

***Aspergillus fumigatus* 由来 Asp-hemolysin と血漿成分の相互作用に関する研究**

福地 祐司

仙台赤十字病院, 〒982-8501 仙台市太白区八木山本町 2-43-3

Interactions between Asp-hemolysin from *Aspergillus fumigatus* and Blood Plasma Components

Yuji FUKUCHI

Japanese Red Cross Sendai Hospital, 2-43-3 Yagiyamahon-cho,
Taihaku-ku, Sendai 982-8501, Japan

(Received March 12, 2001)

Asp-hemolysin is a cytolytic toxin that is produced by *Aspergillus fumigatus*. This toxin is lytic for erythrocytes of humans, rabbits and sheep. However, Asp-hemolysin is inactivated by the addition of serum or blood plasma. This study was undertaken to identify plasma components inhibitory to the hemolytic activity of Asp-hemolysin. α_2 -Macroglobulin (α_2 M) was isolated from the human blood plasma by affinity chromatography on a column containing Asp-hemolysin coupled to Sepharose. However, the hemolytic activity was only partially inhibited by α_2 M. Apolipoprotein B (apoB)-containing lipoproteins, such as low density lipoprotein (LDL), inhibit the activity of this hemolytic toxin. When 20 μ g apoB was added, the hemolytic activity was almost completely inhibited. Furthermore, similar inhibition was observed in the filtrates separated from the incubation mixture of Asp-hemolysin with LDL or apoB following ultrafiltration through a membrane with a molecular mass cutoff of 100000. These results suggest that the inhibition by LDL is due to apoB binding to Asp-hemolysin. The binding activity of LDL to Asp-hemolysin was measured. LDL binds to Asp-hemolysin with an affinity as high as the LDL receptor. The apparent K_d , determined by Scatchard plot analysis, was 8.9×10^{-9} M 125 I-LDL. Oxidized LDL (Ox-LDL), but not acetylated LDL, inhibited the hemolytic activity of this toxin. The inhibitory effects of Ox-LDL increased with the time of Cu^{2+} -induced LDL oxidation. Similar inhibition was observed in the filtrate separated from the incubation mixture of Asp-hemolysin with Ox-LDL (for 2 h of oxidation) following ultrafiltration through a membrane with a molecular mass cutoff of 100000. However, at longer LDL oxidation times, the inhibition by the filtrates was less than the control mixture without ultrafiltration. These results suggest that the inhibition of the hemolytic activity by Ox-LDL was due to the binding of Ox-LDL to Asp-hemolysin at short LDL oxidation times.

Key words—Asp-hemolysin; low density lipoprotein (LDL); apolipoprotein B (apoB); oxidized LDL (Ox-LDL); lysophosphatidylcholine (lysoPC)

1. はじめに

感染症における菌側因子として、細菌毒素の研究は今日までに数多くなされてきている。一方、ヒトの真菌症は、いわゆる日和見感染 (opportunistic infection) として扱われることが多く、真菌の産生するタンパク質毒素に関する研究は極めて少ない。実際、これまでに真菌由来のタンパク質で、細菌毒素のように分子レベルや生物活性レベルで報告されているものは *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) の産生する Asp fl,¹⁾ Asp fl/a,²⁾ restrictocin³⁾ など構造の類似した塩基性タンパク質群である、いわゆる mitogillin ファミリー⁴⁾ の cytotoxins と Asp-hemo-

lysin⁵⁾ があるのみである。しかしながら、*Aspergillus* species は他の真菌とは異なり、必ずしも全身抵抗減弱状態でなくとも、陳旧性の肺結核病巣、肺嚢胞・嚢腫、気管支拡張症、サルコイドーシス、さらには cystic fibrosis などの気管支肺疾患を基礎に多彩な気管支肺病変を生じることが知られ、⁶⁾ *Aspergillus* species の産生する病原性因子について研究する必要性が高まっている。

Asp-hemolysin は、ペンギン肺から分離した *A. fumigatus* Fresenius-村松株が産生する易熱性タンパク質毒素で、各種動物の赤血球に対し *in vitro* において溶血作用を有する。⁵⁾ 成熟 Asp-hemolysin は、

cDNA 塩基配列及び精製 Asp-hemolysin の N 末端アミノ酸配列から 126 アミノ酸よりなることが推定され,⁷⁾ mitogillin ファミリーとは構造の全く異なるタンパク質である。また Asp-hemolysin は, *A. fumigatus* の実験的感染⁸⁾に際し感染促進効果を示し, 感染病巣中にも産生される。さらに Asp-hemolysin は *in vivo* においては, マウス肝細胞・心筋細胞に壊死性変化を惹起し, 同時に腎臓及び脳の動脈壁中膜に局在⁹⁾する。一方, *in vitro* において Asp-hemolysin はヒト多核白血球, モルモット腹腔マクロファージ,⁹⁾ ヒト線維芽細胞¹⁰⁾に細胞毒性を示す。これら結果から, Asp-hemolysin は *Aspergillus* 感染における病変形成・進展に関与する菌側因子の 1 つと考えられている。構造活性相関では, 種々化学修飾実験から赤血球に対する結合にはアルギニン残基, リジン残基の ϵ -アミノ基¹¹⁾が, 溶血活性の発現にはシステイン残基の -SH 基¹²⁾が必須であることが明らかとなっている。一方, Ebina ら¹³⁾は, ヒト赤血球膜上の Asp-hemolysin レセプターの同定を試み, その候補の 1 つとして band 3 領域のタンパク質を明らかにしている。また坂口ら¹⁴⁾は, Asp-hemolysin の溶血がマウス血清の添加により阻害される現象を報告している。同様の現象は, *Streptococcus pyogenes* の産生する streptolysin O (SLO) などの細菌由来の毒素にも認められ, その溶血活性阻害成分としては, 血清中のコレステロールが知られている。¹⁵⁾しかし, Asp-hemolysin の溶血活性は, コレステロールにより全く阻害されず, 血清中の溶血阻害成分は未同定のみであった。

著者は, *A. fumigatus* 感染における Asp-hemolysin の役割をより明確にする目的から, Asp-hemolysin と血液成分との相互作用について, 血漿中の溶血阻害成分の同定を含め検討を行った。本稿では特に, これまで同定された Asp-hemolysin 親和性ヒト血漿成分を紹介するとともに, その溶血活性に及ぼす影響について述べる。

