

## 酸化修飾低密度リポタンパク質の生物活性とその活性抑制因子としての Asp-hemolysin に関する分子生物学的研究

熊谷 健

### Biological Activity of Asp-hemolysin as a Regulation Factor to Atherogenic Effect by Oxidized Low-Density Lipoprotein

Takeshi KUMAGAI

Department of Environmental Health Science, Tohoku Pharmaceutical University,  
4-4-1 Komatsushima, Aoba-ku, Sendai City 981-8558, Japan

(Received May 17, 2006)

Oxidatively modified low-density lipoprotein (OxLDL) is present in atherosclerotic lesions and has been proposed to play an important role in atherogenesis. Asp-hemolysin, a hemolytic toxin from *Aspergillus fumigatus*, is a binding protein for OxLDL. This study was undertaken to clarify the biological activity of OxLDL and the potential of Asp-hemolysin as a regulation factor to atherogenic effect by OxLDL. We first analyzed the interaction between OxLDL and blood coagulation factors, which are involved in the blood coagulation pathway. OxLDL caused prolongation of activated partial thromboplastin time (APTT) as a parameter of the intrinsic pathway of blood coagulation in a dose- and oxidation time-dependent manner. In addition, OxLDL significantly inhibited blood coagulation factor VIII, IX, and XI activity. Furthermore, we demonstrated that factor VIII binds to OxLDL. These results indicate that the binding of factor VIII to OxLDL affects the intrinsic pathway of the blood coagulation cascade. Next, to clarify the structure-function relationship of Asp-hemolysin, we expressed Asp-hemolysin in *Escherichia coli* as a fusion protein with a maltose-binding protein (MBP) and purified it by affinity chromatography. The purified recombinant Asp-hemolysin showed an immunoreactivity with the anti-Asp-hemolysin antibody. In addition, MBP-Asp-hemolysin fusion protein exhibited binding activity to Ox-LDL as did native Asp-hemolysin. Furthermore, to investigate the effect of the Asp-hemolysin-related peptide (P-21), a synthetic peptide derived from a region of Asp-hemolysin that is rich in positive charges, on macrophage proliferation induced by OxLDL. P-21 inhibited OxLDL-induced macrophage proliferation in a dose-dependent manner. In addition, the binding analysis of P-21 to OxLDL indicated that P-21 binds to OxLDL. These results indicate that P-21 inhibits the OxLDL-induced macrophage proliferation through binding of P-21 to OxLDL. In conclusion, we have shown that OxLDL affects the intrinsic pathway of blood coagulation, and its mechanism is dependent on the binding of factor VIII to OxLDL. Furthermore, we indicate the possibility that Asp-hemolysin is a useful tool to investigate the pathophysiological significance of OxLDL. In particular, since the P-21, an Asp-hemolysin-related peptide, inhibits the OxLDL-induced macrophage proliferation through binding of P-21 to OxLDL, further study on the binding mechanism between Asp-hemolysin-related peptide and OxLDL may provide important information on the prevention and treatment of atherosclerosis.

**Key words**—Asp-hemolysin; Asp-hemolysin-related peptide; oxidized low-density lipoprotein; binding; factor VIII; expression

#### 1. はじめに

Asp-hemolysin は、ペンギン肺から分離された *Aspergillus fumigatus* Fresenius-村松株の培養ろ液並びに菌体から分離・精製されたタンパク質毒素で

あり、各種動物赤血球に対し *in vitro* において溶血活性を示すほか、マウス腹腔内血管透過性亢進作用、ヒト多核白血球やマウス並びにモルモット腹腔マクロファージ (Mφ) に対する細胞毒性など様々な生物活性を有している。<sup>1)</sup> 近年、Ebina ら<sup>2)</sup> は、Asp-hemolysin の cDNA クローニングと塩基配列解析から Asp-hemolysin が 131 アミノ酸残基からなる分子量 14275 のタンパク質であることを明らかにし、低密度リポタンパク質 (LDL) レセプターの

東北薬科大学環境衛生学教室 (〒981-8558 仙台市青葉区小松島 4-4-1)

e-mail: ta-kuma@tohoku-pharm.ac.jp

本総説は、平成 17 年度日本薬学会東北支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

リガンド結合ドメインと Asp-hemolysin の部分アミノ酸配列に類似性を認めている。実際に Fukuchi ら<sup>3,4)</sup>は、LDL あるいは LDL のアポタンパク質であるアポ B-100 タンパク質が Asp-hemolysin の溶血活性を阻害し、LDL が Asp-hemolysin に対して LDL レセプターと同等の親和性 ( $K_D$  値:  $8.9 \times 10^{-9} \text{M}$ ) で結合することを明らかにしている。さらに Kudo ら<sup>5,6)</sup>は、Asp-hemolysin が OxLDL に対しても OxLDL を認識することが知られているスカベンジャーレセプター (SR) と同程度の高親和性 ( $K_D$  値:  $1.2 \times 10^{-9} \text{M}$ ) で結合することを報告し、OxLDL 側の結合成分として OxLDL 粒子中の lysophosphatidylcholine (LysoPC) の関与を強く示唆している。

粥状動脈硬化症は、動脈の肥厚や脂質沈着を伴う血管機能の低下を主な特徴とする病変であり、狭心症や心筋梗塞などの急性冠症候群 (acute coronary syndrome) を引き起こす主因と考えられている。その発症や発症後の進展に関与する因子として、高脂血症に伴い増大する LDL、特にその酸化成績体である酸化 LDL (OxLDL) が知られている。OxLDL は、動脈硬化初期病変の血管内皮下において特徴的に観察される  $M\phi$  の泡沫細胞化を引き起こすほか、内皮細胞及び平滑筋細胞に対する直接的な細胞障害作用や、単球及びリンパ球に対する遊走活性化、内皮細胞からの各種サイトカインや増殖因子の産生、さらには  $M\phi$  及び平滑筋細胞に対する増殖活性などの様々な生物活性を有していることが報告されており、粥状動脈硬化症の発症や進展に関与していると考えられている。<sup>7-11)</sup>したがって OxLDL の有する生物活性のより詳細な解析や OxLDL の生物活性を制御し得る物質の探索は新たな動脈硬化症の診断薬や治療薬の開発に貢献できるものと考えられる。

