

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 13 日現在

機関番号：82111  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21380068  
 研究課題名（和文）再構築酸化 LDL 受容体の集積・機能発現機構の解明と検出・評価系への展開  
 研究課題名（英文）Oligomer forming mechanism of lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1), and its functional reconstitution.  
 研究代表者  
 町田 幸子 (MACHIDA SACHIKO)  
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品バイオテクノロジー研究領域上席研究員  
 研究者番号：30353981

研究成果の概要（和文）：動脈硬化危険因子である酸化 LDL を認識する受容体(LOX-1)の認識機構を明らかにし、認識素子として安定に生産し活用する手法を開発した。該手法により、酸化 LDL の生成量のみならず、酸化 LDL 上に生じる細胞に真に有害と思われる分子構造の検出も可能なことが示された。さらに、開発された手法は、高コレステロール食により脂質異常症を誘導した病態モデルマウスの血中酸化 LDL の検出にも有効なことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) recognizes oxidized LDL and initiates endothelial dysfunction, which is believed to be a crucial early step in atherosclerosis. Here we show how LOX-1 forms the functional unit, and succeed to reconstitute the binding ability of LOX-1. Moreover, we develop molecular device to evaluate the OxLDL formation and molecular species, which produced on OxLDL as the results of oxidative stress.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：LOX-1、オリゴマー化、サンドイッチ ELISA、ビオチン化、競合 ELISA、酸化 LDL、酸化 LDL 受容体

## 1. 研究開始当初の背景

酸化 LDL (Low Density Lipoprotein) は動脈硬化の危険因子として知られている。しかし、酸化 LDL とは、酸化的な修飾を受けた LDL 分子の総称であり、酸化により実際に生じている分子種は多様であり、修飾の程度も異なった分子集団である。酸化 LDL 定量法としては、酸化 LDL 中の一つの分子種に対する抗体を利用した手法などがあるが、全ての酸化 LDL が補足されている保証は無く、さらに、動脈

硬化発症の引き金となる重要な分子種を捉えているかは不明であった。

一方、血管内皮細胞からクローニングされた lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) は、血管内皮において酸化 LDL を認識し取り込み、動脈硬化発症の最も初期の反応である血管内皮細胞機能不全を誘導することが明らかにされていた。課題担当者らは、LOX-1 はダイマーを基本単位としたヘキサマーを形成することによりリガンド認識・取り込み能を

獲得するなど、その機能制御機構の一端を世界で始めて明らかにしていた。さらに、LOX-1の認識能を再構築することにより、LDL 修飾物の中でも動脈硬化発症に直結する酸化 LDL 分子種を補足可能な認識素子の創出に結びつくと発想のもと、大腸菌を宿主とした生産系により、リガンド認識領域を大量発現させ、その特異的な認識能を再生した再構築 LOX-1 の創出にも成功していた。

以上のような研究成果から、LOX-1 の機能発現機構のより詳細な解析により、再構築 LOX-1 の安定なダイマー形成、さらには、基板上への集積化を実現することにより、動脈硬化症を引き起こす酸化 LDL 分子種の検出・評価系への発展につながると期待した。

## 2. 研究の目的

(1) LOX-1 安定化機構の解析と認識素子としての最適化

① LOX-1 は、ダイマーを基本単位とし、ヘキサマー以上のオリゴマーを形成して酸化 LDL を認識することが示唆されている。LOX-1 の認識能の活用を目指して、LOX-1 がオリゴマーを形成し安定に機能する機構を明らかにする。

② 認識素子としての最適化

LOX-1 を認識素子として活用する際の最も安定で供給が容易な分子構造を明らかにする。

(2) 再構築 LOX-1 の検出・評価系への展開

① 再構築 LOX-1 による多様な分子種の補足、並びに、特定分子種の検出に対応可能な技術基盤を確立する。

② 再構築 LOX-1 による病態モデルマウスの血中酸化 LDL の検出が可能な検出系に①を発展させ、病態と酸化 LDL 生成量の相関を解析可能な技術基盤を開発する。

