

[原著] ラット動脈壁コレステロール代謝における Sterol Carrier Protein 2の関与

伴 俊 明*

(平成2年4月11日受付, 平成2年5月29日受理)

要 旨

生体内の種々のコレステロール代謝において重要な役割を果たすことが明らかにされている細胞内脂質転送蛋白の一種である sterol carrier protein 2 (SCP 2) のラット動脈壁における存在, およびそのコレステロール代謝における役割について検討を加えた。

ラット肝臓ホモジネートの105,000×g可溶性画分より精製した SCP 2 を抗原として家兎を用い抗体を作成, SCP 2 をリガンドとしたアフィニティカラムにより特異的抗 SCP 2-IgG 抗体を精製した。これを一次抗体とし, 二次抗体には ¹²⁵I-抗家兎 IgG 抗体を用いた高感度 Western blot 法によりラット動脈壁中の SCP 2 の存在を検討した。その結果動脈壁可溶性画分中に精製 SCP 2 と分子量および抗原性において同一の蛋白が存在する事が確認された。この Western blot 分析では SCP 2 以外に分子量58KDa の蛋白が認識された。この SCP 2 と交叉する蛋白を熱処理により除去する方法を確立し, enzyme immunoassay (EIA) による SCP 2 の微量定量法を確立した。EIA によりラット動脈壁の各細胞画分における SCP 2 様蛋白の含量を求めた結果, 可溶性画分に最も多く分布した。また精製 SCP 2 をラット動脈壁ミクロソーム画分に添加し, acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) による [¹⁴C] コレステロールからコレステロールエステルの産生に及ぼす影響を検討した。その結果 ACAT によるエステル化反応は SCP 2 の添加により用量依存性および時間依存性に増大した。

以上の成績より, ラット動脈壁には SCP 2 様蛋白が存在し, 細胞内脂質転送蛋白として ACAT によるコレステロールエステル産生に関与する可能性が示唆された。

Key words: sterol carrier protein 2, 動脈硬化, acyl-CoA: cholesterol acyltransferase

略語一覧: SCP 2: sterol carrier protein 2, nsL-TP: nonspecific lipid transfer protein, ACAT: acyl-CoA: cholesterol acyltransferase, LDL: 低比重リポ蛋白, SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, EIA: enzyme immunoassay, BSA: bovine serum albumin, TBS: tris-buffer saline, PBS: phosphate-buffer saline

I. 緒 言

生体の重要な構成脂質の一つであるコレステロールは細胞膜をはじめ各種生体膜の構成成分として形態および機能の維持に必須のものであると同時に, 副腎皮質ホル

モンや性ホルモンなどのステロイドホルモン, あるいは胆汁酸の前駆物質としても重要な役割を果たしている。一方, コレステロールの過剰状態は動脈硬化症のもっとも重要な促進因子として注目されている。近年動脈硬化症を基盤とした心臓循環器系および脳血管系疾患の増加

* 千葉大学医学部内科学第二講座

Toshiaki BAN: Possible Involvement of Sterol Carrier Protein 2 (SCP 2) in Cholesterol Metabolism in Rat Vessel Wall.

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

Received April 11, 1990. Accepted May 29, 1990.

にとまないその病因病態に関する研究が精力的に進められている。

生体において、コレステロールは食餌性に摂取されるほか肝臓で合成され、低比重リポ蛋白 (LDL) として血液中を運ばれる。そしておもに標的臓器の細胞膜上にある LDL レセプターを介して細胞内に取り込まれ、ライソゾームにおいて酸性コレステロールエステラーゼにより遊離型のコレステロールと脂肪酸に分解される。ここでできた遊離コレステロールの一部は小胞体に運ばれ、acyl CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) により再びエステル化されコレステロールエステルとなり細胞内に蓄えられる¹⁾。動脈硬化症のもっとも重要な促進因子は血液中のコレステロールの増加すなわち高コレステロール血症であり、動脈硬化の病変部に認められる主な変化はコレステロールエステルに代表される脂質の沈着であることはよく知られている。動脈硬化症のモデル動物を用いた血管壁脂質代謝の研究により、動脈硬化巣において ACAT による遊離コレステロールからのコレステロールエステルの合成が亢進していることが明らかにされている¹⁻⁴⁾。しかしながら、その詳細については不明な点が多く残されている。

コレステロールは疎水性脂質であり、血液中では両親媒性のアポタンパク質と結合して移動・種々の代謝を受ける。一方細胞内のコレステロールの転送・代謝においても同様な carrier となる物質の存在が予想されていたが⁵⁾、1970 年代後半になりそうした働きをする蛋白質があいついで発見された。これらの蛋白質は細胞内脂質転送蛋白とよばれその一つに sterol carrier protein 2 (SCP 2) がある⁶⁾。SCP 2 は塩基性の比較的低分子の蛋白であり、Wirtz らにより報告された nonspecific lipid transfer protein (nsL-TP) と同一の蛋白であることが明らかにされている^{6,7)}。SCP 2 は、肝臓をはじめ副腎、小腸、卵巣など種々の臓器に存在することが報告されており⁸⁻¹¹⁾、細胞内のコレステロール転送に重要な役割を果たすだけでなく、コレステロールの生合成とその代謝における酵素反応にも深く関与している^{6,12-16)}。すなわちラット肝臓に於いては、SCP 2 が ACAT によるコレステロールエステルの産生を促進する事が明らかにされており、その機序としては基質であるコレステロールの供給を SCP 2 が増加させる可能性が示唆されている¹⁷⁻¹⁹⁾。しかしながら、血管壁に於いてはコレステロール代謝、特に ACAT によるコレステロールのエステル化反応に対する SCP 2 の関与については未だ報告がないばかりか、血管壁における SCP 2 の存在すら明らかでない。そこで今回われわれは、まずラット動脈壁に

SCP 2 が存在するか否かについて検討し、ついでこの蛋白が動脈壁での ACAT によるコレステロールエステル産生にどのような影響を与えるかについて一連の研究を行った。