本総説では、OxLDL 結合タンパク質である Asp-hemolysin の動脈硬化症診断薬や治療薬への応用の可能性と OxLDL の生物活性の更なる解析を行い、得られた成果について紹介する。

## 2. OxLDL の血液凝固系に及ぼす影響

血液凝固は、組織因子と VII 因子による X 因子の活性化に始まり速やかにトロンビンを形成する外因系凝固反応と XII 因子と異物面の接触によりカスケード的に凝固因子が活性化されトロンビンを形

成する内因系凝固反応が知られている。<sup>12)</sup> OxLDL は組織因子の発現誘導やトロンボモジュリンの発現抑制のほかプロテイン C 活性化の阻害など血液凝固促進的な作用を有することが報告されており、動脈硬化病変部位における血栓形成に促進的に働くものと考えられている。<sup>13)</sup> しかしながら OxLDL と各血液凝固因子との相互作用について不明な点が多いことから、OxLDL の血液凝固系に及ぼす影響について検討を行った。<sup>14)</sup> 始めに血液凝固反応に対する OxLDL の影響について外因系凝固反応の測定法であるプロトロンビン時間 (PT) と内因系凝固反応の測定法である活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) の測定を行った。その結果、OxLDL は外因系凝固反応ではなく内因系凝固反応を用量依存的かつ酸化時間依存的に阻害することが明らかとなった (Figs. 1, 2)。この OxLDL による内因系凝固阻害に関与している OxLDL 粒子中の成分を同定する目的から、修飾方法を変えて作製した各種修飾 LDL を用い APTT 試験を行った結果、アセチル化 LDL (AcLDL) は APTT 試験に影響を及ぼさなかったが、AcLDL を酸化処理した Ox-AcLDL や phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 及び 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (Pefabloc) であらかじめ LDL を処理後、酸化修飾した PMSF-pretreated OxLDL 並びに Pefabloc-pretreated OxLDL では OxLDL と同程度の凝固時間の延長が認められた (Fig. 3)。一般に、LDL の酸化進行は、活性酸素、金属イオンなどにより惹起された脂質フリーラジカルによる連鎖的な反応であると考えられる。<sup>15)</sup> 脂質成分に含まれる高度不飽和脂肪酸は過酸化反応を受け、脂質ペルオキシド、脂質フリーラジカルを生成し、自動酸化が開始する。脂質ペルオキシドは不安定な中間体で、マロンジアルデヒド、4-ヒドロキシノネナール、アルデヒド含有酸化 phosphatidylcholine (OxPC) などの種々のアルデヒド類を含む脂質過酸化体に分解される。生じたアルデヒド類はアポ B タンパク質を修飾し、アポ B タンパク質の架橋と開裂、粒子全体の陰性荷電上昇などの変化を生じる。一方、OxPC は、リポタンパク質粒子と結合して存在する platelet-activating-factor acetylhydrolase の基質として認識され、加水分解を受けて LysoPC を生成することが知られており、<sup>16)</sup> この platelet-activating-factor ace-

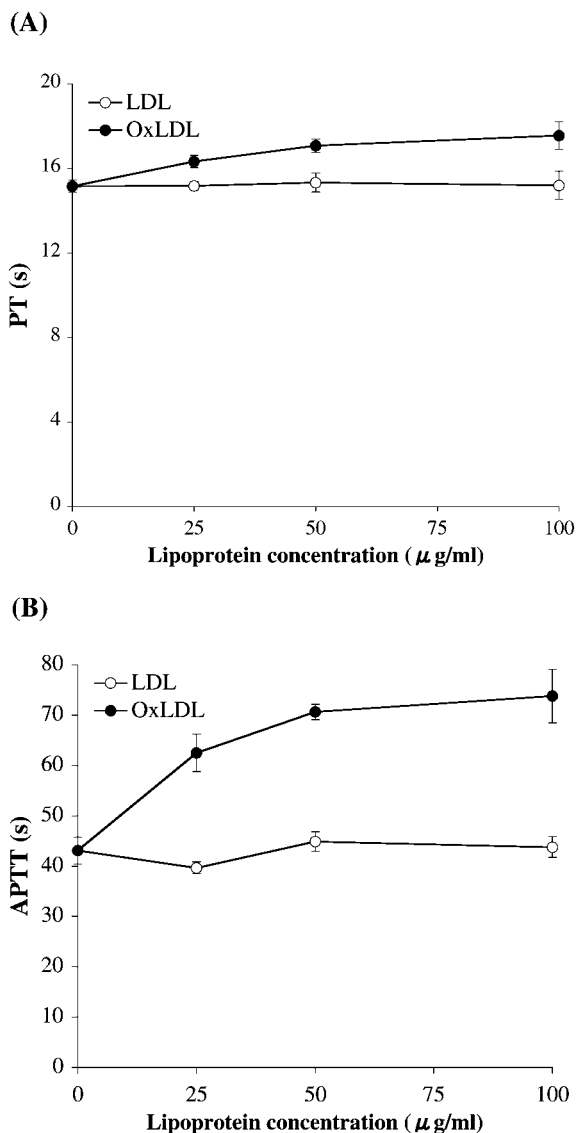


Fig. 1. Effects of Lipoprotein Concentrations on PT and APTT Assays

LDL was isolated by sequential ultracentrifugation from fresh human plasma collected in EDTA and was oxidized by incubation with 5 μM CuSO<sub>4</sub> in phosphate-buffered saline without EDTA at 37°C. OxLDL and LDL at increased concentration were incubated with plasma (50% volume concentration) for 5 min at 37°C prior to PT (A) and APTT (B) assays. Results represent the mean ± S.D. of three separate experiments.

