

## [原著] 血管壁 Cholesterol ester 水解活性の研究

篠 宮 正 樹\*

(昭和59年4月27日受付)

### 要 旨

動脈硬化巣に最も多く蓄積する脂質は cholesterol ester であり, その蓄積機構には cholesterol esterase (EC 3. 1. 1. 13, 以下 CEase) が重要な役割を果たしている。ラット大動脈 homogenate を酵素液として, CEase 活性の調節機構について検討した。

放射性 cholesterol ester (cholesteryl [1-<sup>14</sup>C] oleate) とリン脂質の emulsion を基質として用いたときは, CEase 活性の至適 pH は, pH 4.5 と pH 7.5 の 2 つがみられ, 前者は主として lysosome 画分に存在しており, 後者は主として microsome 画分に, 次いで cytosol 画分 (105000×g 上清画分) に存在していた。前者を acid CEase, 後者を neutral CEase と呼ぶ。リン脂質では phosphatidylcholine が両 CEase 活性を上昇させた。Cholesteryl oleate 濃度が 12.5 μM のとき, 血清は, 血清蛋白量 0.8 mg/tube まで neutral CEase 活性を上昇させた。Cholesteryl oleate 濃度 500 μM とき血清は蛋白量 0.2 mg/tube まで neutral CEase 活性を上昇させたが, それ以上の血清の添加は逆に活性を低下させた。またリポ蛋白も neutral CEase 活性を上昇させた。

Cholesteryl [1-<sup>14</sup>C] oleate をとりこませた reconstituted LDL を作成してラット大動脈壁 homogenate と incubate したところ, pH 4.5 にのみ cholesterol ester 水解活性がみられた。アセチル化された reconstituted LDL をラット腹腔 macrophage の homogenate と incubate したときも, pH 4.5 のみに cholesterol ester 水解活性がみられた。以上のことは, LDL として動脈壁細胞にとりこまれた cholesterol ester はまず lysosome で水解されることを推測させ, さらに neutral CEase の役割は外因性にもたらされた cholesterol ester の水解ではないことを推測させる。基質のちがいで pH 7.5 の水解活性が変動することは基質の存在状態が cholesterol ester の水解に重要であることを推測させる。

次に neutral CEase の役割を探るために, ラット大動脈 homogenate の 105000×g 上清に出現する neutral CEase 活性と, microsome 画分と Triton X-100 とを incubate して可溶化されてくる neutral CEase 活性の両者を heparin-Sepharose affinity chromatography にかけてその性質を比較した。両者とも heparin-Sepharose に吸着される画分が存在したので, この吸着された画分について 105000×g 上清由来の neutral CEase 活性と, microsome から可溶化された酵素に由来する neutral CEase を比較したところ, 前者はリポ蛋白で活性が変化しなかったが, 後者はリポ蛋白によって活性が著しく上昇した。即ち両者は性質が異なっていると考えられた。

動脈硬化巣にみられる蓄積脂質と同様の組成の基質 (以下, 人工脂質球と呼ぶ) を作成して, ラット大動脈 homogenate を酵素液として cholesterol ester 水解を測定した。人工脂質球の cholesterol ester 以外の成分—リン脂質, 中性脂肪, 遊離 cholesterol—を変化させると cholesterol ester 水解活性に変動がみられ, とくにリン脂質の質と量によって大きく活性が変動した。このことから 105000×g 上清に出現する neutral CEase 活性は細胞内に lipid droplet として沈着した cholesterol ester の水解に働くかと推測しているが, microsome の neutral CEase

\* 千葉大学医学部第二内科学教室

Masaki SHINOMIYA: Cholesterol Ester Hydrolysis in Rat Arterial Wall.

Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Chiba University, Chiba 280.

Received for publication, April 27, 1984.

ase との異同についてはさらに検討する必要がある。

人工脂質球における cholesterol ester 水解がその脂質組成によって変動すること、さらに人工脂質球の作成温度、cholesterol ester/リン脂質 emulsion の作成温度によって cholesterol ester 水解活性が大きく変動することから、cholesterol ester 水解を左右する基質の存在状態のひとつには、リン脂質、cholesterol ester の相転移による状態の変化を挙げるができる。

**Keywords:** Acid cholesterol esterase, Neutral cholesterol esterase, 基質の存在状態, 人工脂質球, 相転移

**略語一覧:** CEase, Cholesterol esterase; VLDL, Very low density lipoprotein; LDL, Low density lipoprotein; HDL, High density lipoprotein; rLDL, reconstituted low density lipoprotein; ApoC-II, Apolipoprotein C-II

## 序 文

動脈硬化症は、先進国の三大死因（悪性腫瘍、脳血管障害、心血管疾患）のうち、脳血管障害と心血管疾患の2つに密接に関連している。動脈硬化症は、数十年にわたって無症状に進行して、突然発症することが多く、死の転帰をとることも少なくないので、その予防の重要性が叫ばれている。動脈硬化症の病理学的本態は、血管壁への脂質沈着と石灰化であり、血栓または出血をおこして臨床症状を現わすに至る。血管壁に沈着する脂質は cholesterol ester を主としており、cholesterol ester 沈着の機構の解明は火急の課題である。

コレステロールは細胞膜の構成成分のひとつとして、あるいはステロイドホルモンの前駆体として生体に欠くことのできない物質である。しかしその過剰な蓄積は動脈硬化症を招来してしまうことが報告されて以来<sup>1)</sup>、動脈硬化症研究の中心課題としてコレステロールの代謝が研究されてきた。動脈壁細胞内には cholesterol ester 水解酵素 (Cholesterol esterase, 以下 CEase) が存在しており、本酵素が cholesterol ester 沈着防御及び除去に重要な役割を果たしていると考えられる。CEase については、従来から種々の検討が加えられているが、その性質及び動脈硬化症における変動について、報告は必ずしも一致してはいない。その理由としては、第一に報告によって酵素源が異なること (実験動物・動脈硬化症作成条件・酵素液作成法の差異)、第二に基質が異なること (用いる cholesterol ester の脂肪酸種・基質作成法の差異)、第三に測定条件が異なること (pH・遊離した生成物の抽出法の差異など) が挙げられる。また近年は生きた細胞の中での cholesterol ester 代謝が研究されており、cholesterol ester の水解と合成を併わせた cholesterol ester 代謝が検討されている。血中では cholesterol ester は、主に低比重リポ蛋白 (Low density lipoprotein, 以下 LDL) によって運ばれている。Goldstein

らは、血中の LDL 中の cholesterol ester<sup>2)</sup> が動脈壁平滑筋細胞の LDL-receptor を介して、細胞内に取り込まれ、lysosome で水解されること及びこの過程が細胞内での cholesterol ester の合成を調節していることを報告して LDL-pathway 説を展開し、この pathway の障害によって cholesterol ester 合成過剰がおこり cholesterol ester 沈着を招くと主張した<sup>2-4)</sup>。

また、実験動物や人で、高脂血症時には全身の macrophage に脂質の沈着がみられることが報告されている<sup>5,6)</sup>。Macrophage を正常の LDL と incubate しても macrophage に cholesterol ester の蓄積はおこらないが、アセチル化した LDL と incubate すると LDL は macrophage にとり込まれ、同時に cholesterol の ester 化が亢進して多量の cholesterol ester が蓄積したことが報告され<sup>7,8)</sup>、変性した LDL と macrophage の関連が研究されている<sup>9-14)</sup>。

そこで今回、cholesterol ester 水解の機構を研究することによって、動脈壁における cholesterol ester 代謝の機構を明らかにし、蓄積した cholesterol ester が水解され得るか否かについて検討することにした。

まずラット大動脈 homogenate を酵素液として① cholesteryl oleate とリン脂質 (phosphatidylcholine) の emulsion と、② LDL にとりこまれた cholesterol ester を用いて水解の様子を観察した。次にラット大動脈 homogenate の 5500×g 上清 (post-mitochondrial fraction) を 105000×g, 60分遠心して、上清画分 (顆粒画分—lysosome 画分及び microsome 画分) を TritonX-100 と incubate して可溶化されてくる neutral CEase 活性の両者を heparin-Sepharose affinity chromatography にかけて、両者の性質を検討した。動脈硬化巣における cholesterol ester は、他の脂質—リン脂質、中性脂肪、遊離 cholesterol 一などととも脂質球として存在し、その脂質組成も動脈硬化の進展とともに変化することが素らによ

Table 1. Lipid composition of lipid droplets in fatty streaks and fibrous plaques.

	Fatty Streaks	Fibrous Plaques
Cholesterol ester	82.1±10.5 <sup>a</sup>	60.8±12.6
Free cholesterol	4.9± 3.1	13.0± 5.0
Triglyceride	4.3± 2.4	10.4± 8.3
Phospholipids	8.7± 5.9	15.8± 6.0
Phosphatidylethanolamine	1.2±0.5	1.3±0.7
Phosphatidylcholine	4.6±0.7	5.2±1.2
Sphingomyelin	2.2±0.5	3.8±1.5
Lysophosphatidylcholine	0.7±0.5	1.5±0.8

a. weight % (mean±S.D.)

