



Relation of N-glycosylation of apolipoprotein B-100 to cellular metabolism of low density lipoprotein

Fujioka, Yoshio

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1995-01-11

(Date of Publication)

2008-03-28

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1891

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3105491>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001891>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	藤 岡 由 夫 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博ろ第1432号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成7年1月11日
学位論文題目	Relation of N-glycosylation of apolipoprotein B-100 to cellular metabolism of low density lipoprotein (アポ蛋白B-100アスパラギン結合糖鎖の構造の低比重リポ蛋白代謝におよぼす影響)
審査委員	主査 教授 横山 光 宏 教授 松尾 雅 文 教授 春日 雅 人

論 文 内 容 の 要 旨

[序 文]

糖蛋白であるアポ蛋白B-100 (以下アポB-100) は, 低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein, 以下LDL) や超低比重リポ蛋白 (very low density lipoprotein, 以下VLDL) 等の構造蛋白であり, LDL受容体のリガンドである。アポB-100は, そのアミノ酸構造の解析により19カ所のアスパラギン結合糖鎖の結合可能部位を有し, 実際に16カ所に同糖鎖が結合しており, そのうち7カ所はLDL受容体結合ドメインと考えられている領域に存在する。またWHHLウサギは加齢と共に血清コレステロール値が低下することが知られている。本研究ではWHHLウサギにおける加齢に伴う血清コレステロール値の変動と酸性糖鎖の比率の関係を調べた。さらにアポB-100アスパラギン結合糖鎖の病態生理学的役割を調べるため, 酸性糖鎖比率の異なるLDLを用いて皮膚線維芽細胞内のLDL代謝を検討した。

[方 法]

1. アポB-100アスパラギン結合糖鎖の構造解析

糖鎖の構造解析には4匹のホモ接合型WHHL家兎から4, 6.5, 12, 18ヶ月齢時に採取した血液を用いた。超遠心法によりLDL ($d=1.020-1.063$) を分離し, ポリアクリルアミドゲル電気泳動でアポB-100を分離, 精製した。得られたアポB-100をヒドラジン分解 (100°C , 8時間) でアスパラギン結合糖鎖を遊離し, 無水酢酸を用いてN-アセチル化を行った後, NaB^3H_4 で還元して ^3H 標識少糖とした。得られた少糖を高圧濾紙電気泳動にかけ, 中性画分(N)と2つの酸性画分(A1, A2)に分離した。2つの酸性画分をシアリダーゼ処理にて中性糖とし(酸性画分A1N, A2N), Bio-Gel P-4カラムにかけて糖鎖を分離し, 放射活性の測定により各画分の比率を算出した。Bio-Gel P-4カラムによる分析にはグルコースオリゴマーを内部標準として用いた。各糖鎖画分は逐次酵素分解処理及びメチル化分析により構造を決定した。A1, A2の酸性画分は, 酸水解 (0.01N HCl) により, それぞれシアル酸が1分子, 2分子結合していることを確認した。

2. 脂質の分析

コレステロール、トリグリセリドは酵素法で測定した。LDLをアガロースゲル電気泳動(70分)にかけ、ヒト正脂血症者のLDLの泳動度を1.0として相対泳動度を算出した。LDL粒子径はネガティブステイン法による電子顕微鏡写真より測定した。

3. LDLの細胞内代謝

新たに血清コレステロール値 $371.0 \pm 90.8 \text{ mg/dl}$ のWHHL家兎のLDLをhigh acidic ratio-LDL、血清コレステロール値 $952.2 \pm 98.5 \text{ mg/dl}$ のWHHL家兎のLDLをlow acidic ratio-LDLとして精製した。LDLを $[^{125}\text{I}]$ で標識し、日本白色家兎とWHHL家兎の線維芽細胞を用いて、Goldsteinらの方法に従い、標識LDLの取り込み量と分解量を測定した。また $[^{14}\text{C}]$ oleateを用いてコレステロールエステル合成能を測定した。

[結果]

