

酸化低密度リポタンパク質に対する Asp-hemolysin の結合特性に関する研究

工藤 陽一

Binding Characterizations of Asp-hemolysin to Oxidized Low-Density Lipoprotein

Yoichi KUDO

Sendai Hospital of East Japan Railway Company, 1-1-5 Itsutsubashi, Aoba-ku, Sendai 980-8508, Japan

(Received April 21, 2005)

Oxidized low-density lipoprotein (Ox-LDL) is known to be involved in the generation and progression of atherosclerosis. Ox-LDL has a number of potentially atherogenic effects on vascular cells, including uncontrolled uptake by scavenger receptors. Asp-hemolysin, a hemolytic toxin from *Aspergillus fumigatus*, is a binding protein for Ox-LDL. This study was undertaken to clarify the binding specificity of Asp-hemolysin to Ox-LDL. We examined the binding specificity of Asp-hemolysin to Ox-LDL using several modified lipoproteins and scavenger-receptor ligands. Asp-hemolysin bound to Ox-LDL with shorter LDL oxidation times. However, Asp-hemolysin did not bind to acetylated LDL. The native high-density lipoprotein (n-HDL) and modified HDL (e.g., acetylated HDL, oxidized HDL) also had no Asp-hemolysin binding. Inhibitors of scavenger-receptor binding, including maleylated bovine serum albumin, polyinosinic acid, dextran sulfate, and fucoidin, had no effect on the binding of Ox-LDL to Asp-hemolysin. Surface plasmon-resonance studies revealed that Ox-LDL binds with high affinity ($K_D=0.63 \mu\text{g/ml}$) to Asp-hemolysin. Furthermore, we have shown that Ox-LDL strongly inhibits the hemolytic activity of Asp-hemolysin and that the removal of lysophosphatidylcholine (lysoPC) from Ox-LDL abolished the inhibition. We also investigated the interaction between Asp-hemolysin and lysoPC as a typical lipid moiety of Ox-LDL. The binding of Asp-hemolysin to LDL oxidized for different times depended on the lysoPC content in each Ox-LDL. In addition, the inhibition of lysoPC production in Ox-LDL by phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) pretreatment of LDL resulted in a marked decrease in Asp-hemolysin binding to PMSF-pretreated Ox-LDL. The binding analysis of Asp-hemolysin to lysoPC revealed that Asp-hemolysin binds directly to lysoPC. We conclude that Asp-hemolysin is a specific binding protein with high affinity for Ox-LDL and that its binding specificity is distinct from any receptor for Ox-LDL.

Key words—Asp-hemolysin; oxidized low-density lipoprotein (Ox-LDL); lysophosphatidylcholine (lysoPC); binding specificity

はじめに

Asp-hemolysin は、*Aspergillus fumigatus* Fresenius-村松株から分離・精製されたタンパク質毒素である。¹⁾ この毒素は各種動物赤血球に対し *in vitro* において溶血活性を有するほか、マウス腹腔内血管透過性亢進作用、ヒト多核白血球、モルモット腹腔マクロファージに対する細胞毒性など様々な生物活性を有する。また、Asp-hemolysin は *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) の実験的感染に際し感染促進効果を示し、感染病巣中にも検出される。²⁾ さ

らに Asp-hemolysin は、呼吸器疾患患者由来 *A. fumigatus* 臨床分離株からタンパク質及び遺伝子レベルにおいて検出されている。³⁾ これらの知見から、Asp-hemolysin は *A. fumigatus* 感染症における病変形成・進展に関与する可能性が示唆されている。

Ebina ら⁴⁾ は、Asp-hemolysin の cDNA クローニングとその塩基配列解析を行い、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た (Fig. 1)。Asp-hemolysin の推定アミノ酸配列と National Biomedical Research Foundation のタンパク質データベースに登録されているタンパク質との同一性、類似性について FASTA プログラムを用いた検索を行ったところ、Asp-hemolysin の 1 次構造と有意な相同性を示す既知のタンパク質は認められなかったが、30-

JR 仙台病院薬剤部 (〒980-8508 仙台市青葉区五橋 1-1-5)

e-mail: senyaku@jr-hospital.aoba.sendai.jp

本総説は、平成 16 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。

	TCTGTTTCATCTCCCTC	17
ACCTGCTTAATTGCAGTTCTATCTCTTAGCAACACCGCTCCAAAATGGCATCGGTCCAA		77
	M A S V Q	-1
GCTTACGCACAGTGGGTTACGGTTCATCTCATCAATAGCATGTCTCCGAGACCTTGAGT		137
A Y A Q W V T V H L I N S M S S E T L S		20
ATCAAGAATGCTAGTCTCTCCTGGGGCAAGTGGTACAAGGACGGTGACAAGGACGCCGAA		197
I K N A S L S W G K W Y K D G D K D A E		40
ATCACAAGTGAAGATGTCCAGCAAAAGACGGCACCCCGGGTCCCGTGAACGTCAAC		257
I T S E D V Q Q K T A P P G G S V N V N		60
TCTTGCGGTCGCAGCGACGCTTCGAGTGCACGCGGGAGGTTTGTATTGTATGACGGC		317
S C G R S D A S S G T T G G F D L Y D G		80
AAATCCAAGATTGGAAGAGTCCACTGGGACTGTCCATGGGGTCTAAAACCAACGATTC		377
N T K I G R V H W D C P W G S K T N D F		100
GATGTGGAGACAGAAACAAAATTACTGGGTCGAAATTGGAACGTGGAACAAGTATCGT		437
D V G E R N K N Y W V E I G T W N K Y G		120
GGTGCCATTGGCAACTGTTGACGTTGAAGTTGGAAGGAAGCGCTGAAGCAGTTGACGCA		497
G A I G N C *		126
GGACAAGGAGGATCATATTTTCTTTATTCCTCCATTCCTGTGCATAACTGGTTTATGTTAC		557
TTATTGTCGTTCTTTTTCACCTCCACATAAGCCAGATTAGAAATCGCCCGTCTATTCT		617
GTTTCATTGGGATCCTTTGATGCGAACAATATCACCTTCTTTAGATAAATTACCAGATG		677
GCTGCTGTGATATACTAATATATGCCTGAAAAGGTCTCGGGGATAAAAAAAAAA		730

Fig. 1. Nucleotide and Deduced Amino Acid Sequences of the cDNA Encoding Asp-hemolysin

Residue 1 is alanine that is believed to constitute the N-terminus of the mature protein. Residues -5—-1 enclosed by a box are the cleaved signal sequence. A stop codon is indicated with an asterisk.

