

# アポ E ノックアウトマウス血清リポタンパク質の 脂質、タンパク質組成の分析

竹 嶋 美夏子

竹 重 佳央里

原 孝 之

## Analyses of Lipid and Protein Components of the Serum Lipoprotein in ApoE-knockout Mice

Mikako Takeshima

Kaori Takeshige

Takayuki Hara

(2005年11月29日受理)

### I 緒 言

高脂血症や動脈硬化の病態は、多くの遺伝的背景と環境的要因が複雑に絡み合っているため、その解析が困難とされてきた。近年の遺伝子工学、発生工学技術の進歩により動物個体の遺伝子に対して人為的に任意の変異を加えることが可能となり、特定の遺伝子に変異を加えた疾患モデル動物の作成が動脈硬化のメカニズム解明の手段として広く用いられるようになった。モデル動物には、外来遺伝子を過剰発現させるトランスジェニック (tg) 系と、内因性遺伝子の発現を抑制して欠損させる系の2通りがある。後者ではES細胞の相同的組換えを利用した、ジーンターゲットイング、すなわちノックアウト (KO) マウスの作製が注目されている。中でもアポリポタンパク質 (アポ) EKO マウスは、普通食負荷でも血中コレステロールは500mg/dlまで増加し、さらに普通食負荷で顕著な動脈硬化を形成することから粥状動脈硬化のモデルとして有名である<sup>1) 2)</sup>。アポ E は主に肝臓で合成される血漿リポタンパク質の主要な構成要素で、アポ B-100とともに低密度リポタンパク質 (LDL) レセプターに高い親和性を持ち、アポ B-100含有リポタンパク質、特に超低密度リポタンパク質 (VLDL)、中間密度リポタンパク質 (IDL) の血中からおもに肝臓へのクリアランスを促進している。一方、食事性脂質のキャリアーとして腸管から分泌されるカイロミクロン (CM) およびそのレムナントは、主要構成タンパ

ク質がアポ B-48であるが、その成分タンパク質の1つアポ E が特異的なリガンドとして取り込まれると考えられている。この際のレセプターは、LDLレセプター以外に、アポ E (レムナント) レセプターが想定されている。さらにアポ E は、他のアポタンパク質と異なり肝臓だけでなく様々な組織で発現、産生されており、血中脂質代謝だけでなく、末梢組織において、脂質の転送、授受にも携わり、脂質、リポタンパク質代謝の制御に重要な役割を担っている<sup>3)</sup>。しかし、このように重要な役割を担っているアポ E を欠損したアポ EKO マウスについての動脈硬化形成の機序とリポタンパク質の脂質組成、タンパク質組成の変化についてほとんど知られていない。そこで我々は、アポ EKO マウスの動脈硬化形成の機序を解明する目的で、アポ EKO マウスの血清から CM+VLDL, LDL, 高密度リポタンパク質 (HDL) を分離精製し、それぞれの画分の脂質組成とタンパク質組成について正常マウスと比較した。

### II 実験方法

#### 1. 実験動物

正常マウスは、C57BL/6系統のオス5匹、メス5匹 (3ヶ月齢) とアポ EKO マウスは、C57BL/6系統のオス6匹、メス6匹 (6ヶ月齢) を本学アニマルセンターにて飼育し実験に用いた。それぞれのマウスは固形飼料 CE-2 (日本クレア社製) で飼育した。

## 2. 血清脂質濃度の測定

血清総コレステロールは、コレステロールオキシダーゼ、3,5-ジメトキシ-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-アニリンナトリウム (DAOS) を利用した酵素法試薬のコレステロールEテスト-ワコー (和光純薬工業社製) を用いて測定した。血清トリグリセライドは、アセチルアセトン法によるトリグリセライドテスト-ワコー (和光純薬工業社製) で測定した。