2. Affinity Chromatography による Asp-hemolysin 親和性血漿成分の分離と同定

Asp-hemolysin をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーにより, ヒト血漿中の Asp-hemolysin 親和性成分を分離し, その Asp-hemolysin 結合性並びに溶血活性に及ぼす影響について検討した。すなわち, ヒト血漿より Asp-hemolysin 固

定化 Sepharose 4B カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーで分離した成分について HPLC 及び免疫電気泳動解析を行い, Asp-hemolysin 親和性血漿成分の同定を試みた。その結果, HPLC では 500 kDa と 150 kDa の 2 つのピークが得られ, そのピークの面積比は約 1 : 9 で 150 kDa のものが主成分であった。一方, 同画分の免疫電気泳動では, IgG 領域に強い沈降線と, 弱い α_2 -マクログロブリン (α_2 M) の沈降線が認められた。これら結果は, 分離された Asp-hemolysin 親和性血漿成分のうち分子量 150 kDa の主成分は IgG であることを, また分子量 500 kDa のマイナー成分は α_2 -M であることを示す。同時に, これら成分は, ともに 1 M NaCl で affinity カラムより溶出されてくることから, Asp-hemolysin との結合は静電的結合に依存すると考えられた。

次いで, IgG のペプシン分解物である F(ab')₂, Fab', pFc' 各フラグメントに対する Asp-hemolysin の結合性を検討した。その結果, pFc' に比べ, F(ab')₂ と Fab' で有意に親和性が高かった (Fig. 1)。また, IgG 各サブクラス間の検討では, IgG₁-IgG₄ のすべてにおいて, Asp-hemolysin の結合性に有意差は認められなかった。

Asp-hemolysin の溶血に及ぼす IgG, IgG フラグメント及び α_2 M の影響を Fig. 2 に示した。IgG, 及び F(ab')₂, Fab', pFc' ではいずれを添加しても溶血阻害は認められなかったが, α_2 M では, 反応系に対し 1 mg の添加で対照に比べ約 15% の溶血阻

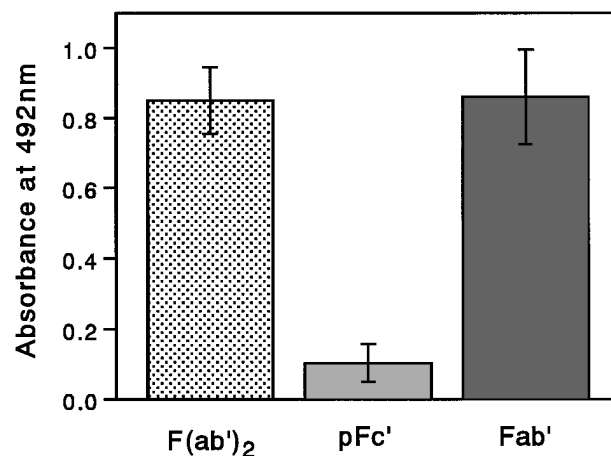


Fig. 1. ELISA of Pepsin-Treated IgG Fragments Using an Asp-Hemolysin-Binding Microtitration Plate

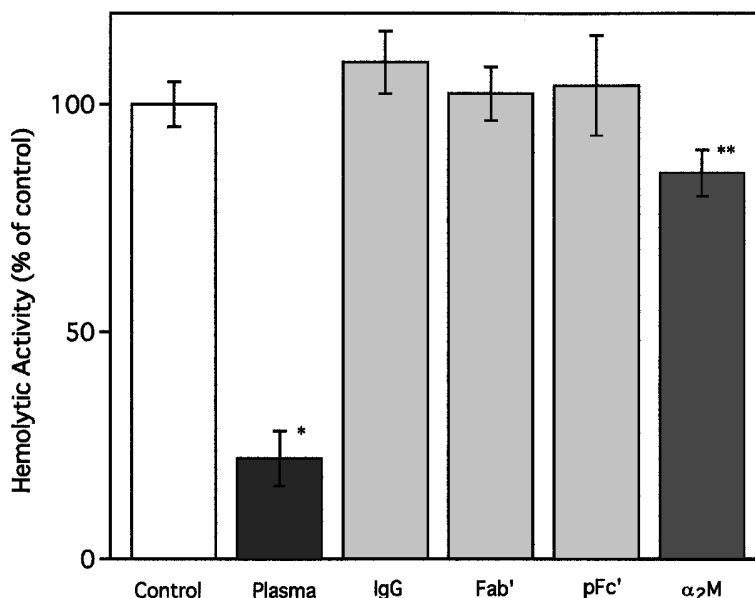


Fig. 2. Effect of Plasma and Its Components on the Hemolytic Activity of Asp-hemolysin
Results were mean \pm S.D. Significant differences from the control by *t*-test (* p < 0.001 and ** p , 0.05).

害が観察された。α₂Mは720 kDaのプロテアーゼインヒビターで、その酵素活性阻害機構が酵素の活性基以外の部分との結合による立体障害であることを考え合わせると、Asp-hemolysinのα₂Mによる溶血阻害機構にも、Asp-hemolysin溶血活性中心に対するα₂Mの結合による立体障害の可能性が考えられた。しかしながら、α₂Mの阻害が血漿そのものによる阻害と比べ著しく弱いことから、他にα₂M以外の強力な阻害性血漿成分の存在が示唆された。

3. 溶血活性に及ぼす血漿リポタンパク質の影響

1994年、Ebinaら⁷⁾により、Asp-hemolysinの一次構造が決定・解析された結果、ヒト低密度リポタンパク質 (low density lipoprotein, LDL) のレセプタータンパク質 (LDL receptor) のLDL結合ドメインとAsp-hemolysinの部分アミノ酸配列との間に比較的高い類似性があることが明らかとなり、Asp-hemolysinとLDLの結合の可能性が示唆された。そこで、LDLをはじめとする各種血漿リポタンパク質及びLDL構成タンパク質であるapolipoprotein B (apoB)のAsp-hemolysin溶血活性に及ぼす影響について検討した。