II. 材料および方法

1. 試薬

[¹²⁵I] anti-rabbit Ig F (ab')₂ fragment from donkey (3.367KBq/ml), nitrocellulose hybridization transfer membranes (0.45μm pore size), および dried milk-membrane blocking agent は Amersham 社 (Cardiff, 英) より購入した。[4-¹⁴C] cholesterol (1.968GBq/mmol), [¹²⁵I] molecular weight markers set (2.202 MBq/μg) は NEN, Research Products 社 (Boston, 米) より購入した。Electrophoresis calibration kit は Pharmacia 社 (Uppsala, 瑞典) より、cholesterol, oleoyl-CoA, p-nitrophenyl phosphate は Sigma Chemical 社 (St. Louis, 米) より、adenosine triphosphate は Boehringer Mannheim 社 (Mannheim, 西独) より、そして Bio-Rad protein dye reagent は Bio-Rad 社 (Richmond, 米) より購入した。Sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) plate (10/20) は第一化学薬品 (株) (東京) より、レントゲンフィルム (Rxo-H) および増感紙 (HR-8) は富士写真フィルム (株) (南足柄, 神奈川) より購入した。マイクロタイタープレートは Greiner & Sohne 社 (Nurtingen, 西独) より、phosphatase-labeled affinity purified antibody to rabbit IgG (H+L) (Goat) は Kierkegaard & Perry Laboratories 社 (Gaithersburg, 米) より、薄層クロマトグラフィプレート (LK5D) は Whatman Chemical Separation (Crifton, 米) より購入した。その他の試薬類は和光純薬社 (大阪) より購入した。

2. ラット肝よりの SCP 2 精製と抗 SCP 2 抗体の作製

SCP 2 はラット肝 105,000×g 上清 (可溶性画分) よりイオン交換カラム、分子ふるいカラムを用いて既報の方法にて精製した¹⁹⁾。SCP 2 の活性は 7-dehydrocholesterol から cholesterol への変換を SCP 2 が促進することを用いた Noland らの方法²⁰⁾に準じて測定した。Terlink らの方法²⁰⁾により SCP 2 を抗原として家兎を免疫後、血清を採取、0.028M NaCl および 0.02% NaN₃ を含む 0.02M Tris-HCl バッファーで透析した。血清中の抗体価は enzyme immunoassay (EIA) により確認した。DEAE Affi-Gel Blue カラム (1 ml 血清/7 ml

DEAE Aff-Gel Blue) を用いて抗血清より IgG 分画を分離, この IgG 分画より SCP 2 をリガンドとした CNBr-activated Sepharose 4B (1.5 mg SCP 2/1 g CNBr-activated Sepharose 4B) を用いたアフィニティクロマトカラムにより特異的抗 SCP 2 抗体を分離した。

3. ラット大動脈壁細胞画分の分離

ラット大動脈壁の各細胞画分, すなわち可溶性画分, ミクロソーム画分, ミトコンドリア画分, ライソゾーム/ペルオキシゾーム画分, および核画分は, Van Amerongen らの方法²¹⁾に準じて分離した。オスの Sprague-Dawley ラット (350-400g) を断頭後, 胸腹部の大動脈を取り出した。これ以後の実験操作は全て 4°C にて行った。取り出した大動脈は 250mM sucrose, 1 mM DTT, および 0.1mM EDTA を含む氷冷した 30mM Tris-HCl, pH 7.4 バッファー (バッファー A) 中にて細断した後, 二倍量のバッファー A でガラス・テフロンホモジナイザーにてホモジナイズした。このホモジネートを 800×g にて 10 分間遠心し, 沈渣を洗浄後バッファー A で再浮遊し核画分とした。上清をさらに 10,000×g にて 20 分間遠心, 沈渣を同様に洗浄・再浮遊しミトコンドリア画分とした。この上清をさらに 20,000×g で 20 分間遠心, 沈渣を同様に洗浄・再浮遊しライソゾーム/ペルオキシゾーム画分とした。最後にこの上清を 105,000×g にて 60 分遠心し, 沈渣を洗浄・再浮遊しミクロソーム画分とし, 上清を可溶性画分とした。各細胞画分の純度はそれぞれの画分のマーカーエンザイムにより検定した。核画分には DNA, ミトコンドリア画分には succinate dehydrogenase, ライソゾーム/ペルオキシゾーム画分には β -N-acetyl glucosamidase および catalase, ミクロソーム画分には cytochrome-C reductase, 可溶性画分には lactic dehydrogenase をマーカーエンザイムとして用いた。

4. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) および Western blot 分析

SDS-PAGE は Laemmli らの方法²²⁾に準じて行った。試料を 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 7% glycerol, 0.001% bromophenol blue を含む 62.5mM Tris-HCl, pH 6.8 バッファーで, 100°C にて 5 分間処理した後, Laemmli らのバッファーシステムを用いた SDS polyacrylamide gradient slab gel (10-20%) にて電気泳動した。ゲル上に泳動された蛋白を semi-dry electroblotting 法によりニトロセルロース膜 (0.45 μ m pore size) 上に転写²³⁾, 膜上の非特異的蛋白結合部位は 20mM Tris-HCl buffer saline, pH 7.6 (TBS) に溶解した 5% dry milk にて 4°C で一晩インキュベートし

てブロックした。ブロックの終了したニトロセルロース膜は室温にて以下の様に抗体処理と洗浄を行った。まず 0.1% Tween-20 を含む TBS (バッファー B) で希釈した特異的抗 SCP 2 抗体と対照のウサギ IgG (125 ng/ml) にて 120 分処理後, バッファー B にてそれぞれ 5 分間, 計 5 回洗浄した。次に, バッファー B で希釈した [¹²⁵I] anti-rabbit IgG (ab')₂ fragment from donkey (3.367 KBq/ml) で 60 分間処理し, 同様の洗浄を行った。最後に蒸留水にて洗浄したのち, 乾燥させた。乾燥ニトロセルロース膜をプラスチックラップで包み, 増感紙付きカセットを用いて X 線フィルムに 48 時間暴露した。