## 3. 血清リポタンパク質の分離

Havel ら<sup>4)</sup>の方法に従い血清リポタンパク質の分離を行った。マウス頸動脈より採血後、20℃、3000 rpm、10分間遠心分離し血清を得た。血清を遠心チューブに入れ  $d=1.006$  比重液を重層し、BECKMAN 社製超遠心分離機 (XL-70) を用い、12℃、40000rpm、18時間遠心した。遠心後、浮上した CM+VLDL を分取した。下層はよく混和後、別の遠心チューブに移し、下層 5 倍容に対して  $d=1.346$  比重液 1 倍容を混合し  $d=1.063$  にした。これを 12℃、40000rpm、20時間遠心した。遠心後、LDL である上層を分取した。下層はよく混和後、別の遠心チューブに移し、下層 1 ml に対して NaBr 0.19g を加え、 $d=1.21$  にした。これを、12℃、40000rpm、40時間遠心した。遠心後、HDL である上層を分取した。VLDL 以外は高濃度の塩を含むために 0.15M NaCl - 0.01% EDTA (pH7.4) で透析を行った。

## 4. 血清リポタンパク質の脂質濃度の測定

CM+VLDL, LDL, HDL の総コレステロール (Chol), トリグリセライド (TG) は、血清脂質濃度の測定と同様、コレステロール E テスト-ワコー (和光純薬工業社製), トリグリセライドテスト-ワコー (和光純薬工業社製) で測定した。リン脂質 (PL) の測定は、リポタンパク質/10M 硫酸/70% 過塩素酸を 5/1/3 の割合で入れ、190℃、30分間加熱し、溶液が透明になるまで灰化した。灰化後、室温に戻し、Ames Reaction Solution を加え、95℃、5分間煮沸し、820nm における吸光度を測定した。

## 5. 血清リポタンパク質の Bio-Rat プロテインアッセイ法

CM+VLDL, LDL, HDL のタンパク質の測定は、Bradford<sup>5)</sup>の方法に従い、反応液0.1ml に 5 倍希釈染色液5.0ml を加え攪拌し、5分以上室温で放置したのち、60分間以内に595nm における吸光度を測定した。

## 6. CM+VLDL, LDL, HDL のアポタンパク質の SDS-電気泳動による分析

CM+VLDL, LDL, HDL の SDS-電気泳動による分析は Laemmli<sup>6)</sup>の方法に従って行った。10% アクリルアミドを含むゲル (e・PAGE L E-T10L ATTO 社製) で、CM+VLDL, LDL, HDL は 1 レーン 20 $\mu$ l を用い、泳動用緩衝液は 25mM トリス-192mM グリシン-0.2% SDS で電気泳動を行った。ゲルは、0.2% クマッシュブリリアントブルー R250-20% 酢酸-20% メタノールで一晩染色したのち、7% 酢酸-40% メタノールで脱色した。分子量マーカーは、Phosphorylase b (97 kDa), Albumin (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carbonic anhydrase (30 kDa), Trypsin inhibitor (20 kDa),  $\alpha$ -Lactalbumin (14.4 kDa) (Amersham Biosciences 社製) を用いた。

## III 結 果

### 1. 血清脂質濃度の測定

血清脂質濃度の測定には、正常マウスはオス 5 匹、メス 5 匹のプール血清、アポ EKO マウスはオス 6 匹、メス 6 匹の血清を用いた。Table 1 に示したように、アポ EKO マウスの血清総コレステロール (Chol) はオス 706 $\pm$ 130mg/dl、メス 534 $\pm$ 94mg/dl で正常マウス (オス 104mg/dl、メス 81mg/dl) に比べ約 7 倍高かった。また、アポ EKO マウスの TG はオス 242 $\pm$ 96mg/dl、メス 119 $\pm$ 34mg/dl で正常マウス (オス 82mg/dl、メス 40mg/dl) に比べ約 3 倍高かった。これは、Zhang ら<sup>1)</sup>の結果 (Table 1) とほぼ同様であることが確かめられた。今回使用したマウスは、正常マウスが 3 ヶ月齢、アポ EKO マウスが 6 ヶ月齢と異なっていたが、血清脂質濃度の結果からマウスの月齢による影響はなく両者を比較できることが確認された。

