

〔原著〕 リポ蛋白リパーゼの活性発現機構に関する研究

田 代 淳*

(平成6年6月15日受付, 平成6年6月20日受理)

要 旨

リポ蛋白リパーゼ (LPL) は血中中性脂肪を加水分解する酵素であり, その活性低下は高中性脂肪血症の原因となる。近年, 本酵素活性低下の原因として機能異常 LPL の存在が見出され, その機能異常は正により高度中性脂肪血症の治療が可能となった症例が報告された。このような機能異常 LPL を見出し治療法を検討するためには, LPL 活性発現機構の詳細を明らかにする必要がある。本研究ではヒト LPL 反応機構の詳細と活性中心構造について検討した。

リパーゼ反応の特徴は, 水に溶けた酵素と水に溶けていない基質との異相間反応ということである。したがって酵素はエステル結合水解に関わる活性中心機能以外に, 基質が形成する界面を認識, 結合する機能をそなえていると考えられる。また, 一般にリパーゼは本来の長鎖脂肪酸エステル水解活性 (lipase 活性) 以外に水溶性の短鎖脂肪酸エステル水解活性 (esterase 活性) を持つ。本研究では, LPL は界面認識部位と活性中心とを別に持ち, 活性中心機能は esterase 活性でモニターできるという機能モデルを想定し解析を行った。

ヒト LPL cDNA から発現された LPL は, lipase 活性 (triolein 水解活性) と esterase 活性 (tributyrin 水解活性) を有した。その triolein 水解活性は tributyrin 添加により低下した。一方, LPL の tributyrin 水解活性は triolein emulsion 添加により増加した。これは LPL が脂質界面と結合した時活性中心に構造変化が生じたためであり, いわゆる interfacial activation と考えられた。この過程がリパーゼ活性発現に果たす意義を明らかにするため, LPL 蛋白を trypsin 処理し検討した。LPL を trypsin 処理しても tributyrin 水解活性と脂質粒子との結合能は保持されていた。しかし triolein 添加による tributyrin 水解活性上昇反応はみられず, triolein 水解活性は認められなかった。以上から interfacial activation は lipase 活性発現に必須な過程と考えられた。

次に活性中心構造の解析を変異 LPL を作製し検討した。活性中心は他のリパーゼとの1次構造の比較から serine (Ser, S)¹³² が重要と推測されている。この Ser¹³² を asparagine (Asn, N) と glycine (Gly, G) に置換させた LPL について解析した。LPL-S132N は超低比重リポ蛋白との結合は認められたが, triolein, tributyrin 水解活性共に認められなかった。LPL-S132G は triolein, tributyrin 水解活性いずれも wild type LPL と同等に有していた。以上から LPL の Ser¹³² は脂質界面との結合に関与せず, 活性中心にとって重要と思われた。しかし Gly に置換しても活性は保持されることが明らかとなった。

Key words: リポ蛋白リパーゼ (LPL), 脂質界面認識, Interfacial activation, trypsin 処理, site-directed mutagenesis, triolein, tributyrin, 短鎖中性脂肪, 長鎖中性脂肪, LPL 遺伝子, LPL cDNA, CHO cell, COS-1 cell

略語一覧: LPL: リポ蛋白リパーゼ, CHO: Chinese hamster ovary, VLDL: very low density lipoprotein, PAGE: ポリアクリルアミド電気泳動, Ser, S: serine,

* 千葉大学医学部内科学第二講座

* Jun TASHIRO: A Study of Catalytic Function and Structure of Lipoprotein Lipase.

* 2nd Department of Internal Medicine, School of Medicine, Chiba University, Chiba 260.

Received June 15, 1994, Accepted June 20, 1994.

Asn, N: asparagine, Gly, G: glycine, LPL-S132N: Ser¹³² を Asn に置換した変異 LPL, LPL-S132G: Ser¹³² を Gly に置換した変異 LPL

I. 緒 言

リポ蛋白リパーゼ (LPL, EC 3. 1. 1. 34.) は脂肪組織、心筋や横紋筋で産生された後血管内皮細胞表面に運搬され、そこで血中 chylomicron, 超低比重リポ蛋白 (VLDL) の中性脂肪水解を行う酵素である¹⁾。水解反応により放出された脂肪酸は筋肉組織や脂肪細胞でエネルギーまたは蓄積脂肪になる²⁾。一方、リポ蛋白側は chylomicron が chylomicron remnant に、VLDL が中間比重リポ蛋白に変換される。したがって LPL は中性脂肪を中心としたエネルギー代謝およびリポ蛋白代謝上重要な役割を担う酵素である。

LPL 活性が低下すると高中性脂肪血症が招来され、高度になると急性膵炎を発症することが知られる³⁾。活性低下の原因として酵素蛋白欠損⁴⁾、自己抗体⁵⁾、補酵素であるアポ CII の欠損^{6,7)}などが知られるが、さらに酵素蛋白量は正常にありながら活性が認められない機能異常 LPL^{8,9)}の存在も明らかにされている。特に後者に属するある症例では⁹⁾、リポ蛋白界面との結合能に異常があるため活性のない LPL が見出され、それに対して基質リポ蛋白側の性状を変えることにより活性が回復し高中性脂肪血症の治療が可能であった¹⁰⁾ことが報告されている。今後さらに LPL 機能異常症例を見出し、治療法を検討するためには、まず LPL の活性発現機構を明らかにする必要があると考え、検討を行った。

ところで、リパーゼ反応は水に溶けず界面を形成した基質に対する反応であるため、活性中心の機能以外に基質が形成する界面に結合する過程が必要とされる。また膵リパーゼや肝リパーゼなどでは他に水溶性の基質である短鎖脂肪酸エステルを水解する活性 (esterase 活性) を有することが知られている¹¹⁾。この esterase 活性は、水中で界面を形成しない基質を水解する活性であるため、活性中心機能を反映すると考えられる¹²⁾。

Sarda と Desnuelle^{13,14)} はブタ膵リパーゼを用い基質 triacetine や酢酸メチルの濃度を高めていくとミセルを形成する濃度で急峻に水解活性が増加したことから、基質界面との結合により酵素は構造変化をおこすと考え、これを interfacial activation と呼んだ。牛ミルク LPL もリン脂質ベジクルと結合すると esterase 活性の増加がみられ、interfacial activation のためと報告されている¹²⁾。

以上を考慮し、ヒト LPL の機能モデルの1つとして

以下のごとく考え、検討することにした。すなわち LPL は脂質界面を認識し結合する界面認識部位と活性中心を別に有し、前者の機能は結合性で、後者の機能は短鎖脂肪酸エステル tributyrin 水解活性でモニターするというものである。本研究では第1に、LPL と脂質界面との結合が活性中心構造に影響を及ぼす可能性とその意義を検討した。

LPL の活性中心構造については、膵リパーゼ¹⁵⁾、胃リパーゼ¹⁶⁾や肝リパーゼ¹⁷⁾など他のリパーゼと同様に、Glycine-X-Serine-X-Glycine という配列 (GX SXG motif) をヒト LPL も持つ^{18,19)}ことから、Serine が活性中心として重要と考えられている²⁰⁾。そこで本研究では第2に、ヒト LPL の serine (Ser, S)¹³² が活性発現に果たす役割を明らかにするため、Ser¹³² を他のアミノ酸に置換した変異 LPL を作製し解析した。

II. 実験材料と方法

実験材料: ヒトリポ蛋白リパーゼ (LPL) cDNA (LPL35) は Dr M. C. Schotz (Veterans Administration, Wadsworth Medical Center, Los Angeles) より供与された¹⁸⁾。COS-1 細胞は財団法人がん研究振興財団より供与された。制限酵素は宝酒造社 (Ohtsu, Japan) より購入した。HAM-F12 培地, Waymouth's MAB 87/3 培地, 牛胎児血清および G-418 は Gibco 社 (Grand Island, NY, USA) より購入した。Methionine 非含有 minimum essential medium (MEM) は日本水産 (Tokyo, Japan) より購入した。Heparin-Sepharose, Sepharose 4B と Protein A Sepharose は Pharmacia 社 (Uppsala, Sweden) より購入した。Triolein, tributyrin, 牛血清アルブミン (essential free fatty acid free) と trypsin inhibitor (soybean) は Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA), α -[³⁵S]dCTP, tri[¹⁴C]oleoylglycerol (112mCi/mMol) と tri[¹⁴C]butyrylglycerol (39 mCi/mM) は New England Nuclear Research Products (Boston, MA, USA) より購入した。L-[³⁵S]Methionine (600Ci/mM) および AmplifyTM は Amersham 社 (UK) より購入した。ウサギ抗ニワトリ IgG 抗体は Cappel Laboratories (West Chester, PA, USA) より購入した。抗牛ミルク LPL 抗体は精製牛ミルク LPL²¹⁾ をニワトリに免疫して作製した。これはヒト LPL を認識するものであった²²⁾。VLDL は健常者血清から Havel

