

[原著] ラット副腎皮質のコレステロール代謝における sterol carrier protein₂ の役割

太 枝 徹*

(平成元年 6 月 27 日受付, 平成元年 9 月 25 日受理)

要 旨

細胞内脂質転送蛋白の一種である sterol carrier protein₂ (SCP₂) の精製法を新たに確立し、ラット副腎皮質での cholesterol 代謝における SCP₂ の役割について検討を加えた。

まず CM-Toyopearl 650M を用いたイオン交換、および Toyopearl HW60S を用いた分子ふるいカラムによる二段階中速液体カラムクロマトグラフィーにより、ラット肝ホモジネートの 105,000×g 遠心上清より、SCP₂ を 69% の収率で約 5,000 倍に精製した。この方法で得られた精製 SCP₂ は、SDS-ポリアクリアミドゲル電気泳動で、明かな単一の蛋白質バンドとして認められ、分子量は、12,300 と比較的小さな低分子蛋白で、等電点は 9.1 とアルカリ性を示した。

この精製 SCP₂ は、ラット副腎皮質の mitochondria における cholesterol 側鎖切断酵素 (cholesterol side-chain cleavage enzyme) による内因性 cholesterol からの pregnenolone 合成を時間および濃度依存性に促進した。一方、精製 SCP₂ はラット副腎皮質の microsome における acyl-CoA : cholesterol acyltransferase (ACAT) による cholesterol からの cholesterol ester 合成を時間及び濃度依存性に促進した。この SCP₂ による ACAT 促進効果は、内因性 cholesterol を基質とした時は認められず、外因性 cholesterol を添加した時にのみ認められ、しかも添加された cholesterol 濃度に依存していたことから、SCP₂ の ACAT 促進効果は、外因性 cholesterol の利用効率を高めることによるものと考えられた。

以上の成績より、SCP₂ はラット副腎皮質の cholesterol からのステロイド合成及び cholesterol ester 合成のいずれの系においても促進作用を有し、ラット副腎皮質の cholesterol 代謝に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

Key words: Sterol carrier protein₂, Cholesterol 代謝, Cholesterol side-chain cleavage enzyme, Acyl-CoA : cholesterol acyltransferase, ラット副腎皮質

略語一覧: SCP₂: Sterol carrier protein₂, ACAT: acyl-CoA : cholesterol acyltransferase

I. 序 文

生体の重要な構成成分の 1 つである cholesterol は、疎水性であるためその生合成や代謝には cholesterol 転送蛋白と呼ばれる細胞内蛋白の存在を必要とすることが明らかにされている^{1,2)}。これらの脂質転送蛋白のうち、sterol carrier protein₂ (SCP₂) は肝をはじめ cholesterol 代謝の盛んな臓器に広く分布し cholesterol の代

謝に深く関与していることが諸家により報告されている³⁻⁵⁾。例えば肝では cholesterol の生合成の最終段階である 7-dehydrocholesterol からの cholesterol の合成⁶⁾、胆汁酸合成における cholesterol からの 7 α -hydroxycholesterol の合成⁷⁾および acyl-CoA : cholesterol acyltransferase (ACAT) による cholesterol ester 合成⁸⁾等の代謝系に関与することが報告されている。副腎皮質において cholesterol は、ステロイドホルモンの前駆体と

* 千葉大学医学部内科学第二講座

Toru OEDA: Role of Sterol Carrier Protein₂ in Rat Adrenal Cholesterol Metabolism.

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

Received June 27, 1989. Accepted September 25, 1989.

してきわめて重要な役割を果たしている事は周知の事実である。副腎皮質の cholesterol の大部分は cholesterol ester として脂肪滴中に貯蔵されており, ACTH の刺激により水解された後, 遊離 cholesterol となり mitochondria に運ばれてステロイド合成に利用される⁹⁻¹¹⁾。一方, 副腎皮質細胞内にはもう一つの cholesterol の代謝系である ACAT が microsome に存在し, cholesterol から cholesterol ester を合成するが, この cholesterol ester が脂肪滴に運ばれ貯えられると考えられている¹²⁾。このような副腎皮質での cholesterol の代謝がどのような因子により調節されているのか不明な点が多いが, 最近 Vahouny らは, 免疫学的手法を用いて, ラット副腎皮質に SCP₂ が存在することを明らかにし, SCP₂ が副腎皮質での cholesterol 代謝に関与する可能性を示唆した¹³⁾。そこで我々は, 副腎皮質 cholesterol 代謝における SCP₂ の生理的意義を明らかにする目的で, mitochondria での cholesterol からのステロイド合成及び microsome での cholesterol からの cholesterol ester 合成に的を絞り SCP₂ の影響について検討を加えた。

ところで SCP₂ の精製法はすでに Scallen らにより報告されている¹⁴⁾が, 操作法が煩雑なうえ回収率, 精製度共に低いため, 今回新たに SCP₂ の効率的な精製法を確立し, 得られた SCP₂ を用いて今回の研究を行なった。

II. 材料および方法

1. 試薬

[1-¹⁴C] oleoyl-CoA (SA. 57.4mCi/mmol), [4-¹⁴C] cholesterol (SA. 53.2mCi/mmol), [³H] cholesteryl oleate (SA. 72.0Ci/mmol), [7-³H (N)] pregnenolone (SA. 13.0mCi/mmol) は, New England Nuclear 社 (Boston, USA) より購入した。7-dehydrocholesterol は Aldrich 社 (Milwaukee, Wis., USA) より, cholesterol, oleoyl-CoA, bovine serum albumin (fraction V, free from free fatty acid) は, Sigma 社 (St. Louis, MO, USA) より購入した。NADPH は, オリエンタル酵母社 (大阪) より, adenosine 5' triphosphate (ATP) は, Boehringer Mannheim 社 (Mannheim, W. Germany) より購入した。TSK-Gel Toyopearl CM-650M および Toyopearl HW60S は, 東ソー社 (東京) より購入した。その他の試薬および溶剤は和光純薬社 (大阪) より購入した。

2. 試料の調整

実験動物は標準ラット食 (オリエンタル酵母社, 東京) で飼育した雄性 Sprague-Dawley ラット (300-350

g) を高杉実験動物社 (埼玉) より購入した。

(1) ラット肝 105,000×g 遠心上清およびラット肝 microsome 画分の調製: 断頭屠殺後, 肝臓を 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol を含む氷冷した 15mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) で洗浄し, 2 倍量の同 buffer でホモジナイズした。ホモジネートを 4°C で 20,000×g, 15 分間で 2 回遠心し, 得られた上清をさらに, 105,000×g, 60 分間で 2 回遠心した。その上清および洗浄 microsome 画分を各々 SCP₂ 精製及び SCP₂ 活性測定に用いた。

