

〔原著〕

機能異常リポ蛋白リパーゼ (LPL)

に関する研究

小 林 淳 二*

(平成4年10月29日受付, 平成4年11月16日受理)

要 旨

リポ蛋白リパーゼ (LPL) はカイロミクロンや超低比重リポ蛋白 (VLDL) 中の中性脂肪の水解反応を担う酵素である。その特徴として酵素である LPL は水に溶けているが基質は水に不溶であることがあげられる。このような場合、反応を律速する因子としては酵素量だけでなく基質の界面面積や基質表面に対する吸着力などが問題になる。LPL の機能異常がその成因となる高カイロミクロン血症の成因を解明することは本酵素の機能を解析するうえで重要な手がかりを与えてくれると思われる。そこで、高カイロミクロン血症を呈し脾炎に反復罹患していた患者の LPL の機能を解析しそれに基づく治療法を確立し、その遺伝子解析を行い LPL 酵素蛋白の変異部を明らかにした。本患者のヘパリン静注後血漿 (PHP) 中には LPL 酵素蛋白が存在した。この LPL は水溶性基質である tributyrin を水解するが、脂質界面を形成する TritonX-100 にて乳化した triolein (以下 Triton X-100-triolein) に対して水解能を示さず超低比重リポ蛋白 (VLDL) との結合も見られなかったことから脂質界面認識に異常を有すると考えられた。リゾリン脂質を用いて triolein を乳化し基質を作成したところ、患者 LPL は結合し水解した。また中鎖中性脂肪 (MCT) を用いて triolein を乳化し作成した基質にも水解活性を示した。本患者に MCT を経口投与しガスクロマトグラフィーを用いて脂肪酸分析を行った結果、投与された MCT はカイロミクロンや VLDL 中に取込まれていることが判明した。このとき血清中性脂肪値は著明に低下した。その機序として投与された MCT の一部が基質のリポ蛋白中にとりこまれ、患者 LPL による中性脂肪の水解を促進する可能性が考えられた。

本患者の末梢血リンパ球より採取した DNA を分析した結果、LPL の遺伝子の1595番目の塩基にはシトシンからグアニンへの変異がヘテロ型に存在することが判明した。この結果、LPL を構成する448個のアミノ酸のうち447番目のセリンに相当するコドンが停止コドンに置換されることが示唆された。本患者の脂肪組織より得た LPLcDNA にも、同様の変異が確認された。本変異を有する LPLcDNA を発現させると、tributyrin に対する水解活性は正常に存在したが Triton X-100-triolein に対する水解活性は著明に低下していた。またリゾリン脂質や中鎖中性脂肪のひとつである tricaprין にて乳化した triolein に対して正常な LPL と同等の水解活性を示した。したがって、本変異が患者 LPL にみられた脂質界面認識異常に関与することが示唆された。

Key words: リポ蛋白リパーゼ (LPL), I 型高脂血症, 脂質界面認識, triolein, tributyrin, 短鎖中性脂肪, 長鎖中性脂肪, Lysophosphatidyl-choline 中鎖中性脂肪, LPL 遺伝子, LPL cDNA, Cosl cell

* 千葉大学医学部内科学第二講座

Junji KOBAYASHI: A study of Functionally Defective Lipoprotein Lipase.

The Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Chiba University, Chiba 260.

Received October 29, 1992, Accepted November 16, 1992

略語一覧: LPL, リポ蛋白リパーゼ; MCT, medium chain triglyceride; LysoPC, lysophosphatidyl choline; VLDL, very low density lipoprotein; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PI, phosphatidylinositol

I. 緒 言

中性脂肪の水解機構は大きく分けてリパーゼ酵素の量, 性質, 基質の物理化学的性質および酵素と中性脂肪の結合の調節などがあげられる。リポ蛋白リパーゼ (LPL) はカイロミクロンや超低比重リポ蛋白 (VLDL) の中性脂肪の水解を担う酵素である。その特徴として酵素である LPL は水に溶けているが基質は水に不溶であることがあげられる。近年, LPL の遺伝子構造が明らかにされ, それに基づき LPL 酵素蛋白のアミノ酸配列が解明された。その構造と機能の関係についてさまざまな仮説が提唱されている¹⁻⁶⁾がその詳細は未だ明らかにされているとは言い難くアミノ酸の性質や構造上の homology からその機能部位を推測することの限界を見極める必要があると思われる。従って, LPL の構造と機能の関係を明らかにするために LPL が欠損した病態を把握し, 詳細に解析することはこの問題について有益な情報を与えてくれると思われる。図 1 は高中性脂肪血症の症例を対象としてそのヘパリン静注後血漿中の LPL の酵素蛋白と酵素活性の関係を示したものである。大部分の症例で両者の関係は正相関を示す。すなわち高中性脂肪血症の症例で LPL の酵素活性が低いことは酵素量が少ないことを意味する。一方, LPL の酵素蛋白が正常に存在しながら活性が見られない症例が存在した。すなわち, LPL 酵素の機能異常がその成因となる高中性脂肪血症の症例が存在することが示唆される。

従来より種々の検討により, 機能を考慮した LPL の分子モデルが提唱されている (図 2)。すなわち LPL はエステル結合に作用しこれを分解する活性中心部位と, 水に不溶な基質の中性脂肪が形成する脂質界面を認識する界面認識部位を別々に有し, tributyrin などの疎水性が低く脂質界面を有しない短鎖脂肪酸エステルの水解は前者の活性中心部位のみによって行われ, triolein などの疎水性が高く, 反応液中で脂質界面を形成する長鎖脂肪酸エステルの水解は後者の界面認識部位によって認識されてから前者の活性中心部位によってエステル結合の分解をうけるであろうというものである⁷⁻⁹⁾。そこで, われわれは上述した分子構造モデルに従って, 14 歳の高カイロミクロン血症の症例にみられた機能異常 LPL の性質の解明を試み, 高中性脂肪血症の発症との関係を明らかにしたうえで, 本症例が治療可能であるひ

とつの疾患単位であることを確立するために遺伝子工学的手法を用いて LPL 遺伝子上の異常を解明し, さらに治療面への応用についても検討した結果を報告する。

II. 実験材料およびその方法

実験材料: Heparin-Sepharose, phenyl-Sepharose は Pharmacia 社, triolein, tributyrin, lysophosphatidyl choline, phosphatidyl choline, tricaprln, 牛血清アルブミン (grade V) は Sigma 社, AmpliTaq DNA polymerase は Perkin Elmer Cetus 社, T7 DNA polymerase は Promega Biotek 社, Mouse mammary leukemia virus reverse transcriptase は Bethesda Research Laboratory 社, tri [1-¹⁴C] oleoyl glycerol (50mCi/mmol), tri [1-¹⁴C] butyryl glycerol (43.8mCi/mmol), [α -³⁵S] dATP (1325 Ci/mmol) は New England Nuclear より購入した。

脂肪負荷後ヘパリン静注試験: 脂肪 540Cal 含有するスープを経口摂取した 2 時間後にヘパリン 50U/kg 静注し, 0.15, 30, 60 分後に採血して血清中の TG 値の変動を測定した。

