ラット肝細胞における LDL 受容体の精製の試み*

木 下 誠** 寺 本 民 生** 加 藤 泰 一**
橋 本 佳 明** 岡 博**

I. はじめに

成熟ラットの肝細胞膜 LDL 受容体が、エストロゲン投与により活性化される¹⁾ことを利用し、ラット肝の LDL 受容体の分離、精製を試みた。

II. 方 法

体重 160~200 gr のウィスター系雄ラットにブロピレングリコールに溶解したエストラジオール (E₂) 5 mg/kg を 5 日間連続皮下注射した。肝細胞膜分画は、肝をホモゲナイズ後 8,000 g~100,000 g の分画を採取し、Goldstein らの方法²⁾に従い可溶化した。可溶化した膜分画を Phosphatidylcholine-liposome にて沈殿させ、受容体活性を測定した。受容体の分離にはイオン交換カラム (DE 52, 2.6×7 cm) を用いた。受容体の Ligand Blot-

ting はニトロセルロースペーパーを LDL と incubate 後よく洗い、抗 β リポ蛋白抗体と incubate 後再びよく洗い、¹²⁵I-Protein A と反応させ autoradiography にて観察した。

III. 結果・考察

E₂ を投与したラット血清を分析したところ、対照群に比し TC, HDL-C, TG に有意の低下が認められ、LDL 受容体が活性化されていることが推測された。Phosphatidylcholine-liposome で沈殿させた膜成分と ¹²⁵I-LDL との結合を調べた結果、¹²⁵I-LDL と膜成分との specific binding は飽和曲線を示し (Fig. 1), 多量の native LDL で抑制された (Fig. 2)。したがってこの部分に LDL 受容体が存在することが認められた。

この可溶化した膜成分を DE52 で分離した結果、

Fig. 1 Saturation curve for the binding of ¹²⁵I-LDL to liver membranes from estradiol-treated rats.

* 1984年6月、第16回日本動脈硬化学会総会において発表

** 東京大学医学部第一内科

Fig. 2 Competitive inhibition for the binding of ¹²⁵I-LDL.

Fig. 3 DE52 chromatography of solubilized rat liver membrane and ligand blotting of LDL receptor (A; Molecular weight marker, B; DE52 fraction corresponding the high receptor activity was subjected to 7% SDS-PAGE. The proteins were transferred electrophoretically to nitrocellulose paper and incubated with human LDL followed by incubation anti- β -lipoprotein antibody and by ¹²⁵I-Protein A. The dried paper was processed for autoradiography).

塩濃度 100~150 mM において受容体の溶出が認められた (Fig. 3). 受容体活性の存在する分画を、7% PAGE で泳動しニトロセルロースペーパーに

転写し、LDL 受容体の Ligand Blotting を行ったところ、分子量約 130 K の蛋白に、LDL との結合が認められた。

IV. ま と め

1. ラット肝臓の LDL 受容体活性をエストロゲン投与で上昇させ、その分離、精製を試みた。
2. ラット肝の LDL 受容体は、イオン交換カラムで分離でき、その分子量は約 130 K であった。
3. LDL 受容体の精製は Goldstein らが牛副腎を用いて行っているが^{2,3)} 今回の結果はそれとよく一致した。

文 献

- 1) Kovanen, P. T., Brown, M. S. and Goldstein, J. L.: Increased binding of low density lipoprotein to liver membranes from rats treated with 17 α -ethinyl estradiol. *J. Biol. Chem.*, **254**: 11367 (1979).
- 2) Schneider, W. J., Goldstein, J. L. and Brown, M. S.: Partial purification and characterization of the low density lipoprotein receptor from bovine adrenal cortex. *J. Biol. Chem.*, **255**: 11442 (1980).
- 3) Daniel, T. O., Schneider, W. J., Goldstein, J. L. and Brown, M. S.: Visualization of lipoprotein receptors by ligand blotting. *J. Biol. Chem.*, **258**: 4606 (1983).

Summary

Partial Purification of LDL Receptor of Rat Liver Membrane

Makoto KINOSHITA, Tamio TERAMOTO, Hirokazu KATO,
Yoshiaki HASHIMOTO and Hiroshi OKA

First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo

Low density lipoprotein (LDL) receptor has been partially purified from rat liver membrane as following. The hepatic LDL receptor was activated by five-day injection of estradiol (5 mg/kg body weight). LDL receptor containing proteins were solubilized with use of detergent, n-octylglucopyranoside, from the membrane fraction, which was prepared ultracentrifugally as 8,000 g–100,000 g fraction. The solubilized membrane proteins were loaded on DE52 and eluted with an NaCl gradient containing n-octylglucopyranoside. The LDL re-

ceptor activity, which was expressed as ^{125}I -LDL binding activity precipitated with phosphatidylcholine-liposomes, appeared at about 100 to 150 mM NaCl.

The ligand blotting of LDL receptor revealed that the molecular weight of LDL receptor of rat liver membrane is about 130,000 and this coincident closely with that of bovine adrenal cortex.

Key words: LDL receptor, Rat liver membrane, Ligand blotting.