(2) ラット副腎皮質 mitochondria 画分の調製: Brownie 等の方法¹⁵⁾に準じて, ラットを断頭屠殺後, 副腎を摘出し被膜および髄質を除去後, 氷冷 250 mM sucrose, 1mM EDTA, 20mM nicotinamide を含む 15mM Tris·HCl buffer (pH 7.4) で 5% (w/v) ホモジネート液を作成した。800×g, 10 分間の遠心により得た上清を 5,000×g, 15 分間 2 回の遠心により mitochondria 画分を得た。この洗浄 mitochondria 沈渣を 36mM Tris·HCl buffer (pH 7.5), 10.4mM sodium phosphate buffer (pH 7.5), 13mM succinate, 5.2mM magnesium chloride, 250mM sucrose を含む buffer (pH 7.5)¹⁶⁾ に再浮遊したものを酵素液とした。

(3) ラット副腎皮質 microsome 画分の調製: 断頭屠殺後, 副腎を摘出し被膜および髄質を除去し 4 倍量の氷冷した 250mM sucrose, 0.1mM EDTA, 0.1mM dithiothreitol を含む 15mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) でホモジナイズした。ホモジネートを 4°C 20,000×g, 15 分間, 105,000×g, 60 分間各々 2 回遠心し, 得られた洗浄 microsome 画分を同 buffer に再浮遊したものを酵素液とした。

3. 測定法

(1) SCP₂ 活性の測定: SCP₂ 活性は Noland 等の方法¹⁴⁾に準じ, 肝 microsome 画分を用いて 7-dehydrocholesterol reductase [EC. 13.1.21] による 7-dehydrocholesterol から cholesterol への変換反応の活性化を指標として測定した。すなわち, 0.5mM NADPH, 種々の濃度の SCP₂, microsome 浮遊液 (2 mg 蛋白量) と 5 mM 2-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol を含む 15mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) 1.0 ml を 37°C, 6 分間 N₂ ガス下で, プレインキューベートし, 50nmol の 7-dehydrocholesterol 溶液 (5 μ l, dioxane/1, 2-propandiol, 2:1, v/v) を添加して反応を開始し, N₂ ガス下で, 37°C, 1 時間振盪した。反応は, 1 ml の 30% (w/v) KOH と 2 ml の ethanol を加えて停止し, 脂質を 4 ml の petroleum ether にて 2 回抽

出した。溶媒を N₂ ガス気流下で蒸発除去し、残った脂質を 750 μ l の cyclohexane で再溶解した。未反応の 7-dehydrocholesterol 量を日立製ダブルビーム分光光度計 220A 型を用いて測定し、3 波長 (276, 282, 290nm) 定量演算により求めた。

(2) ラット副腎皮質 mitochondria の pregnenolone 産生の測定: Brownie 等の方法¹⁵⁾に準じて 36mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 10.4mM sodium phosphate buffer (pH 7.5), 13mM succinate, 5.2mM magnesium chloride, 250mM sucrose を含む buffer (pH 7.5)¹⁶⁾ に SCP₂ (0-20 μ g 蛋白量) と mitochondria 浮遊液 (25 μ g 蛋白量) を加え 0.2ml の反応系で 37°C で 30 分間インキュベートした後、50 μ l の ethanol を加えて反応を停止した。遠心後、上清中の pregnenolone を特異抗体 (帝国臓器社, 川崎) を用いて RIA¹⁷⁾ にて測定した。産生量は ng/mg mitochondria 蛋白として表わした。

(3) ラット副腎皮質 microsome の cholesteryl ester 産生の測定: Balasubramaniam らの方法¹⁸⁾に準じ、[1-¹⁴C] oleoyl-CoA から cholesterol ester への [1-¹⁴C] oleate の取り込みを測定して求めた。反応系は、0.5 mM ATP, 2mM dithiothreitol, 1% (w/v) BSA, 6.25 nmol の cholesterol (5 μ l, dioxane/1, 2-propandiol, 2:1, v/v), SCP₂ (0.24-38 μ g 蛋白量) と microsome 浮遊液 (125 μ g 蛋白量) を含む 15mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) 0.5ml に、100 μ M [1-¹⁴C] oleoyl-CoA を加えて反応を開始し、37°C で 20 分間振盪後 1.25ml の chloroform/methanol 混液 (2:1, v/v) を加えて反応を停止した。脂質は Bligh & Dyer らの方法¹⁹⁾で抽出し、産生された cholesteryl [1-¹⁴C] oleate を Skipski らの方法²⁰⁾によって薄層クロマトグラフィーで分離し、その放射比活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。また [4-¹⁴C] cholesterol を基質として用いた時は、6.25nmol の [4-¹⁴C] cholesterol (5 μ l, dioxane/1, 2-propandiol, 2:1, v/v) と 100 μ M の非標識 oleoyl-CoA を反応液に加えた。

Cholesterol ester の産生量は、cholesteryl [1-¹⁴C] oleate nmol/mg microsome 蛋白として表わした。[1-¹⁴C] oleoyl-CoA からの cholesteryl [1-¹⁴C] oleate 産生は、反応時間については 40 分間まで、添加する microsome の蛋白量については 125 μ g/tube まで各々直線的に増加した。

(4) cholesterol 含量の測定: 副腎 microsome 画分中の遊離 cholesterol および cholesterol ester 含量は、Gamble らの方法²¹⁾により測定した。

4. SCP₂ の精製

全精製操作は 0-4°C で行なった。

Step-1: ラット肝 105,000 $\times$ g 遠心上清 (460ml) を、同量の 5 mM 2-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol を含む 15mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) で希釈し、同 buffer で平衡化した CM-Toyopearl 650M カラム (8 $\times$ 20cm) に注入した。流速は 100ml/min で、カラムを 2,000ml の同 buffer で洗浄し、蛋白を 3,000 ml の 5 mM 2-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol を含む 60mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) で溶出した。溶出液を、PT-10,000 膜 (cut off 値分子量 10,000) を 8 カセット装着した Lab Cassette System (Millipor 社, Bedford, Mass, USA) を用いて 250ml に濃縮し、さらに YM-5 の膜 (cut off 値分子量 5,000) を装着した Amicon 限外濾過装置 (Amicon, Danvers, Mass., USA) を用いて 50ml に濃縮した。

Step-2: 濃縮した画分を、5mM 2-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol を含む 45mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) で平衡化した Toyopearl HW60S カラム (4 $\times$ 100cm) に注入した。カラムを同 buffer にて流速 2.8ml/min で溶出し、15ml ずつの画分を収集した。集めた各画分の 220 nm での紫外吸収を測定し、SCP₂ 活性のある画分を一緒にし、YM-5 膜を装着した Amicon 限外濾過装置を用いた 2 ml に濃縮した。