63 (34 アミノ酸残基) の部分配列は、ヒト低密度リポタンパク質 (low-density lipoprotein: LDL) レセプター前駆体との同一性/類似性が 26.5%/61.8% であった。また、この領域には 12 アミノ酸残基からなる D-X-D-X-D-X-E-X-X-S-E-D という酸性アミノ酸を含む特異的なモチーフが含まれている。このモチーフは、LFASTA プログラムによる解析結果から、LDL レセプター中のリガンド結合ドメインであるシステインリッチ領域の繰り返し配列中の陰性荷電アミノ酸リッチ部位と類似していることが明らかになった (Fig. 2)。実際に Fukuchi らは、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 の溶血活性を阻害すること、⁵⁾ さらに、Asp-hemolysin と LDL の結合実験を行い、LDL が Asp-hemolysin に対して LDL レセプターと同等の高親和性で結合すること、また、その解離定数 (K_D 値) が 8.9×10^{-9} M であることを明らかにした。⁶⁾

LDL レセプターは Goldstein ら⁷⁻⁹⁾ により初めてその存在が明らかにされたが、家族性高コレステロール血症 (FH) と呼ばれる遺伝的疾患の研究に

において、FH 患者はこの LDL レセプターが遺伝的に欠損しているため、高コレステロール血症を引き起こすことが示され、FH の原因は LDL レセプターそのものの遺伝的異常であることが明らかにされている。

さらに近年、動脈硬化発症の機序においてマクロファージの役割が重要であることが解明されてきた。⁹⁻¹⁴⁾ 中でもマクロファージが LDL を取り込んで細胞内にコレステロールを蓄積した泡沫細胞を形成する現象が、LDL レセプターを遺伝的に欠いた FH 患者や、その動物モデルである WHHL (Watanabe heritable hyperlipidemic) ウサギにおいて認められていることから、¹⁵⁾ この LDL 取り込みには LDL レセプターが関与していないことが明らかとなった。¹⁶⁾ 原因としては、LDL が体内に長く留まる間に酸化され、酸化 LDL (Ox-LDL) となることで、初めてマクロファージに取り込まれることが確認されている。このマクロファージのレセプターはスカベンジャーレセプター (SR) と名付けられ、¹⁷⁻¹⁹⁾ 1990 年に初めてウシで SR 遺伝子がクローニングされ、^{20,21)} 1993 年にはヒト、²²⁾ マウス、

	Residue No.		Repeat No.
Asp-hemolysin	34-45	D G D K D A E I T S E D	
LDL receptor	26-37	D G S A E C Q D G S D E	I
	69-80	D G Q V D C D N G S D E	II
	108-119	D S D R D C L D G S D E	III
	147-158	D N D P D C E D G S D E	IV
	196-207	D G G P D C K D K S D E	V

Fig. 2. Local Comparison of an Amino Acid Sequence at Residues 34-45 of the Asp-hemolysin with the Negatively Charged Amino Acid Sequences in the Ligand Binding Domain of the Human LDL Receptor

ウサギ²³⁾においても SR 遺伝子が同定された。この SR は LDL レセプターと異なり、Ox-LDL から取り込んだコレステロールによりネガティブフィードバックを受けないため、動脈硬化巢中でマクロファージのコレステロール蓄積は制御されず、最終的に泡沫化を引き起こす。^{24,25)} さらに Ox-LDL は血管内皮細胞に対しても、様々な反応を惹起することから、²⁶⁻³⁷⁾ 動脈硬化症発症に重要な役割を果たすと考えられている。この Ox-LDL のレセプターとしては、マクロファージで最初にクローニングされた SR である SR-AI/SR-AII^{20,21)} を始めとし、最近では、内皮細胞上に発現する lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1, SR-E),³⁸⁻⁴⁰⁾ scavenger receptor expressed by endothelial cells (SREC, SR-F)⁴¹⁾ 及び scavenger receptor that is a membrane-type collectin from placenta (collectin placenta 1, CL-P1)⁴²⁾ など 10 種類以上が発見されている。これら SR 類はアセチル化 LDL (Ac-LDL) を始め種々の修飾 LDL、さらに様々なポリアニオン類と結合するため、いずれも Ox-LDL に対し非特異的であると考えられている。また、Ox-LDL を認識する分子として、各種の抗体⁴³⁻⁴⁶⁾ も報告されているが、他の抗原との交差反応性を有することから、Ox-LDL 認識において非特異的であると考えられており、Ox-LDL を特異的に認識する物質の報告は見当たらない。

そこで筆者は、LDL 結合性タンパク質の 1 つである Asp-hemolysin の分子機能をより詳細に解明する観点から、本稿では Asp-hemolysin と Ox-LDL の結合性、Ox-LDL に対する Asp-hemolysin の結合特異性、Asp-hemolysin と Ox-LDL の主要脂質

成分の 1 つであるリゾホスファチジルコリン (LysoPC) との相互作用について検討したので報告する。

1. Asp-hemolysin と酸化 LDL の結合性

1994 年、Ebina ら⁴⁾ により、Asp-hemolysin の 1 次構造が決定・解析された結果、LDL レセプターリガンド結合領域と Asp-hemolysin の各部分アミノ酸配列において類似性があることが明らかとなり、Asp-hemolysin の LDL 親和性が示唆された。そこで、LDL とその修飾体である Ac-LDL, Ox-LDL の Asp-hemolysin 溶血活性に及ぼす影響について検討し (Fig. 3),⁴⁷⁾ LDL, Ox-LDL の添加により Asp-hemolysin の溶血活性阻害が認められ、特に Ox-LDL でより強く阻害されることが確認された。一方、Ac-LDL では、溶血阻害は認められなかった。この阻害は Asp-hemolysin と LDL, Ox-LDL の結合に起因するものと考え、次に Asp-hemolysin と Ox-LDL の結合を検討する目的から、Ox-LDL と Asp-hemolysin の反応混液について抗 Asp-hemolysin 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った結果、⁴⁸⁾ Ox-LDL に対する Asp-hemolysin の用量依存的な結合が認められた (Fig. 4)。これらの結果から、Asp-hemolysin は新規な Ox-LDL 結合性タンパク質であることが明らかとなった。

2. 酸化 LDL に対する Asp-hemolysin の結合特異性

Ox-LDL はマクロファージに SR を介し取り込まれ、泡沫細胞形成を引き起こすことが知られている。また Ox-LDL は、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞に対しても様々な反応を惹起することから、動脈硬化症発症に重要な役割を果たすと考えられてい

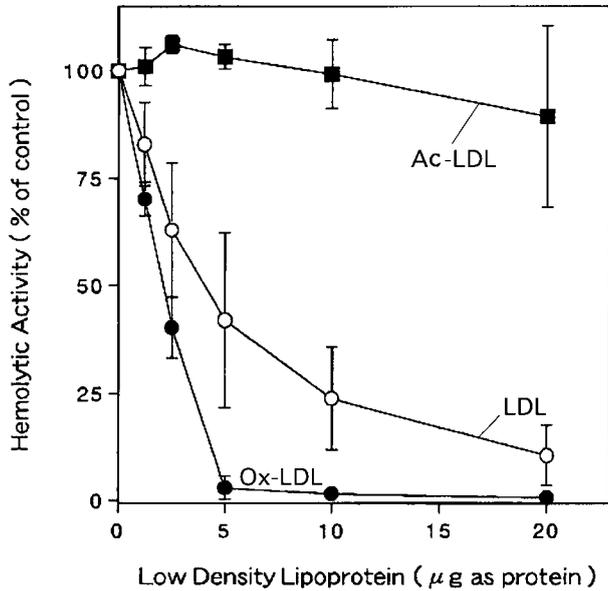


Fig. 3. Effect of Modified Lipoproteins on the Hemolytic Activity of Asp-hemolysin
Each value is the mean \pm S.D. from three separate experiments. \circ : LDL, \bullet : Ox-LDL, \blacksquare : Ac-LDL.

