

生体内で活性のある酸化 LDL を検出する － 真の悪玉コレステロールの一括検出 －

試験研究計画名：ホメオスタシス維持機能をもつ農林水産物・食品中の機能性成分多視点
評価システムの開発と作用機序の解明

研究代表機関名：自然免疫制御技術研究組合

背景とわらい：

酸化 LDL (いわゆる“悪玉コレステロール”)は、生活習慣病の危険因子として知られていますが、酸化的修飾を受けた LDL 分子の総称であり、修飾の程度も異なった不均一な分子集団です。酸化 LDL を認識し生活習慣病発症の引き金となる機能不全を誘導する受容体 (LOX-1) の認識能に着目し、酸化的修飾を受けた LDL 分子中から、生体中で活性を示す酸化 LDL (真の悪玉) のみを広範に検出する手法の確立を目指しました。

特長と効果：

- ・ LOX-1 の酸化 LDL 認識領域 (CTLD14) を遺伝子組換えカイコにより安定生産することに成功しました (図 1)。カイコにより生産された CTLD14 は、カイコ型糖鎖の付加を受けており、pH 安定性が向上するなどの特性が確認されました。
- ・ カイコ型 CTLD14 を活用し、酸化的修飾を受けた広範な LDL を検出可能なプレートタイプ検出システムを開発しました (図 2)。開発したシステムは、LDL とは反応せず、 $3 \mu\text{g/ml}$ 以下の酸化 LDL を特異的に検出可能なことが明らかとなりました (図 3)。さらに、大過剰の LDL ($1200 \mu\text{g/ml}$) が存在し、高コレステロール、高トリグリセライド値を示す血漿中においても、数 $\mu\text{g/ml}$ の酸化 LDL の変化が検出可能なことが確認されました (図 4)。
- ・ 一方、pH 安定性の問題から活用範囲が限られていた CTLD14 が、pH 安定性、塩非存在下での安定性を獲得したことから、ラテラルフローアッセイの原理に基づいた簡易ストリップを作製し、金属コロイド修飾 CTLD14 を検出試薬として、20 分以内に 30ng 以下の酸化 LDL が検出可能なことが確認されました。

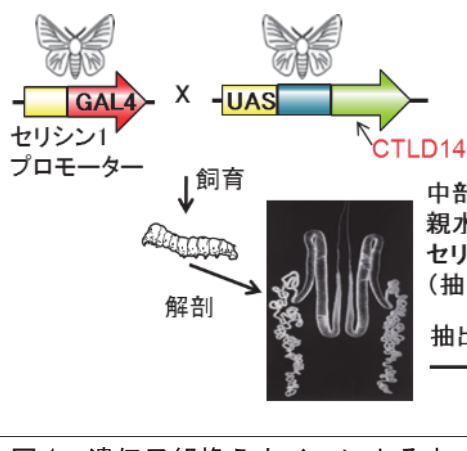


図 1. 遺伝子組換えカイコによる中部絹糸腺への CTLD14 生産

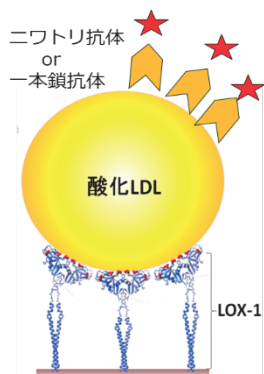


図 2. カイコ型 CTLD14 による酸化 LDL 検出原理。固相化した LOX-1 の認識部位 (CTLD14) と抗酸化 LDL ニフトリ抗体 (若しくは、抗酸化 LDL 一本鎖抗体) で酸化 LDL をサンドイッチし、発色 (450nm における吸光度) により酸化 LDL を定量

