リポタンパク質粒子 Chylomicron と Disk-HDL モデルの 形成とその機能

半田哲郎

鈴鹿医療科学大学 薬学部
〒513-8670 三重県鈴鹿市南玉垣町 3500-3

Reconstitution of Distinct Lipoprotein Models, Chylomicron and Disk-High-Density Lipoprotein (Disk-HDL)

Tetsurou Handa

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Suzuka University of Medical Science
Minamitamagaki-cho 3500-3, Suzuka, Mie 513-8670, Japan

A: Thermodynamic stability of disk-HDL was evaluated to be more stable than the starting mixture of free apoA-I and phosphatidylcholine (PC) large unilamellar vesicle (LUV). However, the rate of disk formation was very slow, suggesting the large kinetic barrier. Addition of sphingomyelin led to rapid microsolvubilization of LUV and formation of the disk. Conformational change of apoA-I in acidic condition also resulted in progressive transformation of PC LUV to the disk. These findings raise the possibility that ABCA1 may act to lower the kinetic barrier and facilitate the disk-HDL generation.

B: Cholesterol (Chol)-rich lipid emulsion (triolein-PC/Chol emulsion) was prepared as a model for chylomicron remnant. Internalization of the emulsion particles into macrophages induced leakage of lysosomal protease, cathepsin-L, to cytosol and cell death. This observation implied that Chol of chylomicron remnant plays a role in accelerating atherosclerosis.

Keywords: lipoprotein model / chylomicron / disk-high-density lipoprotein / cholesterol / cytotoxicity / thermodynamics of HDL reconstitution

1. はじめに

コレステロール (Chol) は哺乳類の細胞膜の形成に必須であり, その 1/3 が脳・神経系に分布し情報処理・伝達機能に関わっている. Chol は脳・神経系以外の全身の細胞膜でもその生理的機能を調整している. 細胞内の過剰の Chol は膜の機能障害を誘起して細胞死を導く. 過剰の Chol は酵素 ACAT (acyl

CoA-cholesterol acyltransferase) によりエステル化される. エステル化されたコレステロールエステル (CE) あるいはオレイン酸コレステロール (CO) は不活性な貯蔵・運搬型コレステロールである. ヒトでは Chol の約 65% が体内で合成されるが不足分は食事によって補う必要がある. Chol は体内から失われないように大切に保持されているが, 飽食の時代にあっては過剰の Chol は悪玉として忌み嫌われるという 2 重性をもつ生体分子である. Chol およびそのエステルの体内の送達と分布は血漿リポタンパクであるキロミクロン (Chylomicrons), 超低密度リポタンパク VLDL, 低密度リポタンパク LDL, 高密度リポタ

Fig. 1 Schematic representation of reverse cholesterol transport.

Fig. 2 Temperature-dependence of disk-HDL formation void: PC LUV, disc: Disk-HDL.

ンパク HDL によって調整されている。しばしば、LDL は悪玉コレステロール、HDL は善玉コレステロールと呼ばれる。これらのリポタンパクのバランスが崩れると動脈硬化、脳や心臓の疾患を発症する^{1,2)}。

2. A HDL による細胞からの脂質搬出と Disk-HDL の再構成の熱力学

高密度リポタンパク HDL はアポリポタンパク（主に apoA-I）と脂質によって構成される 8～10 nm のナノ粒子であり、末梢細胞から肝臓へ Chol を運搬する。肝臓で Chol が胆汁酸に変換され腸管に分泌される。これが唯一の Chol 体外排出経路である。この過

Fig. 3 CD spectra of apoA-I in solution and disk-HDL.

剰の Chol の排出経路は reverse cholesterol transport と呼ばれている。20 世紀末に HDL 生合成（新生）を担う膜タンパク ABCA1 が同定された (Fig. 1)³⁾。しかし、この発生期の disk 状の HDL (disk-HDL) 新生メカニズムはわかっていない。

著者等は disk-HDL の生物物理化学的な正体を明らかにして、動物細胞でのその新生の機構について研究した。

3. 2 apoA-I + 156 POPC (レシチン 2 分子膜リポソーム) → Disk-HDL

この反応はギブズエネルギーが低下する熱力学的に有利な方向である ($\Delta G^0 < 0$)。しかし、反応は疎水性の高エネルギー遷移状態を経由するためほとんど進行しない。デオキシコール酸塩を加え、脂質分子の水中移動を促進し、反応速度を高め平衡に到達させる。次にデオキシコール酸塩を透析で引き抜く。透析中は熱力学的平衡（可逆性）が維持され、最終的にデオキシコール酸塩を含有しない apoA-I, POPC リポソームと disk-HDL の平衡に到達する。この系の組成分析より、disk-HDL 生成の平衡定数やギブズエネルギー変化 (ΔG^0) を得る。Fig. 2 で明らかなように、disk-HDL の生成率は温度が低いほど高くなり、発熱反応（エンタルピー変化 $\Delta H^0 < 0$ ）であることがわかる。

37 °C では、 $\Delta G^0 = -52$ kJ/mol、ファンツホフプロットにより、 $\Delta H^0 = -622$ kJ/mol、また、 $-T\Delta S^0 = 570$ kJ/mol（すなわちエントロピー変化 $\Delta S^0 = -1.84$ kJ/mol·K）が求まる。Disk-HDL の生成は発熱性で、系外への熱の散逸によるエントロピー増大が disk-HDL 生成によるエントロピー低下を補い、反応方向を有利に導いている。この熱力学的メカニズム

Table 1 Thermodynamic parameters of disk-HDL formation (37 °C).

