

氏名 (本籍)	青 山 琢 磨 (愛知県)		
学 位 の 種 類	博 士 (医学)		
学位授与番号	甲第 416 号		
学位授与日付	平成 10 年 3 月 31 日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	Structure and chromosomal assignment of the human lectin-like oxidized low-density-lipoprotein receptor-1 (LOX-1) gene		
審 査 委 員	(主査) 教授 藤 原 久 義		
	(副査) 教授 岡 野 幸 雄	教授 清 島	満

論 文 内 容 の 要 旨

動脈硬化の初期病変においては内皮細胞の機能的変化が大きく関わっている。内皮細胞においてNO産生障害、白血球の走化因子や接着分子、平滑筋細胞の増殖因子の発現誘導といった変化が生じ、これには酸化LDLが大きな役割を果たすことが主張されてきた。マクロファージ上の酸化LDLの受容体は多く報告されているが、最近、申請者らは初めての内皮細胞上の酸化LDL受容体のクローニングに成功し報告した。この受容体はC型レクチンに属すⅡ型の膜蛋白であり、血管が豊富な器官、正常な内膜、動脈硬化を認める内膜で発現している。今回、申請者らはLOX-1の生理学的、病理学的役割に迫るために、遺伝子上の構造、染色体上の位置決めを行った。

実験方法

1) ヒトLOX-1遺伝子の5'上流域のクローニング

Human promoter finder DNA walking kit (Clontech) にてnested primerを用いてPCR法にてヒトLOX-1遺伝子の5'上流域を増幅し2.5kbpの断片を得た。これをpGEM-Tベクターにサブクローニングし、次にシーケンスにて塩基配列を決定した。

2) ゲノム遺伝子の単離

ヒトゲノムDNAライブラリーをLOX-1のcDNAをプローブにしてスクリーニングし、6つのクローンを得た。これらに含まなかったイントロン1, 2に関してはゲノムDNAライブラリーを鋳型としnested PCRを行いゲノムDNA断片を得た。これらを用いてエクソン、イントロン境界をシーケンスにて決定した。

3) プライマーエクステンション法

LOX-1 cDNAの特異的プライマー (65-86) を作製し、ヒト胎盤mRNAとハイブリダイゼーションさせ、逆転写酵素を用いてDNAの延長を行った。また同プライマーを用いてゲノムDNAを鋳型としシーケンス反応を行い、前述のサンプルと一緒に電気泳動し比較した。

4) 5'-RACE法

ヒト胎盤の5'-RACE-ready cDNA (Clontech) を用いて5'末端をPCRにて増幅し、サブクローニングしシーケンスした。

5) ルシフェラーゼレポーター遺伝子の構築

ヒトLOX-1遺伝子の5'上流域2.5kbを鋳型としPCRにてコアプロモーター付近の増幅をしDNA断片を得、ルシフェラーゼレポーター遺伝子にサブクローニングし、8つの欠失変異体を作製した。この欠失変異体をHeLa細胞にβ-ガラクトシダーゼレポーター遺伝子と共にカルシウムフォスフェート法にてトランスフェクションし48時間後に細胞を回収し、それぞれのアッセイシステムにて活性を測定した。β-ガラクトシダーゼ活性値にてトランスフェクションの効率を補正し、ルシフェラーゼ活性値を相対値で示し、student's t-testにて検定した。

6) サザンブロットアナライシス

ヒト胎盤組織から4μgのゲノムのDNAを抽出し、3つの制限酵素にて完全消化しアガロースゲルにて電気泳動しブロッティングを行った。これをヒトLOX-1 cDNA断片をプローブとしハイブリダイゼーションを行い、オートラジオグラフィーにて解析した。

7) FISH法

Rバンドのヒト分裂中期の染色体スライドは末梢血を用い作製した。ヒトLOX-1ゲノムDNAをビオチン化16 dUTPでラベルしプローブとし、FISH法を行った。染色体を対比染色しプローブのシグナルはDETEK 1-f signal-generating systemで検出した。

