

動脈硬化易発ウズラの遺伝子変異に関する研究

岩崎 公典

2000

①

動脈硬化易発ウズラの遺伝子変異に関する研究  
(Studies on the genetic disorder of  
hyperlipidemia atherosclerosis prone quail.)

鹿児島大学大学院連合農学研究科  
生物資源利用科学専攻  
応用生物化学連合講座  
配属大学：琉球大学 (2000)  
岩崎 公典

## 目次

第一章 緒論 .....	5
第二章 動脈硬化易発性ウズラ(Hyperlipidemia Atherosclerosis Prone: LAP)のアポリポタンパク質 遺伝子のクローニング .....	8
第一節 動脈硬化易発性及び正常日本ウズラにおけるアポ A-I タンパク質の構造と mRNA の組織分布およびコレス テロール投与の影響 .....	8
緒言 .....	8
方法および材料 .....	10
実験動物 .....	10
RNA 抽出 .....	10
アポ A-I cDNA のクローニング .....	11
cDNA 塩基配列決定 .....	12
ノーザンブロットハイブリダイゼーション .....	12
各種組織におけるアポ A-I mRNA 発現量測定 .....	13
イムノブロットハイブリダイゼーション .....	14
ウェスタンブロットハイブリダイゼーション .....	15
統計解析 .....	15
結果 .....	16
考察 .....	24
小括 .....	27
第二節 動脈硬化易発性及び正常日本ウズラにおける主要 な低分子量アポリポタンパク質の構造と mRNA の組織分	

布及びコレステロール投与の影響 .....	28
緒言 .....	28
方法および材料 .....	30
実験動物 .....	30
血清総アポタンパク質の調製 .....	30
N末端アミノ酸配列決定 .....	30
主要 LMWA cDNA のスクリーニングと塩基配列決定 .....	30
RNA の調製 .....	31
ノーザンブロットハイブリダイゼーション .....	31
統計解析 .....	31
結果 .....	33
考察 .....	43
小括 .....	45
第三章 動脈硬化易発性ウズラと、正常日本ウズラ の脂質吸収能の比較 .....	46
第一節 胃管栄養法を用いた動脈硬化易発性ウズラおよび 日本ウズラのコレステロール吸収能の測定 .....	46
緒言 .....	46
方法および材料 .....	48
実験動物 .....	48
試料の回収 .....	48
脂質の抽出 .....	48
排泄物中の脂質の定量 .....	49
血中の脂質の定量 .....	50
肝臓中の脂質の定量 .....	51

肝臓コレステロール 7 $\alpha$ -ヒドロキシラーゼ mRNA 発現量	52
統計解析	53
結果	55
コレステロール, 胆汁酸, 脂肪の排泄量	55
血中脂質濃度	55
肝臓脂質濃度	56
肝臓コレステロール 7 $\alpha$ -ヒドロキシラーゼ mRNA 発現量	56
考察	62
小括	64
第四章 LAP ウズラの小腸の高い脂質吸収能に関 わる因子の検索と解明	65
第一節 LAP と CA ウズラの小腸における mRNA の種類 と発現量の差異の検出	65
緒言	65
方法および材料	67
実験動物	67
RNA 抽出	67
Differential Display 法による mRNA 発現量分析	67
ノーザンブロットハイブリダイゼーション	68
結果	70
考察	74
小括	75
第五章 総括	76
第六章 要約	79
謝辞	81

人は動物とともに生きていくわけであり、血管壁は動物とと  
うに障害を受けた際、その修復中心基細胞、大動脈球、脳卒中  
という形で現れる。この状態の悪化の原因が動脈硬化である。従っ  
て、動脈硬化の発症、病状の進行の抑制、血管壁心疾患および脳  
血管障害の予防上、最も重要な研究課題の一つと考えられる。  
本研究はこのような動脈硬化発症のメカニズムの一端を分子レベル、  
遺伝子レベルで明らかにし、発症の予防や改善、治療に資すること  
を目的とした。

動脈硬化発症の最初の病変は動脈内皮表面における斑点状の  
病変とされた。この病変形成としてコレステロールを主要  
な構成した細胞の集合であり、動脈硬化発症の過程にはコレステ  
ロール代謝が深く関わっている。これまでのヒトにおける疫学的研究  
や動物実験研究などのメカニズム的研究と、近年の多岐にわたる分子創  
薬や疫学的研究などがメカニズムの解明にも得られた成果の間には大きな  
隔たりが存在している。この問題を解決し、動脈硬化症の全体像  
を明らかにするために動物を用いた系統的研究が必要であると考えも  
た。現在では多種多様な実験動物が用いられている。

現在、動脈硬化症の発生のメカニズムを研究する上でマウス  
やラットが実験動物として多く用いられているが、本来これらの動物  
は動脈硬化症を容易には発症しない。このため、トランスジェネ  
ス動物またはノックアウト動物が動脈硬化モデルとして用いられてい  
る。その中でもアポE欠乏マウスといった比較的動脈硬化症を引  
き起こしやすい動物も存在するが、これらの動物は、多くの実験ア  
プローチを適用して行う実験にはコストや倫理的観点から適当でない。

## 第一章 緒論

人は血管とともに老いるといわれており、血管壁は年齢とともに障害を受けて硬化し、その破綻が心筋梗塞、大動脈瘤、脳卒中という形で現れる。この破綻の最大の原因が動脈硬化である。従って、動脈硬化の発症、進展の機序の解明は、虚血性心疾患および脳血管障害患者の予防上、最も重要な研究課題の1つと考えられる。本研究はこのような動脈硬化発症のメカニズムの一端を分子レベル、遺伝子レベルで明らかにし、発症の予防や改善、治療に資することを目的とした。

粥状動脈硬化の最初の病変は動脈内皮表面における斑点状の脂肪沈着に端を発する。この病変は主としてコレステロールを多量に蓄積した細胞の集合であり、粥状動脈硬化の成立にはコレステロール代謝が深く関わっている。これまでのヒトにおける疫学的研究や解剖学的研究などのマクロな研究と、近年の多岐にわたる分子細胞生物学的研究などのミクロな研究から得られた成果の間には大きな隔たりが存在している。この問題を解決し、動脈硬化症の全体像を理解するためには動物を用いた実験的研究が重要であると考えられ、現在では多種多様な実験動物が用いられている。

現在、動脈硬化症の発生のメカニズムを研究する上でラットやマウスが実験動物として多く用いられているが、本来これらの動物は動脈硬化症を容易には惹起しない。このため、トランスジェニックまたはノックアウト動物が動脈硬化モデルとして用いられている。その他にもブタ<sup>1)</sup>やウサギ<sup>2)3)</sup>といった比較的動脈硬化症を引き起こしやすい動物も存在するが、これらの動物は、多くの実験グループを設定して行う実験にはコストや施設面で難点がある。一方、