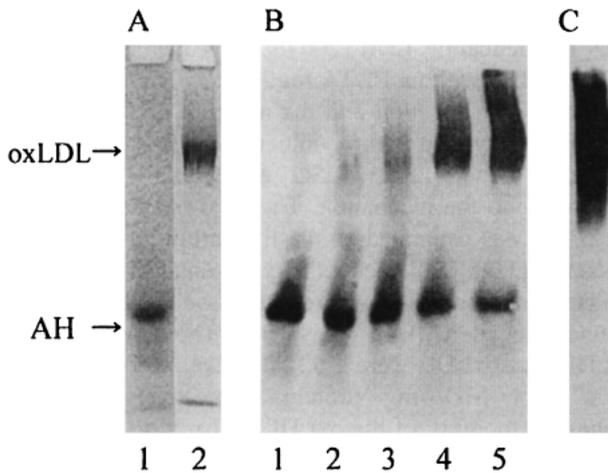


Fig. 4. Dose Dependent Binding of Asp-hemolysin to Ox-LDL

A: Asp-hemolysin (AH, 10 μ g; lane 1) and Ox-LDL (10 μ g, lane 2) were electrophoresed on a 4% nondenaturing PAGE. Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue. B: Asp-hemolysin (1 μ g) was incubated with various concentrations of Ox-LDL (lane 1, 0 μ g; lane 2, 0.8 μ g; lane 3, 4 μ g; lane 4, 8 μ g; lane 5, 40 μ g). The mixtures were applied to a 4% nondenaturing PAGE, immunoblotted with anti-Asp-hemolysin antibody and detected by ECL. C: Asp-hemolysin (1 μ g) was incubated with Ox-LDL (10 μ g). The mixture was applied to a 4% nondenaturing PAGE, immunoblotted with anti-Asp-hemolysin antibody and detected by ECL.

る。特に高コレステロール血症患者では肝臓の LDL レセプターの活性が低下し、健常人と比較し、LDL の血中滞留時間が長く、Ox-LDL が生成し易いと考えられている。^{49,50)} そこで、まず始めに Asp-

hemolysin に対する様々な酸化処理時間の Ox-LDL の結合性を検討した結果、⁵¹⁾ Fig. 5 に示すように短時間酸化処理の Ox-LDL と Asp-hemolysin が強い結合性を示した。一方、酸化処理時間の長い Ox-LDL では、酸化処理時間の増加に伴い、結合の減少が認められた。LDL は脂質とタンパク質の複合体であるが、酸化修飾過程において、主要構成タンパク質であるアポ B タンパク質が、酸化処理時間の増加に伴い分解することが知られている。⁵²⁾ また、様々な生物活性を有すると言われる過酸化物質、アルデヒド、リゾリン脂質、酸化ステロール類が酸化に伴い LDL 分子中で生成し、さらに酸化が進行すると、これら物質が LDL 分子から離脱することが報告されている。⁵³⁾ これらのことから、Asp-hemolysin に対する長時間酸化処理 Ox-LDL の結合活性の減少理由としては、アポ B タンパク質のフラグメンテーション、若しくは構成脂質類の離脱などが関与しているものと推察された。

次に各種修飾 LDL、修飾 HDL に対する Asp-hemolysin の結合性を検討した。⁵¹⁾ その結果、Figs. 6 and 7 に示す通り Asp-hemolysin は SR のリガンドとして一般的に用いられる Ac-LDL、各修飾 HDL には結合をほとんど示さず、Ox-LDL にのみ特異的に結合した。また、Asp-hemolysin はキロミクロンや VLDL にも結合性を示さないことから、Asp-hemolysin と Ox-LDL の結合には、LDL の酸化修飾時にのみ生成する物質の関与が推察された。また、SR (クラス A, B) への Ox-LDL 結合阻害を示すポリアニオン類のいずれもが、Ox-LDL に対する Asp-hemolysin の結合に影響を与えなかったことから (Fig. 8),⁵¹⁾ Asp-hemolysin は各種 SR とは異なり、Ox-LDL と特異的な結合を示す可能性が強く示唆された。

一般に、Ox-LDL 結合性タンパク質である SR は、構造に関係なく、多くの化学物質を結合することから “multiligand receptor” と言われる。近年報告された Steinbrecher のリガンド特異性にに基づいたレセプターの分類によると、SR A (タイプ I, タイプ II)、クラス B SR (CD36, SR-BI) は Ac-LDL、M-BSA を認識することが明らかになっている。⁵⁴⁾ また、Moriwaki ら⁵⁵⁾ はウシ、ヒトの LOX-1 を発現させた Chinese hamster の CHO 細胞で、Ox-LDL の血管内皮細胞レセプターである LOX-1 が、

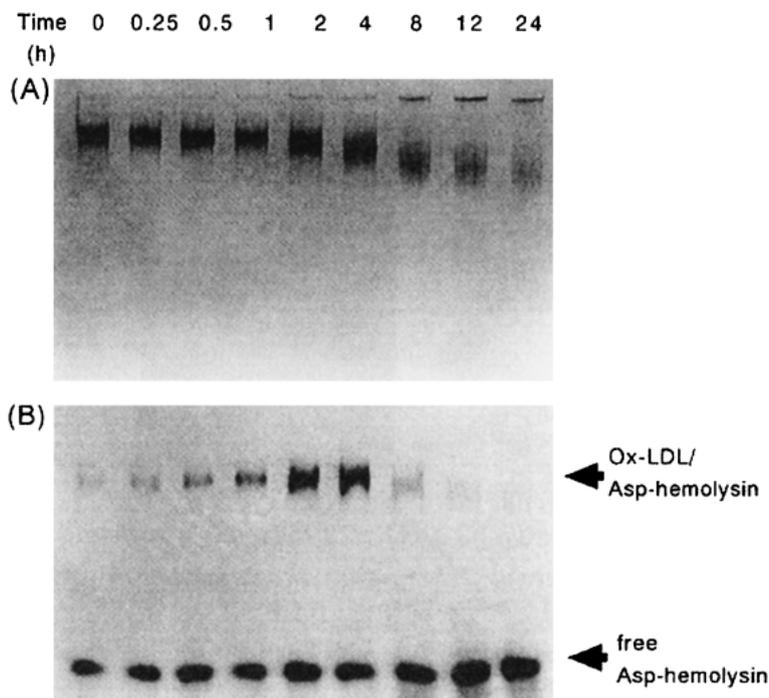


Fig. 5. Binding of Asp-hemolysin to Ox-LDL versus Time of LDL Oxidation

A: Time course of LDL oxidation with $5 \mu\text{M}$ CuSO_4 . The various oxidized LDLs for the indicated time were electrophoresed on a 4% native PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue. B: Binding of Asp-hemolysin to LDL oxidized at different times. Asp-hemolysin ($0.5 \mu\text{g}$) and Ox-LDL ($5 \mu\text{g}$) were incubated at 21°C for 18 h and the resultant complexes were separated on 4% native PAGE, transferred to Immobilon P, and probed with rabbit anti Asp-hemolysin antibody. The membrane was washed and incubated with goat antibody to rabbit IgG Fc and rabbit peroxidase-anti-peroxidase complex. Detection was done by enhanced chemiluminescence (ECL).

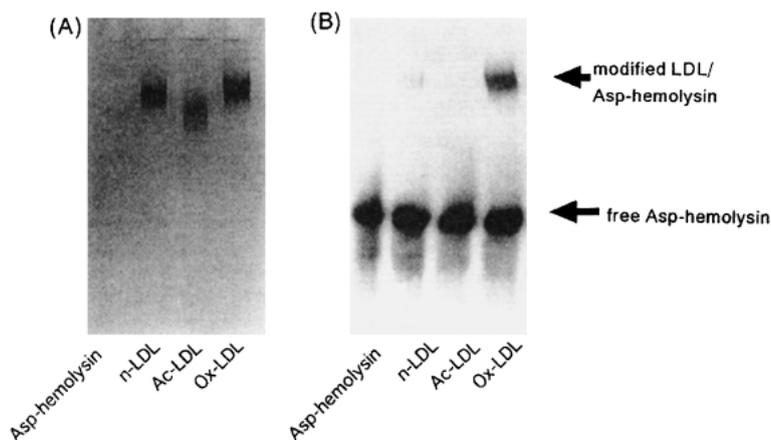


Fig. 6. Binding of Asp-hemolysin to Chemically Modified LDLs

A: Asp-hemolysin ($10 \mu\text{g}$), and LDL ($10 \mu\text{g}$), modified LDLs ($10 \mu\text{g}$: Ac-LDL and Ox-LDL) were electrophoresed on a 4% native PAGE. Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue. B: Asp-hemolysin ($1 \mu\text{g}$) was incubated with LDL ($10 \mu\text{g}$) or modified LDLs ($10 \mu\text{g}$) at 21°C for 21 h. The mixtures were applied on a 4% native PAGE and immunoblotted with anti-Asp-hemolysin antibody detected by ECL.