5. 蛋白の分析

最終精製 SCP₂ (75 μ g 蛋白量) を 5 mM 2-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol を含む 15mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) で平衡化した Superose HR-12 カラム (1.0 $\times$ 30 cm) (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を装着した fast protein liquid chromatography で分析した。流速は 0.4ml/min とし、220nm の紫外吸収を測定し 500 μ l の画分を集め、各分画の SCP₂ 活性を測定した。SDS-ポリアクリアミド電気泳動は、Laemmli らの方法²²⁾で、10-20% 密度勾配平板ゲルを用いて泳動した。分子量決定用標準蛋白は、cytochrome C の多量体 (オリエンタル酵母社) を用いた。ゲルは Coomassie Brilliant Blue R-250 を用いて染色した。等電点は、Ampholine polyacrylamide gel plate (pH 3.5-9.5) (LKB, Bromma, Sweden) を用いて分析した。pI 決定は、等電点用 pI calibration kit, pH 3-10 (Pharmacia, Piscataway, N. J., USA) と表面電極を用いて行なった。両等電点決定法での結果は一致した。アミノ酸分析のため、逆相高速液体クロマトグラフィーにて試料から 2-mercaptoethanol, glycerol 及び potassium phosphate を除き、得られた試料を 3N-mercaptoethane sulfonic acid で 110°C, 44 時間加水分解した。

表 1. ラット肝 105,000×g 上清からの SCP₂ 精製

試 料	総蛋白 (mg)	総活性 (単位) ^a	比 活 性 (產生 chol. nmol/h/mg)	回収率 (%)	精製度 (倍)
105,000×g 遠心上清	22,300	27,123	1.216	100-	1-
Toyopearl CM-650 M	1,755	34,951	19.9	129-	16-
Toyopearl HW-60 S	3.1	18,714	6,037	69- 54	4,969- 303

^a: SCP₂ 活性単位は、時間あたり 7-dehydrocho-lesterol からの cholesterol の產生が 1 nmol であるものを単位とする。

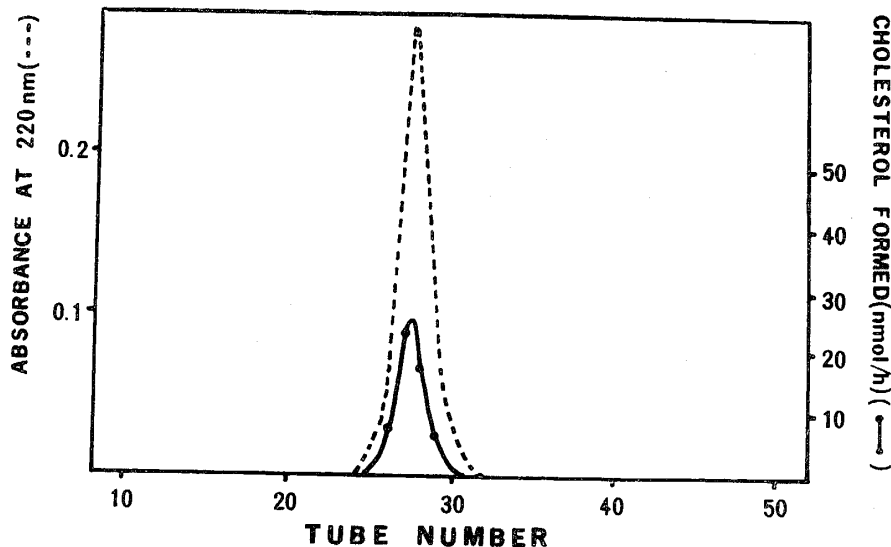


図 1. 精製蛋白の SuperoseHR-12 カラムクロマトグラフィー
精製蛋白 (75μg 蛋白量) を 5 mM 2-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol を含む 15mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) で平衡化した Superose HR-12 カラム (1.0×30cm) に添加した。流速 0.4ml/min で同 buffer で溶出し、500μl 画分ずつ収集した。……, 220nm での吸光度; ●, SCP₂ 活性。

水解物を日立製アミノ酸分析計 835 型で分析した。Tryptophan は、逆相高速液体クロマトグラフィー時の 280 nm の吸光度より算出した。Cysteine は、dithiothreitol で還元し carboxymethyl 化した試料より測定した。精製蛋白の吸光度は日立製ダブルビーム分光光度計 220 A 型を用いて測定した。対照に、5mM 2-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol を含む 45mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) を用いた。蛋白定量は、Bradford の方法²³⁾にて牛 γ-globulin を標準として測定した。

6. 統計処理

有意差検定は Duncan multiple range test によって行なった。

III. 結 果

1. SCP₂ の精製

表 1 に各精製段階の比活性と回収率をまとめて示した。SCP₂ は 4,969 倍の精製度、69% の回収率で精製され

た。ラット肝 105,000×g 遠心上清から精製蛋白までの精製行程は 2 日以内に完了した。450ml のラット肝上清の CM-Toyopearl 650M イオン交換カラムクロマトグラフィーによる第一段階精製は、1 時間以内で行なわれ、この最初の段階で SCP₂ は、16 倍の精製度、129% の回収率で精製された。著明な比活性の上昇が、Toyopearl HW60S による分子ふるいカラムクロマトグラフィーにより得られた。この精製段階で、SCP₂ は 303 倍の精製度、54% の回収率で精製された。

2. 精製蛋白の特性

最終精製蛋白は、SuperoseHR-12 カラムを装着した fast protein liquid chromatography で、単一の対称的な蛋白ピークとして溶出し、SCP₂ 活性と一致した (図 1)。蛋白はまた SDS-ポリアクリアミド電気泳動で単一の蛋白質バンドを示した (図 2)。これらの実験結果は、精製蛋白が均一であることを示唆した。SDS-ポリアクリアミド電気泳動による精製蛋白の分子量は、12,300 で

