
演題名 apolipoprotein A-I の糖化・重合が ATP binding cassette transporter A1 を介した細胞中コレステロールの排出に及ぼす影響

氏名 黒崎祥史 小川善資

所属 北里大学大学院医療系研究科

【目的】血漿中の高比重リポ蛋白質 (HDL) は、末梢組織のコレステロールを肝臓へと輸送するコレステロール逆転送 (RCT) において主要な役割を担い、抗動脈硬化作用を有している。HDL 中で最も主要な構成タンパクは apolipoprotein A-I (A-I) であり、HDL を中心として脂質代謝に重要な役割を担う。近年、A-I は慢性的な高血糖状態で発生するメチルグリオキサールによって糖化されて重合体を形成することが報告されている。A-I の糖化による立体構造の変化がその機能に及ぼす影響として、lecithin cholesterol acyltransferase 活性化能が低下する等が報告されている。一方で、RCT 経路における A-I の重要な機能として、ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) を介する細胞内コレステロールの排出への関与がある。これは、末梢組織細胞中に蓄積したコレステロールを肝臓へ転送する為の重要なステップである。本研究では、A-I 糖化による重合が A-I と ABCA1 の誘導する細胞のコレステロール放出能にどのような影響を及ぼすかについて、線維細胞を用いて検討した。

【方法】超遠心法により得られた HDL から、DEAE カラムを用いて A-I を精製した。精製した A-I を 1 mg/ml になるよう調整し、3 mmol/L メチルグリオキサールを添加して 37°C で 0-48 時間インキュベーションした。糖化 A-I が重合しているかどうかを、western blotting にて確認した。線維芽細胞のひとつである MRC-5 を通常どおり培養し細胞数が 1×10^5 cells/well 以上であることを確認した。培養上清にろ過滅菌後の正常 A-I (normal A-I) もしくは糖化 A-I (glycated A-I) をそれぞれ 0 - 20.0 ug/ml 添加して、24 時間培養した。培養上清中のコレステロールをホルチ法で抽出し、その濃度を測定した。

【結果】精製した A-I にメチルグリオキサールを添加して糖化させると、A-I が重合することが確認できた。そこで、正常な A-I (normal A-I) もしくは糖化させて重合させた A-I (glycated A-I) を添加して 24 時間 MRC-5 を培養した際に、培養上清中に排出されたコレステロールを測定した。細胞に normal A-I を添加した際、添加量 10 ug/ml までは濃度に依存して、培養上清中のコレステロール濃度も上昇した。10 ug/ml 添加時をピークにして、20 ug/ml normal A-I 添加時にはコレステロール濃度は減少した。一方で、glycated A-I を添加しても培養上清中のコレステロール濃度は増加しなかった。

【考察】MRC-5 に normal A-I を添加して培養した時、培養上清中のコレステロール量は増加した。これは MRC-5 に存在する ABCA1 に A-I が作用して、MRC-5 からのコレステロール排出が誘導されたと考えられた。これに対して、MRC-5 へ glycated A-I を添加してもコレステロールの排出が誘導されなかった。A-I は糖化されて A-I 重合体を形成することにより、ABCA1 に対する作用が低下して細胞に蓄積したコレステロールを排出させる機能が低下することが示唆された。