ヘパリン静注後血漿 LPL の精製: ヘパリン 50U/kg を静注 10 分後に採血して得られた血漿 30ml を 15ml の heparin-Sepharose カラムに apply し, 0.4M NaCl, 30% グリセロール, 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) および 0.75M NaCl と 30% グリセロールを含有する 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて洗浄後 1.6M NaCl と 30% グリセロールを含有する 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて溶出された画分を 2ml の phenyl-Sepharose カラムに apply し, 30% グリセロールを含有する 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて洗浄後, ヘパリン (50 μ g/ml) と 30% グリセロールを含有する 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて溶出した。

triolein 基質液の調整: 基質液は triolein 100 mg, tri [1-¹⁴C] oleoyl glycerol (50 μ Ci/ μ mol, New England Nuclear) 10 μ Ci, 1M Tris-HCl (pH=8.4) 7.5 ml, 0.2% Triton X-100 7.5 ml を添加後, 超音波処理 (Ultrasonicator, トミー精工社) を 25W, 4°C, 10 分間行い, 20% 牛血清アルブミン (Sigma 社) 7.5ml を添加し作成した。

LPL 活性の測定: LPL 活性は Triton X-100 を用いて乳化した triolein, lysophosphatidyl choline (Lyso-

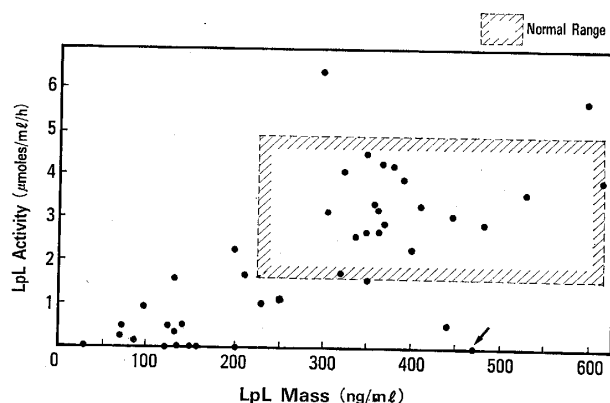


Fig. 1. The relationship between lipoprotein lipase activity and mass from postheparin plasma of hypertriglyceridemia. $\square$ shows a range of LPL activity and mass from postheparin plasma of normal subjects.

PC) を用いて乳化した triolein を基質として測定した。反応液は tri $[1-^{14}\text{C}]$ oleyl glycerol ($0.033\mu\text{Ci}$), triolein ($330\mu\text{g}$), 0.02% TritonX-100 (または $16.5\mu\text{g}$ の Lyso PC), 2% 牛血清アルブミン, 0.1M Tris-HCl (pH 8.4) を含有しこれに精製した LPL を $50\mu\text{l}$ と精製アポ蛋白 CII $0.5\mu\text{g}$ を加え, 総量 $250\mu\text{l}$ として 37°C で 60 分インキュベーションした。遊離された $[1-^{14}\text{C}]$ oleic acid の抽出は Belfrage and Vaughan の方法¹⁰⁾にしたがって行い, methanol: heptane: chloroform (1.45: 1.25: 1) 混液 3.25ml に 0.1N の NaOH を 1ml 加えて反応を停止させた後, 激しく振とうし 1500g にて 5 分間遠心したのちにその上清 1ml に Scintillator を 8ml 加え, 液体シンチレーションカウンター (toluen: Triton X-100 = 3: 1, diphenyloxazole 1%, 1.4 bis $[2-(5\text{ phenyloxazolyl benzene})]$ 0.025%) を用いて放射活性を測定し単位容量あたり単位時間に遊離した脂肪酸の量をもって活性とした。

LPL 酵素蛋白量の測定: LPL 酵素蛋白量は Goers ら¹¹⁾の方法に準じて anti-bovine milkLPL monoclonal antibody と anti-bovine milk LPL polyclonal antibody を用いた sandwich-enzyme immunoassay 法にて測定した¹²⁾。

PHP 中 LPL 活性の測定: 反応液は, tri $[1-^{14}\text{C}]$ oleyl glycerol ($0.033\mu\text{Ci}$), triolein ($330\mu\text{g}$), 0.02% TritonX-100, 2% 牛アルブミン, 0.1M Tris-HCl (pH 8.4), ヘパリン静注10分後に採血してえられた血漿 $10\mu\text{l}$ からなり, 精製アポ CII $0.5\mu\text{g}$ を加え総量 $250\mu\text{l}$ として, 37°C , 60分インキュベーションした。遊離された $[1-^{14}\text{C}]$ oleic acid は上述した方法にて抽出分離し, そ

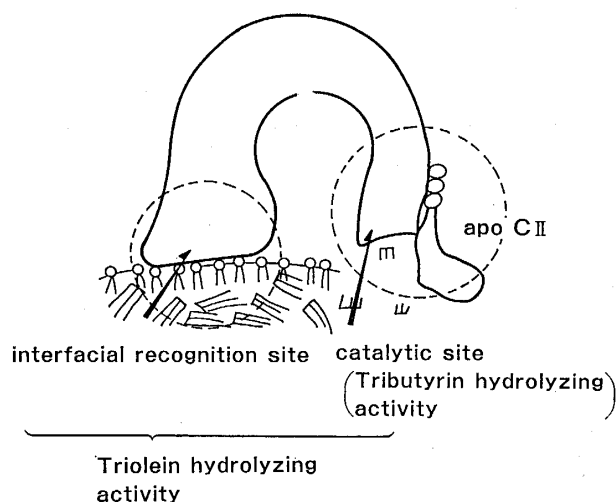


Fig. 2. The proposed structure of human lipoprotein lipase.

の放射活性を測定しリパーゼ活性とした。LPL 活性は求めたリパーゼ活性より 1M NaCl 存在下でのリパーゼ活性を差引いてもとめた¹³⁾。

エステラーゼ活性の測定: 反応液は Tri $[1-^{14}\text{C}]$ butyryl glycerol (0.025mM), tributyrin (0.4mM), 1% 牛アルブミン, 0.1M Tris-HCl (pH 8.4) に $50\mu\text{l}$ LPL を加え, 総量 $250\mu\text{l}$ として, 37°C , 60分インキュベーションして行った。遊離した $[^{14}\text{C}]$ butyric acid を上述した方法で抽出し, その放射活性を測定した。

Tri $[1-^{14}\text{C}]$ oleyl glycerol labeled chylomicron ($[^{14}\text{C}]$ chylomicron) の水解: chylomicron への tri $[1-^{14}\text{C}]$ oleyl glycerol の labeling は Fielding らの方法¹⁴⁾に従って, dimethyl sulfoxide を用いて行った (比活性: $0.1\mu\text{Ci}/\text{mg}$ triglyceride)。反応液は $[^{14}\text{C}]$ chylomicron (TG = $250\mu\text{g}$, $0.025\mu\text{Ci}$) 1% 牛アルブミン, 0.1M Tris-HCl (pH 8.4) からなり, これに精製した LPL を加え, 総量 $250\mu\text{l}$ として, 37°C で 60 分間インキュベーションした。遊離された脂肪酸は上述した方法にてその放射活性を測定した。

