

細胞内脂質輸送機構の解析

— 細胞内ビタミンE特異的輸送タンパク質の構造と意義 —

東京大学薬学部

新井 洋 由

α -Tocopherol, the most biologically active form of vitamin E, is a lipid-soluble antioxidant, which can inhibit the peroxidation of membrane lipids. α -Tocopherol is widely distributed throughout the mammalian tissues, where it is found in the membranes of intracellular organelles. The mechanism by which α -tocopherol is transported to intracellular organelles has not yet been clarified. α -Tocopherol transfer protein which facilitate the transfer of this vitamin between membranes was detected in rat liver cytosol by us and others. We have recently succeeded in purification of α -tocopherol transfer protein and showed that the protein has Mr. of about 30 kDa and is composed of two charge isomers. Furthermore, we have isolated the cDNA encoding α -tocopherol transfer protein and deduced the primary amino acid sequence. The protein is unique and is not identical to any other proteins ever reported. Both Western and Northern blot analyses revealed that α -tocopherol transfer protein is expressed exclusively in the liver in rats. Surprisingly, α -tocopherol transfer protein has been found to exhibit a structural homology with the cellular retinal binding protein present only in retinal epithelial cells and with SEC 14 protein that bind to and transfer specifically phosphatidylinositol and phosphatidylcholine. These three proteins may form a new family of lipid binding/transfer proteins.

1. 緒 言

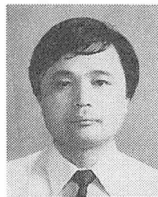
活性酸素やフリーラジカルにより生ずるいわゆる酸素毒性に対して、生体は一連の防御システムを備えている。ビタミンE（別名トコフェロール）は脂溶性のラジカル捕捉型抗酸化物として生体内で最も重要なものであり、生体膜における脂質の連鎖的過酸化反応を抑えることにより、生体膜の酸化傷害を防いでいる。ビタミンEの抗酸化物としての化学的特性や、様々な病態との関係等についてはかなり詳細に解析されてきている。—

方、生体という不均一な場においては、いかにして必要な時に、必要な場に、そして必要な量を正しく供給するかということは非常に重要な問題である。

ビタミンEのように水に溶けない物質の輸送には、生体は複雑な機構でこれに対処している。まず、小腸から吸収されたビタミンEは、小腸で合成されるリポタンパク質の1つであるキロミクロンとともに、リンパ管を経て血管中へと輸送される。さらに、各臓器への輸送にも血漿リポタンパク質が利用されている。しかし、ビタミンEのリポタンパク質への結合は物理化学的性質によるものであり、特別な結合因子が存在しているわけではない。従って、その輸送もリポタンパク質代謝にそったいわば受動的な輸送といえる。

一方、細胞内においては、ビタミンEは主に細胞内小器官の膜脂質二重層に存在しており、細胞の外から供給されたビタミンEは、何らかの方法で各小器官に輸送されているはずである。しかし

Mechanism of intracellular lipid transport
— Structure and function of
 α -tocopherol transfer protein —



Hiroyuki Arai

Faculty of Pharmaceutical
Sciences
The University of Tokyo

これまで、ビタミンEの細胞内輸送機構に関しては殆ど知見がなかった。このような背景のもとに、我々は細胞内のビタミンEの輸送機構というものに興味をもち研究を開始した。最近我々は、ビタミンEの細胞内輸送に関すると考えられるユニークな細胞内タンパク質の単離、一次構造の解明に成功した。その結果、ビタミンEの体内動態を制御する新たな機構が見えてきた。ここでは、この新規細胞内ビタミンE特異的輸送タンパク質について最近の知見を紹介する。

