

平成 10 年度厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業研究報告書

「代謝変化と栄養による修飾の研究」

主任研究者 板 倉 弘 重

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書

代謝変化と栄養による修飾の研究

主任研究者 板倉 弘重

国立健康・栄養研究所健康 名誉所員

研究要旨

高齢者の主要な死因として、虚血性心疾患、脳血管障害があげられる。これらの疾患は動脈硬化によるものであり、動脈硬化の発症機構の解明とその予防対策が必要である。動脈硬化の発症進展に脂質代謝異常が関与していることが明らかにされているが脂質代謝調節機構についてはまだ不明のところも多く、動脈硬化とのかかわりを解明するにはさらに研究を進めなければならない。

これまでリポ蛋白代謝調節機構について研究をすすめ、新しいリポ蛋白受容体として VLDL 受容体、アポ E2 受容体、HDL 受容体 (HB2) のクローニングに成功し、構造を決定した。これらの受容体の機能解析を進め、細胞内コレステロール代謝調節に HB2 が関与していることを明らかにした。VLDL 受容体の機能を明らかにするため VLDL 受容体欠損動物を作成した。VLDL 受容体は脂肪組織が TG-リッチリポ蛋白を取り込むために役割をはたしていることが明らかになった。

酸化 LDL が主としてマクロファージスカベンジャー受容体を介して取り込まれ泡沫細胞の増殖をもたらすことを報告した。細胞内カルシウム上昇とこれに続く PKC の活性化が細胞内にシグナルとして重要であることが明らかとなった。

加齢に伴ない免疫応答の変動が見られる。酸化コレステロールにより免疫応答の変化が示され、酸化ストレスが免疫機能の低下をもたらすことが示された。またエイコサノイドの産生は必ずしも脂肪酸構成に一致して変動しないことが示された。

分担研究者

板倉 弘重 国立健康・栄養研究所健康 名誉所員

菅野 道廣 熊本県立大学 教授

山本 徳雄 東北大学遺伝子実験施設 教授

堀内 正公 熊本大学医学部 教授

A. 研究目的

老化過程では代謝変化が認められ、栄養が代謝変化を修飾して老化制御あるいは老化促進に働くこともあることが知られている。生体は加齢と共に諸臓器機能が低下してくるが健康を維持していくためには、代謝機能が良好な状態に保たれ、様々な侵襲に対応して適切な調節機能が発揮されなければならない。

これまでの研究で、加齢と共に代謝が変化し、その結果様々な病態が発生し、高齢者では多臓器障害が多くにみとめられており、その予防と治療をはかることが求められている。なかでも脂質代謝障害は、高齢者の主要な死亡原因である動脈硬化をひきおこしており、その発症進展機序を解明することが重要である。そこで栄養による脂質代謝、糖代謝修飾機構を明らかにすると共に、老化制御にかかわりを持つ、抗酸化物質を介するフリーラジカル消去機構を解明し、加齢に伴う病態の予防と治療に必要な基礎的知見を得ることを目的に研究を行う。加齢に伴う疾病の予防に、食事、運動などの生活習慣が大切であることが認識されるようになって来た。予防方針を立てるための科学的データが必要であり、そのための知見を得ることを目的とする。

B.研究方法

脂質代謝調節機構として重要な役割をはたしているものにリポ蛋白受容体がある。LDL受容体は1970年代にすでに見出されているが酸化LDL受容体、HDL受容体、アポE受容体、カイロミクロンレムナント受容体など不明なところが多く、これらの受容体の調節機構の解明は大きな課題として残されている。そこでこれらの受容体の構造を明らかにし、機能の解析をすすめた。HDL受容体はSDラットの肝臓と肺から調整したRNAを用いて、HB2cDNA断片とクローニングし、さらにラット肺cDNAライブラリーを作成し、スクリーニングを行った。得られたHDL受容体について、細胞内コレステロールの代謝、脂溶性ビタミンの影響について解析した。アポEに特異的な受容体のクローニングを試み、VLDL受容体、アポE受容体2のクロー

ニングに成功した。受容体活性はLDL受容体欠損細胞にcDNAを発現し、ラジオアイソトープあるいは蛍光ラベルしたリポ蛋白を用いて解析した。

スカベンジャー受容体の機能と泡沫細胞増殖との関係について解析した。マウス腹腔マクロファージに酸化LDLを添加し、細胞数測定、放射性チミジンの取り込みを増殖の指標として検討した。同時に各種サイトカインの中和抗体を添加し、酸化LDLによるマクロファージ増殖に対する作用を検討した。GM-CSFの発現はRP-PCRおよびELISA法を用いてmRNAおよび蛋白レベルで検討した。加齢に伴う免疫応答の変動は高齢者にとって重要な課題であり、脂質過酸化反応の免疫調節機構の発現に及ぼす影響について解明することとした。コレステロールの過酸化物質、多価不飽和脂肪酸について検討した。食事脂肪酸のプロスタグランジンE1に及ぼす影響について観察した。

C.研究結果及び考察

研究結果

HepG2細胞を用いてHDL受容体発現量に関する検討を行った結果、胆汁酸の種類により影響に違いのあることが判明した。

デオキシコール酸あるいはタウロコール酸の添加ではコントロールと差が見られなかったがケノデオキシコール酸、ウルソデオキシコール酸はHDL受容体発現量を増加させた胆汁酸の作用が肝細胞に特異的かどうかみるためにTHP-1由来マクロファージについて同様の実験を行ったところ、ケノデオキシコール酸によりHDL受容体発現量が増加した。

HMG-CoA還元酵素阻害薬によってもHDL受容体発現量が増加した。ビタミンの影響は、

レチノール, α -トコフェロールなど HDL 受容体を低下させるものと, 1 $\alpha,25$ -ビタミン D3 のように発現量を増加させるものがあることが判明した。

野生型 C57BL/6 マウス, VLDL 受容体欠損マウス, LDL 受容体欠損マウス, VLDL 受容体と LDL 受容体を共に欠損するマウスから調整した胎児由来繊維芽細胞を用い, 脂肪細胞分化させた結果, 4 種のマウス由来の細胞に分化率の違いは認められなかった。これらの細胞で β -VLDL の結合, 細胞内への取り込みを解析したところ, VLDL 受容体と LDL 受容体を共に欠損するとほとんど取り込みが見られなくなることが明らかとなった。アポ E 欠損マウスの脂肪組織重量も有意に減少することが示された。酸化 LDL によるマクロファージの増殖は GM-CSF 抗体で有意に抑制された。酸化 LDL は GM-CSF の mRNA および蛋白量を増加させることが示され, この現象は PKC 阻害剤 (カルフォスチン C) で抑制されることが明らかにされた。これらの結果から, 酸化 LDL によって活性化された PKC が GM-CSF の産生を促進し, マクロファージ増殖を誘導している可能性が考えられた。

