生体エマルション “血漿リポ蛋白質” の構造と代謝

斎藤 博 幸

国立医薬品食品衛生研究所 大阪支所 ☎ 540-0006 大阪市中央区法円坂 1-1-43

Structure and Metabolism of Plasma Lipoproteins as Biological Emulsions

Hiroyuki Saito

Osaka Branch, National Institute of Health Sciences
1-1-43 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan

Plasma triglyceride-rich lipoproteins, chylomicrons and VLDL, vary in lipid composition during their metabolism. Using lipid emulsions of defined composition as model particles, we investigated the effects of the lipid composition on the surface and core structures and the metabolism of the emulsion particles. Surface cholesterol significantly facilitated the removal of triglyceride-phosphatidylcholine emulsions from plasma after intravenous injection to rats, presumably due to the change in the ratio of bound apolipoprotein E (apoE) to Cs at the emulsion surface. In contrast, sphingomyelin, the second most abundant phospholipid in lipoproteins, delayed the emulsion clearance and showed the strong inhibition of the apoE binding and lipolysis by lipoprotein lipase. These changes in the emulsion metabolism caused by cholesterol and sphingomyelin are thought to result from the modification of the emulsion surface structures. On the other hand, cholesteryl oleate, major component of core lipids in LDL, was shown to retard the emulsion clearance by means of the decrease in the bound apoE content, which was closely correlated with the mobility of core lipids rather than the surface structure. These results indicate that not only the surface structure but also the core mobility modulate the emulsion metabolism through the alteration in the binding behavior of apolipoproteins.

Key words : emulsions/lipoproteins/apolipoproteins/cholesterol/sphingomyelin/cholesteryl oleate

1. はじめに

血漿リポ蛋白質は脂質と蛋白質の複合粒子であ

り、トリグリセライド (TG) やコレステロールなどの水に不溶な脂質を分子集合体として各組織間を輸送する役割を担っている。リポ蛋白質は、

Table 1 Classification and Composition of Plasma Lipoproteins

Lipoproteins ^a	Diameter (nm)	Molecular weight (MDa)	Density (g/ml)	% of lipoprotein mass ^b					Major apolipoproteins
				apo	PL	Chol	TG	CE	
Chylomicrons	75-1200	~400	>0.96	2	7	2	86	3	B48, A-I, Cs, E
VLDL	30- 80	10-80	0.96-1.006	8	18	7	55	12	B100, Cs, E
IDL	25- 35	5-10	1.006-1.019	19	19	9	23	30	B100, Cs, E
LDL	18- 25	2.3	1.019-1.063	22	22	8	6	42	B100
HDL ₂	9- 12	0.36	1.063-1.125	40	33	5	5	17	A-I, A-II, Cs
HDL ₃	5- 9	0.18	1.125-1.210	55	25	4	3	13	A-I, A-II, Cs

^aVLDL, very low-density lipoproteins ; IDL, intermediate-density lipoproteins ; LDL, low-density lipoproteins ; HDL, high-density lipoproteins.

^bapo, apolipoprotein ; PL, phospholipid ; Chol, cholesterol ; TG, triglyceride ; CE, cholesteryl ester.

中性脂質である TG とコレステリルエステルの核 (コア) をリン脂質とコレステロールから成る単分子膜が覆ったエマルション様の構造をしており、さらにアポリポ蛋白質と呼ばれる両親媒性の蛋白質がその表面に結合している¹⁾。アポリポ蛋白質は安定なリポ蛋白質としての構造を維持するとともに、受容体へのリガンド、酵素の活性化、不活性化など、リポ蛋白質の代謝においても種々の重要な役割を果たしている²⁾。