表 1. Site-directed mutagenesis の目的で作製した oligonucleotide

mutation	oligonucleotide
wild type	5'-CCATCTCTTGGGATA <u>CAG</u> TCTCTTGGGATA-3'
Ser ¹³² → Asn	5'-CCATCTCTTGGGATA <u>CAA</u> TCTCTTGGGATA-3'
Ser ¹³² → Gly	5'-CCATCTCTTGGGATA <u>CGG</u> TCTCTTGGGATA-3'

ら²³⁾の方法を用いて調製した。

LPL の発現と精製: LPL は、ヒト LPL cDNA を CHO 細胞または COS-1 細胞に発現させ、培養液中に分泌されたものを精製して用いた。発現 vector は pKCR²⁴⁾を用いた。CHO 細胞への transfection は plasmid DNA 10 μ g と選択 vector pSV₂ neo 1 μ g を用いてリン酸カルシウム沈殿法²⁵⁾により行った。LPL 産生株は G-418 の耐性株を指標として選択した。COS-1 細胞に対する transfection は DEAE-dextran 法²⁶⁾を用いた。

LPL の精製は選択株の培養液を heparin-Sepharose 4B と 4°C 12時間 incubation し、gel を 0.4M NaCl/20mM Tris-HCl (pH 7.4) にて洗浄後、1.6M NaCl/20mM Tris-HCl (pH 7.4) により溶出させて行った²¹⁾。

LPL の immunoprecipitation および SDS-polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE): Transfection を行った CHO 細胞を 10⁶ cells/60mm dish で 24時間培養し、さらに methionine free MEM 培地で 30時間培養した後 [³⁵S] methionine (180 μ Ci/dish) を添加した。添加 2 時間後の培養液にニワトリ抗牛ミルク LPL 抗体、ウサギ抗ニワトリ IgG 抗体次いで Protein A Sepharose を加え、[³⁵S] methionine でラベルされた蛋白を沈降させた。この沈降蛋白を SDS (10%)-PAGE を行い泳動度を検討した。詳細は Masuno ら²⁷⁾の方法に準じた。

LPL 活性の測定: LPL の lipase 活性は triolein (trioleoylglycerol) を基質として水解能を測定することにより求めた⁹⁾。反応液は tri[1-¹⁴C]oleoylglycerol, (0.033 μ Ci), triolein (330 μ g), 0.02% Triton X-100 2%牛アルブミン, 0.1M Tris-HCl (pH 8.4) を含有し、酵素として培養液または精製 LPL と正常血清 25 μ l を加え総量 250 μ l とした。37°C で 60 分間 incubation した後、遊離した [¹⁴C]oleic acid を Belfrage と Vaughan²⁸⁾の方法で抽出分離し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定し、水解活性を算出した。

LPL の esterase 活性は, tributyrin (tributyrilglycerol) を基質として水解能を測定することにより求め

た⁹⁾。反応液は tri[1-¹⁴C]butyrylglycerol (0.025 μ Ci), tributyrin (1.0mM), 1%牛アルブミン, 0.1M Tris-HCl (pH 8.0) に LPL を加え、総量 400 μ l とした。37°C, 60分間の条件で incubation し、水解された tri[1-¹⁴C] butyrylglycerol を Belfrage と Vaughan²⁸⁾の方法に準じて抽出し、放射活性を測定した。

LPL の trypsin 処理: LPL の trypsin による修飾のため、精製 LPL (40nM/h esterase) を trypsin (0-100 μ g/ml in 0.14M NaCl/10mM Tris-HCl (pH 7.4)) と 37°C, 10分間の条件で incubation した。これに trypsin と等量の trypsin inhibitor を加えて trypsin を失活させたのち、活性測定に用いた。

LPL と VLDL との結合能の検討: LPL と VLDL との結合能の検討は Sepharose 4B を用いたゲル濾過法により行なった⁹⁾。カラムサイズ 1×25cm の Sepharose 4B カラムを 30%グリセロール含有 0.14M NaCl/10mM Tris-HCl (pH 7.4) で平衡化した後 VLDL (2 mg/ml) または LPL (85nmol/h esterase) をアプライし、30%グリセロール・0.14M NaCl/10mM Tris-HCl (pH 7.4) で 1 cm/15分 の速度で溶出した。この検討での VLDL は 280nm での吸光度を、LPL は tributyrin 水解活性を指標とした。

変異 LPL cDNA の作製: ヒト LPL の Ser¹³² を Asparagine (Asn, N) と glycine (Gly, G) に置換した変異 LPL cDNA の作製は Kunkel らによる site-directed mutagenesis 法²⁹⁾によった。変異のための合成 oligonucleotide は表 1 に示すごとく Ser¹³² (CGA) をコードする部分を含み、それぞれ Asn (CAA) と Gly (CGG) にコードするようにした合成 oligonucleotide を用いた。作製した変異 cDNA の塩基配列の確認は Sanger らの方法³⁰⁾によった。

LPL 酵素蛋白量の測定: LPL 酵素蛋白量は Goers らの方法³¹⁾に準じ anti-human LPL monoclonal antibody と anti-bovine milk LPL polyclonal antibody を用いた sandwich-enzyme immunoassay 法にて測定した³²⁾。

変異 LPL と VLDL との結合能の検討: LPL または変異 LPL と脂質界面との結合能を検討する目的で酵素約 10ng を VLDL (500mg/dl triglyceride in 100 μ l) と

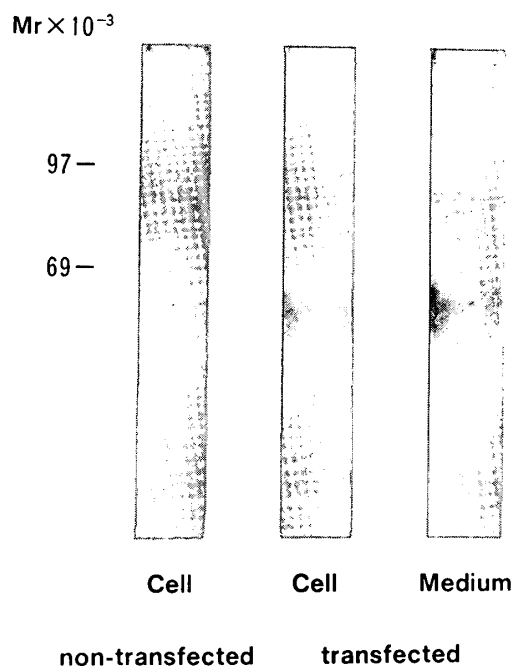


図 1. LPL cDNA を transfect した CHO 細胞培養液中の $[^{35}\text{S}]$ -methionine-LPL の SDS-PAGE 所見

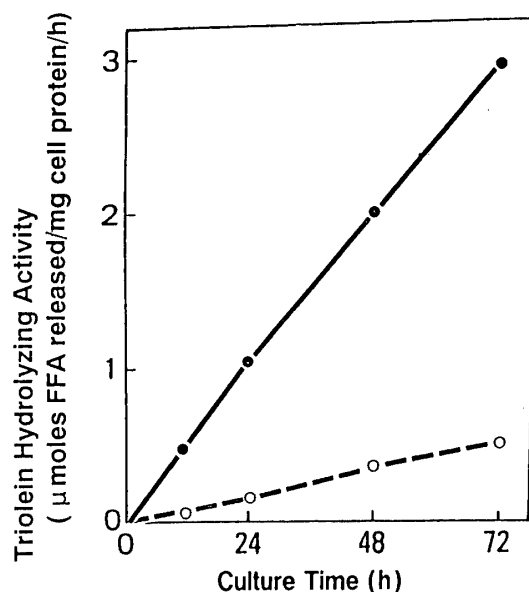


図 2. LPL cDNA を transfect した CHO 細胞培養液中の triolein および tributyrin 水解活性 (○, 血清未添加時; ●, 血清添加時)