LPL による phospholipids-, lysophospholipids-emulsified $[^{14}\text{C}]$ triolein 水解の測定: tri $[1-^{14}\text{C}]$ oleyl glycerol $2\mu\text{Ci}$, trioleyl glycerol 40mg , phosphatidyl choline (PC), phosphatidyl ethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), lysoPC lysoPE, あるいは lyso PI 2mg を添加し N_2 ガスにて evaporate して, 1M Tris-HCl (pH 8.4) 2ml を添加後 Ultrasonicator (トミー精工社) にて 4°C , 25W, 10分間超音波処理した後に, 20% 牛アルブミンを添加し基質とした。リパーゼ活性測定の反応液は, この基質 $75\mu\text{l}$ と上記の方法したがって作製した LPL 10 units esterase (= 1000nmoles/h

tributylin hydrolyzing activity) に apolipoprotein CII 0.5 μ g を加え、総量250 μ l として 37°C で60分間インキュベーションした。遊離された [14 C] oleic acidは上述した方法にしたがって抽出分離し、その放射活性を測定した。

LPL と VLDL の Sepharose 4B カラムによるゲル濾過法: カラムサイズ 1 $\times$ 25cm の Sepharose 4B カラムを 30%グリセロール含有 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて平衡化し、VLDL (2mg/ml) または LPL 50 units esterase=5000 nmoles/h tributyrin hydrolyzing activity) を含有する30%グリセロール, 10mM リン酸緩衝液0.6ml を apply し同じ緩衝液にて 1cm/15分の速度で溶出した。

LPL と lysophosphatidyl choline (lysoPC) vesicle の Sepharose 4B カラムによる分画: Sepharose 4B (カラムサイズ1.0 $\times$ 25cm) を30%グリセロール含有10mM リン酸緩衝液 (pH=7.4) にて平衡化した。このカラムに lysoPC (2mg/ml) と患者および健常人 LPL (50 units esterase=5000nmoles/h tributyrin hydrolyzing activity) を含有する30%グリセロール, 10mM リン酸緩衝液0.6ml を apply して同じ緩衝液にて 1cm/15min の速度で溶出した。

Tricaprin-emulsified [14 C] triolein 水解活性の測定: Tri [1- 14 C] oleoyl glycerol 2 μ Ci, trioleoyl glycerol 40mg, tricaprin 0.4~4 mg のヘキサン溶液を混和したのち N₂ガスにて evaporate し、これに 1M Tris-HCl (pH 8.4) 2ml を添加したのちに Ultrasonicator (トミー精工社) を用いて 4°C, 25Wで10分間超音波処理したものに20%牛アルブミン 2ml を加えて基質とした。リパーゼ活性は前述した方法にしたがって測定した。

カイロミクロン中の脂肪酸組成の分析: 長鎖トリグリセリド10g, 中鎖トリグリセリド7.5gを経口負荷2時間後に採血しその血清中よりカイロミクロンを分離した。その脂肪酸組成は、0.6N 水酸化ナトリウム含有メタノール液にてメチル化後、Shimadzu Gas Chromatography GC-9A を用いてカラム温度は160°C で注入温度は200°C で N₂ガス流量は55ml/min の条件で行った。

LPL 遺伝子の解析: genomicDNA は EDTA 採血によりえられた末梢血リンパ球より採取した。LPL 遺伝子の増幅は 1~10までの各エクソンについて Polymerase Chain Reaction (PCR) 法¹⁵⁾を用いて行った。Thermocycler (Ericomp, San Diego, CA) を用いて 94°C にて 1分, 55°C にて 1分, 72°C にて 2分を30サイクル行うことにより得られたサンプルを 1%アガ

ロースゲルに apply し 80 V にて 40 分間電気泳動を行うことにより得られた DNA の塩基配列を [α - 35 S] dATP と T7DNA polymerase を用いて direct sequence¹⁶⁾を行い解析した。

脂肪組織中の LPLmRNA の採取と cDNA の作成: 臀部脂肪組織 2g より Guanidine isothiocyanate を用いて total RNA を採取した¹⁷⁾。得られた total RNA より random hexamer, dNTPs, RNasin, M-MLV reverse transcriptase を用いて cDNA を作成した。さらに, specific primers, Taq DNA polymerase, dNTPs を用いて Polymerase Chain Reaction (PCR) を行い, 目的とする LPL の cDNAを増幅し, 得られた cDNA を PUC119 plasmid に組み込み増幅し, 塩基配列の解析を行った。

LPL 酵素蛋白の発現: 脂肪組織より抽出された RNA をもとに合成された LPL の cDNA を expression vector pCDE に組み込み, DEAE-dextran¹⁸⁾を用いて Cos1 cell に transfection し96時間後に culture media を採取し, medium 中に分泌された LPL の酵素活性をtributylin, Triton X-100-triolein, Lyso PC-triolein, MCT-triolein を基質として測定し, また酵素蛋白量を先に述べた方法で測定した。

III. 結 果

症例: 14歳, 女兒。身長140cm, 体重29kg, 12歳より肺炎を反復し, 近医にて高脂血症を指摘され, その精査のため来院した。血清総コレステロール (TC) 値420mg/dl 中性脂肪 (TG) 値 2260 mg/dl, HDL-コレステロール値32mg/dl を呈した。また血清アポリポ蛋白値はそれぞれ AI 109mg/dl, B 263mg/dl, CII 10.2mg/dl であった。

LPL の heparin-Sepharose カラムからの溶出 profile (図3): ヘパリン静注後血漿 (PHP) から heparin-Sepharose カラムを用いて LPL の精製を行った時の溶出 profile を示す。健常者では1.6M NaCl での溶出画分に triolein 水解活性を認めたが患者では認められなかった。一方, 本画分は水溶性基質である tributyrin に対して水解活性を示した。

PHP 中の LPL 画分と VLDL との結合能: LPL と VLDL との結合をゲル濾過法を用いて検討した (図4)。健常人の PHP 由来の LPL と VLDL とを pre-incubation した後に Sepharose 4B カラムでゲル濾過を行った。図4Bに示すごとく LPL が溶出される画分の他に VLDL が溶出される画分にも一致して認められた。このことは健常人の LPL が VLDL と結合する

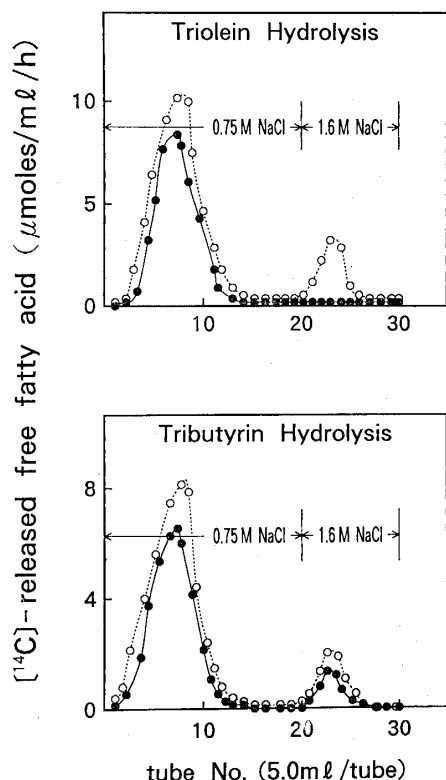


Fig. 3. Elution profile of LPL from a normal control and the patient from heparin-Sepharose. Postheparin plasma from patient and a normal control (30 ml) were applied to a heparin-Sepharose column (10ml). The column was washed with phosphate buffer (pH=7.4) containing 0.4 M NaCl and 30% glycerol. Then the concentration of NaCl was raised to 0.75 M and elution was continued until the absorbance of eluate decreased to <0.01. Then the concentration of NaCl was raised to 1.6 M. Triolein and tributyrin hydrolyzing activities in fractions of eluate were determined with tri [1- 14 C] oleoyl glycerol and tri [1- 14 C] butyryl glycerol, respectively, as substrates. ○---○, control; ●—●, patient.

