

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 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22650177

研究課題名（和文） 未知の栄養素の血中輸送担体の同定とその役割

研究課題名（英文） Functional identification of a novel endocytic receptor

研究代表者

山本 徳男 (YAMAMOTO TOKUO)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：30192412

研究成果の概要（和文）： エンドサイトーシスに必要な配列は高度に保存される FD/ENPVY 配列である。本研究では FD/ENPVY 配列を有する未同定のレセプターのリガンドを精製・同定することを目的とした。BLST 解析した結果、10 数個のタンパクが抽出され、最もその機能や性質が不明な CUB and sushi multiple domain タンパクを本研究でモデルとして用いた。CUB and sushi multiple domain タンパクを his-myc タグと融合させて、myc 抗体カラムを用いてこのタンパクに特異的に結合する分子量約 25K のタンパクを精製した。

研究成果の概要（英文）： To characterize a novel endocytic receptor, CUB and sushi multiple domain protein, its binding protein with 25 kDa was purified. The 25 kDa protein is shown to be derived from fetal bovine serum, specifically bound to CUB and sushi multiple domain protein on the cell surface, and internalized into cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	0	1,800,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	330,000	3,230,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学、食生活学

キーワード：健康と食生活

1. 研究開始当初の背景

コレステロール（担体：低密度リポタンパ

ク、LDL）や中性脂肪（担体：超低密度リポタンパク、VLDL）、ビタミン 12（担体、内因

子 IF)、鉄(担体:トランスフェリン)などの栄養素や、血小板由来細胞増殖因子 (PDGF)、インスリン、上皮細胞増殖因子 (EGF) などの細胞増殖因子のレセプターはいわゆるエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ代謝される。これらのエンドシテック・レセプターの多くは、一回膜貫通タンパクで、細胞外はシステインに富むリガンド結合ドメインが存在し、細胞質ドメインには高度に保存される FD/ENPVY 配列が存在している。FD/ENPVY 配列はいわゆるインターナリゼーション・シグナルと呼ばれ、レセプターのエンドサイトーシスに必須であることが示されている。

ヒトやマウスのデータベースを FDNPVY 配列で簡単な BLAST 解析を行うと意外にも数個の機能不明なタンパクが抽出されることが判明した。同様な解析を FENPVY で行うと、オーバーラップなしに数個の機能不明なタンパクが抽出されることが示された。これらのタンパクは多くのエンドシテック・レセプターに特徴的な細胞外ドメインにシステイン・リッチなリガンド結合ドメイン様構造を持ち、膜貫通ドメインを1つ有することが簡単なコンピューター解析により明らかで、未同定の栄養素や細胞増殖因子に対するエンドシテック・レセプターの存在がデータベースより明らかにされた。

ヒトでは、LDL レセプターやインスリンレセプター、IF のレセプターである Cubilin には多くの遺伝子異常が見つかっており、代謝異常を伴う遺伝病の原因になっている。このような背景からリガンド不明な未同定のレセプターの機能を明らかにすることは重要であると見え、研究を開始した。

2. 研究の目的

コレステロールや中性脂肪、ビタミン 12、鉄などの栄養素や、PDGF をはじめインスリン、上皮細胞増殖因子 (EGF) などの細胞増殖因子のレセプターの多くは、細胞膜上のコーテッドに存在し、リガンド結合後、細胞内に取り込まれる。このレセプターのインターナリゼーションに必要な領域は細胞質ドメインで、特に細胞質ドメインに高度に保存される FD/ENPVY は重要である。FD/ENPVY 配列を細胞内ドメインに有するレセプターの多くは、コレステロールやビタミンなどの栄養素の輸送や細胞増殖因子のレセプターとして重要である。従って、そのリガンドの同定は新しい栄養素や細胞増殖因子の代謝やシグナル伝達を明らかにするために不可欠である。

コレステロールの担体である LDL レセプターの異常は人類で最も頻度の高い家族性高コレステロール血症の原因となっており、また、ビタミン 12 の担体である IF のレセプターである cubilin の遺伝子異常も megaloblastic anemia の原因となっていて、血液中の栄養素の担体に対するレセプターは栄養素の代謝に重要な役割を担っていることは明らかである。

本研究ではイン・シリコ解析により新たなエンドシテック・レセプターとして抽出された未同定のタンパクと細胞膜上で結合するタンパクを精製・同定し、その機能を明らかにすることを目的としている。イン・シリコの解析では CUB and sushi multiple domain タンパクが抽出された。CUB は CUB ドメインを複数持つビタミン 12 の担体である IF のレセプターである cubilin に類似した構造を有し、最も興味ある未同定のタンパクであることより、これをモデルタンパクとしてリガンドの精製に用いた。