2. α -トコフェロール輸送タンパク質の同定と精製

我々は、動物の臓器の可溶性画分中にビタミンEの膜間輸送を促進する因子があるのではないかと考え、検索を行った¹⁾。方法は、ビタミンEの一つである α -トコフェロールの放射標識体を組み込んだリポソームをドナーに、また、ラット肝臓より調製した比較的重い(10,000×g遠心で沈殿する)膜画分をアクセプターに用い、リポソームから膜画分への α -トコフェロールの移行率を測定することにより輸送活性を測定した。図1に示すように、何も試料を加えなくてもある程度の速度で α -トコフェロールはリポソームから膜画分への経時的な移行がみられたが、ここに、ラット肝臓から調製した可溶性画分を加えると、移行速度の有意な増加が観察された。従って、この可溶性画分には、 α -トコフェロールの膜間輸送を促進する何らかの因子が存在すると考えられ

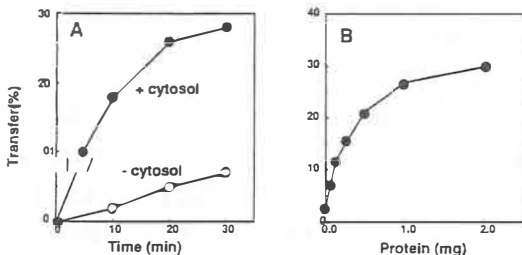
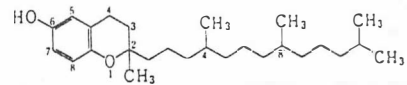


図1 ラット肝可溶性画分による α -トコフェロールの膜間輸送促進

た。そこで、この因子の性状を解析した結果、熱に対して不安定であること、トリプシン消化によって失活すること、などからタンパク質であると予測された。さらに、可溶性画分をゲル濾過カラムにかけて、この因子の分子量を調べたところ、約3万の位置に活性が溶出された。

ビタミンEには、図2に示すようにクロマン環のメチル基の数や位置の違いによって、 α 、 β 、 γ 、 δ といった同族体が存在する。



トコロール

(2-メチル-2-(4', 8', 12'-トリメチルトリデシル)-6-クロマンオール)



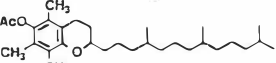

Toc	トコロール	分子式	分子量
α -	5, 7, 8-トリメチル-	$C_{29}H_{50}O_2$	430.71
β -	5, 8-ジメチル-	$C_{28}H_{48}O_2$	416.69
γ -	7, 8-ジメチル-	$C_{28}H_{48}O_2$	416.69
δ -	8-メチル-	$C_{27}H_{46}O_2$	402.66

図2 ビタミンE同族体の構造

そこで見いだされたタンパク質がこれらの同族体の中でどれをよく認識するか調べてみた。リポソームに放射標識した α -トコフェロールとともに、過剰量の無標識類似体を加え、競合実験によってその特異性を調べた。その結果、表1に示すように、無標識の α -トコフェロールを過剰に加えると、 α -トコフェロール標識体のみかけ上の移行は顕著に低下したが、クロマン環のメチル基の数が1つ少ないだけの γ -トコフェロールを加えても競合率は低いということが分かった。また、フェノール性水酸基をブロックした α -トコフェロール酢酸や、酸化体の α -トコフェリルキノンでは殆ど競合障害は見られなかった。従って、このタンパク質は、ビタミンE同族体のなかでも α -トコフェロールを特異的に認識し輸送することが判明し、我々は α -トコフェロール輸送タンパク質(α TTP)と名付けた。その後長い間、このタンパク質の実体は不明のままであったが、最近、このタンパク質の完全精製に成功した²⁾。

α TTPは以下の各操作で精製した。ラット肝

表1 ビタミンE輸送タンパク質の基質特異性

Competitor	[¹⁴ C]α-Toc.Transfer(%/30min)	
	I	II
None	16.1	14.6
α-Tocopherol 	0.0	0.0
γ-Tocopherol 	5.8	5.3
α-Tocopherol acetate 	13.0	12.9
Tocopherol quinone 	16.2	13.2