ルシフェラーゼアッセイの結果, GM-CSF 遺伝子の 5' 端上流 -224bp から -120bp の領域に酸化 LDL 刺激によって GM-CSF の転写を正に調節する部位を固定した。ゲルシフトアッセイの結果, GM-CSF 遺伝子 5' 端上流の -173bp から -147bp の領域に AP-2 結合領域が存在し, 酸化 LDL 刺激により, 本領域に核蛋白質の結合が増加することが明らかとなった。

摂取脂肪酸の体重および臓器重量に及ぼす影響は脂肪量が 10% の場合, リノール酸, γ -リノレン酸, EPA および DHA に富む魚油の

間で大きな差は認められなかった。

血清脂質濃度に及ぼす影響をみると若齢ラット, 加齢ラット共に血清総コレステロール濃度は γ -リノレン酸で高く, 魚油群で低い傾向がみられた。

血清中の抗体価は若齢ラットに比較し, 加齢ラットでは高値を示した。しかし食事脂肪の違いによる影響は少なかった。臓器脂肪酸組成は食事脂肪の組織に応じて変化が認められた。PGE1 産生能について検討したところ, その産生量は必ずしもジホモ γ -リノレン酸含量と相関せず, また魚油群で最も PGE1 産生能が低下した。

考察

生体内では脂質, 糖質は相互に関連して代謝調節を受けており, 加齢と共にこれらの代謝機能が変化し, 高脂血症, 耐糖能障害を有する頻度が増加している。そのため動脈硬化が急速に進展し, 脳血管障害や虚血性心疾患罹患者が加齢と共に増加し, 高齢者での重大な病態となっている。我々は特に脂質代謝に焦点をあてて研究を進め, これまでに HDL 受容体, スカベンジャー受容体, VLDL 受容体, アポ E 受容体 2 などについて構造の解明とその発現調節, 機能について報告して来た。

LDL 受容体遺伝子の 5' 上流領域に, 細胞内コレステロール濃度に応答して転写調節を行う SRE の存在が明らかにされており, 我々はこれまでにケノデオキシコール酸が SREBP-1 を介して, LDL 受容体発現を高めることを報告してきた。今回ケノデオキシコール酸は HDL 受容体 HB2 の発現も高めることを見出した。胆汁酸によるリポ蛋白受容体遺伝子発現機構に共通の構造が存在する可能性が示唆される。細胞内コレステロール代謝の調節に

複数の酵素、受容体が関係し、HDL受容体もその一部の役割をはたしていると考えられる。HDL受容体の発現はビタミンによっても活性の変化がもたせることが示され、シグナル伝達にも関係していることから、食物成分と受容体を介する相互作用が生体にどのような効果を及ぼしていくか今後さらに解明することが大切であると思われる。

リポ蛋白のうちLDLについてはLDL受容体を介する細胞内への取り込みと、LDLが変性した場合のスキャベンジャー受容体などによる取り込みなど解明が進んでいるがレムナント粒子についての解明は不十分である。日本人の動脈硬化発症にレムナント粒子が重要な役割をはたしていることが推定されることから、レムナント粒子の代謝機構の解明は大切である。レムナント粒子受容体として、VLDL受容体、アポE受容体2を解明し、その研究を進めたところ、脂肪組織への脂肪の輸送に関与していることが明らかとなった。今後、肥満、インスリン抵抗性症候群など脂肪組織が関与する病態にどのようにこれらの受容体がかかわっているか明らかにしていくことが必要であると思われる。

動脈硬化の発症進展に酸化LDLが関与していることは明らかにされている。酸化LDLの生成とその病態発症機構にはまだ不明のところが多く残されている。我々はスキャベンジャー受容体の構造を明らかにし、遺伝子発現調節機構について研究を進めると共に、その欠損動物を作成し、その機能の研究を行った。酸化LDLは主として、スキャベンジャー受容体を介してマクロファージに取り込まれ、マクロファージの増殖を促進させていることを明らかにした。このマクロファージの増殖はPKCの活性化とそれに引き続くGM-CSFの

産生を介して行われていることを明らかにした。この知見をもとに、アテローム病巣の治療法について研究を進めていくことが必要と考えている。また酸化LDLの生成を抑制することもその治療法の一つとして大切であると考え、食品中のポリフェノールの効果について研究をすすめ、その一部を発表している。

不飽和脂肪酸の酸化によりラットリンパ球のIgE産生が促進されるなど食餌脂肪が免疫調節機能を有することが示されている。加齢によって免疫調節機能が変化することも見出されており食餌脂肪と加齢がどのように免疫機能に影響するか解析をすすめることは意義があると考えられる。食餌脂肪の違いが血清コレステロール、トリグリセリド濃度に影響を及ぼしているが魚油は第4シリーズのロイコトリエン産生抑制を通じて抗アレルギー作用が認められた。このことは若齢および加齢ラットに共通に作用が認められた。抗アレルギー作用は組織中の脂肪酸構成の変化以外の要因によっても影響を受けることが示され今後の検討課題である。

D. 結論

1. 新しく発見したHDL受容体(HB2)はケノデオキシコール酸により発現量の増加が認められ、細胞コレステロール合成量によっても発現量が変動することから、LDL受容体と共にコレステロールの代謝調節に関与していることが明らかとなった。
2. アポEとその受容体が脂肪細胞への脂質の転送に関与していることが明らかとなった。脂肪組織の機能と肥満症における意義についての研究に新しい手掛りが得られた。
3. 酸化LDLによりマクロファージの増殖がひきおこされアテローム形成が進行するが、

その機序として、細胞内カルシウム上昇とそれに続く PKC の活性化が細胞内シグナルとして重要であり、GM-CSF の産生を介してマクロファージ増殖が誘導されることが明らかになった。

4.魚油は加齢にかかわらず、脂肪代謝改善機能および抗アレルギー作用を有することが示された。PGE1 産生能は基準レベル以外の要因で抑制されていることが明らかにされた。

E.研究発表

1.論文発表

1)板倉弘重: 動脈硬化の予防と治療.栄養学雑誌,56(3):129-138,1998

2)寺田幸代, 梶木洋子, 松本明世, 近藤和雄, 板倉弘重: 脂肪負荷後の血清トリグリセライド値変動に及ぼす年齢及び遺伝子多型の影響に関する研究.Therapeutic Research 19(11): 219-224,1998