### 2. リポタンパク質の脂質組成 (W/W)

正常マウスのオス、メスのプール血清とアポ EKO マウスのオス、メスの血清から分離精製したリポタンパク質の脂質組成 (W/W) を Table 2 に示した。脂質組成に雌雄差はほとんどみられなかったため、平均値を表すことにした。アポ EKO マウスの CM+VLDL の Chol/PL 比は 2.44 で正常マウス (0.36) の 6.7 倍に増加し、アポ EKO マウスの LDL の Chol/PL 比は 2.34 で正常マウス (0.50) の 4.6 倍に増加した。アポ EKO マウスの CM+VLDL の TG/PL 比は 1.92 で正常マウス (3.06) の 63% に

低下し、アポEKOマウスのLDLのTG/PL比は0.04で正常マウス(0.55)の7.7%に低下した。HDLではChol/PL比、TG/PL比ともにアポEKOマウスと正常マウスで差はなかった。また、Prot/PL比はCM+VLDL、LDL、HDLすべての画分でアポEKOマウスと正常マウスで大きな差はみられなかった。

### 3. リポタンパク質の脂質組成 (mol/mol)

Table 3はTable 2のリポタンパク質の脂質組成(W/W)で差がみられたChol/PL比とTG/PL比についてmol/molで表したものである。Chol, TG, PLの分子量をそれぞれ、386.7, 900, 800として、PL1分子あたりのChol, TGを示している。アポEKOマウスのCM+VLDLのChol+TG/PL比は6.75で正常マウス(3.46)の2.0倍に増加し、ア

Table 1 正常マウス、アポEKOマウスの血清脂質濃度

	Total cholesterol (Chol) mg/dl		Triglyceride (TG) mg/dl	
	This work	Zhang et al.	This work	Zhang et al.
♂正常マウス	104 <sup>a</sup> (5) <sup>c</sup>	86±20 <sup>b</sup> (46) <sup>c</sup>	82 <sup>a</sup> (5) <sup>c</sup>	73±36 <sup>b</sup> (32) <sup>c</sup>
♀正常マウス	81 <sup>a</sup> (5) <sup>c</sup>		40 <sup>a</sup> (5) <sup>c</sup>	
♂アポEKOマウス	706±130 <sup>b</sup> (6) <sup>c</sup>	434±129 <sup>b</sup> (40) <sup>c</sup>	242±96 <sup>b</sup> (6) <sup>c</sup>	123±51 <sup>b</sup> (42) <sup>c</sup>
♀アポEKOマウス	534±94 <sup>b</sup> (6) <sup>c</sup>		119±34 <sup>b</sup> (6) <sup>c</sup>	

正常マウスは3ヶ月齢のオス、メス5匹ずつのプール血清、アポEKOマウスは6ヶ月齢のオス、メス6匹ずつの血清を用い、血清総コレステロールと血清トリグリセライドを定量した。Zhangらの値は2-5ヶ月齢のマウスのオス、メスを用い、血清総コレステロールと血清トリグリセライドを定量したものである。a, b, cはそれぞれ平均、平均±SD、マウスの数を示している。

Table 2 リポタンパク質の脂質組成 (W/W)

