

氏名	ありもと いたる 有本達
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第424号
学位授与の日付	平成11年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科製薬化学専攻
学位論文題目	Studies on physicochemical properties of emulsion surface and lipoprotein lipase activity (脂質エマルジョン表面膜の物理化学的性質とリポ蛋白質リパーゼの活性に関する研究) (主査)
論文調査委員	教授 半田哲郎 教授 中川照眞 教授 多賀 徹

論 文 内 容 の 要 旨

リポ蛋白質リパーゼ (LPL) は毛細血管壁にヘパラン硫酸を介して結合し、血液循環中のリポ蛋白質のトリグリセライド (TG) を加水分解 (リポリシス) する酵素である。また、脂肪乳剤や薬物キャリアーとしての脂質エマルジョンなどの外来脂質粒子も、血液中でLPLによるリポリシスを受ける。リポリシスはリポ蛋白質或いは脂質エマルジョンの表面単分子膜の物理化学的性質、そして脂質組成に依存すると考えられる。血漿リポ蛋白質はその種類により脂質組成の異なることが知られているが、脂質組成とリポリシスの関係は明らかでない。そこで筆者は、リポリシス調節メカニズムの解明を目的として、リポ蛋白質の表面膜構成脂質であるスフィンゴミエリン (SM) とコレステロール (Chol) がリポリシスに及ぼす影響を脂質エマルジョンを用いて *in vivo*、並びに *in vitro* で評価した。このリポリシスの見かけの反応速度パラメーターを求め、また、パラメーターに対する脂質エマルジョン表面での律則因子を表面酵素反応速度論より明らかにした。次に、脂質組成のエマルジョン表面単分子膜の物理化学的性質への影響を研究して、リポリシスの律則因子との関係を解明した。

第1章 脂質エマルジョン粒子のプラズマからの消失とリポリシス

脂質エマルジョン (粒子径100nm) は、高圧乳化機により脂質成分を乳化し、次に共存するリポソームを超遠心により除き調製した。コントロールのエマルジョンとして、コア脂質のトリオレイン (TO) を卵黄レシテン (PC) により乳化した TO-PCエマルジョンを用いた。SMエマルジョン (TO-PC/SM (モル比2/1))、Cholエマルジョン (TO-PC/Chol (3/2)) も同様に調製して、ラットに静注後の血中エマルジョン粒子濃度、及び血中TO濃度を測定した。SMエマルジョンはコントロールに比べて、粒子の血中滞留性が上昇すると同時にTOの消失は著しく遅くなった。このことは、ラット体内で、SMエマルジョンのリポリシスが遅いことを示している。一方、Cholエマルジョンはコントロールに比べて血中からの粒子の消失が顕著に早かった。この場合、リポリシスが粒子の血中消失速度に追いつかない可能性も考えられ、*in vivo*でのLPL活性を評価することは困難である。そこで、粒子が消失していかない実験系として、カラム中のヘパリンに固定化したLPLにplasmaと脂質エマルジョンのmixtureを循環させ、リポリシス速度を測定した。その結果、Cholエマルジョンのリポリシス速度にコントロールとの違いはみられず、一方、SMエマルジョンの反応速度は減少した。また、コントロールエマルジョンの粒子径を200nmにしてもリポリシス速度の変化はなかった。このようにして、リポ蛋白質表面脂質のなかで、Cholはリポリシスには影響せずに肝臓などへの取り込みを促進するのに対して、SMはリポリシスを阻害することを見出した。

第2章 脂質エマルジョン表面のリポ蛋白質リパーゼによるリポリシスに関する速度論的考察

表面膜中のSMが引き起こすリポリシス阻害機構を明らかにする目的で、脂質エマルジョン表面で起こるリポリシスの見

かけの反応速度パラメーターを求めた。その結果、SM含量が増えると、 $K_m(\text{app})$ の増大、並びに $V_{\text{max}}(\text{app})$ の減少の両効果によりリポリシスが阻害されることが明らかになった。一方、Chol含有による両パラメーターの変化は見られなかった。表面反応速度論より、 $K_m(\text{app})$ または $V_{\text{max}}(\text{app})$ に影響する因子としてLPLのactivatorであるアポリポ蛋白質C-II (apoC-II)の結合量、表面リン脂質膜中のTO濃度等が考えられる。まず、各エマルションへのapoC-II結合量を求めた結果、表面膜中のSM含量の増大によりapoC-II結合量は減少した。しかし、リポリシスに影響しないCholがさらに顕著にapoC-II結合量を減少させたことから、この範囲のapoC-II結合量の変化は反応速度に影響を与えないと考えられた。次に、TOのリン脂質膜への飽和濃度を ^{13}C -NMRにより測定したところ、SM含量の増加による飽和TO濃度の上昇が示され、SMによるリポリシス阻害は表面リン脂質膜中のTO濃度の減少が原因ではないと確認された。事実、TO濃度を一定に保つことのできる気-水界面単分子膜上においても、SMを含む膜中ではリポリシス反応が阻害された。反応速度論に基づく考察より、表面膜中のSMの存在は、LPLと脂質エマルションの結合性を低下させて $K_m(\text{app})$ の増大を引き起こし、表面に結合しているLPLの触媒活性を低下させて $V_{\text{max}}(\text{app})$ の減少を導くと推察された。