3)板倉弘重: 酸化・糖化変性の抑制とその効果
1 食事と酸化・糖化変性. 治療学 32(4): 74-78,1998

4)板倉弘重: 最近の脂質検査(1) 動脈硬化の成因と LDL コレステロール. 医学検査 47(8): 1284-1288,1998

5)板倉弘重: 最近の脂質検査(2) 動脈硬化の病態と LDL コレステロール. 医学検査 47(9): 1400-1403,1998

6)板倉弘重: 遺伝子と慢性疾患(3)高脂血症. 臨床栄養 92(3): 241-244,1998

7)R,Yanagibori K,Kondo Y,Suzuki K,Kawakubo T,Iwamoto H,Itakura A,Gunji : Effct of 20 day's bed rest on the reverse cholesterol transport system in healthy young subjects. Journal of Internal Medicine 243: 307-312,1998

8)R,Oshima T,Ikeda K,Watanabe H,Itakura N,Sugiyama : Probucol treatment attenuates the aortic atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemicrabbits. Atherosclerosis.137: 13-22,1998

9)A,Iizuka O,T.Iijima F,Yoshiie B,Makino S,Amagaya Y,Komatsu K,Kondo A,Matsumoto H,Itakura : Inhibitory effect of Dai-saik-to(Da-Chai-Hu-Tang)on the progression of atherosclerotic lesions in Korosawa and Kusanagi-hypercholesuterolemic rabbits. Journal of Ethnopharmacology. 63: 209-218,1998

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

栄養と代謝機能の変化に関する研究

主任研究者 板倉 弘重
国立健康・栄養研究所 名誉所員

研究要旨

加齢に伴う主要な病態として動脈硬化があげられ、その発症進展に脂質代謝異常が関与している。動脈硬化病巣の形成に促進的に関係するマクロファージスカベンジャー受容体を介する酸化LDLの取り込み機構とその調節因子について研究を進めた。一方、動脈硬化の抑制にはHDLを介するコレステロール逆転送系の活性化が重要と考えられるが、これまでHDL受容体の解明がおくれている。我々はHDL受容体のクローニングを試み、新しいHDL受容体を見出した。この新しいHDL受容体（HB2）の調節機構について研究をすすめた結果、細胞内コレステロールに反応して、HDL受容体の発現量が増加することが認められた。このHDL受容体は細胞接着分子に属するイムノグロブリンスーパーファミリーの膜糖蛋白と相同性が高く、コレステロール代謝を介して、免疫機能の調節にも関与していることが示唆される。

スカベンジャー受容体を介するマクロファージの泡沫細胞化には酸化LDLが関与しており、血管免疫の進行を抑えるにはLDLの酸化変性を抑制することが必要である。LDLの酸化変性を抑制する方法としてポリフェノールの摂取について検討し、有効であることを証明した。

A.研究目的

加齢に伴う代謝機能の変化により、脂質代謝異常、耐糖能障害、高血圧などの生活習慣病が増加してくる。これらの代謝異常が動脈硬化を発症進行させ、冠動脈疾患や脳血管障害あるいは痴呆など、高齢者に高率に見られる血管循環障害による病態をひきおこしている。特に脂質代謝異常は動脈硬化の成因として重要であり、そこに栄養が密接に関係している。

そこで動脈硬化巣の形成にかかわる脂質代謝調節機構の解明と、動脈硬化予防のための栄養学的アプローチをおこなうこととした。泡沫細胞形成に促進的に作用するスカベンジャー受容体の発現調節とコレステロール逆転送に関与するHDL受容体の構造を明らかにし、その発現調節の機構を明らかにすることを目的に研究を進めた。また酸化LDLの生成を抑制する食品成分について研究し、動脈硬化の

予防に役立つことを目的とし研究を進めた。

B.研究方法

これまでに、ヒトスカベンジャー受容体については我々の研究室でクローニングに成功し、遺伝子発現調節機構について研究を進め、スカベンジャー受容体遺伝子のプロモーター領域の解析を行った。

次にHDL受容体の研究を進めるにあたり、まずラットHDL結合蛋白2(HB2)のクローニングを行い、その構造特性を解析した。HB2の発現は転写レベルで調節されていることが明らかにされたので、さらにHB2の発現を調節する因子について検討した。単球のマクロファージへの分化過程についてHB2の発現が上昇する。LDL受容体の発現調節に胆汁酸が関係していることはすでに報告したが、HB2の発現にも関与しているかどうか解析することとした。細胞内コレステロールの合成を抑制するHMGCoA還元酵素阻害薬でコレステロールプールを変化させた場合の影響について検討することとした。

脂溶性ビタミンが遺伝子の発現調節に関与していることが報告されている。そこでレチノール、活性型ビタミンD3、 α -トコフェロールによるHB2の発現調節について検討した。

C.研究結果

コンフルエントに達したHepG2細胞に、終濃度0.05mMとなるように各胆汁酸を添加し、24時間インキュベートし、Northern-blot hybridization法によりHB2の検出を行った。胆汁酸の種類によ

り影響に違いが認められた。Deoxy cholic acidあるいはTawo cholic acidの添加ではHB2の発現量はコントロールと差が認められなかったが、Chenodeoxycholic acid,ursodeoxycholic acidの添加でHB2の発現は有意に上昇した。胆汁酸の作用が肝細胞に特異的かどうかをみるためにTHP-1由来マクロファージについても同様の実験を行ったところ、chenodeoxycholic acidによりHB2の発現が上昇されることが判った。

今回、HMG-CoA還元酵素阻害剤として、シンバスタチン、プラバスタチンを用いて、HB2の発現に及ぼす影響について検討した。シンバスタチンは10nMから、プラバスタチンは100nMからHB2の発現を有意に上昇させた。発現量はコントロールに対し、プラバスタチンは1.5倍以内であるがシンバスタチンは1.5倍以上に増加させ、HB2発現量の増加はシンバスタチンでより強い効果が認められた。

ビタミンのHB2発現に及ぼす影響を検討したところ、レチノール添加によって、THP-1細胞ではHB2の発現は変化しなかったが、THP-1由来マクロファージでは有意に減少した。10 μ M添加で65%までの減少がみられた。HepG2細胞でもレチノールの添加によりHB2の発現は顕著に減少した。1 μ Mの添加により、無添加時の35%まで減少した。

1 α , 25-ビタミンD3(活性型)添加によるHB2発現に及ぼす影響はTHP-1細胞においては変化がなかったが、THP-1由来マクロファージでは有意に上昇し、100 μ M添加で無添加時の1.56倍となっ

た。HepG2細胞でも10nMの添加で無添加時の1.56倍まで有意にHB2の発現が増加した。

α -トコフェロールのHB2発現に及ぼす影響を観察したところ、THP-1細胞ではHB2の発現に差が見られなかったが、THP-1由来マクロファージでは10 μ Mで無添加時の68.9%まで有意に低下したこれに対し、HepG2細胞では10 μ Mで無添加時の82.2%に低下したのみで影響が少なかった。