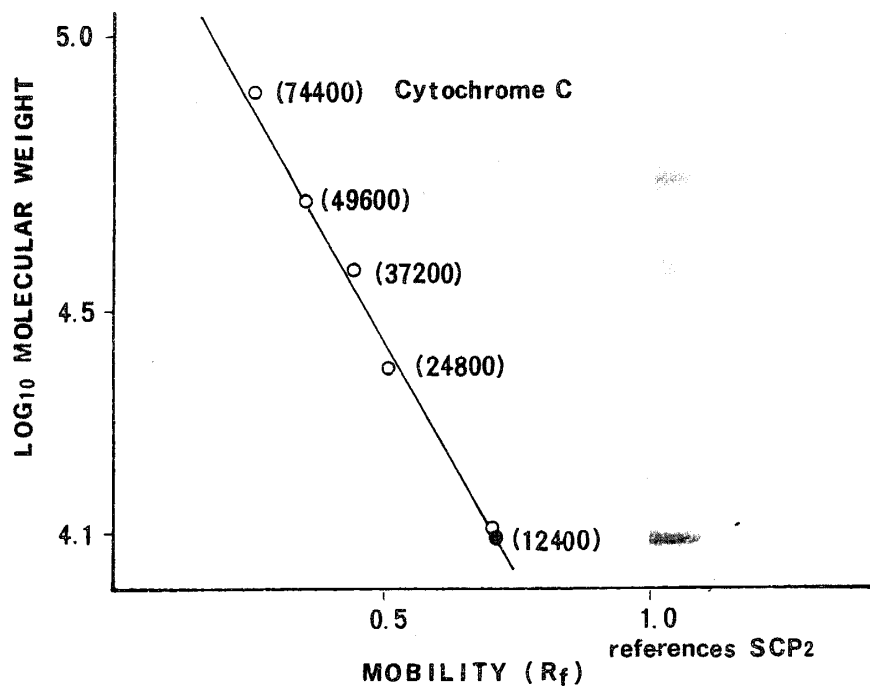


図 2. 精製蛋白の SDS-ポリアクリアミド電気泳動

試料を10-20%密度勾配ポリアクリアミドゲルにて泳動し、Coomassie Brilliant Blue R-250 によって染色した。MOBILITY の単位は、Blomophenol blue の移動度 (1.0) に対する蛋白の移動度の比 (R_f) として表わした。
試料：●, 5 μ g の精製蛋白；○, 分子量決定用標準蛋白 Cytochrome C；hexamer (分子量 74,400), tetramer (分子量 49,600), trimer (分子量 37,200), dimer (分子量 24,800), monomer (分子量 12,400)。

あり、等電点電気泳動分析より等電点は、9.1であった。精製蛋白のアミノ酸分析結果を表 2 に示した。最も多いアミノ酸は lysine で 16.5mol % であった。わずかに arginine と tryptophan を含んでいた。Scallen らの報告した SCP₂ と精製蛋白の間のアミノ酸組成の相関係数は、0.996 であった。精製蛋白の紫外吸収は、216 nm で最大吸収を示し、280nm で低吸収を示した (図 3) が、アミノ酸分析における tyrosine と tryptophan 含量の低値と一致した。

3. ラット副腎皮質の cholesterol 代謝に及ぼす作用

(1) 副腎 mitochondria における pregnenolone 産生に及ぼす SCP₂ の影響：図 4 は、SCP₂ (5 μ g 蛋白量) の存在非存在下における内因性 cholesterol を基質として産生される pregnenolone 量と時間との関係を検討した実験結果である。5 μ g の SCP₂ を加えた時、非添加時に比して明らかに pregnenolone 産生増加が認められた。図 5 は、pregnenolone 産生に及ぼす SCP₂ の蛋白量の影響を検討したものだが、10 μ g の蛋白量まで直線的に pregnenolone 産生が増加した。

(2) 副腎 microsome における cholesterol ester 産

生に及ぼす SCP₂ の影響：図 6 は、SCP₂, 外因性 cholesterol あるいは両者の存在非存在下における [1-¹⁴C] oleoyl-CoA からの cholesteryl [1-¹⁴C] oleate 産生量と時間との関係を検討した実験結果である。反応液中の microsome 画分における内因性遊離 cholesterol と cholesterol ester 含量は、各々 0.92 および 8.40 nmol であった。外因性 cholesterol の非存在下すなわち内因性 cholesterol を基質とした条件下では、[1-¹⁴C] oleoyl-CoA からの cholesteryl [1-¹⁴C] oleate 産生は、40 分間まで時間に比例して増加したが、9.5 μ g の SCP₂ を添加しても、cholesteryl [1-¹⁴C] oleate 産生は非添加時に比して有意な変動は認められなかった。6.25 nmol の外因性 cholesterol を加えると、非添加時に比して、いずれの反応時間においても cholesteryl [1-¹⁴C] oleate 産生が有意に増加した。9.5 μ g の SCP₂ と 6.25 nmol の外因性 cholesterol の両者を加えると cholesterol の単独添加と比して、いずれの反応時間でも有意の cholesteryl [1-¹⁴C] oleate 産生の増加が認められた。図 7 は、外因性 cholesterol 存在非存在下における cholesterol ester 産生におよぼす SCP₂ 添加濃度の影響を検討した

表 2. 精製蛋白及び Scallen らの SCP₂ のアミノ酸組成, 分子量, および等電点の比較

アミノ酸残基	精製蛋白	精製蛋白	SCP ₂ ^a
	モル%	残基数/モル	残基数/モル
Asp (n)	13.0	14	13
Thr	3.6	4	4
Ser	5.9	7	7
Glu (n)	12.7	14	14
Pro	3.0	3	4
Gly	12.3	12	13
Ala	11.8	12	11
1/2 Cys	1.0 ^b	1	1
Val	5.4	6	6
Met	5.2	5	4
Ile	5.9	6	6
Leu	12.3	12	12
Tyr	0.0	0	0
Phe	7.0	7	7
Lys	16.5	17	17
Hiss	0.8	1	1
Arg	0.0	0	0
Trp	1.0 ^c	1	1
分子量		12,300	13,500
等電点		9.1	8.6

^aScallen らによって精製された SCP₂ ^bCysteine に関しては, dithiothreitol による還元後, カルボキシメチル化した試料をアミノ酸分析した成績より 1 残基数/モルと算出した。

Tryptophan は, 逆相高速液体クロマトグラフィーでの 280 nm の吸光度より算出した。

結果を示したものである。外因性 cholesterol が存在しない条件下では, いずれの濃度の SCP₂ も cholesteryl [1-¹⁴C] oleate 産生に明らかな影響を示さなかった。6.25nmol の外因性 cholesterol の存在下では, SCP₂ は用量依存性に cholesteryl [1-¹⁴C] oleate の産生を促進した。外因性にくわえる cholesterol の量を 62.5nmol に増加させた場合も同様に, SCP₂ は用量依存的に cholesteryl [1-¹⁴C] oleate の産生を促進したが, その促進効果は 6.25nmol の cholesterol 添加時と比べてより顕著であった。

つぎに, 外因性に加えた cholesterol の ACAT による代謝に及ぼす SCP₂ の影響をより直接的にみる目的で, [4-¹⁴C] cholesterol を基質として用いて検討を加えた (図 8)。[4-¹⁴C] cholesterol からの [4-¹⁴C] cholesteryl oleate の産生は反応時間とともに増加したが,

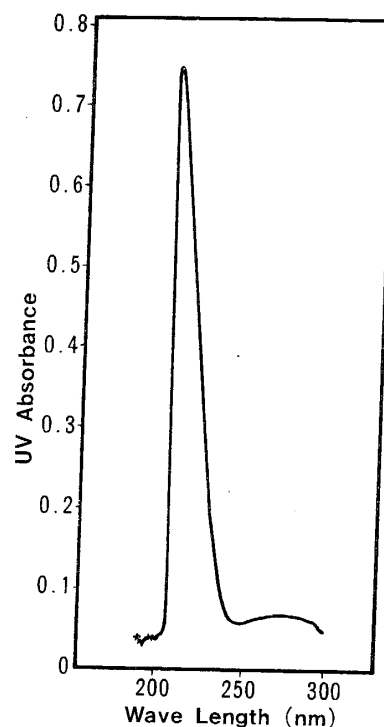


図 3. 精製蛋白の紫外吸収スペクトラム
5mM 2-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol を含む 45mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) 中の精製蛋白 (29μg/ml) のスペクトラムを 190nm-300nm の間で測定した。