		Chol/PL (W/W)	TG/PL (W/W)	Prot/PL (W/W)
CM+VLDL	正常マウス	0.36 (0.26 <sup>b</sup> ~0.46 <sup>a</sup> )	3.06 (2.54 <sup>b</sup> ~3.57 <sup>a</sup> )	0.44 (0.43 <sup>b</sup> ~0.44 <sup>a</sup> )
	アポEKOマウス	2.44 (2.29 <sup>a</sup> ~2.58 <sup>b</sup> )	1.92 (1.91 <sup>a</sup> ~1.93 <sup>b</sup> )	0.29 (0.27 <sup>a</sup> ~0.30 <sup>b</sup> )
LDL	正常マウス	0.50 (0.32 <sup>a</sup> ~0.69 <sup>b</sup> )	0.55 (0.52 <sup>a</sup> ~0.57 <sup>b</sup> )	0.46 (0.17 <sup>a</sup> ~0.74 <sup>b</sup> )
	アポEKOマウス	2.34 (2.19 <sup>a</sup> ~2.49 <sup>b</sup> )	0.04 (0.04 <sup>a</sup> ~0.05 <sup>b</sup> )	0.57 (0.55 <sup>a</sup> ~0.57 <sup>b</sup> )
HDL	正常マウス	0.83 (0.77 <sup>a</sup> ~0.89 <sup>b</sup> )	0.10 (0.10 <sup>a</sup> ~0.10 <sup>b</sup> )	1.99 (1.68 <sup>a</sup> ~2.31 <sup>b</sup> )
	アポEKOマウス	0.68 (0.54 <sup>b</sup> ~0.82 <sup>a</sup> )	0.12 (0.09 <sup>a</sup> ~0.14 <sup>b</sup> )	1.91 (1.72 <sup>b</sup> ~2.09 <sup>a</sup> )

正常マウスとアポEKOマウスの血清から分離精製したCM+VLDL, LDL, HDLのコレステロール (Chol), トリグリセライド (TG), リン脂質 (PL), タンパク質 (Prot) を定量し、PLに対するChol, TG, Protを重量% (W/W) で示している。それぞれの値は2例の平均値、( )内は2例の値、aはオス、bはメスを示している。

Table 3 正常マウスとアポ EKO マウスのリポタンパク質の脂質組成 (mol/mol)

		Chol/PL (mol/mol)	TG/PL (mol/mol)	Chol+TG/PL (mol/mol)
CM+VLDL	正常マウス	0.74 (0.53 <sup>b</sup> ~0.96 <sup>a</sup> )	2.72 (2.26 <sup>b</sup> ~3.18 <sup>a</sup> )	3.46 (2.79 <sup>b</sup> ~4.14 <sup>a</sup> )
	アポEKOマウス	5.04 (4.74 <sup>a</sup> ~5.34 <sup>b</sup> )	1.71 (1.70 <sup>a</sup> ~1.72 <sup>b</sup> )	6.75 (6.44 <sup>a</sup> ~7.06 <sup>b</sup> )
LDL	正常マウス	1.04 (0.65 <sup>a</sup> ~1.43 <sup>b</sup> )	0.49 (0.47 <sup>a</sup> ~0.51 <sup>b</sup> )	1.53 (1.12 <sup>a</sup> ~1.94 <sup>b</sup> )
	アポEKOマウス	4.85 (4.53 <sup>a</sup> ~5.16 <sup>b</sup> )	0.04 (0.03 <sup>a</sup> ~0.04 <sup>b</sup> )	4.89 (4.56 <sup>a</sup> ~5.20 <sup>b</sup> )
HDL	正常マウス	1.71 (1.59 <sup>a</sup> ~1.83 <sup>b</sup> )	0.09 (0.09 <sup>a</sup> ~0.09 <sup>b</sup> )	1.80 (1.68 <sup>a</sup> ~1.92 <sup>b</sup> )
	アポEKOマウス	1.41 (1.12 <sup>b</sup> ~1.70 <sup>a</sup> )	0.10 (0.08 <sup>a</sup> ~0.13 <sup>b</sup> )	1.51 (1.25 <sup>b</sup> ~1.78 <sup>a</sup> )

Table 2 で差がみられた Chol/PL と TG/PL について mol/mol で表している。Chol, TG, PL の分子量を 386.7, 900, 800 として PL 1 分子あたりの Chol, TG を示している。それぞれの値は 2 例の平均値, ( ) 内は 2 例の値, a はオス, b はメスを示している。

アポ EKO マウスの LDL の Chol+TG/PL 比は 4.89 で正常マウス (1.53) の 3.2 倍に増加した。HDL では Chol+TG/PL 比はアポ EKO マウスと正常マウスで差はなかった。このことから, アポ EKO マウスの CM+VLDL と LDL は正常マウスに比べ, 2 ~ 3 倍の脂質をリポタンパク質粒子内に含んでいることがわかった。

