

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 8 日現在

機関番号：32511

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590084

研究課題名（和文）スカベンジャー受容体 FEEL の生理機能解析

研究課題名（英文）Analysis for physical roles of scavenger receptor FEEL

研究代表者

安達 栄樹（ADACHI HIDEKI）

帝京平成大学・薬学部・教授

研究者番号：60291051

研究成果の概要（和文）：酸化 LDL を認識する受容体 FEEL の生理的リガンドとして Hsp70 を同定し自然免疫機構への関与を明らかにした。細胞内での FEEL の輸送機構に関与する細胞内ドメイン結合タンパク質として SNX17 を同定し、受容体のプロセッシングや安定化に寄与することを明らかにした。ノックアウトマウスに高コレステロール食を負荷することにより FEEL-1 はリポタンパク質の代謝に寄与することを明らかにした。また apoE ノックアウトマウスとのダブルノックアウトマウスを用いた解析により動脈硬化の進展に関与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We identified an endogenous ligand, Hsp70 for an oxidized LDL receptor, FEEL and demonstrated that FEEL is implicated in innate immunity. Then, we identified SNX17 as a binding protein to cytoplasmic domain of FEEL and demonstrated that SNX17 is implicated in the processing and stability of FEEL protein. Using knockout mice for FEEL, we found the contribution of FEEL to lipoprotein metabolism. Using FEEL and apoE double-knockout mice, we found FEEL is implicated in the development of atherosclerotic regions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医科学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：酸化 LDL 受容体

1. 研究開始当初の背景

スカベンジャー受容体 FEEL-1、FEEL-2 は酸化 LDL、グラム陰性、陽性の細菌、AGE（糖化後期生成物）、SPARC、Hsp70 などの動脈硬化や糖尿病、自然免疫に関与するようリガンドを認識するマルチリガンドな受容体である。

私共は遺伝子のターゲッティングにより酸化 LDL 受容体 FEEL-1、FEEL-2 のノックアウトマウスを樹立している。既に FEEL-1、FEEL-2 は in vitro ではグラム陽性、陰性の細菌を結合することを報告している。その結合を担う分子はリポテイコ酸 LTA やリポポリサッカライド LPS だけではないことを明らか

した。ノックアウトマウス個体を用いて細菌を投与することによる感染症の発症頻度やLPS に対する個体死に対する感受性を検討することによりマウス個体の恒常性維持や非感染性慢性炎症疾患との関係を明らかにできるものと考えられた。

2. 研究の目的

スカベンジャー受容体 FEEL-1、FEEL-2 の病態への寄与を明らかにするため、また病態の診断、治療薬を開発する基礎研究としてFEEL の細胞内局在機構、FEEL の動脈硬化への寄与についてFEEL-1、FEEL-2 ノックアウトマウスを用いて検討した。

3. 研究の方法

FEEL-1 の細胞内挙動を規定する細胞内ドメインの検索したところNPVF モチーフを含むドメインが受容体活性に必須であった(図1)。

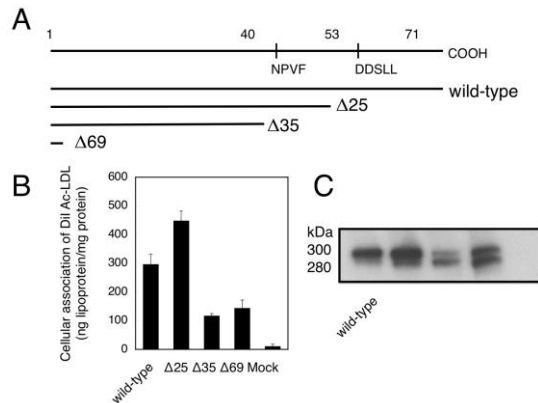


図1 FEEL-1 の細胞内挙動を規定する細胞内ドメインの検索

Yeast Two-Hybrid法によりFEEL-1の細胞内ドメイン結合蛋白質を探索しその候補蛋白質としてsorting nexin 17 (SNX17)を同定した。