リポ蛋白質代謝には、アポリポ蛋白質以外に、リポ蛋白質リパーゼ (LPL)、肝性トリグリセリドリパーゼ (HTGL)、レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT)、コレステリルエステル転送蛋白質 (CETP) などの多くの血漿蛋白質が関与している。筆者らは、リポ蛋白質をミクロなエマルション粒子ととらえ、その構造とこれら血漿蛋白質との相互作用に関する物理化学的アプローチを行うことで、リポ蛋白質代謝のメカニズムの解明を試みている³⁻⁷⁾。たとえば、TG-rich なリポ蛋白質であるカイロミクロンや超低比重リポ蛋白質 (VLDL) は、その異化過程において、構成脂質組成の変化と粒子径の減少という物理化学的变化を伴いながら代謝されていくことが知られているが、これは、これらの変化が引き起こす粒子構造の変化が、アポリポ蛋白質の結合性や LPL の反応性の変化を通してリポ蛋白質の代謝を調節している結果と考えることができる。ここでは、カイロミクロンや VLDL の脂質組成を模倣して作製した脂質エマルションの

構造や代謝に関する我々の知見を紹介することで、リポ蛋白質代謝における粒子構造の重要性について述べてみたい。

2. リポ蛋白質の種類と組成

リポ蛋白質は密度の違いによりカイロミクロン (chylomicron)、VLDL (超低比重リポ蛋白質)、IDL (中間比重リポ蛋白質)、LDL (低比重リポ蛋白質)、HDL (高比重リポ蛋白質) の 5 種類に分画され、さらに HDL は HDL₂ と HDL₃ に分けられる (Table 1)⁸⁾。粒子サイズはこの順で小さくなっており、これは相対的に表面構成成分であるアポリポ蛋白質やリン脂質が増加し、コア成分である TG やコレステリルエステルが減少しているためである。

リポ蛋白質の蛋白質成分であるアポリポ蛋白質もリポ蛋白質分画間で特徴的な分布を示し、各機能を担っている。たとえば、カイロミクロンや VLDL 表面には、可溶性のアポリポ蛋白質であるアポ C 群 (C-I, C-II, C-III) や E などが結合しており、アポ C-II がコアの TG のリポリシスの活性化因子として⁷⁾、アポ E が肝臓による粒子取り込みのリガンドとして機能している⁹⁾。また、アポ C 群がアポ E レセプターを介した取り込みを阻害しているとの報告もある^{10, 11)}。HDL 上に多くみられるアポ A-I は生体内でのコレステロール逆転送系を担っている^{12, 13)}。

TG-rich なリポ蛋白質の代謝過程での脂質組

Fig. 1 Clearance of cholesteryl-1-pyrene decanoate (py-CE) (A) and triglyceride (B) in fasted rats injected with emulsions.

Emulsions used are : (○) TG-eggPC ; (▽) TG-eggPC/Chol (3/2) ; (●) TG-eggPC/eggSM (2/1).

成変化に注目すると、腸管から分泌されたカイロミクロンが血中でカイロミクロンレムナントに代謝される過程で表面コレステロールが、また肝臓から分泌される VLDL が LDL へと異化される際にコア中のコレステリルオレエート (CO) が増加する¹⁴⁾。またホスファチジルコリン (PC) とともに表面リン脂質の主成分であるスフィンゴミエリン (SM) 含量もリポ蛋白質間で大きく異なり、カイロミクロンではほとんど含まれないのに対し、VLDL や LDL ではリン脂質の 30% 近くが SM である¹⁵⁾。

3. 表面脂質組成による代謝の変化とそのメカニズム

前述したように、リポ蛋白質の表面脂質としては PC 以外にコレステロール (Chol) と SM が存在する。Fig. 1 は蛍光プローブ (py-CE) で標識した粒子径約 100 nm のエマルションをラットに静脈投与した際の血中動態を、表面 PC を 40% のコレステロールあるいは 33% の SM で置き換えた場合で比較したものである¹⁶⁾。これから、コレステロールはエマルション粒子の消失を著しく促進するのにに対し SM は消失を遅らせること、また、粒子の消失 (Fig. 1A) とコアの TG の消失 (Fig. 1B) の差から評価したエマルションのリポリシス量は SM を含有するエマルションで

Fig. 2 Binding of apoCs and E to lipid emulsions.

Emulsions were incubated with human serum at a similar ratio when injected to rats.

