



Title	LOW DENSITY LIPOPROTEIN AND APOPROTEIN B INDUCE INCREASES IN INOSITOL TRISPHOSPHATE AND CYTOSOLIC FREE Ca <sup>2+</sup> VIA PERTUSSIS TOXIN-SENSITIVE GTP-BINDING PROTEIN IN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS
Author(s)	森田, 龍平
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37677">https://hdl.handle.net/11094/37677</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	森	田	龍	平
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	9815	号	
学位授与の日付	平成3年5月28日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文名	LOW DENSITY LIPOPROTEIN AND APOPROTEIN B INDUCE INCREASES IN INOSITOL TRISPHOSPATE AND CYTOSOLIC FREE $\text{Ca}^{2+}$ VIA PERTUSSIS TOXIN-SENSITIVE GTP-BINDING PROTEIN IN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS (培養血管平滑筋細胞における低密度リポ蛋白及びアポ蛋白Bのカルシウムシグナル伝達機構に関する研究)			
論文審査委員	(主査) 教 授	荻原 俊男		
	(副査) 教 授	三木 直正	教 授	祖父江憲治

### 論文内容の要旨

#### [目的]

血漿中のコレステロール輸送の大半を担うと考えられる低密度リポ蛋白(LDL)は、主要構成成分のアポ蛋白B(Apo-B)を介して細胞膜上の特異的受容体に結合し、血管平滑筋細胞の増殖を促進することが知られており、動脈硬化の発症・進展における重要な役割を果たすと推察される。しかしLDL及びApo-Bの細胞内での情報伝達機構の詳細は明らかではない。そこで、血管平滑筋細胞(VSMC)におけるLDL及びApo-Bのイノシトール三磷酸(Ins-1, 4, 5-P<sub>3</sub>)、及び細胞質内遊離カルシウム濃度([Ca<sup>2+</sup>]i)に及ぼす影響を検討した。

#### [方法]

<細胞培養> VSMCはラット大動脈中膜平滑筋からexplant法により単離し、10%ウシ胎仔血清(FCS)を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)で37°C、5%CO<sub>2</sub>気相下で培養した。

<イノシトール磷酸の測定> confluentに達したVSMCをイノシトールを含まない血清不含DMEM下でmyo-[<sup>3</sup>H]イノシトールで24時間標識し、disperseで剥離の後、測定用緩衝液にて洗浄し、細胞浮遊液に各被検物質を加えトリクロロ酢酸で反応を停止させ、遠沈し、上清を水飽和エーテルにて洗浄し測定に供した。イノシトール磷酸の測定はHPLC法にて行った。即ち陰イオン交換カラムを用い、蟻酸アンモニウムを溶出液とし階段状の濃度勾配により溶出し、各分画の[<sup>3</sup>H]放射活性をシンチレーションカウンターで計測した。

<[Ca<sup>2+</sup>]iの測定> [Ca<sup>2+</sup>]iの測定はfura 2を用いて行った。confluentに達したVSMCを24

時間血清不含DMEMで培養後fura 2/AMを含むDMEMで50分間インキュベートし、細胞をdisperseで剥離し、細胞浮遊液の状態で分光蛍光光度計を用いて励起光340 nmによる500 nm の蛍光強度を測定し、Tsienらの方法により  $[Ca^{2+}]_i$  の値を算出した。

### 〔結 果〕

#### ① LDLによるイノシトール磷酸産生の経時的変化

VSMCにおいてLDL (5  $\mu g/ml$ ) 刺激前ではIns-1, 4, 5-P<sub>3</sub>は測定可能ながら低値を示したが、刺激後5秒でIns-1, 4, 5-P<sub>3</sub>値の急激な上昇を認め、30秒後には基礎値の330%に達する最大値を示した。イノシトール1, 3, 4, 5-四磷酸 (Ins-1, 3, 4, 5-P<sub>4</sub>) 及びイノシトール1, 3, 4-三磷酸 (Ins-1, 3, 4-P<sub>3</sub>) もそれぞれ30秒後の段階で産生がみられ、Ins-1, 3, 4-P<sub>3</sub>は180秒後で高値を示した。