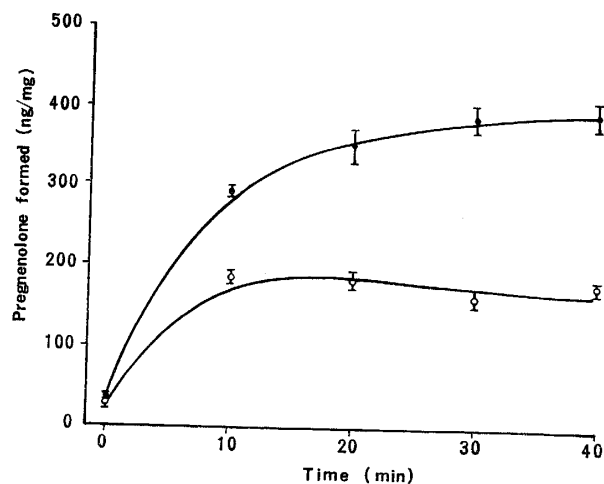


図 4. 内因性 cholesterol からの pregnenolone 産生に及ぼす反応時間の効果
試料: ○, 対照; ●, SCP₂ (5μg 蛋白量)。mean ± S.D. (n=2)

9.5μg の SCP₂ を加えると, [4-¹⁴C] cholesteryl oleate の産生は, 非添加時に比して, いずれの反応時間でも有意に増加した。

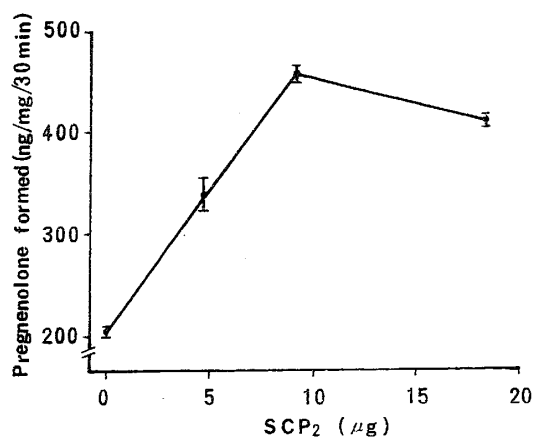


図 5. 内因性 cholesterol から pregnenolone 産生に及ぼす SCP₂ の効果
mean ± S.D. (n=2)

IV. 考 察

細胞内脂質転送蛋白の一種である SCP₂ は cholesterol 代謝の盛んな臓器に広く分布し, cholesterol 代謝の調節因子の一つとして作用することが明らかにされている³⁻⁵⁾。しかし, SCP₂ の精製法については Scallen らが以前に報告したラット肝からの SCP₂ 精製法¹⁴⁾は操作法が煩雑な上に回収率, 精製度とにも必ずしも十分な

ものではなかったため, 今回 SCP₂ の新たな精製法の確立を試みた。Gaylor ら²⁴⁾と Bloj²⁵⁾ らが指摘していたように, SCP₂ は精製過程の途中で凝集し急速に失活する可能性があったので, Poorthuis らの方法²⁶⁾に準じて, 2-mercaptoethanol と glycerol を SCP₂ の安定化剤として用いた。今回確立した精製法の特徴の一つは精製第二段階の Toyopearl HW60S による分子ふるいカラムクロマトグラフィーの過程において, 303倍の著明な精製度の上昇が得られた点である (表 1)。HW-Toyopearl による分子ふるいは, 小さな分子量蛋白の分離に際して明らかなイオン交換効果を示すと報告されており²⁷⁾, 本研究では, SCP₂ の分離と回収に対する buffer のイオン強度の影響を詳細に検討した結果, SCP₂ の至適分離および回収のため, 溶出 buffer として 45mM のモル濃度を選択した。精製蛋白は, SuperoseHR-12 カラムクロマトグラフィー (図 1) と SDS ポリアクリアミド電気泳動 (図 2) の検討結果より均一な蛋白であることが示唆された。上述したように, 今回精製された蛋白は分子量, 等電点, アミノ酸組成等の物理化学的特性において Scallen らの報告した SCP₂ とよく似ており両者は同一のものと考えられた (表 2)。なお今回精製した SCP₂ は普通の蛋白質と異なり 280nm での紫外

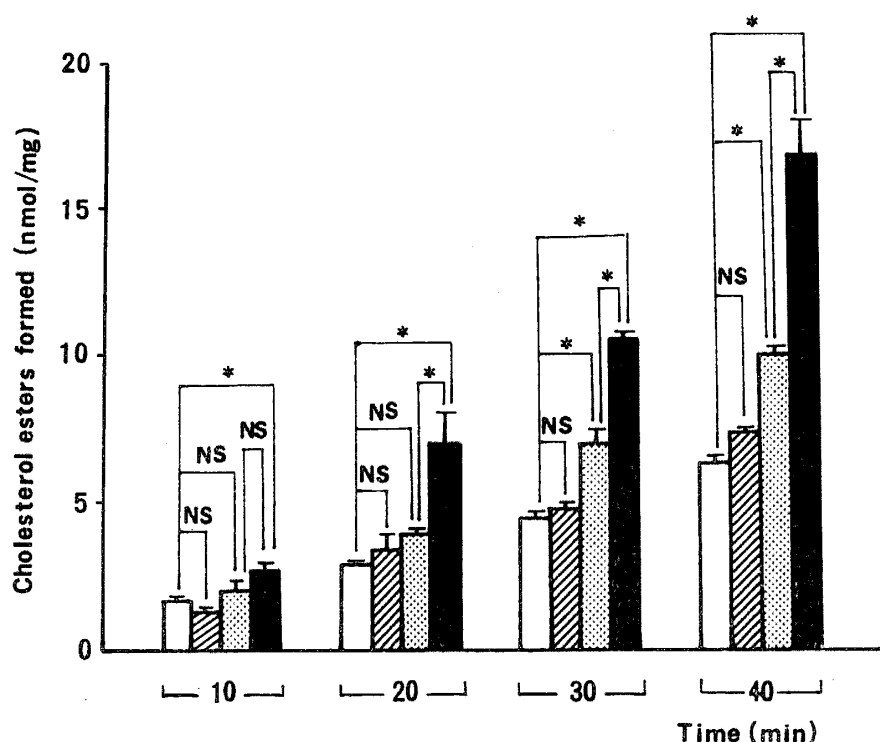


図 6. [1-¹⁴C] oleoyl-CoA から cholesteryl [1-¹⁴C] oleate 産生に及ぼす反応時間の効果

添加試料: □, 対照; ▨, SCP₂ (9.5 μg 蛋白量); ▤, 外因性 cholesterol (6.25 nmol); ■, SCP₂ (9.5 μg 蛋白量) と外因性 cholesterol (6.25 nmol)。mean ± S.D. (n=2), *: p < 0.01, N.S.: 有意差なし。