て報告されている<sup>15)</sup>。動脈硬化の初期段階である fatty streak 及び、それより進んだ段階である fibrous plaque における脂質球の組成を Table 1 に示す<sup>16)</sup>。脂質球と同じ脂質組成をもつ基質（以下人工脂質球と呼ぶ）を作成してラット大動脈 homogenate を酵素液として、cholesterol ester 水解の様子を観察しどのような cholesterol ester の存在状態が水解活性に重要であるかについて検討した。

### 実験方法

#### 酵素液の作成

正常食で飼育した Wistar-King 雄ラット（体重150～200g）を15時間絶食後、断頭屠殺し、大動脈を起始部より大腿動脈分枝部まで剝離する。0.9% NaCl で洗ったのち、外膜をピンセットで注意深く除いた。ハサミで細切後、0.25M sucrose-5mM Tris HCl buffer (pH 7.4) を加え、Hiscotron（目音機器）でホモジナイズし、10% homogenate を作成した。これを800×g、5分間遠心した上清を酵素液として用いた。以上の操作はすべて4°Cで行なった。

#### Cholesterol esterase 活性の測定<sup>17)</sup>

Cholesteryl oleate (Sigma 社), cholesteryl [1-<sup>14</sup>C] oleate (New England Nuclear 50.6mCi/mmol), phosphatidylcholine (Serdary 社) の各 benzene 溶液を混和して、窒素気流下に溶媒を除去する。ここに200mM NaCl 水溶液を加えて3～5分間超音波処理 (sonicate) したものを基質溶液として用いた。反応液は、0.5mM cholesteryl oleate, 1mM phosphatidylcholine, 50mM NaCl 及び50μl の酵素液から成り、全量200μl である。37°C, 120分 incubation ののち、benzene/chloroform/

methanol (10:5:12) 混液2ml と1mM NaOH 50μl を加えて反応を止める。1000×g, 15分遠心で、上層の水層と、下層の有機層に分離するので、上層0.5ml を Triton toluene scintillation fluid と混和して、oleic acid の放射能を liquid scintillation counter (LKB 社) で測定した。[1-<sup>14</sup>C] Oleic acid を用いた系では97%が上層に移行した。酵素液を含まない反応液では上層の放射能は、総放射能の1%以下であった。測定は duplicate で行なった。

#### 細胞分画<sup>18)</sup>

ラット aorta (intima & media) の20% homogenate を、500×g, 10分遠心して、cell debris と核を沈澱画分に回収した。その上清を5500×g, 30分遠心して沈澱を mitochondria 画分として回収した。その上清を14000×g, 60分遠心して沈澱を lysosome 画分として回収した。その上清を105000×g, 60分遠心して沈澱を microsome 画分とした。

#### 人工脂質球の作成<sup>16)</sup>

Cholesteryl oleate, cholesteryl [1-<sup>14</sup>C] oleate, 遊離 cholesterol (Sigma 社), trioleoylglycerol (Sigma 社) 各々の benzene 溶液及び、phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, sphingomyelin, lysophosphatidylcholine (以上 Serdary 社) 各々の chloroform 溶液を混和して、窒素ガス下に溶媒を除き、200mM NaCl 水溶液を加えて56°C で1分間超音波処理したものを1000×g, 15分遠心した上清を基質として用いた。

#### 人工脂質球の cholesteryl oleate 水解の測定

反応液は人工脂質球液50μl, acetate buffer (pH 4.5) または Tris HCl buffer (pH 7.5) 及びラット大動脈 homogenate 50μl からなり、全量200μl として37°C, 120分 incubate した。反応液中の各脂質の量は、fatty streak の人工脂質球を用いたときは、遊離 cholesterol 3.9μg, trioleoylglycerol 3.4μg, phosphatidylcholine 3.7μg, phosphatidylethanolamine 1.0μg, sphingomyelin 1.7μg, lysophosphatidylcholine 0.6μg であり、fibrous plaque の人工脂質球を用いたときは、遊離 cholesterol 13.9μg, trioleoylglycerol 11.1μg, phosphatidylcholine 5.6μg, phosphatidylethanolamine 1.4μg, sphingomyelin 4.1μg, lysophosphatidylcholine 1.6μg であり、cholesteryl oleate は fatty streak と、fibrous plaque とともに65.1μg (0.5mM) とした。反応停止以後の操作は、CEase 測定法と同様である。

#### Heparin-Sepharose affinity chromatography

Heparin-Sepharose 4B は、Iverius らの方法で作成した<sup>19)</sup>。酵素液の作成の項に述べた方法で、ラット大動脈

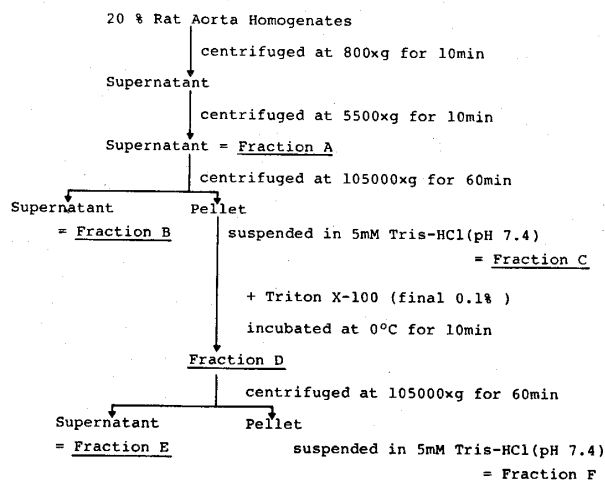


Fig. 1. Subcellular fractionation of rat aorta homogenates and treatment of 105000  $\times$  g pellet with Triton X-100.

(内膜及び中膜)の20% homogenate を作成し, Fig. 1 に示すような順序で細胞分画を行なった。Homogenate を800 $\times$ g, 10分遠心した上清を5500 $\times$ g, 10分遠心し, この上清を Fraction Aとする。これを105000 $\times$ g, 60分遠心した上清を Fraction Bとする。105000 $\times$ g 沈澱画分を0.25M sucrose-5 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) に浮遊させたものを Fraction Cとする。

これを Triton X-100 (最終濃度0.1%) とともに0 $^{\circ}$ C, 10分 incubate したのち, 105000 $\times$ g, 60分間遠心し, その上清を Fraction Eとし, 沈澱画分を同じ buffer に浮遊したものを Fraction Fとする。Fraction B及びE を heparin-Sepharose affinity chromatography にかけた。Fraction Bまたは Fraction Eを前もって5 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) で平衡化しておいた heparin-Sepharose と混和してカラムにつめる。

カラムは①5 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) ②0.5 M NaCl-5 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) ③0.8M NaCl-5 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) ④1.5M NaCl-5 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) をこの順に用いて展開した。Neutral CEase 活性を有する画分を集めて, 酵素の性質の検討に用いた。カラムから流出する蛋白量は280nm の吸光度で測定した。

#### リポ蛋白の分離

ヒト血漿リポ蛋白を, 早朝空腹時の健康成人から採血した血漿を用いて, Havel ら<sup>20)</sup>の方法で超遠心法を用いて分画した。比重0.95~1.006の画分を超低比重リポ蛋白 (very low density lipoprotein 以下 VLDL) 1.019~1.063を低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein, 以下 LDL), 1.063~1.21を高比重リポ蛋白 (high density lipoprotein, 以下 HDL) とした。各リポ蛋白は,

5 mM Tris buffer (pH 7.4) で透析して実験に用いた。

C-アポ蛋白は, Jackson ら<sup>21)</sup>の方法で VLDL から分離精製した。

#### Reconstituted LDL の調整

Krieger らの方法<sup>22)</sup>によって cholesteryl [1-<sup>14</sup>C] oleate を LDL にとりこませて, reconstituted LDL (以下 rLDL)を作成した。0.3mM Na-EDTA で透析した LDL (1.9mg 蛋白/600 $\mu$ l) を25mg のジャガイモデンプンと混和後, 凍結乾燥し, 5 ml の heptane を加えて振盪後-10 $^{\circ}$ C に1時間放置し, 4 $^{\circ}$ C で2000rpm, 10分遠心して上清を除去する。沈澱に再び5 ml の heptane を加えて, -10 $^{\circ}$ C で振盪混和後遠心の操作をくり返す。沈澱に, cholesteryl [1-<sup>14</sup>C] oleate (6 mg 2600cpm/ $\mu$ l) を含む heptane を加えて振盪混和後-10 $^{\circ}$ C に90分放置する。窒素気流下に heptane を除去したのち, 1 ml の10mM Tricine buffer (pH 7.4) を加えて4 $^{\circ}$ C に40時間放置後4 $^{\circ}$ C で2000rpm, 10分遠心し, その上清を12000rpm, 20分遠心して上清に rLDL を回収する。

#### ラット腹腔 macrophage の調整

ラット腹腔 macrophage は Goldstein ら<sup>7)</sup>の方法によって調整した。50ml の滅菌生理的食塩水を, 16時間絶食したラットの腹腔に注入, 30分後にカテーテルにてこれを回収する。400 $\times$ g で5分遠心ののち, 沈澱を, 10% ウシ胎児血清加 Hanks 液と混和して, 滅菌済シャーレに入れる。95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> 下に37 $^{\circ}$ C, 120分 incubate して, シャーレ底に付着した細胞をかきとり, 0.25 M sucrose-5 mM Tris HCl buffer (pH 7.5) に浮遊して glass-glass homogenizer で5往復 homogenize した。

#### Acetylated rLDL の調整

Acetylated rLDL は Basu らの方法で調整した<sup>23)</sup>。

放射性 cholesteryl oleate をとりこませた reconstituted LDL (蛋白量1.0mg), 1.5M NaCl 0.1ml, 飽和酢酸ナトリウム水溶液0.1ml を混和し, ice-bath 中で stirring し, ここに無水酢酸を2 $\mu$ l ずつ, ゆっくり滴下, 水溶液に濁りが生じた時点で, 滴下をやめて, さらに30分 ice-bath 中で stirring する。これを0.9% NaCl 5 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) に対して透析して, acetylated rLDL とした。

#### rLDL 中の cholesteryl oleate 水解活性の測定

反応液は30 $\mu$ l の rLDL, 50 $\mu$ l の200mM acetate buffer (pH 4.5) または200mM Tris HCl buffer (pH 7.5) 及び50 $\mu$ l の macrophage homogenate (またはラットの aorta particulate fraction) からなり全量を200 $\mu$ l とした。反応液中の cholesteryl oleate 濃度は0.5mM で,

50-200 $\mu$ g の LDL 蛋白を含む。37°C, 120分 incubate した。反応停止及びそれ以後の操作は CEase 活性測定の方法と同様である。

#### 蛋白量

蛋白定量は Lowry ら<sup>24)</sup>の方法で、ウシ血清 albumin を標準として用いて測定した。

#### 実験成績

Cholesteryl [1-<sup>14</sup>C] oleate と phosphatidylcholine の emulsion を基質として、ラット大動脈の homogenate の CEase 活性を測定した結果を Fig. 2~Fig. 5 に示す。

Cholesterol ester 水解反応は最初の3時間まで直線性がみられた。また homogenate の蛋白量0.1mg まで直線性がみられた。

Acetate buffer, phosphate buffer 及び Tris HCl buffer を用いて pH 3.5~ pH 9.0までの pH の影響をみたところ、pH 4.5及び pH 7.5の2つの peak をみとめた (Fig. 2)。細胞分画により、大動脈 homogenate を分画して、pH 4.5で CEase 活性を測定すると lysosome 画分に最大活性が、pH 7.5で測定すると microsome 画分に最大活性がみられた (Fig. 3)。pH 4.5の lysosome に由来する CEase 活性を acid cholesterol esterase (以下 acid CEase), pH 7.5の microsome に由来する cholesterol ester 水解活性を neutral cholesterol esterase (以下 neutral CEase) と呼ぶ。

Fig. 4 に基質濃度の影響を示す。Acid CEase, neutral CEase ともに Michaelis-Menten 型の曲線を示した。各々の Km 値は、19 $\mu$ M 及び55 $\mu$ M であった。

