

VLDLの酸化とグリコサミノグリカンによる抑制

新井博文¹⁾, 柏木史郎²⁾, 長坂祐二¹⁾, 内田浩二³⁾,
星井嘉信⁴⁾, 福永健治⁵⁾, 中村和行⁶⁾
(¹⁾ 山口県立大・生活科学*, ²⁾ 山口大・医・脳外**, ³⁾ 名古屋大院・生命農***,
⁴⁾ 山口大・医・一病理**, ⁵⁾ 関西医科大・公衆衛生****, ⁶⁾ 山口大・医・一生化**)

Oxidative Modification of Human Very Low Density Lipoprotein and Its Inhibition by Glycosaminoglycans

Hirofumi ARAI¹⁾, Shiro KASHIWAGI²⁾, Yuji NAGASAKA¹⁾, Koji UCHIDA³⁾,
Yoshinobu HOSHII²⁾, Kenji FUKUNAGA⁴⁾ and Kazuyuki NAKAMURA²⁾

¹⁾ *Department of Nutrition, Yamaguchi Prefectural University*

²⁾ *School of Medicine, Yamaguchi University*

³⁾ *School of Agricultural Science, Nagoya University*

⁴⁾ *Kansai Medical University*

Summary

The mechanism of metal ion-catalyzed oxidative modification of apolipoprotein E (apoE) in human very low density lipoprotein (VLDL) and its inhibition by glycosaminoglycan (GAG) was investigated *in vitro*. The VLDL oxidation catalyzed by Cu²⁺ led to the lipid peroxidation and covalent modification of apoE. The modified apoE lost heparin-binding activity. These results suggest that the lipid peroxidation of VLDL and modification of apoE cause impairment of lipid uptake by cells and deposit the oxidized lipids in the tissues. The lipid peroxidation and oxidative modification of apoE in VLDL mediated by Cu²⁺ and an aqueous radical generator were suppressed by GAG, heparan sulfate, heparin, and chondroitin sulfate A. These studies suggest that GAGs preserve the biological functions of apoE

* 所在地：山口市桜島3-2-1 (〒753-8502)

** 所在地：山口市大字吉田1677-1 (〒753-0841)

*** 所在地：名古屋市千種区不老町 (〒464-8603)

**** 所在地：守口市文園町10-15 (〒570-8506)

from oxidative stress.

ヒト血漿低密度リポタンパク質 (LDL) の脂質過酸化およびそれにともなうアポリポタンパク質 B (apoB) の修飾について近年多くの研究がなされており、様々な疾病の発生や進行との関連が示唆されている^{1),2)}。LDLの代謝前駆体である超低密度リポタンパク質 (VLDL) はLDLに比してタンパク質重量当たりの脂質含量が高いため、易酸化的であると考えられるが、これまでのところ VLDLの酸化修飾に関しては詳細に検討されていない。

VLDLを構成するアポリポタンパク質 E (apoE) は apoBと同様に細胞表面の LDLレセプターおよびプロテオグリカンへのリガンドとして働き、生体内での脂質輸送に重要な役割を果たすことが知られている^{3),4)}。アポリポタンパク質はプロテオグリカンのグリコサミノグリカン (GAG) に結合するが、GAGへの結合部位には塩基性アミノ酸残基が集合しており³⁾、活性酸素による酸化修飾を受けやすいと考えられる。

そこで本研究ではヒト VLDLに *in vitro*系で酸化ストレスを負荷し、脂質過酸化にともなう apoEの酸化修飾と GAGへの結合性の変化について調べた。さらに GAGによる VLDLの酸化修飾抑制効果について検討した。

実験方法

12時間絶食後の健康成人男子の新鮮血漿から超遠心分離法によって VLDL画分を得た。VLDL懸濁液 (100 μ gタンパク質, pH 7.4) に Cu²⁺ (50 μ M) または水溶性ラジカル発生剤 (AAPH, 5mM) を加え、37 $^{\circ}$ Cで酸化反応を引き起こした。経時的に反応液中のチオパルピツール酸反応性物質 (TBARS) およびコレステロールエステルヒドロペルオキシド (ChE-OOH) 濃度を測定した。apoEの酸化修飾は SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS - PAGE) およびウエスタンブロットティング法 (WB) によって分析した。GAG (ヘパラン硫酸およびヘパリン, コンドロイチン硫酸 A) の存在下で同様に VLDLを酸化し、GAGの抗酸化活性を評価した。Cu²⁺触媒によって酸化した VLDL (50 μ gタンパク質) を湿潤量 50mgの Heparin - Sepharose CL-6B (HS6B) と混合し、HS6Bに結合している apoEを SDS - PAGE および WB で分析することによって修飾を受けた apoEのヘパリン結合能を評価した。GAGのフリーラジカル捕捉能は *a, a*-diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) 法⁵⁾ で調べた。