鳥類は非常に動脈硬化症を引き起こしやすく、ライフサイクルも比較的短いことから、モデル動物として特にニワトリが多くの研究者に用いられてきた<sup>4)</sup>。しかしながら、ニワトリも成鳥は比較的大型になり個体数を要求するような実験には適さない。これに対し、日本ウズラはニワトリ同様動脈硬化症を惹起しやすく、小型でライフサイクルもさらに短く、入手も容易である等の利点を備えている。また雑食性であるため、実験的食餌性動脈硬化症の研究には非常に適していると考えられ、近年多く用いられてきている<sup>5-7)</sup>。

現在、市販(Commercially Available: CA)日本ウズラの中から動脈硬化易発性(Hyperlipidemia Atherosclerosis Prone: LAP)系統が確立されている<sup>8)</sup>。このLAPウズラはコレステロール負荷に反応して著明な高コレステロール血症を呈するだけでなく、大動脈をはじめとする弾性型の血管で強い動脈硬化性病変を示す<sup>8)9)</sup>。また、LAPウズラは冠状動脈閉塞による心筋梗塞により、6カ月の間に約半数は死亡する<sup>8)</sup>。すなわち、LAPウズラは食餌性のコレステロール負荷に対して血液及び動脈両方で非常に高い反応性を示すばかりでなく、動物レベルでの心筋梗塞発作を誘発するという点で非常に有用な動物モデルであり、発症メカニズムの分子生物学的解析にも適していると判断された。

血中に存在している脂質は、アポタンパク質と呼ばれる脂質輸送タンパク質と結合し親水性の粒子、すなわちリポタンパク質として血液中を輸送されている。リポタンパク質には様々な種類が存在し、血中におけるリポタンパク質の濃度と組成は、高脂血症や動脈硬化症と密接に関わっている<sup>10)11)</sup>。ウズラのリポタンパク質組成に関してはすでにいくつか報告があり、我々の研究室でも数年にわ



たり食餌性脂質の吸収と、体内輸送に重点を置いて、LAP ウズラを用いた動脈硬化発症と脂質代謝との関わりを追求してきた<sup>7)12-14)</sup>。これらの報告においては、ラットなどと比べてウズラのリポタンパク質組成は少なからずヒトに近似していることも指摘されている。さらに、脂質の吸収や肝臓におけるコレステロール代謝系酵素と、動脈硬化易発との関連性についても研究がなされている<sup>14)</sup>。しかし、LAP ウズラの動脈硬化易発の原因については依然不明である。

そこで本研究では血中における脂質輸送に関与しているアポタンパク質遺伝子に焦点を絞り、LAP ウズラの動脈硬化易発と関連する遺伝子変異を追究した。アポリポタンパク質 mRNA の組織分布を調べた結果、LAP の小腸機能に差異がある可能性が指摘されたので、次いで、コレステロール吸収能を LAP と CA 間で比較した。さらに小腸機能の差異に寄与する遺伝子を、Differential Display 法により明らかにすることを試みた。

## 第二章 動脈硬化易発性ウズラ(Hyperlipidemia

Atherosclerosis Prone: LAP)のアポリポタンパク質

遺伝子のクローニング

第一節 動脈硬化易発性及び正常日本ウズラにおけるアポ

A-I タンパク質の構造と mRNA の組織分布およびコレス

テロール投与の影響

緒言

動脈硬化病変の発生初期には血管壁へのコレステロールの沈着が認められる。これは肝臓から末梢組織への脂質輸送課程で生じる低密度リポタンパク質(LDL)が酸化修飾され、異物とみなされた酸化 LDL はスカベンジャー受容体を介してマクロファージ内に取り込まれる。コレステロールを多量に蓄積したマクロファージは泡沫細胞へと変化し、この泡沫細胞が血管内皮に多量に蓄積することで動脈硬化病巣へと変化していくと考えられている<sup>15)</sup>。一方、生体内には末梢組織のコレステロールを再び肝臓へ運んで処理するコレステロール逆転送系と呼ばれる機能が存在しており、動脈硬化の防御機構として重要視されている。この逆転送系で重要な働きをするのは高比重リポタンパク質(HDL)であり、ヒトの場合、主に肝臓と小腸で合成され、末梢組織のコレステロールを引き抜いて肝臓へ輸送することで逆輸送を行っている。ヒトにおいては HDL 画分のコレステロール値の低下は動脈硬化の危険因子の一つと考えられており、動脈硬化を誘発したウサギにおいては HDL を静注する事に

より動脈硬化の進展が抑制され、また、いったん生じた動脈硬化巣の退縮も認められていることから HDL は抗動脈硬化作用を有するリポタンパク質と考えられている<sup>16)17)</sup>。肝臓及び小腸で合成された直後の HDL はアポ A-I とリン脂質を主成分としており、血液中を移動しながら、末梢組織の細胞膜から遊離コレステロールを抜き取る。遊離コレステロールは HDL 粒子の表面に存在している lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) の働きによりエステル化され、コレステロールエステルとして HDL 粒子内に包埋される。この酵素反応は HDL の主要アポタンパク質であるアポ A-I の働きにより活性化される<sup>18)</sup>。また、トランスジェニックマウスとノックアウトマウスを用いた検討からは、アポ A-I は抗動脈硬化作用があると考えられており<sup>18)</sup>、動脈硬化の進展と抑制に対する影響は大きいものと推察される。

ウズラのアポ A-I については、N 末端アミノ酸配列及び cDNA 塩基配列が既に明らかになっており、各種組織における mRNA 発現量についても調査されている<sup>19)</sup>。しかしながら、LAP についての分子生物学的な研究は成されておらず、動脈硬化易発性との関連についても明らかでない。そこで、本研究ではまず LAP のアポ A-I cDNA の塩基配列の決定と各種組織における mRNA の発現量及び血中のアポ A-I タンパク質濃度の測定を行い、正常な日本ウズラと比較し、高コレステロール血症および動脈硬化症の発生との関連を明らかにすることを目的とした。

## 方法および材料

### 実験動物

正常な日本ウズラは全て九動(株)から 2-3 月齢の雄ウズラを購入した。LAP ウズラについては、大塚製薬(株)藤井記念研究所または宮崎大学獣医学部的那須哲夫助教授から同じく 2-3 月齢の雄ウズラを譲り受けた。飼育は、ステンレスケージにて室温 25°C、12 時間づつのライトサイクルで市販飼料を自由摂食させて行った。市販飼料の組成はタンパク質 22%、脂肪 2.5%、食物繊維 5%、灰分 14%で 2,700 kcal/kg である。コレステロール食は市販の飼料に 10%コーン油と 1%のコレステロールを混合して調製し、これを二週間自由摂食させることで高コレステロール血症を誘導した。

