

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05886

研究課題名(和文) ヒト酸化LDL受容体の糖結合特異性の解析と応用

研究課題名(英文) Analysis and application of carbohydrate binding specificity of oxidized LDL receptor

研究代表者

氏田 稔(Ujita, Minoru)

名城大学・農学部・教授

研究者番号：50340295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトのレクチン様酸化LDL受容体-1(hLOX-1)は、酸化LDLの認識と取り込みを介してアテローム性動脈硬化症の発症と進行に関与している。hLOX-1のC末端側のC型レクチン様ドメインの機能を解明するために、N末端側に各種のタグを付加したhLOX-1の細胞外領域をカイコ-バキュロウイルス発現系で可溶性組換えタンパク質として発現させ、精製後、糖結合特異性を解析した。本組換えhLOX-1が厳密な結合特異性を有していることから、本組換えhLOX-1はヒトにおける天然のリガンドを同定するために有益であり、hLOX-1とヒト酸化LDLの相互作用を解析する上でも利用可能であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、ヒト酸化LDL受容体の糖結合特異性と糖鎖リガンドを解析し、酸化LDLとの相互作用をオリゴ糖が競合阻害するかどうかを明らかにすることである。本研究では、ヒト酸化LDL受容体のレクチン様ドメインと特異的に結合するオリゴ糖を探索し、アテローム性動脈硬化症予防食品成分のハイスループット評価法を開発した。アテローム性動脈硬化症は最も一般的な動脈硬化症であり、動脈硬化症に起因する心疾患や脳血管疾患を合わせると日本人の死因の第1位である悪性新生物に匹敵する。超高齢社会となった現代日本において高齢者の動脈硬化症の予防という観点からも本研究は重要である。

研究成果の概要(英文)：Human lectin-like oxidized LDL (ox-LDL) receptor-1 (hLOX-1) mediates the recognition and internalization of ox-LDL. Internalization of ox-LDL by hLOX-1 results in pro-atherogenic cellular responses implicated in the initiation and progression of atherosclerosis. To elucidate the function of the C-terminal C-type lectin-like domain, hLOX-1 was expressed as a fusion protein with an N-terminal FLAG tag, hexahistidine tag, and green fluorescent protein in a baculovirus-silkworm expression system, and assayed for binding specificity. The purified recombinant hLOX-1 specifically bound to some glucans, but not to other carbohydrates. The glucan binding of recombinant hLOX-1 was inhibited by oligosaccharides. These results suggest that the recombinant hLOX-1 can be used as a useful probe in identifying natural ligands in humans due to its strict binding specificity, and to examine the hLOX-1-ox-LDL interaction. Our study might lead to a better understanding of the mechanism of atherosclerosis.

研究分野：食品免疫学

キーワード：組換えヒト酸化LDL受容体 糖結合特異性 動脈硬化症予防

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酸化 LDL はアテローム性動脈硬化症患者の動脈壁の肥厚部分（プラーク）に多量に蓄積されており、動脈の内皮細胞表面に存在する酸化 LDL 受容体が酸化 LDL を取り込むことによりプラークの形成が始まる。このプラークは細胞、細胞外マトリックス、脂質、キチナーゼが複雑に相互作用して形成されており、動脈内壁でプラークが大きくなると血流の減少や遮断によって虚血が引き起こされる。プラークが破裂すると血栓が形成されることが多く、動脈が閉塞して心筋梗塞や脳梗塞が発症する。アテローム性動脈硬化症は最も一般的な動脈硬化症であり、動脈硬化症に起因する心疾患や脳血管疾患を合わせると日本人の死因の第 1 位である悪性新生物に匹敵する。超高齢社会となった現代日本において高齢者の動脈硬化症の予防という観点からもヒトの酸化 LDL 受容体の研究は重要であると考えられ、「食品中の β -グルカンはヒト酸化 LDL 受容体のレクチン様ドメインに結合して酸化 LDL の取り込みを競合阻害することにより動脈硬化予防効果を示すのではないか？」を学術的な「問い」としている。

酸化 LDL 受容体と酸化 LDL との相互作用解析は世界中で行われているが、そのほとんどがマウスを対象としている。機能性食品成分としての β -グルカンの対象はあくまでヒトであり、マウスでのデータをそのままヒトに適用することはできない。受容体のリガンド結合部位が細胞外レクチン様ドメインに存在することはわかっているが、これまでは単量体と二量体における結合活性の違いを解析する研究が主流であり、レクチン様ドメインの糖結合活性や酸化 LDL 内のリガンド構造は未解明であった。このような現状ではヒトにおけるアテローム性動脈硬化症の発症メカニズムを完全に解明することはできず、医薬品だけでなく、アテローム性プラークの形成を阻害して動脈硬化を予防する食品成分の探索もままならない。また、研究手法として動物実験や臨床試験だけでは費用や期間の面で限界がある上、医薬品開発や機能性食品研究においても動物実験を減らす努力が世界中で求められており、代替法を開発すべきだという議論も盛んである。ヒトにおけるアテローム性動脈硬化症の発症メカニズムの解明が進んでいない原因の 1 つは、ヒト酸化 LDL 受容体の糖鎖リガンドが未同定で、糖結合特異性に対する分子レベルの解析法や評価法が確立されていないことであると総括することができる。そこで本研究では組換えタンパク質を用いて、ヒトの酸化 LDL 受容体の糖結合特異性と糖鎖リガンドについて分子レベルで研究を行う。