結 果

Cu²⁺触媒によるヒト血漿 VLDL画分の脂質過酸化反応において、TBARSの蓄積が認められた。未酸化 VLDL中の apoEは SDS-PAGE (Fig. 1A, lane 1) および抗 apoE抗体を用いた WB (Fig. 1B, lane 1) で分子量 34Kの明瞭なバンドとして検出されるが、酸化 VLDL中の apoEは見かけ 35kのバンドおよび高分子スミア状バンドとして検出された (Fig. 1AおよびB, 各 lane 2)。脂質ヒドロペルオキシドの分解によって生成する主要アルデヒドである 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) 標準物質を apoEに直接反応させた場合にも apoEの高分子化が起こり (Fig. 1B, lane 3), 35kのバンドは抗 HNE抗体によって検出された

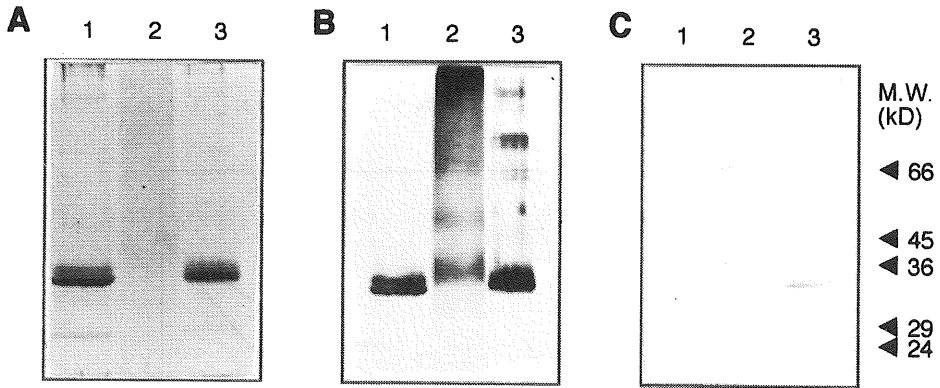


Fig. 1 SDS-PAGE and subsequent immunoblot analysis of apoE in oxidized VLDL. (A) SDS-PAGE. (B) Immunoblotting for apoE detection. (C) Immunoblotting for HNE-protein adducts detection. Samples in A-C were as follows : lane 1, native VLDL ; lane 2, VLDL (100 μ g protein) oxidized by Cu^{2+} (50 μ M) in TBS (pH 7.4) at 37 $^{\circ}$ C for 12h ; lane 3, VLDL (120 μ g protein) incubated with 20mM HNE in TBS (pH 7.4) at 37 $^{\circ}$ C for 3h.

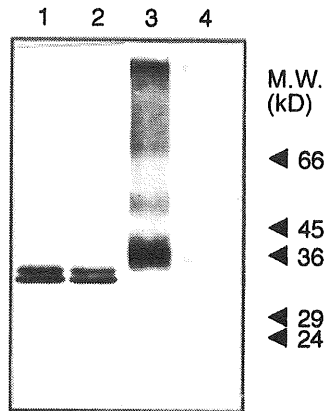


Fig. 2 Heparin-binding activity of apoE in VLDL. Native VLDL (50 μ g protein) and VLDL oxidized by 50 μ M Cu^{2+} at pH 7.4 for 12h (50 μ g protein) were incubated with 50mg of Heparin Sepharose CL-6B (HS6B) at 4 $^{\circ}$ C for 3h. VLDL bound to HS6B was extracted and subjected to immunoblotting. Lane 1, native VLDL ; lane 2, HS6B-binding fraction in native VLDL ; lane 3, oxidized VLDL ; lane 4, HS6B-binding fraction in oxidized VLDL.