5. Enzyme immunoassay (EIA)

ラット大動脈壁細胞各画分の SCP 2 含量は, Teerlink らの方法²⁰⁾に準じた enzyme immunoassay (EIA) により測定した。各細胞画分の試料は 0.1% (W/V) の bovine serum albumin (BSA) を含む phosphate-buffer saline (PBS) で試料蛋白濃度を 1 mg/ml に希釈し, 85°C にて 5 分間処理, 変性した蛋白を 20,000×g, 10 分間の遠心により取り除いた。こうして作製した試料 0.1 ml を EIA 用マイクロタイタープレートのウェルに入れ, プレートに 37°C の恒温槽で 1 時間インキュベートした後, 0.05% (V/V) Tween-20 を含む PBS (バッファー C) にて 6 回洗浄した。次に, 1% (W/V) の BSA を含むバッファー C にて 50 倍に希釈した特異的抗 SCP 2 抗体 0.1 ml をウェルに入れ, 室温で 1 時間インキュベートした後, バッファー C にて 6 回洗浄した。この特異抗体による処理の後, 1% BSA を含むバッファー C にて 200 倍に希釈した二次抗体, すなわち phosphatase-labeled affinity purified antibody to rabbit IgG (H + L) (Goat) 0.1 ml を全てのウェルに入れ, 室温にて 1 時間インキュベートした。バッファー C にて 6 回洗浄した後, p-nitrophenyl phosphate を溶解した 1 M diethanolamine バッファー, pH 9.8, 0.1 ml を各ウェルにいった。室温にて約 2 時間インキュベートした後, 405-nm での吸光度を MTP-100 Microplate reader (コロナ電気 (株), 茨城) で測定した。

6. Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase によるコレステロールエステル産生の測定

ラット大動脈壁ミクロソーム画分における Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) によるコレステロールエステル産生は, Gavey らの方法¹⁷⁾に準じて [4-¹⁴C] 標識コレステロールからコレステロールエステルへの変換を測定して求めた。各々測定チューブには, 0.5 μ M oleoyl-CoA, ラット大動脈壁ミクロソーム (100 μ g), 0.25mM adenosine triphosphate, および

さまざまな濃度の SCP 2 を添加し、0.1mM EDTA と 250mM sucrose を含む 30mM Tris-HCl バッファー、pH 7.4 で全容量 0.5ml とした。10 分間のプレインキュベーション後、8 nmol の $[4-^{14}\text{C}]$ cholesterol (370-KBq/mol) を溶かした dioxane/1, 2-propandiol (2:1, V/V) 5 μl を加えて反応をスタートさせた。振盪下に 37°C で 2 時間インキュベーションした後、chloroform/methanol (1:2, V/V) 混合液を 1.25ml 加えて反応を止め、脂質を Bligh and Dyer²⁴⁾ の方法にて抽出した。産生された $[4-^{14}\text{C}]$ cholesterol oleate は Skipski²⁵⁾ らの方法により薄層クロマトグラフィーにより分離した。標準品のコレステロールエステルで確認した部分と一致した部位を掻き取り、カウンティングバイアルにいれ、液体シンチレーションカウンター (LKB 社, Turk, Finland) にて測定した。

7. 蛋白定量

蛋白濃度は Bradford の方法²⁶⁾により、 γ -globulin をスタンダードとして測定した。

8. 統計解析

実験結果の解析は、J 3100 SGT コンピューター (東芝, 東京) により “Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programs”²⁷⁾ を用いて行った。統計学的処理は、“t-Test I: Grouped Data” を用いて行った。

III. 結 果

1. ラット大動脈壁細胞可溶性画分における SCP 2 様蛋白の Western blot 分析

図 1 には、ラビットの抗血清からアフィニティカラムにより分離・精製した特異的抗 SCP 2 抗体を用いて行ったラット大動脈壁および肝臓可溶性画分の Western blot 分析結果を示す。SDS-PAGE で泳動され、ニトロセルロース膜に転写されたラット大動脈壁可溶性画分中の蛋白のうち、ふたつの蛋白が抗 SCP 2 抗体により認識された。一つはラット肝臓より作製した SCP 2 と同じ分子量 (12.3kDa) であり、他方の分子量は 58kDa であった。

2. ラット大動脈壁における SCP 2 様蛋白の細胞内分布

(1) EIA 分析のための測定試料の前処理

図 1 で示されるように、われわれの用いたポリクローナルな抗 SCP 2 抗体によりラット動脈壁および肝臓の可溶性画分には SCP 2 以外に 58kDa の蛋白が認識された。EIA による SCP 2 定量にあたっては、この 58kDa の蛋白を何らかの方法で除去する必要があるため、種々

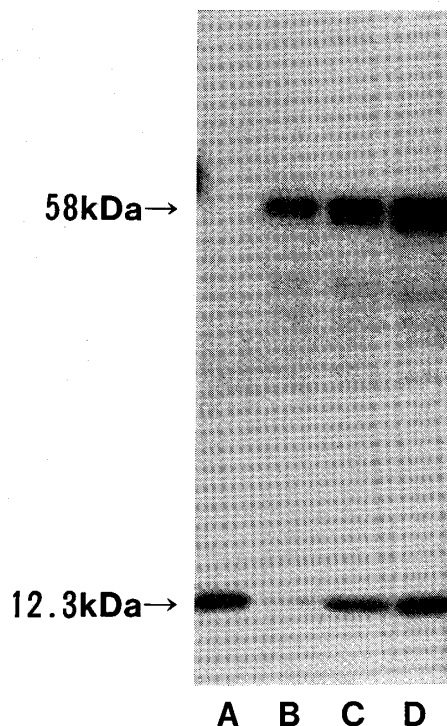


図 1. 精製 SCP 2, ラット肝臓および大動脈壁の 105,000×g 可溶性画分の Western blot 分析。A: 精製 SCP 2 75ng/well, B: ラット大動脈壁 105,000×g 可溶性画分 60 μg /well, C: ラット肝臓 105,000×g 可溶性画分 30 μg /well, D: 同 60 μg /well。