37°C で 10 分間 incubation し, 500 μl の 0.14M NaCl/10mM Tris-HCl (pH 7.4) を留置したのち 10°C, 150,000 $\times g$ で 8 時間超遠心し, 下層の LPL 蛋白量を測定した。当初の LPL 蛋白量との差を VLDL と結合した LPL 蛋白量とした³³⁾。

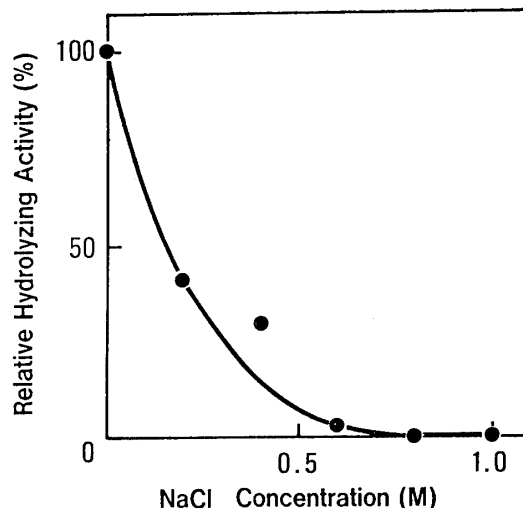


図 3. ヒト LPL cDNA を transfect した CHO 細胞培養液中のリパーゼ活性に及ぼす NaCl の濃度効果

III. 結 果

$[^{35}\text{S}]$ -methionine-LPL の SDS-PAGE 所見 (図 1): ヒト LPL cDNA を transfect した CHO 細胞に $[^{35}\text{S}]$ -methionine を加え 2 時間の incubation 後, 培養液を採取し抗 LPL 抗体, ウサギ抗ニワトリ IgG 抗体ついで Protein A-Sepharose を順に反応させ沈降物を作製した。この沈降物の SDS-PAGE を行くと, 分子量約 58kDa の位置に radioactivity が認められた。細胞溶解液中にも同様の radioactivity が認められた。抗体の代りにコントロール血清用いた場合はこの radioactivity は認められなかった。

LPL cDNA を transfect した CHO 細胞培養液中の triolein および tributyrin 水解活性: ヒト LPL cDNA を transfect した CHO 細胞培養液中には血清の添加により上昇する triolein 水解活性が認められ, 経時的に増加がみられた (図 2)。活性は pH 8.0 で最大活性を示し (データ省略), 1 M NaCl で完全に抑制された (図 3)。またこの活性はニワトリ抗牛ミルク LPL 抗体を添加すると抑制された (データ省略)。これらからこの triolein 水解活性を持つ酵素は LPL であると考えられた。この培養液を heparin-Sepharose と incubation すると, triolein 水解活性は結合し, 1.6M NaCl で溶出が認められた。この画分には triolein 水解活性と一定比率で tributyrin 水解活性が検出された (図 4 A)。さらに Sepharose 4 B column を用いて column chromatography を行っても両活性は同一画分に一定の比率で溶出された (図 4 B)。以上から両活性は同一酵素によると考えられた。

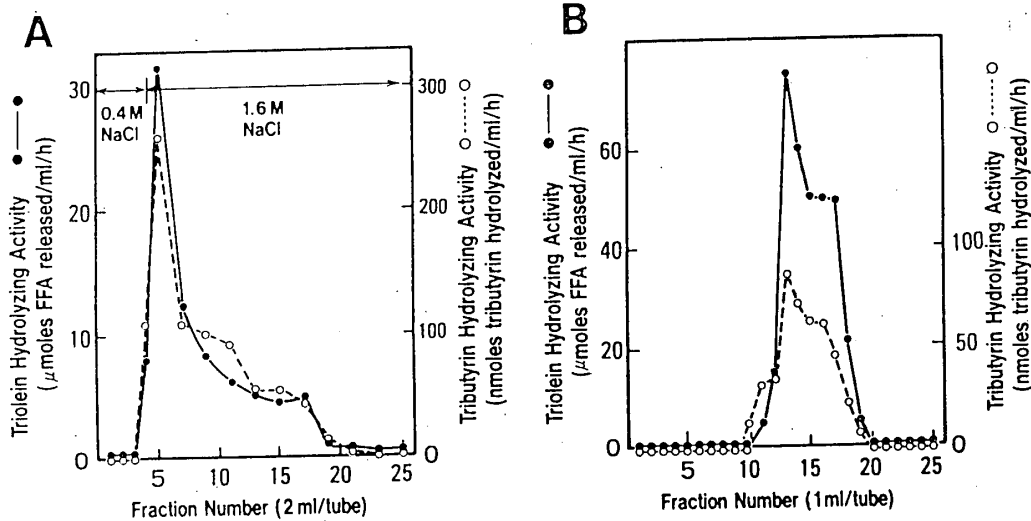


図 4. Transfect した CHO 細胞培養液と incubation した heparin-Sepharose の 0.4M NaCl および 1.6M NaCl により溶出された各フラクションの triolein 水解活性および tributyrin 水解活性 (A)。LPL 画分の Sepharose 4B column を用いた column chromatography による各フラクションの triolein 水解活性および tributyrin 水解活性 (B)。

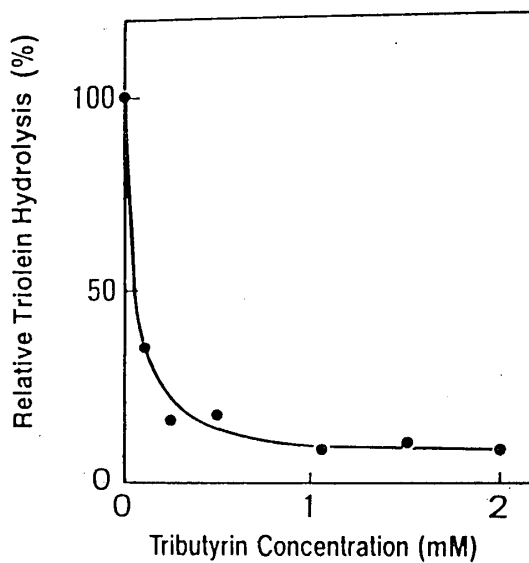


図 5. LPL の triolein 水解活性に対する tributyrin の添加効果

LPL の triolein 水解活性に対する tributyrin の添加効果 (図 5): LPL 発現細胞培養液から精製された LPL の triolein 水解活性は tributyrin を加えると濃度依存性に低下し, 1 mM tributyrin 添加では 92% の抑制が認められた。

LPL の tributyrin 水解活性に対する triolein emulsion の添加効果 (図 6): 上述の検討とは逆に LPL の tributyrin 水解活性に対する triolein の添加効果を検討した。Tributyrin 水解反応後に Triton X-100 で乳化した triolein を添加すると, 添加量に依存して tri-

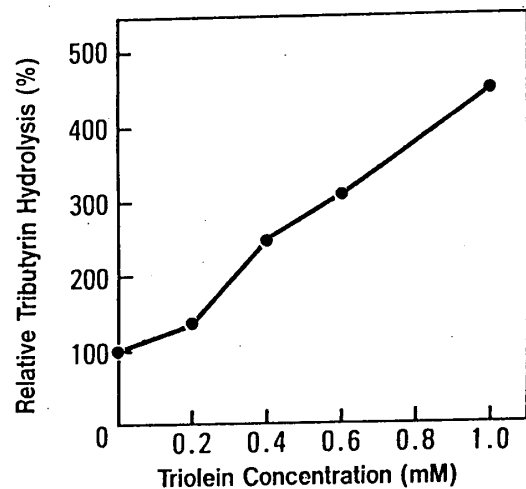


図 6. LPL の tributyrin 水解活性に対する triolein emulsion の添加効果

butyrin 水解活性の増加がみられた。Triolein 1 mM では 4.5 倍の活性であった。

LPL の triolein 水解活性と tributyrin 水解活性に及ぼす trypsin 処理の影響 (図 7): LPL 蛋白を trypsin 処理し, その水解活性を測定した。Trypsin 50 μ g/dl で triolein 水解活性は 90% 低下し, 100 μ g/ml では完全に抑制された。この時, trypsin 処理 LPL の tributyrin 水解活性は trypsin 100 μ g/ml の条件でも保持され, 70% 残存していた。また, trypsin 処理 LPL の VLDL にラベルされた triolein⁹⁾ に対する水解活性も抑制がみられ, 100 μ g/ml では完全に抑制された (データ省略)。