Ac-LDLではなく、Ox-LDLを認識することを報告した。さらに、この結合は fucoidin, M-BSA で効果的に阻害されるが、poly I では阻害されないことも明らかにした。しかし Asp-hemolysin の場合、上記のようなポリアニオン類は Ox-LDL に対する

Asp-hemolysin の結合に影響を与えなかった。さらに、Asp-hemolysin は、Ac-LDL、長時間酸化の Ox-LDL に対し結合しないことから、この相互作用には、必ずしも Ox-LDL の変性アポ B タンパク質に起因する電気泳動度や荷電の変化が重要ではな

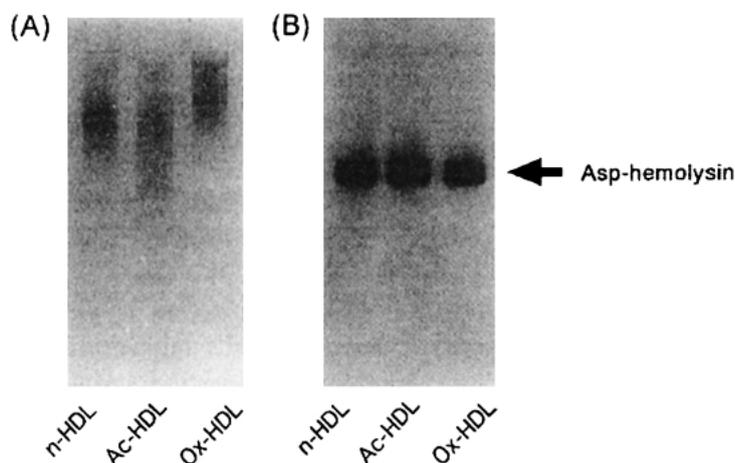


Fig. 7. Binding of Asp-hemolysin to Chemically Modified HDLs

A: HDL (10 μg), modified HDLs (10 μg , Ac-HDL and Ox-HDL) were electrophoresed on a 10% native PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue. B: Asp-hemolysin (1 μg) was incubated with HDL (10 μg) or modified HDLs (10 μg) at 21°C for 18 h. The mixtures were applied to a 10% native PAGE and immunoblotted with anti-Asp-hemolysin antibody, then detected by ECL.

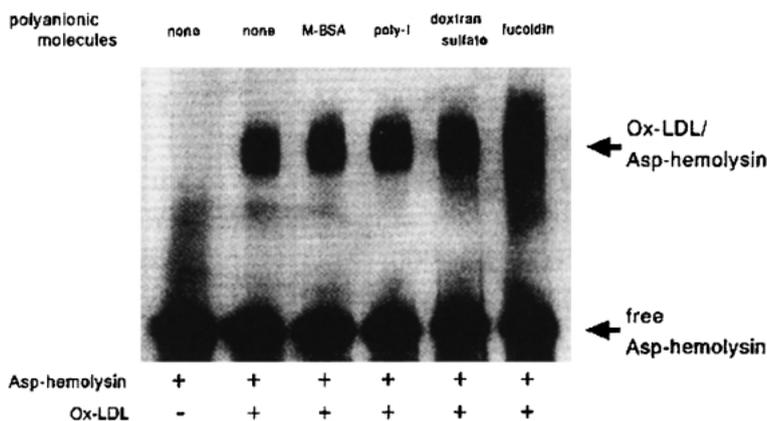


Fig. 8. Effect of Polyanionic Molecules on Ox-LDL Binding to Asp-hemolysin

M-BSA, poly-I, dextran sulfate or fucoidin was preincubated with Asp-hemolysin at 37°C for 10 min, then the binding assay of the preincubated Asp-hemolysin and Ox-LDL was performed as described in the legend to Fig. 6.

Table 1. Kinetic Binding Constants of Interaction between Ox-LDL and Asp-hemolysin

Ox-LDL ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	k_{ass} ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$)	k_{diss} (s^{-1})	K_{D} (nM)	K_{D} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
10	6.33×10^5	4.03×10^{-4}	0.6	0.33
20	3.49×10^5	3.92×10^{-4}	1.1	0.58
40	1.98×10^5	3.79×10^{-4}	1.9	0.98
Mean (\pm S.D.)	2.21×10^5	3.91×10^{-4}	$1.2 (\pm 0.64)$	$0.63 (\pm 0.33)$

Analyses were done with BIAevaluation 2.1 software (Pharmacia). K_{D} was calculated from $k_{\text{diss}}/k_{\text{ass}}$.

いことも示唆された。酸化脂肪酸，酸化リン脂質，リゾリン脂質のような脂質類が，この結合においてはより重要であることが推測された。これらの実験結果から，Asp-hemolysinはLOX-1，クラスA，B SRなどとは異なるメカニズムでOx-LDLに結合することが明らかとなった。

さらに，Asp-hemolysinとOx-LDLの結合特性について，SPR法を用いて，動力学的解析を行った。得られた結合速度定数と解離速度定数から，固定化したAsp-hemolysinに対するOx-LDLの速い結合と，遅い解離が明らかとなり，算出された解離定数($K_{\text{D}}=0.63 \mu\text{g}/\text{ml}$)はスカベンジャーレセプター

のそれとほぼ同等レベルを示した (Table 1, Fig. 9). これらの結果から, Asp-hemolysin は Ox-LDL に対し特異的に結合し, 高親和性であることが強く示唆された.