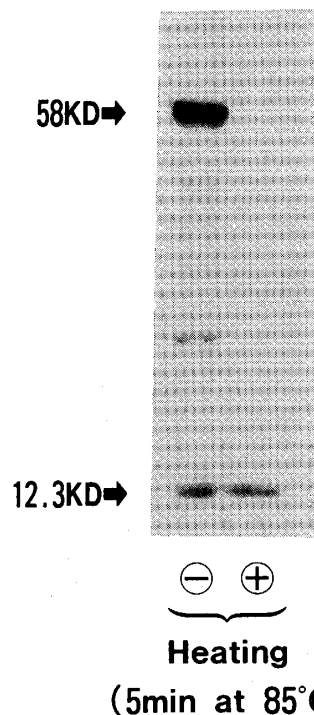


図 2. ラット肝臓 105,000×g 可溶性画分の熱処理 (85°C, 5 分) の影響。50 μg の試料を泳動し、Western blot 分析を行った。右は熱処理を加えた試料、左は加えない試料。

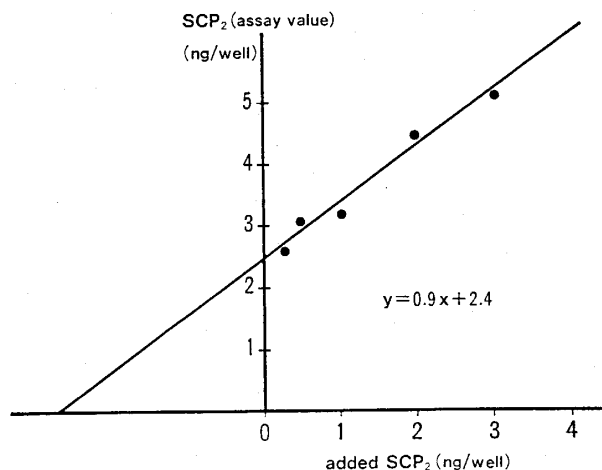


図 3. 熱処理 (85°C, 5 分) における SCP 2 の添加回収実験。横軸は精製 SCP 2 の添加量, 縦軸は SCP 2 の測定値。

表 1. ラット大動脈壁細胞画分における SCP 2 様蛋白の分布

細胞画分	総蛋白量 mg/ml	SCP 2 様 蛋白量 ng/mg protein	SCP 2 様 蛋白の分布 (%)
核	1.96	16±3	6.0±1.4
ミトコンドリア	2.78	19±1	10.3±2.3
ライソゾーム/ ペルオキシゾーム	1.41	30±5	8.2±2.7
ミクロソーム	3.14	17±3	10.4±2.7
可溶性画分 (105,000×g)	37.07	9±3	65.0±6.5

mean±S.D., n=3

検討した結果, 分析試料を 85°C で 5 分間熱処理することにより 58kDa の蛋白が除去されることが明らかになった。図 2 には, ラット肝臓の可溶性画分を 85°C で 5 分間熱処理した試料および非処理試料の Western blot 分析の結果を示す。この熱処理により 58kDa の蛋白は, 完全に消失したのに対し, SCP 2 にはほとんど影響を認めなかった。精製 SCP 2 を用いた添加回収実験より, この熱処理における SCP 2 の回収率は約 90%であった (図 3)。

(2) ラット大動脈壁細胞画分の SCP 2 様蛋白の定量とその細胞内分布

表 1 は, EIA で求めたラット大動脈壁における SCP 2 様蛋白の細胞内分布を示す。これから明らかなように, SCP 2 様蛋白は可溶性画分に最も多量に分布, すなわち全 SCP 2 様蛋白中の 65% が可溶性画分に含まれるのに対し, ミトコンドリアおよびマイクロソーム画分

中の含量は, それぞれ 9.2%, 9.3% と少なかった。SCP 2 様蛋白含量が最も少ないのは核画分で, 全 SCP 2 様蛋白の 6% であった。各分画毎の単位蛋白当たりの SCP 2 様蛋白の含量は, ライソゾーム/ペルオキシゾーム画分がもっとも多く 30ng/mg total protein であった。

3. ラット大動脈壁ミクロソーム画分での ACAT によるコレステロールエステル産生に及ぼす精製 SCP 2 の影響

ラット大動脈壁ミクロソーム画分における外因性 [4-¹⁴C] cholesterol から [4-¹⁴C] cholesteryl ester への変換を, 精製 SCP 2 の存在および非存在下で検討した実験の結果を図 4 に示す。SCP 2 非存在下では, 標識コレステロールからのコレステロールエステル産生は 6 時間まで時間依存性に増加した。これに対し精製 SCP 2 を 9.8μg 添加した時の標識コレステロールエステルの産生は, 非添加時のコントロールに比べて測定したいずれの時間においても約 3 倍に増加した。図 5 には SCP 2 の添加量の標識コレステロールエステル産生に及ぼす影響を示した。精製 SCP 2 は 5.0–50μg の範囲でコレステロールエステルの産生を用量依存性に増加した。一方ラット大動脈壁可溶性画分の添加は, その蛋白量を 2 mg protein/tube まで増量してもコレステロールエステルの産生には影響を与えなかった。

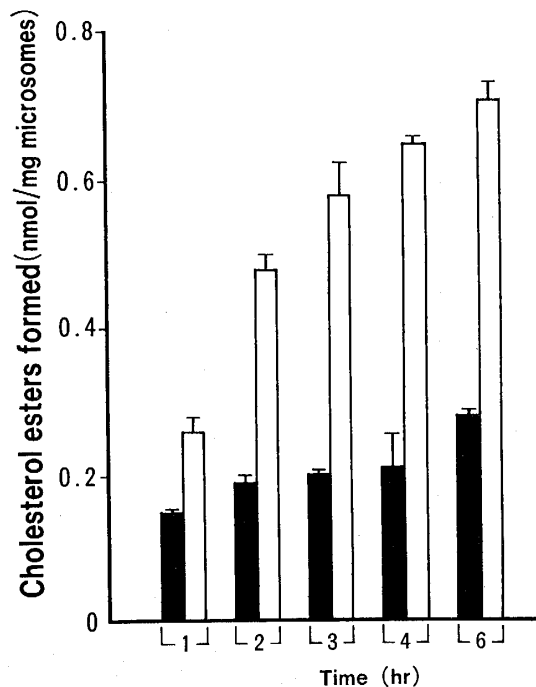


図 4. 精製 SCP 2 存在および非存在下での ACAT によるコレステロールエステル産生。横軸はインキュベーション時間, 縦軸はコレステロールエステル産生量, 黒塗りは SCP 2 非存在下, 白抜きは存在下 (9.6ng/tube) を示す。