Trypsin 処理 LPL の tributyrin 水解活性に及ぼす triolein emulsion の添加効果 (図 8): Trypsin 処理

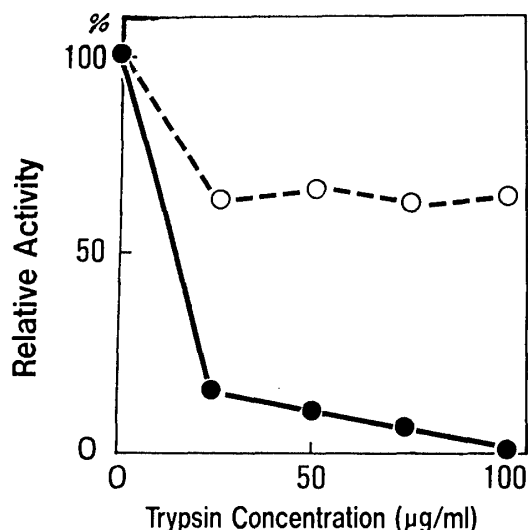


図 7. LPL の triolein 水解活性 (○) と tributyrin 水解活性 (●) に及ぼす trypsin 処理の影響

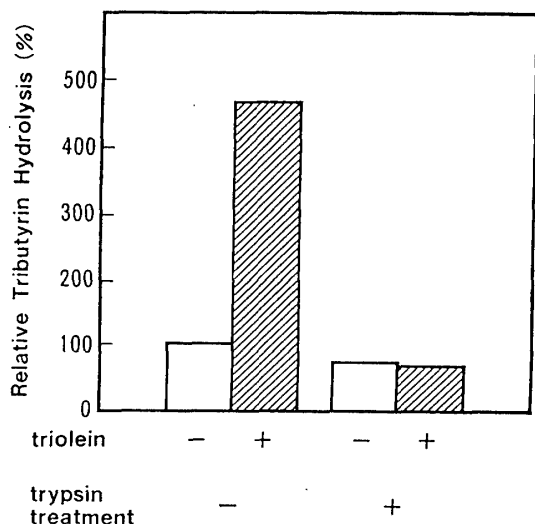


図 8. Trypsin 処理 LPL の tributyrin 水解活性に及ぼす triolein emulsion の添加効果

(100 μ g/ml) した LPL について triolein emulsion 添加による tributyrin 水解活性上昇作用を検討した。Tributyrin 水解反応液に 1 mM triolein emulsion を加えても未処理 LPL でみられた tributyrin 水解活性上昇は認められなかった。

Trypsin 処理または未処理 LPL と VLDL との結合能 (図 9): Trypsin 処理 LPL と VLDL との結合を Sepharose 4 B gel filtration により検討した。LPL を Sepharose 4 B カラムで溶出させた時, tributyrin 水解活性は第13フラクションに溶出された。また VLDL を単独で溶出させると第6, 7フラクションに認められた (A)。LPL と VLDL を 37°C, 10分間 preincubation した後に Sepharose 4 B カラムで溶出させると, tributyrin 水解活性画分と吸光度 280nm のピーク

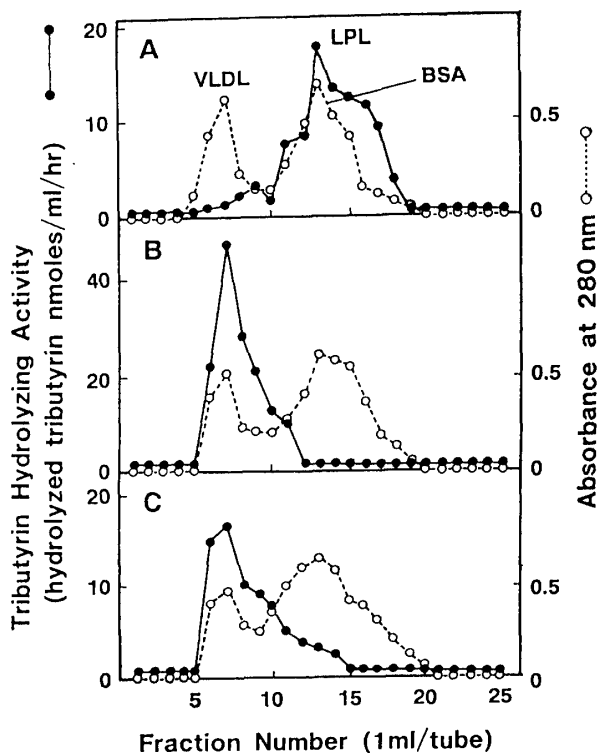


図 9. Trypsin 処理または未処理 LPL と VLDL の Sepharose 4 B gel filtration (A) VLDL, LPL を単独で溶出した時の溶出プロファイル, (B) 未処理 LPL と VLDL を incubation した後に apply したときの溶出プロファイル, (C) Trypsin 処理 LPL と VLDL を incubation した後に apply したときの溶出プロファイル

は共に第6, 7フラクションに認められた (B)。一方, trypsin 処理した LPL を VLDL と同様の条件を preincubation した後に Sepharose 4 B カラムで溶出させると tributyrin 水解活性のピークは第13フラクションに認められた (C)。以上から trypsin 処理 LPL は未処理 LPL と同様, VLDL との結合能を保持したことが判った。

Site-directed mutagenesis 法により作製した変異 LPL cDNA の塩基配列: LPL の Ser¹³² を Asn と Gly に置換した変異 LPL cDNA の塩基配列を確認した成績を図10に示す。変異 cDNA の該当コドンの塩基配列は wild type の LPL cDNA の CGA に対して, Asn への変異 LPL (LPL-S132N) cDNA では CAA, Glycine への変異 LPL (LPL-S132G) cDNA では CGG であることが確認された。

Wild type および変異 LPL cDNA を transfect した COS-1 細胞培養液中の LPL 蛋白量 (図11): Wild type LPL cDNA を transfect した COS-1 細胞培養液中の LPL 蛋白濃度は 2.8 μ g/ml であった。LPL-S

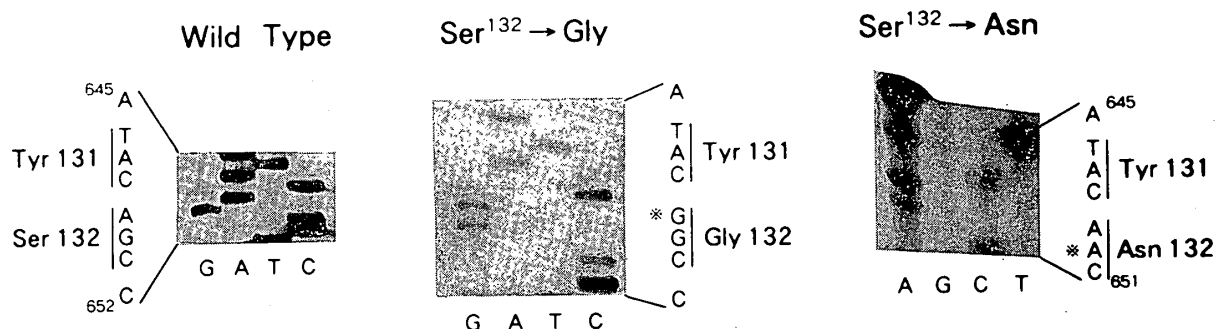


図 10. Site-directed mutagenesis 法により作製した変異 LPL cDNA の Ser¹³² を含む部位の塩基配列

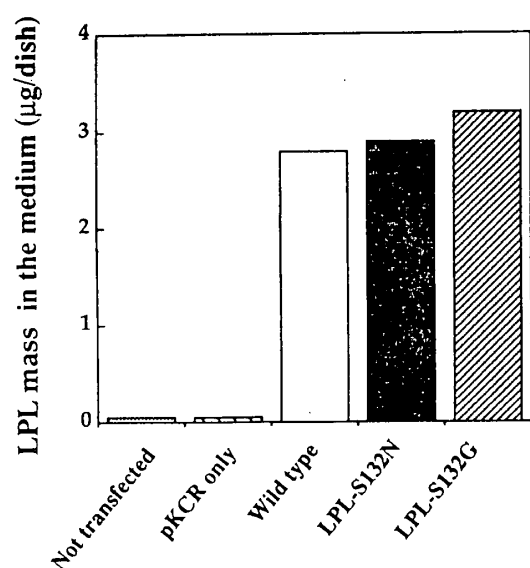


図 11. Wild type および変異 LPL cDNA を transfect した COS-1 細胞培養液中の LPL 蛋白量

132N cDNA を transfect した細胞培養液では $2.9\mu\text{g/ml}$, LPL-S132G cDNA を transfect した細胞培養液では $3.2\mu\text{g/ml}$ であった。Transfection を行わなかった細胞と発現 vector pKCR のみを transfect した細胞では共に $0.1\mu\text{g/ml}$ であった。