1. アポB-100アスパラギン結合糖鎖の構造解析と血清コレステロール値との関係

アポB-100アスパラギン結合糖鎖の構造解析の結果、中性画分Nは2本鎖の高マンノース型糖鎖(Man α 1-2)₀₋₄ [Man α 1-6 (Man α 1-3) Man α 1-6 (Man α 1-3) Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc_{cor}]であった。酸性画分A1Nは4種類(a, b, c, d)からなり、a) Man₃・GlcNAc・GlcNAc_{cor}の母核構造に2本のGal β 1-4GlcNAc β 1-側鎖を持つ複合型、b) Man₃・GlcNAc・GlcNAc_{cor}に1本のGal β 1-4GlcNAc β 1-側鎖と1本のGlcNAc β 1-側鎖を持つ複合型、c)ハイブリッド型糖鎖Man α 1-3(6) Man α 1-6 (Gal β 1-4GlcNAc β 1-2 Man α 1-3) Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc_{cor}、d) Man₃・GlcNAc・GlcNAc_{cor}に1本のGal β 1-4GlcNAc β 1-側鎖とMan側鎖を持つ複合型であった。それぞれGal残基の末端にシアル酸を1分子結合していた。酸性画分A2NはMan₃・GlcNAc・GlcNAc_{cor}の母核構造に2本のGal β 1-4GlcNAc β 1-側鎖を持つ複合型糖鎖で末端にシアル酸が2分子結合していた。N, A1N, A2Nの比率を算出し、A1NとA2Nの和を酸性糖鎖比率(A1N + A2N (%))とした。すべてのWHHL家兎において血清コレステロール値は加齢とともに低下し、血清コレステロール値の逆数と酸性糖鎖比率は、正相関を示した($r=0.901$, $P<0.005$)。これらの結果からアポB-100の酸性糖鎖比率は各個体に固有の値をとるものではなく、血清コレステロール値に伴って変動することが明らかになった。

2. LDL相対泳動度の検討

シアル酸は陰性荷電を持ち、LDLの荷電は酸性糖鎖の比率に影響されると考えられる。血清コレステロール値の異なるWHHL家兎から採取したLDLの相対泳動度は、血清コレステロール値と有意な逆相関を示し($r=0.79$, $P<0.001$)、血清コレステロール値の高いWHHL家兎から採取したLDLは陰性荷電が低いことが認められた。

3. 酸性糖鎖比率が異なるLDLの分析

high acidic ratio-LDLの酸性糖鎖比率は $63.9 \pm 4.5\%$ でlow acidic ratio-LDLの酸性糖鎖比率($46.7 \pm 3.4\%$)より有意に高値であった。high acidic ratio-LDLに比べて、low acidic ratio-LDLでは遊離コレステロールの重量比は有意に高くトリグリセリドの重量比は有意に低かったが、相対泳動度は小さく、粒子径に有意差はなかった。

4. 酸性糖鎖比率が異なるLDLの細胞内代謝

日本白色家兎皮膚線維芽細胞においてlow acidic ratio-LDLの取り込み量、分解量およびコレステロールエステル合成能はhigh acidic ratio-LDLに比べ濃度依存性に1.5~2倍高値であった。W

HH L家兎皮膚線維芽細胞においては両LDLの取り込み量と分解量に差はなく、日本白色家兎の細胞における取り込み量と分解量に比べ著明に低かった。

[考 察]

アスパラギン結合糖鎖のheterogeneityについてはIgG myeloma蛋白、慢性関節リュウマチのIgG、肝癌患者の種々の糖蛋白などの病的な状態で報告されており、またSindbis virusでは蛋白の形態や条件の違いにより糖鎖の組成が異なることや、細胞の成長と共に糖鎖のプロセッシングに關与する酵素活性が変化し糖鎖の組成が異なることが示されている。

今回の研究で、同一固体でも血清コレステロール値の変動に伴いapo B-100の酸性糖鎖比率が変化することが明らかになり、コレステロール代謝が糖鎖のプロセッシング（複合型糖鎖合成の段階に關与するN-acetylglucosaminyl-transferase Iと α -mannosidase II）の活性の変化に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。合成分泌されたアポB-100含有リポ蛋白の代謝の違いが酸性糖鎖比率を変化させた可能性はWHHL家兎において血清コレステロール値の逆数と酸性糖鎖の比率が正相関を示したこと、更にWHHL家兎皮膚線維芽細胞で両LDLの取り込み量と分解量に差がなかったことから考え難い。血中でシアル酸がはずれる可能性は構造解析において証明されなかったことから否定された。

アポB-100のアスパラギン結合糖鎖のLDL代謝における役割については意見の一致を見ていない。今回の検討では正常家兎皮膚線維芽細胞におけるLDLレセプターを介するコレステロール代謝にアポB-100のアスパラギン結合糖鎖の違いが影響を及ぼすことが示された。この機序としては、アポB-100のLDLレセプター結合ドメインの陰性荷電の違いや蛋白の構造変化によると思われる。

以上、WHHL家兎のapo B-100のアスパラギン結合糖鎖の構造解析を行い、酸性糖鎖比率が血清コレステロール値の変動に伴い変化すること、更に酸性糖鎖比率の違いがLDLの細胞内代謝に影響することを明らかにした。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