結果と考察

1) LOX-1遺伝子の5'上流域の転写制御エレメント

5'上流域の転写制御エレメントをデータベースTRANSFACにて検索した。5'上流域においてLOX-1の発現に関わる潜在的転写活性制御エレメントが見いだされた。エンドセリンの内皮特異的発現に関わるGATA-2が-180, -1676bpにあった。血管新生の際発現し、一方、内皮成長因子受容体flkの内皮特異的発現に関わるc-etsが-2274bpに存在する。これらはヒトLOX-1の内皮細胞発現に関わるかもしれない。PKCによって活性化されるAP-1の結合エレメントであるTREが-60, -984, -1714bpに認められた。実際にLOX-1の発現はホルボールエステルによって誘導されることが確認されている。

ずり応力による発現誘導に関わるエレメントであるSSREは-1011bp, -1447に存在し、LOX-1においても実際にずり応力により発現が誘導される。HMG-CoA合成酵素、還元酵素、LDL受容体にはコレステロールによりその発現が調節されるSREが存在するが、LOX-1には認められず、過剰LDL投与による発現低下を認めないことを支持すると考えられアテロームでのLOX-1の役割を示唆すると考えられる。

2) LOX-1遺伝子プロモーター

転写開始位置をプライマーエクステンション法、5'-RACE法にて決定したが翻訳開始位置より-61bp (多数)、-55bpの2箇所が存在した。他の遺伝子と同様にTATAボックスは転写開始位置より-29bp, CAATボックスは-99bpに存在した。

3) プロモーター活性

ヒトLOX-1遺伝子のコアプロモーター付近の8つの欠失変異体 (-310bpより-20bpまでの欠失) を作製した。GCボックス, CAATボックスを含む-150bpから-90bpを欠失させると最大値の24%まで活性は有意に減少した。さらにTATAボックスを含む領域を欠失させると3%にまで活性は有意に減少した。GCボックス, CAATボックス, TATAボックスはLOX-1遺伝子の基礎転写活性に重要であることが示唆された。

4) ヒトLOX-1のエクソン, イントロン構造

ヒトLOX-1遺伝子は6つのエクソンと5つのイントロンからなっており、全長は7kb以上であった。受容体の機能ドメインとエクソン構造の対応をみると、細胞質ドメインがエクソン1, 膜貫通ドメインがエクソン2, 頸部ドメインがエクソン3, CRDがエクソン4, 5, 6の6つのエクソン構造をもっており、これはLOX-1が属するC型レクチンスーパーファミリーであるNKR-P1, Ly49と同様な遺伝子構造であった。

5) ヒトLOX-1遺伝子のサザンブロットアナライシス

同じファミリーであるNKR-P1, Ly49は複数遺伝子の選択的スプライシングの様式をとっておりLOX-1についても検討した。サザンブロットアナライシスは単一バンドを示しNKR-P1等と異なり単一遺伝子であることが明らかになった。

6) 染色体マッピング

FISH法では染色体の12p12.3-p13.2に位置することが明らかになった。染色体の12p12.3欠失は家族性高血圧症との関係が示唆されており、一方、高血圧ラットでLOX-1の発現が誘導されていることより高血圧症の発症にLOX-1は大きく関与するかもしれない。

結 論

ヒトLOX-1は6つのエクソンと5つのイントロンからなっており、機能ドメインとの相関が認められた。同遺伝子は2箇所の転写開始位置を示し、その5'上流域に、SSRE等の種々の潜在的エンハンサー以外にTATA box, CAAT boxをもち、基本的転写に重要であることが明らかになった。また単一遺伝子であり12p12.3-p13.2に位置することが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

申請者 青山琢磨はヒト酸化LDL受容体 (LOX-1) の遺伝子構造, 染色体上の位置を明らかにした。この新発見は動脈硬化の発生機序を明らかにし循環器病学の進歩に寄与するものと認める。

〔主論文公表誌〕

Structure and chromosomal assignment of the human lectin-like oxidized low-density-lipoprotein receptor-1 (LOX-1) gene

平成11年発行予定 Biochemical Journal 印刷中