体構造を保つことが活性には必要である。

(2) LOX-1 ホモ二量体界面構造変異体の立体構造解析

上記の W150A 変異体の活性低下機構についてさらに詳細に解析を進めるために W150A 変異体の立体構造解析を進めた。解析の結果、W150A では、リガンド結合表面の basic spine 構造には全く変化がなく、結合部の構造が変異によって壊れたことが活性低下の原因では無いことが確認できた。一方、変異により二量体界面部のサブユニット間で水素結合を形成する H151 側鎖の配向が逆転し、サブユニット内で水素結合を形成する構造変化が誘導されたことが分かった。

二量体界面部には、サブユニット間表面の静電的な相補性があるが、W150A 変異により H151 側鎖の配向が変化することにより界面部の表面電荷も変化する。このような界面部の構造変化が基質結合ドメインの自己会合性を低下させ、これが W150A 変異体の基質結合能の低下につながっていると考えられる。

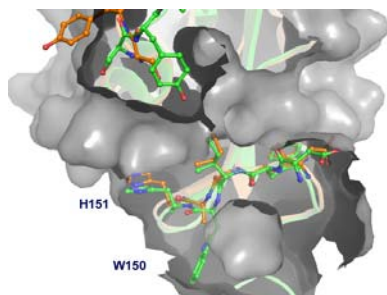


図 5: LOX-1 W150A 変異体の界面部構造変化

(3) LOX-1 に対する高い親和性をもつリポソームの調製

LOX-1 がクラスター形成して酸化 LDL を認識していることから、酸化 LDL よりも大きな球形をもち、表面に強く負電荷を帯びたリポソームは酸化 LDL よりも強く LOX-1 に結合することが期待できる。DOPG を用いた単層膜ベシクル (single uni-lamellar vesicle: suv) を用いてその LOX-1 に対する結合能を解析した。NiNTA-レジンに His-tag を介して LOX-1 細胞外ドメインを固定化した。この LOX-1 レジンを用いて酸化 LDL と DOPG-SUV の相対的な結合能の違いを測定した。

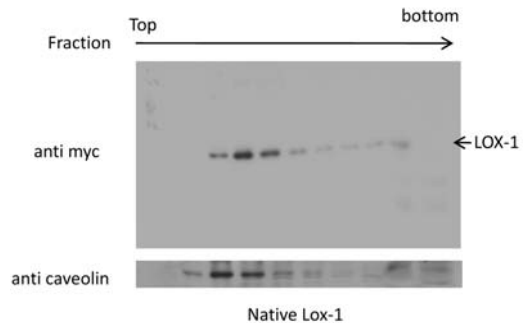
実験の結果、DOPG-SUV (直径 120 nm, LDL は 25 nm) はレジン上に集積した LOX-1 に対して約 1000 倍強い結合能を示すことが分かった。このリポソームは、MRI 画像化のためのキャリアーとして利用可能である。

(4) LOX-1 の細胞膜上でのクラスター形成機構の解明

上記のように SPR 等を用いた研究から LOX-1 は集積構造を取ることによって酸化 LDL に対する高い親和性を実現するという機構を明らかにした。では、実際の細胞上ではどのようにしてクラスター構造を維持しているのか、この点を明らかにするために細胞生物学的に、LOX-1 のクラスター構造形成機構を明らかにすることを旨とした。

*In vitro, in vivo* のいずれの実験でも LOX-1 細胞外ドメインが自発的にクラスターを作るとことはない。従って、細胞上での自己集積化には特別な機構が存在するはずである。LOX-1 を安定に発現する細胞株を用いて、そのシヨ糖密度勾配遠心の膜画分を取得して含まれる蛋白質を分析した。その結果 LOX-1 は、caveolin1 と同じ画分に含まれることが明らかになった。Caveolin1 は細胞膜上のリピッドラフトのマーカー蛋白質であるため、LOX-1 はリピッドラフト上に局在化することが示唆された。

図 6: シヨ糖密度勾配遠心による画分解析結果



果、LOX-1 は caveolin と共在していることが分かった。



また、共焦点レーザー顕微鏡観察により caveolin と LOX-1 が細胞膜上で共局在していることも観測でき、LOX-1 が細胞膜上のリピッドラフト上で集積構造をとる可能性が示された。