### RNA 抽出

アポ A-I cDNA の塩基配列決定に用いる RNA は、LAP、CA の肝臓 0.5 g を 4 M グアニジンチオシアン酸塩溶液中でホモジナイズし、超遠心法に従って抽出した。まず、ホモジネートを注射針に数回通し、DNA を切断後、室温で 3000 rpm、10 分間遠心し、上清を回収した。続いて、5M CsCl 溶液を 1.6 ml 入れ、その上に 1.6 ml の試料を重層し、93000 x g、16 hr、4°C で遠心した。上清を注意深く除去し、透明な RNA 沈殿を 4 M グアニジンチオシアン酸塩溶液に溶解し、エッペンドルフチューブに移した。この溶液をフェノール-クロロホルム処理し、エタノール沈殿を行った。沈殿を TE 溶液に溶解して Total RNA 溶液とした。この Total RNA から市販のキット(cDNA synthesis module, cDNA rapid adaptor ligation module, Amersham 社)を用いて、mRNA の精製と cDNA の合成を

行った。

各種組織におけるアポ A-I mRNA 発現量の測定に用いる RNA は、普通食またはコレステロール食を二週間自由摂食させた両系統のウズラから抽出した。0.2 g の小腸、肝臓、肺、胸筋、精巣、心臓を、25 mM クエン酸ナトリウム、0.5% N-ラウリルサルコシン酸ナトリウム、0.1 M 2-メルカプトエタノールを含む 4 M グアニジンチオシアン酸塩溶液 2 ml 中でホモジナイズし、遠心分離、上清を得る。上清に 60  $\mu$ l の 2M 酢酸ナトリウムと 600  $\mu$ l の水飽和フェノール、120  $\mu$ l のクロロホルム-イソアミルアルコールを加え激しく攪拌した後、氷水中に 15 分静置する。遠心して中間層を取らないように水層を分取し、イソプロパノール沈殿を行い、これを二回繰り返した。遠心により得られた沈殿を 50  $\mu$ l のジエチルピロカーボネート処理した Milli Q 水 (DEPC 水) に溶解し、65°C で 10 分間インキュベートし、Total RNA 溶液とした。

#### アポ A-I cDNA のクローニング

LAP, CA の肝臓 cDNA は市販のキット (cDNA rapid cloning module -  $\lambda$  gt10,  $\lambda$  -DNA *in vitro* packaging module (Amersham 社)) を用いてファージベクター ( $\lambda$  gt10) にパッケージングし、プラークハイブリダイゼーションを行った。

アポ A-I cDNA をスクリーニングするためのプローブは、既知の正常ウズラのアポ A-I cDNA の 7-318 番塩基の塩基配列 (312 bp) と同配列の、標識された DNA 断片を用いた<sup>19)</sup>。プローブの標識には、塩基配列中のチミン (T) をフルオレセインで蛍光標識したウラシル (U) に置換することで非 RI 標識を行うキットを用いた

(ECL 3'-oligolabeling detection system (Amersham 社)). 大腸菌へのファージの感染からハイブリダイゼーション, 検出までは全てキットの使用説明書に従った(Gene Image CDP-star detection module (Amersham 社)).

X線フィルム上に得られたシグナルは, スキャナーで読みとり, コンピューターの画像解析ソフト(NIH Image)を用いて蛍光のシグナル強度を算出した.

#### cDNA塩基配列決定

スクリーニングにより得られたポジティブブランク由来のファージから DNA を精製し, 塩基配列決定を行った. 塩基配列決定には蛍光ダイターミネーター法を利用した DNA シーケンシングキットと DNA シーケンサーを使用した(Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PERKIN ELMER 社)). 本研究では 6 種類のプライマーを用いた Primer Extension 法により, アポ A-I cDNA の塩基配列を決定した(Fig. 2-1-1). 6 種類のプライマーは全て既知の正常ウズラのアポ A-I cDNA 塩基配列から設計した.

#### ノーザンブロットハイブリダイゼーション

LAP の小腸, 肝臓, 肺, 胸筋, 精巣, 心臓から抽出した total RNA は, 定法に従ってノーザンブロッティングを行った<sup>20)</sup>. まず 10  $\mu$ g の total RNA サンプルを 4 mM 酢酸ナトリウム, 0.5 mM EDTA, 10 mM MOPS (pH 7.0), 6.475%ホルムアルデヒド, 50%ホルムアミド溶液中で 55°C, 15 分間変性させ, 2  $\mu$ l の gel loading buffer(50% glycerol, 1 mM EDTA, 0.25% BPB, 0.25% xylene

cyanol)を加えた後, 8 mM 酢酸ナトリウム, 1 mM EDTA, 20 mM MOPS (pH 7.0), 6.66%ホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルで電気泳動を行った. 泳動緩衝液は8 mM 酢酸ナトリウム, 1 mM EDTA, 20 mM MOPS (pH 7.0)で, 100 V, 30 分間泳動した. 泳動後のゲルは滅菌水中で2分間穏やかに浸透し, これを3回繰り返した. 続いて, 20 x SSC(3 M NaCl, 0.3 M Na citrate)中で10分間穏やかに浸透し, これを2回繰り返した. このゲルをニトロセルロースメンブラン上にトランスファーし, 80°C, 1時間感熱処理することでメンブランにRNAを固定した. これを, 先のスクリーニングの時と同様にハイブリダイゼーションを行い, シグナルを検出した. プローブはスクリーニングと同様のものを用い, 検出法はキットのプロトコールに従った.

#### 各種組織におけるアポ A-I mRNA 発現量測定

各種組織から抽出した total RNA のブロッティングはドットブロッティング装置を用いて定法に従って行った. まず, total RNA 5  $\mu$ g を, 40  $\mu$ l の 1 x SSC, 6.5%ホルムアルデヒド, 50%ホルムアミドを含む溶液中で 68°C, 15 min. インキュベートし, 80  $\mu$ l の 20 x SSC を加えた. ナイロンメンブランはあらかじめ 10 x SSC 中で 1 hr 平衡化した後, ブロッティング装置にセットした. ブロッティング装置のスロットをまず 400  $\mu$ l の 10 x SSC で洗浄した後, サンプルを添加した. サンプルが全てメンブランに吸引されたら再び 400  $\mu$ l の 10 x SSC で洗浄し, 全て吸引した. ブロッティング装置から取り出したメンブランは 254 nm の UV を 10 min. 照射して RNA をメンブランに固定した. ハイブリダイゼーションに用いる

プローブ及び検出法は、先に述べたスクリーニングと同様に行った。また、未標識のプローブを段階的に逐次希釈してブロットして、同様のプローブでハイブリダイゼーションを行い、得られたシグナル強度から標準曲線を作成し、mRNA濃度を算出した。