	ΔG° (kJ/Disk mol)	ΔH° (kJ/Disk mol)	$-T\Delta S^\circ$ (kJ/Disk mol)*
apoA-I + PC LUV $\rightarrow$ disk-HDL	-52	-622	570
apoA-I: in solution $\rightarrow$ disk-HDL	-74	-461	387
PC: PC LUV $\rightarrow$ disk-HDL	22	-161	183

* $\Delta S^\circ = -T\Delta S^\circ/310$, at 37 °C **Fig. 4** Thermodynamic scheme of disk-HDL formation. The activation barrier of disk-HDL formation is high, and the mixture of free apoA-I and vesicles (POPC liposomes) is metastable.

は disk-HDL 生成に伴う apoA-I の構造変化に負っている (Fig. 3 および Table 1 参照). 水溶液中の遊離 apoA-I が disk-HDL に移動して α -helix 含量が大幅に増大し, これに伴う発熱が反応の進行を担保している. それにもかかわらず試験管中や培養細胞系でこの反応が容易に進行しないのは, apoA-I やリン脂質の疎水性面が露出した遷移状態の活性化エネルギーが高いためである (Fig. 4)⁴⁾.

動物細胞膜の表面には, リン脂質としてレシチン (PC) とスフィンゴミエリン (SM) が存在し, 相分離あるいはクラスター形成していることが知られている. Fig. 5 は人工の脂質 2 分子膜, LUV 表面の PC-SM 相分離あるいはクラスター化がトリガーとなって apoA-I との相互作用が昂進され, disk-HDL 生成が促進されることを示している. 粒子径 100 nm のリポソーム (LUV) が直径 10 nm, 厚さ 5 nm の disk に変化すれば光散乱 (濁度) は千分の一以下に低下する (Fig. 5 および Fig. 6)⁵⁾. これとは別に, 水中で apoA-I の構造が変化して水との疎水的相互作用が増大すれば, apoA-I は不安定化して速やかにリポソームと相互作用する. これによりリポソームを崩壊してナノ粒子 disk-HDL を生成する (data 省略)⁶⁾. 本研究の結果と最近の ABCA1 による HDL 新生に関する研究成果⁷⁾ を比較すると, ABCA1 は apoA-I の分子シャペロンの機能, あるいはまたリン脂質のクラス

Fig. 5 Rapid decrease of light scattering during conversion of PC-SM LUV (100 nm) to disk-HDL (10 nm $\times$ 5 nm). **Fig. 6** Electron microscopic picture of reconstituted disk-HDL.Inset: Rat plasma disk-HDL (pre- β -HDL).

ター化機能を持つと推定される. これらのメカニズムに対しては, それぞれ実験的な支持が報告されているが完全には確立されていない.

さて, 試験管中で再構成された disk-HDL を動物血中に投与すると, 一過的に血中 Chol レベルが低下する. これを持続化するには, disk-HDL の動物体内での生成を継続させる医薬品の開発が必要である. 一方, disk-HDL を医薬品の送達システムとして利用する試みも散見されるが, 紹介は割愛する.

4. B Triglyceride-Rich リポタンパクモデル粒子の形成とその機能

キロミクロン chylomicron や VLDL は, トリグリセリド (TG) の油滴コアを PC の単分子膜が覆ったエマルション構造をもつリポタンパクである. 肝臓から放出された VLDL (約 70 nm) や小腸で分泌されたキロミクロン (~ 100 nm) は, 血中で代謝あるいは異化 (catabolism) されるとレムナント remnant になり, その体内動態が変化する. A の章で述べた HDL は善玉コレステロールと呼ばれているが, chylomicron remnant, VLDL remnant や LDL は悪玉コレステ

Fig. 7 Chylomicron and VLDL metabolism in plasma. Chylomicron remnant and VLDL remnant contain high % of Chol in surface lipid monolayer.

Fig. 8 Plasma-clearance of lipid emulsion and liposome. PC: egg PC, Chol: cholesterol, TO: triolein, CO: cholesterol oleate.

