

# 血管壁細胞機能活性化における牛乳中の コレステロールとカルシウムの役割

帝京大学薬学部微生物・病態生化学教室

教授 高野 達 哉

はじめに

牛乳に含まれる脂質、特にコレステロールは、腸管により吸収され、リポタンパク質によって生体内に輸送され、細胞内に取り込まれて生体膜の主要構成成分となる。したがって細胞の増殖時、あるいは細胞内の小胞分化時には、大量のコレステロールを必要とする。血中コレステロール値が低下すると、細胞内のHMG CoA reductase 活性が上昇し、コレステロール生合成能が亢進される。また、過剰のコレステロールが細胞内に取り込まれると、HMG CoA reductase 活性は低下し、コレステロールの合成が阻害され、細胞内コレステロール値は一定に保たれている。しかし、コレステロール量がさらに低下すると、細胞機能そのものにもいろいろな障害が生じてくる。

それでは、大過剰に細胞内にコレステロールが取り込まれても障害が起こらないのは、どのような機構によって制御されているからであろうか。

本研究は、過剰のコレステロールにより産生されたリポタンパク質が肝細胞ミクロソームで、どのようにして分解されるか、その制御機構につき検討した。

[結 果]

リポタンパク質としては、悪玉リポタンパク質と考えられているLDLのアポタンパクアポB-100 と、善玉リポタンパク質と考えられているHDLのアポタンパクアポA-1を用いた。ヒト肝由来のHep G2細胞をあらかじめ<sup>35</sup>S-Met で15分間標識する。培地交換後、経時的に、抗アポB-100 抗血清、抗アポA-1 抗血清とインキュベート後、アポB、アポA-1 抗体結合物をProtein A-Sepharose CL-4B とともに沈渣に回収する。SDS-PAGEにて、アポB-100、A-1を分離し、アポB-100、A-1に対するバンドの比活性より、それぞれの分解速度を計算した。その結果、HDLの構成

タンパクであるアポA-1にはほとんど分解は認められないにもかかわらず、LDLの構成タンパクであるアポB-100には分解されているという知見を得た。

この分解機構をさらに解析するために、糖タンパク質の生合成をtrans Golgi領域で阻害することで知られている抗生物質Breferridin A(1  $\mu$ g/ml, 1 hr)を加え、それぞれのアポタンパク質の分解速度を求めた。その結果、予想通りアポA-1はわずかしか分解されないにもかかわらず、アポB-100は約45分の半減期で分解されていることが見出された (Fig. 1)。

この分解速度は、4、20、37°Cと温度が上昇するほど促進される (Fig. 2) ことから、なんらかの特異的な分解酵素 (Protease等) が Pre Golgi領域で作用していると示唆される。しかも、この系に過剰のLDL (80  $\mu$ g コレステロール/ml, 24h)を加えると、その分解速度はさらに亢進された (Fig. 3)。

これらの知見は、肝細胞におけるLDLの制御機構が、HMG CoA reductase 活性低下という機構とともに、LDLの分解という機構が相乗的に働いていることを示唆している。

コレステロールの欠乏により、生体に障害が惹起される反面、過剰にコレステロールが取り込まれても、障害がほとんど認められない理由は、HDLにはほとんど影響されないにもかかわらずLDLに特に分解が起こり、コレステロールの細胞内恒常性維持機構が働くためと考えられる。

1. R. Hashida, C. Anamizu, J. Kimura, S. Ohkuma, Y. Yoshida and T. Takano: Transcellular transport of lipoprotein through arterial endothelial cells in monolayer culture. *Cell Struct. Funct.* **11**:31-42(1986)
2. H. Mowri, K. Chinen, S. Ohkuma and T. Takano: Peroxidized lipids isolated by HPLC from atherosclerotic aorta. *Biochem. Int.* **12**(2):347-352(1986)
3. T. Takano, K. Amanuma, J. Kimura, T. Kanaseki and S. Ohkuma: Involvement of macrophages in accumulation and elimination of cholesteryl ester in atherosclerotic aorta. *Acta Histochem. Cytochem.* **19**(1):135-143(1986)
4. R. Hashida, C. Anamizu, Y. Yagyu-Mizuno, S. Ohkuma and T. Takano: Transcellular transport of fluorescein dextran through an arterial endothelial cell monolayer. *Cell Struct. Funct.* **11**:343-349(1986)
5. J. Kimura, K. Nakagami, K. Amanuma, S. Ohkuma, Y. Yoshida and T. Takano: Monoclonal antibodies recognizing lipid-laden cells and extracellular regions with lipid-deposits in atherosclerotic aorta. *Virchows Arch. A* **410**:159-164(1986)
6. K. Amanuma, T. Kanaseki, Y. Ikeuchi, S. Ohkuma and T. Takano: Studies on fine structure and location of lipids in quick-freeze replicas of atherosclerotic aorta of WHHL rabbits. *Virchows Arch. A* **410**:231-238(1986)
7. M. Enomoto, K. Nakagami, S. Ohkuma and T. Takano: Transformation of macrophages into foam cells in vitro induced by cholesteryl oleate liquid crystals. *J. Biochem.* **101**(4):933-938(1987)
8. Y. Yagyu-Mizuno, R. Hashida, C. Mineo, S. Ikeuchi, S. Ohkuma and T. Takano: Effect of PGI<sub>2</sub> on transcellular transport of fluorescein dextran through an arterial endothelial monolayer. *Biochem. Pharmacol.* **36**(22):3809-3813(1987)

9. C. Mineo, T. Kanaseki, M. Enomoto, S. Ohkuma and T. Takano: Intracellular transport of cholesteryl esters from lysosomes to cytoplasm in macrophages. *Cell Struct. Funct.* **13**:435-443(1988)
10. T. Takano, C. Mineo, R. Hashida, Y. Yagyu-Mizuno, K. Nakagami and S. Ohkuma: Endothelial injury and accumulation of cholesterol ester derived from circulating lipoproteins. Role of Blood Flow in Atherogenesis 231-236(1988)
11. H. Mowri, S. Ohkuma and T. Takano: Monoclonal DLR1a/104G antibody recognizing peroxidized lipoproteins in atherosclerotic lesions. *Biochim. Biophys. Acta* **963**:208-214(1988)
12. K. Nakagami, O. Shimasaki, R. Sato, Y. Komine, S. Ohkuma and T. Takano: Monoclonal antibody EMR1a/212D recognizing site of deposition of extracellular lipid in atherosclerosis: Purification and characterization of the antigen. *Am. J. Pathol.* **135**(1):93-100(1989)
13. R. Sato, T. Imanaka and T. Takano: The effect of HMG-CoA reductase inhibitor (CS-514) on the synthesis and secretion of apolipoproteins B and A-1 in the human hepatoblastoma Hep G2. *Biochim. Biophys. Acta* **1042**:36-41(1990)
14. O. Shimasaki, C. Mineo, H. Mowri, S. Ohkuma and T. Takano: Accumulation of oleate-rich cholesteryl esters by acetyl-LDL in macrophages in the presence of an acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) inhibitor (Sandoz 58-035). *Biochem. Int.* **20**:389-396(1990)
15. C. Mineo, Y. Yagyu, T. Imanaka and T. Takano: Transcellular transport of angiotensin II through a cultured arterial endothelial monolayer. *Exp. Cell Res.* submitted
16. R. Sato, T. Imanaka, A. Takatsuki and T. Takano: Degradation of newly synthesized apolipoprotein B-100 in a pre-Golgi compartment. - A novel approach to intracellular protein degradation by use of Brefeldin A. *J. Biol. Chem.* submitted