③ 食品・農林水産物摂取、血中酸化 LDL 量、および、動脈硬化発症の可能性、の3者の因果関係を迅速に評価可能な基盤技術を開発する。

## 3. 研究の方法

(1) LOX-1 細胞外領の全長、および、変異を導入した細胞外領域を大腸菌を宿主として大量発現させ、封入体として得られたタンパク質をリフォールディングし、再構築 LOX-1 を調製した。

(2) 再構築 LOX-1 の溶液状態での認識能、ビーズやプレートなどへの固定化後の認識能を蛍光標識酸化 LDL の結合を測定することにより評価した。

(3) 基板上に固定化した再構築 LOX-1 の認識特性が細胞上での認識特性を反映しているか、生細胞における認識能の定量評価結果との相関解析を行った。

(4) 再構築 LOX-1 を活用した評価系の有効性を評価するため、高コレステロール食の摂取により脂質異常症を誘導した病態モデルマウスと健常群マウスを対象に、血中の酸化 LDL 量、酸化反応に伴い生じるアルデヒド修飾物などの分子構造の比率の差異を評価可能か検討した。

(5) 動物実験のレベルで動脈硬化発症抑制効果が知られている食品由来の化合物を対象に、再構築 LOX-1 固定化プレート、LOX-1 発現細胞における LOX-1 機能への影響を定量評価し、固定化プレートによる評価の有効性を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 認識素子としての安定な構造単位

① LOX-1 の認識領域を再構築し、その安定化機構の解析を進めた結果、認識に必須な最少領域である C type lectin-like domain (CTLD) 単独、あるいは、細胞外領域全長ではなく、ネック領域に存在している Cys140 (LOX-1 の分子間 S-S 結合に必須) を含む CTLD14 として再構築することにより安定に存在することが示された。CTLD14 は、溶液中で80%以上が自然にダイマーを形成するが、オリゴマーは自発的に形成されないことが明らかになった。また、溶液状態でのダイマーは4°Cで安定であり、酸化 LDL を補足する機能を1年以上維持可能であった。

② オリゴマー形成におけるネック領域の機能を解析するために、ネック領域に変異を導入した LOX-1 を CHO 細胞に一過性発現させオリゴマー形成能、酸化 LDL 認識能に与える影響を解析したが、ネック領域上のオリゴマー形成へ寄与する構造は特定できなかった。

③ 細胞上でのオリゴマー形成機構を制御する構造を細胞内領域、膜貫通領域も含めて解析したところ、膜貫通領域の Cys36, Cys46 がパルミトイル化されることにより、細胞膜上の脂質ラフトに高密度に集積し、オリゴマーを形成することが示された。

以上から、CTLD14 が認識素子として安定供給可能な分子形態であること、実際に効率的な認識を実現するオリゴマー形成には、CTLD14 の改変ではなく、CTLD14 を高密度集積可能な N 末端への修飾が有効であることが示された。

さらに以上の成果は、LOX-1 の細胞上におけるオリゴマー形成機構を世界に先駆けて明らかにしたものであり、血管内皮細胞はラフト構造が発達していることから、ラフトを介した酸化 LDL 取り込み機構に関する研究への新たな展開が期待できる。

(2) 再構築 LOX-1 の検出・評価系への展開

① (1) の成果を受けて、再構築 LOX-1 高密度集積を N 末端ビオチン化の導入によって行う

こととした。CTLD14のN末端に大腸菌内でビオチン化を受ける配列 ( Avi-tag: GLNDIFEFAQKIEWHE) を導入し、ビオチン化CTLD14として生産させリフォールディングによりビオチン化再構築CTLD14を調製した。続いてストレプトアビジンビーズ、固相などに高密度に集積させ、酸化LDLの検出を試みたところ、0.05 $\mu$ g/mlのレベルで検出可能なことが確認された。