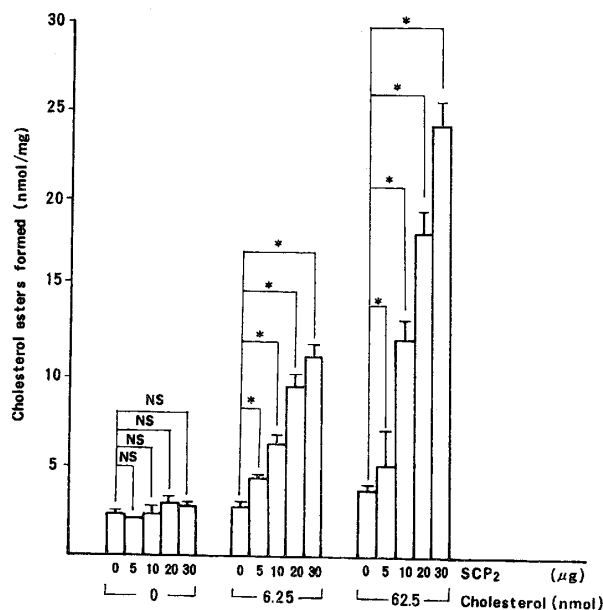


図 7. $[1-^{14}\text{C}]$ oleoyl-CoA からの cholesteryl $[1-^{14}\text{C}]$ oleate 産生に及ぼす SCP₂ 濃度と外因性 cholesterol 濃度の効果
mean $\pm$ S. D. (n=2), *: $p < 0.01$, N. S.: 有意差なし。

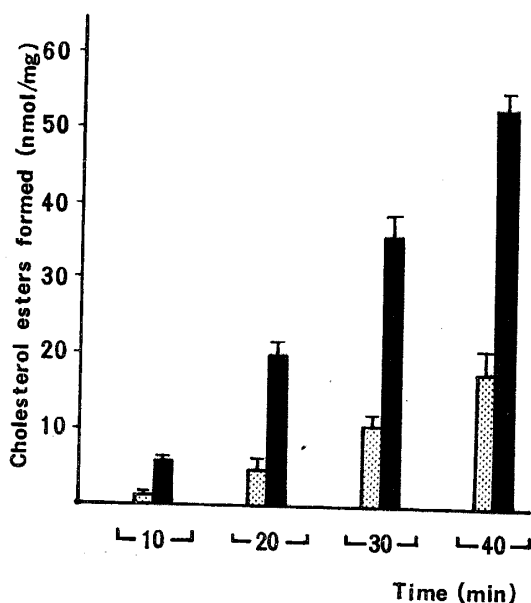


図 8. $[4-^{14}\text{C}]$ cholesterol からの $[4-^{14}\text{C}]$ cholesteryl oleate 産生に及ぼす SCP₂ と外因性 cholesterol の効果

添加試料: , 外因性 cholesterol (6.25 nmol); , SCP₂ (9.5 μg 蛋白量) と外因性 cholesterol (6.25 nmol). mean $\pm$ S. D. (n=3)。

吸収がきわめて低いため、その精製に際しては 220 nm での検出が望ましいと考えられた (図 3)。

ラット副腎皮質細胞における cholesterol の主な代謝

経路は cholesterol からステロイドホルモン産生にいたる過程と、エステル化を受け細胞内脂肪滴中に貯えられる過程の二つである¹²⁾。ラット副腎皮質ステロイド合成の主な場は mitochondria であり、その律速段階は mitochondria 内膜における cholesterol sidechain cleavage enzyme による cholesterol からの pregnenolone 産生反応である^{28,29)}。まず SCP₂ のラット副腎皮質 mitochondria での pregnenolone 産生に及ぼす影響について検討を加えた。ラット副腎皮質 mitochondria には内因性 cholesterol のプールが存在し pregnenolone 産生の基質として用いられる³⁰⁾ことはよく知られている。そこでラット副腎皮質 mitochondria に精製 SCP₂ を添加し内因性 cholesterol からの pregnenolone 産生を見たところ、図 5 に示したように SCP₂ の用量に依存して pregnenolone の産生増加が認められた。同様の成績は Vahouny らも報告しており¹³⁾、SCP₂ が副腎でのステロイド合成の律速段階に参与する可能性を示すものとして注目される。SCP₂ の mitochondria での pregnenolone 産生促進の機序としてどのようなものが考えられるであろうか。mitochondria の cholesterol は大部分が外膜に存在しているのに対して、cholesterol side-chain cleavage enzyme は内膜に存在するため外膜中の cholesterol は cholesterol side-chain cleavage enzyme の基質として利用されるためには内膜への移動が必須とされている³¹⁾。また SCP₂ が細胞内成器間での cholesterol やリン脂質の転送に関与することはすでに肝細胞で報告されている。したがって Vahouny らが指摘している^{32,33)}ように、SCP₂ はラット副腎 mitochondria において外膜から内膜への cholesterol の転送の促進に参与する可能性が考えられる。なおこの点については、いわゆる labile protein³⁴⁾ と考えられ mitochondria の外膜から内膜への cholesterol の転送促進作用を有すると考えられている steroidogenic activator polypeptide³⁵⁾ との異同が問題になるが、SCP₂ とは分子量が異なることから別の蛋白と考えられる。一方 SCP₂ が直接 cholesterol side-chain cleavage enzyme 系に作用し、pregnenolone 合成を促進した可能性も考えられるが、その点に関しては今後の検討が必要と思われる。最近 Trzeciak らは ACTH 刺激によりラット副腎皮質細胞で SCP₂ 産生が増加することを報告した³⁶⁾が、今回の SCP₂ の pregnenolone 産生促進作用とあわせホルモン刺激時のステロイド産生における SCP₂ の役割を考える上で興味深い成績と考えられる。