NPVFモチーフのうちフェニルアラニン残基をアラニン残基に置換したF2519A変異体では受容体活性がほぼ失われており、プロセッシングも起きていないことが明らかになった(図2)。

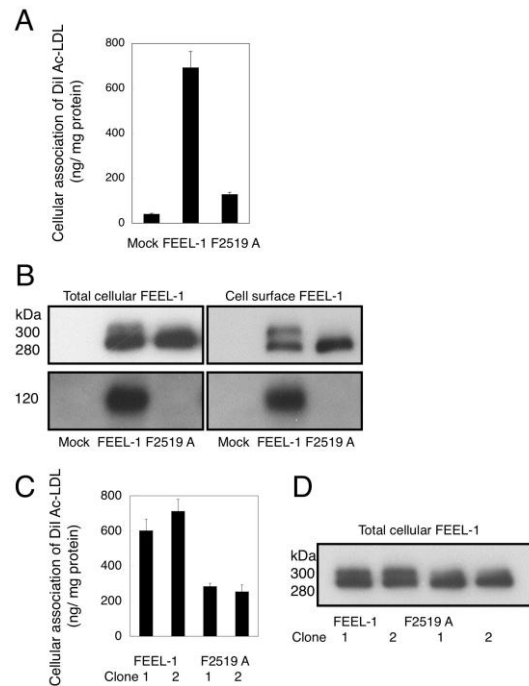


図2 F2519A変異体での受容体活性と細胞内挙動

そこで293A細胞にSNX17に対するsiRNAを導入し、FEEL-1の発現を検討した。

SNX17に対するsiRNAを導入することにより受容体活性は減少した。細胞表面の蛋白質をビオチン標識し、チェイスすることにより経時的にFEEL-1蛋白質の挙動を検討したところプロセッシング(糖鎖の付加やプロテオリスシが抑制されていることが明らかになった(図3)。

さらにFEEL-1を発現している血管内皮細胞でのSNX17の役割を検討したところsiRNAの導入により血管内皮細胞でも受容体活性が減少し、FEEL-1のプロセッシングが抑制されていることが明らかになった。

これらの結果は血管内皮細胞におけるFEEL-1の酸化LDL受容体活性への寄与を示すとともにSNX17がFEEL-1の安定性を規定する因子であることを示している(図4)。