糖蛋白であるアポ蛋白B-100（以下アポB-100）は低比重リポ蛋白（low density lipoprotein, 以下LDL）や超低比重リポ蛋白（very low density lipoprotein, 以下VLDL）等の構造蛋白であり、LDL受容体のリガンドである。アポB-100は、そのアミノ酸構造の解析により19カ所のアスパラギン結合糖鎖の結合可能部位を有し、実際に16カ所に同糖鎖が結合しており、そのうち7カ所はLDL受容体結合ドメインと考えられている領域に存在する。本研究では遺伝性高脂血症（WHHL）家兎における加齢に伴う血清コレステロール値の変動と酸性糖鎖の比率の関係を調べた。さらにアポB-100アスパラギン結合糖鎖の病態生理学的役割を調べるため、酸性糖鎖比率の異なるLDLを用いて皮膚線維芽細胞内のLDL代謝を検討した。

1. ホモ接合型WHHL家兎の血液から超遠心法により分離したLDLからアポB-100を分離精製した。アポB-100アスパラギン結合糖鎖の構造解析の結果、中性画分Nは2本鎖の高マンノース型糖鎖（ $\text{Man } \alpha 1-2$ ）₀₋₄、 $[\text{Man } \alpha 1-6 (\text{Man } \alpha 1-3) \text{Man } \alpha 1-6 (\text{Man } \alpha 1-3) \text{Man } \beta 1-4\text{GlcNAc } \beta 1-4\text{GlcNAc}_{\text{cor}}]$ であった。酸性画分A1Nは4種類（a, b, c, d）からなり、a) $\text{Man}_3 \cdot \text{GlcNAc} \cdot \text{GlcNAc}_{\text{cor}}$ の母核構造に2本の $\text{Gal } \beta 1-4\text{GlcNAc } \beta 1$ -側鎖を持つ複合型、b) $\text{Man}_3 \cdot \text{GlcNAc} \cdot \text{GlcNAc}_{\text{cor}}$ に1本の $\text{Gal } \beta 1-4\text{GlcNAc } \beta 1$ -側鎖と1本の $\text{GlcNAc } \beta 1$ -側鎖を持つ複合型、c)ハイブリッド型糖鎖

Man α 1-3 (6) Man α 1-6 (Gal β 1-4GlcNAc β 1-2 Man α 1-3) Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc_{cor}d) Man₃ • GlcNAc • GlcNAc_{cor}に1本のGal β 1-4GlcNAc β 1-側鎖とMan側鎖を持つ複合型であった。それぞれGal残基の末端にシアル酸を1分子結合していた。酸性画分A 2 NはMan₃ • GlcNAc_{cor}の母核構造に2本のGal β 1-4GlcNAc β 1-側鎖を持つ複合型糖鎖で末端にシアル酸が2分子結合していた。すべてのWHHL家兎において血清コレステロール値は加齢とともに低下し、血清コレステロール値の逆数と酸性糖鎖比率 (A 1 NとA 2 Nの和) は、正相関を示した。これらの結果からアポB-100の酸性糖鎖比率は各個体に固有の値をとるものではなく、血清コレステロール値に伴って変動することが明らかになった。この機序としてコレステロール代謝が糖鎖のプロセッシング (複合型糖鎖合成の段階に関与する*N*-acetylglucosaminyl-transferase Iと α -mannosidase II)の活性に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

2. LDL相対泳動度を検討した結果、シアル酸は陰性荷電を持ち、LDLの荷電は酸性糖鎖の比率に影響されると考えられる。血清コレステロール値の異なるWHHL家兎から採取したLDLの相対泳動度は、血清コレステロール値と有意な逆相関を示し、血清コレステロール値の高いWHHL家兎から採取したLDLは陰性荷電が低いことが認められた。

3. 酸性糖鎖比率が異なるLDLの細胞内代謝を調べた。日本白色家兎皮膚線維芽細胞においてはlow acidic ratio-LDLの取り込み量、分解量およびコレステロールエステル合成能はhigh acidic ratio-LDLに比べ濃度依存性に1.5~2倍高値であった。一方、WHHL家兎皮膚線維芽細胞においては両LDLの取り込み量と分解量に差はなく、日本白色家兎の細胞における取り込み量と分解量に比べ著明に低かった。今回の検討で正常家兎線維芽細胞におけるLDLレセプターを介するコレステロール代謝にアポB-100のアスパラギン結合糖鎖の違いが影響を及ぼすことが示されたが、この機序としては、アポB-100のLDLレセプター結合ドメインの陰性荷電の違いや蛋白の構造変化によると思われる。

本研究は、WHHL家兎のapo B-100のアスパラギン結合糖鎖の構造解析を行い、酸性糖鎖比率と血清コレステロール値の変動の関係、更に酸性糖鎖比率の違いがLDLの細胞内代謝に及ぼす影響について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士 (医学)の学位を得る資格があると認める。