#### イムノブロットハイブリダイゼーション

普通食またはコレステロール食を投与した LAP, CA ウズラの小腸及び肝臓におけるアポ A-I タンパク質の発現量を測定するため、ウェスタンブロットハイブリダイゼーションを行った。小腸、肝臓組織 0.2 g をタンパク質溶解液(50 mM KPB, 6 M Urea, pH 8.0)1 ml 中でポリトロンで破碎し、13000 rpm で 30 分間遠心した後、上清を得た。余分な脂質を除去するために以下の操作に従って試料を脱脂した。500  $\mu$ l の上清を 20 倍量のエタノール：エーテル(3:1)溶液中に滴下し-70  $^{\circ}$ Cで一晩静置した。3000 rpm で 5 分間遠心し、沈殿を 5 ml のエタノール：エーテル(3:1)溶液に再懸濁する。-70  $^{\circ}$ Cで 1 時間静置し、遠心した。沈殿を 5 ml のエーテルに懸濁し、-70  $^{\circ}$ Cで 1 時間静置後、遠心し、この操作を二回繰り返した。得られた沈殿を 500  $\mu$ l のタンパク質溶解液に再溶解し、遠心後の上清をアポタンパク質溶液とした。2.0  $\mu$ g の脱脂後のタンパク質を 20%メタノールを含むタンパク質溶解液に溶解し、ドットブロッキング装置を用いて、ニトロセルロースメンブランにスポットした。検出には市販のキットを用いた(ECL Western blotting products (Amersham 社))。プローブとして、精製したウズラアポ A-I タンパク質を抗原とするウサギ抗血清を調製し、キットのプロトコールに従いアポ A-I の検出を行った。得られたシグナル強度は



mRNA 発現量の測定と同様に，既知濃度のアポ A-I タンパク質を用いて作成した標準曲線により推定した。

#### ウェスタンブロットハイブリダイゼーション

10  $\mu$ g の血清タンパク質を 15% SDS-PAGE で泳動し，定法に従ってニトロセルロールメンブランにエレクトロブロットした<sup>20)</sup>。まず，泳動後のゲルをあらかじめ 10 mM CAPS，10%メタノール(pH 11.0)を含むエレクトロブロッティングバッファーで湿らせたポリビニリデンジフルオリド(PVDF)フィルターに密着させ，エレクトロブロッティング装置(ATTO)で 168 mA，1 時間，エレクトロブロッティングを行った。メンブラン上の目的タンパク質の検出はイムノブロットと同様に行った。

#### 統計解析

本実験の有意差検定は二元配置の分散分析により行った<sup>21)</sup>。グラフの肩文字の大文字は系統間，小文字は食餌の影響における有意差を表しており，危険率 5%以下で有意差のある場合には異なる文字を付した。

## 結果

ラムダファージ cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、CA で 3 クローン、LAP で 5 クローンのポジティブクローンを検出し、全てのクローンの塩基配列を決定した。塩基配列決定に用いたプライマーと、その決定部位を Fig. 2-1-1 A に示した。LAP アポ A-I cDNA の塩基配列は全長 990 bp で、44 番目の開始コドンから 836 番目の終止コドンまでに 792 bp のオープンリーディングフレーム(ORF)を含んでおり、264 残基のアミノ酸をコードしていると推定された(Fig. 2-1-1 B)。CA と比較すると LAP は cDNA の塩基配列で 472 番目(G→A)と 927 番目(C→T)に一塩基ずつの変化が認められた。特に 472 番目の変異は ORF 内の変化であったが、コドン冗長性の範囲内の変異であり、推定されるアミノ酸配列に変異は認められなかった。また、CA の cDNA の 3' 末端においてはポリ A 付加シグナルからポリ A まで 13 塩基であるのに対して、LAP では 24 塩基あり、系統間で 11 塩基の差異が認められた。この塩基配列の違いは LAP の 5 クローンのうち 3 クローンにおいてのみ認められた。

LAP、CA ウズラを普通食またはコレステロール食で二週間飼育した後、各種組織において発現している mRNA についてノーザンブロット解析をおこなった(Fig. 2-1-2)。測定の結果、LAP ウズラにおいてアポ A-I はほとんど小腸と肝臓で合成されていることが分かった。発現の分布をバンドの濃度から推定すると、約 93% が小腸及び肝臓で合成されていることが明らかになった。LAP、CA ウズラのコレステロール投与群の血中コレステロールレベルはそれぞれ、3950 mg/dl、580 mg/dl であった。

続いて、普通食またはコレステロール食を与えた場合の各種組織におけるアポ A-I mRNA の発現量を CA, LAP 間で比較した。アポ A-I mRNA の発現量はほとんど全ての組織において CA よりも LAP で高かった (Fig. 2-1-3)。肝臓, 胸筋, 心臓においてはコレステロール食の投与により CA, LAP ともにアポ A-I mRNA の発現量が増大したが, LAP の方が増加の度合いがより顕著であった。また小腸, 肺においては食餌コレステロールに関係なく LAP で発現量が高くなっていた。

次に、アポ A-I mRNA 発現の主要な組織であった小腸と肝臓について、実際にタンパク質レベルでどの程度のアポ A-I が発現しているかを評価するため、イムノブロットを行った。小腸, 肝臓タンパク質中のアポ A-I タンパク質濃度は mRNA 発現量と異なり、系統間及び食餌の影響を受けなかった (Fig. 2-1-4)。しかし、アポ A-I は分泌タンパク質であるため合成されたタンパク質は直ちに血中へと放出されていくと考えられる。そこで血中のアポ A-I レベルについての測定を行った結果、コレステロールを負荷した LAP, CA ウズラの間にはアポ A-I 濃度の差は認められなかった (Fig. 2-1-5)。