tylhydrolase 活性を阻害する物質として PMSF<sup>17)</sup> や Pefabloc<sup>18)</sup> が知られている。また AcLDL は、LDL のアポタンパク質である B-100 のリジンの ε-アミノ基をアセチル化したりポタンパク質であり、脂質画分の変性は伴っていないが、酸化処理を行った Ox-AcLDL は AcLDL の脂質画分の過酸化を引き起こしていることから、OxLDL で認められた内因系凝固反応の阻害には LDL の酸化に伴い生成される OxPC などの脂質過酸化体が関与しているこ

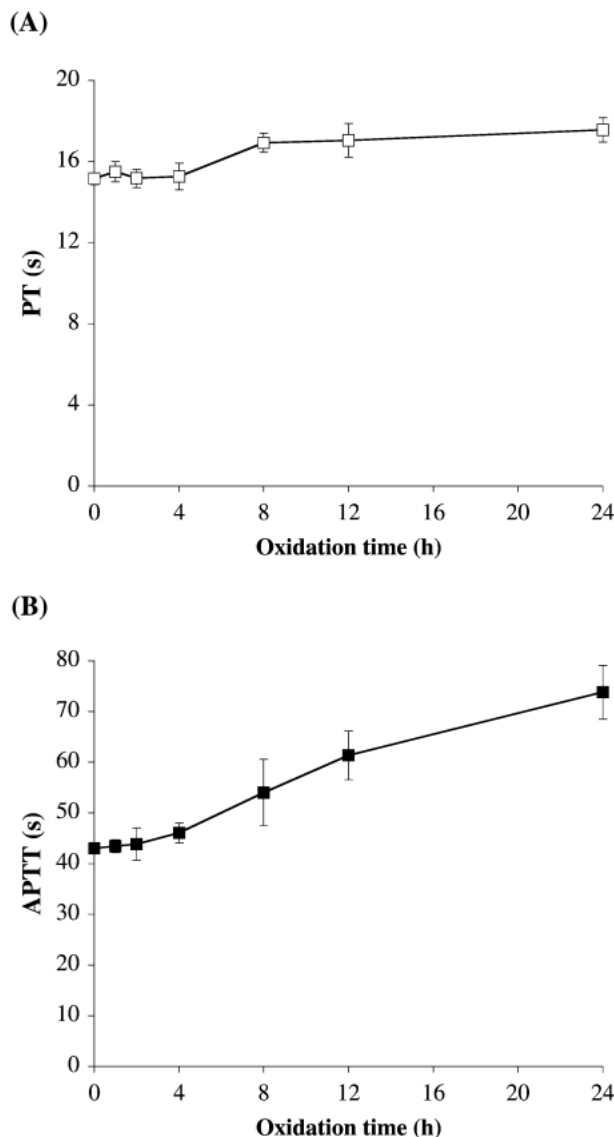


Fig. 2. Effects of LDL Oxidized at Different Times on PT and APTT Assays

LDL oxidized at different times was incubated with plasma (50% volume concentration) for 5 min at 37°C prior to PT (A) and APTT (B) assays. Results represent the mean ± S.D. of three separate experiments.

とが示唆された。

次に OxLDL で認められた血液凝固阻害機構を解明する目的から各凝固因子活性に及ぼす OxLDL の影響について検討を行った。<sup>14)</sup> その結果、OxLDL は外因系凝固反応に関与している VII 因子活性には影響を与えなかったが、内因系凝固反応に関与している VIII 因子、IX 因子並びに XI 因子活性を阻害し、特に VIII 因子活性は OxLDL 共存下でその活性が 90.7% 阻害された (Fig. 4)。この OxLDL による VIII 因子活性の阻害機構を解明する目的から、OxLDL と VIII 因子との相互作用について dis-

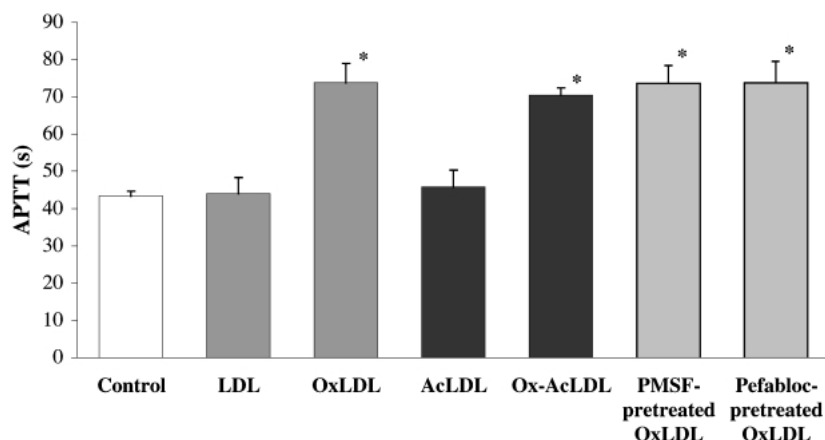


Fig. 3. Effects of Chemically Modified LDLs on APTT Assay

Chemically modified LDLs were incubated with plasma (50% volume concentration) for 5 min at 37°C prior to coagulation assay. Results represent the mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments. \* $p < 0.005$ , compared with control (Student's *t*-test).

