卵黄低密度リポ蛋白質のヒトマクロファージ様細胞株への結合

鈴木道子***・新本洋士***・小堀真珠子****
津志田藤二郎****・篠原和毅****
米倉政実**・堤 将和**

Binding of Egg-Yolk Low Density Lipoprotein to a Human Monocytic Cell Line UM

Michiko SUZUKI*, **, Hiroshi SHINMOTO***,
Masuko KOBORI****, Tojiro TSUSHIDA****,
Kazuki SHINOHARA****, Masami YONEKURA**
and Masakazu TSUTSUMI**

* A.L.A. CORPORATION, Shinjuku Island-tower 20 F
6-5-1, Nishi-Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 163-1320

** Ibaraki University, Food Functionality Laboratory,
Department of Applied Biological Resource Sciences,
Faculty of Agriculture, Chuou 3-21-1,
Ami, Inashiki, Ibaraki 300-0393

*** Tohoku National Agricultural Experiment Station,
Department of Upland Farming, 50 Harajuku-
minami, Arai, Fukushima 960-2156

**** National Food Research Institute, 2-1-2,
Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

Egg yolk low density lipoprotein (YLDL) had a growth stimulating activity to a human monocytic cell line UM. Analysis on binding of YLDL labeled with europium (Eu) to the UM cells by time-resolved fluorometry showed that UM cells had a large number of binding sites with low binding affinity on the cell surface. Inhibition analysis of the binding by using human serum lipoproteins suggested the binding site would have an affinity to human very low density lipoprotein.

(Received Aug. 9, 1999 ; Accepted Nov. 17, 1999)

筆者らは鶏卵卵黄に含まれるリポ蛋白質 (YLP) がヒトリンパ系細胞株の増殖を促進することを見いだし

た¹⁾。強い細胞増殖促進作用を持つ卵黄リポ蛋白質を超遠心分離によって分画したところ、低密度リポ蛋白質 (YLDL) 画分に強い細胞増殖作用が見られた。

ヒトリンパ球の血清 LDL レセプターについては、詳しい研究が行われており、レセプター結合後のエンドサイトーシスによって細胞内に LDL が取り込まれる仕組みや、レセプターへの結合に関するアポ蛋白質の役割が解析されている²⁾³⁾。

本研究では YLDL の細胞増殖作用発現における作用機序を明らかにすることを目的とし、ヒトマクロファージ様細胞株への YLDL の結合について検討し、YLDL レセプターの性質について考察した結果を報告する。本研究の結果は、無血清培地の添加剤として YLDL を用いるにあたり、その応用範囲を広げる可能性を示唆するものと考えられる。

1. 実験方法

(1) YLDL の調製

市販鶏卵から卵黄膜を除去した卵黄約 100 ml に、等量の 1% 塩化ナトリウム溶液を加えてよく混和した。これを 4℃, 20 000×g で 30 分間遠心 (日立高速遠心機 20 PR-50 D, RPR 20-2 ロータ) した上清を YLP とした⁴⁾。YLP にさらに塩化ナトリウムを終濃度 10% となるように添加し、4℃, 78 000×g で 18 時間遠心 (ベックマン超遠心機 L-8, Type 70 Ti ロータ) した最上層画分を YLDL とした⁵⁾。YLDL 中の蛋白質含量はブラッドフォード法⁶⁾によって測定した。YLDL の蛋白質含量は 14.8% であった。

(2) YLDL のユーロピウム標識

YLDL を 0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.8) で希釈して蛋白質濃度を 5 mg/ml とした。この YLDL 溶液 1.35 ml (15 nmol) をユーロピウムラベルキット標識試薬 (ファルマシア社) 1 バイアル (300 nmol) に加え、37℃ で 16 時間反応させた⁷⁾。標識された YLDL と非標識ユーロピウムは、0.15 M 塩化ナトリウムを含む 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.8) で平衡化したセファデックス G-50 によるゲルろ過で分離した。1 分子の YLDL あたりのユーロピウム標識数は 17.5 であった。

(3) 細胞株

ヒト単芽球様細胞株 U-937 をフォルボールエステル処理して樹立されたマクロファージ様細胞株 UM 細胞

* 株式会社エイ・エル・エイ (〒163-1320 東京都新宿区西新宿 6-5-1 新宿アイランドタワー 20F)