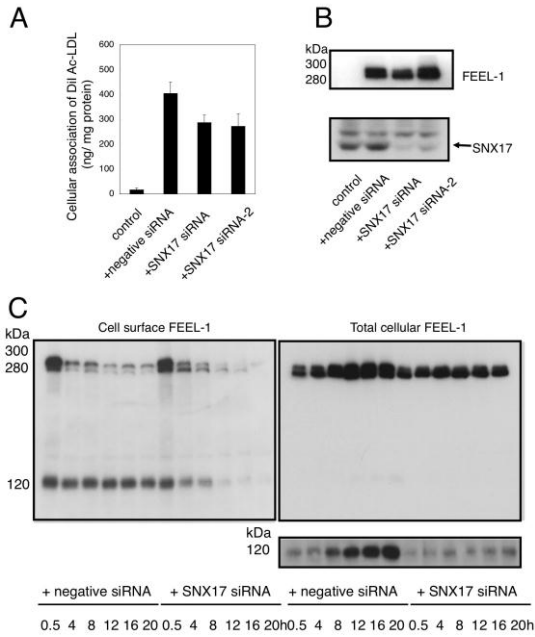


図3 SNX17のノックダウンによるFEEL-1蛋白質の挙動の変化

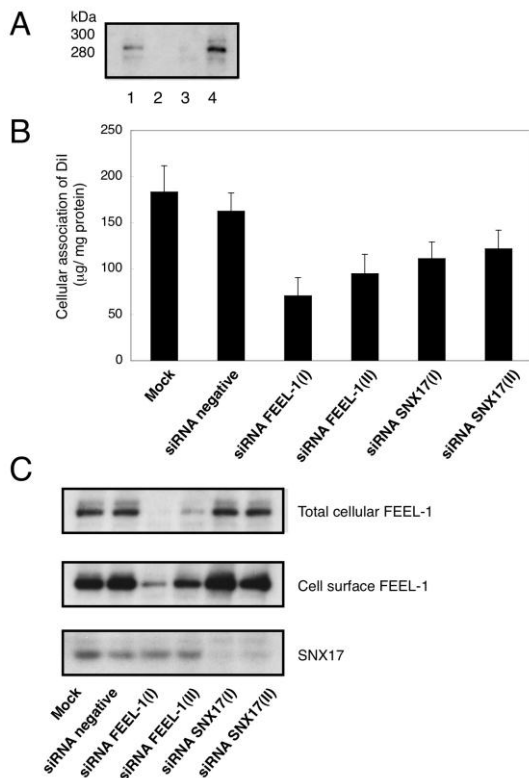


図4 HUVECにおけるSNX17のノックダウンによるFEEL-1蛋白質の挙動

高コレステロール食の負荷によって FEEL-1 ノックアウトマウスでは血中コレステロール濃度が野生型に比べて約2倍に増加し、その増加はIDL様リポ蛋白質の増加によるものであった。アポリポ蛋白質の解析を行ったところApoE含むリポ蛋白質及びApoAI含むリポ蛋白質が増加しており FEEL-1 はApoAIを認識する可能性が示唆された(図5)。

Lipid	wild	FEEL-1 ^{-/-}
High Fat Diet		
Cholesterol		
Male	81 ± 14	155 ± 7 *
Triglyceride		
Male	40 ± 6	42 ± 5
HDL		
Male	58 ± 11	104 ± 10 **

*P<0.01. **P<0.05 with respect to wild type mice

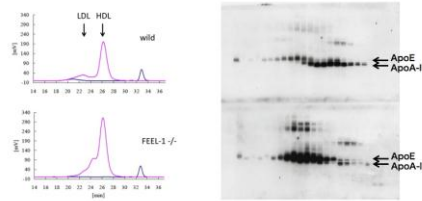


図5 高コレステロール食の負荷によるコレステロール濃度変化とリポ蛋白質の変化

しかし長期の高コレステロール食の負荷によっても動脈硬化病変を惹起させることはできなかった。そこで ApoE ノックアウトマウスとのダブルノックアウトマウスの作出によりさらに検討を行った。高コレステロール食の負荷によって惹起された動脈硬化巣の面積は ApoE ノックアウトマウスと FEEL-2/ApoE ノックアウトマウスでは有意差はなかったが ApoE ノックアウトマウスと FEEL-1/ApoE ノックアウトマウスでは有意な差が見出された。また高コレステロール食を負荷しない自然発生的な動脈硬化巣の面積では ApoE ノックアウトマウスと比べて FEEL-1/ApoE ノックアウトマウスでは顕著な差が見出された(図5)。

4. 研究成果

(1) NX17 の PX (phox-homology)ドメインが FEEL-1 の細胞内ドメインのアミノ酸配列 NPVF に特異的に結合することを明らかにした。SNX17 に対する siRNA を臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC に導入しマルチリガンド受容体機能への影響を検討した。SNX17 に対する siRNA を発現させることにより FEEL-1 をノックダウンしたときと同様にアセチル LDL や酸化 LDL の細胞内への取り込みは約 50%まで抑制された。