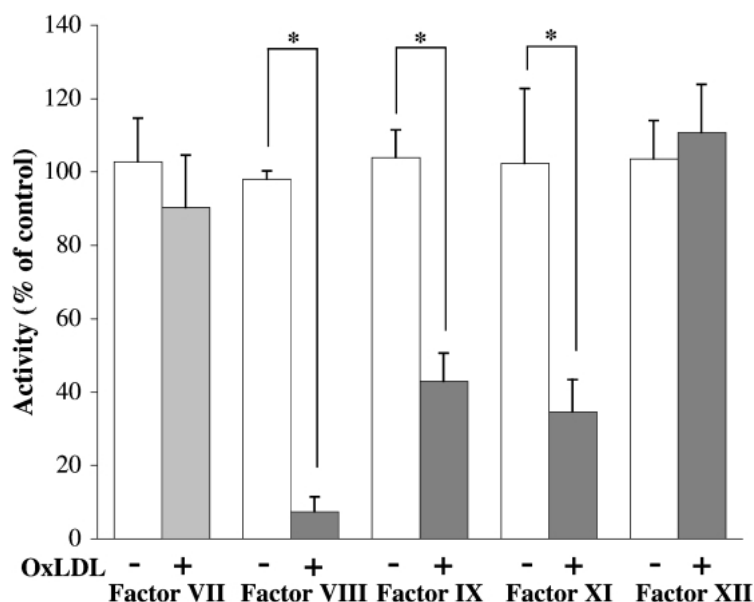


Fig. 4. Effect of OxLDL on Blood Coagulation Factor Activity

Plasma in the presence or absence of OxLDL was incubated with each factor-deficient plasma for 1 min at 37°C and the time required for clot formation of each sample was determined. Results represent the mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments. \* $p < 0.005$ , compared with control (Student's *t*-test).

sociation-enhanced lanthanide fluorometric immunoassay (DELFI A) を用い解析を行った. OxLDL と VIII 因子を混和後,  $\beta$ -リポプロテイン抗体を固定化した 96 well plate に添加し, VIII 因子抗体並びに  $\text{Eu}^{3+}$  標識二次抗体を用い OxLDL に結合した VIII 因子の測定を行った. その結果, VIII 因子は LDL の酸化時間に依存した結合性を示した (Fig. 5). さらに血漿と LDL 又は OxLDL を混和後 DELFIA 法を用い同様に検討した結果, OxLDL 添加群において VIII 因子が検出されたことから

(Fig. 6), OxLDL の新規生物活性として血液中に存在している OxLDL が VIII 因子と結合し, VIII 因子活性を抑制することで循環系における抗凝固性に関与している可能性が示唆された.

### 3. Asp-hemolysin の動脈硬化症診断薬及び治療薬への応用に関する基礎研究

現在用いられている動脈硬化症治療薬は, 血中におけるコレステロール量の低下を主作用とする医薬品が主流を占めているが, 多様な動脈硬化促進的作用を有している OxLDL を直接標的とした医薬品は

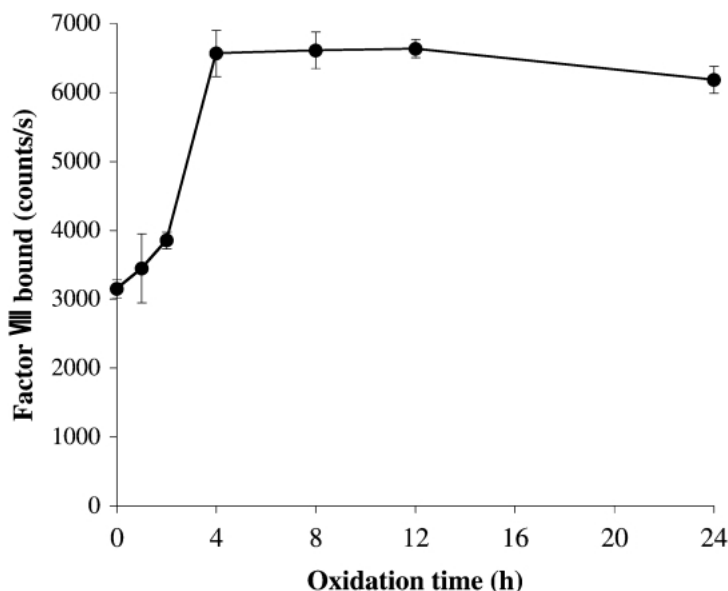


Fig. 5. Binding of Factor VIII to LDL Oxidized at Different Times by DELFIA

Microtiter plates were coated with goat anti-human  $\beta$ -lipoprotein IgG fraction. Then the reaction mixture of LDL oxidized at different times and recombinant human factor VIII was added to each well. DELFIA was carried out with rabbit anti-human factor VIII polyclonal antibody and  $\text{Eu}^{3+}$ -labelled anti-rabbit antibody. Results represent the mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments.