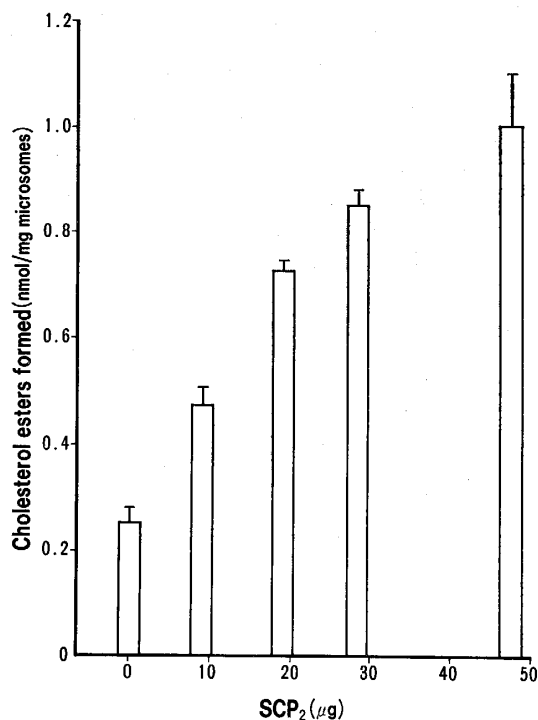


図 5. ACAT によるコレステロールエステル産生に及ぼす精製 SCP 2 の添加量の影響。横軸は精製 SCP 2 の添加量、縦軸はコレステロールエステル産生量を示す。インキュベーション時間：2 時間

IV. 考 察

アフィニティカラムを用いて分離・精製した特異的 SCP 2 抗体を使った Western blot 法を用いてラット動脈壁での SCP 2 存在の有無について検討した。その結果、ラット大動脈壁の可溶性画分より精製した SCP 2 と同一の分子量 (12.3kDa) および同一の免疫原性を持つ蛋白の存在が認められ、ラット大動脈壁に SCP 2 様蛋白が存在することが明らかになった。また、ラット大動脈壁可溶性画分にはこの SCP 2 様蛋白 (12.3kDa) 以外にも、抗 SCP 2 抗体と反応し免疫学的に SCP 2 と交叉する蛋白の存在が認められ、その分子量は 58kDa であった。この 58kDa の蛋白は、ラット肝臓、副腎、および Leydig 細胞において Van der Krift ら²⁸⁾、Chanderbhan ら¹⁰⁾、ならびに Van Noort ら²⁹⁾によりその存在が報告されている 58kDa の分子量を持ち、SCP 2 と共通の抗原性を持つ蛋白とおそらくは同じものである可能性が高い。Van der Krift ら、および Van Amerongen らはこの 58kDa の蛋白が肝臓の可溶性画分のほかペルオキシゾームにも豊富に存在する事を報告している^{28,29)}。最近 Fujiki らはこの両者の蛋白の異同につきラット肝臓を用い遺伝子工学的手法により mRNA の

レベルで検討したところ、抗高脂血症剤の一種であるクロフィブレートとの投与は 58kDa の蛋白の誘導をもたらしたが、SCP 2 の誘導はみられずむしろ抑制される傾向であったと報告している³⁰⁾。いずれにしても、この 58kDa の蛋白の役割あるいは SCP 2 との関連については未だ不明の点が多く残されており、今後この 58kDa の蛋白の性質および機能の解明等についてさらに詳細な検討が必要であろう。

今回の研究では、ラット大動脈壁における SCP 2 様蛋白の細胞内分布を調べるため、新たに EIA を用いた SCP 2 の定量法を確立し検討を加えた。上述したようにラット動脈壁の細胞画分中には SCP 2 様蛋白以外に SCP 2 と交叉する 58kDa の蛋白が含まれているので、まず EIA で試料を分析する前に、この蛋白を除去する必要がある。そのために Teerlink らの方法²⁰⁾に準じて試料の熱処理を行った。熱処理の条件を種々検討した結果、試料を 0.1% (W/V) BSA の存在下で 85°C にて 5 分間処理しさらに 20,000×g で 10 分間遠心することにより 58kDa の蛋白を完全に除去することが可能になった。なお熱処理する生体試料の蛋白濃度は種々検討した結果、1 mg/ml とした。一方この熱処理に於ける SCP 2 自身の回収率は約 90% と満足のゆくものであった。なお EIA 用マイクロタイタープレートについては、抗原である SCP 2 の結合効率に的を絞ってスクリーニングした結果、Greiner & Sohne 社 (Nurtingen, 西独) の製品を用いることとした。EIA の諸条件についてはまず、マイクロタイタープレートへの SCP 2 の結合は 37°C の恒温槽で 1 時間のインキュベートで十分であることが判明した。また抗体の非特異的結合などによるバックグラウンド値の上昇を極力抑えるためプレートの洗浄には 0.05% (V/V) Tween-20 を含む PBS (バッファー C) を用い、さらに一次および二次抗体との反応は 1% (W/V) の BSA に存在下で行った。このようにして確立した SCP 2 の EIA の測定感度はマイクロプレートのウェルあたり 0.1ng と Teerlink らの方法²⁰⁾と比較して高感度であり、血管壁の細胞画分をはじめサンプル量に制限のある各種の生体試料中の SCP 2 の微量定量に有用と考えられる。