臓のホモジェネートから10,000×g遠心上清を集め、pH 4.5の酸処理を行い、その上清を硫酸分画後、ゲル濾過(セファデックスG-75)、イオン交換(DEAEセファロース)、ヒドロキシアパタイト、クロマトフォーカシング、ブルーセファロースの各クロマトグラフィーで完全精製品を得ることができた。αTTPは、クロマトフォーカシングの段階で、等電点5.1および5.0の2つのピークに分かれた。最終精製品はどちらのアイソフォームも約1000倍の精製倍率であり、ラット肝臓可溶画分の全タンパク質のうち2つ合わせて約0.2%を占める比較的豊富なタンパク質であることが分かった。精製品のSDS-PAGEパターンでは、どちらのアイソフォームも分子量30,500の単一バンドを示し(図3)、また、ゲル濾過カラムによる活性の溶出位置から算出される分子量も約3万であったことから、このタンパク質はモノマーで活性を示すことが明らかになった。

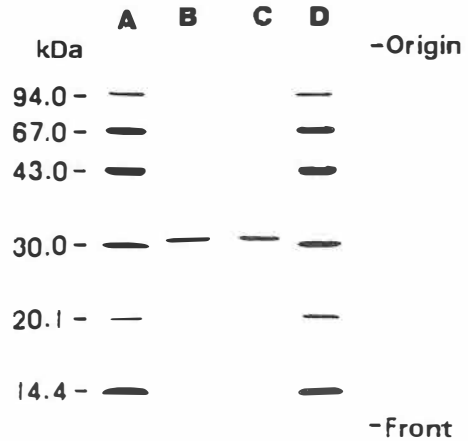


図3 ビタミンE輸送タンパク質のSDS-PAGEパターン

レーンA,D: 分子量マーカー
レーンB : 等電点5.1アイソフォーム
レーンC : 等電点5.0アイソフォーム

3. αTTPの性質

1) 基質特異性

精製したαTTPを用いた場合も、α-トコフェロールに対して強い選択性を示した。また、2つのアイソフォームの間で基質特異性には差はみられなかった。現在のところ、これら2つのアイソフォームの機能的違いは明らかになっていない。一方、αTTPは、α-トコフェロールを結合して、シャトル機構によって膜間輸送を促進することが判明し、αTTP1分子当り1分子のα-トコフェロールが結合することが、精製タンパク質を用いた実験から明らかになった。

2) 局在性

まず、精製タンパク質を用いて各種モノクローナル抗体を作製した。それらの中には、等電点の異なる2つのアイソマーを共に認識する抗体、および一方のアイソマーのみを認識する抗体が得られた。このことは2種類のアイソマーが免疫化学的に似ているが、異なる部分も存在することを示している。

次に、両アイソマーを認識する抗体を用いて、 α TTPの臓器分布を調べたところ、興味深いことに、ラット各臓器の中で本タンパク質は肝臓にしか存在しないことがわかった。しかし、様々な肝癌細胞株を調べてみたところ、いずれにも α TTPは発現していなかった³⁾。また、ラット肝臓実質細胞の初代培養系を用いて α TTPの発現を調べると、培養開始後24時間内に実質細胞から速やかに消失していった。以上のように、 α TTPは、「肝臓特異的に発現しているタンパク質」であり、しかも「分化特異的に発現するタンパク質」であることが明らかになった。

4. α TTP 遺伝子のクローニング

α TTP 特異的抗体を用いて、ラット肝臓cDNAライブラリーから遺伝子クローニングを行った結果⁴⁾、全長2194bpの α TTPをコードするクローンが得られた。そこから推定されるタンパク質は、278個のアミノ酸をコードし(図4)、これから算出される分子量は31,845となり、精製タンパク質のものとよく一致していた。また、 α TTPはこれまでに報告されているどのタンパク質とも異なり、新規のタンパク質であることが分かった。全体的にそれほど疎水性は高くなく、疎水性基質と結合するようなドメインは一次構造からは推定できなかった。しかし、C末端側に疎水性アミノ酸が比較的多く存在していたことから、C末端側部分に基質(の特に疎水部)結合部位が存在している可能性が示唆された。また3'非翻訳領域は約1300bpと比較的長く、そのなかにmRNAの半減期を短くするシグナルといわれているAUUUA配列が4箇所存在していた。本タンパク質は肝初代培養系において速やかに消失したことを述べたが、このmRNAの特徴を反応しているかもしれない。