D.考察

細胞内コレステロールのLDL受容体発現調節機構に関しては、これまでに多くの報告があり、LDL受容体遺伝子の5'上流領域に細胞内コレステロール濃度に応答して転写制御を行うSREの存在が明らかにされている。我々はこれまでにchenodeoxycholic acidがSREBP-1を介してLDL受容体発現を高めることを報告してきた。今回HB2の発現をchenodeoxycholic acidが高めることが確認され、同様の機構が存在する可能性が示唆された。しかしHB2はursodeoxycholic acidによっても発現量の亢進が認められており、これはLDL受容体では認められなかったことである。胆汁酸によるHB2発現調節機構についてはさらに研究を進める必要があると考える。

HMGCoA還元酵素阻害薬による細胞内コレステロールプールの減少はLDL受容体発現量を高めることが知られているが、HB2についても発現量の増加が認められた。HB2は細胞内コレステロール代謝の影響を受けて発現量の調節を受けて

いることが明らかになった。HB2はLDL受容体と共に細胞内コレステロールの恒常化に関与していると考えられる。

ビタミンAやDは核内受容体が発見され、生体の代謝調節に様々な形で関わりあっていると考えられる。ビタミンEは抗酸化作用を有するビタミンとして重要である。高齢者では感染に対する抵抗力の低下、骨粗鬆症、酸化ストレスによる老化の促進などが課題であり、これらのビタミン補給とHB2の役割を明らかにするために意義のある研究と考えた。

レチノールによりHB2が肝細胞においても、マクロファージにおいても発現の抑制が確認された。このことはHDLがHB2に結合することで何らかのシグナル伝達が行われレチノールがプロテインキナーゼCを阻害してHB2の発現を抑制する可能性も考えられる。今後さらに研究を進めたいと考える。

ビタミンD3はマクロファージ、肝細胞ともにHB2の発現量を増加させている。ビタミンD3受容体はプロテインキナーゼCによりリン酸化されることが報告されており、ビタミンD3の影響はプロテインキナーゼCの活性をもたらしてHB2転写の促進をもたらされた可能性が考えられる。

α -トコフェロールはプロテインキナーゼCの活性を阻害するという報告もある。マクロファージでは α -トコフェロールによりHB2発現の抑制が認められた。 α -トコフェロールは抗酸化作用により酸化LDLの生成を抑制し、マクロファージの泡沫細胞化を阻ぐとの報告もある。この反応を介してHB2の発現を抑制した可能

性も考えられる。

E. 結論

HDL受容体(HB2)はchenodeoxycholic acidにより発現量の増加が認められた。細胞内コレステロールプールを減少させるとHB2の発現量の上昇が認められた。LDL受容体と類似した機構で、細胞内コレステロールに反応してHB2発現は変動すると考えられる。

レチノールはHB2発現量を低下させた。ビタミンD活性型はHB2発現量を増加させた。 α -トコフェロールはマクロファージのHB2発現量を減少させた。脂溶性ビタミンはプロテインキナーゼC活性を変動させ、これを介してHB2発現が調節されている可能性が示唆される。

さらにHB2の役割を明らかにしていることが必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yanagibori R, Kondo K, Itakura H. et al. Effect of 20 days' bed rest on the reverse cholesterol transport system in healthy young subjects. J. Int. Med. 243:307-312, 1998

2) Oshima R, Ikeda T, Itakura H. et al. Probucol treatment attenuates the aortic atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. atherosclerosis 137:13-22, 1998

3) Iizuka A, Iijima OT, Itakura H. et al. Inhibitory effects of Dai-saiko-To on the progression of atherosclerotic lesions in Kurosawa and Kusanagi-

hypercholesterolemic rabbits.

J. Ethnopharm 63, 209-218, 1998

加齢に伴う細胞老化および免疫機能低下の 栄養的制御

菅野道廣（熊本県立大学教授）

山田耕路（九州大学農学部教授）

ラットの加齢に伴う脂質代謝および免疫機能の変化に及ぼす食餌脂肪の摂食効果について検討した。その結果、魚油を摂食した若齢および加齢ラットでは、アラキドン酸レベルの低下を介して抗アレルギー効果が発現することが示唆された。ボラージ油摂食ラットでは、ジホモ- γ -リノレン酸の割合が上昇したが、必ずしも PGE₁ 産生能の上昇につながらないことが示された。

キーワード：ラット、魚油、ボラージ油、免疫調節機能、脂質代謝調節機能

A. 研究目的

加齢に伴う免疫応答の変動は種々の疾病を誘発し、助長する。われわれは胆汁酸¹⁾や不飽和脂肪酸²⁾などの脂質関連物質が強い免疫調節作用を有しており、ラットリンパ球の IgE 産生の促進およびその他の抗体産生の抑制を通じて I 型アレルギー応答の促進および液性免疫機能の低下をもたらすことを明らかにした。この免疫調節機能の発現には脂質過酸化反応が関与しており、脂溶性抗酸化成分の共存により不飽和脂肪酸の IgE 産生促進効果の発現が阻害された²⁾。脂質過酸化反応はコレステロールにおいても問題となり、コレステロール酸化物が強い免疫修飾作用を発現することがこれまでの研究で明らかとなっている³⁾。以上の結果は、脂質過酸化物の生成が免疫機能を修飾し、アレルギー応答を促進するとともに、感染症発症の危険性を増大させることを示唆している。

このような脂質過酸化物の免疫修飾作用の発現を阻止するためには、食品中の抗酸化

成分の活用が有効であり、われわれは食品中の抗酸化成分が IgE 産生抑制効果に加え、ケミカルメディエーター放出を抑制することにより、I 型アレルギー応答を抑制することを細胞実験系を用いてすでに明らかにした^{4,5)}。一方、 γ -リノレン酸、エイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA) などの多価不飽和脂肪酸が抗アレルギー効果を有するとの報告もあり、食餌脂肪の免疫調節機能の解明が必要となっている。本研究では、これら抗アレルギー活性が報告されている多価不飽和脂肪酸の摂食効果を週齢の異なるラットを用いて検討した。 γ -リノレン酸の免疫調節機能はその代謝物であるジホモ- γ -リノレン酸 (DGLA) から生産されるプロスタグランジン E₁ (PGE₁) を介して発現する可能性がある。そこで、各種組織の PGE₁ 産生能に及ぼす影響についても検討した。

B. 研究方式

1. 摂食実験

4週齢（若齢）および8ヶ月齢（加齢）の Sprague-Dawley (SD) ラットに20%のカゼイン、10%の食餌脂肪を含むAIN93Gタイプの純化食を3週間摂食させ、種々の免疫指標に及ぼす影響を検討した。食餌脂肪はリノール酸に富むサフラワー油 (SO)、 γ -リノレン酸に富むボラージ油 (BO)、EPAおよびDHAに富む魚油 (FO) を用いた。これら食餌脂肪は多価不飽和脂肪酸含量を約60%に合わせるため、パーム油と混合するか、相互に混合したものを用いた。得られた混合物の脂肪酸組成をTable 1に示した。