本研究では未同定のエンドシテック・レセ

プターを発現し、それと結合するリガンドを精製・同定し、その性質や機能を明らかにし、最終的に個体レベルでの機能を明らかにし、肥満や糖尿病、動脈硬化などの食習慣病研究にフィードバックすることを目的とした。

3. 研究の方法

ヒトタンパク質データベース Swissprot を用いて、FDNPVY と FENPVY 配列を BLAST 解析を行い、リガンド未同定のエンドシテック・レセプターをイン・シリコ スクリーニングした。

CUB and sushi multiple domain タンパクを含む標的タンパクの C-末端を in-frame で His-myc と結合した融合タンパクの cDNA を構築し、HEM293 細胞に導入し、G418 耐性の高発現細胞を得た。

融合タンパクは高発現細胞のポストミトコンドリアフラクションより調製し、Triton-X100 で可溶化後、抗-myc 抗体アガロースに結合させ、洗浄後 myc ペプチドを用いて溶出した。リガンドの精製はレセプター発現細胞がリガンドをエンドサトースしない条件で血清と培養し、レセプター・リガンド複合体として、同様に抗-myc 抗体アガロースと myc ペプチドを用いて精製した。レセプターならびにレセプター・リガンド複合体は SDS-PAGE 後、銀染色し、検出した。

総細胞抽出液からの精製は困難で、8000 x g 15 分の上清、すなわちポストミトコンドリアフラクションを用いることにより、融合タンパクを精製することができた。8000 x g 上清を 1% TritonX100 処理し、15000 x g 15 分の上清を抗-myc 抗体アガロースに供した。

4. 研究成果

Swissprot データベースを用いて、FDNPVY と FENPVY 配列で BLST 検索した結果、LDL レセプターをはじめ、その類似タンパクである VLD レセプターやアポ E レセプター 2、メガリン、cubilin などが含む十数個のタンパクが抽出された。これらのタンパクのうち、最もその機能や性質が不明な CUB and sushi multiple domain タンパクをモデルタンパクとして本研究で用いた。

CUB and sushi multiple domain タンパクは EGF や Cubilin などに保存される CUB ドメインと補体調節タンパクに保存されるスシドメインを多数持つ構造のタンパクで、その機能は全く不明である。CUB ドメインが細胞増殖因子 EGF や IF のレセプターである cubilin に保存されていることから、構造的にも興味ある分子である。

CUB and sushi multiple domain タンパクの翻訳領域と his-myc タグと融合させた cDNA を構築し、HEK293 細胞に導入し、高発現する細胞を得た。融合タンパクを高発現細胞のポストミトコンドリアフラクションより、Triton-X100 を用いて可溶化し、抗-myc 抗体アガロースに結合させ、myc ペプチドを用いて溶出・精製した。リガンドの精製はレセプター発現細胞がリガンドをエンドサトースしない条件で血清と培養し、レセプター・リガンド複合体として、同様に myc アガロースと myc ペプチドを用いて精製した。精製したタンパクは SDS-PAGE し、銀染色により検出した。

その結果、CUB and sushi multiple domain タンパクに特異的に結合する分子量約 25K のタンパクが精製された。分子量 25K のタンパクはインターナリゼーションが起こらない条件で細胞を血清とともに培養した時のみ、検出された。従って、この分子量 25K

のタンパクは牛胎児血清由来で、CUB and sushi multiple domain タンパクと細胞膜上で結合し、インターナリゼーションすることが示唆された。

リガンドの可能性の高い分子量約25Kのタンパクを、現在、LC-MS-MSを用いて同定・解析し、その本体を明らかにしている。

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 2 件)

① Imagawa M, Takahashi S, Zenimaru Y, Kimura T, Suzuki J, Miyamori I, Iwasaki H, Hattori H, Yamamoto TT, Nakano T, Nakajima K.

Comparative reactivity of remnant-like lipoprotein particles (RLP) and low-density lipoprotein (LDL) to LDL receptor and VLDL receptor: effect of a high-dose statin on VLDL receptor expression.

Clin Chim Acta. 査読有、413 巻、2012、441-447

② Takahashi S, Ito T, Zenimaru Y, Suzuki J, Miyamori I, Takahashi M, Ishida T, Ishida T, Hirata K, Yamamoto TT, Iwasaki T, Hattori H, Shiomi M.

Species differences of macrophage very low-density lipoprotein (VLDL) receptor protein expression.

Biochem Biophys Res Commun. 査読有、407 巻、2011、656-662.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 徳男 (YAMAMOTO TOKUO)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号：30192412

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：