Fig. 5 に種々のリン脂質の影響を示す。cholesteryl oleate と種々のリン脂質とで emulsion を作成した。pH 4.5・pH 7.5ともに phosphatidylcholine を用いたときに活性が最も高く、phosphatidylserine がこれに次いだ。Phosphatidylethanolamine, sphingomyelin では、CEase 活性はほとんど認められなかった。以下の実験は、ひきつづき phosphatidylcholine を用いた。

Table 2 に種々の物質の影響を示す。pH 4.5の CEase の活性は FeCl<sub>2</sub> 及び BSA で上昇し、CuCl<sub>2</sub>, SDS (Sodium dodecyl sulfate), N-ethyl maleimide, Triton X-100で低下した。pH 7.5の CEase 活性は MnCl<sub>2</sub>, EDTA, BSA で上昇し、CuCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, SDS, N-ethyl maleimide, Triton X-100で低下した。

Fig. 6 に CEase に対する血清の効果を示す。cholesteryl oleate が 500 $\mu$ M のとき、acid CEase は血清の添加で活性が低下したが、neutral CEase では、血清蛋

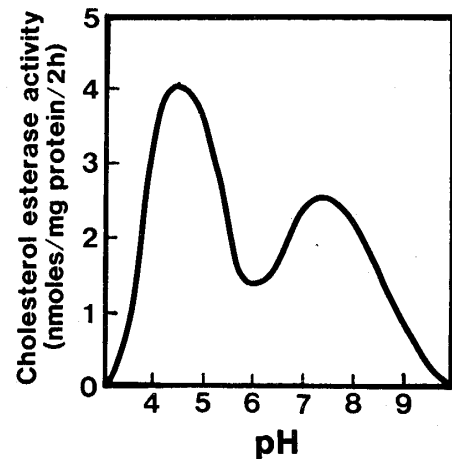


Fig. 2. Effect of pH on cholesterol esterase activity. Experimental procedures are described in the text. Acetate buffer 50mM (pH 3-5), 50mM phosphate buffer (pH 5-8) or 50 mM Tris-HCl buffer (pH 6.5-10) was used to assess enzyme activity. Postnuclear supernatant (0.05 mg of protein per assay) was used. Incubation for 120min at 37°C.

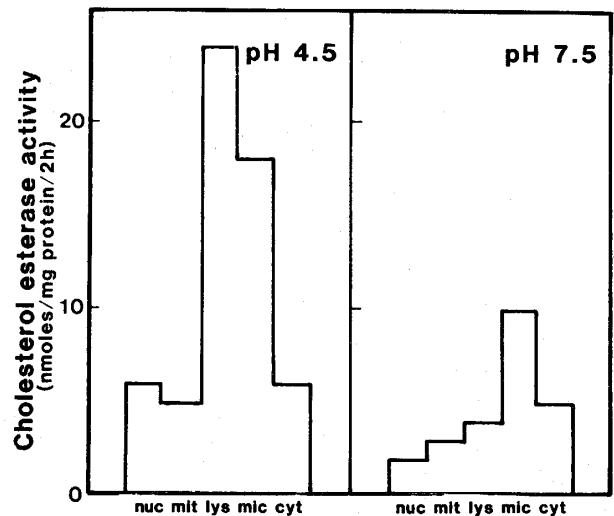


Fig. 3. Fractionation of rat arterial wall (media and intima) by differential centrifugation. The number represent total enzyme activities of cholesterol esterase in each fraction.

白量0.2mg/tube までは活性を上昇させ、それ以上では活性が低下した。12.5 $\mu$ M の基質濃度では、neutral CEase 活性は、血清蛋白量0.8mg/tube まで上昇した。Neutral CEase に対する血清 (0.2mg/tube) の効果と、基質濃度の関係を Fig. 7 に示す。

Cholesteryl oleate が100 $\mu$ M 以下では、血清は CEase 活性を上昇させ、250 $\mu$ M 以上では、血清は CEase 活性

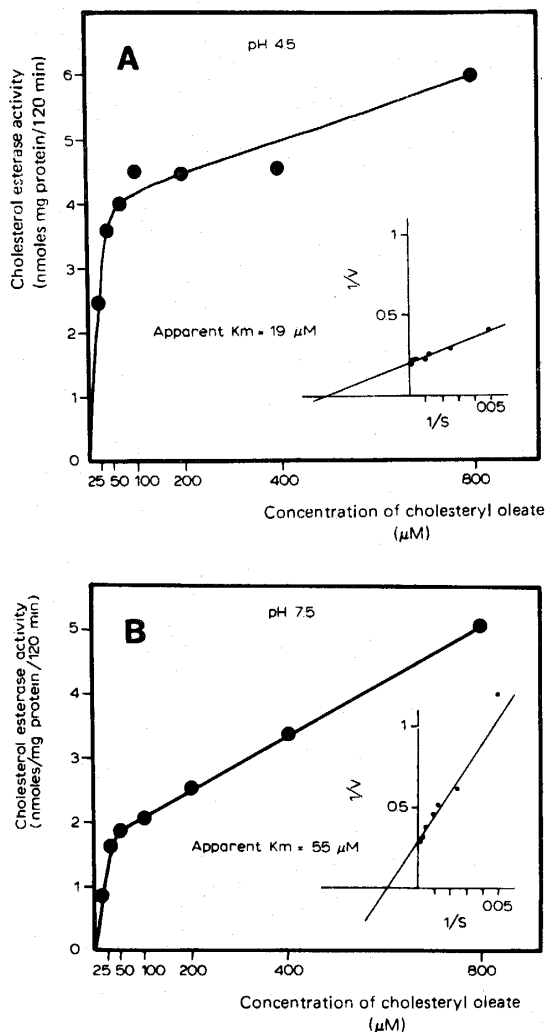


Fig. 4. (A) Effect of substrate concentration on acid cholesterol esterase and (B) neutral cholesterol esterase. Enzyme activities were determined with the postnuclear supernatant fractions (0.05 mg of protein per assay); incubation was for 120min.

を低下させた。

Fig. 8 に VLDL, LDL, HDL の CEase に対する効果を示す。Acid CEase は、 $1.5\mu\text{g}/\text{tube}$  の VLDL で活性が上昇したが、それ以上の VLDL は活性を軽度低下させた。LDL も活性を軽度低下させ、HDL も活性を低下させた。Neutral CEase は、VLDL, LDL, HDL によって活性が軽度上昇した。次に LDL 中の cholesterol ester の水解について検討した。放射性 cholesterol ester (cholesteryl [ $1-^{14}\text{C}$ ] oleate) を LDL にとりこませた reconstituted LDL (rLDL) と、ラット大動脈の homogenate の顆粒画分とを incubate して cholesterol ester の水解を検討した。大動脈 homogenate の顆粒画分による rLDL 中の cholesterol ester の水解は 180

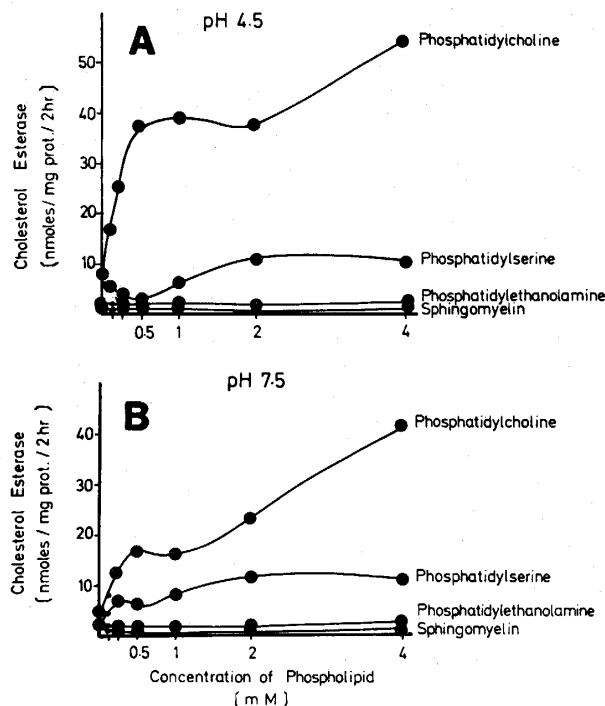


Fig. 5. (A) Effect of various phospholipids on acid cholesterol esterase. The substrates were sonicated mixtures of cholesteryl oleate and each phospholipid. The assay procedures are as described in the text. (B) Effect of various phospholipids on neutral cholesterol esterase.

Table 2. Effect of various substances on the activity of acid and neutral cholesterol esterases. Experiments were performed under standard assay conditions. The substances were added to 5 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer.

Addition	Relative Activity <sup>a</sup>	
	pH 4.5	pH 7.5
CaCl <sub>2</sub> (1mM)	115%	96%
CuCl <sub>2</sub> (1mM)	38	0
MgCl <sub>2</sub> (1mM)	109	83
FeCl <sub>2</sub> (1mM)	152	28
MnCl <sub>2</sub> (1mM)	109	155
ZnCl <sub>2</sub> (1mM)	86	0
EDTA (1mM)	125	142
SDS (1mM)	13	2
BSA (0.5%)	145	192
N-ethyl maleimide (1mM)	99	15
Triton X-100 (0.1%)	27	18

a. The results are expressed as relative activity as compared to the control with no additions.

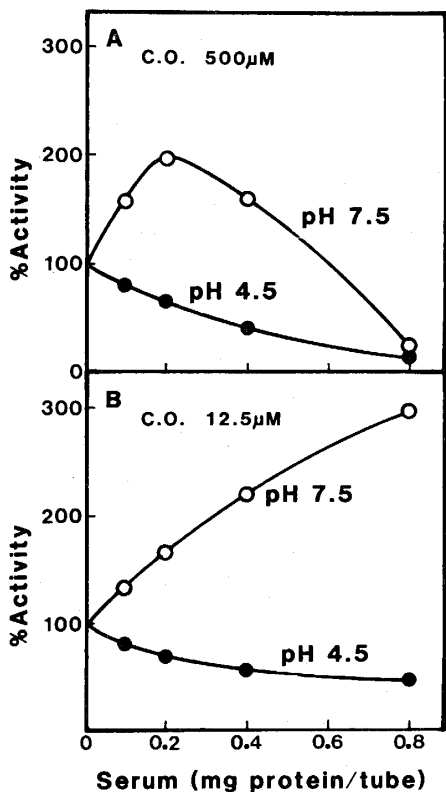


Fig. 6. Effect of serum on rat arterial wall cholesterol esterase activities. Micro-emulsions of cholesteryl oleate and phosphatidylcholine were used as substrate.