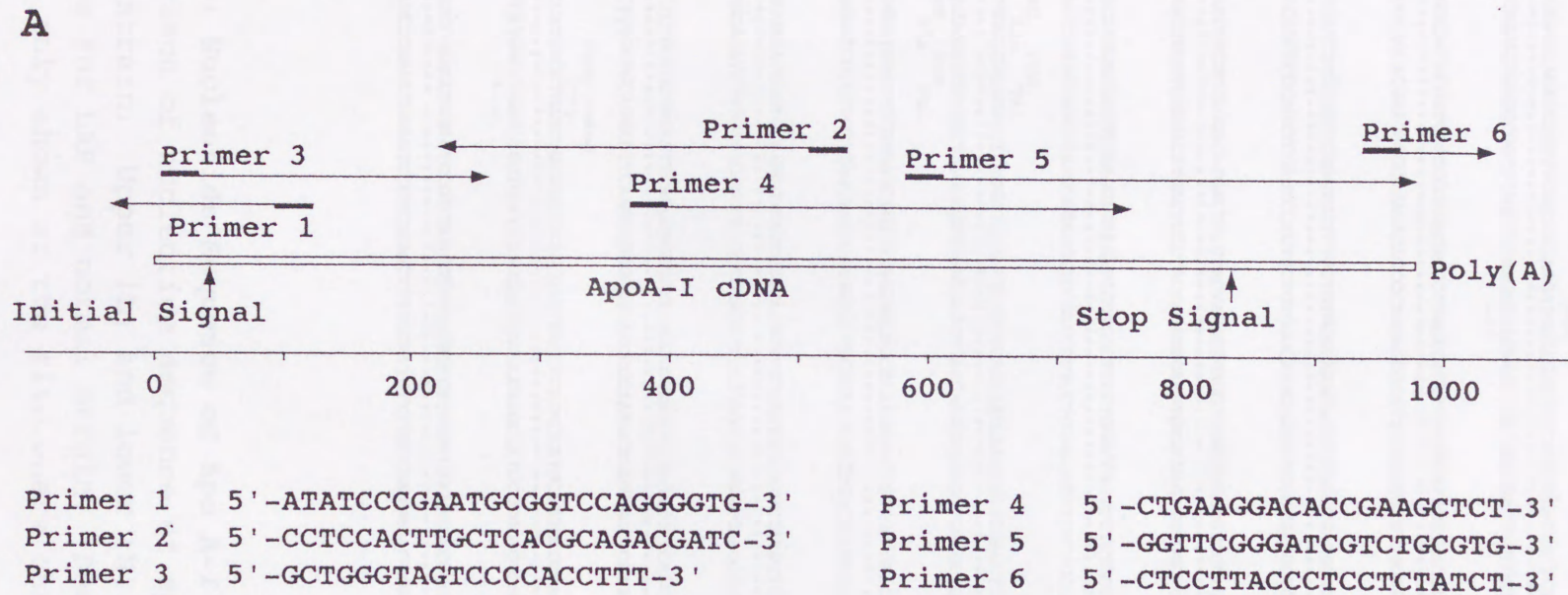


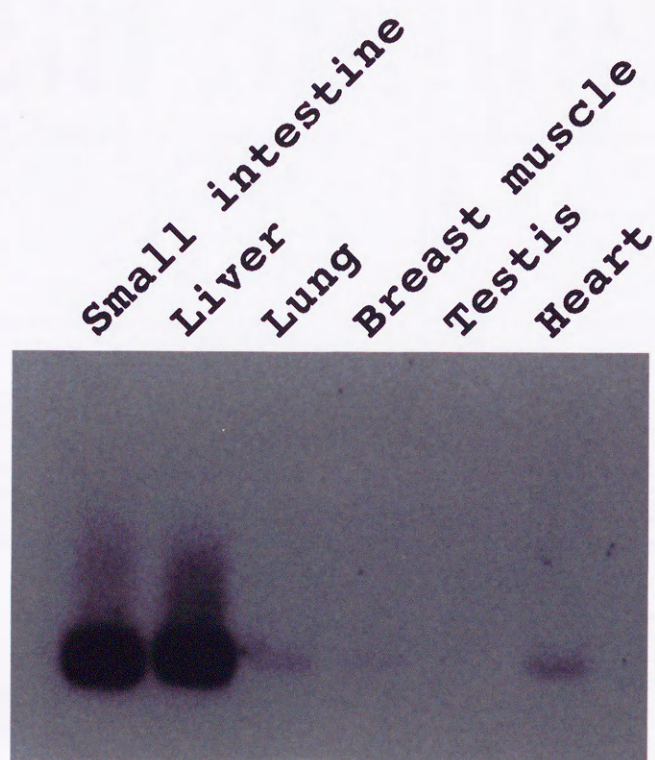
Fig. 2-1-1 A: Sequencing strategy of apo A-I cDNA and the primer sequences.

# B

Initiate codon		
GCAGAGCGGAGCAGCGGCAGGACAGAGCCGGTTAGCCCCGAAGATGAGAGGCGTTCGGTGACCCCTCGCTGTGCTCTTCTTGACGGGCAC	90 (L)	
*****		
GCAGAGCGGAGCAGCGGCAGGACAGAGCCGGTTAGCCCCGAAGATGAGAGGCGTTCGGTGACCCCTCGCTGTGCTCTTCTTGACGGGCAC	90 (N)	
CCAGGCCCGCTCCTTCTGGCAGCACGATGACCCCCAGACACCCCTGGACCGCATTCGGGATATGTTGGACGCTACCTGGAGACGGTGAA	180 (L)	
*****		
CCAGGCCCGCTCCTTCTGGCAGCACGATGACCCCCAGACACCCCTGGACCGCATTCGGGATATGTTGGACGCTACCTGGAGACGGTGAA	180 (N)	
GGCCAGTGGCAAGGATGCCATCTCCAGTTCGAGTCTCTGCTGTGGGCAAACAGCTTGACCTGAAGCTGGCTGACAACCTGGACACGCT	270 (L)	
*****		
GGCCAGTGGCAAGGATGCCATCTCCAGTTCGAGTCTCTGCTGTGGGCAAACAGCTTGACCTGAAGCTGGCTGACAACCTGGACACGCT	270 (N)	
GAGTGTGCGGCTGCCAAACTGCGTGAGGACATGACTCCCTACTACAGGGAGGTGCCGAGATGTGGTGAAGGACACCGAAGCTCTTCG	360 (L)	
*****		
GAGTGTGCGGCTGCCAAACTGCGTGAGGACATGACTCCCTACTACAGGGAGGTGCCGAGATGTGGTGAAGGACACCGAAGCTCTTCG	360 (N)	
TGCTGAGCTGACCAAGGACCTGGAGGAGTGAAGGAGAAGATCCGACCCCTTCTGGACCAGTTCTCTGCCAAGTGGACCGAGGAGGTGGA	450 (L)	
*****		
TGCTGAGCTGACCAAGGACCTGGAGGAGTGAAGGAGAAGATCCGACCCCTTCTGGACCAGTTCTCTGCCAAGTGGACCGAGGAGGTGGA	450 (N)	
Gln Leu Pro Arg Ala Val		
GCAGTACCGCCAGCGCCTGGCACCCTGGCTCAGGAGCTGAAGGATCTGACCAAGCAGAAGGTGGAGCTGATGCAGGCCAAGCTGACCCC	540 (L)	
*****		
GCAGTACCGCCAGCGCCTGGCACCCTGGCTCAGGAGCTGAAGGATCTGACCAAGCAGAAGGTGGAGCTGATGCAGGCCAAGCTGACCCC	540 (N)	
Gln Leu Pro Arg Ala Val		
AGTGGCCGAGGAGGTCGGGATCGTCTGCGTGAGCAAGTGGAGGAGCTGCGCAAGAACCCTGGCCCGTACAGCAGCGAGTTGAGGCAGAA	630 (L)	
*****		
AGTGGCCGAGGAGGTCGGGATCGTCTGCGTGAGCAAGTGGAGGAGCTGCGCAAGAACCCTGGCCCGTACAGCAGCGAGTTGAGGCAGAA	630 (N)	
GCTGAGCCAGAAGCTGGAGGAGATCCGTGAGAGGGGCATCCCTCAGGCTTCCGAGTACCAGGCCAAGGTGGTGGAGCAGCTCAGCAACCT	720 (L)	
*****		
GCTGAGCCAGAAGCTGGAGGAGATCCGTGAGAGGGGCATCCCTCAGGCTTCCGAGTACCAGGCCAAGGTGGTGGAGCAGCTCAGCAACCT	720 (N)	
GCGTGAGAAGATGACGCCTCTGGTGCAGGAATCAAGGAGCGCCTCACCCCTATGCTGAGAACCCTCAAGAACCCTTGATCGACCTCCT	810 (L)	
*****		
GCGTGAGAAGATGACGCCTCTGGTGCAGGAATCAAGGAGCGCCTCACCCCTATGCTGAGAACCCTCAAGAACCCTTGATCGACCTCCT	810 (N)	
stop codon		
GGATGAAGTCCAGAAGACCATGGCCTGAGCTGCTGGCCAGGGACTGAGCCAGGCCATGCCGGCCCCAGGAGACCCCTCCTTACCCTC	900 (L)	
*****		
GGATGAAGTCCAGAAGACCATGGCCTGAGCTGCTGGCCAGGGACTGAGCCAGGCCATGCCGGCCCCAGGAGACCCCTCCTTACCCTC	900 (N)	
CTCTATCTCCACCCCAACCCGACCTGGAGTCCGTCTCAGCTTTGCCATTCTTTGTCAAATAAACGCTGACTTAAGTTATGGAGCTCA	-Poly(A) 990 (L)	
*****		
CTCTATCTCCACCCCAACCCGACCTGGAGTCCGTCTCAGCTTTGCCATTCTTTGTCAAATAAACGCTGACTTAAGTT	-Poly(A) 979 (N)	