得られた遺伝子が2つの等電点の異なるアイソマーのどちらをコードするか、モノクローナル抗体を用いて発現したタンパク質との反応性で調べ

```

-70      -60      -50      -40      -30      -20
GGCGCGTTATTCCCATGACCCCGGGCGAGCTCCGGGAACCAAGTCTTTGGGTTCCG
-10      10      20      30      40
GGGGGGCGGGCATGGCAGAGATGCGGCCGGGGCCAGTGGTTGGAAACAGCTCAAGGAG
          M A E M R P G P V V G K Q L N E
50      60      70      80      90      100
CAGCCCGACCACTCGCCCTGGTCCAGCCGGCCCTGGCCGAAGTGGGGCCGGGGCCGAC
Q P D H S P L V Q P G L A E L R R R A Q
110     120     130     140     150     160
GAGGAGGGGCTCCAGAGACCCCGCAGCCGCTCACAGACGCTTCTTGTGGATTCTCTG
E E G V P E T P Q P L T D A F L L R F L
170     180     190     200     210     220
CGTGGCCGGGATTCGACTGGACCTGGCCCTGGCCGCTTAATGAAACATATTACAAATGG
R A R D F D L D L A W R L M K N Y Y K W
230     240     250     260     270     280
CGAGCAGAATGTCAGAACTAAGTCAGATCTACACCTAGAAGTATCCTTGGACTTCTG
R A E C P E L S A D L H P R S I L G L L
290     300     310     320     330     340
AAGCTGGCTACCATGGAGTTCCTGAGTCCAGGATCCGACTGGCAGTACAGTCTCTCATT
K A G Y H G V L R S R D P T G S R V L I
350     360     370     380     390     400
TACCGAATTCCTATTGGGACCCAAAGTTTTTACAGCTATGATGTTTCTGTGTAAGT
Y R I S Y W D P K V F T A Y D V F R V S
410     420     430     440     450     460
CTGATCACATCAGAGCTCATTGTACAGGAGGGGAAACTCAACGGAATGGAGTCAAGGCT
L I T S E L I V Q E V E T Q R N G V K A
470     480     490     500     510     520
ATATTTGACCTGGAAGGCTGGCAGATTTCTCATGTCTTTCAAATTACCCCATCTGTAGCC
I F D L E G W Q I S H A F Q I T P S V A
530     540     550     560     570     580
AAGAAGATTGCTGCTGTAGTACAGATTCCTTCCATTGAAAGTTCGGGGATCCATTGG
K K I A A V V T D S F P L K V R G I H L
590     600     610     620     630     640
ATAAATGAGCCGGTCAATTTCCATGCTGTCTTTCCATGATTAACCACTTCTGACTGAA
I N E P V I F H A V F S M I K P F L T E
650     660     670     680     690     700
AAGATTAAGGGTCGGATTACATCGATGGGAACAATATAAATCAAGCCTACTTCAGCAC
K I K G R I H L H G N N Y K S S L L Q H
710     720     730     740     750     760
TTCCAGACATCTTCTCTGGAATATGGTGGTAAGCAGCTCCATCGGAGATATTGT
F P D I L P L E Y G G N E S S M E D I C
770     780     790     800     810     820
CAGGAGTGGCAAAATTTTATAAGTCTGAAGATATCTCAGCAGCATTTCTGAGACC
Q E W T N F I M K S E D Y L S S I S E T
830     840     850     860     870     880
ATCCAAATGAGAAGTTGTTTCTGTAAGTACTCATCAAATCAAGGATGGATTCTA
I Q *
890     900     910     920     930     940
TCTGGTTACTAAACTCAAGACCAACCTTCTAAACGAATGATCCTTATCTGATCTTTAA