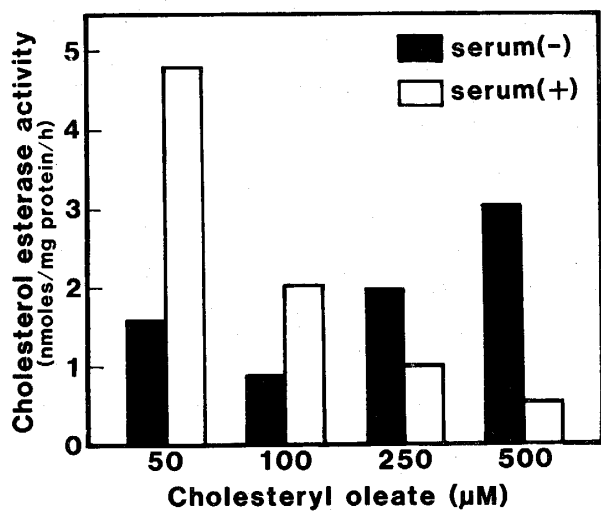


Fig. 7. The effect of serum (0.8mg protein per assay) on neutral cholesterol esterase at various concentration of cholesteryl oleate.

分まで直線性がみられた。顆粒画分の蛋白量は200µgまで直線性がみられた。Fig. 9に示すように、この水解は、pH 4.5に唯一の peak がみられた。

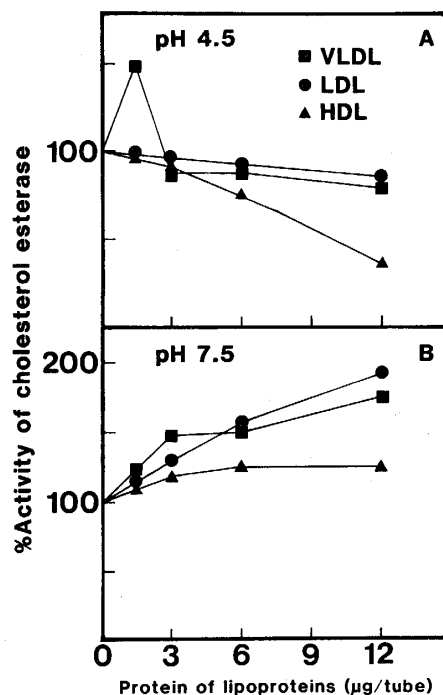


Fig. 8. Effect of lipoproteins on cholesterol esterase. (A) acid cholesterol esterase (B) neutral cholesterol esterase

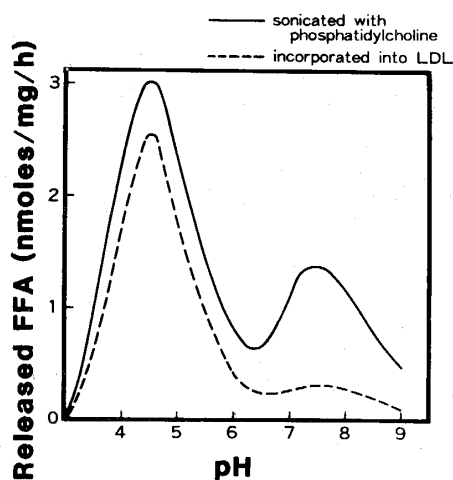


Fig. 9. Effect of pH on the hydrolysis of cholesteryl oleate in rLDL (reconstituted LDL) by a particulate fraction of rat arterial wall homogenate. Experimental procedures are described in the text. The final concentration of each buffer was 50mM and each assay mixture contained 0.1mg of protein.

ラット腹腔から採取した macrophage の homogenate による acetylated rLDL 中の cholesterol ester 水解は、180分まで、macrophage の蛋白量400µgまで直線性

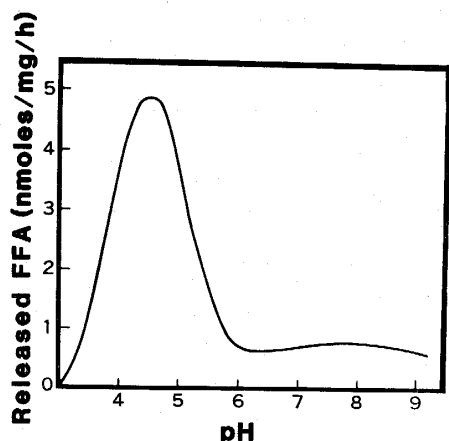


Fig. 10. Effect of pH on the hydrolysis of cholesteryl oleate in acetylated rLDL by a peritoneal macrophage homogenate. Experimental procedures are described in the text. The final concentration of each buffer was 50mM and each assay mixture contained 0.2mg of protein.

がみられた。Fig. 10に示すように、この水解は、pH 4.5に唯一の peak がみられた。

Neutral CEase 活性は、ラット大動脈の homogenate では、105000×g 上清にも、105000×g 沈澱画分(顆粒画分)にも認められ、顆粒画分を Triton X-100と incubate すると neutral CEase 活性が可溶化されてくる。105000×g 上清の neutral CEase と顆粒画分の neutral CEase の性状を比較した。

Fig. 1 に示すような順序で細胞分画を行ない大動脈 homogenate 作成中に105000×g 上清に遊離してくる画分(Fraction B)と、顆粒画分を Triton X-100と incubate して可溶化されてくる酵素活性(Fraction E)を比較した。各画分の活性を Table 3 に示す。ラット大動脈の20% homogenate を5500×g 10 分間遠心した上清(Fraction A, post-mitochondrial fraction)の neutral

CEase 活性を100%としたとき、Fraction Aを105000×g, 60 分間遠心すると、酵素活性の137%が上清画分中出现し、6.6%が沈澱画分に認められた。この沈澱画分を0.1% Triton X-100と0°Cで10分 incubate したのち、105000×g, 60分遠心すると、その酵素活性の100%が上清画分(Fraction E)に、132%が沈澱画分中出现した。

Fraction Bと Fraction Eを heparin-Sepharose affinity chromatography にかけたところ、それぞれ heparin-Sepharose に吸着されない画分と、吸着されて0.5M NaCl で溶出される画分に分けられた。Fig. 11 Aは、Fraction B の chromatogram を示す。2つの peak がみられた。第一の peak は NaCl を含まない 5 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) で流出する。heparin-Sepharose に吸着されない画分(以下 peak Is と呼ぶ)で、第二の peak は0.5M NaCl-5 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) で溶出される画分(peak IIs と呼ぶ)である。続いて行なった0.8M NaCl-5 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) と1.5M NaCl-5 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) では CEase 活性は溶出されなかった。Chromatography にかけた蛋白の46%が peak Is に、23%が peak IIs に認められ、酵素活性の42%が Is に、6%が peak IIs に認められた。Fig. 11 Bは Fraction E (Triton X-100によって顆粒画分から可溶化された CEase) の chromatogram を示す。2つの peak がみられた。第一の peak は、heparin-Sepharose に吸着されずに流出した画分(以下 peak Ip と呼ぶ)で、第二の peak は0.5M NaCl-5 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) で溶出される画分(以下 peak IIp と呼ぶ)である。続いて行なった0.8M NaCl-5 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) と1.5M NaCl-5 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) では CEase 活性は溶出されなかった。Chromatography にかけた蛋白の90%が peak Ip に、4%が peak IIp に認められ、酵素活性の11%が peak Ip に、48%が peak IIp に認められた。以上

Table 3. Neutral cholesterol esterase activity in each subcellular fractions of rat aorta homogenate. Fraction A to F refer to that described in Fig. 1.

Fractions	Protein (mg)	Specific activity (nmol/mg/h)	Total activity (nmol/h)	% Recovery (%)
A	87.3	5.36	468	100.0
B	68.0	9.41	640	137.0
C	20.6	1.50	31	6.6
D	20.6	1.35	28	6.0
E	8.5	3.26	28	6.0
F	19.1	1.94	37	7.9



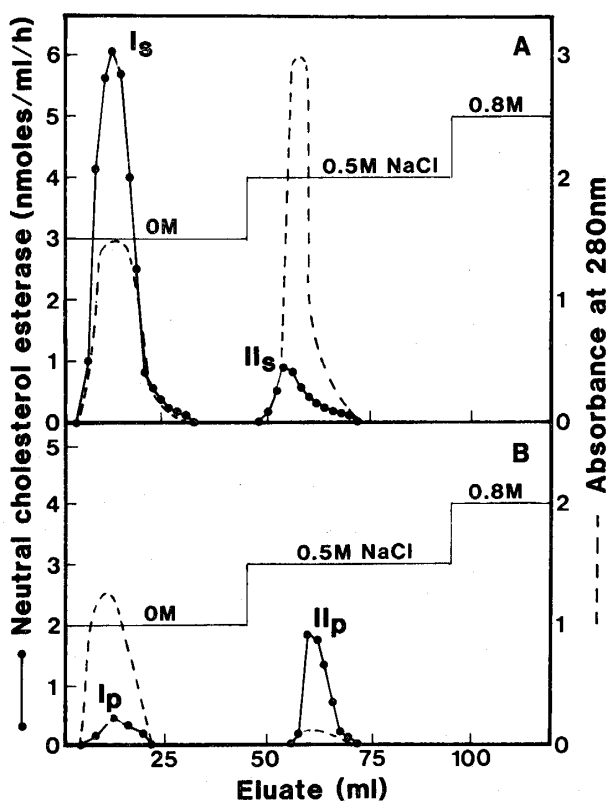


Fig. 11. Affinity chromatography of neutral cholesterol esterase on heparin-Sepharose. (A) Affinity chromatography of neutral CEase in 105000×g supernatant fraction of arterial wall (Fraction B in Fig. 1). Fraction B was incubated with heparin-Sepharose and eluted with 5 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5M NaCl-5mM Tris-HCl (pH 7.4) and 0.8M NaCl-5mM Tris-HCl (pH 7.4) successively. (B) Affinity chromatography of neutral CEase in particulate fraction. Pellet fraction of arterial wall homogenate was incubated with 0.1% Triton X-100 at 0°C for 10min and was centrifuged at 105000×g. The resultant supernatant fraction (Fraction E in Fig. 1) was incubated with heparin-Sepharose and eluted with 5 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5M NaCl-5mM Tris-HCl (pH 7.4) and 0.8 M NaCl-5mM Tris-HCl (pH 7.4) successively. Unbound fraction and bound fraction in Fig. 11A were designated as peak Is and peak IIs, respectively. Unbound fraction and bound fraction in Fig. 11B were designated as peak Ip and peak IIp, respectively.

