

|              |  |
|--------------|--|
| Title        | ENHANCED BINDING OF AN APOLIPOPROTEIN E MUTANT, APO E5, TO LDL RECEPTOR ON HUMAN FIBROBLASTS |
| Author(s)    | 董, 黎明  |
| Citation     |  |
| Issue Date   |  |
| Text Version | none   |
| URL          | <a href="http://hdl.handle.net/11094/37315">http://hdl.handle.net/11094/37315</a>            |
| DOI          |  |
| rights       |  |
| Note         |  |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

|         |   |       |          |
|---------|---|-------|----------|
| 氏名・(本籍) | とう  | れい    | めい       |
|         | 董   | 黎     | 明        |
| 学位の種類   | 医   | 学     | 博        |
|         | 士   |       |          |
| 学位記番号   | 第   | 9596  | 号        |
| 学位授与の日付 | 平成3年3月14日   |       |          |
| 学位授与の要件 | 学位規則第5条第2項該当  |       |          |
| 学位論文題目  | ENHANCED BINDING OF AN APOLIPOPROTEIN E<br>MUTANT, APO E 5, TO LDL RECEPTOR ON HUMAN<br>FIBROBLASTS<br>(変異アポリポ蛋白E-アポE5-のヒト線維芽細胞のLDL<br>レセプターに対する高結合能) |       |          |
| 論文審査委員  | (主査)  |       |          |
|         | 教授  | 垂井清一郎 |          |
|         | (副査)  |       |          |
|         | 教授  | 田川 邦夫 | 教授 荻原 俊男 |

### 論文内容の要旨

#### (目 的)

アポリポ蛋白E (アポE) は超低比重リポ蛋白 (VLDL) の主要アポ蛋白成分で、レムナントレセプターやLDLレセプターを介して、リポ蛋白代謝に重要な役割を果たしている。また、アポEには一般人口中にE4, E3, E2の3種のアポEポリペプチドに基づく分子多様性が認められている。LDLレセプターへの結合研究によると、三つの isoform のうち、E2 (Arg<sub>158</sub> → Cys) はLDLレセプターにほとんど結合できず、E2のホモ接合体は動脈硬化の合併率の高いⅢ型高脂血症の発症要因となっている。われわれは動脈硬化と高脂血症に関連する2つの新しい変異アポE、すなわちE5 (Glu<sub>3</sub> → Lys) とE7を明らかにした。本研究では、アポE5の動脈硬化と高脂血症との関連を究明するために、培養皮膚線維芽細胞を用いてアポE5変異アポEのLDLレセプターに対する結合能を検討した。

#### (方法ならびに成績)

高脂血症症例およびアポE5症例の血清から超遠心法によってVLDLを分離し、有機溶媒で脱脂してアポVLDLを得た。アポE同位体の分離・精製には、可溶化ポリアクリルアミドゲルを用いた調製用等電点電気泳動によって行った。アポE同位体のレセプターへの結合能は Innerarity らの方法に基づき、正常ヒト培養線維芽細胞を用いて、<sup>125</sup>I-LDLとの競合によって測定した。dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) 粒子と精製アポE同位体をインキュベート後、密度勾配超遠心法によってアポE・DMPC粒子を作成した。線維芽細胞をリポ蛋白除去血清で培養後、<sup>125</sup>I-LDLと種々の量のアポE・DMPC粒子を添加して、LDLレセプターへの<sup>125</sup>I-LDLの結合量を測定した。アポE同位体のLDLレセプター結合能は<sup>125</sup>I-LDLの結合と50%競合するアポE濃度で表わした。

アポE5のLDLレセプター結合能を明確に分析するため、E2、E3とE5についていずれもシアロ酸を含まないアシアロ・アポEイソ蛋白を分離・精製して実験に用いた。培養液中にアポE・DMPCを0.1~1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で添加して実験を行なったところ、すでに報告されているようにE3・DMPCは $^{125}\text{I}$ -LDLとレセプターへの結合を競合するが、E2・DMPCは競合が認められずLDLレセプターにほとんど結合しないことが観察された。一方、アポE5・DMPCとE3・DMPCはどちらも $^{125}\text{I}$ -LDLと競合しているが、もっとも薄い0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度ではE5・DMPCの方がよく競合するようであった。そこで、さらに低濃度の範囲で測定するとE5・DMPCはE3・DMPCに比べ、LDLレセプターに対してより強い結合性を示していた。ロジット・ログ・プロットによりアポE・DMPCのレセプター結合量を直線化し、これから求めた $^{125}\text{I}$ -LDLとの50%競合濃度はE3の63ng/mlに対して、E5では29ng/mlと約半分の濃度で競合し、すなわちE5は野生型とされるE3より約2倍、LDLレセプターへの親和性の高いことが示された。

アポEのLDLレセプターへの結合部位は136-158番のアミノ酸残基付近とされ、アポE5における変異部位はこれとは異なっている。しかし、この部位以外の部位もレセプター結合に影響を与えることが報告されており、アポE全体のコンフォメーションの重要性も示唆されている。アポE5がレセプターに対して高親和性を示すことより、アポE5を含有するリポ蛋白の肝臓への取り込みが亢進し、肝細胞におけるコレステロール・プールの増加が予想される。このためLDLレセプターにダウン・レギュレーションがかかり、その結果血漿LDL濃度の上昇を来すものと考えられる。従って、アポE5の動脈硬化易発症性にはこのような一面の関与していることが示唆される。

(総括)

1. アポEイソ蛋白を分離・精製し、LDLレセプターへの結合能を検討した。
2. 変異アポE5は培養皮膚線維芽細胞のLDLレセプターに対して、野生型のアポE3よりも約2倍高い親和性を有していた。
3. E5症例ではアポE5含有リポ蛋白の取り込みが亢進することによってLDLの異化が遅延し、高LDL血症へと導かれ、これが動脈硬化易発症性と関連していることが示唆される。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は新しく発見されたアポリポ蛋白E変異種、アポE5のLDLレセプターへの親和性を明らかにし、高脂血症、動脈硬化症への関与機構を解明したものである。すなわち、アポE5は野生型のアポE3よりLDLレセプターに対する親和性が約2倍高いことを実証した。このことから、アポE5を含有するリポ蛋白の肝臓への取り込みが亢進し、肝臓でのコレステロール・プールの増加によってLDLレセプターにダウン・レギュレーションを起こし、高LDL血症へと導かれる。この結果、アポE5が動脈硬化の危険因子となることを指摘したものである。アポ蛋白Eの変異による高コレステロール血症の成因を明らかにした興味ある知見であり、学位に値すると判断される。