ロールと呼ばれている (Fig. 7). 著者らは、これらのリポタンパク粒子の血中異化による脂質組成変化がその動態変化と関係すると考え、トリグリセリド TG (TGとしてトリオレインTOを用いた) あるいはコレステロールエステルCE (CEとしてオレイン酸コレステロールCOを用いた) をコア脂質とするエマルション粒子 (100 nm) をリポタンパクの基本構造として調査を行った。

Fig. 8に示すように、PCリボソームにくらべPC/TOエマルションはラット血中からの消失が速い。このエマルションのTOをコレステロールエステルCOに置き換えると、ラット血中から組織への移行が遅延する。さらに表面のPC膜にスフィンゴミエリンSMを添加しても同様な遅延が見られる。脂質組成により表面膜にミクロな構造変化がおり、脂質粒

Fig. 9 Cytotoxicity of remnant model (TO-PC/Chol emulsions)

Heparin inhibits apoE-mediated binding of lipid particle to cells.

Fig. 10 Cytotoxicity of remnant model particle (TO-PC/Chol emulsion).

子へのアポリタンパク E (apoE) の結合性に影響すると結論された。これらの結果はVLDLがLDLに異化するに伴いCOやSMが蓄積し、その血中動態が変化することと関係している⁸⁻¹¹⁾。一方、エマルション表面のPC単分子膜にCholを添加すると、血中から組織への移行が促進される。この(表面/コア)が[(PC+Chol)/TO]の組成をもつカイロミクロンレムナントのモデル粒子は、培養液からHepG2やJ774細胞への移行がCholを含有しない粒子より昂進され、かつ細胞死を誘導する^{12,13)}。これはレムナント粒子が心臓や肺に急性の障害を導く危険なリポタンパクであるという知見と符合する。

Chol-richレムナントモデル粒子とJ774細胞の相互作用を、LDLやアセチル化LDL (Ac-LDL) と比較して調査した。いずれの粒子も細胞に取り込まれ、

Cholをlysosomeに蓄積するが、Chol-richレムナントモデルのみが急性の細胞死を誘導した (Fig. 9). Chol-richレムナントモデルのみが、細胞のlysosomeのタンパク分解酵素, cathepsin-Lを顕著に細胞質に漏洩させることもわかった. Chol-richレムナントモデルはCholをlysosome膜に速やかに蓄積し、これを障害する. 細胞質に漏れ出したcathepsin-Lはミトコンドリアなどの細胞内の構造を破壊し、細胞死を引き起こす (Fig. 9および Fig. 10). 一方、LDLやAcLDLは非活性型のコレステロールエステルCOを多く含有するが、lysosomeではACATにより制御を受けながらCholに加水分解されると考えられる¹³⁾.

リポタンパクは代謝・異化に伴い動物血中の動態などが大きく変化することはよく知られていたが、メカニズムは不明であった. 著者等は脂質組成の変化がアポリポタンパクとの相互作用に関係し、このことが動態や細胞障害に影響すると提案した. 人工的に調製されるこれらの脂質エマルション粒子はDDSへの応用も期待できるが、本稿ではこれを割愛する.

謝 辞

本研究を展開するにあたり、徳島大学 斎藤博幸教授、奥平桂一郎准教授、姫路獨協大学 岡村恵美子教授、神戸薬科大学 田中将史講師、滋賀医科大学 森田真也准教授、富山大学 中野 実教授、中外製薬 福田正和博士をはじめとする多くの方に、実験と考察の両面で協力と示唆を受けたことに感謝いたします.

文 献

- 1) Fruchart JC, Shepherd J Eds : "Human Lipoproteins" de Gruyter, Berlin & New York (1989)
- 2) 寺本民生編 : "コレステロール 基礎から臨床へ" ライフサイエンス出版, 東京 (2009)
- 3) Brooks-Wilson A *et al.* : *Nat. Genet.*, **22**, 336 (1999)
- 4) Fukuda M *et al.* : *J. Phys. Chem., B*, **114**, 8228 (2010)
- 5) Fukuda M *et al.* : *J. Lipid Res.*, **48**, 2007 (2007)
- 6) Fukuda M *et al.* : *J. Lipid Res.*, **49**, 2419 (2008)
- 7) Nagata KO *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 5034 (2013)
- 8) Saito H *et al.* : *Lipid*, **36**, 27 (2001)
- 9) Morita S *et al.* : *Biochim. Biophys. Acta*, **1631**, 169 (2003)
- 10) Tanaka M *et al.* : *Langmuir*, **19**, 5129 (2003)
- 11) Okamura E *et al.* : *J. Phys. Chem. B*, **105**, 12616 (2001)
- 12) Sakurai A *et al.* : *J. Lipid Res.*, **46**, 2214 (2005)
- 13) Wakita K *et al.* : *Biochim. Biophys. Acta*, **1851**, 598 (2015)

(Received 12 June 2015 ;

Accepted 8 July 2015)

著者略歴

半田哲郎 (はんだ てつろう)

1974年7月 京都大学薬学究科博士課程中途退学

2009年5月～2013年4月 日本膜学会会長

2010年3月 京都大学 (薬学研究科) 退職, (京都大学名誉教授)

2010年4月 鈴鹿医療科学大学薬学部 教授

2014年4月 鈴鹿医療科学大学薬学 部長

専門領域: 界面の物理化学, 脂質の生物物理化学