一方前述したごとく、細胞内 cholesterol の代謝経路としては、もう一つ重要な経路がある。すなわち、小胞

体に存在する acyl-CoA: cholesterol acyltransferase により cholesterol は, cholesterol ester に転換され脂肪滴に貯えられる¹²⁾。そこで microsome 画分を用いて SCP₂ の cholesterol ester 産生に及ぼす影響について検討した。Microsome にも mitochondria 同様に内因性 cholesterol のプールが存在し cholesterol ester の基質として用いられることがすでに明らかにされている¹³⁾。そこで内因性 cholesterol を基質とした cholesterol ester 産生に及ぼす SCP₂ の影響についてまず検討した。ACAT による cholesterol ester 産生の測定法は大別して基質である cholesterol と, oleoyl-CoA の各々の標識化合物を用いる方法がある³⁷⁾が, 前者の方法では内因性 cholesterol からの cholesterol ester の産生をみるのには適していないので, まず後者の方法を用いて実験を行なった。図7に示したごとく SCP₂ の添加濃度を 5 μ g から 40 μ g まで増加させても, また図6に示したごとく反応時間を10分から40分まで延長しても SCP₂ は cholesterol ester 産生には全く影響を与えなかった。このことは SCP₂ が内因性 cholesterol からの cholesterol ester 産生には影響を与えないことを示唆しており, 上述の mitochondria における成績すなわち SCP₂ 添加により内因性 cholesterol からの pregnenogone 産生が増加したと対照的でありきわめて興味深い。ラット副腎 mitochondria 蛋白あたりの遊離 cholesterol 含量は microsome のそれに比べて約10倍ときわめて高いことが報告されており³⁸⁾, 内因性 cholesterol に対する SCP₂ の作用が mitochondria と microsome で異なっていた理由の一つとしては, このような両者での内因性 cholesterol プールの大きさの相違が考えられた。

ところで Goldstein らはラット副腎 microsome においては内因性 cholesterol だけでなく外因性に添加された cholesterol も同様に ACAT の基質として利用されることを報告している¹⁶⁾。そこで外因性 cholesterol 存在下で検討を加えた。添加する外因性 cholesterol 量を一定に保ち反応時間を 40 分迄みたところ外因性 cholesterol の添加は, 非添加時に比して cholesterol ester 産生を有意に増加させた (図6)。この成績は Goldstein らの報告とよく一致している。SCP₂ は上述のごとく内因性 cholesterol からの cholesterol ester 産生に何等の影響も示さなかったが, 外因性 cholesterol と SCP₂ を同時に添加したところ, 外因性 cholesterol 単独添加と比較して著明な cholesterol ester 産生の亢進が認められた (図6)。次に外因性 cholesterol の添加量を変えた時の SCP₂ の添加効果について検討した。図7に示すように 6.25 μ g の外因性 cholesterol の存在下では SCP₂

は添加濃度依存性に cholesterol ester の産生を促進し, しかもその促進効果は外因性に添加する cholesterol の量を 6.25 μ g から 62.5 μ g に増すとより顕著に認められた。これらの成績から SCP₂ が内因性 cholesterol よりむしろ外因性 cholesterol からの cholesterol ester 産生を促進する可能性が示唆された。そこで [4-¹⁴C] cholesterol を基質とする系を用いて外因性 cholesterol からの cholesterol ester 産生に及ぼす SCP₂ の影響を検討したところ, 図8に示したごとく SCP₂ は外因性 [4-¹⁴C] cholesterol からの [4-¹⁴C] cholesteryl oleate の産生を時間依存性に促進し, 上述の可能性が裏付けられた。これらの成績は SCP₂ がラット副腎皮質において ACAT による cholesterol ester 合成の促進因子として作用する可能性を示すとともに, SCP₂ の ACAT 促進効果の機序としては, 基質である外因性 cholesterol の利用率を高めることが考えられた。

以上の成績より, SCP₂ はラット副腎皮質において cholesterol からのステロイド合成および cholesterol ester 合成のいずれの系においても促進作用を有する事が明らかとなり, SCP₂ がラット副腎皮質の cholesterol 代謝に重要な役割を果たす可能性を示した。なお副腎皮質の cholesterol 代謝は周知のごとく各種のホルモン特に ACTH によって調節されており, ACTH は mitochondria での pregnenolone 産生を著明に促進するのに対し, microsome での ACAT による cholesterol ester 産生は逆に抑制することが明らかにされている^{9,39)}。このような ACTH による cholesterol 代謝の調節に SCP₂ がどの様に関与しているのか今後の検討課題と考えられる。

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に深甚の謝意を表します。また終始直接御指導を賜った千葉大学医学部第二内科講師田村泰博士, 千葉大学医学部第二内科助手平井愛山博士, さらに御援助を頂きました千葉大学医学部第二内科学教室内分泌研究班の諸先生方に心から感謝致します。なお本論文は学位審査論文である。

SUMMARY

The purification procedure of sterol carrier protein 2 (SCP₂), one of the intracellular lipid transfer proteins, was newly established and the role of SCP₂ in the cholesterol metabolism of rat adrenal cortex was studied. First of all, SCP₂ was purified approximately 5,000-fold to apparent homogeneity with an overall yield of 69 % from

a 105,000×g supernatant of rat liver homogenates using a two-step fast flow ion-exchange and gel permeation chromatography. The purified protein had a molecular weight of 12,300 as estimated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and had an isoelectric point of 9.1.

The purified SCP2 stimulated, in a time and dose dependent manner, not only the formation of pregnenolone from endogenous cholesterol by a cholesterol side-chain cleavage enzyme in rat adrenal mitochondria, but also the formation of cholesterol esters from cholesterol by acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) in rat adrenal microsomes. The activation of SCP2 on the formation of cholesterol esters was not observed when endogenous cholesterol was used as a substrate. However, it was observed when exogenous cholesterol was added. This activation of SCP2 was dependent on the dose of exogenous cholesterol. These results indicated that SCP2 enhances the formation of cholesterol esters in rat adrenal most likely by modulating the availability of exogenous cholesterol to ACAT.

These experiments demonstrated that SCP2 seems to play an important role in intracellular cholesterol metabolism in rat adrenal cortex.