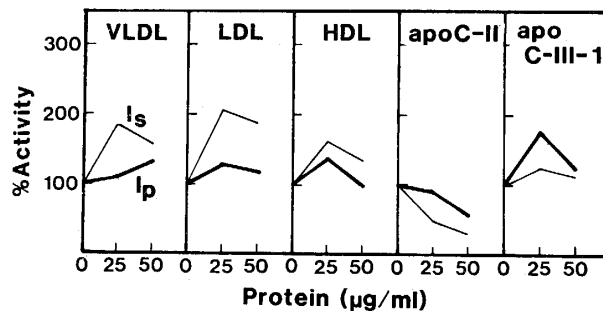


Fig. 12. Effect of lipoproteins and C-apoproteins on the activity of neutral cholesterol esterase which did not bind to heparin-Sepharose.

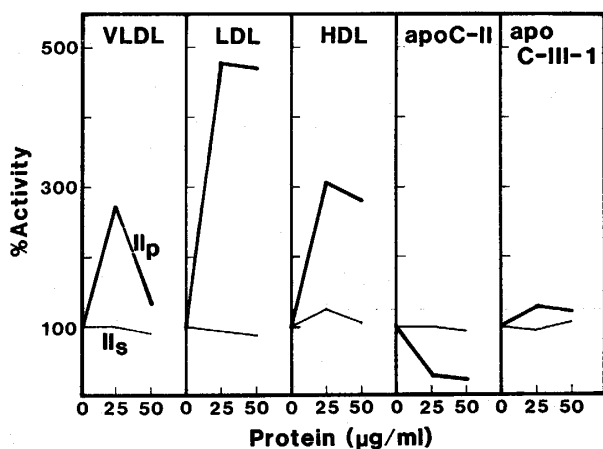


Fig. 13. Effect of lipoproteins and C-apoproteins on neutral cholesterol esterase in bound fraction to heparin-Sepharose.

の各 peak (peak Is, IIs, Ip, IIp) の CEase 活性について、VLDL, LDL, HDL, apo C-II, apo C-III-1 の効果を検討した。Fig. 12は、peak Is と peak Ip, 即ち heparin-Sepharose に吸着されない画分の酵素に対するリポ蛋白・アポ蛋白の効果を示す。VLDL, LDL, HDL は peak Is の酵素活性を上昇させ、peak Ip の酵素活性もわずかに上昇させた。Apo C-II は、peak Is と peak Ip の両者の酵素活性を低下させ、apo C-III-1 は 25µg/ml の濃度で両者の酵素活性を上昇させた。Fig. 13 は peak IIs 及び peak IIp (heparin-Sepharose に吸着された画分) の酵素活性に対する、リポ蛋白と C-アポ蛋白の効果を示す。リポ蛋白も、C-アポ蛋白も、peak IIs の酵素活性には効果がなかったが、peak IIp の酵素活性はリポ蛋白によって著明に上昇した。LDL 25µg/ml で酵素活性は470%に、50µg/ml で460%に増加した。HDL 25µg/ml で酵素活性は305%に、50µg/ml で285%に増加した。Apo C-II は peak IIs の酵素活性を低下させたが、apo C-III-1 は効果がなかった。

Table 4. (A) Cholesterol ester hydrolysis on omission of various lipids from artificial fatty streak mixtures.

(B) Cholesterol ester hydrolysis on omission of various lipids from artificial fibrous plaque mixtures. Artificial lipid mixtures were prepared by mixing various lipids simulating composition and relative ratios of lipids found in fatty streaks. One component of lipids was omitted at the time of preparation of substrates and the degree of hydrolysis of cholesteryl oleate was compared. The concentration of cholesteryl oleate was 0.5mM.

(A)	% Activity	
	pH 4.5	pH 7.5
Fatty streak mixtures	100	100
minus free cholesterol	97	96
minus triglyceride	88	81
minus phospholipids	34	24

(B)	% Activity	
	pH 4.5	pH 7.5
Fibrous plaque mixtures	100	100
minus free cholesterol	63	60
minus triglyceride	84	42
minus phospholipids	42	69

次に人工脂質球についての実験結果を述べる。Fatty streak の脂質球と同じ脂質組成の人工脂質球と、fibrous plaque の脂質球と同じ脂質組成の人工脂質球を作成して実験に用いた。人工脂質球における cholesterol ester 水解は3時間まで直線性がみられた。人工脂質球の脂質構成成分 (cholesteryl oleate, 遊離 cholesterol, trioleoylglycerol, リン脂質) のうち, cholesterol ester 以外の一を除いて作成した基質で cholesterol ester 水解活性を比較すると, fatty streak の人工脂質球では, pH 4.5でも pH 7.5でも, リン脂質を除いて作成した基質で最も水解活性が低値であった (Table 4 A)。

Fibrous plaque の人工脂質球では, pH 4.5ではリン脂質を除いたときに, pH 7.5では, 中性脂肪を除いたときに cholesterol ester 水解活性が最も低値であった (Table 4 B)。

次にリン脂質の各成分 (phosphatidylcholine, phos-

Table 5. (A) Cholesterol ester hydrolysis on omission of various phospholipids from artificial fatty streak mixtures.

(B) Cholesterol ester hydrolysis on omission of various phospholipids from artificial fibrous plaque mixtures. The experiments were performed as same as in Table 4., but fibrous plaques was used for the simulation instead of fatty streaks.

(A)	% Activity	
	pH 4.5	pH 7.5
Fatty streak mixtures	100	100
minus phosphatidylcholine	48	794
minus phosphatidylethanolamine	56	91
minus sphingomyelin	89	139
minus lysophosphatidylcholine	110	76

(B)	% Activity	
	pH 4.5	pH 7.5
Fibrous plaque mixtures	100	100
minus phosphatidylcholine	19	51
minus phosphatidylethanolamine	100	66
minus sphingomyelin	99	122
minus lysophosphatidylcholine	105	102

phatidylethanolamine, sphingomyelin, lysophosphatidylcholine)の影響を検討した (Table 5)。Fatty streak の人工脂質球では, phosphatidylcholine または phosphatidylethanolamine を除いたとき, pH 4.5で水解活性が低下した。pH 7.5では phosphatidylcholine を除くと活性が上昇した。Fibrous plaque では, pH 4.5, pH 7.5ともに phosphatidylcholine を除いたとき最も活性が低かった。

Phosphatidylcholine の量による cholesterol ester 水解活性の変動を Fig. 14 に示す。Fatty streak の人工脂質球では, phosphatidylcholine の量が増加すると, 水解活性は, pH 4.5で上昇し, pH 7.5で低下した (Fig. 14A)。Fibrous plaque の人工脂質球では phosphatidylcholine の量を増加させると 35 $\mu$ M までは pH 4.5, pH 7.5ともに水解活性が上昇した (Fig. 14B)。

Fig. 15は, 人工脂質球の cholesterol ester 水解活性に

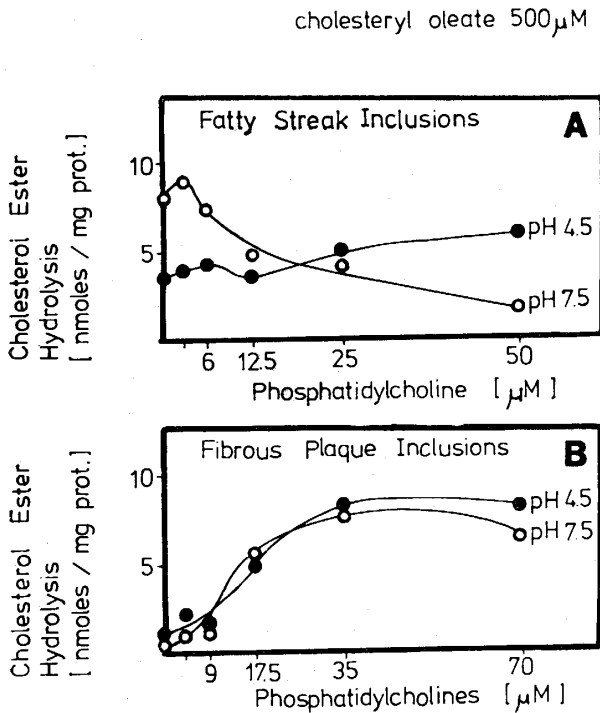


Fig. 14. (A) Effect of phosphatidylcholine on cholesterol ester hydrolysis on artificial fatty streak mixtures. The artificial fatty streak mixtures of various concentrations of phosphatidylcholine were prepared as substrates. (B) Effect of phosphatidylcholine on cholesterol ester hydrolysis in artificial fibrous plaque mixtures. The artificial fibrous plaque of various concentrations of phosphatidylcholine were prepared as substrates. The concentrations of lipids other than phosphatidylcholine were fixed to that of the experiment employed in Table 4.

対する phosphatidylethanolamine の効果を示す。Fatty streak では phosphatidylethanolamine の量が増すと pH 4.5 及び pH 7.5 の水解活性はともに上昇した (Fig. 15 A)。Fibrous plaque での、pH 4.5 の水解活性は 2 μM の phosphatidylethanolamine で上昇したが、4 μM 8 μM では上昇がみられなかった (Fig. 15 B)。pH 7.5 の水解活性は phosphatidylethanolamine では変化しなかった (Fig. 15 B)。

Fig. 16 に、人工脂質球の作成温度と、cholesterol ester 水解活性の関係を示す。人工脂質球を 56°C で超音波処理したときの cholesterol ester 水解活性は、4°C で超音波処理したときの水解活性より高く、この傾向は fatty streak と fibrous plaque の人工脂質球の両者にみられ、pH 4.5 で、その差がより大きかった。

基質作成時の温度の効果をも、cholesteryl oleate と

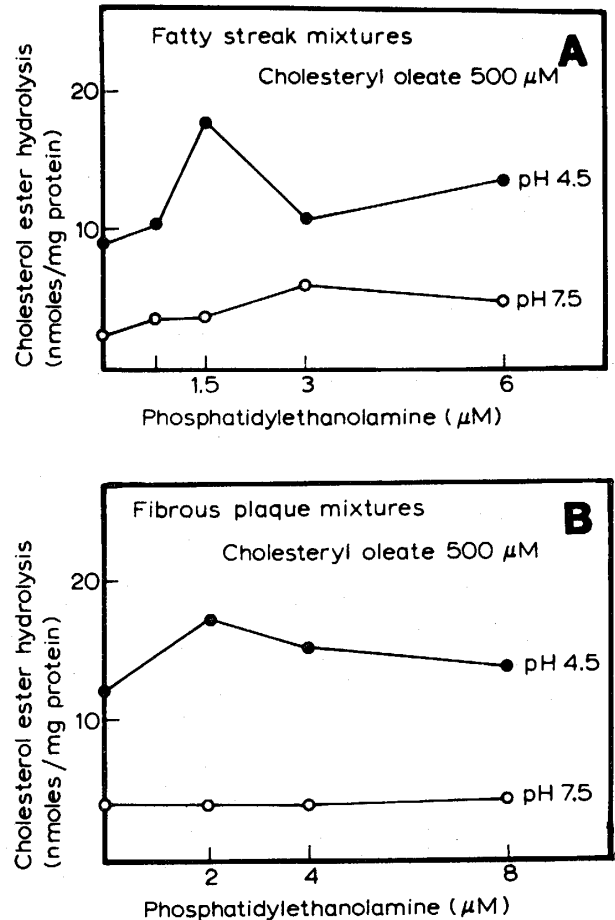


Fig. 15. (A) Effect of phosphatidylethanolamine on cholesterol ester hydrolysis in artificial fatty streak mixtures. The artificial fatty streak mixtures of various concentrations of phosphatidylethanolamine were prepared as substrates. The concentrations of lipids other than phosphatidylethanolamine were fixed to that of the experiment in Table 4. (B) Effect of phosphatidylethanolamine in cholesterol ester hydrolysis in artificial fibrous plaque mixtures. The artificial fibrous plaque mixtures of various concentrations of phosphatidylethanolamine were prepared as substrates. The concentrations of lipids other than phosphatidylethanolamine were fixed to that of the experiment in Table 4.