Fig.2-1-1 B: Nucleotide Sequence of Apo A-I cDNA.

Comparison of nucleotide sequence of apo A-I cDNA between LAP and normal strain. Upper (L) and lower (N) lines respectively show the sequence for LAP and normal strain. Deduced amino acid sequence is only shown at the site where changes in DNA sequence took place.



**Fig. 2-1-2: Northern Blot Analysis of the Apo A-I mRNA Distribution in Various Tissues of LAP Quail.**

Total RNA was analyzed as described in Materials and Methods.

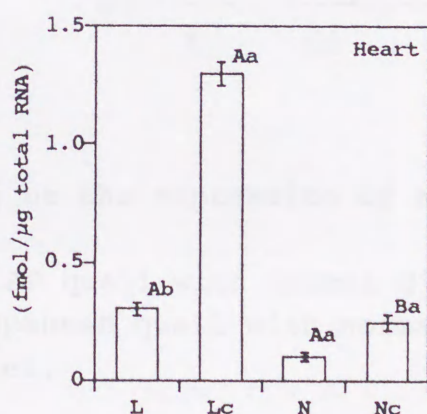
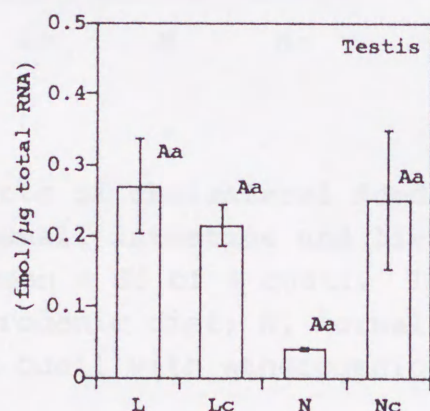
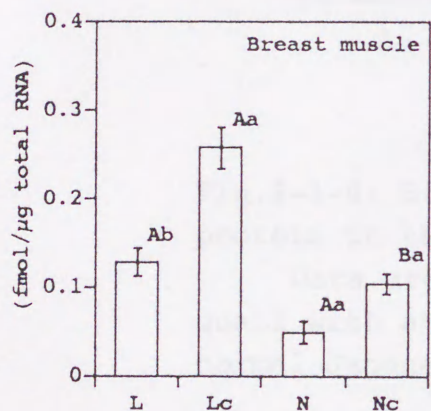
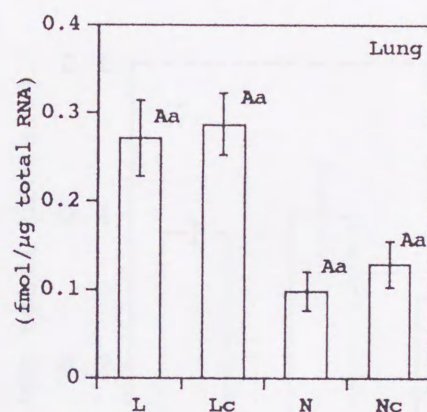
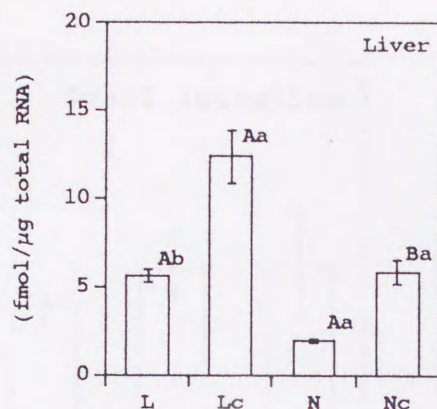
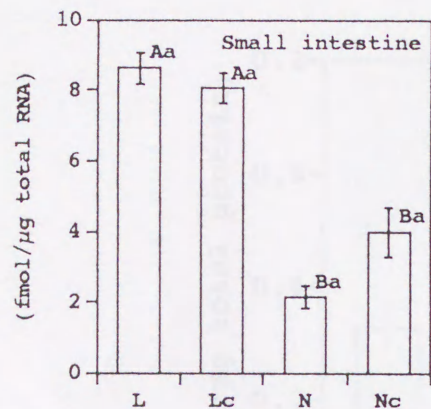


Fig.2-1-3: Expression of Apo A-I mRNA in the Various Tissues of LAP and Normal Quail Fed Either Atherogenic or Normal Diet.

Data are mean  $\pm$  SE of 4 quail. Capital and small letters respectively show the comparison between strains and diets (cholesterol feeding), and a different letter denotes a statistically significant difference at  $p < 0.05$ . L, LAP quail on normal diet; Lc LAP quail on atherogenic diet; N normal quail on normal diet; Nc normal quail on atherogenic diet.