3. Asp-hemolysin とリゾホスファチジルコリンの相互作用

生活習慣病の1つとして知られる動脈硬化症は, 加齢とともに発生頻度が増加し, 脳血管障害, 心筋

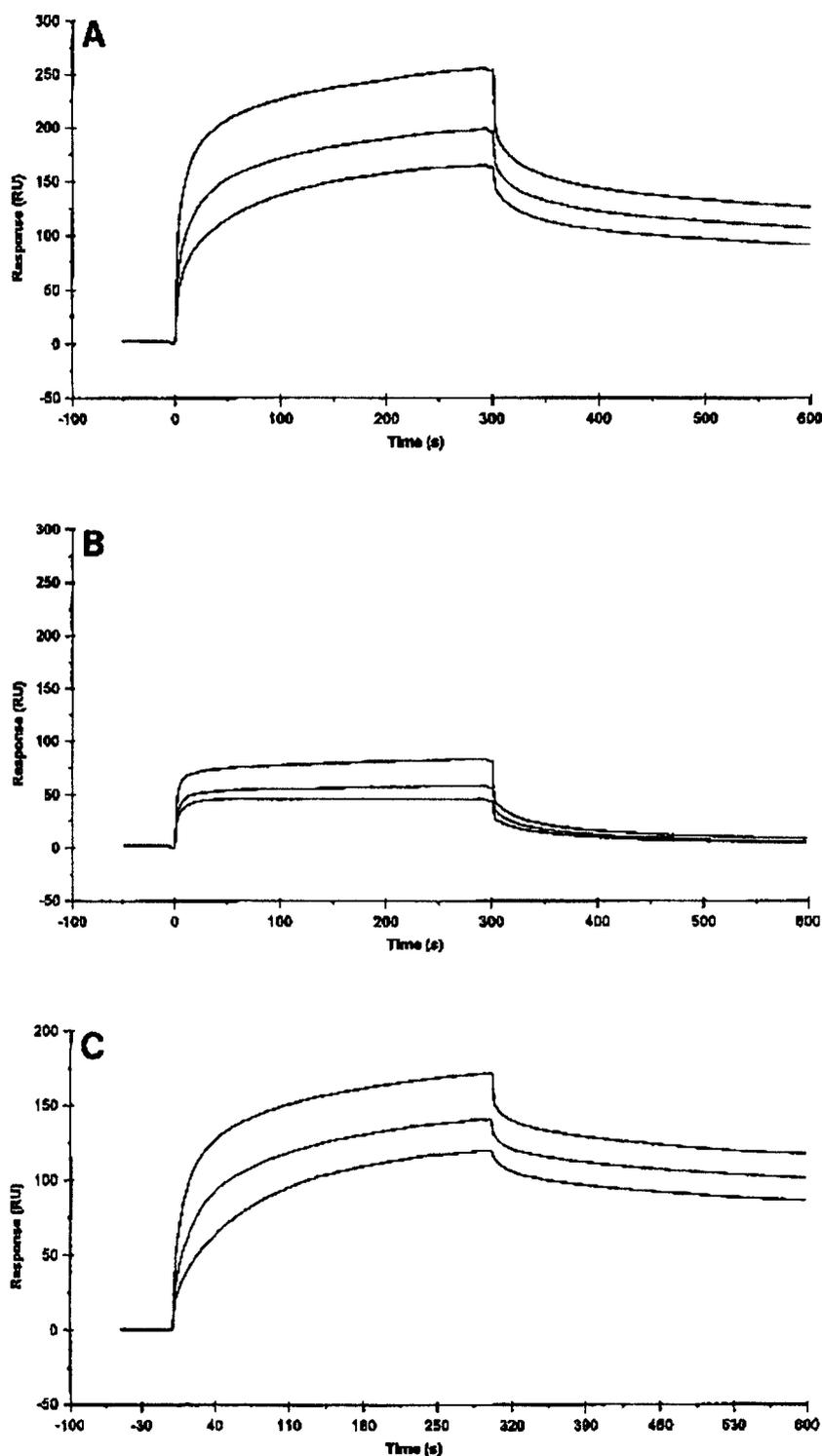


Fig. 9. Sensorgrams of Ox-LDL Binding to Asp-hemolysin

A,B: Solutions of increasing concentrations of Ox-LDL (bottom to top: 10, 20 and 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were run over a sensor chip containing immobilized Asp-hemolysin (A), or a mock-derivatized sensor chip as control (B), at a flow rate of 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. C: y-Transformed sensorgrams after subtraction of control.

梗塞, 狭心症などを惹起することが知られている. 近年ではこれら動脈硬化のなかで, 虚血性心疾患, 脳梗塞, 大動脈瘤などの重篤な疾患の基盤となる粥状動脈硬化が, 病理学的に最も重要であると考えられている. 粥状動脈硬化発生の初期において, 血管内皮細胞の機能障害をもたらす重要因子として知られるのが Ox-LDL である.^{49,50} 酸化変性を受けた Ox-LDL では, その構成脂質の過酸化物の増加, 構成アポ B タンパク質の分解, そして粒子全体の陰性荷電の増加がみられる. またリン脂質画分においてはホスファチジルコリン (PC) のリゾホスファチジルコリン (LysoPC) への変換が認められる.^{43,56}

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. 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, 脂質ヒドロペルオキシド, 脂質フリーラジカルを生成し, 自動酸化が開始する. 脂質ヒドロペルオキシドは, 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ホスファチジルコリン (酸化 PC) 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, 酸化 PC は, リポタンパク

質粒子と結合して存在する platelet-activating-factor acetylhydrolase (PAF-AH)⁵⁷⁻⁵⁹ 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いる. そこで, Ox-LDL 脂質成分中の Asp-hemolysin 結合成分の 1 つと考えられる LysoPC に注目し, 種々結合解析を行い, Asp-hemolysin と短時間酸化処理の Ox-LDL との結合メカニズムについて検討した. Ox-LDL 中から LysoPC を取り除くためあらかじめ BSA を用いて前処理した Ox-LDL (BSA 処理 Ox-LDL) を調製し, 溶血に及ぼす影響を検討した.⁶⁰ その結果, Fig. 10 に示す通り BSA 処理 Ox-LDL では, 通常の Ox-LDL で認められた溶血阻害作用がほとんど認められなくなったことから, Ox-LDL 中の LysoPC が溶血阻害に関与していることが示唆された. LysoPC は, 一般に溶血性物質として知られており, 実際, 本反応系に LysoPC を 5 μ g 添加することで溶血が観察された. 一方, LysoPC を含む Ox-LDL では溶血は誘起されないものの, 赤血球の構造変化が起こることが報告されている.⁶¹ そこで, 溶血が起こらない程度の少量の LysoPC と preincubate した赤血球を用いて, Asp-hemolysin の溶血活性を測定したところ, Asp-hemolysin の溶血活性は LysoPC の添加で, Ox-LDL と同様に阻害された. これらの結果から, Ox-LDL による溶血阻害メカニズムは, LDL の酸化過程で生成した

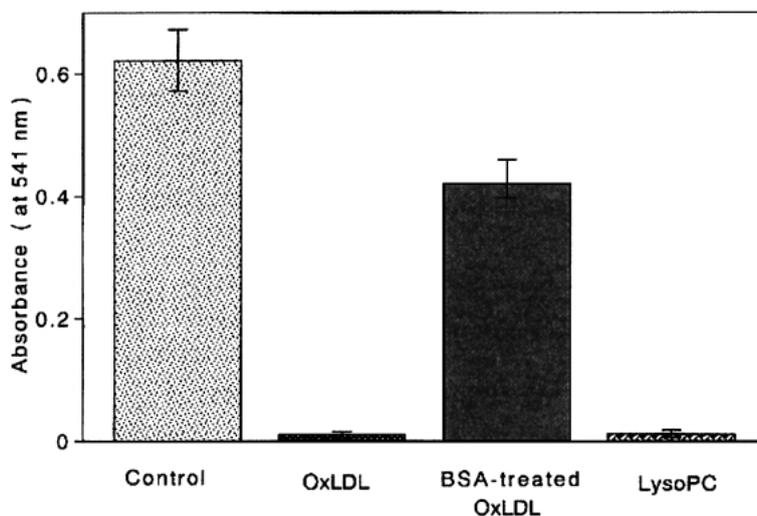


Fig. 10. Effect of Preincubation of Erythrocytes with Ox-LDL on the Hemolytic Activity of Asp-hemolysin

The 2% erythrocyte suspension (200 μ l) was incubated with Ox-LDL (10 μ g/50 μ l), BSA-treated Ox-LDL (10 μ g/50 μ l) or LysoPC (2 μ g/50 μ l) 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. Each value is the means \pm S.D. from three separate experiments.