** 茨城大学農学部 (〒300-0393 茨城県稲敷郡阿見町中央 3-21-1)

*** 農林水産省東北農業試験場 (〒960-2156 福島県福島市荒井字原宿南 50)

**** 農林水産省食品総合研究所 (〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-2)

を用いた⁸⁾。細胞は増殖因子 (インスリン 5 mg/l, トランスフェリン 10 mg/l, エタノールアミン 1.53 mg/l, および亜セレン酸ナトリウム 0.0043 mg/l) を含む ERDF 培地⁹⁾ を用いて継代培養した。

(4) YLDL の UM 細胞への結合試験

0.4 ml 容のポリエチレンマイクロチューブにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 回洗浄した UM 細胞懸濁液と、標識した YLDL 溶液を所定の濃度となるように加えた。反応液の容量は 0.1 ml、細胞密度は 1×10^5 /ml とした。4°C でインキュベーションした後、遠心 (4°C, 2000×g, 5 分間) して上清を除き、0.2% 牛血清アルブミン (BSA) を含む PBS で細胞を 3 回遠心洗浄した。回収した細胞は 0.1 ml の 0.5% Triton X-100 溶液で溶解した。この 0.05 ml を 96 穴アッセイプレート (住友ベークライト) に分注し、蛍光増強試薬 (ファルマシア社) 0.05 ml を加え、細胞に結合したユーロピウム量をアークス時間分解蛍光光度計 (ファルマシア社) で測定した¹⁰⁾。

2. 実験結果および考察

(1) ユーロピウム標識 YLDL の UM 細胞への結合タイムコース

はじめにユーロピウム標識 YLDL の UM 細胞への結合が平衡に達する時間を測定した。8.4 nmol の標識 LDL とともに UM 細胞を 4°C でインキュベートしたところ、図 1 に示すように、約 6 時間で結合が平衡に達することが判明した。したがって以降の結合試験では、インキュベーション時間は 6 時間とした。

図 1 ユーロピウム標識 YLDL の UM 細胞への結合曲線

ユーロピウム標識した YLDL を 4°C で UM 細胞と反応させた。細胞を洗浄後 Triton-X 100 で溶解し、細胞に結合したユーロピウム量を時間分解蛍光光度計で測定した。

(2) YLDL の UM 細胞への結合のスカッチャード解析

添加する標識ユーロピウムの量を変えて結合試験を行い、反応液を遠心した上清に含まれる非結合標識 YLDL と、UM 細胞に結合した YLDL 量を測定した。測定結果のスカッチャード解析の結果を図 2 に示す。結合は典型的な単一レセプター型のカーブを示した。解析の結果、細胞あたりの標識 YLDL 結合数は 1.24×10^6 個、解離定数は 5.87 nM と計算された。ヒト LDL のリンパ球系の株細胞に対する解離定数は 0.1~1 nM、細胞あたりのレセプター数は $0.75 \sim 1.5 \times 10^4$ 個と報告されている¹¹⁾。このことから、YLDL は UM 細胞に対して、低い親和性で非常に多数 (約 100 倍) 結合すると考えられる。

(3) ヒト血清リポ蛋白質による YLDL の UM 細胞への結合の阻害試験

ヒト血清超低密度リポ蛋白質 (VLDL)、ヒト血清低密度リポ蛋白質 (LDL)、およびヒト血清高密度リポ蛋白質 (HDL) による YLDL の UM 細胞に対する競争結合阻害試験を行った。ユーロピウム標識した YLDL を蛋白質として $3.77 \mu\text{g/ml}$ になるよう細胞に添加したときの標識 YLDL の結合量 (100%) に対する、ヒト血清リポ蛋白質存在下での標識 YLDL の結合量の比率 (%) を比較した。図 3 の横軸は非標識の競争蛋白質濃度、縦軸は UM 細胞に結合したユーロピウム標識 YLDL 量 (%) を示している。表 1 には 50% の結合を阻害する添加濃

図 2 UM 細胞へのユーロピウム標識 YLDL の結合飽和曲線

種々の濃度の標識 YLDL を UM 細胞と反応させ、細胞に結合した YLDL と結合しなかった YLDL を測定した。

図中の右下には、スカッチャードプロットを示す。

図 3 YLDL の UM 細胞への結合に対するヒト血清リポ蛋白質の結合阻止作用

ユーロピウム標識 YLDL と種々の濃度のヒト血清リポ蛋白質を UM 細胞と反応させ、結合した標識 YLDL 量を測定した。(■) 非標識 YLDL ; (●) ヒト VLDL ; (▲) ヒト LDL ; (◆) ヒト HDL.