ことを示している。一方、本患者 PHP 由来の LPL を用いて同様の検討を行うと tributyrin 水解活性は VLDL が溶出される画分には認められず、LPL を単独で apply し溶出した画分にのみその活性を認めた。

LPL の chylomicron-triolein, PC-, PE-, PI-emulsified triolein に対する水解能 (図 5): PHP から得られた LPL 画分の chylomicron-triolein, PC-, PI-, PE-emulsified triolein に対する水解能は健常者 LPL に比較して triolein 水解活性が著明に低下していた。

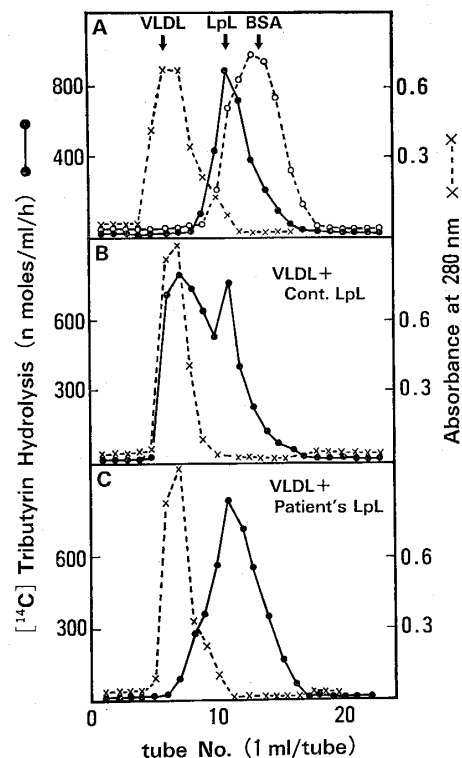


Fig. 4. Gel filtration of LPL and VLDL on Sepharose 4B.

The reaction mixture containing purified LPL (50 units esterase activity) and VLDL (10 mg triglyceride) in a final volume of 0.5 ml was applied to a column (1.0×25 cm) of Sepharose 4B. A, Elution profile of 1 mg triglyceride of VLDL. B, Elution profile of a mixture of 1 mg triglyceride of VLDL and 50 units of esterase of the normal control LPL incubated at 37°C for 5 min. C, Elution profile of a mixture of 1 mg triglyceride of VLDL and 50 units of esterase of the patient's LPL incubated at 37°C for 5 min.

The eluate was monitored for tributyrin hydrolyzing activity and absorbance at 280 nm.

LPL の lysoPC-, lysoPI-, lysoPE-emulsified triolein に対する水解能: 基質として lysoPC, lysoPI, lysoPE-emulsified triolein を用いて同様の検討を行うと本患者の LPL は健常者のものと比較してそれぞれ、106%, 113%, 95%とほぼ同等の水解活性を示した (図 6)。

LPL と lysoPC-emulsified triolein の結合に関する検討: 本患者の PHP 中の LPL 画分と lysoPC-emulsified triolein を Sepharose 4B カラムに apply し、ゲル濾過を行い、LPL の溶出を tributyrin 水解活性にてモニターした (図 7)。両者を単独で apply すると、本患

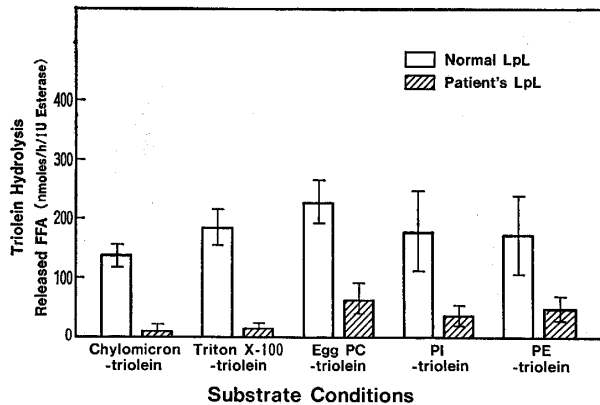


Fig. 5. Hydrolysis of triolein in various condition by LPL from normal control and the patient. Each reaction mixture contained one unit of esterase of LPL of normal control and the patient purified by chromatographies on heparin-Sepharose, 0.5 μ g of apo CII, 5 mg of BSA and [14 C]-triolein labelled chylomicrons (250 μ g of triglyceride) or [14 C] triolein (330 μ g) emulsified with Triton X-100 or various phospholipids. The preparation of these substrates are described in methods. Values are mean $\pm$ SD for triplicate determinations. PC, phosphatidylcholine; PI, phosphatidylinositol; PE, phosphatidyl ethanolamine.

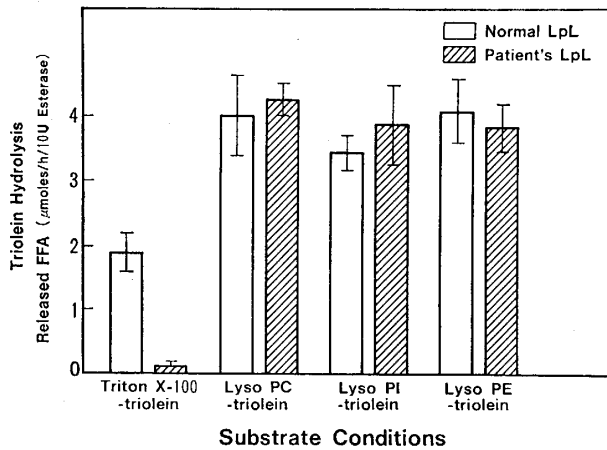


Fig. 6. Hydrolysis of triolein in various condition of LPL from normal control and the patient. Each reaction mixture contained the same things as Fig. 5 except for [14 C] triolein emulsified with various lysophospholipids as substrates. Values are mean $\pm$ SD for triplicate determinations.

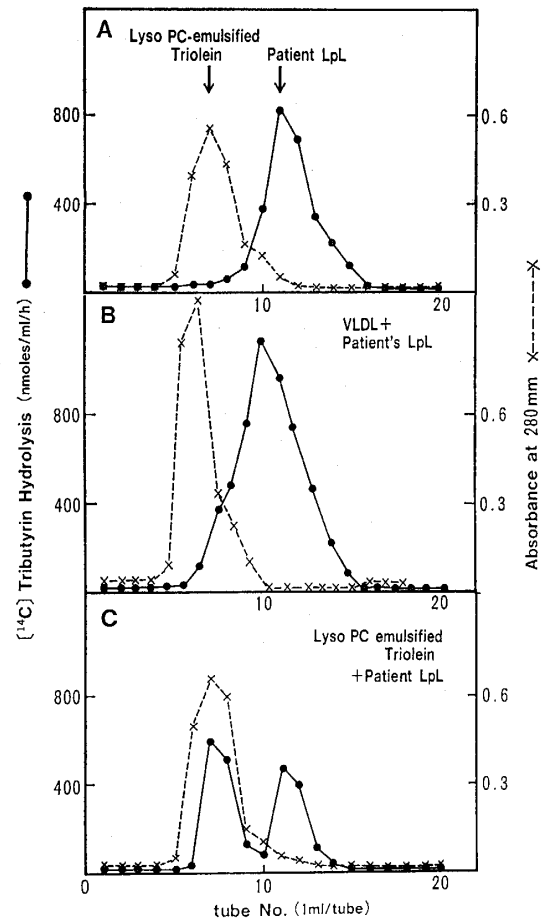


Fig. 7. Gel filtration of the patient's LPL with lysophosphatidyl: choline (LysoPC)-emulsified triolein on Sepharose 4B. Reaction mixture containing purified LPL from the patient (5 unit esterase activity=5000 nmol/h) and lyso PC-emulsified triolein in a final volume of 0.5 ml was applied to Sepharose 4B column (1.0 $\times$ 25 cm). All other procedures are the same as described in Fig. 4.