はじめに、対照実験としてのヒト血漿によるAsp-hemolysin溶血阻害活性をFig. 3に示す。Asp-hemolysinの溶血活性は添加した血漿の用量に依存し、ほぼ直線的に減少し、その50%溶血阻害量

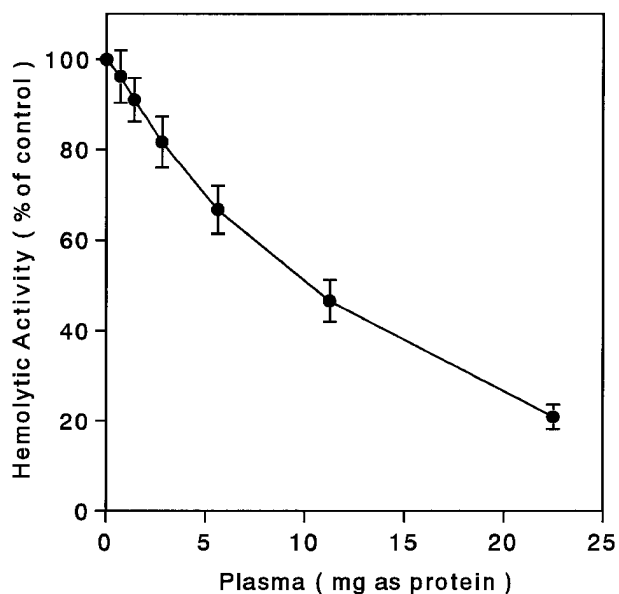


Fig. 3. Effect of Human Blood Plasma on the Hemolytic Activity of Asp-hemolysin from *A. fumigatus* on Human Erythrocytes

The values are means \pm S.D. of triplicate determinations. The 100% control value was 0.773 measured as the absorbance at 541 nm.

(ID₅₀)は10.3 mgであった。

次に、ヒト血漿から超遠心分離法により分離・調製したカイロミクロン、超低密度リポタンパク質 (VLDL)、LDL、高密度リポタンパク質 (HDL)の各画分について、溶血活性に及ぼす影響を検討した。その結果、LDLを添加した系では、溶血が有

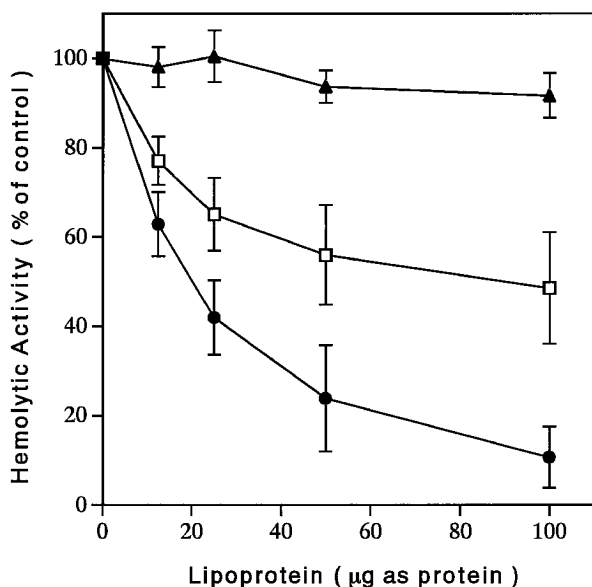


Fig. 4. Effects of VLDL, LDL and HDL on the Hemolytic Activity of Asp-hemolysin

The values are means \pm S.D. of three separate experiments. The 100% control value was 0.756 measured as the absorbance at 541 nm. \square : VLDL, \bullet : LDL, \blacktriangle : HDL.

意にかつ用量依存的に抑制された。また、VLDLを添加した系でも LDL に類似した阻害パターンが見られたが、その阻害程度は LDL に比較して弱かった (Fig. 4)。一方、HDL 添加、あるいはグラフには示さないが、カイロミクロンを添加した系での溶血阻害は全く観察されなかった。なお、LDL、VLDL の ID_{50} はそれぞれ、20.2 μ g, 89.7 μ g であった。

さらに、Helenius, Simons¹⁶⁾ の方法により調製した apoB の Asp-hemolysin 溶血活性に対する影響を検討した。Fig. 5 に示すように、Asp-hemolysin の溶血活性は apoB 10 μ g の添加で約 90% の阻害、20 μ g の添加では完全に阻害された。apoB の ID_{50} は、1.2 μ g であった。これらの結果より、Asp-hemolysin の溶血活性を阻害する血漿成分は、LDL をはじめとする apoB 含有リポタンパク質であることが明らかとなった。Table 1 の結果から、apoB は、LDL と比べて約 17 倍、血漿と比べると実に約 8600 倍強い溶血阻害活性を示した。LDL は、脂質 78%、タンパク質 22% から成り、そのタンパク質のほとんどが 540 kDa の apoB である。一方、VLDL は 92% の脂質と 8% のタンパク質から成り、LDL と比較してタンパク含有率が少なく、また、そのタンパク質成分中 37% は apoB であるが、50

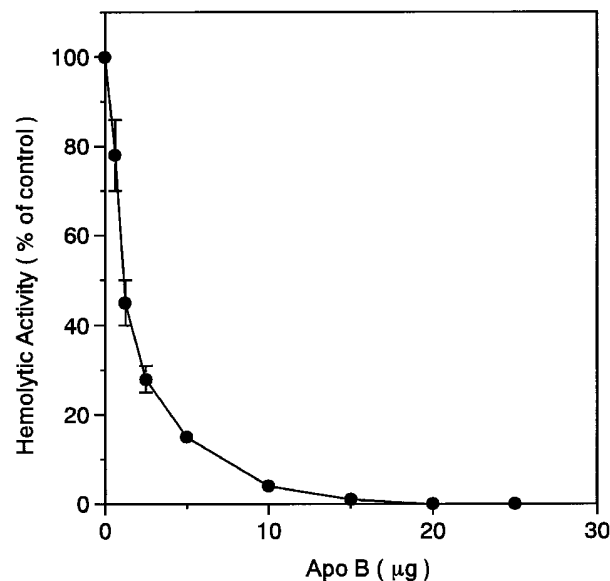


Fig. 5. Inhibition of the Hemolytic Activity of Asp-hemolysin by ApoB on Human Erythrocytes

The values are means \pm S.D. of triplicate determinations. The 100% control value was 0.782 measured as the absorbance at 541 nm.