②酸化LDL分子中には、酸化修飾に伴う脂質過酸化反応の結果生成するアルデヒドによりLDLを構成するApoBタンパク質が修飾を受けた結果生じる付加体がある。これらの付加体がLOX-1リガンドとして機能していることが明らかにされた (図1)。

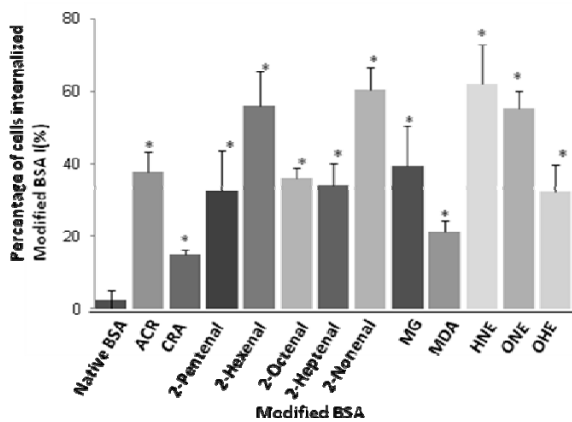


図1. アルデヒド修飾BSAがLOX-1発現細胞に認識され取り込まれる比率

4-hydroxy-2-nonenal (HNE)-histidineは、特に強いリガンド活性を有しており、動脈硬化発症につながる血管内皮細胞機能不全を誘導することも示された (図2)。

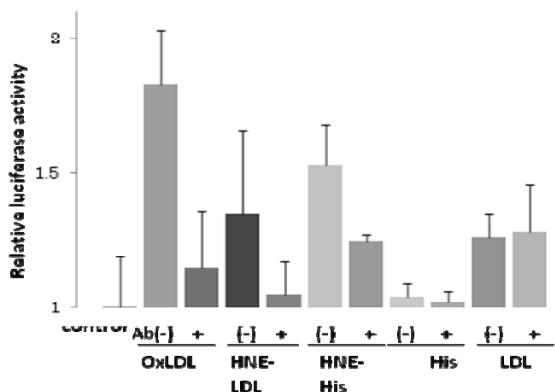


図2. HNE-HisがLOX-1を介して血管内皮細胞に取り込まれた結果、NF $\kappa$ -Bの活性化 (縦軸: luciferaseの活性で検出) することが確認された

酸化LDL中に生じるHNE-Hisの検出は、真に動脈硬化発症に重要な分子構造の定量に発展する可能性がある。さらに、固定化CTLD14と抗HNE-His抗体の活用したサンドイッチELISAを試みたところ、LDLの酸化修飾の進行に伴うHNE-Hisの生成が検出可能なことも確認された。

③マロンジアルデヒド(MDA)などの脂質異常症のマーカーとしての有効性が発表されている他のアルデヒドの検出もCTLD14と抗アルデヒド付加体抗体との組み合わせにより可能なが示された。この結果から、CTLD14固定化プレートを活用したサンドイッチELISAにより、酸化LDLの検出と並行して、酸化LDLを構成する分子種に関する情報も同時に取得可能なことが明らかとなった。

④高コレステロール食の投与により脂質異常症を誘導させた病態モデルマウスの血清を対象に、酸化LDL様活性を示す分子の検出を試みた。その結果、脂質異常症を示す発症群 (図3.A-1:Hi-Chol, 総コレステロール値、LDL-コレステロール値、トリグリセライド値が上昇) では、再構築CTLD14固定化プレートにより血清中の酸化LDL活性が高いことが示された (図3, A-2, 活性高いと縦軸の値が小さくなる)。また、LDLを分離し、固定化プレートにより評価したところ、酸化LDL活性が確認された (A-1)。さらに、サンドイッチELISAにより酸化LDL上のHNE-Hisの生成量を測定したところコントロール群 (contl) に比べ有意な生成が確認された (B-2)。