phosphatidylcholine からなる emulsion の、ラット大動脈 homogenate による水解についても検討した (Fig. 17)。Phosphatidylcholine が無いときは、4°C または 37°C で基質を超音波処理しても、cholesterol ester は水解されないが、56°C で超音波処理したときは水解された。Phosphatidylcholine の存在下では、4°C または 37°C での超音波処理では、phosphatidylcholine の有無は、cholesterol ester 水解活性に大きな影響を与えなかった。

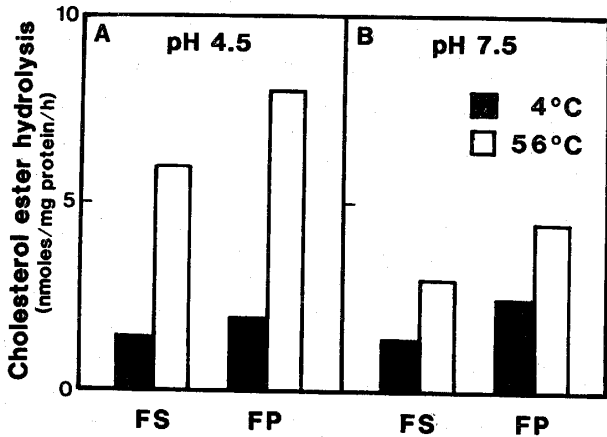


Fig. 16. Effect of sonication temperature on cholesterol ester hydrolysis at pH 4.5 (A) or at pH 7.5 (B) in artificial lipid mixtures of fatty streak (FS) or fibrous plaque (FP).

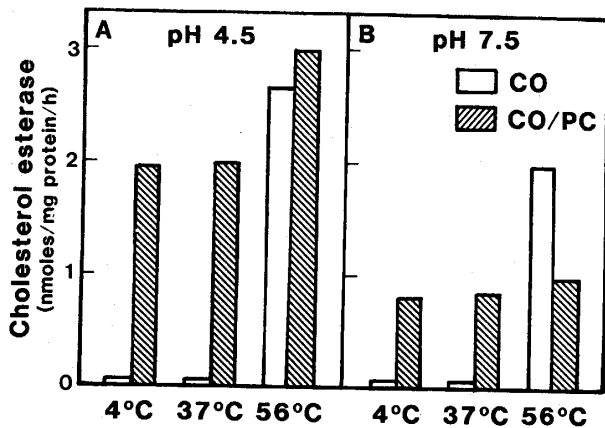


Fig. 17. Effect of sonication temperature of cholesteryl oleate/phosphatidylcholine emulsion on cholesterol ester hydrolysis at pH 4.5 (A) or at pH 7.5 (B). CO=cholesteryl oleate, PC=phosphatidylcholine

### 考 察

Cholesterol esterase (CEase) については従来から多くの報告がみられる。CEase 活性は、肝臓<sup>25-28)</sup>、皮膚線維芽細胞<sup>27,29)</sup>、赤血球<sup>30)</sup>、副腎<sup>31)</sup>、脂肪組織<sup>32)</sup>、で報告されている。動脈壁の CEase については、至適 pH を 4~5 にもつ酸性 CEase が、家兎<sup>33-36)</sup>、モルモット<sup>36)</sup>、ヒト<sup>37,38)</sup>、ラット<sup>39,40)</sup>、豚<sup>37)</sup>、鳩<sup>40)</sup>で、至適 pH を 7~8.5 にもつ中性 CEase が、モルモット<sup>36)</sup>、ヒト<sup>38,41)</sup>、ラット<sup>40,42)</sup>、猿<sup>42)</sup>、鳩<sup>40)</sup>で報告されている。

動脈壁での cholesterol ester 蓄積の原因について初期の研究は、lysosome の acid CEase の機能低下で説明しようとしたが<sup>33)</sup>、Haley ら<sup>43)</sup>は、家兎の動脈硬化薬に

おける acid CEase 活性が、正常動脈壁細胞のそれと比較してかえって上昇していたと報告した。Severson ら<sup>40)</sup>も、動脈硬化をおこしやすい鳩の動脈壁における acid CEase と neutral CEase 活性が、動脈硬化をおこしにくい鳩におけるそれらより高かったと報告した。また Subbiah ら<sup>44)</sup>は鳩で、Brecher ら<sup>42)</sup>は猿で動脈硬化症で neutral CEase 活性が正常と比べて低下していないと報告した。そして cholesterol ester の蓄積を中性の pH における cholesterol ester の合成と分解のバランスのくずれに求める説<sup>45-47)</sup>と、macrophage における acetylated LDL をはじめとする変性 LDL による刺激で cholesterol ester の合成が亢進することに求める説<sup>10,48)</sup>が提唱されている。また CEase に影響する因子としてリポ蛋白<sup>33)</sup>、ホルモン<sup>49)</sup>、プロスタグランジン<sup>50)</sup>なども報告されている。

本論文の実験では、ラット大動脈の homogenate を酵素液として、第一に cholesterol ester とリン脂質との emulsion、第二に LDL 中の cholesterol ester、第三に人工脂質球の 3 群の基質を用いて、基質の性状のちがいが cholesterol ester 水解に大きく影響することを明らかにした。

Cholesteryl oleate とリン脂質との emulsion を用いた実験で、以下のことが明らかになった。リン脂質のうち、phosphatidylcholine を用いて emulsion を作成したときに最も cholesterol ester 水解活性が高く、phosphatidylcholine の量を増加させると水解活性が上昇した。リン脂質とくに phosphatidylcholine が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

以後の実験は phosphatidylcholine を用いた。CEase の至適 pH は 4.5 と 7.5 の 2 つ存在し、細胞分画で前者は主に lysosome に存在し (acid CEase)、後者は主に microsome に存在して (neutral CEase) いることが明らかとなった。両者は、各種物質によって受ける影響が異なっており、局在も異にしていることから異なる役割をもつことが考えられる。血清及び血中のリポ蛋白 (VLDL, LDL, HDL) の効果も acid CEase と neutral CEase では異なっていた。血中のリポ蛋白で両酵素の活性が変動することは、血中のリポ蛋白が大動脈壁細胞内の酵素を調節していることを示唆しているが、リポ蛋白が細胞内にとりこまれるには様々な過程を経る必要がある。

血中のリポ蛋白、主に LDL は、細胞表面に存在する LDL-receptor を介して細胞内にとりこまれ、LDL 中の cholesterol ester は lysosome の acid CEase によって水解を受けるとされていることを前文に述べたが、水

解で生じた遊離 cholesterol の一部は microsome でエステル化されて再び cholesterol ester となる。この cholesterol ester は neutral CEase で水解されると考えられている<sup>40)</sup>。ラット大動脈 homogenate による LDL 中の cholesterol ester の水解は pH 4.5にのみ peak が認められた。また acetylated rLDL の macrophage homogenate による水解も、pH 4.5にのみ peak を有した。このことから LDL としてとりこまれた cholesterol ester はまず lysosome の acid CEase で水解されることが推測された。さらに、homogenate を酵素液として用いたにも拘らず、pH 7.5の水解活性が認められなかったことから、LDL 中の cholesterol ester が直接 microsome で水解される可能性は低いこと、及び cholesterol ester の存在状態がその水解にとって重要であることが推測された。またこのことは、cholesterol ester が水解され得るか否かを検討するには、その cholesterol ester が存在している環境と同様の条件で水解を測定する必要があることを意味している。この故に、動脈硬化巣に存在する cholesterol ester が水解され得るか否かに答えるには、第一に、cytosol に出現する lipid droplet<sup>51)</sup> に neutral CEase が到達できるか、第二に動脈硬化巣に存在する cholesterol ester がそこにあるがままの状態では水解され得るかが検討される必要がある。前者の検討のために neutral CEase の性質の検討を、後者の検討のために人工脂質球を用いた実験を行なった。

Neutral CEase は cytosol にも microsome にも認められ<sup>40,42,44)</sup> 本論文の実験成績でもラット大動脈 homogenate の105000×g 上清にも105000×g 沈澱にも neutral CEase 活性が存在する。両活性の相違を検討するために105000×g 上清の neutral CEase と、105000×g 沈澱を Triton X-100と incubate して可溶化される neutral CEase の性質を比較した (Fig. 1, Fig. 11~13, Table 3)。

105000×g 上清の neutral CEase も、105000×g 沈澱から可溶化された neutral CEase も、heparin-Sepharose に吸着されない部分と吸着される部分に分けられ、Fig.12に示すように105000×g 上清に由来する neutral CEase は、リポ蛋白による効果が明らかに異なっていた。このことから105000×g 上清の neutral CEase は cytosol に沈着した cholesterol ester の水解に働き105000×g 沈澱の neutral CEase は、microsome で再エステル化された cholesterol ester の水解に働くとして推測しているが、両者が異なる酵素であるか否かについてはさらに検討を要する。

次に、動脈硬化巣に存在する脂質球中の cholesterol

ester が水解され得る状態にあるか否かを検討するために、fatty streak 及び fibrous plaque にみられる脂質球と同様の脂質組成の人工脂質球を cholesteryl [1-<sup>14</sup>C] oleate を加えて作成した。このような脂質構成によっても cholesterol ester は水解される可能性があることを推測させた。このことと、LDL 中の cholesterol ester はラット大動脈 homogenate を用いたとき、pH 7.5では水解されなかったことを考えあわせると、基質の状態の重要性が再び確認される。