第3章 脂質エマルション表面膜の物理化学的性質とリポ蛋白質リパーゼの活性

上述したSMによるリポリシスの阻害機構は、脂質組成変化が及ぼす脂質エマルション表面単分子膜の物理化学的性質の変化が関係すると思われる。そこで、表面膜中のSMやCholの膜構造への影響を蛍光分光学的手法により検討した。表面膜アシル鎖領域の蛍光異方性を測定した結果、SM又はChol含量の増加により流動性の減少が観測された。しかし、SMの効果はCholに比べて小さく、アシル鎖領域の堅さではLPLの反応性を説明できない。次に、表面膜極性基領域の水和度を蛍光プローブを用いた重水同位体効果により評価した。その結果、SM含量の増加に伴い極性基付近の水和度は減少する、つまり膜表面の構造性が密になることが示された。SMのこの効果は極性基の水素結合能が高いためであることが、飽和アシル鎖レシチンとの比較より推定された。また、アシル鎖を顕著に硬くするCholは膜表面の水和度には影響を与えなかった。種々の脂質エマルションで、 $K_m(\text{app})$ の値と膜表面の水和度とに良い相関がみられ、SMの存在は脂質間水素結合により膜表面の構造性を高めて、LPLの結合性を低下させ、それに伴い $K_m(\text{app})$ を増大させると結論された。

一方、 $V_{\text{max}}(\text{app})$ の値に影響するLPL触媒活性は、基質のTGが酵素の活性部位に移行するプロセスに依存すると思われる。SMとTGとの混合膜中ではTGが膜中で安定に存在することが確認され、TGがLPL活性部位に移行しにくくなることがSMエマルションの $V_{\text{max}}(\text{app})$ の低下に寄与していると考えられた。

以上、脂質エマルションを用いた速度論的解析により、LPLの脂質粒子表面の見かけの反応速度パラメーターに対する律速因子を決定し、その律速因子と膜構造との関連を明らかにした。これらの結果は、血漿リポ蛋白質代謝についての新知見であるとともに、リポリシスの制御された薬物キャリアーの設計にも重要な情報を提供したと思われる。

論文審査の結果の要旨

リポ蛋白質リパーゼ (LPL) は、血液循環中のリポ蛋白質のトリグリセライド (TG) を加水分解 (リポリシス) する酵素である。リポリシスはリポ蛋白質或いは脂質エマルションの表面単分子膜の物理化学的性質、そして脂質組成に依存すると考えられるが、脂質組成とリポリシスの関係は明らかでない。申請者はリポリシス調節メカニズムの解明を目的として、リポ蛋白質の表面膜構成脂質であるスフィンゴミエリン (SM) とコレステロール (Chol) がリポリシスに及ぼす影響を脂質エマルションを用いて *in vivo*、並びに *in vitro* で評価し、以下の研究結果を得た。

コントロールのエマルションとして、コア脂質のトリオレイン (TO) を卵黄レシチン (PC) により乳化した TO-PC エマルションを用いた。SM エマルション (TO-PC/SM (モル比2/1)) も同様に調製して、ラットに静注後の血中エマルション粒子濃度、及び血中TO濃度を測定した結果から、ラット体内でSMエマルションのリポリシスが遅いことを明らかにした。また、ヘパリンに固定化したLPLにplasmaと脂質エマルションのmixtureを循環させリポリシス速度を測定した結果、SMエマルションの反応速度は減少した。

脂質エマルション表面で起こるリポリシスの見かけの反応速度パラメーターを求めた。その結果、SM含量が増えると、 $K_m(\text{app})$ の増大、並びに $V_{\text{max}}(\text{app})$ の減少の両効果によりリポリシスが阻害されることが明らかになった。一方、Chol

含有による両パラメーターの変化は見られなかった。表面反応速度論より、 $K_m(\text{app})$ または $V_{\text{max}}(\text{app})$ に影響する因子としてLPLのactivatorであるアポリポ蛋白質C-IIの結合量、表面リン脂質膜中のTO濃度等が考えられるが、これらはSMによるリポリシス阻害の原因ではないと確認された。表面膜中のSMは、LPLと脂質エマルションの結合性を低下させて $K_m(\text{app})$ の増大を引き起こし、表面に結合しているLPLの触媒活性を低下させて $V_{\text{max}}(\text{app})$ の減少を導くと推察された。

次に、表面膜アシル鎖領域の蛍光異方性を測定した結果、SM又はChol含量の増加により流動性の減少が観測された。しかし、SMの効果はCholに比べて小さく、アシル鎖領域の堅さではLPLの反応性を説明できない。極性基領域の水和度を蛍光プローブを用いた重水同位体効果により評価した結果、SM含量の増加に伴い極性基付近の水和度は減少する、つまり膜表面の構造性が密になることが示された。また、アシル鎖を顕著に硬くするCholは膜表面の水和度には影響を与えなかった。 $K_m(\text{app})$ の値と膜表面の水和度とに良い相関がみられ、SMの存在は膜表面の構造性を高めて、LPLの結合性を低下させ、それに伴い $K_m(\text{app})$ を増大させると結論された。一方、 $V_{\text{max}}(\text{app})$ の値に影響するLPL触媒活性は、基質のTGが酵素の活性部位に移行するプロセスに依存すると思われる。SMとTGとの混合膜中ではTGが膜中で安定に存在することが確認され、TGがLPL活性部位に移行しにくくなることがSMエマルションの $V_{\text{max}}(\text{app})$ の低下に寄与していると考えられた。

以上、本研究は脂質エマルションを用いた速度論的解析により、LPLの脂質粒子表面の見かけの反応速度パラメーターに対する律速因子を決定し、その律速因子と膜構造との関連を明らかにした。これらの結果は、血漿リポ蛋白質代謝についての新知見であるとともに、リポリシスの制御された薬物キャリアーの設計にも重要な情報を提供したと考える。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成11年2月18日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。