Table 1. Inhibitory Capacity of Plasma, VLDL, LDL and ApoB on the Hemolytic Activity of Asp-hemolysin

	ID_{50} (μ protein)	Specificity (-fold)*
Plasma	10300	—
VLDL	89.7	114.8
LDL	20.2	509.9
ApoB	1.2	8583.3

* Relative to plasma=1.00.

% は apoC, 13% は apoE である。そのため VLDL 中の apoB 含量は LDL と比べて極めて低く、したがって VLDL のアポタンパク質当たりの溶血阻害効果も低いものと考えられた。

LDL による溶血阻害現象は、細菌毒素である SLO でも起こることが知られている。¹⁷⁾ SLO は、チオール化合物で活性化される毒素群である Sulfhydryl (SH)-activated bacterial toxin の代表的な毒素である¹⁵⁾が、これら毒素の特徴に、コレステロールとの結合によりその活性が強力かつ不可逆的に阻害される¹⁸⁾ことがあげられる。一方、Asp-hemolysin の溶血活性は、コレステロールによって全く阻害を受けず、apoB により阻害されたことから、Asp-hemolysin に対する LDL による溶血阻害機構は、SLO とは全く異なり、新しいメカニズムによることが示唆された。

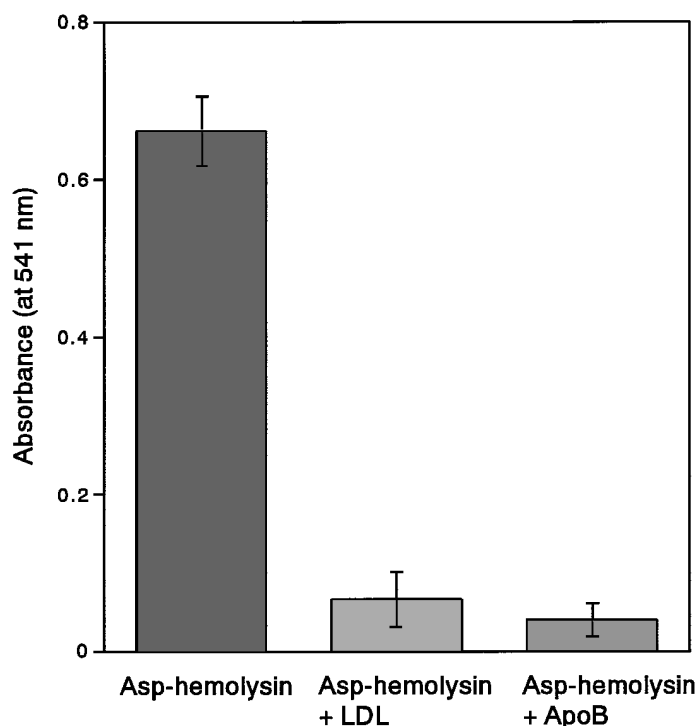


Fig. 6. Effect of Ultrafiltration on the Inhibition by LDL or ApoB of the Hemolytic Activity of Asp-hemolysin
Asp-hemolysin was incubated with 100 μg (as protein) LDL or 10 μg apoB at 21°C for 1 h. The values are means \pm S.D. of triplicate determinations.

さらに、LDL, apoB と Asp-hemolysin の反応混液を分画分子量 10 万のメンブランフィルターで限外ろ過した際のろ液からは、溶血活性がほとんど検出されなくなることより (Fig. 6), apoB が Asp-hemolysin に対して高親和性に結合することが考えられた。

LDL と apoB の Asp-hemolysin 溶血阻害活性を比較する目的から、Asp-hemolysin を LDL あるいは apoB とさまざまな時間でインキュベートした後、その溶血活性を測定した。その結果、Fig. 7 に示したように LDL において、1 時間のインキュベーションで溶血は 50% 阻害されたが、時間の延長とともに阻害はさらに増強し、以降 6 時間のインキュベーションまで溶血活性は減少し続けた。これとは対照的に、apoB では、15 分のインキュベーションで 50% 阻害を示し、その後、溶血阻害は増強せず、30 分以降はプラトーに達した (Fig. 7)。

LDL と apoB はともに Asp-hemolysin の溶血を阻害したが、apoB は短時間で阻害が発現したのに対し、LDL では長時間を要した。この反応性の差が先に示した LDL と apoB との ID_{50} 値の差に結びついたものと思われる。

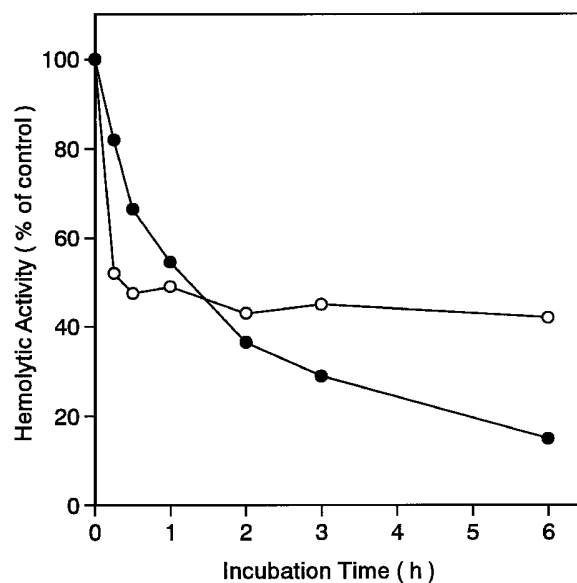


Fig. 7. Effect of LDL or ApoB on the Time-Course of the Hemolytic Activity of Asp-hemolysin

Asp-hemolysin was incubated with 20 μg (as protein) LDL or 1.5 μg apoB at 21°C for varying periods of time. The 100% control value was 0.746 measured as the absorbance at 541 nm. ●: LDL, ○: apoB.