Wild type および LPL cDNA を transfect した COS-1 細胞培養液の triolein 水解活性 (図12): Wild-type LPL cDNA を transfect した COS-1 細胞培養液の triolein 水解活性は, wild type では $25.8 \pm 1.4 \mu\text{M FFA released/dish/hour}$ (比活性 $9.2 \pm 0.5 \text{ nM}/\mu\text{g/hour}$) であった。LPL-S132N cDNA を用いた場合 $0.3 \pm 0.2 \mu\text{M/dish/hour}$ ($0.1 \pm 0.1 \text{ nM}/\mu\text{g/hour}$) であった。LPL-S132G cDNA を用いた場合 $38.4 \pm 2.6 \mu\text{M/dish/hour}$ ($12.0 \pm 0.8 \text{ nM}/\mu\text{g/hour}$) であった。Transfection を行わなかった細胞では $0.2 \pm 0.2 \mu\text{M/dish/hour}$, pKCR のみを transfect した細胞は $0.2 \pm 0.2 \mu\text{M/dish/hour}$ であった。

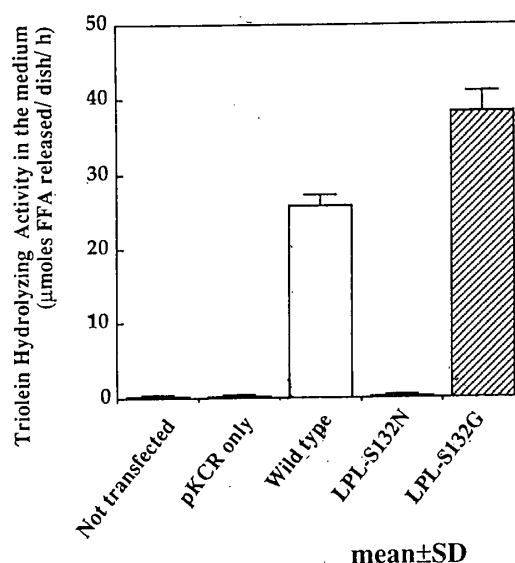


図 12. Wild type または変異 LPL cDNA を transfect した COS-1 細胞培養液の triolein 水解活性

Wild type および変異 LPL cDNA を transfect した COS-1 細胞培養液の tributyrin 水解活性 (図 13): Wild type LPL cDNA を transfect した COS-1 細胞の培養液中の tributyrin 水解活性は $308 \pm 16.8 \text{ nM tributyrin hydrolyzed/dish/hour}$ ($110 \pm 6 \text{ nM tributyrin hydrolyzed}/\mu\text{g/hour}$) であった。LPL-S132N cDNA を用いた場合 $9 \pm 6 \text{ nM tributyrin hydrolyzed/dish/hour}$ ($3 \pm 2 \text{ nM}/\mu\text{g/hour}$), LPL-S132G cDNA を用いた場合は $390 \pm 38 \text{ nM tributyrin hydrolyzed/dish/hour}$ ($122 \pm 12 \text{ nM}/\mu\text{g/hour}$) であった。

Wild type LPL および LPL-S132N の VLDL に対する結合能 (表 2): Wild type LPL 9.56 ng/tube を VLDL と incubation し, 0.14 M NaCl 重層, 超遠心後に得られた VLDL に結合した LPL 蛋白は 5.57 ng であった。LPL-S132N 10.00 ng を用いたとき, 結合した LPL 蛋白は 6.52 ng と wild type LPL と同等であった。

Wild type および変異 LPL の tributyrin 水解活性

における基質の濃度効果 (scatchard analysis) : LPL-S132G と wild type LPL の tributyrin 水解活性におよぼす基質濃度の影響について検討した成績を図 14A に

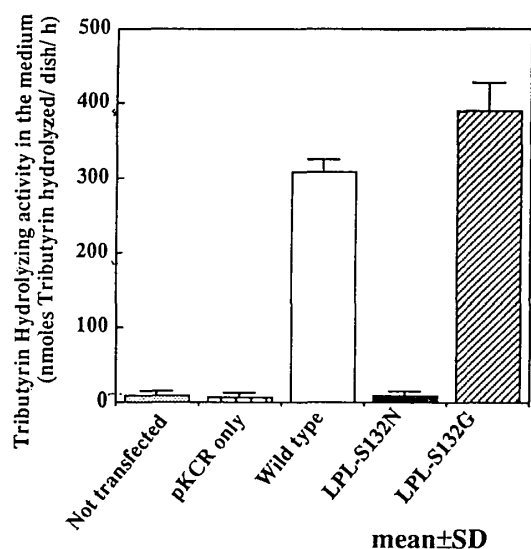


図 13. Wild type または変異 LPL cDNA を transfect した COS-1 細胞培養液の tributyrin 水解活性

表 2. Wild type LPL および LPL-S132N と VLDL との結合能の検討

	Wild type LPL	LPL-S132N
総蛋白	9.56	10.00
下層 LPL	3.99	3.48
結合 LPL	5.57	6.52

(ng/tube)

示す。この成績に基づく Lineweaver-Burk plot を行った成績を図 14B に示す。Tributyrin 水解に対する V_{max} は wild type LPL で 127nM tributyrin hydrolyzed/ μ g/hour, LPL-S132G では 164nM tributyrin hydrolyzed/ μ g/hour であった。また K_m は wild type LPL で 0.31mM, LPL-S132G では 0.20mM であった。

IV. 考 察

リパーゼ反応は、水に溶けた酵素が水に不溶の中性脂肪を加水分解する異相間反応である。すなわち、中性脂肪は血中では両親媒性のリン脂質やアポリポ蛋白で覆われて水相と分離されるため、水相のリパーゼが基質界面に結合したのちに反応が行われる。そこでリパーゼ反応では酵素量や基質濃度以外にも、基質界面面積や酵素と基質との結合力が律速因子になる。リポ蛋白との結合能低下から活性が低下した機能異常 LPL³⁴⁾ の存在などからも、LPL も同様にリポ蛋白との結合が重要と思われる。また、リパーゼには基質界面との結合後、酵素蛋白自身が構造変換をおこす過程が知られており interfacial activation と呼ばれている^{13,14)}。今回、ヒト LPL における interfacial activation の存在とその意義、及び活性中心に関わるアミノ酸配列について検討した。

ところで、ヒト LPL の研究は今までヘパリン静注後血漿から精製された LPL が用いられてきた。しかし血清中には LPL 以外に esterase 活性をもつコリンエステラーゼが多量に存在する。その混入が LPL の esterase 活性の検討に支障をきたすと考え、ヒト LPL cDNA から発現された酵素標品を用いることにした。ヒト

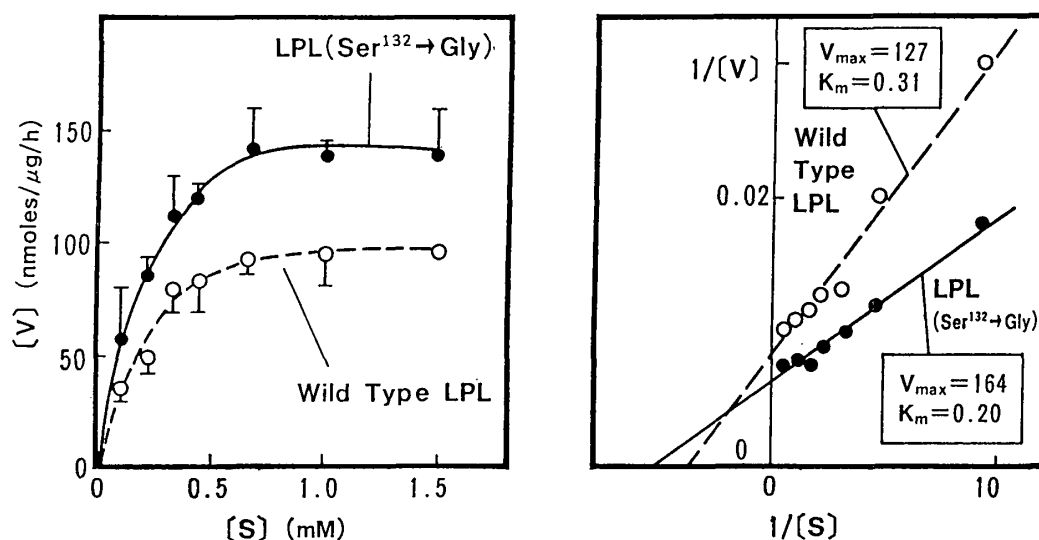


図 14. Wild type または変異 LPL の tributyrin 水解活性における基質濃度効果 (A) および Lineweaver-Burk plot (B)