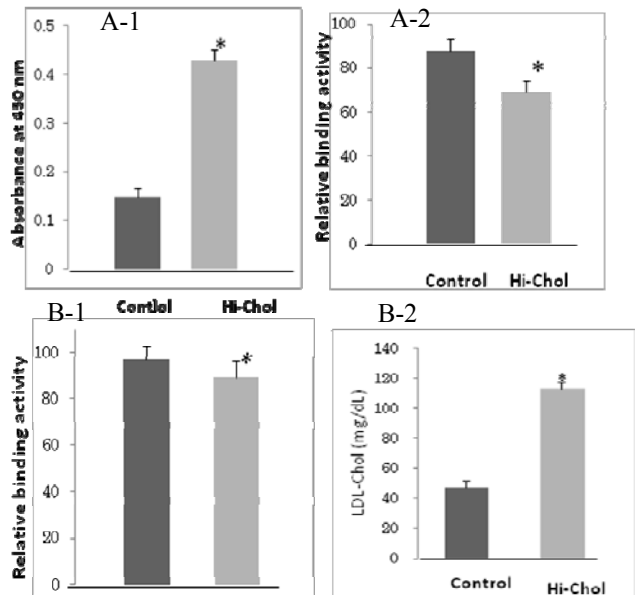


図3. 高脂血症モデルマウス (高コレステロール食) と健常群マウス血清の A-1: LDLコレステロール値、A-2: LOX-1固定化プレートへの酸化LDLの結合阻害活性。高脂血症発症群の阻害活性が有意に高い。P<0.05 versus control diet B-1:高脂血症モデルマウスと健常群由来のLDLによるLOX-1固定化プレートへの酸化LDL結合阻害活性、高脂血症発症群の阻害活性が有意に高い。P<0.05 versus control diet B-2:LDLの酸化に伴い生じる4-hydroxy-2-nonenal(HNE)に対する抗体とマウスLDLの反応性、高脂血症発症群が有意に高い。P<0.05 versus control diet

⑤抗酸化能を有し動脈硬化発症抑制効果があることが知られているケルセチンなどを対象に、CTLD14 固定化プレート上での酸化 LDL 結合阻害活性、細胞上での酸化 LDL 結合阻害活性を観察した。その結果、プレート上で阻害活性を示す分子は、細胞上でも高い阻害活性を示すことが確認された(図 4)。CTLD14 固定化プレートの活用により、動脈硬化発症抑制効果の迅速なスクリーニングが可能ながことが明らかとなった。

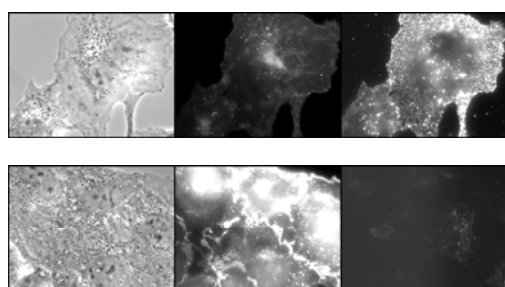
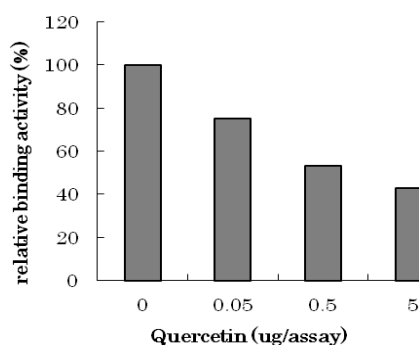


図 4. 上段：動脈硬化予防効果が知られているケルセチンの酸化 LDL 結合阻害を CTLD14 固定化プレートで評価した結果。中段：LOX-1 発現細胞に蛍光標識酸化 LDL を取り込ませた結果 (左) 位相差像 (中央) LOX-1 発現状態を示す画像 (LOX-1 由来の蛍光が観察される) (右) 取り込まれた酸化 LDL の蛍光画像  
下段：LOX-1 発現細胞をケルセチン処理し蛍光標識酸化 LDL を取り込ませた結果 (左) 位相差像 (中央) LOX-1 発現状態 (LOX-1 は高発現していることが確認できる) (右) 酸化 LDL の取り込みが観察されず、ケルセチンによる阻害が格にされた。

#### 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 7 件)

① M. K. Kuramochi, Y. Shimozu, C. Wakita, M.