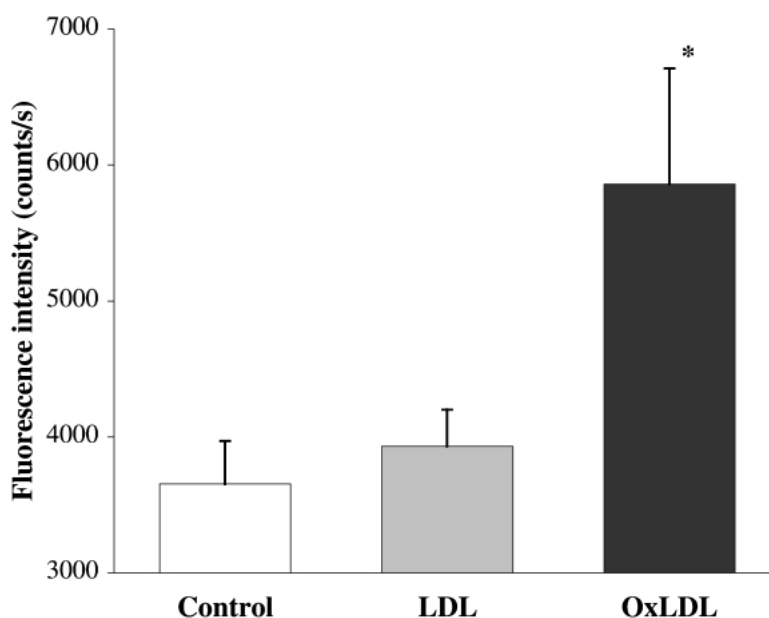


Fig. 6. Binding of Factor VIII Containing Plasma to OxLDL by DELFIA

Microtiter plates were coated with goat anti-human  $\beta$ -lipoprotein IgG fraction. Then the reaction mixture of plasma and LDL or OxLDL was added to each well. DELFIA was carried out with rabbit anti-human factor VIII polyclonal antibody and  $\text{Eu}^{3+}$ -labelled anti-rabbit antibody. Results represent the mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments. \* $p < 0.05$ , compared with control (Student's *t*-test).

知られていない。したがって OxLDL の生物活性を制御する物質の探索は、既知の動脈硬化症治療薬とは作用機序の全く異なる新規医薬品の開発につながる事が考えられる。既に Kudo ら<sup>5,6)</sup>は Asp-hemolysin が OxLDL、特に短時間酸化処理の Ox-

LDL に対して OxLDL を認識することが知られている SR と同程度の高親和性で特異的に結合することを明らかにするとともに、OxLDL 粒子中の Asp-hemolysin 結合因子として LDL の酸化に伴い生成される LysoPC が関与していることを明らかにし、

Asp-hemolysin が SR 類とは異なる機序で OxLDL を特異的に認識することを強く示唆している。そこで、OxLDL 結合タンパク質である Asp-hemolysin の新規動脈硬化症診断薬並びに治療薬への応用の可能性について分子生物学的手法を用い検討を行った。

**3-1. 組換え型 Asp-hemolysin の作製とその生物活性** Maltose-binding protein (MBP) との融合タンパク質発現系を用い、大腸菌での recombinant Asp-hemolysin の作製を試みた。<sup>19)</sup> Asp-hemolysin cDNA の翻訳領域を PCR 法により増幅し、pMAL-c2 ベクターとライゲーションさせ、Asp-hemolysin 発現ベクターを構築した。この Asp-hemolysin 発現ベクターを大腸菌に導入、形質転換させ、アンピシリン含有 LB 寒天培地で培養し、組み込んだ Asp-hemolysin cDNA 配列を確認したコロニーについて融合タンパク質の発現を行った。Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加し、さらに 3 時間培養後の菌体並びに菌体の超音波破壊後の遠心分離画分について SDS-PAGE を行った結果、Fig. 7(A), lane 2 に示すように融合タンパク質の強い発現を示した。また、発現したタンパク質は遠心分離上清画分に認められた (Fig. 7(A), lane 4)。この遠心分離上清画分について amylose resin column を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより発

現タンパク質の精製を行った結果、Fig. 7(B) に示すようにほぼ単一のタンパク質が回収され、分子量マーカーから精製したタンパク質の分子量は約 57 kDa であり、Asp-hemolysin と MBP との融合タンパク質の理論上の分子量と一致した。さらに、抗 Asp-hemolysin 抗体を用いた western blot 解析の結果、精製タンパク質は抗 Asp-hemolysin 抗体 (Fig. 7(C)) 並びに抗 MBP 抗体に対して反応陽性を示した。

次に精製したタンパク質の OxLDL に対する反応性を dot blot 法を用いて検討した。<sup>19)</sup> 各種濃度の精製タンパク質、Asp-hemolysin 及び MBP をスポットしたニトロセルロース膜に抗 Asp-hemolysin 抗体を反応させた結果、Fig. 8(A) に示すように、精製タンパク質並びに Asp-hemolysin において反応陽性を示すスポットが検出され、その検出限界は同程度であった。一方、MBP は抗 Asp-hemolysin 抗体に対して反応性を示さなかった。また、同様に各試料をスポットした膜に OxLDL を反応させ、抗 LDL 抗体で検出した結果、Fig. 8(B) に示すように精製タンパク質並びに Asp-hemolysin において抗 LDL 抗体反応陽性スポットが検出され、その検出限界は融合タンパク質の方が強く認められた。一方、MBP は抗 LDL 抗体に対して反応性を示さなかつ