A, Elution profiles of lyso PC-emulsified triolein and purified LPL of the patient applied separately to the Sepharose 4B column.

B, Elution profile of a mixture of VLDL and purified patient's LPL incubated at 37°C for 5 min.

C, Elution profiles of a mixture of lysoPC-emulsified triolein and purified patient's LPL incubated at 37°C for 5 min.

者の LPL は画分 11 に lysoPC-emulsified triolein は画分 7 に溶出された。次いで両者をあらかじめ 37°C にて 5 分間 incubation した後に apply すると LPL の存

在を示す tributyrin 水解活性は基質 lyso-PC-emulsified triolein が溶出される画分7にも存在した。対照として健常者 PHP 中の LPL を用いて同様の検討を行うと tributyrin 水解活性は基質 lysoPC-emulsified triolein が溶出される画分7にも同様に存在した (データ呈示せず)。

LPL による triolein 水解活性に及ぼす中鎖中性脂肪 tricaprin の効果 (図8): LPL の triolein の水解に及ぼす tricaprin の影響を検討した成績を示す。健常者 LPL による triolein 水解活性は基質作成時 tricaprin を添加し乳化してもその水解活性にほとんど影響が見られなかった。一方、本患者 LPL による triolein 水解活性は基質作成時 tricaprin を添加し乳化することにより著明に促進された。

ガスクロマトによるカイロミクロン中の脂肪酸分析 (表1): 中鎖中性脂肪由来の脂肪酸であるカプリン酸 (C10:0) はトリカプリン投与前はカイロミクロンと VLDL 中には存在しなかったがトリカプリン投与2時間後、カイロミクロンと VLDL 中の構成脂肪酸としてそれぞれ1.4%, 2.6% (重量比)存在した。

患者 LPL の genomicDNA の構造解析: 患者の LPL 遺伝子はエクソン1から8までその塩基配列はコントロールのものと完全に一致した。図9に本家系の LPL 遺伝子のエクソン9の塩基配列の一部を示す。図左側より本患者、父、母、コントロールのシーケンスの結果を示す。患者、父母では1,595番目の塩基としてシトシンからグアニンへの変異 (C¹⁵⁹⁵→G) がヘテロ型に存在することが確認されその結果 LPL 酵素蛋白を構成するアミノ酸の447番目のセリンが停止コドンに変異する (Ser⁴⁴⁷→Ter) ことが示された。

患者 LPL の RNA の構造解析: 本患者の脂肪組織よ

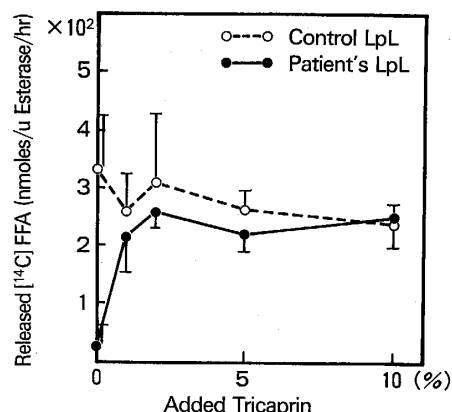


Fig. 8. Effect of addition of tricaprin on hydrolysis of triolein by the patient's LPL. Preparation of substrates emulsion and assay conditions are described in methods. Values are mean $\pm$ SD for triplicate determinations.

り RNA を抽出し cDNA を合成しクローニングしてシーケンスを行った (図10)。Subcloning により得られた5クローンのうち2クローンに1,595番目の塩基の位置にシトシンからグアニンへの変異が存在した。この結果は genomicDNA の解析を行った結果1,595番目の塩基にシトシンからグアニンへの変異がヘテロ型に存在するという上述した成績を支持するものである。

Ser⁴⁴⁷→Ter を有する LPL の発現とその機能解析 (図11): C¹⁵⁹⁵→G を有する LPLcDNA を expression vector, PCDE に挿入し, Cos 1 cell に Transfection させ発現された LPL の機能解析を試みた。Cos 1 cell の培養 medium 中に LPL 酵素蛋白の存在が見られた。発現された LPL の活性を水溶性基質である tributyrin と、脂質界面を形成する基質である TritonX-100-triolein, lysoPC-triolein, を基質として測定した成績

Table 1. Effect of MCT administration on fatty acid composition of chylomicrons and VLDL

Fatty acid	Before Administration		After administration	
	chylomicron	VLDL	chylomicron	VLDL
C 10 : 0	—	—	1.4	2.6
C 12 : 0	1.7	1.5	3.0	4.0
C 14 : 0	4.3	3.7	8.5	2.7
C 16 : 0	22.5	24.3	22.4	29.0
C 16 : 1	9.8	9.8	10.8	12.0
C 18 : 0	8.6	8.7	4.9	5.2
C 18 : 1	28.6	28.7	24.3	27.0
C 18 : 2	17.0	17.0	18.6	15.3

NOTE. Values are percentages.

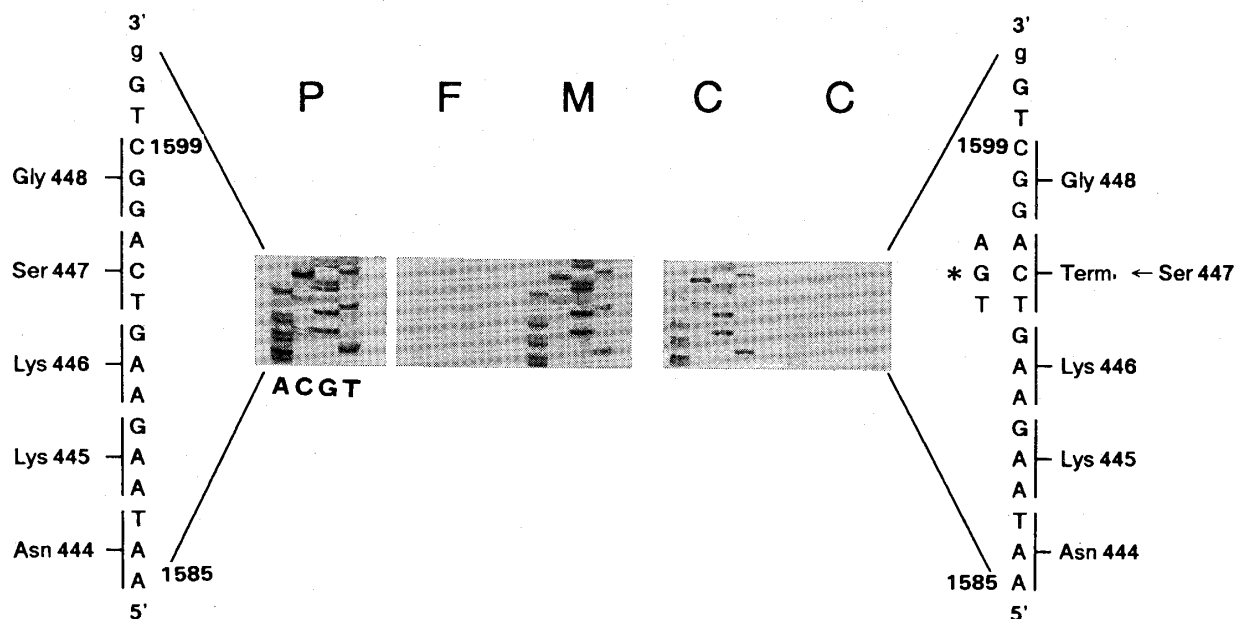


Fig. 9. DNA sequence of LPL exon 9. P, M, F and C designate proband, father, mother and control, respectively. DNA sequence analysis was performed with oligonucleotide primers FSE9 (5'-GACA GAACTGTACCTTT-3') and RSE9 (5'-TGAAGCTGCCTCCCTTAGG-GTGCAAG-3') and analyzed by electrophoresis on 6 % acrylamide/8M urea sequencing gel.