Asp-hemolysin と同様に、分子内に LDL レセプターと類似のアミノ酸配列を持つ領域を含むタンパク質には、 α_2 -M-プロテアーゼ複合体に対するレセプター、VLDL レセプター、gp330 (megalin)¹⁹⁾ な

どいわゆる LDL 受容体関連タンパク質 (LRP, LDL receptor-related protein/ α_2 M receptor) が知られている。Asp-hemolysin の溶血活性が, LDL ばかりではなく, LRP のリガンドである VLDL や α_2 -M によっても阻害されることは, それらアミノ酸配列の共通性ととも興味深い知見といえよう。

Asp-hemolysin 固定化ビーズに対する 125 I-LDL の結合解析を行った。あらかじめ Asp-hemolysin (500 μ g/ml) と反応させたビーズを, さまざまな濃度の 125 I-LDL 溶液とインキュベートし, Asp-hemolysin 固定化ビーズに結合した 125 I-LDL を測定した。さらに別に行った対照実験から, 特異的結合を算出した (Fig. 8(A))。このデータを元に Schatchard 分析を行った結果, 見掛け上の解離定数 K_d は 4.45 μ g/ml, すなわち 8.9×10^{-9} M となり, LDL が Asp-hemolysin に対して高親和性を有することが明らかとなった (Fig. 8(B))。LDL の LDL レセプターに対する K_d 値についてはヒト線維芽細胞では 2.5×10^{-8} M (37°C), 4.5×10^{-9} M (4°C),²⁰⁾ また, ウシ副腎細胞では, 2.0×10^{-8} M (室温)²¹⁾ と報告されている。これらの値から比較すると, LDL の Asp-hemolysin に対する親和性は, LDL の LDL レセプターに対するそれと同等若しくはそれ以上であり, Asp-hemolysin は新規な LDL 結合タンパク質の 1 つであることが判明した。

実験的アスペルギルス感染においては, 脳及び腎臓の感染病巣で *A. fumigatus* の菌体表面に Asp-hemolysin が存在すること, さらに, Asp-hemolysin の多彩な生物学的活性が感染の成立・進展に促進的に働く可能性が示唆されている。⁹⁾ 一方, LDL レセプターあるいは, 変性 LDL の受容体として発見されたスカベンジャーレセプターが, ある種の細菌, ウイルスと結合することにより生体防御の一端を担っている可能性を示す報告が近年相次いでなされている。²²⁻²⁶⁾ 実際に, Asp-hemolysin が LDL と *in vivo* においても高い親和性を持ち結合するとすれば, LDL に結合した Asp-hemolysin は LDL レセプターを含めた生体側の防御機構に対して何らかの影響を及ぼす可能性も考えられる。

4. Asp-hemolysin の溶血活性に及ぼす酸化 LDL (Ox-LDL) の影響

次に, Ox-LDL を含む修飾 LDL の Asp-hemolysin 溶血活性に対する影響について検討した。

Fig. 9 はアセチル化 LDL (Ac-LDL) 及び Ox-LDL の Asp-hemolysin 溶血活性に及ぼす影響を示す。未変性の LDL (nLDL) に比べ, 24 h 酸化の Ox-LDL はより強く Asp-hemolysin の溶血活性を阻害した。Asp-hemolysin 溶血活性は 5 μ g の Ox-LDL 添加でほぼ完全に阻害された。一方, Ac-LDL では, 溶血阻害が認められなかった。

Fig. 10 には LDL の酸化時間と溶血阻害の関係について示した。脂質過酸化の指標である thiobarbi-

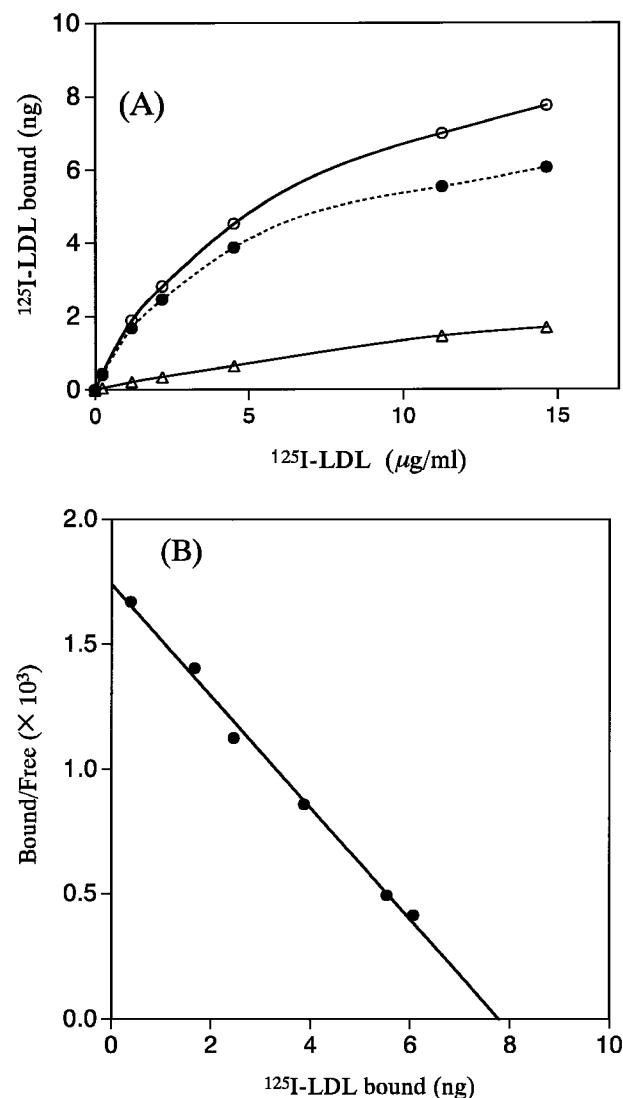


Fig. 8. Concentration-Binding Curve and Schatchard Plot for the Binding of 125 I-LDL to Immobilized Asp-hemolysin

Each value in the figures represents the data from duplicate assays. (A) Eupergit CB-6200 bead, after incubation in 1 ml Asp-hemolysin (500 μ g/ml) for 20 h at 4°C, was incubated in 1 ml of ligand solution of 125 I-LDL and immobilized Asp-hemolysin. The specific binding was determined by subtracting the nonspecific binding obtained in the presence of a 300-fold excess of unlabeled LDL from the total binding obtained in the absence of unlabeled LDL.