今回確立した EIA を用いてラット大動脈壁の各細胞画分における SCP 2 様蛋白の分布を調べたところ、SCP 2 様蛋白が最も多く認められたのは、可溶性画分で全 SCP 2 様蛋白の 65% を占め、ついでミトコンドリアおよびマイクロゾーム画分であり、最も少なかったのは核画分であった。ところで SCP 2 の細胞内分布の変動については Van Noort らが Leydig 細胞を用いた系で

性腺刺激ホルモンにより短時間のうちに SCP 2 の細胞内分布が変化することを明らかにしている³¹⁾。今回明らかになった血管壁の SCP 2 様蛋白の分布様式が恒常的なものなのか、あるいはまたコレステロールエステルが大量に沈着した動脈硬化巣のような病変部においてはその分布様式が変化し得るものなのか等については今後の検討が必要である。ところで各分画毎の単位蛋白当たりでの SCP 2 様蛋白の量は可溶性画分ではなくライゾーム/ペルオキシゾーム画分でもっとも高値であった。従来 SCP 2 の細胞内分布に関しては最も研究が進んでいるラット肝臓においてもペルオキシゾーム画分における成績はほとんど見られず、ラット肝臓のペルオキシゾーム画分には SCP 2 は存在しないとされていた²⁸⁾。ところが最近、Tuneoka ら³²⁾および Keller ら³³⁾は従来法に比べよりすぐれたオキシゾーム画分の調製法を確立し SAR 2 の細胞内分布を検討した結果、ラット肝臓においては SCP 2 が可溶性画分よりはむしろペルオキシゾーム画分により多く分布することを明らかにした。また、SCP 2 の C-末端のアミノ酸配列がペルオキシゾームに存在する蛋白の C-末端に共通して認められる「ペルオキシゾームへの targeting signal」と考えられているアミノ酸配列と同一であることから³⁴⁾、最近では SCP 2 は、ラット肝臓ではペルオキシゾーム蛋白の一種として機能している可能性が示唆されている。血管組織は結合織に富み、かつサンプル量に制限があるため肝臓のようにペルオキシゾーム画分のみを単離してさらに検討を加えることは極めて困難と思われる。血管壁ペルオキシゾームにおける SCP 2 の分布とその機能については今後の研究の進歩を待ちたい。

つぎに血管壁コレステロール代謝に及ぼす SCP 2 の影響を調べるため、ラット大動脈壁ミクロソーム画分を用い、ACAT によるコレステロールからコレステロールエステルの産生への SCP 2 の添加効果を検討した。その結果ラット肝臓から精製した SCP 2 は用量依存性および時間依存性にミクロソーム画分におけるコレステロールエステルの産生を増進させた。SCP 2 がラット肝臓および小腸において ACAT によるコレステロールエステル産生を促進させることはすでに報告されている^{11,17,18)}。また、最近われわれはラット副腎のミクロソーム画分におけるコレステロールエステル産生も SCP 2 の添加により促進されることを明らかにした³⁵⁾。今回の結果は、他の組織と同様にラットの大動脈に於いても SCP 2 が ACAT によるコレステロールエステル産生を促進する可能性を示したものとして注目される。SCP 2 による、コレステロールエステル化反応促進の機

序としてどのようなことが考えられるであろうか。今回の実験では基質であるコレステロールの [¹⁴C] 標識体を用いて外因性に添加されたコレステロールからの ACAT によるコレステロールエステル合成を測定する系をもちいて SCP 2 の添加効果について検討を加えた。SCP 2 は肝臓および副腎皮質のミクロソームにおいて外因性に添加されたコレステロールの ACAT に対する供給を増加させることによりコレステロールエステル産生を促進する事が明らかにされている^{17,35)}。血管壁における ACAT によるコレステロールのエステル化反応を調節する因子についてはいくつかの報告があるが^{1,36-38)}、そのうちで反応の基質であるコレステロールの供給が最も重要と考えられている³⁸⁻⁴⁰⁾。以上のことから、SCP 2 はラット動脈壁においても他の臓器と同様に増加させることによりコレステロールのエステル化反応を促進する可能性が考えられた。しかしながら、その詳細な機構については今後の検討が必要である。

なお今回の実験では、ラット大動脈壁の可溶性画分ではその添加量を 2 mg/tube まで増加させてもミクロソーム画分におけるコレステロールのエステル化反応には影響を与えなかった。2 mg の血管壁可溶性画分中には約 20 ng の SCP 2 様蛋白が含まれている。一方肝臓から精製された SCP 2 の標品を用いた実験の成績では、有意なコレステロールエステルの産生増加には少なくとも μ g のレベルの SCP 2 を必要とすることから、この可溶性画分中の SCP 2 の量ではコレステロールエステル化を促進するには不十分であると考えられた。この量の SCP 2 が生理的にどのような意味があるか、あるいは動脈硬化症等の血管壁のコレステロール含量が大幅に増加するような病態において SCP 2 の量的な変化が起こり得るのか今後の研究が期待される。

今回の研究では、まずラット動脈壁に SCP 2 様蛋白が存在することをはじめて明らかにし、次にラット肝臓より精製した高純度の SCP 2 がラット大動脈壁ミクロソーム画分の ACAT によるコレステロールエステル化反応を促進することを示した。血管壁における SCP 2 様蛋白の生理的役割は不明であるが、今回の成績は動脈硬化症の発症・進展において、とくにコレステロールエステルの産生亢進とその沈着において SCP 2 が何らかの影響を与える可能性を示唆する新たな知見として注目される。今後この可能性を検証するためには、動脈硬化症のモデル動物等を用いて動脈硬化の発症・進展にともなう血管壁中の SCP 2 の量的・質的変動の検討が不可欠であろう。

稿を終えるにあたり、本研究遂行の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。また直接御指導、御援助を賜りました、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平井愛山博士、さらに多大な御援助を頂きました千葉大学医学部第二内科内分泌代謝研究室の諸先生方に深く感謝致します。

なお本論文は学位審査論文である。

SUMMARY

Sterol carrier protein 2 (SCP 2) is a basic and low molecular protein and which is reported to exist in various tissues such as liver, adrenal, intestine and ovary, SCP 2 has been shown to play an important role in intracellular transfer of cholesterol and to participate in several enzymatic reactions of cholesterol metabolism. However, there have been no reports concerning the presence of SCP 2 in the artery. Therefore, the present study was performed firstly to investigate whether the protein may exist in rat aorta, and secondly to clarify the effect of the protein on ACAT-catalyzed cholesterol esterification in rat aorta.