```

図4 ビタミンE輸送タンパク質

た結果、等電点5.0のアイソマーをコードすることが明らかになった。我々は、このクローン以外に5つの別のクローンを単離したが、いずれも同じアイソマーをコードするクローンしか得られなかった。肝臓内において、2つのアイソマーはタンパク質的にはほぼ同量発現している。従って、2つのアイソマーは同じ遺伝子にコードされており、翻訳後の修飾の違いによって生じた可能性も考えられる。しかし、現在2つのアイソマーの構造的相違はまだ明確ではなく、また機能的役割分担も含めて今後解決されなければならない問題である。

5. 既知のタンパク質との相同性

得られたラット α TTPのアミノ酸配列と既知のタンパク質とのホモロジーを検索した結果、興味深いホモロジーがあることが見いだされた。1つは眼の網膜に存在し、11-シス-レチナールを特異的に結合するタンパク質（CRALBP, cellular retinaldehyde binding protein）であり、もう1つは、酵母のSEC14タンパク質である。CRALBPは1988年にクローニングされたが、他のレチノイド結合タンパク質、例えばレチノール結合タンパク質やレチノイン酸結合タンパク質などとは全くホモロジーがない。このタンパク質は、眼の網膜上皮細胞内に存在し、視細胞にレチナールを供給する役割を持つと考えられている。一方、SEC14は、酵母の分泌変異株の1つから得られた遺伝子であり、その機能は、分泌過程の中で特にゴルジ体の関与する過程において必須であることがわかっている。また、このタンパク質は、リン脂質の中でホスファチジルイノシトールとホスファチジルコリンの膜間での交換輸送を行う活性を有することが知られている。しかし、この活性と分泌過程における機能との関連は現在のところ明確ではない。これらのタンパク質の間でのホモロジーを調べると、 α TTPとCRALBPの間では約54%、 α TTPとSEC14の間で約40%であった。

以上のように、 α TTPは、2つの全く異なる脂質、すなわちレチナールとホスファチジルイノシトール（およびコリン）を輸送するタンパク質と相同性が高いことが判明し、これらが脂質輸送タンパク質としての新しいファミリーを形成している可能性が考えられる。これらのタンパク質は、輸送する基質は異なっても機能的類似性があるかもしれず、それについては後に議論する。

6. α TTPの生理的役割

当初、我々は、ビタミンEのような脂溶性分子を細胞内で各小器官に運ぶためには、何らかの輸送担体が必要であろうという考えのもとに、 α -トコフェロールの輸送タンパク質の検索を始めた。最初に用いた材料がラットの肝臓可溶性画分であったため、すぐにそのようなタンパク質を同定することができ、こうしたタンパク質は恐らくすべてのビタミンEを必要とする臓器に存在すると思われた。しかしながら、その後 α TTPの性状が解析されるに従い、 α TTPは肝臓にのみ特異的に発現していることが明らかになってきた。従って、我々が同定、精製した α TTPは、 α -トコフェロールの細胞内輸送を普遍的に担うタンパク質ではなく、むしろ、肝臓特有の機能を担うタンパク質であることが予想されてきた。そこで、これまでのビタミンの体内動態に関する知見をもとに、 α TTPの性状から予想される α TTPの生理的役割を推察してみたい。