2. 臓器組成の分析

飼育終了後、大動脈より血液を採取し、血清中のコレステロール、トリグリセリドおよびリン脂質濃度を市販の測定キットを用いて測定した。血清中の各種抗体濃度は酵素抗体法を用いて測定した。また、肝臓、脳、腎臓、心臓、肺臓、脾臓および睾丸周辺脂肪組織を切除し、組織重量を測定した。さらに、これら組織の総脂質あるいはリン脂質について、ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸組成を分析した。

3. リンパ球の分析

これら食餌脂肪を摂食させたラットの脾臓および腸間膜リンパ節 (MLN) からリンパ球を分離し、10%ウシ胎児血清含有RPMI1640培地中で24時間培養して培養上清中の抗体濃度を測定することにより、食餌脂肪摂食が抗体産生能に及ぼす影響を検討した。脾臓リンパ球については、総脂質の脂肪酸分析を行った。

4. 肝臓および脾臓リンパ球 PGE₁ 産生能の測定

ラットの肝臓1gを10mlの0.1Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 中でホモジナイズ

し、37°Cで10分間振とうしてPGE₁を産生させた後、0.5mlの42mMアスピリン溶液を添加してPGE₁産生を停止させた。反応上清中のPGE₁濃度は酵素抗体法により定量した。脾臓リンパ球では10⁸個の細胞を2mlの緩衝液中でホモジナイズし、同様に反応を行った。

C. 研究成果

1. ラットの成長に及ぼす影響

摂食量および体重増加については、食餌脂肪の種類により有意な差は認められなかった。臓器重量においては、若齢ラットでBOおよびFO摂食群でSO群より脾臓重量が有意に増加する傾向が認められたが、加齢ラットではまったく差が認められなかった。加齢ラットの肝臓重量はBO群で有意に高い値が得られたが、若齢ラットでは有意な差を与えるには至らなかった。他の臓器の重量については、顕著な効果は認められなかった。これらの食餌脂肪の多価不飽和脂肪酸の組成はかなり偏っているが、これらの結果は10%レベルでの食餌脂肪の摂取はラットの成長および臓器重量に大きな変化をもたらさないことを示している。

2. 血清脂質濃度に及ぼす影響

Table 2に血清脂質濃度に及ぼす食餌脂肪の影響を示した。総コレステロール濃度はBO群で最も高く、FO群で最も低い結果が若齢ラットと加齢ラットの両方で得られた。トリグリセリド濃度は若齢ラットではBO群で有意に高い結果が得られたが、加齢ラットではSO群とBO群の間に差は認められず、FO群で有意に低い結果が得られた。リン脂質濃度については、若齢および加齢ラットの両者においてBO群で最も高く、FO群で最も低

い結果が得られた。

3. 抗体産生能に及ぼす影響

血清中の抗体価は、いずれも若齢ラットに比べ加齢ラットで数倍高い価が得られ、若齢ラットでは抗体レベルがかなり低い状態にあることが明らかとなった。しかし、食餌脂肪の違いによる影響は大きなものではなかった。脾臓および MLN リンパ球の抗体産生能の及ぼす影響も小さなものであり、これら食餌脂肪の摂食が抗体産生系に及ぼす影響は比較的小さいことが示唆された。

4. 脂肪酸組成および PGE₁ 産生に及ぼす影響

各種臓器の脂肪酸組成においては食餌脂肪は顕著な影響を与えた。Table 3 に肝臓 PC の脂肪酸組成を示したが、BO 群では SO 群と比べてリノールの割合が顕著に低く、 γ -リノレン酸、DGLA およびアラキドン酸の割合が有意に高い結果が、若齢および加齢ラットの両者で得られた。一方、FO 群ではアラキドン酸の割合が有意に低く、EPA および DHA の割合が有意に高い結果が若齢および加齢ラットの両者で得られた。

同様な影響は脾臓リンパ球の脂肪酸組成においても認められた (Table 4)。しかし、肝臓 PC への影響とは異なる傾向も認められ、脾臓リンパ球では、肝臓 PC と比べ DGLA の割合が高い傾向が認められ、BO 群における DGLA の増加傾向が肝臓 PC よりさらに顕著に認められた。

DGLA のシクロオキシゲナーゼ酸化により生じる PGE₁ は血小板凝集抑制作用に加え、抗炎症作用を有することが知られている。そこで、これら組織の PGE₁ 産生能について検討し、Table 5 にその結果を示した。肝臓 PC および脾臓総脂質のいずれにおいても、BO

群で最も高い DGLA 含量が得られたが、PGE₁ 産生能は必ずしも DGLA 含量と相関せず、脾臓では SO 群で高い傾向が認められた。また、FO 群では PGE₁ 産生能が最も低い結果が得られた。肝臓においては、加齢に伴い PGE₁ 産生能が若干低下する傾向が認められたが、脾臓リンパ球においてはその傾向はさらに顕著であった。

D. 考察

不飽和脂肪酸の酸化によりラットリンパ球の IgE 産生が促進され、その他の抗体産生が抑制されることから、不飽和脂肪酸が I 型アレルギー応答を促進する可能性が細胞実験において明らかにされている²⁾。一方、ある種の多価不飽和脂肪酸が抗アレルギー効果を示すとの報告がある⁶⁾。これらの結果は、食餌脂肪が免疫調節機能を有することを示している。そこで、抗アレルギー効果が報告されている γ -リノレン酸、EPA、DHA に富む食餌脂肪の免疫調節機能について検討した。

食餌脂肪レベルは現在の日本人の平均的な摂取レベルより若干低いと考えられる 10% レベル (エネルギー比 22~23%) で投与したが、IgE は血清中にも脾臓および MLN リンパ球培養上清中にも検出されなかった。多価不飽和脂肪酸は IgE 産生促進効果を有するが²⁾、この程度の摂取レベルでは IgE 産生の促進をもたらすことは無いと考えられた。その他の抗体については、若齢ラットで BO および FO 群で MLN リンパ球の IgA 産生能が高値を与え、これらの食餌脂肪の摂食により腸管免疫系の発達が促進される可能性が示された。加齢ラットでは、FO 群で脾臓および MLN リンパ球の IgA、IgG および IgM