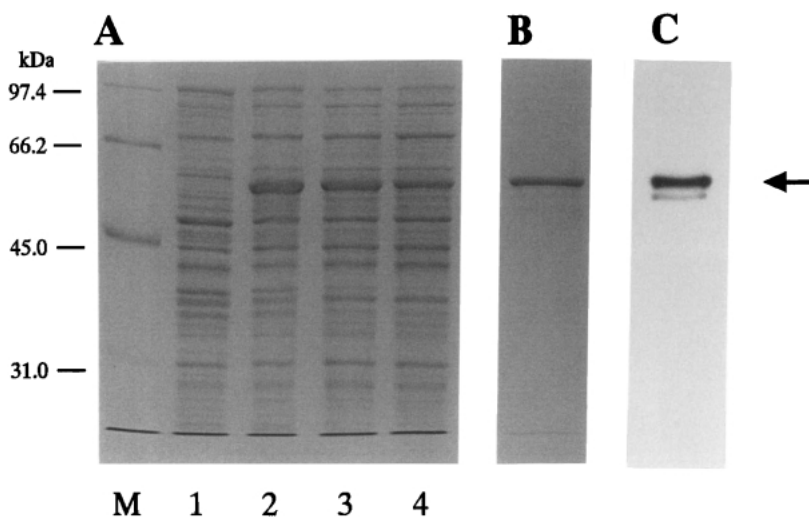


Fig. 7. Analysis of the Expressed Proteins by SDS-PAGE and Western Blot

A: BL21 harboring expression vector was cultured in the presence and absence of IPTG, and IPTG-induced cells were disrupted by sonication and separated by ultracentrifugation ( $105000 \times g$ , 60 min,  $4^{\circ}C$ ). Each sample was analyzed by 10% SDS-PAGE and stained with Coomassie brilliant blue. M: molecular size markers, lane 1: uninduced cells, lane 2: induced cells, lane 3: insoluble fraction, lane 4: soluble fraction. B: The expressed protein was purified by affinity chromatography using an amylose resin column. The purified protein was analyzed by 10% SDS-PAGE and stained with Coomassie brilliant blue. C: The affinity purified fusion protein was subjected to 10% SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane, and probed with rabbit anti-Asp-hemolysin antibody. The membrane was incubated with goat antibody to rabbit IgG Fc and PAP complex. Detection was done by enhanced chemiluminescence (ECL). The position of the fusion protein of recombinant Asp-hemolysin with MBP is indicated by an arrow.

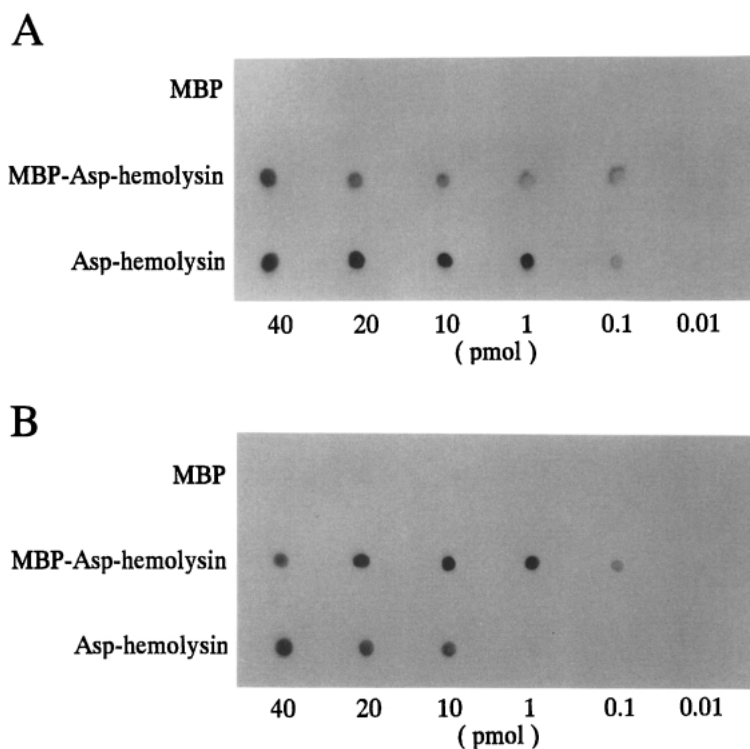


Fig. 8. Binding of OxLDL to MBP-Asp-hemolysin Fusion Protein Using a Dot Blot Assay

Several dilutions of MBP-Asp-hemolysin fusion protein, Asp-hemolysin and MBP were spotted onto a nitrocellulose membrane. A: The membrane was incubated with rabbit anti-Asp-hemolysin antibody and detected by ECL. B: The membrane was probed with OxLDL. Immunodetection of OxLDL using rabbit anti-LDL antibody and PAP complex was performed with ECL.

たことから、発現したタンパク質が MBP と Asp-hemolysin との融合タンパク質であることが強く示唆され、この recombinant Asp-hemolysin 発現系の確立によって、Asp-hemolysin の分子構造と OxLDL に対する結合性の解析を行う上で非常に有効である Asp-hemolysin の各種変異体の作製が可能となった。

**3-2. OxLDL 誘導 M $\phi$  増殖に及ぼす Asp-hemolysin 由来合成ペプチドの影響** 一般に動脈硬化病変部位ではプラークと呼ばれる内膜の肥厚性病巣が形成されることが知られているが、中でも大きな脂質コアが存在し、局所的に脆弱化した繊維性被膜を有している不安定プラークは、急性冠症候群の主要な原因とされている。また炎症細胞、特に M $\phi$  の浸潤は、この不安定プラークの大きな特徴となっており、M $\phi$  に富む不安定プラークの形成には活性化内皮細胞に誘導される単球の侵入、さらに病変部位での M $\phi$  の増殖と活性化が重要な役割を果たしていると考えられている。<sup>20)</sup> すなわち、プラークの M $\phi$  は matrix metalloproteinase (MMP) を発現し、血管の安定性を規定するコラーゲンなどの細胞外基

質の分解を通じて、プラークの破綻に寄与する可能性や M $\phi$  が組織因子 (tissue factor; TF) や plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) の発現を通じて、プラークの破綻部位での血栓形成を促進する可能性が考えられている。<sup>21,22)</sup> さらに不安定プラークの血管壁内には growth factor である macrophage colony stimulating factor (M-CSF) などのほかに M $\phi$  の増殖を誘導することが報告されている OxLDL の存在が知られている。<sup>23-26)</sup> 既に Kudo ら<sup>27)</sup> は Asp-hemolysin と OxLDL との結合解析から Asp-hemolysin 分子中のリジン残基が OxLDL との結合に関与していることを報告している。そこで Asp-hemolysin の分子構造中に存在しているリジン残基に富む陽性荷電の豊富な領域を含む 21 アミノ酸残基からなるペプチド (P-21) を合成し、OxLDL の生物活性の 1 つである M $\phi$  増殖誘導活性に及ぼす P-21 ペプチドの影響について検討した。<sup>28)</sup> CuSO<sub>4</sub> で 4 h 酸化処理を行った OxLDL を含む培地でマウス腹腔 M $\phi$  を培養し、その OxLDL による増殖誘導活性に対する P-21 ペプチドの効果を [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation assay 及び細胞のミトコン