LPL cDNA を transfect した CHO 細胞の培養液および細胞中には抗 LPL 抗体に特異的に反応する蛋白が認められ、SDS-PAGE 上 58kDa の位置に泳動された³⁵⁾。この蛋白には triolein 水解活性が認められ、この活性が LPL の性質³⁶⁾をもつことを確認された。そこで本酵素標品を用いて以下の検討を行った。

Heparin-Sepharose と Sepharose 4 B column chromatography を用いて得られた LPL 画分には水溶性短鎖脂肪酸エステル tributyrin 水解活性を認めた。そこで LPL は他のリパーゼと同様に疎水性基質水解活性以外に水溶性基質の短鎖脂肪酸エステル水解活性を有することが確認された。この LPL の triolein 水解に対する tributyrin 添加効果を検討すると、低下がみられた。このことは LPL の triolein と tributyrin のエステル結合水解が共通の活性中心によることを示唆すると思われた。

このような性質を考慮し LPL の機能モデルは次の様なものと考えた。すなわち脂質界面認識部位と活性中心からなり、後者の機能は短鎖脂肪酸エステル水解活性でモニターできるものである。以下この機能モデルに基づき、検討することにした。

まず LPL が基質界面と結合後に interfacial activation がおこる可能性とその意義を検討した。LPL の tributyrin 水解反応液に triolein emulsion を添加すると、活性増加がみられた。このことは LPL が脂質界面と結合すると活性中心機能が亢進する過程と解釈され、前述の interfacial activation に相当することが考えられた。その機構として、隠れていた活性中心が構造変化により酵素の表面に現われた可能性、あるいは tributyrin が脂質界面で濃縮されたことにより水解活性が高まった可能性があげられる。しかし牛ミルク LPL の esterase 活性に対する種々のリン脂質ベジクルの作用を比較した成績では、活性上昇率と基質の局所濃度の増加率とは相関しないこと¹²⁾ことから前者の活性中心の構造変化による可能性が考えられた。

次に、この interfacial activation が LPL 反応に必須の過程であるかにつき、trypsin 処理による蛋白修飾を行い検討した。Trypsin 処理により LPL の tributyrin 水解活性は保持されたが、triolein 水解活性は失われた。この成績を先に述べた酵素機能モデルにしたがい解釈すると、LPL の界面認識機能と活性中心機能と活性中心機能は別の構造に依存し、trypsin は活性中心を障害しないが、脂質界面結合能あるいは以後の機能部位に作用した可能性が考えられる。ゲル濾過法による結合能の検討では、trypsin 処理 LPL の界面への結合能は保

持された。したがって、リパーゼ活性の消失は interfacial activation の障害による可能性が考えられた。そこで、trypsin 処理 LPL の tributyrin 水解系に対する triolein emulsion の添加効果を検討すると、活性上昇がみられなかったことから interfacial activation が障害を受けたと解釈された。

Trypsin の作用部位を考えると、近年明らかになった以下の点から、リパーゼのもつ disulfide bond に挟まれたループ構造が interfacial activation に関与することが考えられる。すなわち牛ミルク LPL で明らかになった trypsin 感受性部位³⁷⁾とリパーゼの相同性に基いて考えると、ヒト LPL では arginine²³⁰-glycine²³¹ と推定される。豚リパーゼの X 線解析³⁸⁾から、この部位は Ser¹⁵³-Asn¹⁷⁷-histidine²⁵⁴ により形成される serine protease の catalytic triad^{39,40)} に類似した構造を覆うループの一部に相当する⁴¹⁾。また、阻害剤やリン脂質を Rhizomucor miehei lipase やヒト豚リパーゼに作用させるとループの移動と catalytic triad が酵素表面に現われる構造変化が X 線解析観察された^{42,43)}。さらにヒト LPL のループを構成すると考えられる 22 個のアミノ酸を除くと、triolein 水解活性は失われたが tributyrin 水解活性は残存したことから、このループが活性中心機能以外のリパーゼ活性発現に必要な構造であると報告されている⁴¹⁾。これらを考慮すると、trypsin によりループが破壊され、酵素と基質が結合した後活性中心を酵素表面に誘導する過程が障害されたため、リパーゼ活性が失われたと考えられた。

以上をまとめると、LPL の interfacial activation は、酵素が脂質界面と結合した後に活性中心が表面に現われる構造変化と考えられた。そして、trypsin 処理 LPL は基質界面に結合するものの interfacial activation がおこらないため triolein 水解活性が失われたことから、interfacial activation が LPL 反応に必須と考えられた。以上の結果は今後高中性脂肪血症の成因として interfacial activation が異常である LPL の可能性を考慮する必要があることを示唆し、さらにその異常部位の推定に役立つ成績と思われた。

次いで LPL の活性中心機能に関わるアミノ酸配列を検討した。リパーゼの活性中心は、前述の X 線解析以前から活性阻害剤の添加や、他のリパーゼの 1 次構造との比較により検討されてきた。活性阻害剤が豚リパーゼの Ser¹⁵³ に結合することから活性中心とした報告^{44,45)}がある。また、リパーゼの 1 次構造が次々と明らかにされ、GX SXG motif を共通にもつことが指摘された^{19,20)}が、この Ser に阻害剤が結合すること、さらに X 線解析で

見出された catalytic triad⁴⁰⁾ を構成する Ser もこれに一致することから、リパーゼでは Ser¹⁵³ が活性中心と推測されるようになった。しかしリパーゼ活性が阻害されても短鎖脂肪酸エステル水解活性が保持されたとしてこの Ser を脂質結合部位と位置づけた報告⁴⁶⁾もある。そこでこの Ser に相当するヒト LPL の Ser¹³² が活性中心の機能に及ぼす意義を明らかにする目的でこの Ser を Asn と Gly に置換させた変異酵素を作製し、その性質を解析した。

Wild type LPL cDNA を transfect した COS-1 細胞培養液中の LPL 蛋白濃度と変異 LPL cDNA を transfect した細胞培養液中の LPL 蛋白濃度は同等であり、このアミノ酸の置換は酵素蛋白の発現、分泌に影響しないと思われた。次いで LPL-S132N の性質をみると、wild type LPL が triolein 水解活性を持つのに対して、LPL-S132N では triolein 水解活性を認めなかった。また tributyrin 水解活性も認めなかった。Tributyrin 水解活性が活性中心機能を反映するとの考えにたてば、LPL-S132N は活性中心機能が障害されたと考えられる。この LPL は VLDL との結合能を有したことから、Ser¹³² がリポ蛋白との結合には関与しないと推測された。Faustinella ら⁴⁷⁾はヒト LPL のすべての Ser 残基の中で Ser¹³² の置換のみがリパーゼ活性を失うことから、活性に重要な部位であることを報告したが、Ser¹³² が esterase 活性すなわち活性中心機能に重要であることが今回の検討により明らかになった。肝リパーゼの同様の検討⁴⁸⁾でも Ser が活性中心として重要と報告されており、各リパーゼの相同性の高い構造が共通の機能を担う可能性を示唆すると思われた。