2. 研究の目的

ヒト酸化 LDL 受容体は細胞外領域にレクチン様ドメインを持ち、ヒト免疫細胞 β -グルカン受容体と高いアミノ酸配列の類似性を示すが、このレクチン様ドメインの糖結合活性についてはまったく研究が進んでいない。本研究の目的は、ヒト酸化 LDL 受容体の糖結合特異性と糖鎖リガンドを解析し、酸化 LDL との相互作用を β -グルカンが競合阻害するかどうかを明らかにすることである。ヒト酸化 LDL 内の糖鎖リガンドを明らかにするとともに、ヒト酸化 LDL 受容体-酸化 LDL 間の相互作用を阻害するオリゴ糖や β -グルカンを探索し、アテローム性動脈硬化症を予防する機能性食品の開発につなげるところに学術的独自性と創造性がある。本研究では、マウスではなく実際に医薬品や機能性食品の対象となるヒトの酸化 LDL 受容体を解析し、また、緑色蛍光測定を利用したインビトロのシステムを採用しているため、細胞実験や動物実験に比べ、より分子レベルであるという優位性がある。すなわち、本研究において初めてヒト酸化 LDL 受容体による酸化 LDL の取り込みの分子メカニズムが解明されるわけである。本方法は動物実験や臨床試験などのインビボ実験法や培養細胞を用いる方法と併用・共存するアッセイであるが、極めて簡便・迅速・安価・高感度の定量的なスクリーニング法として利用することにより細胞実験や動物実験を大幅に減らすこともできるという利点がある。

本研究の医療への応用例としては、 β -グルカンやオリゴ糖によるヒト酸化 LDL 受容体-酸化 LDL 間相互作用の競合阻害を応用した動脈硬化の進行の阻止などが考えられる。本研究の結果を応用して開発される新たな動脈硬化予防薬・治療薬は、従来の抗血栓剤のように出血などの副作用を起こすことはないと思われ。

3. 研究の方法

(1) 可溶性組換えヒト酸化 LDL 受容体をカイコ-バキュロウイルス発現系で大量発現させる。N 末端側に FLAG タグ、ヒスチジンタグ、緑色蛍光タンパク質を付加したヒト酸化 LDL 受容体の細胞外レクチン様ドメイン (FLAG-His-GFP-ヒト酸化 LDL 受容体) と GFP を持たない融合タンパク質 (FLAG-His-ヒト酸化 LDL 受容体) をアフィニティー精製する。

(2) 動脈硬化症に対する予防効果が報告されている食品中の各種 β -グルカンを β -グルカナーゼにより部分加水分解して可溶化した β -グルカンオリゴ糖を HPLC で精製した後、FLAG-His-GFP-ヒト酸化 LDL 受容体と反応させ、競合的固相結合アッセイにより結合特異性を解析する。本アッセイで明らかとなる β -グルカンオリゴ糖-組換えヒト酸化 LDL 受容体間の相互作用のカイネティクスと、動脈硬化予防 β -グルカンの効能との相関関係を確認・検証する。

(3) 組換えヒト酸化 LDL 受容体 (FLAG-His-ヒト酸化 LDL 受容体) 固定化ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより動脈硬化予防食品成分を単離し、構造を決定する。キノコ類や海藻類に加え、動脈硬化を予防する効果が期待されている穀類、果物類、野菜類 (大麦、リンゴ、ミカン、レモン、オクラ、ゴボウ、キャベツなど) から可溶性多糖類・オリゴ糖類を抽出し、固定化ヒト酸化 LDL 受容体に結合させる。洗浄後、結合した物質を溶出し、HPLC で精製した後、NMR、MALDI-TOF MS、ESI-TOF MS、メチル化分析などによって構造決定を行う。最後に上記の競合的固相結合アッセイを利用して結合特異性を確認する。

4. 研究成果

本研究では、可溶性組換えタンパク質を用いて、ヒト酸化 LDL 受容体の糖結合特異性、ヒト酸化 LDL 内の糖鎖リガンド、ヒト酸化 LDL との相互作用を解析した。N 末端側に FLAG タグ、ヒスチジンタグ、緑色蛍光タンパク質を付加したヒト酸化 LDL 受容体の細胞外レクチン様ドメインをカイコ-バキュロウイルス発現系で可溶性組換えタンパク質として大量調製し、アフィニティー精製を行い、天然型と同じように二量体として発現していることを確認した。組換えヒト酸化 LDL 受容体の糖結合特異性を競合的固相結合アッセイにより解析し、グルカン結合特異性を解明した。続いて本組換えヒト酸化 LDL 受容体のグルカン結合特異性およびヒト酸化 LDL との相互作用をプルダウンアッセイにより解析した。その結果、特定濃度のヒト酸化 LDL、抗ヒト ApoB 抗体、Protein G 磁気ビーズの組み合わせにおいて効率よくヒト酸化 LDL が沈降し、ヒト酸化 LDL 受容体の細胞外レクチン様ドメインとヒト酸化 LDL の相互作用解析および各種グルカンやオリゴ糖による結合阻害活性解析が可能であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤知樹・伊藤誌小里・奥村裕紀・氏田 稔
2. 発表標題 酵母ツーハイブリッド法を用いたフィラグリンとケラチン1のtailドメインの相互作用解析
3. 学会等名 第84回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白倉智裕・氏田 稔・奥村裕紀
2. 発表標題 哺乳類UMODの鳥類ホモログZPDの機能解析
3. 学会等名 第84回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤原由季・水野綺香・武田祐真・氏田稔・奥村裕紀
2. 発表標題 安定発現株を用いたZP1 - ZP3複合体形成機構の解明
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 窪田真理子・西尾俊亮・松田幹・氏田稔・奥村裕紀
2. 発表標題 ZP糖タンパク質が体細胞の遺伝子発現調節に関与している可能性の発見
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------