○: total binding, ●: specific binding, △: nonspecific binding. (B) Schatchard plot from the data shown in Fig. 8(A).

turic acid reactive substance (TBARS) 値は酸化 2 h 後から 50 nmol 以上と高い値を示し、4 h から 12 h の間で最高値を示した。各酸化状態の Ox-LDL の Asp-hemolysin の溶血に対する影響を検討した結果、短時間酸化に比べ、長時間酸化の Ox-LDL で

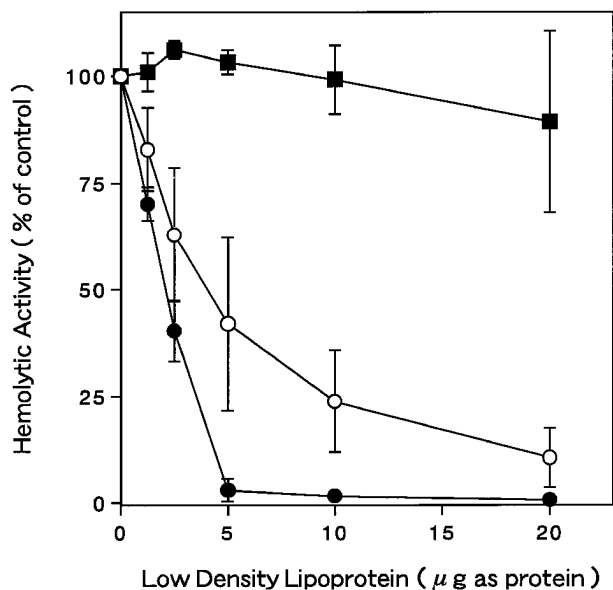


Fig. 9. Effect of Modified Lipoproteins on the Hemolytic Activity of Asp-hemolysin
The values are mean \pm S.D. of three separate experiments. ○: LDL, ●: Ox-LDL, ■: Ac-LDL.

より強い阻害が観察された。

さらに、Ox-LDL による溶血阻害が、Ox-LDL と Asp-hemolysin の結合によるものかどうかを検討する目的から、Asp-hemolysin と Ox-LDL の混液を分画分子量 10 万のメンブレンフィルターで限外ろ過し、そのろ液について溶血活性の測定を行った。Ox-LDL の場合も、2 h 酸化までは、nLDL と同様に、フィルター通過の有無に関係なくほぼ同程度の阻害率を示したが、4 h 酸化以降の Ox-LDL では、時間の経過とともにフィルター通過後のろ液での溶血阻害が弱くなり、24 h 酸化では、未ろ過のコントロールに比べ約 10% の阻害しか観察されなかった (Fig. 11)。以上の結果より、短時間酸化の Ox-LDL では、nLDL よりも高い親和性で Asp-hemolysin に結合している可能性が強く示唆されたが、長時間酸化 Ox-LDL による阻害は単純な結合の結果ではないと考えられた。LDL は酸化の進行に伴って、陰性荷電の増加の他に apoB タンパク質のフラグメンテーションが起こることが知られている。²⁷⁾ この apoB タンパク質の変化が、長時間酸化 Ox-LDL の Asp-hemolysin 結合性低下に関与している可能性が考えられる。

次に、長時間酸化 Ox-LDL での溶血阻害メカニズムについてさらに検討を加えた。LDL は酸化の

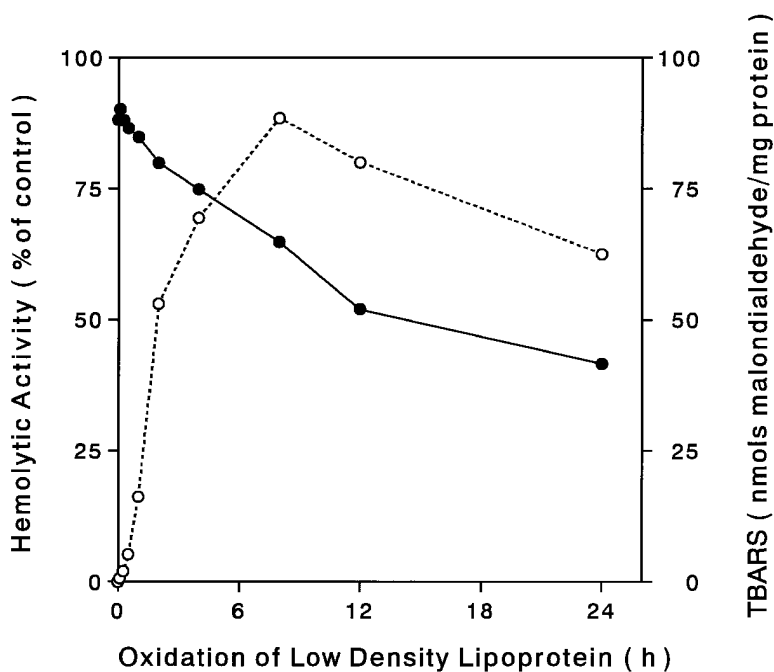


Fig. 10. Dependence of Inhibition by Ox-LDL on the Time of Cu^{2+} -Induced Oxidation
●: hemolytic activity, ○: thiobarbituric acid reactive substances (TBARS).