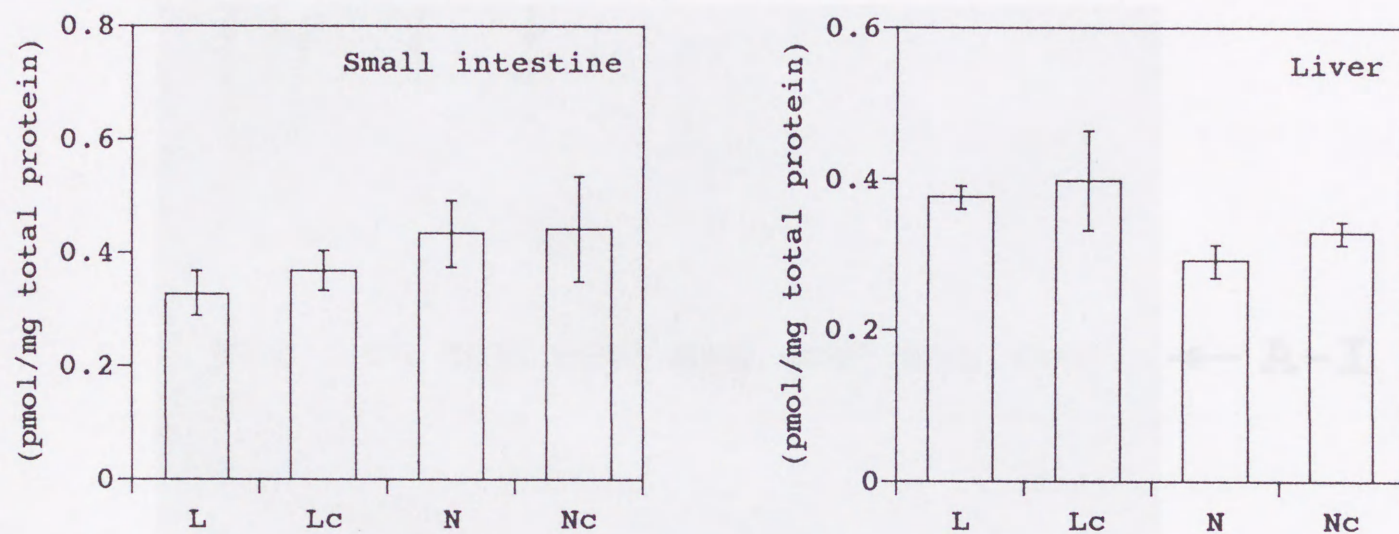


Fig.2-1-4: Effects of cholesterol feeding on the expression of apo A-I protein in the small intestine and liver.

Data are mean  $\pm$  SE of 4 quail. L, LAP quail with normal diet; Lc, LAP quail with atherogenic diet; N, normal Japanese quail with normal diet; Nc, normal Japanese quail with atherogenic diet.



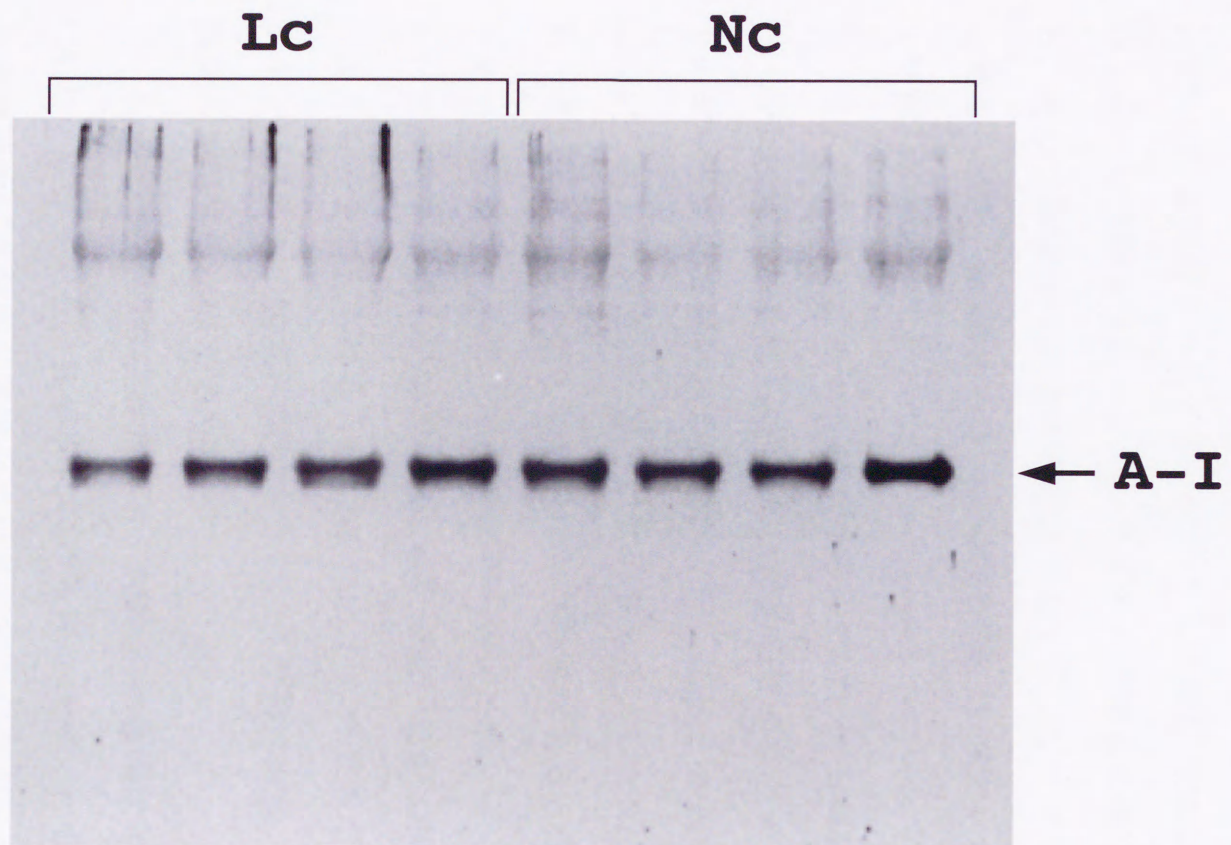


Fig.2-1-5: Western Blot Analysis of the Serum Apo A-I in LAP and Normal Japanese Quail.

Lc, LAP quail with atherogenic diet; Nc, normal Japanese quail with atherogenic diet.

## 考察

正常な日本ウズラのアポ A-I 遺伝子については既に多くの知見が得られている<sup>19)</sup>。今回の研究で決定した LAP ウズラのアポ A-I cDNA から推定されたアポ A-I のアミノ酸配列は CA ウズラの場合と同一と判断された。タンパク質の一次構造に変化がないことから、その立体構造や構造的特性についても CA ウズラと同様であると考えられた。mRNA の 3' 末端における 11 ヌクレオチドのギャップ配列が LAP ウズラの 5 クローン中 3 クローンで確認されている。全く同配列のギャップがニワトリにおいても報告されている<sup>22)</sup>。今回の結果からは LAP ウズラにおいてのみこの 11 ヌクレオチドのギャップ配列が確認されたが、さらに多くの cDNA クローンについて調査を行えば、ギャップの有無による mRNA 分子種のばらつきが CA についても認められる可能性があると思われる。このギャップの役割についての見解は得られていないが、おそらくポリ A 付加配列を認識した後の RNA ポリメラーゼの DNA 認識の影響によるものと考えられる。mRNA のポリ A 付近の塩基配列の変化がタンパク質への翻訳に影響するという報告はなく、今回の場合も翻訳への影響はないと考えられた。

LAP ウズラにおけるアポ A-I mRNA の組織分布のパターンは CA と類似しており、組織間における発現パターンの差異が LAP の動脈硬化症の発症と関連している可能性は少ないと考えられた。アポ A-I mRNA の組織分布については LAP と CA 間で明確な差は認められなかったが、絶対的な mRNA 発現量と、食餌性コレステロールに対する応答性に LAP と CA 間で顕著な差が認められた。発現量の少ない肺、胸筋、精巣、心臓においても系統間またはコレ