O. Kameyama, T. Shibata, S. Matsunaga, Y. T. Ishikawa, J. Watanabe, M. Goto, Q. Xie, S. Komba, K. Uchida, S. Machida; Identification of 4-hydroxy-2-nonenal-histidine adducts that serve as ligands for human lectin-like oxidized LDL receptor-1, *The Biochemical Journal*, 442, 171-180(2012) (査読有)  
10.1942/BJ20111029

② T. Terauchi, S. Machida and S. Komba, A new method for cleavage of silicon-carbon linkers on glass plate supports with applications to solid-phase syntheses on silica resins, *Tetrahedron Letters*, 51, 1497-1499 (2010) (査読有)  
10.1016/j.tetlet.2010.01.042

③ K. Ishino, C. Wakita, T. Shibata, S. Toyokuni, S. Machida, S. Matsuda, T. Matsuda, and K. Uchida, Lipid peroxidation generates a body order component trans-2-nonenal covalently bound to protein *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 285, 15302-15313 (2010) (査読有)  
10.1074/jbc.M109.068023

④ M. Kumano-Kuramochi, M. Ohnishi-Kameyama, Q. Xie, S. Niimi, S. Komba, and S. Machida, Minimum stable structure of the receptor for advanced glycation end products possesses multi ligand binding ability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 386 (1), 130-136 (2009) (査読有)  
10.1016/j.bbrc.2009.05.142

[学会発表] (計 6 件)

① S. Machida, Lectin-like oxidized LDL receptor-1(LOX-1), A critical player in the development of atherosclerosis. 吉林大学招待講演 2011 年 8 月 22 日(中国吉林大学)

② 倉持(熊野)みゆき、謝秋宏、今場司朗、町田幸子、酸化 LDL 受容体 LOX-1 のラフト局在におけるパルミトイル化の影響、第 84 回日本生化学会 2011 年 9 月 23 日 京都国際会館

③ 倉持(熊野)みゆき、下津祐樹、脇田知佳、亀山(大西)真由美、松永茂、謝秋宏、今場司朗、内田浩二、町田幸子、HNE-histidine 付加体の酸化 LDL 受容体 LOX-1 リガンドとしての機能、第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010 年 12 月 神戸国際会議場

④ 倉持(熊野)みゆき、亀山(大西)真由美、謝秋宏、新美節子、久保田富佐子、今場司朗、

町田幸子、後期糖化生成物を認識する受容体 (RAGE)の安定な機能単位, 第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 22 日、神戸国際会議場

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: リガンド様活性を有する分子の検出法  
法

発明者: 町田幸子、倉持みゆき、石川祐子、  
後藤真生、渡辺純

権利者: 独立行政法人 農業・食品産業技術  
総合研究機構

種類: 特許

番号: 特願 2010-25840

出願年月日: 2010 年 11 月 18 日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

町田 幸子 (MACHIDA SACHIKO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機  
構・食品総合研究所・食品バイオテクノロジー  
研究領域・上席研究員

研究者番号: 30353981

### (2)研究分担者

石川 祐子 (ISHIKAWA YUKO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機  
構・食品総合研究所・食品機能研究領域・上  
席研究員

研究者番号: 40353940

### (3)研究分担者

渡辺 純 (WATANABE JUN)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機  
構・食品総合研究所・食品機能研究領域・主  
任研究員

研究者番号: 10374729