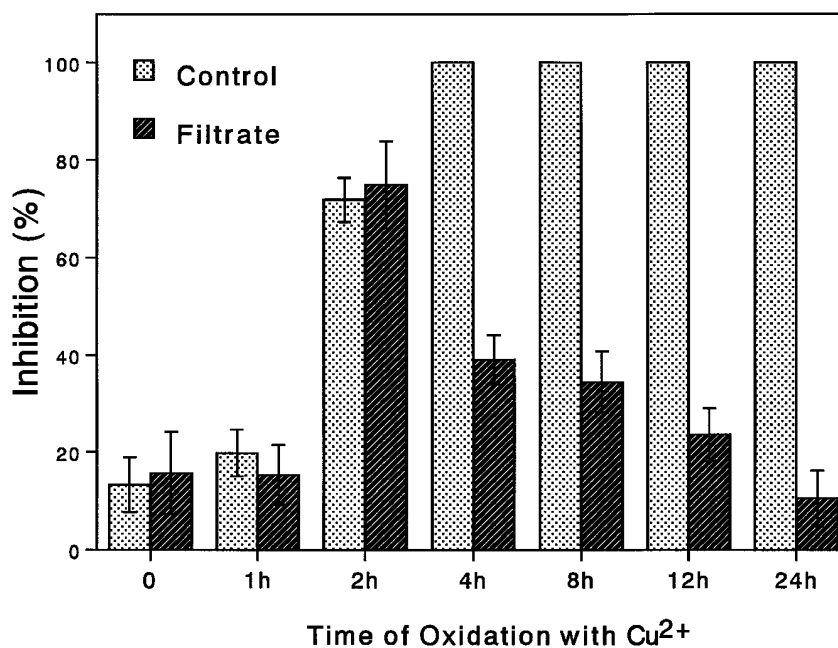


Fig. 11. Effect of Ultrafiltration on the Inhibition by Oxidized Ox-LDL
The values are mean \pm S.D. of three separate experiments.

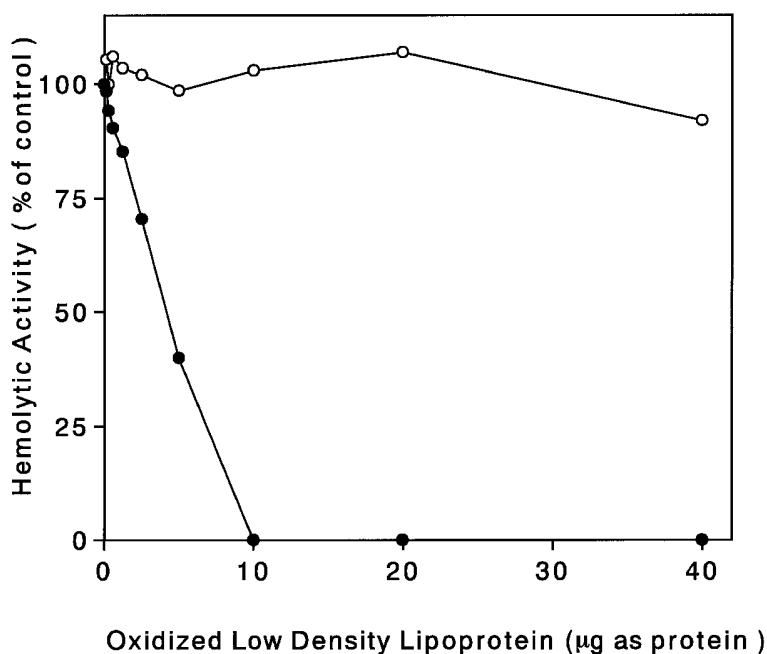


Fig. 12. Effect of Bovine Serum Albumin-Treated Ox-LDL on the Hemolytic Activity of Asp-hemolysin
●: Ox-LDL, ○: bovine serum albumin-treated Ox-LDL.

過程で多価不飽和脂肪酸に過酸化が起こり、次いでホスファチジルコリン (PC) からリゾホスファチジルコリン (LysoPC) への転換が起こる²⁸⁾ことが知られている。そこで、24 h 酸化 Ox-LDL を fatty acid-free BSA とインキュベートし、LysoPC を取り除いた Ox-LDL を調製し、その溶血に及ぼす影

響について検討した。その結果、BSA 処理 LDL には、溶血阻害作用が全く認められなかった (Fig. 12)。この結果は、Ox-LDL 中の LysoPC が、溶血阻害に深く関与していることを示す。LysoPC は、一般に溶血性物質として知られており、実際、溶血反応系に LysoPC 5 μ g を添加することで完全な溶

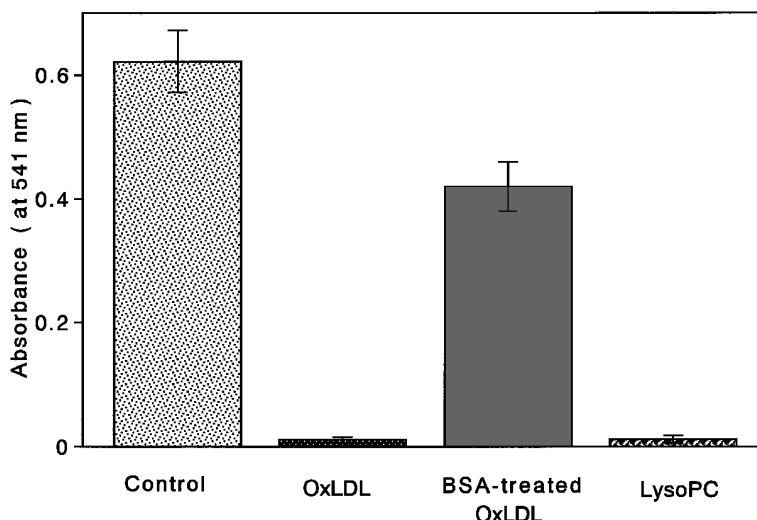


Fig. 13. Effect of Preincubation of Erythrocytes with Ox-LDL on the Hemolytic Activity of Asp-hemolysin

The erythrocyte suspension (200 μ l) was incubated with 10 μ g (50 μ l) Ox-LDL, BSA-treated Ox-LDL or 2 μ g lysophosphatidylcholine (lysoPC) suspension in PBS for 1 h at 21°C. As a control, the same volume of PBS instead of each sample was used. Each incubation mixture was washed 3 times with PBS, and then Asp-hemolysin (10 μ g) was added. The values are means \pm S.D. of three separate experiments.

