1. 脂質代謝における低比重リポ蛋白 (LDL) 受容体の役割

北 徹

京都大学医学部 第三内科

Lipoprotein Metabolism in Normal and WHHL-Rabbit

Toru KITA

*The Third Division, Department of Internal Medicine,
Faculty of Medicine, Kyoto University, Kyoto*

Summary

We studied the metabolic behavior of exogenous and endogenous cholesterol carrying lipoproteins *in vivo*.

Normal and WHHL-rabbits were given intravenous injection of chylomicrons labeled either in the lipid portion with [^3H]cholesterol or in the protein portion with [^{125}I]iodine. All radio-labeled components were removed from plasma at comparable rates and the bulk of the radio-activity was found in the liver in both genotypes. It suggests that liver has a specific chylomicron remnants receptor.

Normal and WHHL-rabbits were given intravenous injection of ^{125}I -LDL and VLDL. The FCR for LDL in WHHL-rabbit was about one third the normal rate. That could not account for 20-fold increase of LDL in this rabbit. When ^{125}I -VLDL was injected to normal rabbit, it was converted to IDL and more than 90% of IDL was taken up by the liver rapidly. On the contrary, once VLDL was converted to IDL in WHHL-rabbit, it failed to enter the liver for catabolism, subsequently converted to LDL. These data suggest that endogenous lipoproteins require LDL receptor for their catabolism, and decreasing amounts of hepatic LDL receptors lead not only to impaired catabolism but to overproduction of LDL by the shunt mechanism.

はじめに

家族性高コレステロール血症のホモ接合体患者 (FH) は、心筋梗塞をきたす遺伝性疾患として最初に明らかになった疾患である。1973年、GoldsteinとBrownは、ヒト皮膚線維芽細胞を用いて、血中LDLの代謝経路であるLDL受容体を発見し、FHでは、その欠損が認められることを見いだした。彼らは、この発見により、1985年ノーベル医学、生理学賞を受賞した。生化学的、分子遺伝学的には、すでにその詳細がGoldsteinとBrownにより明らかにされたが、生体内で、このLDL受容体が各種リポ蛋白代謝に、いかなる役割を果たしているのかについては不明な点が多々あった。この問題の解明については、本日のテーマであるFHのモデル動物WHHLウサギの果たした役割が大きい。

本稿ではまず、*in vitro*の研究で明らかになったLDL代謝経路、およびLDL受容体の性質について述べ、さらにWHHLウサギを用いて明らかになった

*in vivo*におけるLDL受容体の役割について述べてみたい。

外因性、内因性コレステロール輸送の作業仮説

Fig.1のごとく、外因性コレステロールは、chylomicronsにより胸管を通り大循環に運ばれる。血管内皮に存在するlipoprotein lipase (LPL)の働きでその中性脂肪が加水分解され、コレステロールエステルに富んだchylomicron remnantsになり、速やかに肝臓に取り込まれると考えられている¹⁾。しかも、chylomicron remnantsはLDLに変換されないことはよく知られた事実である。

一方、内因性のコレステロールは肝臓からVLDLを担体として分泌される。VLDLはそのcoreに大量の中性脂肪と比較的少量のコレステロールエステルを含んでいる。脂肪組織あるいは筋肉の毛細血管内皮に存在するLPLにより、その中性脂肪が分解される。VLDLはコレステロールエステルに富んだIDLに移行するわけである。IDLの一部は再び肝臓に取り込ま

Fig.1. Separate pathways for receptor-mediated metabolism of lipoproteins carrying endogenous and exogenous cholesterol.⁴⁾

Fig.2. Circulating LDL.¹⁴⁾

れる。さらに LPL により中性脂肪がほとんど分解され、コレステロールエステルに富んだ LDL に移行する。LDL はアポ B-100 を表面に有しており、肝および肝外²³⁾の LDL 受容体にアポ B-100 が認識されることにより受容体を介してその 2/3 が代謝され、1/3 は LDL 受容体非依存性経路で代謝されると考えられている。