#### 4. CM+VLDL のアポタンパク質 SDS-電気泳動

CM+VLDL の SDS-電気泳動を Fig.1 A に示した。アポ E は正常マウスには存在するが, アポ EKO マウスには存在しないことが確認された。アポ A-I, A-IV のバンドは正常マウスよりもアポ EKO マウスで濃く検出された。正常マウス, アポ EKO マウスともにアポ B-48 とアポ B-100 のバンドが検出され, アポ B-48 がより濃く検出された。

#### 5. LDL のアポタンパク質 SDS-電気泳動

LDL の SDS-電気泳動を Fig.1B に示した。正常マウスではアポ B-48 と B-100 のみのバンドが検出された。しかし, アポ EKO マウスはアポ B-48, アポ B-100 のほかにアポ A-I, アポ A-IV のバンドも検出された。正常マウスでは, アポ B-48 よりも B-100 が濃く検出されたが, アポ EKO マウスではアポ B-100 よりも B-48 で濃く検出された。

#### 6. HDL のアポタンパク質 SDS-電気泳動

HDL の SDS-電気泳動を Fig.1 C に示した。アポ E は正常マウスには存在するが, アポ EKO マウスには存在しないことが確認された。アポ EKO マウスには正常マウスと同様にアポ A-I, アポ A-IV のバンドが検出された。アポ A-I, A-IV のバンドは正常マウスよりもアポ EKO マウスで濃く検出された。

### IV 考 察

近年, 疾患モデル動物の作成が動脈硬化のメカニズム解明の手段として広く用いられるようになり, 生理的な条件において生体での解析が可能となった。LDL レセプター KO マウスは高コレステロール食負荷で動脈硬化を生じるが<sup>7) 8)</sup>, アポ A-I KO マウスは高コレステロール食でも動脈硬化の所見は認められないという報告がある<sup>9)</sup>。一方, アポ EKO マウスは, 普通食負荷でも血中コレステロールは 500 mg/dl まで増加し, 自然発症的に動脈硬化を形成する<sup>1) 2)</sup>。モデル動物により脂質代謝に関与するレセプターやアポタンパク質の動脈硬化形成への作用が検討できるようになった。我々は, アポ EKO マウスを用い, 動脈硬化形成の機序を解明する目的で, 血清から CM+VLDL, LDL, HDL を分離精製し, それぞれの画分の脂質組成とタンパク質組成につい