#### ② LDL及びApo-BのIns-1, 4, 5-P<sub>3</sub>産生に対する濃度依存性の検討

LDL, Apo-B共に濃度依存的にIns-1, 4, 5-P<sub>3</sub>の産生を促進させ、その最大値を与える濃度はLDLが50  $\mu g/ml$  (基礎値の370%), Apo-Bでは5  $\mu g/ml$  (基礎値の320%)であり、K<sub>0.5</sub>値はLDLで1.1  $\mu g/ml$ , Apo-Bで0.07  $\mu g/ml$ であった。またVSMCを百日咳菌毒素(IAP)により24時間前処置すると、LDL及びApo-BによるIns-1, 4, 5-P<sub>3</sub>の産生は抑制された。

#### ③ LDL及びApo-Bの $[Ca^{2+}]_i$ に及ぼす影響

細胞外  $Ca^{2+}$  の存在下ではLDL (5  $\mu g/ml$ ), Apo-B (0.5  $\mu g/ml$ ) による刺激で共に急速かつ一過性の  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇とそれに続く持続的上昇が認められた。細胞外  $Ca^{2+}$  を除いた条件下では  $[Ca^{2+}]_i$  の持続的上昇は消失した。即ち  $[Ca^{2+}]_i$  の早期の上昇は細胞内storeよりの  $Ca^{2+}$  の遊離、持続的上昇は細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入によると推察された。またIAP前処置により  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は共に抑制された。

### 〔総 括〕

- ① LDL及びApo-BはVSMCにおけるIns-1, 4, 5-P<sub>3</sub>産生を濃度依存的に亢進させた。
- ② LDL及びApo-BはIns-1, 4, 5-P<sub>3</sub>産生亢進に伴って細胞内storeからの  $Ca^{2+}$  の放出によると考えられる  $[Ca^{2+}]_i$  の急速かつ一過性の上昇をもたらした。
- ③ LDL受容体のLDLに対する結合定数は約20  $\mu g/LDL\text{-protein}/ml$  であると報告されているが、今回の検討ではLDLの0.5~50  $\mu g/ml$  でIns-1, 4, 5-P<sub>3</sub>及び  $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させており、生理的な濃度付近にあると考えられた。
- ④ IAP感受性GTP結合蛋白質が、細胞外の信号の細胞内への伝達を媒介することはよく知られているが、今回の検討では、VSMCをIAPにより前処置することにより、LDL刺激によるIns-1, 4, 5-P<sub>3</sub>の産生、及び  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇が共に抑制された。
- ⑤ 以上より、LDLのVSMCにおける細胞内情報伝達機構のひとつとして、IAP感受性GTP結合蛋白質を介したIns-1, 4, 5-P<sub>3</sub>の産生及びそれに伴う  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇が介在すると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

コレステロールの増加は動脈硬化の危険因子であり、その血中輸送の大半を担う低密度リポ蛋白(LDL)は動脈硬化における重要な役割を果たしていると推察されるが、LDLの血管平滑筋細胞内における情報伝達のメカニズムの詳細は不明である。本研究では、LDLのカルシウムシグナル伝達機構を解明する目的で、ラット培養血管平滑筋細胞を用いてLDLのイノシトール三磷酸(Ins-1, 4, 5-P<sub>3</sub>)及び細胞質内遊離カルシウム濃度([Ca<sup>2+</sup>]i)に及ぼす影響について検討したものである。その結果、LDLはIns-1, 4, 5-P<sub>3</sub>の産生及び[Ca<sup>2+</sup>]iの上昇をもたらし、その作用は百日咳菌毒素により抑制されることが明らかとなった。このことよりLDLの血管平滑筋細胞における細胞内情報伝達機構に、百日咳菌毒素感受性GTP結合蛋白質を介したIns-1, 4, 5-P<sub>3</sub>の産生及びそれに伴う[Ca<sup>2+</sup>]iの上昇が介在することが解明された。以上より、本研究はLDLの血管平滑筋細胞内情報伝達機構に新知見を加え、学位論文に値するものである。