The order of lanes in the corresponding autoradiograms is A, C, G and T, showing the DNA sequence derived from oligonucleotide primer. A heterozygous mutation (a C→G transversion) was shown at nucleotide position 1595 (asterisk) in proband, father and mother.

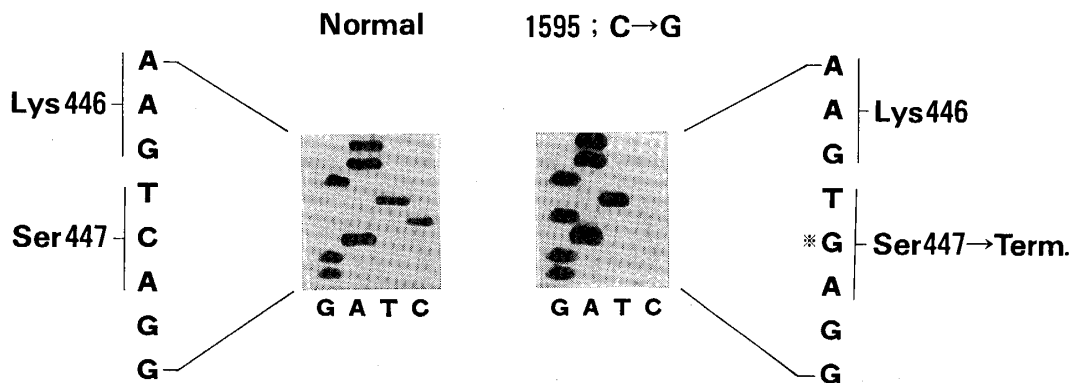


Fig. 10. LPLcDNA sequence from proband's adipose tissue. Complementary DNA was synthesized from 0.5 μ g of total RNA from patient's adipose tissue by incubating the RNA for 40 min. at 37°C in 25 μ l of reaction mixture containing 50 mM Tris-HCl (pH=8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol, 0.5 mM each of dATP, dCTP, dGTP and dTTP, 50 μ g/ml oligonucleotide (dT), 40 units of RNasin (Promega Biotek, Madison, WI), and 200 units of mouse mammary leukemia virus reverse transcriptase (Bethesda Research Laboratory). The cDNA was recovered by ethanol precipitation after extraction with phenol/chloroform. The cDNAs were each subjected to polymerase reaction on using 50 pmol of each primer and 2.5 units of Taq DNA polymerase. The reaction mixtures were denatured at 95°C for 1 min, primer annealed at 55°C for 1 min., and primer extended at 72°C for 5 min. for 30 cycles..

を示す。本変異を有する LPL の tributyrin に対する水解能は wild type のものとほぼ同等に認められたが TritonX-100-triolein に対する水解活性は著明に低下し

ていた。しかしながら, lysoPC や tricaprin にて乳化した triolein に対する水解能は wild type のものとほぼ同等に存在した。

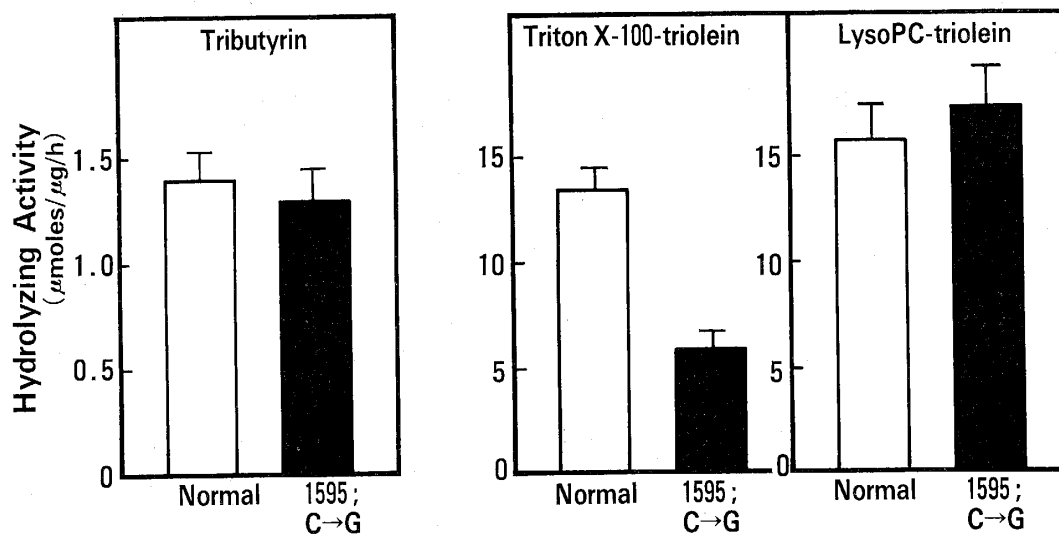


Fig. 11. Hydrolyzing activities toward Tributyrin, Triton X-100-triolein and LysoPC-triolein by expressed mutant LPL. Preparation of substrate emulsions and assay conditions are described in the Methods. Values are mean $\pm$ SD for triplicate determinations.

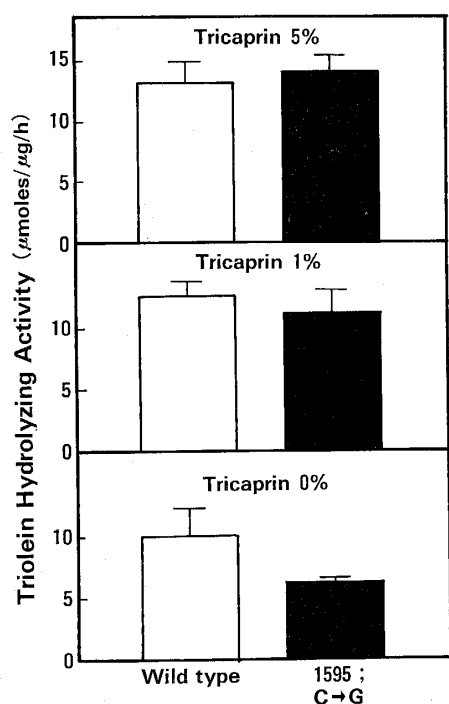


Fig. 12. Effect of tricaprins addition to triolein substrate on triolein hydrolysis by expressed mutant LPL. Preparation of substrate emulsions and assay conditions are described in the Methods. Values are mean $\pm$ SD for triplicate determinations.