LDL pathway

Fig.2 は、Goldstein と Brown により明らかにされた LDL pathway シェーマである。すなわち、細胞には血中に LDL の形で存在するコレステロールエステルを取り込み、利用する一連の系がある。LDL は細胞表面にある LDL 受容体にその構成蛋白であるアポ B-100 が結合し、LDL 受容体-LDL 複合体が coated pit に集合することにより、細胞内に endocytosis の機構で取り込まれる²⁾。LDL は cytosol で lysosome に融合し、アポ B-100 はアミノ酸に分解される。コレステロールエステルは加水分解を受けて、遊離コレステロールになり、細胞膜の構成成分として、また胆汁酸あるいはステロイドホルモンなどの前駆体として、各組織での必要性に応じ使われる。細胞内にとって必要以上のコレステロールの供給は次の三つの反応を引き起こす。1) *de novo* のコレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素の抑制、2) これ以上の LDL の取り込みを抑制する意味での LDL 受容体の合成の抑制、3) 余分の遊離コレステロールを ACAT の活性化により、コレステロールエステルに変換して貯蔵する。この LDL 受容体は Schneider により精製され、その分子量が 16 万で、N および O-結合の糖鎖を有する糖蛋白であることが明らかになった^{8,7)}。さらに、Russell、山本らによって、ウシ、ヒトの LDL 受容体 messenger RNA が精製され⁹⁾、その遺伝子構造も決定された。ヒトの LDL 受容体遺伝子は、クロモソームの 19 番目に位置していることも明らかになっている。Fig.3 はヒト LDL 受容体 messenger RNA のヌクレオチド配列から明らかになったアミノ酸を基にして想像される LDL 受容体蛋白の二次構造のシェーマである。家族性高コレステロール血症(FH)ホモ接合体は、LDL 受容体蛋白の異常により惹起されることを Goldstein と Brown は明らかにし、次の 4 種の遺伝的異常を示した⁹⁾。1) LDL 受容体 messenger RNA は存在するが、LDL 受容体蛋白は存在しない。すなわち翻訳障害が存在する型、2) 翻訳はされるが、糖鎖が LDL 受容体蛋白

Fig.3. LDL Receptor.¹⁴⁾

に結合しない型、したがってゴルジ装置に LDL 受容体蛋白が移行しない型、3) 糖鎖が結合し、LDL 受容体は細胞表面に出現するが、LDL に結合できない型、すなわち LDL のアポ B-100 に結合する場所に異常がある、4) LDL 受容体は細胞表面に現われ、LDL と結合するが、endocytosis に必要不可欠の coated pit への集簇ができない型が明らかにされている。これ以外にも、理論的には LDL 受容体構造遺伝子の欠損、あるいは構造遺伝子は存在するが、その構造遺伝子周辺のヌクレオチド配列の異常により、転写が惹起しない型などが考えられ、今後の検討が待たれる。

WHHL (Watanabe Heritable Hyperlipidemic) ウサギ

WHHL ウサギは、LDL 受容体遺伝子の突然変異により高コレステロール血症が出現する。そのホモ接合体は正常ウサギに比して、血漿 IDL, LDL コレステロールおよびアポ B-100 値が 10 倍以上の高値を示し、若齢時より黄血腫、動脈硬化を引き起こす特徴を有していることが明らかになり、ヒト FH のモデル動物として確立された^{4,10,11)}。

われわれの研究から、正常ウサギ実質細胞には、LDL 受容体は発現しているが、WHHL ウサギにはその発現が認められないことがわかり、WHHL ウサギは LDL 受容体の single gene mutation であることが確認された¹⁰⁾。そこで正常ウサギと WHHL ウサギのリポ蛋白代謝を比較検討することにより、各種リポ蛋白代謝における LDL 受容体の役割を明らかにすることが可能になってきた。

すなわち、もしも ^{125}I で標識したリポ蛋白の代謝が WHHL ウサギで遅延していれば、そのリポ蛋白代謝には LDL 受容体が必要であるということになる。逆に、代謝に差がなければ他の機構を考える必要がある。

Chylomicrons の代謝

Chylomicrons は LPL により、その中性脂肪が分解され、相対的にコレステロールの含量の増加した chylomicron remnants に移行すれば、速やかに肝臓に取り込まれ代謝される。In vitro ではその構成蛋白であるアポ E が認識され、LDL 受容体に結合し、細胞内に取り込まれることがすでに知られている。ところが、FH ホモ接合体あるいは WHHL ウサギの血中に、その蓄積を認めないことから、in vivo ではアポ B-100 を有するリポ蛋白を認識する LDL 受容体とは異なった経路により代謝されているであろうと考えられていた。

われわれは WHHL ウサギを用いて chylomicrons の代謝における LDL 受容体の役割について、in vivo で実験を試みた。すなわち、 ^{125}I で chylomicrons のアポ蛋白部分を標識し、その turnover rate を正常および WHHL ウサギで比較した。WHHL ウサギは LDL 受容体欠損があるため、本ウサギでその代謝に遅延があれば、その代謝に LDL 受容体が必要であることになる。Fig. 4 のごとく両者にまったく差がなく、非常に早い速度で代謝されることが明らかになった。