人工脂質球の脂質構成成分のうち、とくにリン脂質の除去によって水解活性は著しく変動した (Table 5, Fig. 14)。

そこで、リン脂質等の組成の変化によって、どんな変化が基質におきるかを検討した。

人工脂質球の構造は、疎水性の cholesterol ester と中性脂肪を内核として、リン脂質と遊離 cholesterol が内核を覆う外殻を構成している粒子と想像される。Via らは<sup>52)</sup> LDL と同様の脂質組成をもち、蛋白は含んでいない混合物 (cholesterol ester 2.37mg, リン脂質1.41mg, 遊離 cholesterol 0.52mg, 中性脂肪0.7mg) を超音波処理してその性状を報告している。これは BioGel A150 m の column chromatography で単一の peak を示し、組成も均一で大きさは平均45nm 径であった。中性脂肪を加えないで作成したものや、不飽和脂肪酸を有するリン脂質 (dioleoylphosphatidylcholine) を用いて作成したものは不均一で不安定であった。このことから組成の変動によっては、不均一で不安定な人工脂質球ができることが想像される。Fig. 16, Fig. 17にあるように、基質作成の温度が CEase 活性に重要であった。cholesterol ester やリン脂質は、温度の上昇によって固体から液体になる中間の段階で、液晶状態と呼ぶ構造をとる。これは、液体ほど分子相互の運動が自由ではなく一定の分子配列をしているが、固体ほど不動の構造ではない。この温度による変化を相転移と呼んでいる<sup>53)</sup>。cholesteryl oleate は42°C 以下で固体、51°C 以上で液体であるが42~51°C では液晶状態となっている。即ち56°C での超音波処理では、cholesteryl oleate は液体となっており、人工脂質球内での分布が4°C での超音波処理時とは異なっていると想像される。

Ginsburg ら<sup>54)</sup>はリン脂質と cholesterol ester のみからなる混合物を、両脂質が液晶状態となる温度 (転移温度, transition temperature) より高い温度で超音波処理してその性質を報告している。300分の超音波処理のうち、遠心と agarose gel column chromatography による分画で得られる粒子は cholesterol : リン脂質=0.9

: 1 のモル比をもつ安定な構造物で、電子顕微鏡では約 20nm 径の球状であり、cholesterol ester を内核にリン脂質が周囲をとりかこんでいた。cholesterol ester とリン脂質の種類の違いによって相転移の様子が異なっていた。Egg yolk phosphatidylcholine と cholesteryl oleate からなる系では後者が 42°C と 51°C で相転移をおこす。Dimyristoylphosphatidylcholine と cholesteryl oleate の系では、dimyristoylphosphatidylcholine は 25°C で相転移をおこしこれは dimyristoylphosphatidylcholine 単独のときの転移温度 (=23°C) より高い。同じ系で cholesteryl oleate は 46°C で相転移をおこし、これは cholesteryl oleate 単独のときの転移温度 (=42°C) より高い。Dipalmitoylphosphatidylcholine と cholesteryl oleate からなる系では 41°C で両者が同時に相転移をおこす。以上のことは、脂質の組成の違いによって内核と外殻の脂質が呼応して変化することを示している。

この温度による相転移は、生理的にも意義のあることと考えられている。Deckelbaum<sup>55)</sup>らは LDL 中の cholesterol ester が 37°C 付近で相転移をおこすことを報告し、LDL 中の中性脂肪と cholesterol ester の比が大きいほど低温で相転移をおこすことから、LDL 中の中性脂肪の量が粒子内の cholesterol ester の流動性 (fluidity) に影響していると結論している。Atkinson<sup>56)</sup>らや Kroon<sup>57)</sup>も LDL 中の cholesterol ester が生理的温度で相転移をおこすと報告している。秦<sup>16)</sup>は、動脈硬化巣にみられる脂質球も、液晶の光学的特徴である複屈折性を示したと報告している。

即ち、cholesterol ester の水解活性を左右する基質の状態のひとつとして脂質の組成ないしはリン脂質・中性脂肪の脂肪酸組成によって、脂質複合体の形状、大きさ、安定性、相転移の状況が変化することが挙げられると結論できる。イオンや小分子の透過性は、転移温度付近で最大となることが知られている<sup>58)</sup>。人工脂質球において、脂質組成を変化させたり、作成温度をかえると、cholesterol ester の水解され易さが変化するという本論文の実験成績は、基質の相転移の様子が変化して、酵素が基質表面から内部にその一部を侵入させたり、cholesterol ester が基質粒子の表面に出現する程度が変化するものと想像できる<sup>59,60)</sup>。具体的にどのような状態で酵素の attack が最も容易になるかをさらに検討する必要がある。そしてこのような lipid droplet が水解されるために酵素がその場にあるか<sup>61)</sup>について酵素の側から検討していくのが、これからの方向と思われる。このためには、酵素の精製、酵素合成の遺伝子の解明が必要であ

る。そして細胞全体の cholesterol ester 代謝、生体全体の cholesterol ester 代謝の理解によって動脈硬化症の進展抑制が可能になることが望まれる。

#### 謝 辞

本研究の遂行にあたり御指導を賜りました恩師、千葉大学医学部第二内科学教室 吉田尚教授、富山医科薬科大学熊谷朗副学長 (前千葉大学医学部第二内科学教室教授) に深甚の謝意を表します。終始直接御指導を賜った、千葉大学医学部第二内科講師斎藤康博士、川崎製鉄千葉病院内科部長兼検査室部長松岡信夫博士、千葉大学医学部第二内科白井厚治博士、さらに多大の御援助を戴いた千葉大学医学部第二内科脂質代謝研究室の佐々木憲裕先生、村野俊一先生、森崎信尋先生、東京大学医学部神経内科溝淵真人先生に心より感謝致します。このような研究の機会を与えて下さいました千葉大学医学部第二内科及び川崎製鉄千葉病院の諸先生に深く感謝致します。

なお本論文は、審査学位論文である。

#### SUMMARY

The factors which regulate the activity of cholesterol esterase (CEase) in rat arterial wall homogenates were investigated so as to determine whether they may play a role in the removal of cholesterol ester from atherosclerotic lesions. Rat arterial wall CEase activity showed two pH optima, one at pH 4.5 and the other at pH 7.5 using microemulsions of cholesteryl oleate and phosphatidylcholines as substrate. The CEase activity at pH 4.5 (acid CEase) and pH 7.5 (neutral CEase) were localized to the lysosomal and microsomal fractions, respectively. With respect to substrate phospholipid, both acid and neutral CEase activity was highest when the cholesteryl oleate was emulsified with phosphatidylcholine.

Neutral CEase activity was increased by the addition of serum; acid CEase activity was decreased by serum. This effect of serum on neutral CEase depended on the concentration of the substrates. Very low, low and high density lipoproteins also increased the neutral CEase activity.

Hydrolysis of cholesteryl oleate incorporated into low density lipoprotein by rat arterial wall homogenate showed only one pH optimum around pH 4.5. Hydrolysis of cholesteryl oleate incorporated into acetylated low density lipoprotein by rat peritoneal macrophage homogenate also showed only one pH optimum around pH 4.5.

The data suggest that the physical state of the substrate is important for the hydrolysis of cholesterol ester by these enzymes.

Neutral CEase found in 105000×g supernatant

of rat arterial wall homogenates and that solubilized from particulate fraction were compared using heparin-Sepharose affinity chromatography; both activities were eluted with 0.5M NaCl. The enzyme activity in the 0.5M NaCl-eluate of 105000×g supernatant was not affected by either lipoproteins or C-apoproteins. The enzyme activity in the 0.5M NaCl-eluate of solubilized enzyme from the particulate fraction was increased by very low density lipoprotein, low density lipoprotein or high density lipoprotein, and decreased by apolipoprotein C-II. These results suggest that the properties of the neutral CEase in 105000×g supernatant fraction are different from those of neutral CEase associated with particulate fractions of rat arterial wall homogenates.

The possibility of hydrolysis of cholesterol ester in lipid deposits in atherosclerotic lesions, such as fatty streaks and fibrous plaques, and its mechanism were examined by studying the effects of the various components of lipid deposits on cholesterol ester hydrolysis. Studies were carried out using artificial lipid emulsions prepared by sonication of mixtures of the components of lipid deposits. That cholesterol ester in the artificial lipid emulsions was hydrolysed by rat arterial wall homogenates suggested the possibility of the removal of cholesterol ester from atherosclerotic lesions. These results suggest that phospholipids, especially phosphatidylcholine, play an important role in the hydrolysis and that alteration of lipid components, other than cholesterol ester, influences cholesterol ester hydrolysis in lipid deposits.

#### 文 献

- 1) Anitschkow, N. und Chalutow, S.: Über experimentelle Cholesteatose und ihre Bedeutung für die Entstehung einiger pathologischer Prozesse. Zentbl. all Path. path Anat. **24**, 1-9, 1913.
- 2) Goldstein, J. L. and Brown, M. S.: Lipoprotein receptors, cholesterol metabolism and atherosclerosis. Arch. Pathol. **99**, 181-184, 1975.
- 3) Goldstein, J. L. and Brown, M. S.: Atherosclerosis: The low-density lipoprotein receptor hypothesis. Metabolism **26**, 1257-1275, 1977.
- 4) Goldstein, J. L. and Brown, M. S.: The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. Ann. Rev. Biochem. **46**, 897-930, 1977.
- 5) Chomette, G., De Gennes, J. L., Delcourt, A., Hammon, J. C. and Perie, G.: La xanthomatose cutanéotendineuse hypercholestérolémique familiale, Étude anatomo-clinique. Ann. Anat. Pathol. **16**, 233-250, 1971.
- 6) Wurster, N. B. and Zilvermit, D. B.: The role of phagocytosis in the development of atherosclerotic lesion in the rabbit. Atherosclerosis **14**, 309-322, 1971.
- 7) Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K. and Brown, M. S.: Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **76**, 333-337, 1979.
- 8) Brown, M. S., Goldstein, J. L., Krieger, M., Ho, Y. K. and Anderson, R. G. W.: Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoprotein. J. Cell Biol. **82**, 597-613, 1979.
- 9) Goldstein, J. L., Ho, Y. K. and Brown, M. S.: Cholesteryl ester Accumulation in macrophages resulting from receptor-mediated uptake and degradation of hypercholesterolemic canine  $\beta$ -very low density lipoproteins. J. Biol. Chem. **255**, 1839-1848, 1980.
- 10) Brown, M. S., Ho, Y. K. and Goldstein, J. L.: The cholesteryl ester cycle in macrophage from cells. J. Biol. Chem. **255**, 9344-9352, 1980.
- 11) Mahley, R. W., Innerarity, T. L., Brown, M. S., Ho, Y. K. and Goldstein, J. L.: Cholesteryl ester synthesis in macrophages: stimulation by  $\beta$ -very low density lipoproteins from cholesterol-fed animals of several species. J. Lipid Res. **21**, 970-980, 1980.
- 12) Stein, O., Halperin, G. and Stein, Y.: Interaction between macrophages and aortic smooth muscle cells. Biochim. Biophys. Acta **665**, 477-490, 1981.
- 13) Fogelman, A. M., Haberland, M. E., Seager, J., Hokom, M. and Edwards, P. A.: Factors regulating the activities of the low density lipoprotein receptor and the scavenger receptor on human monocyte-macrophages. J. Lipid Res. **22**, 1131-1141, 1981.
- 14) Fogelman, A. M., Shechter, I., Seager, J., Hokom, M., Child, J. S. and Edwards, P. A.: Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. Proc. Natl. Acad. USA. **77**, 2214-2218, 1980.
- 15) Hata, Y., Sci, D. M., Hower, J. and Insull, W.: Cholesteryl ester-rich inclusions from human aortic fatty streak and fibrous plaque of atherosclerosis. Am. J. Path. **75**, 423-453, 1974.
- 16) 秦 葭哉: 動脈硬化壁に蓄積した脂質球の化学