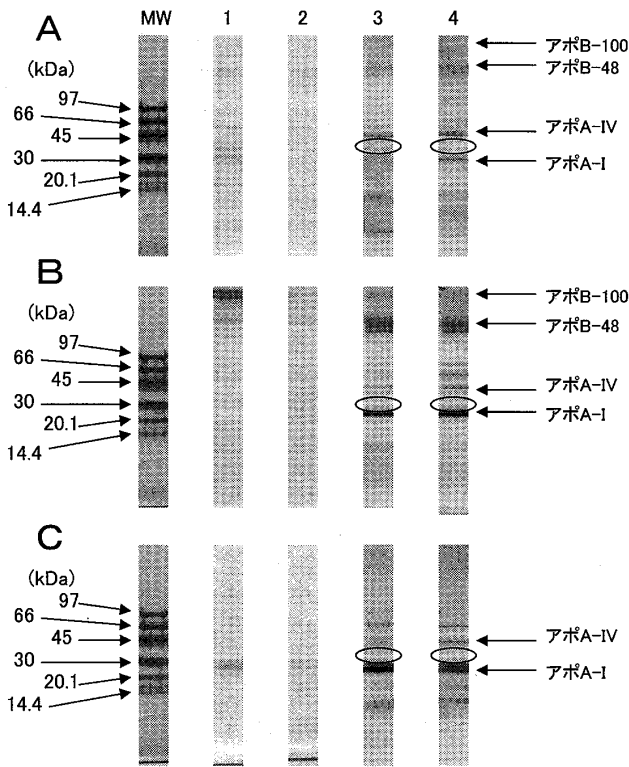


Fig.1 A, 1 B, 1 C アポタンパク質の SDS-電気泳動

アポ EKO マウスの CM+VLDL (Fig.1A.), LDL (Fig.1B), HDL (Fig.1C) のアポタンパク質の SDS-電気泳動の結果を示している。1, 2, 3, 4 はそれぞれオス正常マウス, メス正常マウス, オスアポ EKO マウス, メスアポ EKO マウスを示し, 左の MW は分子量マーカーである。○ の部分はアポ E が存在しないことを示している。

て正常マウスと比較した。

アポ EKO マウスの血清 Chol は正常マウスに比べ約 7 倍高く, TG は約 3 倍高いことがわかった。これは Zhang ら<sup>1)</sup>とほぼ同様の結果であった。血清を Havel ら<sup>4)</sup>の方法でリポタンパク質の分離を行い, 得られた CM+VLDL, LDL, HDL の Chol, TG, PL, Prot を測定した。アポ EKO マウスの CM+VLDL, LDL は, Chol を正常マウスの 2~3 倍含んでいることがわかった。しかし, HDL ではアポ EKO マウスと正常マウスに差がみられなかった。

次に, CM+VLDL, LDL, HDL のアポタンパク質組成を調べるために SDS-電気泳動を行った。この結果, アポ EKO マウスの CM+VLDL, LDL, HDL にはアポ E が存在しないことが確認できた (Fig.1 A, 1 B, 1 C)。アポ EKO マウスの LDL には正常マウスと同様にアポ B-48, アポ B-100 が存在していた (Fig.1 B)。アポ EKO マウスではアポ B-100 よりもアポ B-48 が多く存在し, 正常マウスとは逆であった。また, アポ EKO マウスの LDL には正常マウスではみられないアポ A-I, アポ A-

IV も存在していた (Fig.1 B)。LDL に存在していたアポ A-I, アポ A-IV は, CM+VLDL, HDL でも存在しており, 正常マウスよりもアポ EKO マウスに多く存在していた (Fig.1 A, 1 B, 1 C)。SDS-電気泳動の結果からアポ EKO マウスと正常マウスではアポタンパク質組成に大きな違いがあることがわかった。これらの原因について, 以下にまとめた。

1. アポ EKO マウスの CM+VLDL, LDL の Chol が正常マウスよりも増加していたのは (Table 2), VLDL が正常の VLDL ではなく, カイロミクロンレムナントや VLDL レムナントであることが考えられる。カイロミクロンレムナントや VLDL レムナントはカイロミクロン, VLDL が LPL の作用により TG を失い, Chol 含量が増加した状態である。LDL は,  $d=1.006 \sim 1.063$  の範囲で分取したために LDL だけでなく, VLDL から LDL への変換過程の中間代謝物である VLDL レムナントが存在する IDL を含んでいた可能性があり, Chol 含量が増加した状態であったとも考えられる。
2. リポタンパク質はコレステロールエステルと TG を中心とし, その表面が PL と遊離コレステロール, タンパク質 (アポタンパク質) で覆われた球形の粒子として血中に存在している<sup>10)</sup>。アポ EKO マウスの CM+VLDL, LDL 粒子内に正常マウスの 2~3 倍の脂質が含まれていたことから, リポタンパク質粒子が大きくなり, この粒子中に大量の脂質, 特に Chol を含んでいると考えられる。しかし, 今回の実験では総 Chol しか測定できなかったため, アポ EKO マウスのリポタンパク質粒子中の Chol がエステル型であるのか遊離型であるのか区別することはできなかった。
3. LDL の SDS-電気泳動において, アポ EKO マウスではアポ B-100 よりもアポ B-48 が多く存在していた。アポ B-100 は LDL レセプターを介し肝臓へ取り込まれるが, アポ B-48 は LDL レセプターへの結合部位がないためアポ E がレセプターの結合部位として機能する。しかし, アポ EKO マウスはアポ E がノックアウトされていることから, 肝臓への取り込みができない。そのために, 血中に IDL を含んでいると思われる LDL が増加し, 動脈硬化形成へ繋がると考えられる。
4. アポ EKO マウスとアポ A-I tg 発現マウスの交配による検討<sup>11)</sup>, アポ EKO マウスとアポ A-IV tg 発現マウスの交配による検討<sup>12)</sup>から, アポ A-I, アポ A-IV の抗動脈硬化作用が明らかにされた。Hashimoto ら<sup>13)</sup>は, アポ E 欠損患者の血漿