一方 LPL-S132G は esterase 活性、lipase 活性が共に認められた。この変異 LPL の活性中心の機能を検討する目的で esterase 活性の kinetics を検討すると、Km は特に変化ないが V max が高まったことから、活性中心機能が wild type LPL と異なる可能性が考えられた。エステル結合水解は Ser の水酸基が nucleophilic reaction を行うことが推測されている³⁹⁾が、水酸基を失ったこの変異により esterase 活性が残存した詳細は不明である。Ras^H 蛋白の Mg²⁺ 結合ドメインが置換によって機能が残存したとの報告⁴⁹⁾があるが、この変異は水酸基を保持した Ser から threonine への置換であることや LPL の機能部位とは全く異なった機能を担うことから、同様の機序によるかは不明である。3次構造上の変化から他のアミノ酸が Ser¹³² の役割を担った可能性なども推測されるが、明らかではない。この変異における活性中心の変化は今後詳細に検討すべきと考えられる。

近年相次いで LPL 欠損症の遺伝子解析の成績が報告されている⁵⁰⁻⁵⁵⁾。その中には LPL 酵素蛋白が認められながら活性のない機能異常 LPL⁵⁵⁾ や、活性が回復し得た LPL を有した症例³⁴⁾も報告されている。そこで、治療法を探るうえでも機能異常の解析の意義があると思われる。今後 interfacial activation の異常も検討されなければならない。また遺伝子解析上アミノ酸配列異常があっても、機能異常と即断せず発現実験を行い活性を確認すべきと考えられた。

V. おわりに

今後、これらの成績をもとに活性発現機構を解析しうる LPL 異常症が見出され、特異的な治療法が確立されることが期待される。また、生体内の不溶性基質はリパーゼの基質以外にも多くあり、様々な病態と関わっている。今回得られた成績は、それらに対する反応機構においても酵素の基質界面認識過程と構造変換過程が病態形成に関わる可能性を示唆するものであり、この観点に基づいた病態解明と治療法開発が期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり御指導いただきました恩師吉田 尚教授に深謝致します。本研究を行なうにあたり終始御指導を賜った千葉大学医学部内科第2講座斎藤康博士(現山形大学)、白井厚治博士(現東邦大学)、更に多大な御援助を頂いた千葉大学第2内科脂質代謝研究室の諸先生方に心から感謝申し上げます。なお本論文は学位審査論文である。

Summary

We studied the catalytic process of lipoprotein lipase (LPL) and the structure which affects the catalytic activity of LPL. LPL was expressed in CHO cells transfected with human LPL cDNA. The LPL retained tributyrin, water-soluble substrate, hydrolyzing activity (esterase activity). The catalytic action of LPL was studied by monitoring the esterase activity. The esterase activity was enhanced 4.5-fold by the addition of triolein emulsion. This process was named interfacial activation. Treatment of LPL with trypsin caused the loss of the triolein hydrolyzing activity. The esterase activity of trypsin-treated LPL was not enhanced by the addition of the triolein emulsion.

The trypsin-treated LPL retained the ability to bind to very density lipoproteins. These results are consistent with an idea that LPL has a catalytic site and a lipid interface recognition

site, and that the enzyme undergoes interfacial activation, in which the concealed catalytic site is revealed after the enzyme binds to the surface.

Based this hypothesis, the present results suggested that trypsin-nicking may impair the interfacial activation process and cause the loss of the lipase activity, and that interfacial activation may be necessary for catalytic actions of lipase.

Next, for studying the role of Ser (S)¹⁸² in the putative catalytic site of human LPL, mutant LPL cDNA expressing LPLs with amino acid substitution of Asn (N) or Gly (G) for Ser¹⁸² were obtained and were expressed in COS-1 cells. Considerable amounts of LPL enzyme protein mass were detected in the culture medium of the COS-1 cells transfected with wild type LPL, LPL-S132N or LPL-S132G. LPL-S132N showed no activity against triolein or tributyrin, whereas the mutant LPL bound to very low density lipoproteins as effectively as wild type LPL. The result indicated that Ser¹⁸² is important for the catalytic activity of human LPL, but not for binding to lipid interface. Whereas, LPL-S132G hydrolyzed triolein and tributyrin, indicating that the Ser¹⁸² is contained in the structure of which the substitution of glycine for Ser¹⁸² can retain the catalytic activity of LPL.

文 献

- 1) Garfinkel AS and Schotz MC: Lipoprotein lipase. In: Plasma Lipoproteins, Gotto Jr AM, ed, pp. 334-357, Elsevier Science Publishers, New York, 1987.
- 2) Brunzell JD: Familial lipoprotein lipase deficiency and other causes of chylomicronemia syndrome. In: The Metabolic Basis of Inherited Disease, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS and Valle D, ed, 6th ed, pp. 1165-1180, McGraw-Hill, New York, 1989.
- 3) Havel RJ, Kane JP and Kashyap ML: Interchange of apolipoprotein between chylomicron and high density lipoproteins during alimentary lipemia in man. J Clin Invest 52: 32-38, 1973.
- 4) Kesaniemi YA and Grundy SM: Dual defect in metabolism of very low density lipoprotein triglyceride. JAMA, 251: 2542-2547, 1984.
- 5) Kihara S, Matsuzawa Y, Kubo M, Nozaki S, Funahashi T, Yamashita S, Shio N and Tarui S: Autoimmune Hyperchylomicronemia. New Eng J Med 320: 1255-1259, 1989.
- 6) Breckenridge WC, Little JA, Steiner G, Chow A and Poapst M: Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein CII. New Eng J Med 298: 1264-1273, 1978.
- 7) Inadera H, Hibino A, Kobayashi J, Kanzaki T, Shirai K, Saito Y and Yoshida S: A missense mutation (Trp²⁸→Arg) in exon 3 of the apolipoprotein CII gene in a patient with apolipoprotein CII deficiency (apo CII-Wakayama). Biochem Biophys Res Commun 193: 1174-1183, 1993.
- 8) 平良真人, 白井厚治, 森崎信尋, 斎藤 康, 熊谷 朗, 松岡信夫, 上村重明: ヘパリン静注後血漿リパーゼとカイロミクロンとの反応異常が見られた高中性脂肪血症の一例. 日本内科学会雑誌, 72: 796-802, 1983.
- 9) Kobayashi J, Shirai K, Saito Y and Yoshida S: Lipoprotein-lipase with a defect in lipid interface recognition in a case with type I hyperlipidaemia. Eur. J Clin Invest 19: 424-432, 1989.
- 10) Shirai K, Kobayashi J, Inadera H, Ohkubo Y, Mori S, Saito Y and Yoshida S: Type I hyperlipoproteinemia caused by lipoprotein lipase defect in lipid-interface recognition was relieved by administration of medium-chain triglyceride. Metabolism 41: 1161-1164, 1992.
- 11) Rapp D and Olivecrona T: Kinetics of milk lipoprotein lipase. Studies with tributyrin. Eur J Biochem 91: 379-385, 1978.
- 12) Shirai K and Jackson RL: Lipoprotein lipase-catalyzed hydrolysis of *p*-nitrophenyl butyrate. Interfacial activation by phospholipid vesicles. J Biol Chem 257: 1253-1258, 1982.
- 13) Sarda L and Desnuelle P: Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. Biochim Biophys Acta 30: 513-521, 1958.
- 14) Benzonana G and Desnuelle P: Etude cinétique de l'action de la lipase pancréatique sur des triglycérides en émulsion: essai d'une enzymologie en milieu hétérogène. Biochim Biophys Acta 105: 121-136, 1965.
- 15) De Caro J, Boudouard M, Bonicel J, Guidoni A, Desnuelle P and Rivery M: Porcine pancreatic lipase. Completion of the primary structure. Biochim Biophys Acta 671: 129-138, 1981.
- 16) Bodmer MW, Angal S, Yarranton GT, Harris TJR, Lyons A, King DJ, Pieroni G, Riviere C, Verger R and Lowe PA: Molecular cloning of a human gastric lipase and expression of the enzyme in yeast. Biochim Biophys Acta 909: 237-244, 1987.
- 17) Martin GA, Busch SJ, Meredith GD, Cardin AD, Blankenship DT, Mao SJT, Rechtein AE, Woods CW, Racke MM, Schafer