Immunoblot analysis using affinity-purified antibody against SCP 2 showed that SCP 2-like proteins exist in $105,000 \times g$ supernatant of rat aorta. Subcellular distribution of SCP 2-like proteins in rat aorta was determined by enzyme immunoassay (EIA). The SCP 2-like proteins were the highest level in the cytosolic fraction, while in the lowest level in the nuclear fraction. The SCP 2, which was purified from rat liver, stimulated, in a time and dose dependent manner, the formation of [$4\text{-}^{14}\text{C}$] cholesteryl esters from exogenously added [$4\text{-}^{14}\text{C}$] cholesterol in microsomal preparation of rat aorta. These results suggest that SCP 2 might be involved in the formation of cholesteryl esters catalyzed by ACAT in rat aorta.

文 献

- 1) Hashimoto S, Dayton S and Alfin-Slater RB: Esterification of cholesterol by homogenates of atherosclerotic and normal aortas. *Life Sci* **12**: 1-12, 1973.
- 2) St. Claire RW, Lofland HB and Clarkson TB: Influence of duration of cholesterol feeding on esterification of fatty acids by cell-free preparation of pigeon aorta. *Circ Res* **27**: 213-225, 1970.
- 3) Proudlock JW and Day AJ: Cholesterol esterifying enzymes of atherosclerotic rabbit intima. *Biochim Biophys Acta* **260**: 716-723, 1972.
- 4) Brecher PI and Chobani anAV: Cholesteryl ester synthesis in normal and atherosclerotic aortas of rabbits and rhesus monkeys. *Circ Res* **35**: 692-701, 1974.
- 5) Scallen TJ, Schuster MW and Dhar AK: Evidence for a noncatalytic carrier protein in cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem* **246**: 224-230, 1971.
- 6) Noland BJ, Arebalo RE, Handbury E and Scallen TJ: Purification and properties of sterol carrier protein 2. *J Biol Chem* **255**: 4282-4289, 1980.
- 7) Poorthuis BJHM, Glatz JFC, Akeroyd R and Wirtz WA: A new high-yield procedure for the purification of the non-specific phospholipid transfer protein from rat liver. *Biochim Biophys Acta* **665**: 256-261, 1981.
- 8) Chanderbhan R, Tanaka T, Strauss 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 Commun* **117**: 702-709, 1983.
- 9) Tanaka T, Billheimer JT and Strauss JF: Luteinized rat ovaries contain a sterol carrier protein. *Endocrinology* **144**: 533-540, 1984.
- 10) Chanderbhan RF, Kharroubi AT, Noland BJ, Scallen TJ and Vahouny G: Sterol carrier protein 2: Further evidence for its role in adrenal steroidogenesis. *Endocrine Res* **12**: 351-370, 1986.
- 11) Kharroubi A, Wadsworth JA, Chanderbhan RF, Weisenfeld P, Noland BJ, Scallen TJ, Vahouny GV and Gallo LL: Sterol carrier protein 2-like activity in rat intestine. *J Lipid Res* **29**: 287-292, 1988.
- 12) Chanderbhan RF, Noland BJ, Scallen TJ and Vahouny GV: Sterol carrier protein 2: Delivery of cholesterol from adrenal lipid droplets to mitochondria for pregnenolone synthesis. *J Biol Chem* **257**: 8928-8934, 1982.
- 13) Vahouny GV, Chanderbhan RF, Noland BJ, Irwin D, Dennis P, Lambeth JD and Scallen TJ: Sterol carrier protein 2: Identification of adrenalsterol carrier protein 2 and site of action for mitochondrial cholesterol utilization. *J Biol Chem* **258**: 11731-11737, 1983.
- 14) Vahouny GV, Chanderbhan RF, Stewart P, Tombes R, Keyeyune-Nyombi E, Fiskum G and Scallen TJ: Phospholipid, sterol carrier protein 2 and adrenal steroidogenesis. *Biochim Biophys Acta* **834**: 324-330, 1985.