- 的組成について。「動脈硬化」**3**, 163-170, 1975.
- 17) Shinomiya, M., Matsuoka, N., Shirai, K., Saito, Y. and Kumagai, A.: Studies on cholesterol esterase in rat arterial wall. *Atherosclerosis* **33**, 343-350, 1979.
  - 18) Sasaki, N., Matsuoka, N., Shirai, K., Saito, Y. and Kumagai, A.: Studies on CDP-choline: 1,2-diacylglycerol cholinephosphotransferase activity in rat arterial wall. *Atherosclerosis* **43**, 185-195, 1982.
  - 19) Iverius, P. H.: Coupling of glycosaminoglycans to agarose beads (Sephrose 4B). *Biochem. J.* **124**, 677-683, 1971.
  - 20) Havel, R. J., Eder, H. A. and Bragdon, J. H.: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.* **34**, 1345-1353, 1955.
  - 21) Jackson, R. L., Baker, H. W. N., Gilliam, E. B. and Gotto, A. M. Jr.: Primary structure of very low density apolipoprotein C-II of human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 1942-1945, 1977.
  - 22) Krieger, M., Brown, M. S., Faust, J. R. and Goldstein, J. L.: Replacement of endogenous cholesteryl esters of low density lipoprotein with exogenous cholesteryl linoleate. *J. Biol. Chem.* **253**, 4093-4101, 1978.
  - 23) Basu, S. K., Goldstein, J. L., Anderson, R. G. W. and Brown, M. S.: Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**, 3178-3182, 1976.
  - 24) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275, 1951.
  - 25) Riddle, M. C., Smuckler, E. A. and Glomset, J. A.: Cholesteryl ester hydrolytic activity of rat liver plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **388**, 339-348, 1975.
  - 26) Brown, W. J. and Sgoutas, D. S.: Purification of rat liver lysosome cholesteryl ester hydrolase. *Biochim. Biophys. Acta* **617**, 305-317, 1980.
  - 27) Hoeg, J. M., Demosky, S. J. Jr. and Brewer, H. B. Jr.: Characterization of neutral and acid ester hydrolase in Wolman's disease. *Biochim. Biophys. Acta* **711**, 56-65, 1982.
  - 28) Simon, J. B. and Poon, R. W. M.: Hepatic cholesterol ester hydrolase in human liver disease. *Gastroenterology* **75**, 470-473, 1978.
  - 29) Goldstein, J. L., Dana, S. E., Faust, J. R., Beaudet, A. L. and Brown, M. S.: Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **250**, 8487-8495, 1975.
  - 30) Poon, R. W. M. and Simon, J. B.: Cholesterol ester hydrolase in human red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta* **384**, 138-145, 1975.
  - 31) Faust, J. R., Goldstein, J. L. and Brown, M. S.: Receptor-mediated uptake of low density lipoprotein and utilization of its cholesterol for steroid synthesis in cultured mouse adrenal cells. *J. Biol. Chem.* **252**, 4861-4871, 1977.
  - 32) Khoo, J. C., Drevon, C. A. and Steinberg, D.: The hydrolysis of cholesterol ester in plasma lipoproteins by hormone-sensitive cholesterol esterase from adipose tissue. *J. Biol. Chem.* **254**, 1785-1787, 1979.
  - 33) Takano, T., Black, W. J., Peters, T. J. and De Duve, C.: Assay, kinetics, and lysosomal localization of an acid cholesteryl esterase in rabbit aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **249**, 6732-6737, 1974.
  - 34) Brecher, P., Pyun, H. Y. and Chobanian, A. V.: Effect of atherosclerosis on lysosomal cholesterol esterase activity in rabbit aorta. *J. Lipid Res.* **18**, 154-163, 1977.
  - 35) Brecher, P., Pyun, H. Y. and Chobanian, A. V.: Cholesteryl ester and triglyceride hydrolysis by an acid lipase from rabbit aorta. *Biochim. Biophys. Acta* **530**, 112-123, 1978.
  - 36) Severson, D. L. and Fletcher, T.: Characterization of cholesterol ester hydrolase activities in rabbit and guinea pig aorta. *Atherosclerosis* **31**, 21-32, 1978.
  - 37) Smith, A. G., Brooks, C. J. W. and Harland, W. A.: Acid cholesterol ester hydrolase in pig and human aorta. *Steroids Lipids Res.* **5**, 150-161, 1974.
  - 38) Sakurada, T., Orimo, H., Okabe, H., Noma, A. and Murakami, M.: Purification and properties of cholesterol ester hydrolase from human aortic intima and media. *Biochim. Biophys. Acta* **424**, 204-212, 1976.
  - 39) Wolinsky, H., Katz, D., Markle, R., Mills, J., Brem, S. and Wassertheil-Smoller, S.: Hydrolase activities in the rat aorta IV. Relation between clearance rates of circulating <sup>125</sup>I-labeled low-density lipoproteins and levels of tissue hydrolase activity. *Circ. Res.* **47**, 433-442, 1980.
  - 40) Severson, D. L. and Fletcher, T.: Properties of acid neutral cholesterol ester hydrolases in rat and pigeon aortas. *Atherosclerosis*



- 41) Kothari, H. V., Bonner, M. J. and Miller, B. F.: Cholesterol ester hydrolase in homogenates and lysosomal fractions of human aorta. *Biochim. Biophys. Acta* **202**, 325-331, 1970.
- 42) Brecher, P., Kessler, M., Clifford, C. and Chobanian, A. V.: Cholesterol ester hydrolase in aortic tissue. *Biochim. Biophys. Acta* **316**, 386-394, 1973.
- 43) Haley, N. J., Fowler, S. and De Duve, C.: Lysosomal acid cholesteryl esterase activity in normal and lipid-laden aortic cells. *J. Lipid Res.* **21**, 961-969, 1980.
- 44) Subbiah, M. T. R. and Dicke, B. A.: On the cholesteryl ester hydrolase activity in the microsomal and supernatant fractions of pigeon aorta. *Atherosclerosis* **24**, 575-580, 1976.
- 45) Kritchevsky, D. and Kothari, H. V.: Aortic cholesterol esterase: studies in White Carneau and Show Racer pigeons. *Biochim. Biophys. Acta* **326**, 489-491, 1973.
- 46) Patelski, J., Pniewska, B., Piorunska, M. and Obrebska.: The arterial acyl-CoA: Cholesterol acyltransferase and cholesterol ester hydrolase activities. *Atherosclerosis* **22**, 287-291, 1975.
- 47) Kritchevsky, D., Tepper, S. A., Genzano, J. C. and Kothari, H. V.: Aortic cholesterol esterase in rabbits. *Atherosclerosis* **19**, 459-462, 1974.
- 48) Henriksen, T., Mahoney, E. M. and Steinberg, D.: Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. *Arteriosclerosis* **3**, 149-159, 1983.
- 49) Tomita, T., Yonekawa, I., Umegaki, K., Okada, T. and Hayashi, E.: Sex differences in aortic cholesterol esterase activity in rat and changes of the activity following castration and gonadal hormone treatment. *Atherosclerosis* **43**, 405-415, 1982.
- 50) Hajjar, D. P. and Weksler, B. B.: Metabolic activity of cholesterol esters in aortic smooth muscle cells is altered by prostaglandins I<sub>2</sub> and E<sub>2</sub>. *J. Lipid Res.* **24**, 1176-1185, 1983.
- 51) Shio, H., Haley, N. J. and Fowler, S.: Characterization of lipid-laden aortic cells from cholesterol-fed rabbits. *Lab. Invest.* **41**, 160-167, 1979.
- 52) Via, D. P., Craig, I. F., Jacobs, G. W., VanWinkle, W. B., Charlton, S. C., Gotto, A. M. Jr. and Smith, L. C.: Cholesteryl ester-rich microemulsions: stable protein-free analogs of low density lipoproteins. *J. Lipid Res.* **23**, 570-576, 1982.
- 53) Lee, A. G.: Lipid phase transitions and phase diagrams: I Lipid phase transitions. *Biochim. Biophys. Acta* **472**, 237-281, 1977.
- 54) Ginsburg, G. S., Small, D. M. and Atkinson, D.: Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. *J. Biol. Chem.* **257**, 8216-8227, 1982.
- 55) Deckelbaum, R. J., Shipley, G. G. and Small, D. M.: Structure and interactions of lipids in human plasma low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* **252**, 744-754, 1977.
- 56) Atkinson, D., Deckelbaum, R. J., Small, D. M. and Shipley, G. G.: Structure of human plasma low-density lipoproteins: Molecular organization of central core. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 1042-1046, 1977.
- 57) Kroon, P. A.: The order-disorder transition of the core cholesteryl esters of human plasma low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **256**, 5332-5339, 1981.
- 58) Houslay, M. D. and Stanley, K. K.: Dynamics of biological membranes. John Wiley and Sons Ltd., U.S.A. p. 60, 1982.
- 59) Hamilton, J. A., Miller, K. W. and Small, D. M.: Solubilization of triolein and cholesteryl oleate in egg phosphatidylcholine vesicles. *J. Biol. Chem.* **258**, 12821-12826, 1983.
- 60) Smaby, J. M., Schmid, P. C. and Brockman, H. L.: Phospholipid structure and the packing of cholesteryl oleate at the lipid/water interface. *Biochemistry* **23**, 1955-1958, 1984.
- 61) Hajjar, D. P., Minick, C. R. and Fowler, S.: Arterial neutral cholesterol esterase. *J. Biol. Chem.* **258**, 192-198, 1983.