- MP, Fitzgerald MC, Burke DM, Flanagan MA and Jackson RJ: Isolation and cDNA sequence of human postheparin plasma hepatic triglyceride lipase. *J Biol Chem* **263**: 10907-10914, 1988.
- 18) Wion K, Kirchgessner TD, Lusis AJ, Schotz MC and Lawn RM: Human lipoprotein lipase complementary DNA sequence. *Science* **235**: 1638-1641, 1989.
 - 19) Persson B, Bengtsson-Olivecrona G, Enerbäck S, Olivecrona T and Joernvall H: Structural feature of lipoprotein lipase. Lipase family relationships, binding interactions, non-equivalence of lipase co-factors, vitellogenin similarities and functional subdivision of lipoprotein lipase. *Eur J Biochem* **179**: 39-45, 1989.
 - 20) Hide WA, Chan L and Li W-H: Structure and evolution of the lipase superfamily. *J Lipid Res* **33**: 167-178, 1992.
 - 21) Kinunnen PKJ: Purification of bovine milk lipoprotein lipase with the aid of detergent. *Med Biol* **55**: 187-191, 1977.
 - 22) Shirai K, Wisner DA, Johnson JD, Srivastava LS and Jackson RL: Immunological studies on bovine milk lipoprotein lipase. Effects of F_{ab} fragments on enzyme activity. *Biochim Biophys Acta* **712**: 10-20, 1982.
 - 23) Havel RJ, Eder HA and Braydon JG: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* **34**: 1343-1353, 1955.
 - 24) O'hare K, Benoist C and Breathnach R: Transformation of mouse fibroblasts to methotrexate resistance by a recombinant plasmid expressing a prokaryotic dihydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 1527, 1981.
 - 25) Chen C and Okayama H: High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* **7**: 2745-2752, 1987.
 - 26) Selden RF, Burke-Howie K, Rowe MF, Goodman HM and Moore DD: Human growth hormone as a receptor gene in regulation studies employing transient gene expression. *Mol Cell Biol* **6**: 3173-3179, 1986.
 - 27) Masuno H, Blanchette-Mackie EJ, Chernick SS and Scow RO: Synthesis of inactive nonsecretable high mannose-type lipoprotein lipase by cultured brown adipocytes of combined lipase-deficient *cld/cld* mice. *J Biol Chem* **265**: 1628-1638, 1990.
 - 28) Belfrage P and Vaughan H: Simple liquid-liquid partition system for isolation of labeled oleic acid from mixture with glycerides. *J Lipid Res*, **10**: 341-344, 1969.
 - 29) Kunkel TA, Roberts JD and Zakour RA: Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol* **154**: 367-382, 1987.
 - 30) Sanger F, Nicklen S and Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467, 1977.
 - 31) Goers JWF, Pertersen ME, Kern PA, Ong J and Schotz MC: An enzyme linked immunoassay for lipoprotein lipase. *Anal Biochem* **166**: 27-35, 1987.
 - 32) Kobayashi J, Hashimoto H, Fukamachi I, Tashiro J, Shirai K, Saito Y and Yoshida S: Lipoprotein lipase mass and activity in severe hypertriglyceridemia, *Clin Chim Acta* **216**: 113-123, 1993.
 - 33) Bengtsson G and Olivecrona T: Lipoprotein lipase: Modification of its kinetic properties by mild tryptic digestion. *Eur J Biochem* **113**: 547-554, 1981.
 - 34) 小林淳二: 機能異常リポ蛋白リパーゼ (LPL) に関する研究. *千葉医学* **69**: 63-84, 1993.
 - 35) Hernell O and Olivecrona T: Human milk lipoprotein lipase. *J Lipid Res* **15**: 367-374, 1974.
 - 36) Smith LC and Pownall HJ: Lipoprotein lipase. In: Lipases, Borgstroem B and Brockman HL, ed, pp. 263-305, Elsevier, Amsterdam, 1984.
 - 37) Yang CY, Gu ZW, Yang HX, Rohde MF, Gotto AM Jr and Pownall HJ: Structure of bovine milk lipoprotein lipase. *J Biol Chem* **264**: 16822-16827, 1989.
 - 38) Winkler FK, Darny A and Zakour RA: Structure of human pancreatic lipase. *Nature* **343**: 771-774, 1990.
 - 39) Blow DM, Birktoft JJ and Hartley BS: Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature* **221**: 337-340, 1969.
 - 40) Brady L, Brozowski AM, Derewenda ZS, Tolley S, Turkenburg JP, Christiansen L, Huge-Jensen B, Nørskov L and Menge U: A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* **343**: 767-770, 1990.
 - 41) Dugi KA, Dichek HL, Talley GD, Brewer Jr HB and Santamarina-Fojo S: Human lipoprotein lipase: The loop covering the catalytic site is essential for interaction with lipid substrates. *J Biol Chem* **267**: 25086-25091, 1992.
 - 42) Brozowski AM, Derewenda U, Derewenda

- ZS, Turkenburg JP, Bjorkling F, Høge-Jensen B, Patkar SA and Thim L: A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* **351**: 491-494, 1991.
- 43) van Tilbeurgh H, Egoloff M-P, Martinez C, Rugani N, Verger R and Cambillau C: Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature* **362**: 814-820, 1992.
- 44) Borgstroem B: Mode of action of tetrahydrolipstatin: a derivative of the naturally occurring lipase inhibitor lipstatin. *Biochim Biophys Acta* **962**: 308-316, 1988.
- 45) Hadvary P, Sidler W, Meister W, Vetter W and Wolfer H: The lipase inhibitor tetrahydrolipstatin bind covalently to the putative active site of pancreatic lipase. *J Biol Chem* **266**: 2021-2027, 1991.
- 46) Guidoni A, Benkouka F, De Caro J and Røvery M: Characterization of the serine reacting with diethyl p-nitrophenyl phosphate in porcine pancreatic lipase. *Biochim Biophys Acta* **660**: 148-150, 1981.
- 47) Faustinella F, Smith LC, Semenkovich CF and Chan L: Structural and functional roles of highly conserved serines in human lipoprotein lipase. *J Biol Chem* **257**: 1253-1258, 1991.
- 48) Davis RC, Stahnke G, Wang H, Doolittle MH, Ameis D, Will H and Schotz MC: Hepatic lipase: Site-directed mutagenesis of a serine residue important for catalytic activity. *J Biol Chem* **265**: 6291-6295, 1990.
- 49) Fransworth CL and Feig LA: Dominant inhibitory mutations in the Mg^{2+} -binding site of Ras^H prevent its activation by GTP. *Mol Cell Biol* **11**: 4822-4829, 1991.
- 50) Dichek HL, Fojo SS, Beg OU, Skarlatos SI, Brunzell JD, Culter GB and Brewer HB: Identification of two separate allelic mutations in the lipoprotein lipase gene of a patient with the familial hyperchylomicronemia. *J Biol Chem* **266**: 473-477, 1991.
- 51) Emi MD, Wilson E, Iverius PH, Wu L, Hata A, Hegele R, Williams R and Lalouel JM: Missense mutation (Gly→Glu¹⁸⁸) of human lipoprotein lipase imparting functional deficiency. *J Biol Chem* **265**: 5910-5916, 1990.
- 52) Hata A, Emi M, Luc G, Basdevant A, Gamber P, Iverius PH and Lalouel JM: Compound heterozygote for lipoprotein lipase deficiency: Ser→Thr²⁴⁴ and transition in 3'-splice site of intron 2 (AG→AA) in the lipoprotein lipase gene. *Am J Hum Genet* **47**: 107-111, 1990.
- 53) Ameis D, Kobayashi J, Davis RC, Ben-Zeev O, Malloy MJ, Kane JP, Lee G, Wong H, Havel RJ and Schotz MC: Familial chylomicronemia due to a single missense mutation in the lipoprotein lipase gene. *J Clin Invest* **87**: 1165-1170, 1991.
- 54) Gotoda T, Yamada N, Murase T, Inaba T, Ishibashi S, Shimano H, Koga S, Yazaki Y, Furuichi Y and Takaku F: Occurrence of multiple aberrantly spliced mRNA upon a donor splice site mutation that caused familial lipoprotein lipase deficiency. *J Biol Chem* **266**: 24757-24762, 1992.
- 55) Gotoda T, Yamada N, Kawamura M, Kozaki K, Mori N, Ishibashi S, Shimano H, Takaku F, Yazaki Y, Furuichi Y and Murase T: Heterogeneous mutation in the human lipoprotein lipase gene in patients with familial lipoprotein lipase deficiency. *J Clin Invest* **88**: 1856-1864, 1991.
- 56) Kobayashi J, Sasaki N, Tashiro J, Inadera H, Saito Y and Yoshida S: A missense mutation (Ala³⁸⁴→Thr) in exon 7 of the lipoprotein lipase gene in a case with type I hyperlipidemia. *Biochem Biophys Res Commun* **191**: 1046-1054, 1993.