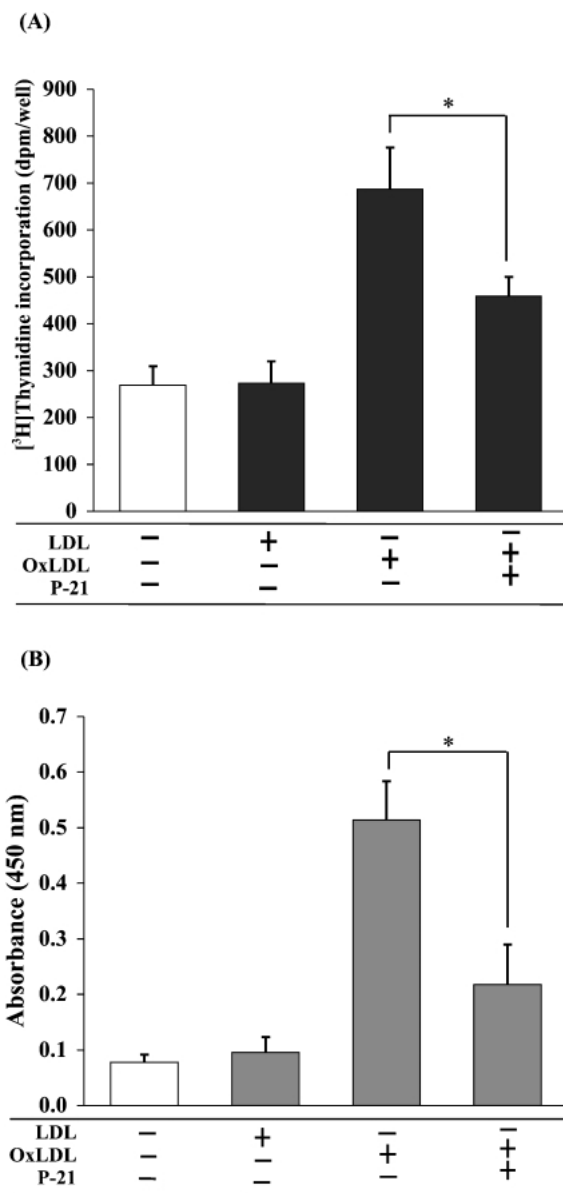


Fig. 9. Effect of P-21 on OxLDL-induced Macrophage Proliferation

Macrophages were incubated with either medium alone, LDL, OxLDL, or OxLDL along with P-21 (100  $\mu$ g/ml) for 96 h. Macrophage proliferation was assessed by the [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation assay (A) and WST-8 assay (B). Results represent the mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments. \* $p$  < 0.005, compared with OxLDL alone (Student's *t*-test).

ドリア内脱水素酵素活性を測定し、この酵素活性と生細胞数が比例していることを利用した WST-8 assay にて測定した結果、P-21 ペプチドは M $\phi$  に対する OxLDL の増殖誘導活性をそれぞれ 54.6% 並びに 67.8% 抑制した (Fig. 9)。また P-21 ペプチドは OxLDL の M $\phi$  増殖誘導活性を用量依存的に阻害することが明らかとなった (Fig. 10)。さらに DEL-FIA を用いた OxLDL と P-21 ペプチドとの相互作用

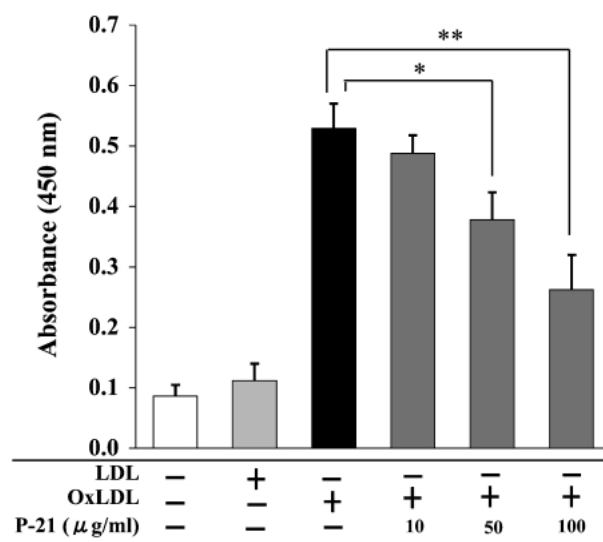


Fig. 10. Effect of P-21 Concentration on OxLDL-induced Macrophage Proliferation

Macrophages were incubated with either medium alone, LDL, OxLDL, or OxLDL along with the indicated concentrations of P-21 for 96 h. Macrophage proliferation was assessed by the WST-8 assay. Results represent the mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.005, compared with OxLDL alone (Student's *t*-test).

用の解析から、OxLDL に対する P-21 ペプチドの結合性が強く示唆され (Fig. 11)、P-21 ペプチドが OxLDL の動脈硬化促進的な作用を制御することができる可能性が示唆された。

#### 4. おわりに

本稿では OxLDL の新規生物活性として内因系血液凝固因子である VIII 因子に対する結合性を示した。また recombinant Asp-hemolysin 発現系の確立や Asp-hemolysin 関連合成ペプチドである P-21 ペプチドの OxLDL 生物活性制御の可能性について明らかにすることで、OxLDL 結合タンパク質である Asp-hemolysin の動脈硬化症診断薬並びに治療薬への可能性について示した。特に Asp-hemolysin の 1 次構造からデザインした P-21 ペプチドは、OxLDL の病態生理学的重要性を検討する上で非常に有用な物質であり、動脈硬化症の発症・進展を抑制する新規医薬品の開発など、動脈硬化症の研究領域において今後の更なる応用が期待される。