また、chylomicrons の脂質部分（コレステロール）を ^3H で標識し、両ウサギに静注したところ、 ^{125}I で蛋白部分を標識した場合と同じ turnover rate を示した。さらに静注後 15 分で屠殺し、全身の ^3H コレステロールの取り込みをみたところ、Fig. 5 のごとく、静注 ^3H コレステロールの大部分のカウント（すなわち、約 60%）が両ウサギとも肝臓に認められた。以上の事実から、chylomicrons は蛋白部分、あるいは脂質部分を標識したいずれの場合でも、その turnover は非常に速く、その大部分が肝臓に取り込まれた。すなわち肝臓には LDL 受容体とは遺伝的に異なる chylomicron remnants 受容体が存在することを強く示唆したことになる¹⁾。ところが、chylomicron remnants と同様、その構成蛋白にアポ E を有している IDL が WHHL ウサギでは上昇していることから、chylomicron remnants 受容体にリポ蛋白が結合するためには、アポ E は必須であるが、十分ではないことになる。Chylomicron remnants はアポ

Fig. 4. Disappearance of ^{125}I -chylomicrons from the unfractionated plasma of normal and WHHL-rabbits.

Fig. 5. Uptake of ^3H cholesterol labeled chylomicrons.

E 以外にアポ B-48 を有しており、IDL はアポ B-100 を有している。したがってアポ B-48, B-100 が chylomicron remnants 受容体あるいは LDL 受容体へそれぞれの結合にアポ E に加えてなんらかの役割を有していると考えられ、今後の研究が待たれる。WHHL ウサギの肝臓を用いて chylomicron remnants 受容体を単離することは、上記事実からいっても近道と思われる。真の受容体-アポ蛋白関係を検討する意味でも必要である。また上記実験事実よりその存在が示唆される chylomicron remnants 受容体の異常症、あるいは欠損症が見いだされるのは臨床的にも近いと思われるし、そういった目で患者を観察する必要がある。

In vivo での VLDL, IDL, LDL 代謝における LDL 受容体の役割

1) LDL 代謝: FH 患者あるいは WHHL ウサギの LDL 値が高いということは、その代謝に LDL 受容体が重要な役割を果たしているということを示唆している。これを前述した WHHL ウサギを用いて in vivo で直接証明したのが次の実験である。Mahley ら

は、LDL の構成蛋白アポ B-100 を methyl 化すると、LDL 受容体に結合しなくなることを見いだした。そこで methyl 化 LDL のアポ B-100 を ^{125}I で、native LDL のアポ B-100 を ^{131}I で標識し、その代謝回転を調べると、正常ウサギでは、native LDL は methyl 化 LDL の約 3 倍の速度で代謝されるが、WHHL ウサギでは、LDL 受容体が欠損しているために methyl 化 LDL, native LDL とともに差がなく、正常ウサギの methyl 化 LDL の代謝速度と一致した。WHHL ウサギの FCR は、正常のウサギの FCR の約 1/3 であった¹²⁾。ところが WHHL の血漿 LDL 値は正常の 20 倍の高値を示しており、その異化率低下だけでは説明がつかない。すなわち、理論的には WHHL ウサギでは LDL の異化低下に加えて、約 6 倍の産生過剰がなければならない。

2) VLDL, IDL の代謝：約 6 倍の LDL の産生過剰は次の三つの可能性が考えられる。(1)WHHL ウサギでは VLDL の分泌過剰がある。(2)WHHL ウサギでは LDL が肝臓から直接分泌される。(3)VLDL→IDL→LDL の前駆体、最終産物の異化過程が正常およ

Fig. 6. Uptake of ^{125}I -labeled VLDL.

び WHHL ウサギで異なる。VLDL の蛋白部分を ^{125}I で標識し、正常、WHHL ウサギで turnover を比較した。すると、正常ウサギでは速やかに ^{125}I -VLDL は血中より消失し Fig. 6 のごとく静注 30 分後には投与量の 33% が肝臓に取り込まれた。一方、WHHL では ^{125}I -VLDL の代謝は遅延し、肝臓には約 3% の取り込みしか認められない。さらに、 ^{125}I -VLDL の IDL, LDL への移行をその構成蛋白である ^{125}I -アポ B-100 で追跡したのが Fig. 7 である。正常ウサギでは、 ^{125}I -VLDL は速やかに VLDL 分画から消失し、IDL 分画に移行する。IDL は、速やかに IDL 分画から消失するが LDL 分画へは移行してこない。つまり Fig. 6, 7 の結果を考え合わせると、VLDL は IDL に移行したのち、その大部分が速やかに肝臓に取り込まれ、IDL の一部 (10%以下) が LDL まで移行するわけである^{11,13)}。

ところが LDL 受容体の欠損した WHHL ウサギでは、VLDL は長時間血中に停滞し、徐々に IDL に移行し、IDL はさらに LDL へゆっくりと移行してくるわけである。