非常に少ないことなどがわかる。別に牛ミルク由来の LPL を用いた *in vitro* でのリポリシスの反応速度論的解析から、コレステロールはリポリシスに影響しないのに対し、SM は LPL のエマルションに対する親和性と反応性の両方を低下させることが明らかとなった⁷⁾。

このようなコレステロールや SM の効果の原因として、エマルション表面へのアポリポ蛋白質の結合性の変化があげられる。ラットに投与した時と同じ比率でエマルションとヒト血漿を混合した場合の各エマルションに対するアポリポ蛋白質の結合性を比較すると (Fig. 2), コレステロールがアポ E に比べてアポ C 群の結合量を大きく低下させるのに対し、SM は逆にアポ E の結合を強く阻害した。この結果から、Fig. 1 の各エマルション間での消失速度の違いは、SM がアポ E の結合を阻害しエマルションの肝臓取り込みを抑制する一方、コレステロールによるアポ C-II、C-III を含めたアポ C 群/アポ E 比の減少がアポ E レセプターを介した取り込みを促進した結果と理解される。またアポ C-II の結合量とリポリシスとは相関がみられないが、これは LPL の活性化に必要なアポ C-II 濃度が非常に低いためと考えられた。

Fig. 3 Effects of fluorescence anisotropy of DPHpPC, reflecting the acyl chain order, on binding of apoC-II (A) and apoE (B) to the emulsion surface.

(○) TG-eggPC, (●) TG-eggPC/Chol (3/2), (□) CO-eggPC, (■) CO-eggPC/Chol (3/2), (△) TG-DPPC, (▲) TG-eggPC/DPPC (2/1), (▽) TG-eggSM, (▼) TG-eggPC/eggSM (2/1).

では、コレステロールや SM によるアポリポ蛋白質の結合性の変化がアポ C 群とアポ E で大きく異なるのは何故であろうか？コレステロールや SM を含めた種々の組成を持つエマルションに対するアポ C-II と E の最大結合量を、表面膜疎水部の流動性の指標である DPHpPC (DPH のリン脂質誘導体) の蛍光異方性との間でプロットしたところ (Fig. 3), アポ C-II の結合量は脂質組成の違いによらず膜流動性の低下とともに減少するのに対し, アポ E の結合量は膜流動性と無関係であった。すなわち, コレステロールや SM は表面膜疎水部の流動性を減少させアポ C-II の解離を促すが, アポ E の結合には脂質特異性があることが示された。Segrest らのアポリポ蛋白質膜結合モデル¹⁷⁾によると, アポ C-II は膜の疎水基部分にまで深く潜り込んだ形で結合していることが予想され, 膜疎水部の流動性の低下はこのような結合に不利であると考えられる。また, アポ E はアポ C-II の約 4 倍の分子量を持ち (34 kDa) 膜親和性が弱いなど, 膜の内部まで入り込んだ結合をしにくいと予想されるが, その結合がコレステロールよりも SM によって強く阻害されることから, SM による極性基付近の構造的増大が結合性に大きく影響していると考えられた。

Fig. 4 Effects of cholesterol (○) and SM (●) on the fluorescence anisotropy of DPHpPC (A) and the fluorescence intensity ratio of dansyl-PE in D₂O to that in H₂O (B) of lipid emulsions.

そこで, DPHpPC による表面膜疎水部の構造評価以外に, dansyl 基がリン脂質極性基に結合した蛍光プローブである dansyl-PE を用いたエマルション表面膜極性部の構造評価を行った (Fig. 4). これは, dansyl 基の重水下と軽水下での蛍光強度の比が, 表面膜極性部の水和の状態(構造的)を反映することを利用したものである¹⁸⁾. 膜中のコレステロールの増加は疎水部をより rigid な構造にするが, 極性部の構造にはあまり影響していない。これに対し, SM はコレステロールに比べて疎水部への影響が小さいにも拘わらず極性部の水和を大きく減少させ, SM による極性部の構造的増大が認められた。このコレステロールと SM によるエマルション表面膜極性部の構造変化の違いは, 前述のアポ E の結合性や LPL の反応性の違いをよく説明し, これら血漿蛋白質とエマルションとの相互作用に対する表面膜極性部の構造的重要性が示唆された。