既に述べたように、自然界のビタミンEにはメチル基の数や位置の違いによって、 α 、 β 、 γ 、 δ -トコフェロールなどの同族体が存在する。一般に食物の中には α -トコフェロールよりも γ -トコフェロールのほうが多い。例えば、ダイズ油では γ 体は α 体の約6倍多く含まれる。生体はこれらのトコフェロールを食餌として摂取しているが、ヒトやラットなど哺乳動物の生体内には α -トコフェロールのほうが多く存在する。例えば、健康人血しょう中の α -トコフェロール濃度は γ -トコフェロールに比較して5~20倍高い。従って、哺乳動物にはこれらトコフェロール同族体を識別して α -トコフェロールを選択的に摂取する機構が存在するはずである。また、実験的に α -トコフェロールの投与量を増加させると、脂肪酸の吸収などとは異なり、体内への α -トコフェロールの摂取率が低下することから摂取機構には飽和過程があることが示唆されていた。しかし、

高等動物がいかにしてトコフェロール同族体を識別し、一定量を摂取しているかについてはこれまでまったく不明のままであった。

最近、米国のKaydenおよびカナダのIngoldの共同研究によって、吸収されたビタミンEの体内動態が詳細に解析され、一つの説が出された⁵⁾。彼らの実験によると、まず α -トコフェロールと γ -トコフェロールは、小腸での吸収段階ではいずれも同程度の効率で吸収され、キロミクロンに結合しリンパ管へ放出されることがわかった(図5)。キロミクロンは血液中で代謝を受け、一部のトコフェロールは各末梢組織に受け渡されるが、

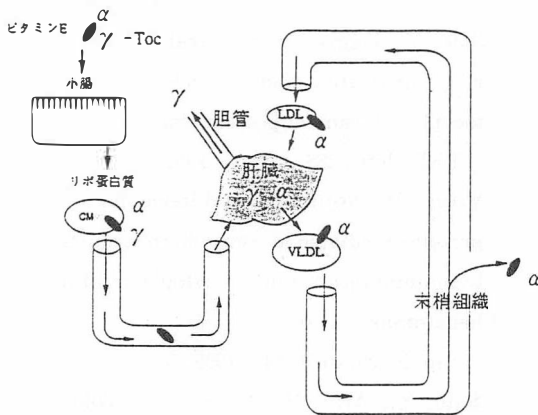


図5 ビタミンEの体内動態

残りはキロミクロン粒子とともに一旦肝臓に取り込まれる。肝臓に取り込まれたトコフェロールは、次に肝臓で合成されるリポタンパク質である高密度リポタンパク質(VLDL)に結合して再び血液中に放出される。興味深いことに、肝臓に取り込まれたトコフェロールのうち、 α -トコフェロールのみがVLDLに結合して再び血液中に放出されるが、 γ -トコフェロールはVLDLにはほとんど結合していなかった。VLDLは血液中で最終的にはLDLまで代謝されるが、これらのリポタンパク質を介して各組織に α -トコフェロールが供給される。こうして生体内には α -トコフェロールが選択的に蓄積していくものと考えた。言い換えれば、生体内におけるトコフェロー

ル同族体の識別は、小腸における吸収段階にあるのではなく、肝臓内にあることが提唱されたのである。我々が精製した α TTPは、同族体のなかで α -トコフェロールを選択的に認識し、しかも生体内において肝臓にのみ存在する。これらの結果は、ビタミンE同族体の肝臓での識別にこの輸送タンパク質が関与していることを強く示唆している。そこでこのような仮説に基づいて、 α TTPの肝細胞内での役割を考察してみた。

キロミクロンレムナントは、肝臓内に取り込まれた後ライソソームで分解され、結合していた α -および γ -トコフェロールが遊離される。これらのトコフェロールはライソソーム膜を通過して細胞質側に放出されるが、これらのうち α 体だけが細胞質に存在する特異的輸送タンパク質に結合する。はじめに述べたように、 α -トコフェロールはVLDLに選択的に取り込まれて血液中に再放出されると考えられるので、 α TTPは結合した α -トコフェロールをVLDLが合成されるオルガネラまで輸送する機能を持つと考えられる。VLDLは小胞体膜で合成されゴルジ装置を経て分泌されており、 α TTPはこれらのオルガネラのどこかを認識し、 α -トコフェロールを効率良くVLDLに運ぶ機能を担っているものと考えられる。 α TTPをクローニングした結果、このタンパク質が、酵母のSEC14とホモロジーがあることを前に述べた。SEC14は分泌過程に必須のタンパク質であり、電顕による観察の結果、細胞質のみならず一部はゴルジ体膜にも結合していることが示されている。もし、 α TTPも同様の性質を有しているならば、ゴルジ体において α -トコフェロールを分泌過程にあるVLDLに受け渡しているかもしれない。現在我々は、このような仮説に基づき解析を続けている。一方、 γ -トコフェロールは、本輸送タンパク質に結合できず、効率良く再循環されないために体内濃度が低下するものと考えられる。