LysoPC によることが明らかとなった。

次に、LDL 分子のフラグメンテーションが認められない、酸化処理時間が 4 h までの酸化程度の低い Ox-LDL について、Asp-hemolysin の結合性を検討した。⁶⁰⁾ その結果 Fig. 11 に示す通り、Asp-hemolysin の結合性は、LDL の酸化処理時間に依存して増大した。また、Ox-LDL から脂質画分を

抽出し、TLC によるリン脂質成分の分析を行ったところ、酸化処理時間に依存した LysoPC 生成量の増加が認められた。これらの結果から Asp-hemolysin の Ox-LDL 結合性は、Ox-LDL 中の過酸化反応生成物である LysoPC が関与している可能性が推測された。

この Ox-LDL 粒子中の Asp-hemolysin 結合成分

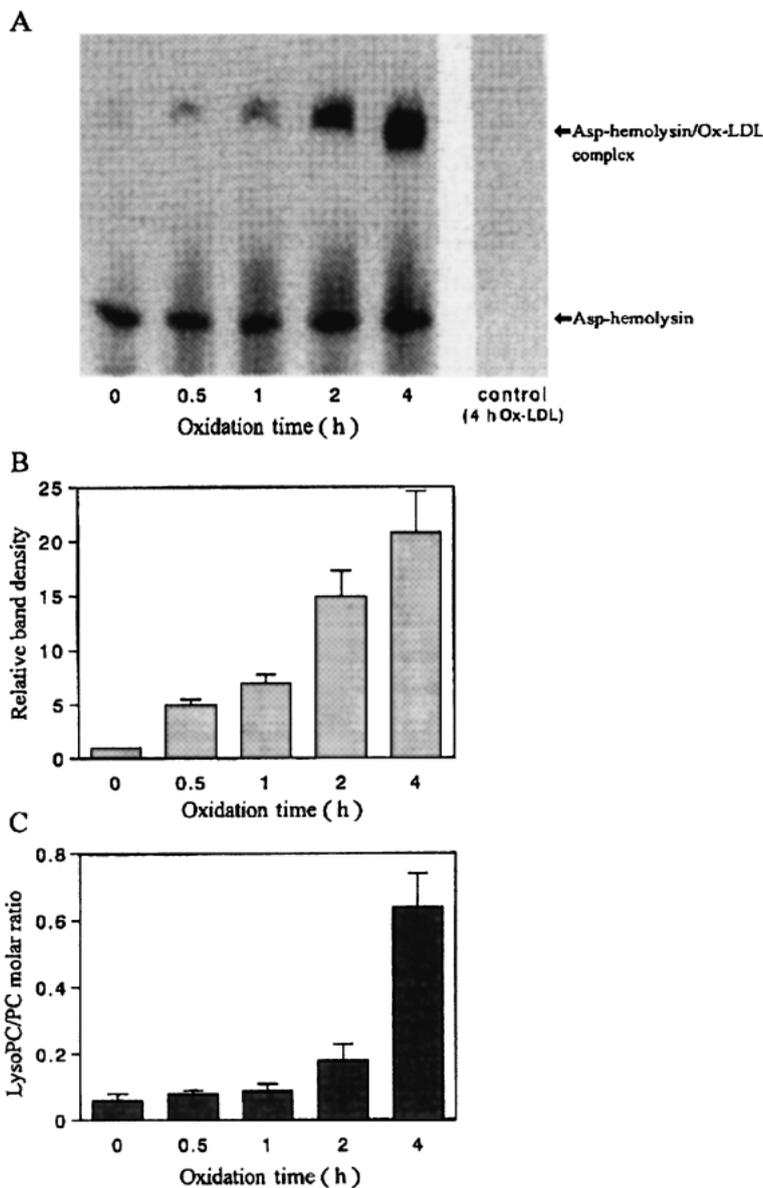


Fig. 11. Binding of Asp-hemolysin to Ox-LDL and Phospholipid Analysis of Ox-LDL

A: Binding of Asp-hemolysin to LDL oxidized at different times. Asp-hemolysin ($1 \mu\text{g}$) and Ox-LDL ($10 \mu\text{g}$) were incubated at 37°C for 5 h and the resultant complexes were separated on a 4% native PAGE, transferred to Immobilon P, and probed with rabbit anti-Asp-hemolysin antibody. The membrane was incubated with goat antibody to rabbit IgG Fc and rabbit peroxidase anti-peroxidase complex. Detection was done by ECL. Control incubation (4 h Ox-LDL) was done without Asp-hemolysin. B: Densitometric analysis of bands corresponding to Asp-hemolysin/Ox-LDL complex in A. C: Phospholipid composition of Ox-LDL. Phospholipids from Ox-LDL were extracted with chloroform/methanol (2 : 1). The extracts were separated by TLC on silica gel 60 using chloroform/methanol/acetic acid/water (25 : 15 : 4 : 2) and the bands were visualized with primulin reagent. LysoPC and PC zones were scraped into test tubes, and assayed for phosphorus content. Phospholipid composition was expressed as the lysoPC/PC molar ratio. Each value is the mean \pm S.D. from duplicate determinations from three separate experiments.

を追求する目的から、LysoPCの生成に関与するPAF-AHの酵素活性を阻害するPMSFを用いて、2, 4, 6 mMのPMSFで前処理した4 h Ox-LDLを作製した。PMSF前処理4 h Ox-LDLとAsp-hemolysinの結合性解析を行った結果 (Fig. 12),⁶⁰ PMSFの前処理濃度の増加に伴いAsp-hemolysinの結合性の減弱が観察された。また、リン脂質成分の分析では、PMSF前処理濃度の増大に伴いLysoPC生成量の減少が認められた。これらの結果から、Asp-hemolysinの結合成分は、Ox-LDLのPMSF処理によりその生成が減少するLysoPCである可

能性が強く示唆された。

さらに、より直接的に解析するため、Asp-hemolysinとLysoPC標品の相互作用について、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて検討した。⁶⁰ LysoPC単独添加時に認められたDE51未結合画分であるFraction No. 8のピークは、Asp-hemolysinとLysoPCの反応混液の添加においては、1 M NaClで溶出したAsp-hemolysinピークと重なるFraction No. 28に移動したことから、Asp-hemolysinとLysoPCの直接結合が明らかとなった (Fig. 13)。

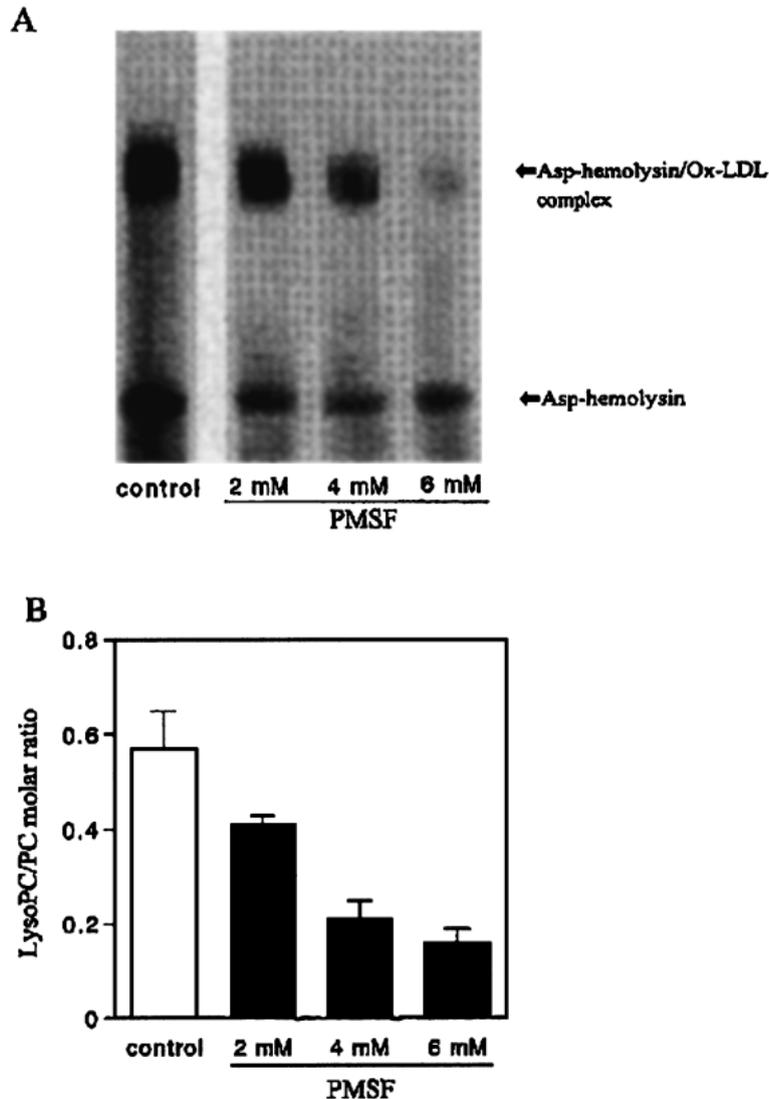


Fig. 12. Binding of Asp-hemolysin to PMSF-Pretreated Ox-LDL and Phospholipid Analysis of PMSF-Pretreated Ox-LDL