このような表面脂質組成によるアポリポ蛋白質や LPL との反応性の違いは, カイロミクロンからカイロミクロンレムナントへと代謝される過程でコレステロールが増加し, アポ C 群と E のバランスが変化して肝臓への取り込みが促進されることや, SM を比較的多く含む VLDL がカイロミクロンに比べてリポリシスやアポ E を介した取り込みが緩やかであることなどのリポ蛋白質代謝と密接に関連しているものと思われる。しかし, 表面組成としてのリゾレシチンの重要性^{19, 20)}や粒子径による代謝の違い^{21, 22)}を指摘する報告も

あり、これらの因子についても現在検討している。

4. コア脂質の構造変化と代謝

VLDL から LDL へと代謝される際に、コアの TG はリポリシスと CETP の働きによってほとんどコレステリルオレート (CO) に置き換わる (Table 1). CO は生理温度付近で相転移を示すことからその構造上の役割が注目され、結合アポリポ蛋白質のコンフォメーション変化と関連しているとの報告もある^{23, 24)}.

筆者らは、TG と CO の比率を変えてエマルションを作製し、そのコアの構造を DPH の、表面膜の構造を DPH のトリメチルアンモニウム塩である TMA-DPH の蛍光異方性からそれぞれ評価した⁶⁾. Fig. 5A に示したように、エマルション中の CO は TG と異なり室温で smectic 液晶状態にあり、約 41°C で isotropic な液体状態へと相転移する²⁵⁾. したがって、CO の比率

Fig. 5 (A) Temperature dependence of DPH fluorescence anisotropy in TG-eggPC (○) and CO-eggPC (●) emulsions. (B) Effects of CO on fluorescence anisotropy of TMA-DPH (▲, surface) and DPH (○, core).

の増加とともにコアの流動性は低下するが、このコアの構造変化は表面膜疎水部の構造に影響を与えない (Fig. 5B). それにもかかわらず、コア中の CO の増加はラットでのエマルションの血中消失速度を低下させ、このとき血中クリアランスとアポ E の結合量との間に相関がみられた (Table 2). すなわち、コアの組成変化は表面膜構造とは無関係にエマルションの代謝に影響を与え、その原因が結合アポ E 量の減少であることが示唆された. さらにアポ A-I や C-II の結合性もコア組成の影響を受け²⁶⁾, アポリポ蛋白質の結合におけるエマルションのコア構造の重要性が明らかとなった. 筆者らはこの原因として、アポリポ蛋白質の結合による膜構造のフラストレーションをコア脂質の挿入が緩和するというモデルを考えており、コアの構造性が高い CO では表面膜への挿入が弱く、アポリポ蛋白質の結合量が低下すると説明される. また、同じ表面組成を持つがコアを持たない PC リポソームではアポ E がほとんど結合しないこと (Table 2) もこのモデルを支持する.

アポ E の結合性はリポ蛋白質やエマルション粒子の血中動態を大きく左右するが、VLDL から LDL へと代謝されていく過程でアポ E が解離していく事実や、同じ表面組成を持つリポソームに比べてエマルションの血中消失が早いこと (Table 2) などの脂質粒子の体内代謝の違いが、粒子でのコアの存在とその構造変化によって説明されうることが示唆された.

Table 2 Fluorescence anisotropy of DPH (r_s), binding maximum of apoE, and plasma clearance of emulsions

	r_s (37°C)	apoE bound (m mol/mol PC)	clearance (ml/hr/kg)
emulsions			
TG-eggPC	0.038 ± 0.002	0.68	18.3 ± 7.4
TG/CO(1/1)-eggPC	0.086 ± 0.001	0.42	13.8 ± 5.2
CO-eggPC	0.149 ± 0.001	0.25	9.5 ± 2.4
eggPC vesicles	—	0.05	6.2 ± 1.3

5. おわりに

リポ蛋白質の各構成脂質は、それぞれ異なるメカニズムによって粒子構造に変化を与え、その構造変化に対する結合性の変化がアポリポ蛋白質間で異なることを利用して、リポ蛋白質の体内代謝を制御しているようである。この脂質組成に対するアポリポ蛋白質の結合応答性（選択性）の違いがエマルション粒子構造の点からより明らかになれば、リポ蛋白質代謝のメカニズムの解明のみならずドラッグキャリアーとしてのエマルションの体内動態制御につながるものと期待される。