産生能が高い傾向が認められ、魚油摂食により抗体産生系が活性化される可能性が示された。

脂質代謝調節機能においては、FO 群で血清コレステロール、トリグリセリド、リン脂質レベルが有意に低い結果が若齢および加齢ラットの両方で認められた。この結果は、魚油摂食が強い脂質代謝改善機能を有することを示しており、循環器系疾患の予防に有効であることを示唆する。

n-3 系多価不飽和脂肪酸は 4-シリーズロイコトリエン (LT) の産生抑制を通じて抗アレルギー効果を発現する⁷⁾。今回の摂食実験結果では、FO 群で、肝臓リン脂質のアラキドン酸の割合が顕著に低下することが明らかとなり、若齢および加齢ラットの両方で 4-シリーズ LT の産生が低下する可能性が示された。本実験では 4-シリーズ LT 産生能の比較は行わなかったが、若齢ラットを用いた実験では、高 EPA 魚油の摂食は肝臓および腹腔滲出細胞のアラキドン酸レベルを高 DHA 魚油より顕著に低下させ、LTB₄ 産生能の顕著な低下を導くことを確認している⁸⁾。

一方、BO 群ではアラキドン酸レベルが上昇する傾向を示し、4-シリーズ LT の産生抑制を通じて抗アレルギー効果を発現する可能性は低いものと考えられる。BO 群では DGLA レベルの上昇が認められたことから、1-シリーズ PG もしくは 3-シリーズ LT の産生を通じて抗アレルギー活性を発現する可能性が考えられた。そこで、肝臓および脾臓リンパ球の PGE₁ 産生能を比較したが、BO 群で特に高い産生は認められず、 γ -リノレン酸の抗アレルギー作用の発現には PGE₁ 以外の因子が関与する可能性が示された。また、これら組織の DGLA 含量と PGE₁ 産生能との

間に相関が認められなかったことは、これら組織の PGE₁ 産生が基質レベル以外の要因で制御されていることを示唆している。

E. 結論

ラットにリノール酸に富む SO、 γ -リノレン酸に富む BO、EPA および DHA に富む FO を 10% レベルで摂食させ、脂質代謝および免疫系に及ぼす影響を検討した。これらの食餌脂肪のなかでは、FO が血清中のコレステロール、トリグリセリドおよびリン脂質レベルを顕著に低下させるとともに、肝臓および脾臓リンパ球のアラキドン酸レベルを若齢および加齢ラットの両方で顕著に低下させた。これらの結果は、FO が強い脂質代謝改善機能および抗アレルギー作用を有することを示唆する。BO 摂食群では、これら組織において DGLA の顕著な蓄積をもたらしたが、PGE₁ 産生能の上昇は認められず、これら組織の PGE₁ 産生能は基質レベル以外の要因で制御されていることが示唆された。

F. 引用文献

- 1) B.O. Lim et al.: Effect of bile acids and lectins on immunoglobulin production in rat mesenteric lymph node lymphocytes. *In Vitro Cell. Develop. Biol.*, 30: 407-413, 1994.
- 2) K. Yamada et al.: Effect of unsaturated fatty acids and antioxidants on immunoglobulin production by mesenteric lymph node lymphocytes of Sprague-Dawley rats. *J. Biochem.*, 120: 138-144, 1996.
- 3) K. Osada et al.: Effect of dietary oxidized cholesterol on lipid metabolism in differently aged rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*,

58: 1073-1076, 1994.

- 4) N. Matsuo et al.: Inhibitory effect of tea polyphenols on histamine and leukotriene B₄ release from rat peritoneal exudate cells. *In Vitro Cell. Develop. Biol.*, 32: 340-344, 1996.
- 5) K. Yamada et al.: Effect of tea extracts and phenolic compounds on immunoglobulin production by mesenteric lymph node lymphocytes of Sprague-Dawley rats. *Food Sci. Technol. Int.*, 3: 179-183, 1997.
- 6) T.H. Lee et al.: Effect of dietary enrichment of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil function. *N. Engl. J. Med.*, 312: 1217-1224, 1985.
- 7) Yamada et al.: Effect of fatty acids on accumulation and secretion of histamine in RBL-2H3 cells and leukotriene release from peritoneal exudate cells isolated from Wistar rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 42: 301-311, 1996.
- 8) P. Hung et al.: Dietary effect of EPA-rich and DHA-rich fish oils on the immune function of Sprague-Dawley rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63 (1) 135-140, 1999.

G. 研究成果

1. 論文発表

- ① M. Sugano et al.: Conjugated linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediators and immunoglobulins in rats. *Lipids*, 33(5), 521-527, 1998.
- ② K. Yamada et al.: *In vitro* and *in vivo* effects of fatty acids and phenolic compounds on chemical mediator release from rat peritoneal exudate cells. ACS symposium series 701, In *Functional Foods for Disease Prevention I Fruits, Vegetables and Teas*, ed. by T. Shibamoto, J. Terao, T. Osawa, pp 198-208, 1988.
- ③ J.-Y. Gu et al.: Effect of dietary fats and sesamin on lipid metabolism and immune function of Sprague-Dawley rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62(10), 1917-1924, 1998.
- ④ 山田耕路ら: 大豆ペプチドの抗アレルギー作用に関する研究: 大豆たん白質と食餌脂肪の免疫調節機能. *大豆たん白質研究*, 1, 81-85, 1998.
- ⑤ Y. Kuramoto et al.: Effect of Rose Bengal on immunoglobulin production by mouse B lymphoma, WEHI-279 cells. *J. Agric. Food Chem.* 46 (12), 5368-5372, 1998.
- ⑥ P. Hung et al.: Dietary effect of EPA-rich and DHA-rich fish oils on the immune function of Sprague-Dawley rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63 (1) 135-140, 1999.

2. 学会発表

- ① 加来志保子ら: ラットの免疫機能に及ぼす食餌脂肪および大豆タンパク質の影響, 日本食品科学工学会大会, 1998.
- ② 大司麻利子ら: ラットの免疫機能に及ぼすボラージュ油および魚油摂食の影響, 日本農芸化学会大会, 1999.
- ③ 大倉健一ら: 若齢および加齢ラットの脂質代謝に及ぼすボラージュ油の摂食効果, 日本栄養・食糧学会総会, 1999.

Table 1. Fatty Acid Composition of Dietary Fats.

Fatty acid	SO	BO	FO
16:0	13.7	16.0	9.7
18:0	2.9	2.9	2.6
18:1n-9	19.7	17.5	12.7
18:2n-6	61.4	14.2	12.0
18:3n-6	0.4	44.8	0.2
20:5n-3	0	0	5.6
22:6n-3	0	0	34.9

SO; an 8:2 mixture of safflower and palm oils. BO; a 7:3 mixture of borage and palm oils. FO; an 85.3:14.7 mixture of fish and safflower oils.