次に、LOX-1 のリピッドラフト上への局在化制御機構の解明を LOX-1 の翻訳後修飾に着目して解析を進めた。一般的にリピッドラフトへの局在化にはパルミトイル化あるいはミリストリル化など脂肪酸修飾を受けることがよく知られている。LOX-1 の膜貫通ドメインには C36、C46 の 2 つの脂肪酸修飾を受ける可能性のある部位が存在する。そこで、この 2 つの Cys を Ser に置換した変異体を作製し、それを発現する CHO 株でラフトへの局在化を調べた。その結果、LOX-1 のリピッドラフトへの局在化を確認できず、LOX-1 はパルミトイル化修飾を受けてリピッドラフトに局在化することが明らかになった。

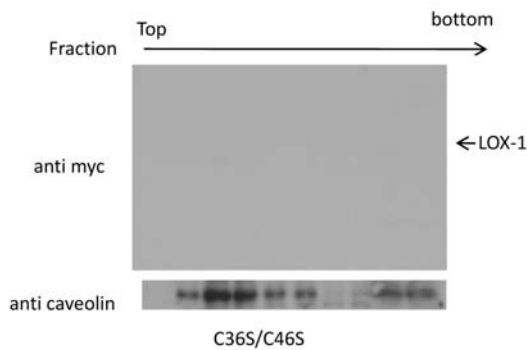


図 7: 膜貫通部のパルミトイル化部位を欠損した LOX-1 のショ糖密度勾配遠心画分の解析結果。LOX-1 のラフトへの局在が無くなった。

ヒト大動脈血管内皮細胞 (HAEC) においては LOX-1 の発現レベルが極めて低いが、発現されている LOX-1 はパルミトイル化を受けており、リピッドラフトに局在化することで集積構造を保っていることも確認できた。Caveolin を介した LOX-1 の輸送系が関与していることも今回研究から明らかになった。

LOX-1 は、リピッドラフト上に局在化することで効率的に集積構造を形成し、少ない発現量であっても高い親和性で酸化 LDL を認識できることが明らかになった。また、リピッドラフト上に集積した状態でそのままラフトごと caveolin を介した細胞内輸送系に運ばれるために、酸化 LDL を手放すことなくエンドソームにまで酸化 LDL を輸送することができると考えられる。

#### (5) フェリチンを用いた MRI 造影法の開発

上記までの結果で、LOX-1 は集積構造を持つことで初めて特異的な酸化 LDL 結合能をもつこと。また、実際に細胞表層上でもリピッドラフトにパルミトイル化により局在する

ことで集積構造を形成し、その結果高い酸化 LDL に対する親和性を発現していることを示した。さらに、酸化 LDL よりも大きな直径を持ち、強い負電荷を表面に帯びた単層膜リポソーム (SUV) は酸化 LDL に対して 1000 倍の LOX-1 に対する親和性を示すこと明らかにした。SUV の高い親和性は、より大きな球形を持つ SUV が、集積構造に含まれるより多くの LOX-1 と同時に相互作用できることにより説明できると考える。

LOX-1 が集積構造をとることで初めて酸化 LDL を認識することを考えると、上記の SUV は特異的に LOX-1 の発現量が上昇した血管内皮細胞に局在化することができると考えられる。私たちは、この SUV を用いて LOX-1 の発現量が上昇する動脈硬化初期過程にある血管内皮細胞の MRI による可視化を目指した。MRI による可視化には、通常は  $Gd^{3+}$  イオンを用いるが、細胞毒のある  $Gd^{3+}$  イオンの利用は診断目的に利用することはできないために、生体毒性の低い画像化を考案する必要がある。本研究では、鉄イオンを多く含む蛋白質フェリチンを用いた MRI 造影技術の開発を進めた。

今回の研究では、フェリチンを用いた造影法の定量化に焦点を絞り、基盤技術開発を中心に進めた。生体中の水の信号の  $T_2$  緩和時間を短縮して陰影造影する方法を想定して、アガロースゲル、ゼラチンにフェリチンをドープしたサンプルをモデルとして得られる像の定量性を検証した。いずれの結果も、フェリチン鉄の量に比例して水の緩和速度が増大しており、定量的にフェリチンの局在量を測定することが可能であることを確認した。