- 15) Seltman H, Diven W, Rizk M, Noland BJ, Chanderbhan R, Scallen TJ, Vahouny G and Sanghvi A: Regulation of bile-acid synthesis: Role of sterol carrier protein 2 in the biosynthesis of 7 α -hydroxycholesterol. *Biochem J* **230**: 19-24, 1985.
- 16) Van Amerongen A, Demel RA, Westerman J and Wirtz KWA: Transfer of cholesterol and oxysterol derivatives by the nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2): a study on its mode of action. *Biochim Biophys Acta* **1004**: 36-43, 1989.
- 17) Gavey KL, Noland BJ and Scallen TJ: The participation of sterol carrier protein 2 in the conversion of cholesterol ester by rat liver microsomes. *J Biol Chem* **256**: 2993-2999, 1981.
- 18) Poorthuis BJHM and Wirtz KWA: Increased cholesterol esterification in rat liver microsomes by purified nonspecific phospholipid transfer protein. *Biochim Biophys Acta* **710**: 99-105, 1982.
- 19) Oeda T, Hirai A, Ban T, Tamura Y and Yoshida S: Use of TSK-Toyopearl gels for the preparative separation of sterol carrier protein 2 from rat liver. *J Chromatogr* **482**: 117-123, 1989.
- 20) Teerlink T, Van der Krift TP, Van Heusden GPH and Wirtz KWA: Determination of nonspecific lipid transfer protein in rat tissues and Morris hepatomas by enzyme immunoassay. *Biochim Biophys Acta* **793**: 251-259, 1984.
- 21) Van Amerongen A, Van Noort M, Van Beckhoven JRCM, Rommerts FFC, Orly J and Wirtz KWA: The subcellular distribution of the nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2) in rat liver and adrenal gland. *Biochim Biophys Acta* **1001**: 243-248, 1989.
- 22) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685, 1970.
- 23) Burnette N: "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**: 195-203, 1981.
- 24) Bligh EG and Dyer WJ: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911-919, 1959.
- 25) Skipski VP, Smolowe AF, Sullivan RC and Barclay M: Separation of lipid classes by thin-layer chromatography. *Biochim Biophys Acta* **106**: 386-396, 1965.
- 26) 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.
- 27) Tallarida RJ and Murray RB: Manual of pharmacologic calculations with computer programs. 2nd ed., pp. 7-18, 131-136. Springer Verlag, New York, NY, 1986.
- 28) Van der Krift TP, Leunissen J, Teerlink T, Van Heusden GPH, Verkleij AJ and Wirtz KWA: Ultrastructural localization of a peroxisomal protein in rat liver using the specific antibody against the non-specific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2). *Biochim Biophys Acta* **812**: 387-392, 1985.
- 29) Van Noort M, Rommerts FFG, Van Amerongen A and Wirtz KWA: Regulation of sterol carrier protein 2 (SCP2) levels in the soluble fraction of rat Leydig cells. Kinetics and the possible role of calcium influx. *Mol Cell Endocrinol* **56**: 133-140, 1988.
- 30) Fujiki Y, Tuneoka M and Tashiro Y: Biosynthesis of nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2) on free polyribosomes as a larger precursor in rat liver. *J Biochem* **106**: 1126-1131, 1989.
- 31) Van Noort M, Rommerts FFG, Van Amerongen A and Wirtz KWA: Intracellular redistribution of SCP2 in Leydig cells after hormonal stimulation may contribute to increased pregnenolone production. *Biochem Biophys Res Commun* **154**: 60-65, 1988.
- 32) Tuneoka M, Yamamoto A, Fujiki Y and Tashiro Y: Nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein-2) is located in rat liver peroxisomes. *J Biochem* **104**: 560-564, 1988.
- 33) Keller GA, Scallen TJ, Clarke D, Maher PA, Krisans SK and Singer SJ: Subcellular localization of sterol carrier protein-2 in rat hepatocytes: its primary localization to peroxisome. *J Cell Biol* **108**: 1353-1361, 1989.
- 34) Morris HR, Larsen BS and Billheimer JT: A mass spectrometric study of the structure of sterol carrier protein SCP2 from rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* **154**: 476-482, 1988.
- 35) Oeda T, Hirai A, Ban T, Tamura Y and Yoshida S: The participation of sterol carrier protein 2 in cholesterol esterification in rat adrenal microsomes. *Endocrinol Jap* **37**: 285-292.
- 36) Proudlock JW and Day AJ: Cholesterol esterifying enzymes of atherosclerotic rabbit

- intima. Biochim Biophys Acta 260: 716-723, 1972.
- 37) Morin RJ, Edralin GG and Woo JM: Esterification of cholesterol by subcellular fractions from swine arteries, and inhibition by amphipathic and polyanionic compounds. Atherosclerosis 20: 27-39, 1974.
- 38) Gillies PJ, Rathgeb KA, Perri MA and Robinson CS: Regulation of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity in normal and atherosclerotic rabbit aortas: Role of a cholesterol substrate pool. Exper Mol Pathol 44: 329-339, 1986.
- 39) Hashimoto S, Dayton S, Alfin-Slater RB, Bui PT, Baker N and Wilson L: Characteristics of the cholesterol-esterifying activity in normal and atherosclerotic rabbit aortas. Circ Res 34: 176-183, 1974.
- 40) Hashimoto S and Dayton S: Studies of the mechanism of augmented synthesis of cholesterol ester in atherosclerotic rabbit aortic microsomes. Atherosclerosis 28: 447-452, 1977.

Better Lifeへの 確かな一歩 Growing DMARD

- 1 リマチルは赤沈、腫脹などRAの活動性の指標を改善する効果が優れています。
- 2 リマチルは特に活動性RAの早期により効果があります。
- 3 リマチルはRAでみられる免疫パラメーターの異常を改善します。

平成元年9月1日より
1回30日分投薬が
認められました。



■効能・効果 慢性関節リウマチ

■用法・用量 本剤は消炎鎮痛剤などで十分な効果が得られない場合に使用すること。通常成人、1回1錠(ブシラミンとして100mg)を1日3回(300mg)食後に経口投与する。なお、患者の年齢、症状、忍容性、本剤に対する反応等に応じ、また、効果の得られた後には1日量1~3錠の範囲で投与する。1日最大用量は300mgとする。

■使用上の注意

一般的注意

- 1) 本剤の投与に際しては、慢性関節リウマチの治療法に十分精通し、患者の病態ならびに副作用の出現に注意しながら使用すること。
- 2) 本剤は消炎鎮痛剤等で十分な効果が得られない場合に使用すること。また、高齢者、手術直後の患者、腎臓機能の低下している患者、全身状態が悪化している患者には原則として投与を避けること。
- 3) 本剤の投与開始に先立ち、主な副作用、用法・用量等の留意点を患者に説明し、特に咽頭痛、発熱、紫斑等の症状がみられた場合には速やかに主治医に連絡するよう指示すること。
- 4) 本剤は遅効性であるので、本剤の効果が得られるまでは、従来より投与している消炎鎮痛剤等は継続して併用することが望ましい。ただし、本剤を6か月間継続投与しても効果があらわれない場合には投与を中止すること。
- 5) 本剤投与前には必ず血液、腎機能、肝機能等の検査を実施すること。投与中は臨床症状を十分に観察するとともに、定期的に血液及び尿検査等の臨床検査を行うこと。

注意 本剤の「副作用」、「使用上の注意」等については、製品添付文書をご参照下さい。

抗リウマチ剤 (劇)指
R リマチル®
RIMATIL® ブシラミン錠
健保適用

〈資料請求先〉



参天製薬株式会社
大阪市東淀川区下新庄3-9-19