A: Binding of Asp-hemolysin to PMSF-pretreated Ox-LDL. Asp-hemolysin (1 μ g) was incubated with PMSF-pretreated Ox-LDL (10 μ g) at 37°C for 5 h. The mixture was applied to a 4% native PAGE and immunoblotted with anti-Asp-hemolysin antibody then detected by ECL. B: Phospholipid composition of PMSF-pretreated Ox-LDL. Phospholipids from PMSF-pretreated Ox-LDL were extracted with chloroform/methanol. TLC of the extracts and phospholipid analysis were performed as described in Fig. 11 (C). Phospholipid composition was expressed as the lysoPC/PC molar ratio. Each value is the mean \pm S.D. from duplicate determinations from three separate experiments.

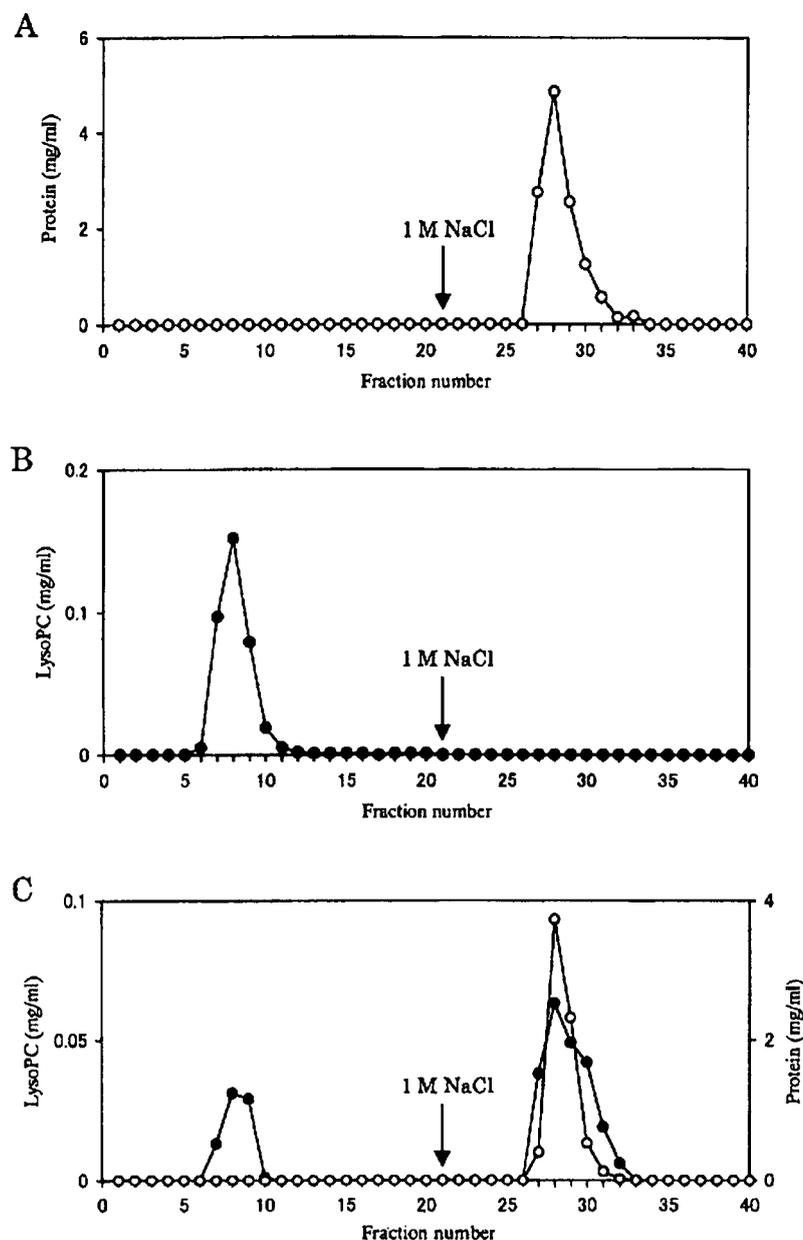


Fig. 13. Binding Analysis of LysoPC to Asp-hemolysin by Ion-Exchange Chromatography

A, B: Elution profile of Asp-hemolysin (A) or lysoPC (B) as controls. C: Asp-hemolysin (1.25 mg) was incubated with $400 \mu\text{M}$ lysoPC at 4°C for 3 h and the mixture was applied to an ion-exchange column. The column was washed with 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) and then the bound Asp-hemolysin was eluted with the buffer containing 1 M NaCl. These fractions were collected and used for determination of protein and phospholipid.

おわりに

Asp-hemolysin が Ox-LDL と高い親和性で結合し、その結合は、SR とは異なり特異的であることが示された。また Asp-hemolysin は、LysoPC と結合することが明らかとなり、Asp-hemolysin が全く新しいタイプの Ox-LDL 結合性タンパク質であることが判明した。

以上の点から Asp-hemolysin は、Ox-LDL 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、今後 Asp-hemolysin と Ox-LDL の結合メカニズムの更なる研究が、早期の動脈硬化診断法の開発、動脈硬化の発症・進展を抑制する医薬品の開発など、動脈硬化の研究領域において応用されることが期待される。

謝辞 本総説で紹介した研究は、東北薬科大学第一衛生化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教授、蝦名敬一助教授、熊谷