Table 2. Effect of Dietary Fats on Serum Lipid Levels of Sprague-Dawley Rats

Group	Cholesterol (mg/dl)	Triglycerides (mg/dl)	Phospholipids (mg/dl)
Young			
SO	92±10 ^a	69±9 ^a	139±14 ^a
BO	149±16 ^b	121±23 ^b	185±19 ^b
FO	41±4 ^c	60±8 ^a	80±7 ^c
Aged			
SO	88±5 ^a	158±24 ^a	127±8 ^a
BO	121±12 ^b	168±8 ^a	152±11 ^a
FO	52±7 ^c	99±13 ^b	86±7 ^b

Data are means±SE (n=5) and values without a common superscript letter are significantly different at $p < 0.05$.

Table 3. Effect of Dietary Fats on Fatty Acid Composition of Liver Phosphatidylcholine of Sprague-Dawley Rats

Group	Fatty acids (weight %)						
	18:1n-9	18:2n-6	18:3n-6	20:3n-6	20:4n-6	20:5n-3	22:6n-3
Young							
SO	2.1±0.2 ^a	9.5±0.8 ^a	0.11±0.01 ^a	0.50±0.07 ^a	33.2±0.6 ^a	ND ^a	3.1±0.3 ^a
BO	1.3±0.1 ^b	1.9±0.1 ^b	0.86±0.04 ^b	1.82±0.26 ^b	38.3±0.5 ^b	ND ^a	1.6±0.1 ^b
FO	1.8±0.2 ^{ab}	5.3±0.5 ^c	0.24±0.01 ^c	0.49±0.03 ^a	23.2±0.4 ^c	2.81±0.46 ^b	12.4±0.6 ^c
Aged							
SO	2.8±0.2	9.9±0.5 ^a	0.20±0.02 ^a	0.97±0.16 ^a	32.3±0.8 ^a	ND ^a	3.5±0.3 ^a
BO	2.2±0.2	2.9±0.1 ^b	1.27±0.15 ^b	2.40±0.39 ^b	34.4±0.3 ^b	ND ^a	3.0±0.3 ^a
FO	2.3±0.2	7.3±1.0 ^c	0.13±0.04 ^a	0.71±0.04 ^a	20.4±0.2 ^c	3.29±0.15 ^b	10.1±0.6 ^b

Data are means±SE (n=5) and values without a common superscript letter are significantly different at $p < 0.05$. ND; not detected.

Table 4. Effect of Dietary Fats on Fatty Acid Composition of Splenocyte Total Lipid of Sprague-Dawley Rats

Group	Fatty acids (weight %)						
	18:1n-9	18:2n-6	18:3n-6	20:3n-6	20:4n-6	20:5n-3	22:6n-3
Young							
SO	1.8±0.1	8.3±0.3 ^a	0.39±0.03 ^{ab}	0.82±0.06 ^a	12.4±0.4 ^a	0.15±0.15 ^a	0.53±0.06 ^a
BO	3.6±1.0	3.1±0.1 ^b	0.41±0.00 ^a	6.93±0.17 ^b	24.0±0.6 ^b	0.04±0.04 ^a	0.80±0.03 ^a
FO	3.2±0.2	8.0±0.5 ^a	0.13±0.13 ^b	0.76±0.04 ^a	14.3±0.6 ^c	2.22±0.11 ^b	5.99±0.23 ^b
Aged							
SO	3.2±0.2	11.7±0.5 ^a	ND ^a	1.21±0.02 ^a	17.8±0.4 ^a	ND ^a	1.41±0.07 ^a
BO	2.7±0.1	4.4±0.3 ^b	0.47±0.01 ^b	5.46±0.33 ^b	20.3±1.2 ^a	ND ^a	1.09±0.09 ^a
FO	3.4±0.4	8.2±0.8 ^c	0.26±0.04 ^c	0.68±0.09 ^a	11.7±1.1 ^b	1.34±0.14 ^b	5.88±0.60 ^b

Data are means±SE (n=3) and values without a common superscript letter are significantly different at $p < 0.05$. ND; not detected.

Table 5. Effect of Dietary Fats on PGE1 Productivity of Liver and Splenocytes of Sprague-Dawley Rats

	Liver		Splenocyte	
	DGLA (%)	PBE1 (ng/ml)	DGLA (%)	PBE1 (pg/ml)
Young				
SO	0.50±0.07 ^a	15.3±1.9 ^{ab}	0.82±0.06 ^a	206±23 ^a
BO	1.82±0.26 ^b	21.0±3.2 ^a	6.93±0.17 ^b	140±18 ^b
FO	0.49±0.03 ^a	6.2±0.5 ^b	0.76±0.04 ^a	25±3 ^c
Aged				
SO	0.97±0.16 ^a	10.1±2.7 ^a	1.21±0.02 ^a	46±11 ^{ab}
BO	2.46±0.39 ^b	9.9±2.2 ^a	5.46±0.33 ^b	52±9 ^a
FO	0.71±0.04 ^a	2.9±0.5 ^b	0.68±0.09 ^a	21±5 ^b

Data are means±SE (n=3 or 4) and values without a common superscript letter are significantly different at $p < 0.05$.

脂肪細胞におけるアポEレセプターの機能解析

山本徳男（東北大学遺伝子実験施設 教授）

要 旨

アポリポタンパクE（アポE）に特異的レセプターである超低密度リポタンパク質（VLDL）レセプター欠損マウスでは、脂肪組織において組織重量と脂肪含量の著しい低下が見られる。野性型やVLDLレセプター欠損、LDLレセプター欠損、VLDLレセプター/LDLレセプターを共に欠損するマウスより調製した初代繊維芽細胞を脂肪細胞へ分化させ、 β -VLDLの結合・取り込みを解析した結果、VLDLレセプターとLDLレセプターのそれぞれの欠損は β -VLDLの細胞内への取込みに大きな影響を与えないが、両者が共に欠損するとほとんど取り込みが見られなくなることが示された。また、リガンドであるアポE欠損マウスの脂肪組織重量を野性型と比較した結果、アポE欠損は脂肪組織重量を有意に減少させることが新たに示された。

A. 研究目的

コレステロールの主要運搬体である低密度リポタンパク（LDL）はLDLレセプターにより、結合されて、細胞内に取り込まれ代謝され、その異常は人類で最も頻度の高い遺伝病の一つである家族性高コレステロール血症を引き起こす（1, 2）。これに対し、アポEリポタンパクのレセプターの機能は依然として不明である。アポEリポタンパクに特異的なレセプターとして、超低密度リポタンパク質（VLDL）レセプター(3)とアポEレセプター2(4, 5)と名づけたレセプターがcDNAクローニングにより明らかにされている。2つのアポEは共に肝臓に発現なく、VLDLレセプターは筋肉細胞や脂肪細胞に、アポEレセプター2は脳に最も高く発現する。VLDLレセプターは鳥類では主として卵巣の卵母細胞に検出され、肝臓で合成分泌される卵黄前駆体の取り込みを担う(6)。これに対し、VLDLレセプターを欠損するノックアウトマウスのリポ蛋白プロファイルや血中コレステロール、中性脂肪濃度は正常と変わりなく、繁殖の異常もみられず(7)、唯一、脂肪細胞の脂質含量の顕著な減少が観察される。本研究では脂肪細胞におけるVLDLレセプター機能を明らかにすることを目的としている。