文 献

- 1) Scallen TJ, Pastuszyn A, Noland BJ, Chanderbhan R, Kharroubi A and Vahouny GV: Sterol carrier and lipid transfer proteins. *Chem Phys Lipids* **38**: 239-261, 1985.
- 2) Zilversmit DB: Lipid transfer proteins: overview and applications. *Methods Enzymol* **98**: 565-573, 1983.
- 3) Chanderbhan R, Kharroubi AT, Noland BJ, Scallen TJ and Vahouny GV: Sterol carrier protein 2: Further evidence for its role in adrenal steroidogenesis. *Endocr Res* **12**: 351-370, 1986.
- 4) Tanaka T, Billheimer JT and Strauss III JF: Luteinized rat ovaries contain a sterol carrier protein. *Endocrinology* **114**: 533-540, 1984.
- 5) Kharroubi A, Wadsworth JA, Chanderbhan R, Wiesenfeld P, Noland B, Scallen TJ, Vahouny GV and Gallo LL: Sterol carrier protein 2-like activity in rat intestine. *J Lipid Res* **29**: 287-292, 1988.
- 6) Scallen TJ, Strikantiah MV, Seetharam B, Hansbury E and Gavey KL: Sterol carrier protein hypothesis. *Federation Proc* **33**: 1733-1746, 1974.
- 7) Seltman H, Diven W, Rizk M, Noland BJ, Chanderbhan R, Scallen TJ, Vahouny GV and Sanghvi A: Regulation of bile-acid synthesis. *Biochem J* **230**: 19-24, 1985.
- 8) Gavey KL, Noland BJ and Scallen TJ: The participation of sterol carrier protein 2 in the conversion of cholesterol to cholesterol ester by rat liver microsomes. *J Biol Chem* **256**: 2993-2999, 1981.
- 9) Boyd GS, McNamara B, Suckling KE and Tocher DR: Cholesterol metabolism in the adrenal cortex. *J Steroid Biochem* **19**: 1017-1027, 1983.
- 10) Brown MS and Goldstein JL: Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science* **191**: 150-154, 1976.
- 11) Gwynne JT, Hess B, Hughes T, Rountree R and Mahafee D: The role of serum high density lipoproteins in adrenal steroidogenesis. *Endocr Res* **10**: 411-430, 1984/5.
- 12) Bisgaier CL, Chanderbhan R, Hines RW and Vahouny GV: Adrenal cholesterol esters as substrate source for steroidogenesis. *J Steroid Biochem* **23**: 967-974, 1985.
- 13) Chanderbhan R, Tanaka T, Strauss III JF, Irwin D, Noland BJ, Scallen TJ and Vahouny GV: Evidence for sterol carrier protein 2-like activity in hepatic, adrenal and ovarian cytosol. *Biochem Biophys Res Comm* **117**: 702-709, 1983.
- 14) Noland BJ, Arebalo RE, Hansbury E and Scallen TJ: Purification and properties of sterol carrier protein 2. *J Biol Chem* **255**: 4282-4289, 1980.
- 15) Bergon L, Gallant S and Brownie AC: Cholesterol side-chain activity and levels of high-spin cytochrome P-450 in adrenal-regeneration hypertension. *Endocrinology* **94**: 336-345, 1974.
- 16) Koritz SB and Kumar AM: On the mechanism of action of the adrenocorticotrophic hormone. *J Biol Chem* **245**: 152-159, 1970.
- 17) Nishikawa T and Strott CA: Steroid concentrations in the outer and inner zones of the adrenal cortex of the guinea pig. *J Steroid Biochem* **20**: 1123-1127.
- 18) Balasubramaniam S, Goldstein JL, Faust JR, Brunschede GY and Brown MS: Lipoprotein-mediated regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase activity and cholesteryl ester metabolism in the adrenal gland of the rat. *J Biol Chem* **252**: 1771-1779, 1977.
- 19) Bligh EG and Dyer WJ: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can Biochem Biophys* **37**: 911-917, 1959.
- 20) Skipski VP, Smolowe AF, Sullivan RC and Barclay M: Separation of lipid classes by

- thin-layer chromatography. *Biochim Biophys Acta* **106** : 386-396, 1965.
- 21) Gamble W, Vaugghan M, Kruth HS and Avigan J: Procedure for determination of free and total cholesterol in micro-or nanogram amounts suitable for studies with cultured cells. *J Lipid Res* **19** : 1068-1070, 1978.
- 22) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** : 680-685, 1970.
- 23) Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* **72** : 248-254, 1976.
- 24) Trzaskos JM and Gaylor JL: Cytosolic modulators of activities of microsomal enzymes of cholesterol biosynthesis. -purification and characterization of a non-specific lipid transfer protein-. *Biochim Biophys Acta* **751** : 52-65, 1983.
- 25) Bloj B, Hughes ME, Willson DB and Zilver-smit DB: Isolation and amino acid analysis of a non-specific phospholipid transfer protein from rat liver. *FEBS Lett* **96** : 87-89, 1978.
- 26) Poorthuis BJHM, Glatz JFC, Akeroyd R and Wirtz KWA: A new highyield procedure for the purification of the non-specific phospholipid transfer protein from rat liver. *Biochim Biophys Acta* **665** : 256-261, 1981.
- 27) Germershausen J and Karkas JD: Preparative high speed gel permeation chromatography of proteins on Toyopearl HW55F. *Biochem Biophys Res Comm* **99** : 1020-1027, 1981.
- 28) Stone D and Hechter O: Studies on ACTH action in perfused bovine adrenals: the site of action of ACTH in corticosteroidogenesis. *Arch Biochem Biophys.* **51** : 457-469, 1954.
- 29) Simpson ER and Boyd G: The cholesterol side-chain cleavage system of bovine adrenal cortex. *Eur J Biochem* **2** : 275-285, 1967.
- 30) Jefcoate CR, McNamara BC and Bibartolomeis MJ: Control of steroid synthesis in adrenal fasciculata cells. *Endocr Res* **12** : 315-350, 1986.
- 31) Mason JJ, Arthur JR and Boyd GS: Regulation of cholesterol metabolism in rat adrenal mitochondria. *Mol Cell Endocrinol* **10** : 209-223, 1978.
- 32) Vahouny GV, Chanderbhan R, Noland BJ, Irwin D, Dennis P, Lambeth JD and Scallen TJ: Sterol carrier protein 2: Identification of adrenal sterol carrier protein 2 and site of action for mitochondrial cholesterol utilization. *J Biol Chem* **258** : 11731-11737, 1983.
- 33) Vahouny GV, Dennis P, Canderbhan R, Fiskum G, Noland BJ and Scallen TJ: Sterol carrier protein 2-mediated transfer of cholesterol to mitochondrial inner membrane. *Biochem Biophys Res Comm* **122** : 509-515, 1984.
- 34) Garren LD, Ney RL and Davis WW: Studies on the role of protein synthesis in the regulation of corticosterone production by adrenocorticotrophic hormone in vivo. *Proc Natl Acad Sci* **53** : 1443-1450, 1965.
- 35) Pedersen, RC and Brownie AC: Cholesterol side-chain cleavage in the ratadrenal cortex: Isolation of a cycloheximide-sensitive activator peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* **80** : 1882-1886, 1983.
- 36) Trzeciak WH, Simpson ER, Scallen TJ, Vahouny GV and Waterman MR: Studies on the synthesis of sterol carrier protein 2 in rat adrenocortical cells in monolayer culture: Regulation by ACTH and dibutyryl cyclic 3', 5'-AMP. *J Biol Chem* **262** : 3713-3717, 1987.
- 37) Spector AA, Mathur SN and Kaduce TL: Role of acyl Coenzyme A: cholesterol O-acyltransferase in cholesterol metabolism. *Prog Lipid Res* **18** : 31-53, 1979.
- 38) Ohno Y, Yanagibashi K, Yonezawa Y, Ishiwatari S and Matsuba M: A possible role of "Steroidogenic factor" in the corticoidogenic response to ACTH; effect of ACTH, cycloheximide and aminogluthethimide on the content of cholesterol in the outer and inner mitochondrial membrane of rat adrenal cortex. *Endocrinol Jpn* **30** : 335-338, 1983.
- 39) Beins DM, Vining R and Balasubramaniam S: Regulation of neutral cholesterol esterase and acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in the rat adrenal gland. *Biochem J* **202** : 631-637, 1982.