血液中を循環するリポタンパク質は、絶えず肝臓に取り込まれて代謝されている。例えばヒト

血漿リポタンパク質の主要成分であるLDLの約2/3量は肝臓に取り込まれて代謝されている。肝臓は再び新たなリポタンパク質(VLDL)を合成して再び血液中に分泌する。従って、血漿リポタンパク質に結合した α -トコフェロールも、血液中を循環している間に一旦は肝臓内に取り込まれなければならない。ここで α TTPに結合したトコフェロールだけがVLDLと共に再循環されるならば、肝臓内の α TTPが体内を循環する α -トコフェロール量を規定している可能性が考えられる。はじめに α -トコフェロールの摂取量には飽和性があることを述べたが、その分子機構の実体がこの α TTPであるのかも知れない。現在、 α TTPの発現にどのような調節機構があるのか全く不明であるが、 α TTP発現の調節により生体内ビタミンE量を制御する機構も考えられ、今後の興味深い問題である。

ところで、古くからビタミンE欠乏症という先天性疾患が知られていた。このような患者では、筋肉、神経に異常が発生し、反射消失、運動失調、感覚異常、筋力低下等の症状が現れる。欠乏症の原因の1つは、リポタンパク質の構成成分の一つであるアポBが合成できないために血液中のリポタンパク質が欠損し、ビタミンEを血液中で輸送できないことによる。またこれとは別に、リポタンパク質合成は正常であるにも関わらず、原因不明のビタミンE欠乏症があることが知られていた。最近この患者におけるトコフェロールの体内動態が解析され、その結果、小腸ではビタミンEを正常人と同じように吸収できるが、その後 α -トコフェロールも γ -トコフェロールと同様にすばやく排泄してしまうために欠乏症に陥るということが明らかにされた。従って、このような先天性患

者では α TTPが欠損していると考えるところまで説明できる。現在我々はラットのcDNAをもとにヒト肝臓にも非常によく似たタンパク質があることを確認し、そのcDNAを単離している。近い将来、これらの遺伝子を材料にビタミンE欠乏症の原因の1つが明らかになるかも知れない。

参考文献

- 1) Mowri, H., Nakagawa, Y., Inoue, K. and Nojima, S. : Enhancement of the transfer of α -tocopherol between liposomes and mitochondria by rat-liver protein (s) .
Eur. J. Biochem., 117, 537-542 (1981)
- 2) Sato, Y., Hagiwara, K., Arai, H. and Inoue, K. : Purification and characterization of α -tocopherol transfer protein from rat liver.
FEBS lett., 288, 41-45 (1991)
- 3) Mowri, H., Nojima, S. and Inoue, K. : Lack of protein-mediated α -tocopherol transfer between membranes in the cytoplasm of ascites hepatomas.
Lipids, 23, 459-464 (1988)
- 4) Sato, Y., Arai, H., Miyata, A., Tokita, S., Yamamoto, K., Tanabe, T. and Inoue, K. : Primary structure of α -tocopherol transfer protein from rat liver : Homology with cellular retinaldehyde binding protein.
J. Biol. Chem., 268, 17705-17710 (1993)
- 5) Kayden, H. J. and Traber, M.G. : Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans.
J. Lipid Res., 34, 343-358 (1993)