すなわち、正常ウサギでは VLDL は肝臓から分泌され、LPL の作用により IDL に移行する。この IDL の大部分が肝臓の LDL 受容体により速やかに肝臓に取り込まれる。In vitro の線維芽細胞培養系を用いた実験から、アポ E はアポ B-100 に比して、LDL 受容体に対する親和性が 10~20 倍高いことがすでに知られている。

さて、IDL は構成蛋白にアポ E を含んでおり、したがって in vivo で IDL はその構成蛋白であるアポ E が肝臓の LDL 受容体に認識されることにより、速やかに取り込まれ代謝されると考えられる。ところ

Fig. 7. Autoradiograms of SDS gels showing the changes in the distribution of ^{125}I -apo B-100 among plasma VLDL, IDL and LDL after intravenous injection of ^{125}I -VLDL into normal and WHHL-rabbits.

Fig.8. Shunt pathway for the production of low density lipoprotein (LDL).⁴⁾

が、WHHL では肝臓の LDL 受容体が欠損しているために、IDL は肝臓に取り込まれることなく LDL まで移行する。LDL はアポ B-100 を有しているが、LDL 受容体欠損のため、もっぱら LDL 受容体非依存性経路 (scavenger pathway) で効率悪く代謝される。また別の実験から、上記の(1)、(2)の可能性は否定されており、結果をまとめると Fig.8 になる。単一蛋白である LDL 受容体の肝臓での減少、あるいは欠損は、血中 LDL の産生過剰および異化低下という相乗作用をもたらし、その結果血中 LDL 値は上昇するという機構が明らかになった⁴⁾。

おわりに

本稿では、リポ蛋白受容体によるリポ蛋白異化機構というテーマで、1) アポ蛋白と chylomicron remnants 受容体、2) アポ E、アポ B-100 と LDL 受容体について述べた。1) に関しては、アポ蛋白の側からはアポ E が重要であることを述べたが、アポ B-48、あるいはアポ B-100 が、何らかの機構で chylomicron remnants 受容体への認識に関与していることは明らかであり、今後の検討が必要である。また、chylomicron remnants 受容体が存在していることは疑う余地もないが、今後その単離、性質に関する研究ばかりでなく、臨床的にこの受容体欠損症を見いだす努力が必要と思われる。また2) に関しては、LDL 受容体の研究が Goldstein と Brown の研究で、生化学的、遺伝学的に非常によく解析されるに至ったが、今後 LDL 受容体に認識される側のアポ E および B-100 の研究の発展が期待される。Ⅲ型高脂血

症患者のアポ E の解析から、その受容体への結合部位などが明らかになってきたが、アポ B-100 に関して、そのアミノ酸構造の決定、遺伝子単離などの研究の発展を期待する。臨床的には、アポ B-100 異常症、つまり LDL 受容体は正常でも、アポ B-100 の異常のために、Ⅱa 型高脂血症を呈している患者の発見が待たれる。

文 献

- 1) Kita, T., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Watanabe, Y., Hornick, C.A. and Havel, R. J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 3623 (1982)
- 2) Kovanen, P.T., Faust, J.R., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. : *Endocrinology*, **104**, 599 (1979)
- 3) Kita, T., Beisiegel, U., Goldstein, J.L., Schneider, W.J. and Brown, M.S. : *J. Biol. Chem.*, **256**, 4701 (1981)
- 4) Goldstein, J.L., Kita, T. and Brown, M.S. : *N. Engl. J. Med.*, **309**, 288 (1983)
- 5) Goldstein, J.L. and Brown, M.S. : *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 897 (1977)
- 6) Schneider, W.J., Beisiegel, U., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. : *J. Biol. Chem.*, **257**, 2664 (1982)
- 7) Cummings, R.D., Kornfeld, S., Schneider, W.J., Hobgood, K.K., Tolleshaug, H., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. : *J. Biol. Chem.*, **258**, 15261 (1983)
- 8) Yamamoto, T., Davis, C.G., Brown, M.S., Schneider, W.J., Casey, M.L., Goldstein, J.L. and Russell, D.W. : *Cell*, **39**, 27 (1984)
- 9) Tolleshaug, H., Hobgood, K.K., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. : *Cell*, **32**, 941 (1983)
- 10) Kita, T., Brown, M.S., Bilheimer, D.W. and Goldstein, J.L. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 2268 (1981)
- 11) 北 徹, 横出正之, 河合忠一 : 代謝, **22**, 635 (1985)
- 12) Bilheimer, D.W., Watanabe, Y. and Kita, T. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 3305 (1982)
- 13) Kita, T., Brown, M.S., Bilheimer, D.W. and Goldstein, J.L. : *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **79**, 5693 (1982)
- 14) Brown, M.S. and Goldstein, J.L. : *Sci. Am.*, **251**, 58 (1984)