(Fig. 1C, lane 3)。しかし、 Cu^{2+} 触媒による酸化VLDL中に抗HNE抗体陽性反応物は認められなかった (Fig. 1C, lane 2)。

Fig. 2はVLDLの酸化にともなうapoEのヘパリン結合能の変化を示している。酸化VLDL中のapoEの

ヘパリン結合能は著しく低下した。

Fig. 3はCu²⁺触媒によるVLDL酸化反応溶液中のGAG濃度（ヘパラン硫酸，ヘパリンおよびコンドロイチン硫酸A）と反応12時間後のTBARS生成抑制率との関係を示している。2%のGAGによって

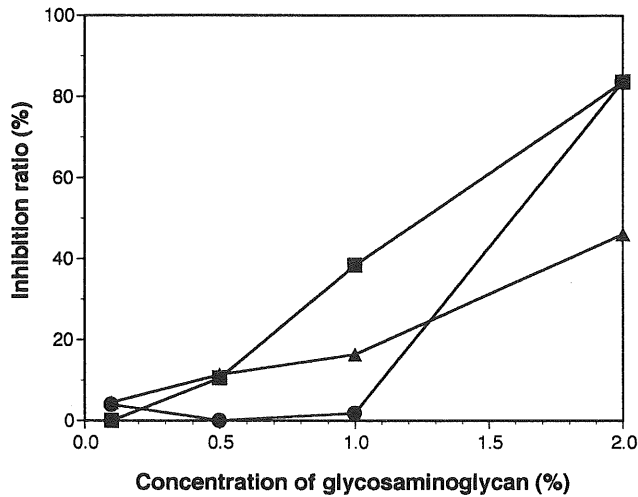


Fig. 3 Inhibition of Cu²⁺-catalyzed oxidation of VLDL by GAGs. The reaction system was the same as that described in the legend of Fig. 1. Inhibition ratios (%) were calculated from the equation $\text{inhibition ratio (\%)} = ([B] - [A]) / [B] \times 100$, where [A] and [B] are TBARS value after 12h incubation in the presence of GAG and that in the absence of GAG, respectively. Heparan sulfate (●), heparin (▲), chondroitin sulfate A (■).

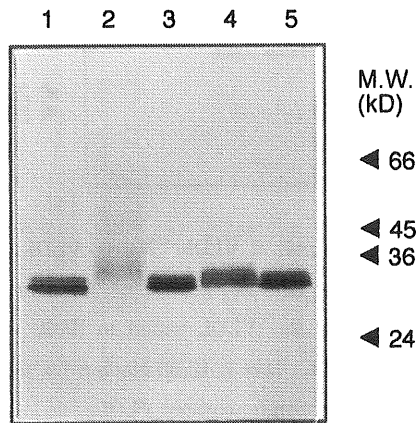


Fig. 4 Inhibition of Cu²⁺-catalyzed oxidative modification of apoE in VLDL by GAGs. VLDL (100μg protein) was oxidized by Cu²⁺ (50μM) in TBS (pH 7.4) for 12h in the presence and the absence of GAG (2%) and subjected to immunoblot analysis for apoE. Lane 1, native VLDL ; lane 2, oxidized VLDL ; lane 3, +heparan sulfate ; lane 4, +heparin; lane 5, +chondroitin sulfate A.

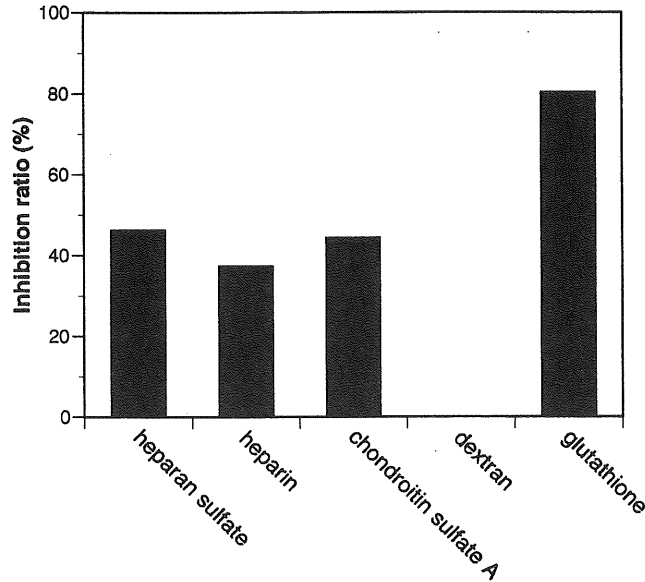


Fig. 5 Inhibition of ChE-OOH accumulation in peroxyl radical-mediated oxidation of VLDL by GAGs, dextran, and glutathione (2%). The reaction mixture consisted of VLDL (100 μ g protein) and 5mM AAPH in TBS (pH 7.4). ChE-OOH was determined by HPLC with UV detection