Ser⁴⁴⁷→Ter を有する LPL による triolein 水解活性に及ぼす中鎖中性脂肪 Tricaprin (C 10) の効果 (図 12): Wild type LPL による triolein 水解活性は基質作成時 tricaprins を添加し乳化しても殆ど影響が見られ

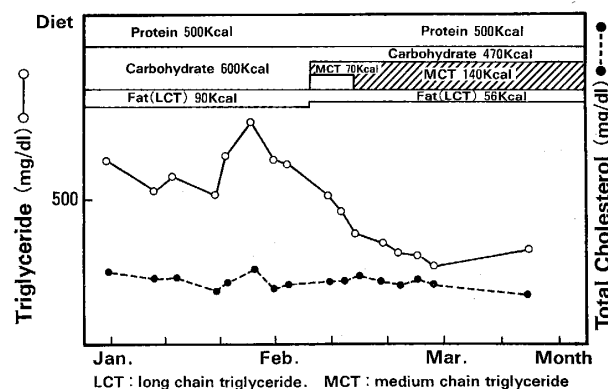


Fig. 13. Effect of medium chain triglyceride (MCT) on lipid levels in patient's plasma —clinical course—

なかった。一方, Ser⁴⁴⁷→Terを有する LPL による triolein 水解活性は, tricaprins を基質総重量に対して 5%添加し乳化して基質を作成することにより wild type LPL とほぼ同等の水解活性を示した。

中鎖中性脂肪投与後の臨床経過 (図13): 低脂肪食 (蛋白 500 kcal, 糖質 600 kcal, 長鎖中性脂肪 90 kcal を含有する食事) を摂取時, 血清中性脂肪 (TG) 値は500~750mg/dl を呈したが総摂取カロリーをほぼ同等にして食事中に中鎖中性脂肪 (MCT) 70~140kcal を添加すると TG 値は250~300mg/dl に低下した。

IV. 考 察

これまでの酵素学は主として水に溶けている酵素と水溶性の基質を用いて進められてきた。しかし, リポ蛋白リパーゼの場合は酵素は水に溶けているが基質は水に不溶である。このような場合, 反応を律速する因子として

は酵素量だけでなく基質の界面面積や基質表面に対する吸着力などが問題になる。高カイルミクロン血症を呈した本患者のヘパリン静注後血漿中 (PHP) LPL は脂質界面を形成する基質である TritonX-100-triolein, chylomicron-triolein に対して水解活性を持たないが、疎水性が低く脂質界面を形成しない短鎖中性脂肪である tributyrin を水解した。従って、本 LPL は脂質界面を認識する部位に異常を有する可能性が示唆された。さらにこのことは本 LPL が VLDL と結合能を有しないことから確認された。本患者の治療を行うためこのような機能異常を有する LPL の活性回復をいかにすべきか考えた。活性中心に異常のないことから基質界面認識の機能を修飾することにより長鎖中性脂肪の水解活性が回復しうる可能性を検討した。その一つとして基質 triolein を lysophosphatidyl choline (LysoPC) にて乳化したところ本患者の LPL によるトリオレイン水解活性が発現し、このとき LysoPC にて乳化した triolein と結合することも確認された (図 7)。その機序として今回の実験事実からリゾ体を用いることにより脂質界面認識に異常を有する本患者の LPL と LysoPC-トリオレインとの親和性が増し、本患者の LPL によって水解されたものと推測される。このような酵素-基質複合体の形成促進が基質の形態を変えることにより成し遂げられることを見出しこの考えの治療への応用を考えた。即ち、経口投与可能な物質による基質の修飾である。in vitro で Lyso-PC と同様に患者 LPL の水解活性を高めた (図 8) 物質である中鎖中性脂肪 (MCT) の一つトリブリンの患者への投与を試みた。経口投与によりカプリン酸は、in vitro での患者 LPL 活性を高めたのと同じ比率でカイルミクロン中に取りこまれることを確認した。ついで、MCT を経口投与することにより血清中性脂肪が著明に低下し、その治療法として極めて有効であることが判明した。このような現象が普遍化されて本患者でみられた LPL 機能異常症が一つの疾患単位として確立されるためには本 LPL の構造異常を明らかにする必要がある。そこで末梢血リンパ球より genomic DNA を抽出しその遺伝子解析を行ったところ、1,595番目の塩基としてシトシンからグアニンへの変異がヘテロ型に存在し、その結果 Ser⁴⁴⁷→Ter となり448個のアミノ酸から構成される LPL 成熟蛋白のC末端近傍にて truncation が起こることが示唆された。LPL 遺伝子上の本変異の意義について解明するために遺伝子工学的手法を用いてこの変異を有する LPL を発現させ、その機能を検討したところ、水溶性基質である tributyrin を水解することから活性中心は正常であると考えた。また長鎖中性脂

肪である TritonX-100-triolein に対する水解活性が著明に低下していたことから脂質界認識能に異常を有する LPL が発現されたと考えた。さらに、LysoPC にて乳化した triolein や中鎖中性脂肪の一つである tricaprיןを用いて乳化した triolein に対して wild type LPL とほぼ同等の水解活性を示した。これらのことから今回見出された異常、すなわち 1,595; C→G が本患者の PHP 中に存在する脂質界面認識に異常を有する LPL の発現に関与しうることが示唆された。このような、mutant LPL では中鎖中性脂肪などを用いて生理的基質である長鎖中性脂肪の存在様式を変化させることにより正常の LPL と同様に水解し、このことが高カイルミクロン血症の治療につながるということが明かとなった。LPL 欠損症の遺伝子解析については近年相次いで報告がなされている¹⁹⁻²⁹⁾。それらの中には、ヘパリン静注後血漿中の LPL 酵素蛋白が存在しながら LPL 活性のない症例があり、それらはヘパリンとの結合能の障害された機能異常 LPL を有する症例と報告されている^{23,27)}。しかしながら、これらの報告からは患者の治療法は見出されていない。一方本研究では患者の病態解析ならびに、遺伝子解析が患者の有する高中性脂肪血症の治療に結びついたことが特記すべき点と思われる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり御指導いただきました恩師吉田尚教授に深謝致します。本研究を行なうにあたり終始御指導を賜った千葉大学第二内科斎藤康博士、白井厚治博士 (現東邦大学)、更に多大な御援助を頂いた千葉大学第二内科脂質研究室の諸先生方に心から感謝申し上げます。

なお本論文は審査学位論文である。

SUMMARY

We have reported lipoprotein lipase with a defect in lipid interface recognition in a patient with type I hyperlipidemia. In this patient, lipoprotein lipase from postheparin plasma did not hydrolyze triolein emulsified with Triton X-100 and that in very low density lipoprotein but hydrolyzed monomeric substrate tributyrin and lysophosphatidyl choline (PC)-triolein substrates. Sequence analysis of the proband's DNA revealed a heterozygous nucleotide change: a C→G transversion at nucleotide position of 1595, resulting in changing the codon for Ser 447 to a stop codon. Expression studies of this mutant LPL cDNA in Cos-1 cells produced and secreted considerable amounts of LPL mass in

the culture media. The mutated LPL hydrolyzed much less Triton X-100-triolein than wild type LPL, whereas hydrolysis of tributyrin and Lyso PC-triolein was the same with both the mutant and wild type LPL. The plasma triglyceride level of this patient did not decrease to less than 500 mg/dl with a low fat diet. When the patient took 70~140 kcal of medium chain triglyceride in addition to the low fat diet, her serum triglyceride level decreased to 250 mg/dl. The patient's lipoprotein lipase hydrolyzed triolein emulsified with 2 % tricaprin at the same rate as that of control lipoprotein lipase.