からアポ B-48を含む LDL (アポ B-48 LDL) を精製し、SDS-電気泳動すると、アポ A-I, アポ A-IV が検出され、アポ B-48 LDL にアポ E を添加すると、アポ A-I, アポ A-IV は大幅に減少し、アポ E が検出されると報告した。このことから、アポ EKO マウスの LDL にアポ A-I, アポ A-IV が存在するのは、アポ E がいないための代償作用とも考えられる。

これまでの報告から、アポ E tg マウスは血清脂質値を低下させ、動脈硬化に抵抗性を示し<sup>14)</sup>、動脈壁またはマクロファージで過剰産生されたアポ E は脂質レベルには影響を与えず動脈硬化を抑制することが示されている<sup>15)</sup>。アポ E は血中リポタンパク質代謝に重要な役割を果たしており、動脈硬化形成に関しても抑制に働くと考えられ、治療的意義も示唆されている。アポ EKO マウスはアポ E がノックアウトされているため、カイロミクロンレムナントや VLDL レムナントの肝臓への取り込みができない。また、アポ EKO マウスの LDL はアポ B-100 よりもアポ B-48が多いことから、LDL レセプターに結合できず、肝臓へ取り込まれない。そのため、カイロミクロンレムナントや VLDL レムナント、LDL が血中へうっ滞し、動脈硬化形成へと繋がると思われる。これを抑制するために、アポ EKO マウスはアポ E の代わりにアポ A-I, アポ A-IV を増加させ、抗動脈硬化に向かわせようとしていると思われる。アポ EKO マウスの CM+VLDL, LDL, HDL でアポ A-I, アポ A-IV が正常マウスよりも多く存在していたのは、アポ E がいないための代償作用であると推察される。また、アポ EKO マウスは HDL が正常マウスの50%程度しか存在しないため、末梢組織から肝臓への Chol の転送が不十分であることも動脈硬化形成に繋がると思われる。

この研究でリポタンパク質の脂質組成、タンパク質組成の分析によりアポ EKO マウスでは正常マウスと比較して CM+VLDL と LDL に質的異常が見出された。HDL は、量的な減少はみられるが、脂質組成には異常が見出されなかったことから、CM+VLDL と LDL の質的異常がアポ EKO マウスの動脈硬化形成に関連があると思われる。これまでは悪玉コレステロールと呼ばれている LDL の増加や変性 LDL が動脈硬化形成に関与すると強調されてきた。しかし、今回のリポタンパク質の脂質組成、タンパク質組成の分析から LDL だけでなく CM, VLDL も動脈硬化形成に強く関与していると思われる。今後、アポ EKO マウスを抗動脈硬化に働くといわれている食事で飼育し、栄養条件によるリポタンパク質の脂質組成、タンパク質組成を検討

し、アポ A-I, アポ A-IV の動向を明らかにしたい。もし、アポ A-I, アポ A-IV が増加することで、動脈硬化病巣が軽減していれば、アポ E の代わりにアポ A-I, アポ A-IV を増加させる食事条件により、動脈硬化を予防、治療することができるようになると思われる。

## V 要 旨

アポ EKO (アポ E ノックアウト) マウスの動脈硬化形成の機序を解明する目的で、アポ EKO マウスの血清からカイロミクロン (CM) + 超低密度リポタンパク質 (VLDL), 低密度リポタンパク質 (LDL), 高密度リポタンパク質 (HDL) を分離精製し、それぞれの画分の脂質組成とタンパク質組成について正常マウスと比較し、以下の結果が得られた。