B. 実験方法

Sambrookらの常法(8)に従ってcDNAと遺伝子

を単離し、解析した。レセプター活性はLDLレセプター欠損ldlA-7細胞にcDNAを発現し、¹²⁵I、もしくは蛍光DII 標識リポタンパクを用いて解析した(9)。総RNAはGTC/CsCl法を用いて調製し、mRNA量はノザンプロッティングにより解析した。PCRは常法に従い(10)、反応産物はアガロースゲルを用いた電気泳動により解析した。免疫化学的方法は常法に従った(11)。

C. 結 果

野性型C57BL/6マウス、VLDLレセプター欠損マウス、LDLレセプター欠損マウス、VLDLレセプターとLDLレセプターを共に欠損するマウスからそれぞれ調製した胎児由来繊維芽細胞を用い、脂肪細胞に分化させた結果、4種のマウス由来の細胞に有為な分化率の違いはなく、VLDLレセプター欠損、LDLレセプター欠損、あるいは両者の欠損は脂肪細胞への分化に影響を与えないことが示された。

次に分化誘導させた脂肪細胞を用い、蛍光色素DIIで標識した β -VLDLの結合・細胞内への取込・解析した結果、VLDLレセプターとLDLレセプターそれぞれの欠損は β -VLDLの細胞内への取込みに大きな影響を与えないが、両者が共に欠損するとほとんど取り込みが見られなくなることが明らかにされた。

同様に、5～6週齢の野性型C57BL/6マウス、VLDLレセプター欠損マウス、LDLレセプター欠損マウス、VLDLレセプターとLDLレセプターを共に欠損するマウスの脂肪組織より、天井培養に調製した初代脂肪細胞を用い、DII標識 β -VLDLの結合、細胞内への取込みを解析した。その結果、繊維芽細胞より分化させた脂肪細胞同様に、VLDLレセプターとLDLレセプターのそれぞれ単独の欠損は β -VLDLの細胞内への取込みに大きな影響を与えず、両者が共に欠損するとほとんど取り込まれなくなることが示された。

前田らによって作製されたアポE欠損マウスは動脈硬化発症のモデルマウスとして広く用いられているが、肥満度についての知られていない。アポEはVLDLレセプターのリガンドとなるため、新たに解析した。その結果、アポE欠損は体重にほとんど変化を与えないが、脂肪組織重量は、有意に減少させることが示された。この結果は、VLDLレセプター欠損マウスの脂肪組織重量が減少すると合致し、アポEとそのレセプターであるVLDLレセプターにより、脂肪細胞へアポEリポタンパク由来のトリグリセリドが供給され、脂肪蓄積の一部を担うことが明らかになった。

D. 考察

従来、脂肪細胞へのリポタンパク由来の脂質の輸送を担うのはリポタンパクリパーゼと脂肪酸トランスポーターと信じられてきたが、本研究により、アポEとそのレセプターであるVLDLレセプターによりその一部が担われることが明らかになった。鳥類でのVLDLレセプターの機能は明らかであるが、ほ乳動物においてはミュータントが不在のため、明確にされていないが、今後、ミュータントを探す必要があると思われる。

E. 結論

アポEリポタンパクとそのレセプターにより、脂

肪細胞へ中性脂肪が供給されるメカニズムが示された。

F. 引用文献

1. Brown, M. S. & Goldstein, J. L. : A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34-47, 1986
2. Yamamoto, T., Davis, C. G., Brown, M. S., Schneider, W. J., Casey, M. L., Goldstein, J. L., and Russell, D. W.: The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* 39, 27-38, 1984
3. Takahashi, S., Kawarabayashi Y., Nakai T., Sakai J., and Yamamoto T.: Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9252-9256 (1992)
4. Kim, D. H., Iijima H., Goto K., Sakai J., Ishii H., Kim H. J., Suzuki H., Kondo H., Saeki S., and Yamamoto T.: Human apolipoprotein E receptor 2. A novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain. *J Biol Chem* 271, 8373-8380 (1996)
5. Kim, D. H., Magoori K., Inoue T. R., Mao C. C., Kim H. J., Suzuki H., Fujita T., Endo Y., Saeki S., and Yamamoto T. T.: Exon/Intron Organization, Chromosome Localization, Alternative Splicing, and Transcription Units of the Human Apolipoprotein E Receptor 2 Gene. *J Biol Chem* 272, 8498-8504 (1997)
6. Bujo, H., Yamamoto, T., Hayashi, K., Hermann, M., Nimpf, J. and Schneider, W. J. Mutant oocytic LDL receptor gene family member causes atherosclerosis and female sterility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92:

9905-9909

7. Frykman, P. L., Brown, M. S., Yamamoto, T., Goldstein, J. L. and Herz, J. Normal plasma lipoproteins and fertility in gene-targeted mice homozygous for a disruption in the gene encoding very low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92: 8453-8457.
 8. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY), 2nd Ed.
 9. Goldstein, J. L., Basu S. K., and Brown M. S.: Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymol* 98, 241-260 (1983)
 10. Saiki, R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., and Erlich H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491 (1988)
 11. Harlow, E., and Lane D.: *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Hrtbor, NY (1988)
- G. 研究発表
1. Kim, Hyoun-Ju. et al. Evolution of the Apolipoprotein E Receptor 2 Gene by Exon Loss. *J. Biochem.*124.451-456(1998)
 2. Iijima, Hiroaki. et al. Expression and Characterization of a Very Low Density Lipoprotein Receptor Variant Lacking the O-Linked Sugar Region Generated by Alternative Splicing. *J. Biochem.*124.747-755(1998)
 3. Tomita, Yasuhiro. et al. A Novel Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein with Type II Membrane Protein -Like Structure Is Abundant in Heart. *J. Biochem.*124.784-789(1998)
 4. Oikawa, Eisaku. et al. A Novel Acyl-CoA Synthetase, ACS5, Expressed in Intestinal Epithelial Cells and Proliferating Preadipocytes. *J. Biochem.*124.679-685(1998)
 5. Kim, Dong-Ho. et al. A New Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein, LRP5, Is Expressed in Hepatocytes and Adrenal Cortex, and Recognizes Apolipoprotein E. *J. Biochem.*124.1072-1076(1998)
 6. Ishii, Hirofumi. et al. cDNA Cloning of a New Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein and Mapping of Its Gene (LRP3) to Chromosome Bands 19q12-q13.2. *Genomics.*51.132-135(1998)