血が観察された。しかし、LysoPCを含む状態であっても Ox-LDL では溶血は起こらず、‘crenation’と呼ばれる赤血球の構造変化が起こることもまた報告されている。²⁹⁾そこで、Ox-LDL, BSA 処理 Ox-LDL あるいは、溶血が起こらない程度の少量の LysoPC と前処理した赤血球を用いて、それぞれ Asp-hemolysin の溶血活性を測定した。その結果、Ox-LDL では溶血は阻害されるが、BSA 処理によってその阻害作用は著しく減弱した。また、LysoPC の前処理赤血球では、Asp-hemolysin の溶血が強く阻害された (Fig. 13)。以上の結果、長時間酸化 Ox-LDL による溶血阻害メカニズムは、LDL 中に生成された LysoPC によるものである事が明らかとなった。

5. まとめ

Asp-hemolysin の溶血活性を阻害する血漿中の主成分は LDL であり、また、そのメカニズムは、Asp-hemolysin と LDL の構成成分のひとつである apoB タンパク質との結合に起因することが明らかとなった。

Ox-LDL の溶血阻害作用は、nLDL よりも強く、そのメカニズムは、短時間酸化では Asp-hemolysin と Ox-LDL との結合、長時間酸化では酸化の過程で Ox-LDL 中に生成される LysoPC によって惹起された赤血球の構造変化に起因することが明らかとなった。

現在、Asp-hemolysin 以外に LDL に高親和性を有する水溶性物質の報告はなく、また、動脈硬化の発症・進展に重要な役割を果たすと考えられている Ox-LDL と Asp-hemolysin の結合も明らかとなり、³⁰⁾ 今後の研究の進展により Asp-hemolysin が、感染症の分野のみならず、動脈硬化研究の領域においても貢献する可能性が期待される。

謝辞 本研究の実施に当たり、終始御指導、御鞭撻を賜りました東北薬科大学横田勝司教授に衷心より感謝申し上げます。本研究は、東北薬科大学第一衛生化学教室のテーマとして行われたものであり、有益な御助言を賜りました蝦名敬一助教授に深謝するとともに、御協力頂いた熊谷 健助手をはじめ共同研究者の方々感謝致します。

REFERENCES

- 1) Arruda L. K., Mann B. J., Chapman M. D., *J. Immunol.*, **149**, 3354-3359 (1992).
- 2) Moser M., Cramer R., Menz G., Schneider T., Dudler T., Virchow C., Gmachl M., Blaser K., Suter M., *J. Immunol.*, **149**, 454-460 (1992).
- 3) Lopez-Otin C., Barber D., Fernandez-Luna J. L., Soriano F., Mendez E., *Eur. J. Biochem.*, **143**, 621-634 (1984).
- 4) Fernandez-Luna J. L., Lopez-Otin C.,

- Soriano F., Mendez E., *Biochemistry*, **24**, 861–867 (1985).
- 5) Yokota K., Shimada H., Kamaguchi A., Sakaguchi O., *Microbiol. Immunol.*, **21**, 11–22 (1977).
- 6) Amitani R., Tanaka E., Murayama T., Kuze F., *Kokyu*, **14**, 923–931 (1995).
- 7) Ebina K., Sakagami H., Yokota K., Kondo H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1219**, 148–150 (1994).
- 8) Ebina K., Yokota K., Sakaguchi O., *Jpn. J. Med. Mycol.*, **23**, 246–252 (1982).
- 9) Ebina K., Yokota K., Sakaguchi O., *Jpn. J. Med. Mycol.*, **24**, 245–252 (1983).
- 10) Thelestam M., Möllby R., *Biochim. Biophys. Acta*, **557**, 156–169 (1979).
- 11) Yokota K., Ichinowatari S., Ebina K., Wakabayashi N., *Jpn. J. Med. Mycol.*, **26**, 70–73 (1985).
- 12) Yokota K., Ichinowatari S., Ebina K., *Jpn. J. Med. Mycol.*, **25**, 332–339 (1984).
- 13) Ebina K., Ichinowatari S., Yokota K., *Microbiol. Immunol.*, **29**, 91–101 (1985).
- 14) Sakaguchi O., Yokota K., Kamaguchi A., *Jpn. J. Bacteriol.*, **32**, 821–828 (1977).
- 15) Bernheimer A. W., *Biochim. Biophys. Acta*, **344**, 27–50 (1974).
- 16) Helenius A., Simons K., *Biochemistry*, **10**, 2542–2547 (1971).
- 17) Badin J., Barillec A., *Ann. Biol. Clin.*, **26**, 213–229 (1968).
- 18) Hewitt L. F., Todd E. W., *J. Pathol. Bacteriol.*, **49**, 45–51 (1939).
- 19) Kerjaschki D., Farquhar M. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 5557–5581 (1982).
- 20) Brown M. S., Goldstein J. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 788–792 (1974).
- 21) Schneider W. J., Beisiegel U., Goldstein J. L., Brown M. S., *J. Biol. Chem.*, **257**, 2664–2673 (1982).
- 22) Hofer F., Gruenberger M., Kowalski H., Machat H., Huettinger M., Kuechler E., Blaas D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 1839–1842 (1994).
- 23) Hodits R. A., Nimpf J., Pfistermueller D. M., Heisberger T., Schneider W. J., Vaughan T. J., Johnson K. S., Haumer M., Kuechler E., Winter G., Blaas D., *J. Biol. Chem.*, **270**, 24078–24085 (1995).
- 24) Suzuki H., Kurihara Y., Takeya M., Kamada N., Jishage K., Ueda O., Sakaguchi H., Higashi T., Suzuki T., Takashima Y., Kawabe Y., Cynshi O., Wada Y., Honda M., Kurihara H., Aburatani H., Doi T., Matsumoto A., Azuma S., Noda T., Toyoda Y., Itakura H., Yazaki Y., Horiuchi S., Takahashi K., Kruijt J. K., van Berkel T. J. C., Steinbrecher U. P., Ishibashi S., Maeda N., Gordon S., Kodama T., *Nature*, **386**, 292–296 (1997).
- 25) Marlovits T. C., Abrahamsberg C., Blaas D., *J. Virol.*, **72**, 10246–10250 (1998).
- 26) Marlovits T. C., Abrahamsberg C., Blaas D., *J. Biol. Chem.*, **273**, 33835–33840 (1998).
- 27) Hoff H. F., Whitaker T. E., O’Neil J., *J. Biol. Chem.*, **267**, 602–609 (1992).
- 28) Steinbrecher U. P., Parthasarathy S., Leake D. S., Witztum J. L., Steinberg D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 3883–3887 (1984).
- 29) Sambrano G. R., Parthasarathy A., Steinberg D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 3265–3269 (1994).
- 30) Kudo Y., Kumagai T., Fukuchi Y., Ebina K., Yokota K., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 549–550 (1999).