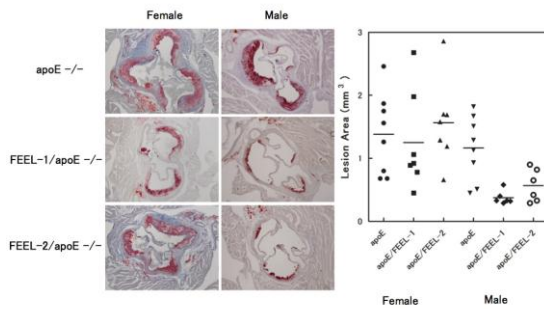


図5 高コレステロール食の負荷によるノックアウトマウスにおける動脈硬化病巣の変化

SNX17はearly endosomeにおけるLDL受容体やLRP(LDL receptor-related protein)のリサイクリングに寄与することが報告されている。FEEL-1もSNX17によって細胞内トラフィックを規定される新たな蛋白質であることを明らかにした。これらの知見はFEEL-1を介した脂質の細胞内輸送と病態との関連や生理機能を解明する上で重要な知見であると考えられた。

(2) 高コレステロール食の負荷によってFEEL-1ノックアウトマウスでは血中コレステロール濃度が野生型に比べて約2倍に増加し、その増加はHDLの増加によるものであり、アポ蛋白質の解析を行ったところApoE含むリポ蛋白質及びApoAIを含むリポ蛋白質が増加しておりFEEL-1はApoAIを認識する可能性が示唆された。

ApoEノックアウトマウスとのダブルノックアウトマウスの作出により検討を行った。高コレステロール食の負荷によって惹起された動脈硬化巣の面積はApoEノックアウトマウスとFEEL-1/ApoEノックアウトマウスでは有意な差が見出された。また高コレステロール食を負荷しない自然発生的な動脈硬化巣の面積ではApoEノックアウトマウスと比べてFEEL-1/ApoEノックアウトマウスでは顕著な差が見出された。

これらの結果はマウス動脈硬化モデルにおいてFEEL-1は動脈硬化の病態を進展させるような役割を担うことが示唆された。

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3件)

①Sano, M., Korekane, H., Ohtsubo, K., Yamaguchi, Y., Kato, M., Shibukawa, Y., Tajiri, M., Adachi, H., Wada, Y., Asahi, M. and Taniguchi, N., N-Glycans of SREC-I (scavenger receptor expressed by endothelial cells): Essential role for ligand binding, trafficking and stability. *Glycobiology*, 査読有 22, 2012, 714-724

DOI:10.1093/glycob/cws010

② Adachi, H., Tsujimoto, M., Adaptor p protein sorting nexin 17 interacts with the scavenger receptor FEEL-1/stabilin-1 and modulates its expression on the cell surface, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 査読有, 1803, 2010, 553-563 DOI:0.1016/j.bbamcr.2010.02.0111

③Gong J, Zhu B, Murshid A, Adachi H, Song B, Lee A, Liu C, Calderwood SK, T cell activation by heat shock protein 70 vaccine requires TLR signaling and scavenger receptor expressed by endothelial cells-1. *J. Immunol.* 査読有, 183(5), 2009, 3092-3098 DOI:10.4049/jimmunol.0901235

[学会発表] (計3件)

①廣瀬浩一、杉山綾子、栗林和美、荒川一郎、安達栄樹、安西偕二郎、久保田洋子、感染制御における薬剤師の活動と取り組みについての実体調査、第21回日本医療薬学会年会、2011年10月1日、神戸

②杉山綾子、廣瀬浩一、齋藤孝啓、田苗見絵梨花、栗林和美、荒川一郎、安達栄樹、安西偕二郎、久保田洋子、感染制御に関する実体調査とその取り組み、第21回日本医療薬学会年会、2011年10月1日、神戸

③安達栄樹、辻本雅文、スカベンジャー受容体FEELの細胞内トラフィック機構の解析、第82回日本生化学会大会、2009年10月22日、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安達 栄樹 (ADACHI HIDEKI)
帝京平成大学・薬学部・教授
研究者番号：60291051

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：