**謝辞** 本研究は東北薬科大学第一衛生化学教室 (現環境衛生学教室) で行われたものであり、ご指導いただきました横田勝司名誉教授、蝦名敬一助教授に厚く感謝の意を表します。また、本研究は大学



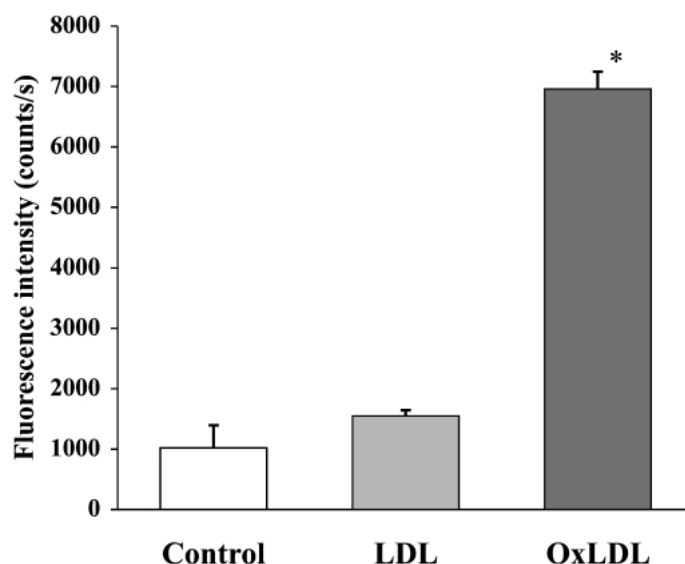


Fig. 11. Binding Analysis of P-21 to OxLDL by DELFIA

LDL or OxLDL were added to microtiter wells precoated with rabbit anti-human  $\beta$ -lipoprotein antibody, and then biotinylated P-21 was added each well. DELFIA was carried out with  $\text{Eu}^{3+}$ -labelled streptavidine. Results represent the mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments. \* $p < 0.05$ , compared with control (Student's *t*-test).

院生、学部学生のご協力のもと遂行することができたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。

#### REFERENCES

- Yokota K., Shimada H., Kamaguchi A., Sakaguchi O., *Microbiol. Immunol.*, **21**, 11–22 (1977).
- Ebina K., Sakagami H., Yokota K., Kondo H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1219**, 148–150 (1994).
- Fukuchi Y., Kumagai T., Ebina K., Yokota K., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 547–550 (1996).
- Fukuchi Y., Kudo Y., Kumagai T., Ebina K., Yokota K., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 1380–1381 (1996).
- Kudo Y., Fukuchi Y., Kumagai T., Ebina K., Yokota K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1568**, 183–188 (2001).
- Kudo Y., Ootani T., Kumagai T., Fukuchi Y., Ebina K., Yokota K., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 787–790 (2002).
- Witztum J. L., Steinberg D., *J. Clin. Invest.*, **88**, 1785–1792 (1991).
- Ross R., *N. Engl. J. Med.*, **340**, 115–126 (1999).
- Luis A. J., *Nature*, **407**, 233–241 (2000).
- Li A. C., Glass C. K., *Nat. Med.*, **8**, 1235–1242 (2002).
- Fan J., Watanabe T., *J. Atheroscler. Thromb.*, **10**, 63–71 (2003).
- Curtis C. G., Brown K. L., Credo R. B., Domanik R. A., Gray A., Steinberg P., Lorand L., *Biochemistry*, **13**, 3774–3780 (1974).
- Holvoet P., Collen D., *Curr. Opin. Lipidol.*, **8**, 320–328 (1997).
- Kumagai T., Hoshi Y., Tsutsumi H., Ebina K., Yokota K., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 952–956 (2005).
- Itabe H., *Prog. Lipid Res.*, **37**, 181–207 (1998).
- Steinbrecher U. P., Pritchard P. H., *J. Lipid Res.*, **30**, 305–315 (1989).
- Liapikos T. A., Antonopoulou S., Karabina S. P., Tsoukatos D. C., Demopoulos C. A., Tselepis A. D., *Biochim. Biophys. Acta*, **1212**, 353–360 (1994).
- Denton C., Tselepis A. D., Chapman M. J., Ninio E., *Biochim. Biophys. Acta*, **1299**, 353–357 (1996).
- Kumagai T., Kudo Y., Fukuchi Y., Ebina K., Yokota K., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 115–117 (2002).
- Moreno P. R., Falk E., Palacios I. F., Newell J. B., Fuster V., Fallon J. T., *Circulation*, **90**,

- 775–778 (1994).
- 21) Libby P., *Circulation*, **91**, 2844–2850 (1995).
- 22) Moreno P. R., Bernardi V. H., Lopez-Cuellar J., Murcia A. M., Palacios I. F., Gold H. K., Mehran R., Sharma S. K., Nemerson Y., Fuster V., Fallon J. T., *Circulation*, **94**, 3090–3097 (1996).
- 23) Matsumura T., Sakai M., Kobori S., Biwa T., Takemura T., Matsuda H., Hakamata H., Horiuchi S., Shichiri M., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **17**, 3013–3020 (1997).
- 24) Martens J. S., Reiner N. E., Herrera-Velit P., Steinbrecher U. P., *J. Biol. Chem.*, **273**, 4915–4920 (1998).
- 25) Hamilton J. A., Myers D., Jessup W., Cochrane F., Byrne R., Whitty G., Moss S., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **19**, 98–105 (1999).
- 26) Sakai M., Miyazaki A., Hakamata H., Sasaki T., Yui S., Yamazaki M., Shichiri M., Horiuchi S., *J. Biol. Chem.*, **269**, 31430–31435 (1994).
- 27) Kudo Y., Kumagai T., Fukuchi Y., Ebina K., Yokota K., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 549–550 (1999).
- 28) Kumagai T., Ogawa N., Tsutsumi H., Ebina K., Yokota K., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1381–1384 (2005).