健康機能性を高める
高付加価値の創出

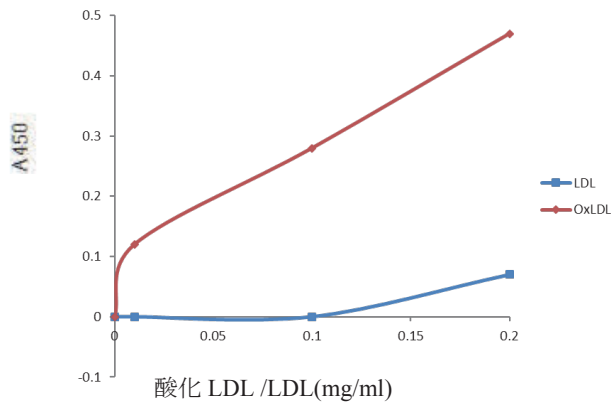


図 3. 開発したシステムによる酸化 LDL、LDL の添加回収実験結果。横軸：測定系に添加した酸化 LDL、もしくは、LDL の濃度 (mg/ml)、縦軸：450nm の吸光度。酸化的修飾を受けていない LDL は高濃度で存在しても反応しないことから、酸化的修飾を受けた LDL のみを検出可能なことが確認されました。

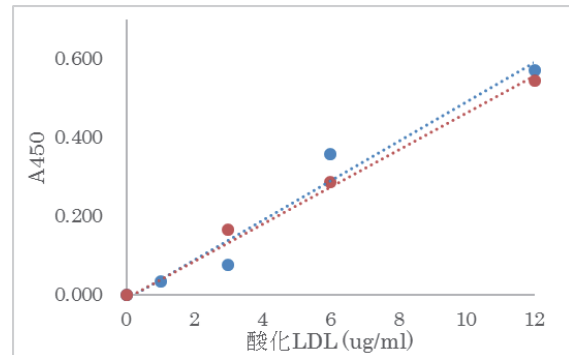


図 4. 脂質異常を示す血漿中への酸化 LDL の添加回収実験結果。横軸：血漿に添加した酸化 LDL 濃度 (ug/ml)、縦軸：450nm の吸光度。●：高コレステロール、●：高トリグリセライドにも影響されず血漿中の酸化 LDL 量の変化を検出可能なことが確認されました。

社会実装の対象と可能性：

- ・ LDL 正常値は $1200 \mu\text{g/ml}$ 未満であり、通常、酸化 LDL は、LDL の 0.2% 程度です。そのため、ヒトを対象とした酸化 LDL 濃測定に必要な検出感度は $2\sim 3 \mu\text{g/ml}$ ですが、開発されたシステムはこの感度を満たしています。
- ・ ヘルスケア分野で、生活習慣改善効果を評価する指標としての活用や、食品産業分野における開発食品の摂取効果を評価する手法としての活用、が期待されます。
- ・ 脂質異常などの進展段階毎のデータの蓄積により、健康診断や検診などへの活用が期待されます。

参考文献：

- ・ Journal of Bioscience and Bioengineering, 122(3) :287-93. Doi:10.1016/j.jbiosc.2016.02.014 (2016).
- ・ Scientific Reports, 7:356. Doi:10.1038/s41598-017-00420-4(2017).
- ・ 特許：PCT/JP2015/005017(2015)，特願2016-551559 (2017. 2. 2)，USAN 15/515998 (2017. 3. 30)，CN:201580065415.X (2017. 6. 1)，HK: 18106800.7 (2018. 5. 28)。

研究担当機関名： 農研機構 食品研究部門、同・生物機能利用研究部門

研究担当者： 農研機構 食品研究部門 小堀俊郎、山本万理、町田幸子、倉持みゆき、同・生物機能利用研究部門 瀬筒秀樹、立松謙一郎、早川舞

問い合わせ先： 国立研究開発法人 農研機構 食品研究部門広報担当
電話：029-838-8050 E-mail：kohop-nfri@ml.affrc.go.jp
<http://www.naro.affrc.go.jp/inquiry/index.html>

作成日： 2019/04