動脈硬化症動脈壁 lysosome 膜の脂質組成について*

武 藤 喜美子** 黒 坂 昌 弘*** 碓 井 眞 澄**
今 中 常 雄** 大 熊 勝 治** 高 野 達 哉**

はじめに

粥状動脈硬化症における cholesteryl ester 蓄積について、我々は、lysosome 内脂質分解機構に何らかの異常が生ずる時 lipoprotein 中の cholesteryl ester が分解されずに lysosome に蓄積してゆくという可能性を指摘してきた。すなわち、動脈壁より分離した cholesteryl ester を蓄積していると考えられる軽くなった lysosome (light lysosome) では、acid cholesteryl esterase 活性が低下していることを見い出してきた¹⁾。

今回、我々は、light lysosome 膜の性質について知見を得るために、light lysosome 膜の脂質組成について調べてみた。

実験方法

実験的動脈硬化症家兎動脈壁、動脈硬化症ヒト動脈壁を細切して、0.34 M SVE (sucrose versene ethanol) 中にてhomogenize し 0.25 M SVEを上層して遠心することにより、light lysosome 分画を得た。この分画を sucrose にて比重 1.26 に合わせ、比重 1.0~1.25 の linear sucrose gradient を上層して遠心すると、操作中に lysosome はこわれて、比重 1.00 に lipid inclusion body が、比重 1.03 付近に lysosome 膜が浮上してき、light lysosome 膜分画を得ることができた¹⁾。

この膜分画から Blight Dyer²⁾ 法にて総脂質分画を調製し、脂質分析を行なった。

リン脂質の定量については、調製できる膜分画が微量であるため、島津二波長クロマトスキャナ

を用いる微量定量法を確立した。一枚の MERCK HPTLC plate に、standard としての各リン脂質 mixture、及び総脂質分画を spot し、CHCl₃/MeOH/AcOH/水 (25: 15: 4: 1)³⁾ にて展開後、50% 硫酸噴霧、加熱により spot を黒化させた。各 spot は 550 nm の吸収の積分値を求め、standard curve を描くことにより、定量を行なった。

Cholesterol は EASTMAM CHROMAGRAM SHEET を用い cyclohexane/benzene/AcOH (60: 60: 0.1) にて free と ester に分離、抽出後、campesterol を internal standard としてガスクロにて定量し、リン脂質中のリンに対するモル比で表示した。リンの定量は Chen⁴⁾ 法にて行なった。

結 果

Standard リン脂質 spot の 550 nm 吸収の積分値は、Fig. 1 に示したように、各リン脂質ごとに濃度に比例した直線関係となり、リン脂質として 7 µg ほどの微量でも定量が可能であることがわかった。

この方法を用いて、動脈硬化症動脈壁 light lysosome のリン脂質組成を調べた。(Table 1) control としての normal lysosome は、動脈では調製できないので、R. Henning らの rat liver lysosome の脂質組成⁶⁾ と比較した。normal lysosome では、PC 次いで PE の占める割合が多いのに対して、light lysosome では、ヒト 2 検体、ウサギ 2 検体ともに、SM の占める割合が著しく高くなっており、PE の占める割合は少なくなる傾

Abbreviations:

SM: sphingomyelin, PC: phosphatidylcholine
PI: phosphatidylinositol, PS: phosphatidylserine,
PE: phosphatidylethanolamine CL: cardiolipin

* 1980 年 6 月、第12回日本動脈硬化学会において発表

** 帝京大学薬学部微生物学教室

*** 神戸大学医学部整形外科

Table 1 Lipid composition of lysosomal membranes.

Phospholipid distribution is presented in percentage of total phospholipid phosphorus. PS and PI are determined together as PS. Phospholipids except SM, PC, PS (PI) and PE were not detected.

Cholesterols are presented in molar cholesterol/phospholipid phosphorus ratios.

Membrane Tissue	Normal Lysosome *Rat Liver	Light Lysosome					
		Human Aorta		Rabbit Aorta			
Sample		1	2	1	2	3	4
lysoPC	0.9	—	—	—	—		
SM	7.6	64	56	28	35		
PC	41.4	33	23	39	40		
lysoPE	2.9	—	—	—	—		
PI	9.7	} 3	8	15	11	***n.d.	n.d.
PS	3.0						
PE	26.3						
CL	4.0	<3	13	18	14		
Others	4.2	—	—	—	—		
Cholesterol**							
Free	0.295	2.3	2.5	***n.d.	2.7	2.9	3.9
Ester		2.0	1.4		0.53	0.35	0.78

* R. Henning et al. B. B. A. **354**, 326–335 (1974)

** molar cholesterol/phospholipid phosphorus ratio

*** not determined

Fig. 1 Standard curves for determination of phospholipids.

向にあることがわかった。

Cholesterol については, light lysosome では, ヒト, ウサギともに normal lysosome の 8 倍から 13 倍と著しく増加していることがわかった。尚,

膜分画には cholesteryl ester も検出されるが, これは, lipid inclusion body の混入であると考えている。

考 察

以上のような lysosome 膜異常の cholesteryl ester 蓄積への関与については今後の問題であるが, いくつかの可能性が考えられる。1 つは, lysosome の acid cholesteryl esterase が膜依存性酵素であるため¹⁾, lysosome 膜の異常により活性が低下し, cholesteryl ester を蓄積してしまう可能性である。もう 1 つは, lysosome 膜の cholesterol 含量増加により lysosome が fusion できなくなり, 内容物を細胞外に捨てたり, primary lysosome から分解酵素を補充したりできず, cholesteryl ester を蓄積してしまう可能性である。

さらに, lysosome 膜が, 何故このような異常な組成になるかも興味深い問題で, 今後考えてゆきたい。

文 献

- 1) Takano, T. and Imanaka, T.: Lysosomal acid

- cholesteryl esterase and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbit. *Acta Histochem. Cytochem.*, **11**: 321 (1978).
- 2) Bligh, E. G. and Dyer, W. J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**: 911 (1959).
- 3) Skipski, V. P., Peterson, R. F. and Barclay, M.: Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography. *Biochem. J.*, **90**: 374 (1964).
- 4) Ames, B. N. and Dubin, D. T.: The role of polyamines in the neutralization of bacteriophage deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.*, **235**: 769 (1960).
- 5) Henning, R. and Heidrich, H.-G.: Membrane lipids of rat liver lysosomes prepared by free-flow electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta*, **345**: 326 (1974).

Summary

Lipid Composition of Light Lysosomal Membranes in Atherosclerotic Aorta

Kimiko MUTO, Masahiro KUROSAKA*, Masumi USUI, Tsuneo IMANAKA,
Shoji OHKUMA and Tatsuya TAKANO

Teikyo University, Faculty of Pharmaceutical Science, Kanagawa, Japan

*Kobe University, School of Medicine, Kobe, Japan

Lipid composition of light lysosomal membranes in rabbit and human arterial wall was analysed. Following properties were observed in these fractions.

1) Concerning phospholipid composition, percentage of sphingomyelin was remarkably high and that of phosphatidylethanolamine was rather low.

2) Molar ratio of free cholesterol to phospholipid was unusually high.

Such alternation of lysosomal membranes may possibly involve in cholesteryl ester accumulation in arterial wall by the reduction of acid cholesteryl esterase activity or the malfunction in fusion capacity of lysosomal membranes.

Key words: lysosome, cholesterol, phospholipid