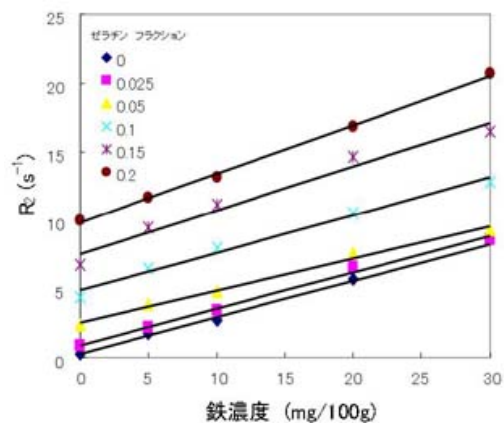


図 8: フェリチン鉄の存在濃度と水信号の  $T_2$  緩和時間の関係。

今回の研究期間では、上記の SUV に効率的にフェリチンを取り込ませた造影粒子の作製に成功できなかったため、動脈硬化病巣の造影まで研究を進めることはできなかったが、目的としていた技術の基盤は確立できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 22 件)

1. Mizuno,S., Amida,H., Kobayashi,N, Aizawa,S., and Tate,S. “The NMR structure of FliK, the trigger for the switch of substrate specificity in the flagellar type III secretion apparatus”, *J.Mol.Biol. in press* (2011). [査読有]
2. Ohki,I., Amida,H. Yamada,R., Sugihara,M., Ishigaki,T., and Tate,S. “Surface plasmon resonance study on functional significance of clustered organization of lectin-like oxidized LDL (LOX-1)”, *Biochim et Biophysica Acta*, 1814, 345-354 (2011). [査読有]
3. Komba,S., Terauchi,T., and Machida,S. “A region- and stereo-selective parallel synthesis of types of trigalactoses on a solid support as a model of a combinatorial oligosaccharide library”, *J. App. Glycoscience*, 58, 1-12 (2010). [査読有]
4. Fujimoto,Y., Shiraki,T., Horiuchi,Y., Waku,T., Shigenaga,A., Otaka,A., Ikura,T., Igarashi,K., Aimoto,S., Tate,S. and Morikawa,K. “Proline cis/trans isomerase Pin1 regulates peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  activity through the direct binding to the AF-1 domain”, *J.Biol.Chem.* 285, 3126-3132 (2010). [査読有]
5. Mitsumori,F., Watanabe,H., and Takaya,N. “Estimation of brain iron concentration in vivo using a linear relationship between regional iron and apparent transverse relaxation rate of the tissue water at 4.7 T”, *Magn. Reson. Med.* 62, 1326-1330 (2009). [査読有]

[学会発表] (計 58 件)

1. Tate,S. “Alteration to internally correlated motion in protein by the mutation to a loop region” PachifiChem2010 (2010.12.18) Honolulu, Hawaii.
2. Mitsumori,F. “Transverse relaxation of the tissue water in human brain in predominantly determined by iron and macromolecules” The 7<sup>th</sup> Minnesota Workshop on High-field MRI (2009.10.08) Minnesota, USA.

[図書] (計 5 件)

1. 楯 真一：広がる NMR の世界 (朝倉哲朗 編) コロナ社 (章著：タンパク質の分子形態変化観測) (2011) 46-49.
2. 三森文行：MR の最近の進歩と安全性 (日本磁気共鳴医学会) (章著：原理とハードウェアから MRI の安全を考える) (2008), 3-13.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：受容体再構築物，ならびにこれを用いる疾病検査法

発明者：町田幸子，倉持みゆき，神原祥清，寺田喜信，鷹羽武史

権利者：(独) 農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所

種類：特許

番号：特願 2008-251868

出願年月日：平成 20 年 9 月 29 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楯 真一 (Tate, Shin-ichi)

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：20216998

(2) 研究分担者

町田 幸子 (Machida, Sachiko)

(独) 農業・食品産業技術機構・食品バイオテクノロジー研究領域・ユニット長

研究者番号：30353981

三森 文行 (Mitsumori, Fumiyuki)

(独) 国立環境研究所・化学環境領域・室長

研究者番号：90125229

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：