TBARSの蓄積は40～80%抑制された。同時にapoEの酸化修飾もGAGによって強く抑制された (Fig. 4)。Fig. 5はAAPH触媒によるVLDL酸化反応溶液中のGAG濃度と反応12時間後のChE-OOH生成抑制率との関係を示している。2%のGAGによってChE-OOHの蓄積は30～50%抑制された。しかし、これらのGAGはDPPHラジカルを全く捕捉しなかった。

考 察

HNEは脂質ヒドロペルオキシドのレドックス分解、 β 開裂等を介して生成する⁶⁾。HNEはタンパク質のリジン、ヒスチジン、システイン残基と反応し、マイケル付加体を形成する⁷⁾。Fig. 1に示したように Cu^{2+} が触媒するVLDLの酸化反応において明らかにapoEは修飾を受けるが、HNE-apoE付加体は検出されなかった。この原因としては、apoEがHNEを介した分子間架橋によって著しく高分子化し、SDS-PAGEの分離範囲を越えたこと、あるいはapoEがHNE以外の活性酸素種によって修飾を受け、HNE-apoE付加体の生成量がWBの検出限界以下だったことが考えられる。

リポタンパク質とGAGの相互作用については詳細に調べられており、リポタンパク質のリジンおよびアルギニン残基とGAGの硫酸基およびカルボキシル基とのイオン結合によるものと考えられている⁸⁾。リポタンパク質とGAGの相互作用はリポタンパクリパーゼの関与するリポタンパク質代謝を制御する可能性が示唆されている^{9),10)}。Fig. 2で示したようにapoEはVLDLの脂質過酸化反応にともない、ヘパリンへの結合能を消失した。この結果はapoEの酸化修飾が脂質代謝の異常をまねく可能性を示唆している。

Ross et al. および Albertini et al. はヘパリンが抗酸化活性を示すことを報告している^{11),12)}。ヘパリン、ヘパラン硫酸およびコンドロイチン硫酸 A は Cu^{2+} が触媒する VLDL の脂質過酸化を抑制すると同時に apoE の修飾を阻害した (Fig. 3, Fig. 4)。さらにこれらの GAG は DPPH ラジカルを捕捉しないにもかかわらず、AAPH が触媒するペルオキシラジカル連鎖反応を介した脂質過酸化に対しても抑制効果を示した (Fig. 5)。ヘパリン、ヘパラン硫酸およびコンドロイチン硫酸 A は構成糖中の硫酸基数がそれぞれ異なるが、 Cu^{2+} および AAPH が触媒する VLDL の脂質過酸化における抗酸化活性との相関はみられなかった (Fig. 3, Fig. 5)。GAG の抗酸化メカニズムは明らかではないが、GAG がアポリポタンパク質に結合して VLDL 粒子を取り囲むことで、活性酸素種の VLDL への直接反応を阻害している可能性が考えられる。GAG で構成されるプロテオグリカン は脂質代謝を調節するばかりではなく、リポタンパク質の酸化修飾を未然に防ぐ機能を有することが示唆された。

引用文献

- 1) Gutteridge, J. M. C. (1995) Clin. Chem., 41 : 1819-1828
- 2) Steinberg, D. (1997) J. Biol. Chem., 272 : 20963-20966
- 3) Mahley, R. W. (1988) Science, 240 : 622-630
- 4) Weisgraber, K. H. (1994) Adv. Protein. Chem., 45 : 249-302
- 5) Blois, M. S. (1958) Nature, 181 : 1199-1200
- 6) Esterbauer, H., R. J. Schaur and H. Zollner (1991) Free Radic. Biol. Med., 11 : 81-128
- 7) Uchida, K., S. Toyokuni, K. Nishikawa, S. Kawakishi, H. Oda, H. Hiai and E. R. Stadtman (1994) Biochemistry, 33 : 12487-12494
- 8) Jackson, R. L., S. J. Busch and A. D. Cardin (1991) Physiol. Rev., 71 : 481-539
- 9) Landis, B. A., F. S. Rotolo, W. C. Meyers, A. B. Clark and S. H. Quarfordt (1987) Am. J. Physiol., 252 : G805-G810
- 10) Nielsen, M. S., J. Brejning, R. García, H. Zhang, M. R. Hayden, S. Vilaró and J. Gliemann (1997) J. Biol. Chem., 272 : 5821-5827
- 11) Ross, M. A., W. F. Long and F. B. Williamson (1992) Biochem. J., 286 : 717-720
- 12) Albertini, R., S. Rindi, A. Passi, G. Pallavicini and G. D. Luca (1996) FEBS Lett., 383 : 155-158