These results suggested that hypertriglyceridemia caused by lipoprotein lipase with a defect in lipid interface recognition could be relieved with medium chain triglyceride.

文 献

- 1) Wion KL, Kirchgessner TG, Lusis AJ, Schotz MC and Lawn RM: Human lipoprotein lipase complementary DNA sequence. *Science* **235**: 1638-1641, 1987.
- 2) Deeb SS and R Peng: Structure of human lipoprotein lipase gene. *Biochemistry* **28**: 4131-4135, 1990.
- 3) Kirchgessner TG, Chuat JC, Heitzmann C, Etienne J, Guilhot S, Svenson K, Ameis D, Pilon C, D'Auriol L, Andalibi A, Schotz MC, Galibert F and Lusis AJ: Organization of human lipoprotein lipase gene and evolution of lipase gene. *J Biol Chem* **265**: 6552-6555, 1989.
- 4) Oka K, Tkalcovic GT, Nakano T, Tucker H, Ishimura-Oka K, Aroen WV: Structure and polymorphic map of human lipoprotein lipase gene. *Biochim Biophys Acta* **1049**: 21-26, 1990.
- 5) Enerabck S and Bjursell G: Genomic organization of the region encoding guinea pig lipoprotein lipase: Evidence for exon fusion and unconventional splicing. *Gene* **84**: 391-397, 1989.
- 6) Kirchgessner TG, Svenson KL, Lusis AJ and Schotz MC: The sequence of the cDNA encoding human lipoprotein lipase: A member of a lipase gene family. *J Biol Chem* **262**: 8463-8466, 1987.
- 7) Shirai K and Jackson RL: Lipoprotein lipase catalyzed hydrolysis of p-Nitrophenyl Butyrate. *J Biol Chem* **257**: 1253-1258, 1982.
- 8) Shirai K, Matsuoka N, Saito Y and Yoshida S: Postheparin plasma hepatic triacyl glycerol lipase-catalyzed tributyrin hydrolysis. Effect of lipid interface. *Biochim Biophys Acta* **795**: 1-8, 1984.
- 9) Shirai K, Saito Y and Yoshida S: Postheparin plasma hepatic trioleoyl glycerol lipase-catalyzed tributyrin hydrolysis. Effect of trypsin treatment. *Biochim Biophys Acta* **795**: 9-14, 1984.
- 10) Belfrage P and Vaughan H: Simple liquid-liquid partition system for isolation of labeled oleic acid from mixture with glycerides. *J lipid Res* **10**: 341-344, 1969.
- 11) Goers JWF, Pertersen ME, Karen PA, Ong J and Schotz MC: An enzyme linked immunoassay for lipoprotein lipase. *Anal Biochem* **166**: 27-35, 1987.
- 12) Kobayashi J, Hashimoto H, Fukamachi I, Tashiro J, Shirai K, Saito Y and Yoshida S: Lipoprotein lipase mass and activity of severe hypertriglyceridemia. *Clin Chim Acta*. in press.
- 13) Korn ED, Clearing factor a heparin activated lipoprotein lipase Isolation and characterization of the enzyme from normal rat heart. *J Biol Chem* **215**: 1-4, 1955.
- 14) Fielding CJ: Validation of a procedure for exogenous isotopic labeling of lipoprotein triglyceride with radioactive triolein. *Biochim Biophys Acta* **573**: 255-265, 1979.
- 15) Saiki R, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491, 1988.
- 16) Sanger F, Nicklen S, and Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci. USA* **74**: 5463-5467, 1977.
- 17) Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ and Rutter WJ: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**: 5294-5299, 1979.
- 18) Selden RF, Burke-Howie K, Rowe MF, Goodman HM and Moore DD: Human growth hormone as a receptor gene in regulation studies employing transient gene expression. *Mol cell Biol* **6**: 3173-3179, 1986.
- 19) Langlois S, Dees S, Brunzell JD, Kastelein JJP and Heyden MR: A major insertion accounts for a significant proportion of mutation underlying human lipoprotein lipase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 948-952, 1989.
- 20) Devlin RH, Deeb S, Brunzell JD: Partial gene duplication involving Exon-Alu-interchange results in lipoprotein lipase deficiency. *Am J Hum Gene* **46**: 112-119, 1990.
- 21) Takagi A, Ikeda Y, Tsutsumi Z, Shoji T and

- Yamamoto A: Molecular studies on primary lipoprotein lipase deficiency. *J Clin Invest* **89**: 581-591, 1992.
- 22) Dichek HL, Fojo SS, Beg OU, Skarlatos SI, Brunzell JD, Culter GB and Brewer HB: Identification of two Separate allelic mutation in the lipoprotein lipase gene of a patient with the familial hyperchylomicronemia. *J Biol Chem* **266**: 473-477, 1991.
- 23) Emi MD, Wilson E, Iverius PH, Wu L, Hata A, Hegele R, Williams R and Lalouel JM: Missense mutation (Gly→Glu188) of human lipoprotein lipase imparting functional deficiency. *J Biol Chem* **265**: 5910-5916, 1990.
- 24) Hata A, Emi M, Luc G, Basdevant A, Gambert P, Ivrius PH and Lalouel JM: Compound heterozygote for lipoprotein lipase deficiency: Ser→Thr²⁴⁴ and transition in 3 splice site of intron 2 (AG→AA) in the lipoprotein lipase gene. *Am J Hum Genet* **47**: 107-111, 1990.
- 25) Henderson HE, Ma Y, Hassan MF, Mosalve MV, Winkler F, Gubernator K, Marais AD, Brunzell JD and Heyden MR: Amino acid substitution (Ile¹⁹⁴→Thr) in exon 5 of the lipoprotein lipase deficiency in three probands support for a multicentric origin. *J Clin Invest* **87**: 2005-2011, 1991.
- 26) Ameis D, Kobayashi J, Davis RC, Ben-Zeev O, Malloy MJ, Kane JP, Lee G, Wong H, Havel RJ and Schotz MC: Familial chylomicronemia due to a single missense mutation in the lipoprotein lipase gene. *J Clin Invest* **87**: 1165-1170, 1991.
- 27) Beg OU, Meng MS, Skarlatos SI, Previato L, Brunzell JD, Brewer Jr HB and Fojo SS: Lipoprotein lipase Bethesda: A single amino acid substitution (Ala-176→Thr) leads to abnormal heparin binding and loss of enzymic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 3473-3478, 1990.
- 28) Gotoda T, Yamada N, Kawamura M, Kozaki K, Mori N, Ishibashi S, Shimano H, Takaku F, Yazaki Y, Furuichi Y and Murase T: Heterozygous mutation in the human lipoprotein lipase gene in patients with familial lipoprotein lipase deficiency. *J Clin Invest* **88**: 1856-1864, 1991.
- 29) Gotoda T, Yamada N, Murase T, Inaba T, Ishibashi S, Shimano H, Koga S, Yazaki Y, Furuichi Y and Takaku F: Occurrence of multiple aberrantly spliced mRNA upon a donor splice site mutation that caused familial lipoprotein lipase deficiency. *J Biol Chem* **266**: 24757-24762, 1992.