1. アポ EKO マウスの血清総コレステロール (Chol) は正常マウスに比べ約7倍、トリグリセライド (TG) は約3倍高かった。
2. アポ EKO マウスの CM+VLDL と LDL の Chol+TG/リン脂質比は、それぞれ正常マウスの2.0倍、3.2倍に増加し、アポ EKO マウスの CM+VLDL, LDL 粒子内に正常マウスの2~3倍の脂質を含んでいた。
3. SDS-電気泳動によるタンパク質組成の分析から、アポ EKO マウスではアポ E が検出されることが確認された。アポ EKO マウスの LDL にはアポ B-100よりもアポ B-48が多く存在し、正常マウスとは逆であった。また、アポ EKO マウスの LDL には正常マウスではみられないアポ A-I, アポ A-IV が存在していた。

脂質化学組成、タンパク質組成の分析からアポ EKO マウスでは正常マウスと比べて CM+VLDL と LDL に質的異常が見出された。アポ EKO マウスの動脈硬化形成は HDL ではなく CM+VLDL と LDL の質的異常に関連することが示唆された。

## 参考文献

- 1) Zhang, S. H., Reddick, R. L., Piedrahita, J. A., Maeda, N. (1992) Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* **258**, 468-471.
- 2) Plump, A. S., Smith, J. D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J. G., Rubin, E. M., and Breslow, J. L. (1992) Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES

- cells. *Cell* **71**, 343-353.
- 3) Mahley, R. W. (1988) Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* **240**, 622-630.
- 4) Havel, R. J., Eder, H. A., Bragdon, J. H. (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.* **34**, 1345-1353.
- 5) Bradford, M. M. (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- 6) Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- 7) Ishibashi, S., Brown, M. S., Goldstein, J. L., Gerard, R. D., Hammer, R. E., Herz, J. (1993) Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J. Clin. Invest.* **92**, 883-893.
- 8) Ishibashi, S., Goldstein, J. K., Brown, M. S., Herz, J., Burns, D. K. (1994) Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J. Clin. Invest.* **93**, 1885-1893.
- 9) Williamson, R., Lee, D., Hagaman, J., Maeda, N. (1992) Marked reduction of high density lipoprotein cholesterol in mice genetically modified to lack apolipoprotein A-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7134-7138.
- 10) 山本章. (1981) リポ蛋白とその役割. 血清脂質—その臨床, 基礎, 分析法 (山本章編). 中外医学社 18-32.
- 11) Plump, A. S., Scott, C. J., Breslow, J. L. (1994) Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9607-9611.
- 12) Duverger, N., Tremp, G., Caillaud, J-M., Emmanuel, F., Castro, G., Fruchart, J-C., Steinmetz, A., Deneffe, P. (1996) Protection against atherogenesis in mice mediated by human apolipoprotein A-IV. *Science* **273**, 966-968.
- 13) Hashimoto, Y., Tsukamoto, K., Teramoto, T., Kurokawa, K., Watanabe, T. (1997) Purification and characterization of low density lipoprotein containing apolipoprotein B-48 from the plasma of an apoE-deficient patient. *Clin. Chim. Acta* **259**, 109-116.
- 14) Shimano, H., Yamada, N., Katsuki, M., Shimada, M., Gotoda, T., Harada, K., Murase, T., Fukuzawa, C., Takaku, F., Yazaki, Y. (1992) Overexpression of apolipoprotein E in transgenic mice: Marked reduction in plasma lipoproteins except high density lipoprotein and resistance against diet-induced hypercholesterolemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1750-1754.
- 15) Shimano, H., Ohsuga, J., Shimada, M., Namba, Y., Gotoda, T., Harada, K., Katsuki, M., Yazaki, Y., Yamada, N. (1995) Inhibition of diet-induced atheroma formation in transgenic mice expressing apolipoprotein E in the arterial wall. *J. Clin. Invest.* **95**, 469-476.