健助手，福地祐司博士（仙台赤十字病院）に厚く御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Yokota K., Shimada H., Kamaguchi A., Sakaguchi O., *Microbiol. Immunol.*, **21**, 11–22 (1977).
- 2) Ebina K., Kumagai T., Fukuchi Y., Yokota K., *Jpn. J. Med. Mycol.*, **38**, 155–160 (1997).
- 3) Ebina K., Suzuki K., Kumagai T., Fukuchi Y., Amitani R., Yokota K., *Jpn. J. Med. Mycol.*, **36**, 245–250 (1995).
- 4) Ebina K., Sakagami H., Yokota K., Kondo H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1219**, 148–150 (1994).
- 5) Fukuchi Y., Kumagai T., Ebina K., Yokota K., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 547–550 (1996).
- 6) Fukuchi Y., Kudo Y., Kumagai T., Ebina K., Yokota K., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 1380–1381 (1996).
- 7) Goldstein J. L., Brown M. S., *J. Biol. Chem.*, **249**, 5153–5162 (1974).
- 8) Brown M. S., Goldstein J. L., *Science*, **232**, 34–47 (1986).
- 9) Goldstein J. L., Brown M. S., *Annu. Rev. Biochem.*, **46**, 897–930 (1977).
- 10) Gerrity R. G., *Am. J. Pathol.*, **103**, 181–190 (1981).
- 11) Gerrity R. G., *Am. J. Pathol.*, **103**, 191–200 (1981).
- 12) Schaffner T., Taylor K., Bartucci E. J., Fischer-Dzoga K., Beeson J. H., Glagov S., Wissler R. W., *Am. J. Pathol.*, **100**, 57–80 (1980).
- 13) Ross R., *N. Engl. J. Med.*, **314**, 488–500 (1986).
- 14) Gerrity R. G., Naito H. K., Richardson M., Schwartz C. J., *Am. J. Pathol.*, **95**, 775–792 (1979).
- 15) Basu S. K., Goldstein J. L., Anderson G. W., Brown M. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 3178–3182 (1976).
- 16) Fogelman A. M., Haberland M. E., Seager J., Hokom M., Edwards P. A., *J. Lipid Res.*, **22**, 1131–1141 (1981).
- 17) Brown M. S., Goldstein J. L., *Annu. Rev. Biochem.*, **52**, 223–261 (1983).
- 18) Via D. P., Dressel H. A., Cheng S. L., Gotto Jr. A. M., *J. Biol. Chem.*, **260**, 7379–7386 (1985).
- 19) Kodama T., Reddy P., Kishimoto C., Krieger M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 9238–9242 (1988).
- 20) Kodama T., Freeman M., Rohrer L., Zabrecky J., Matsudaira P., Krieger M., *Nature*, **343**, 531–535 (1990).
- 21) Rohrer L., Freeman M., Kodama T., Penman M., Krieger M., *Nature*, **343**, 570–572 (1990).
- 22) Matsumoto A., Naito M., Itakura H., Ikemoto S., Asaoka H., Hayakawa I., Kanamori H., Aburatani H., Takaku F., Suzuki H., Kobari Y., Miyai T., Takahashi K., Cohen E. H., Wydro R., Housman D. E., Kodama T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 9133–9137 (1990).
- 23) Doi T., Higashino K., Kurihara Y., Wada Y., Miyazaki T., Nakamura H., Uesugi S., Imanishi T., Kawabe Y., Itakura H., Yazaki Y., Matsumoto A., Kodama T., *J. Biol. Chem.*, **268**, 2126–2133 (1993).
- 24) Henriksen T., Mahoney E. M., Steinberg D., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **401**, 102–116 (1982).
- 25) Boyd H. C., Gown A. M., Wolfbauer G., Chait A., *Am. J. Pathol.*, **135**, 815–825 (1989).
- 26) Boulanger C. M., Tanner F. C., Béa M. L., Hahn A. W., Werner A., Lüscher T. F., *Circ. Res.*, **70**, 1191–1197 (1992).
- 27) Chin J. H., Azhar S., Hoffman B. B., *J. Clin. Invest.*, **89**, 10–18 (1992).
- 28) Weis J. R., Pitas R. E., Wilson B. D., Rodgers G. M., *FASEB J.*, **5**, 2459–2465 (1991).
- 29) Gebuhrer V., Murphy J. F., Bordet J.-C., Reck M.-P., McGregor J. L., *Biochem. J.*, **306**, 293–298 (1995).
- 30) Murohara T., Scalia R., Lefer A. M., *Circ. Res.*, **78**, 780–789 (1996).
- 31) Claise C., Edeas M., Chalas J., Cockx A., Abella A., Capel L., Lindenbaum A., *FEBS Lett.*, **398**, 223–227 (1996).
- 32) Escargueil-Blanc I., Meilhac O., Pieraggi M.-T., Arnal J.-F., Salvayre R., Nègre-Salvayre A., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **17**, 331–339 (1997).
- 33) Sata M., Walsh K., *J. Clin. Invest.*, **102**, 1682–1689 (1998).
- 34) Mazière C., Djavaheri-Mergny M., Frey-Fres-

- sart V., Delattre J., Mazière J.-C., *FEBS Lett.*, **409**, 351–356 (1997).
- 35) Rajavashisth T. B., Andalibi A., Territo M. C., Berliner J. A., Navab M., Fogelman A. M., Lusis A. J., *Nature*, **344**, 254–257 (1990).
- 36) Cushing S. D., Berliner J. A., Valente A. J., Territo M. C., Navab M., Parhami F., Gerrity R., Schwartz C. J., Fogelman A. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 5134–5138 (1990).
- 37) Maier J. A., Barenghi L., Bradamante S., Pagani F., *Atherosclerosis*, **123**, 115–121 (1996).
- 38) Sawamura T., Kume N., Aoyama T., Moriwaki H., Hoshikawa H., Aiba Y., Tanaka T., Miwa S., Katsura Y., Kita T., Masaki T., *Nature*, **386**, 73–77 (1997).
- 39) Yoshida H., Kondratenko N., Green S., Steinberg D., Quehenberger O., *Biochem. J.*, **334**, 9–13 (1998).
- 40) Aoyama T., Fujiwara H., Masaki T., Sawamura T., *J. Mol. Cell Cardiol.*, **31**, 2101–2114 (1999).
- 41) Adachi H., Tsujimoto M., Arai H., Inoue K., *J. Biol. Chem.*, **272**, 31217–31220 (1997).
- 42) Shimaoka T., Kume N., Minami M., Hayashida K., Kataoka H., Kita T., Yonehara S., *J. Biol. Chem.*, **275**, 40663–40666 (2000).
- 43) Itabe H., *Prog. Lipid Res.*, **37**, 181–207 (1998).
- 44) Haberland M. E., Fong D., Cheng L., *Science*, **241**, 215–218 (1988).
- 45) Rosenfeld M. E., Palinski W., Ylä-Herttuala S., Butler S., Witztum J. L., *Arteriosclerosis*, **10**, 336–349 (1990).
- 46) Itabe H., Jimi S., Kamimura S., Suzuki K., Uesugi N., Imanaka T., Shijo H., Takano T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1406**, 28–39 (1998).
- 47) Fukuchi Y., Kudo Y., Kumagai T., Ebina K., Yokota K., *FEMS Microbiol. Lett.*, **167**, 275–280 (1998).
- 48) Kudo Y., Kumagai T., Fukuchi Y., Ebina K., Yokota K., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 549–550 (1999).
- 49) Ross R., *Nature*, **362**, 801–809 (1993).
- 50) Lusis A. J., *Nature*, **407**, 233–241 (2000).
- 51) Kudo Y., Fukuchi Y., Kumagai T., Ebina K., Yokota K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1568**, 183–188 (2001).
- 52) Hoff H. F., Whitaker T. E., O'Neil J., *J. Biol. Chem.*, **267**, 602–609 (1992).
- 53) Hevonoja T., Pentikäinen M. O., Hyvönen M. T., Kovanen P. T., Ala-Korpela M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1488**, 189–210 (2000).
- 54) Steinbrecher U. P., *Biochim. Biophys. Acta*, **1436**, 279–298 (1999).
- 55) Moriwaki H., Kume N., Sawamura T., Aoyama T., Hoshikawa H., Ochi H., Nishi E., Masaki T., Kita T., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **18**, 1541–1547 (1998).
- 56) Steinbrecher U. P., Parthasarathy S., Leake D. S., Witztum J. L., Steinberg D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 3883–3887 (1984).
- 57) Parthasarathy S., Steinbrecher U. P., Barnett J., Witztum J. L., Steinberg D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 3000–3004 (1985).
- 58) Steinbrecher U. P., Pritchard P. H., *J. Lipid Res.*, **30**, 305–315 (1989).
- 59) Liapikos T. A., Antonopoulou S., Karabina S.-A. P., Tsoukatos D. C., Demopoulos C. A., Tselepis A. D., *Biochim. Biophys. Acta*, **1212**, 353–360 (1994).
- 60) Kudo Y., Ootani T., Kumagai T., Fukuchi Y., Ebina K., Yokota K., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 787–790 (2002).
- 61) Sambrano G. R., Parthasarathy S., Steinberg D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 3265–3269 (1994).