表 1 UM 細胞に対する YLDL の結合を 50% 阻止するヒト血清リポ蛋白質の濃度

リポ蛋白質	50% 結合阻止濃度* (μg protein/ml)
非標識 YLDL	2.08
ヒト VLDL	0.27
ヒト LDL	8.73
ヒト HDL	25.8

* 図 3 におけるユーロピウム標識 YLDL の結合を 50% 阻止するヒト血清リポ蛋白質の濃度を算出した。

度を示した。

ヒト血清 VLDL は標識 YLDL の UM 細胞への結合を非常に強く阻害した。その阻害作用は非標識 YLDL よりも強く、標識 YLDL の UM 細胞への結合を 50% 阻害する VLDL の濃度は、非標識 YLDL の 8 分の 1 であった。以上の結果から、YLDL は UM 細胞上にある、血清 VLDL を認識するレセプターに結合するものと推定される。

今後、アポ蛋白質と UM 細胞上の YLDL レセプター

との結合を調べることににより、より詳しい YLDL レセプターの性質を明らかにしたい。さらに、YLDL の培地成分としての応用範囲を広げるため、様々な細胞株の無血清条件下での培養条件の検討を行いたい。

3. 要 約

鶏卵卵黄 LDL (YLDL) のヒト UM 細胞への結合を検討した。4℃ において YLDL の UM 細胞への結合は 6 時間でプラトーに達した。スキッチャード解析の結果、UM 細胞は低親和性の YLDL レセプターを多数持っている計算された。また、ヒト血清リポ蛋白質による結合阻害試験の結果から、YLDL はヒト血清 VLDL に親和性の高いレセプターに結合すると推定された。

文 献

- 1) 鈴木道子・新本洋士・米倉政実・堤 将和・篠原和毅：日食工誌，**41**，37 (1994)。
- 2) GOLDSTEIN, J.L., BASU, S.K. and BROWN, S.: *Methods Enzymol.*, **98**, 241 (1983)。
- 3) GIAN TURCO, S.H., RAMPRASAD, M.P., SONG, R., LI, R., BROWN, M.L. and BRADLEY, W.A.: *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, **18**, 968 (1998)。
- 4) YAMADA, K., IKEDA, I., MAEDA, M., SHIRAHATA, S., and MURAKAMI, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 519 (1990)。
- 5) SHINOHARA, K., FUKUSHIMA, T., SUZUKI, M., TSUTSUMI, T., KOBORI, M. and KONG, Z-L.: *Cytotechnology*, **11**, 149 (1993)。
- 6) BRADFORD, M.: *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976)。
- 7) DIAMANDIS, E.P., MORTON, R.C., REICHSBERG, E. and KHOSRAVI, M.J.: *Anal. Chem.*, **61**, 48 (1989)。
- 8) KONG, Z-L., MIWA, M., MURAKAMI, H. and SHINOHARA, K.: *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **26**, 949 (1990)。
- 9) 村上浩紀・下村 猛・中村卓二・大橋秀哉・篠原和毅・大村浩久：農化，**58**，575 (1984)。
- 10) DECHAUD, H., BADOR, R., CLAUSTRAT, F., DESUZINGES, C. and MALLEIN, R.: *Clin. Chem.*, **34**, 501 (1988)。
- 11) VIA, D.P., PONS, L., DENNISON, D.K., FANSLAW, A. E. and BERNINI, F.: *J. Lipid Res.*, **30**, 1515 (1989)。

(平成 11 年 8 月 9 日受付，平成 11 年 11 月 17 日受理)