文 献

- 1) D. Atkinson and D. M. Small : *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **15** 403-456, (1986).
- 2) W. Patsch and J. A. M. Gotto : "Methods Enzymol.", Vol. 263, W. A. Bradley et al., ed., p. 3-32, Academic Press, London (1996)
- 3) T. Handa, H. Saito, and K. Miyajima : *Biochemistry*, **29** 2884-2890, (1990).
- 4) T. Handa, H. Saito, I. Tanaka, A. Kakee, K. Tanaka, and K. Miyajima : *Biochemistry*, **31** 1415-1420, (1992).
- 5) H. Saito, K. Nishiwaki, T. Handa, S. Ito, and K. Miyajima : *Langmuir*, **11** 3742-3747, (1995).
- 6) H. Saito, T. Minamida, I. Arimoto, T. Handa, and K. Miyajima : *J. Biol. Chem.*, **271** 15515-15520, (1996).
- 7) I. Arimoto, H. Saito, Y. Kawashima, K. Miyajima, and T. Handa : *J. Lipid Res.*, in press.
- 8) 嶋津伸子, 寺本民夫: 循環器 NOW No.12 「動脈硬化・高脂血症」, 山田信博編, p. 20-28, 南江堂 (1996).
- 9) R. W. Mahley : *Science*, **240** 622-630, (1988).
- 10) E. Windler and R. J. Havel : *J. lipid Res.*, **26** 556-565, (1985).
- 11) E. Sehayek and S. Eisenberg : *J. Biol. Chem.*, **266** 18259-18267, (1991).
- 12) C. J. Fielding and P. E. Fielding : *J. Lipid Res.*, **36** 211-228, (1995).
- 13) J. F. Oram and S. Yokoyama : *J. Lipid Res.*, **37** 2473-2491, (1996).
- 14) D. M. Small : "Plasma Lipoproteins and Coronary Artery Disease", R. A. Kreisberg and J. P. Segrest, ed., p.57-91, Blackwell Scientific Publications Inc., Boston (1992).
- 15) M. J. Chapman : "Methods Enzymol.", Vol. 128, J. P. Segrest and J. J. Albers, ed., p. 70-143, Academic Press, London (1986).
- 16) I. Arimoto, C. Matsumoto, M. Tanaka, H. Saito, and T. Handa : *Lipids*, submitted.
- 17) J. P. Segrest, M. K. Jones, H. De Loof, C. G. Brouillette, Y. V. Venkatachalapathi, and G. M. Anantharamaiah : *J. Lipid Res.*, **33** 141-166, (1992).
- 18) C. Ho, S. J. Slater, and C. D. Stubbs : *Biochemistry*, **34** 6188-6195, (1995).
- 19) E. E. T. Windler, S. Preyer, and H. Greten : *J. Clin. Invest.*, **78** 658-665, (1986).
- 20) J. Borensztajn, G. S. Getz, and T. J. Kotlar : *J. lipid Res.*, **29** 1087-1096, (1988).
- 21) I. J. Martins, B.-C. Mortimer, J. Miller, and T. G. Redgrave : *J. Lipid Res.*, **37** 2696-2705, (1996).
- 22) P. C. N. Rensen, N. Herijgers, M. H. Netscher, S. C. J. Meskers, M. Van Eck, and T. J. C. Van Berkel : *J. Lipid Res.*, **38** 1070-1084, (1997).
- 23) M. P. Mims, M. R. Soma, and J. D. Morrisett : *Biochemistry*, **29** 6639-6647, (1990).
- 24) S. Bañuelos, J. L. R. Arrondo, F. M. Göni, G. Pifat : *J. Biol. Chem.*, **270** 9192-9196, (1995).
- 25) G. S. Ginsburg, D. M. Small, and D. Atkinson : *J. Biol. Chem.*, **257** 8216-8227, (1982).
- 26) H. Saito, Y. Miyako, T. Handa, and K. Miyajima : *J. Lipid Res.*, **38** 287-294, (1997).

(受付 1998年1月28日 掲載決定 3月9日)