ステロールに対する反応性に明確な差が認められた。特に心臓では食餌性コレステロールの負荷により LAP における mRNA の発現量が増大しており、これは心臓からのコレステロールの逆輸送が促進されていることを反映しているものと考えられた。LAP ウズラにおける心筋梗塞症の発症とアポ A-I mRNA 発現量の増大は関連している可能性も指摘できる。しかしながら、絶対的な mRNA 発現量が少ないため、心筋梗塞との関連性には疑問も残る。

一方、アポ A-I mRNA 発現の主要な組織である小腸、肝臓ではコレステロールに対する応答性に LAP と CA 間で差異が認められた。LAP ウズラの小腸では食餌性コレステロールの負荷の影響は認められず、常に高いアポ A-I レベルが維持されていた。消化吸収された脂質は小腸吸収上皮細胞内でリポタンパク質として再合成され、リンパ管を経て循環系へとはいる。アポ A-I はリポタンパク質合成の必須成分であることから、LAP ウズラ小腸の高いアポ A-I 合成能力は、脂質吸収能力が LAP ウズラでは潜在的に高いことを示唆している。CA ウズラではコレステロール負荷により mRNA 発現が僅かに上昇しただけであった。肝臓においても、LAP で CA より有意に発現量が高く、コレステロール負荷によって両系統でさらに発現量が増大しており、コレステロール逆輸送がさらに促進されたものと考えられた。しかし、mRNA から翻訳されるアポ A-I タンパク質の組織内濃度においては系統間または食餌コレステロールの影響はほとんど認められず、実際に機能する場である血中濃度も系統間で差異は認められなかった。これは、アポ A-I タンパク質の合成は、mRNA への転写のみならず翻訳レベルにおいても調節されていることを示唆しているものと考えられた。つまり、LAP

において、高い mRNA 量が血中濃度に反映されないのはアポ A-I 合成が翻訳レベルで阻害されていることを示唆していると考えた。

今回の研究では、アポ A-I 遺伝子の構造には系統間での明確な差は認められなかったが、LAP ウズラ小腸ではアポ A-I mRNA の発現レベルが恒常的に CA よりも高いことが明らかになり、小腸機能、特に脂質吸収能が LAP ウズラでは高いことが示唆された。また、アポ A-I 合成においては mRNA の発現すなわち転写レベルのみならず、翻訳レベルでの調節機構にも何らかの差異があることも示唆された。

小括

動脈硬化易発性(LAP)ウズラのアポ A-I cDNA の塩基配列, mRNA 発現量の分布, 食餌性コレステロールを負荷したときの各種組織における mRNA 発現量の変化を CA ウズラと比較した.

LAP のアポ A-I cDNA の塩基配列は CA と比較して, タンパク質の一次構造に影響する変異は認められなかった.

各種組織における mRNA の発現量の分布は約 90%が小腸と肝臓に集中しており, この二組織がアポ A-I の主要な合成組織であることが示された. 組織分布のパターンについては CA の場合とほぼ同様であった.

食餌性コレステロールの mRNA 発現量に対する影響を調べた. LAP の小腸は恒常的に高レベルのアポ A-I mRNA を発現しており, 食餌性コレステロールによってはほとんど影響されなかった. 肝臓においても LAP で高レベルの発現が認められた. 食餌性コレステロールの負荷によってどちらの系統も発現量が増大していたが, LAP の方がより感受性が高かった. 発現の絶対量が小さいながらも, 小腸, 肝臓以外の末梢組織においても, LAP において mRNA 発現量の増大が認められた.

mRNA の発現レベルでは差が認められたにも関わらず, 組織および血中のアポ A-I タンパク質濃度には差が認められなかった.

アポ A-I 遺伝子の構造には動脈硬化を誘起する変異は認められなかったが, LAP ウズラ小腸のアポ A-I 合成量が顕著に高いレベルに維持されていることが明らかになり, 小腸機能の差異がコレステロール負荷に対する LAP ウズラの高い感受性と関連する可能性が指摘された.

## 第二節 動脈硬化易発性及び正常日本ウズラにおける主要な低分子量アポリポタンパク質の構造と mRNA の組織分布及びコレステロール投与の影響

### 緒言

前節では全てのリポタンパク質中に最も多量に存在しているアポ A-I の遺伝子構造を LAP と CA 間で比較した。しかしながら、動脈硬化易発性を説明できる遺伝子変異は認められなかった。

過去の報告で日本ウズラの全てのリポタンパク質画分に、アポタンパク質 C 群に相当すると思われる低分子量アポタンパク質 (low molecular weight apolipoprotein: LMWA) の存在が示されている。このアポタンパク質は比重の大きなリポタンパク質中に、より多く存在しており、全体のアポタンパク質の約 10% を占めていた。一般的に、分子量 10 kDa 以下のアポタンパク質はアポ C 群であり、現在 C-I, C-II, C-III, C-IV が報告されている<sup>23-27)</sup>。アポ C-II には脂肪細胞がトリアシルグリセロール (TG) を取り込む際に必要なリポプロテインリパーゼ (LPL) を活性化する作用がある<sup>28)29)</sup>。アポ C-I, C-III, C-IV の機能の詳細は不明であるが、アポ C-III には LPL の阻害作用が認められている<sup>30-36)</sup>。また、アポ C-I と C-III のトランスジェニックマウスでは血中の中性脂肪の上昇が見られ、TG に富むリポタンパク質の異化の抑制に関与していると考えられている<sup>37)</sup>。一方、ヒトにおける家族性動脈硬化症は、一部は遺伝的な原因により HDL 中のアポ A-I, C-III が不足することにより引き起こされていると考えられている<sup>38)</sup>。LAP ウズラの動脈硬化易

発も、アポ C 群の変異により引き起こされている可能性が考えられたので、今回の研究ではアポ C タンパク質に相当する、主要 LMWA の遺伝子構造および組織における mRNA の発現を比較し、LAP における動脈硬化易発性との関連を明らかにすることを目的とした。

血清のアポタンパク質の測定

血清試料をエタノールで沈殿させた後、4℃ ので 4 時間凍結させた。凍結後、室温で溶かし、高速遠心により血清中のアポタンパク質を抽出した。抽出液は、比重量 1.119 で 15000 回転、15 分間行なった。得られたアポタンパク質は前掲のイムノブロットに用いた抗体を用いた方法で測定を行い、アポタンパク質サンプルとした。

N 末端アミノ酸配列決定

血清中のアポタンパク質を電気泳動で分離後、前掲のウニスタンプロットハイブリダイゼーションで選べた成分に着目し、PVDFメンブレン上にスプレッドブロットした。メンブレン上の目的タンパク質のバンドを切り出し、プロテインソーシング(モダル AP/ABC Applied Biosystems)により、試薬種アミノ酸配列を決定した。

主要 LMWA の DNA のストレリーコーディング配列決定

(DNA ライブラリーは前掲の実験で得られたものを用いた)プライマーハイブリダイゼーション法に入るストレリーコーディングの目的のプローブとして主要 LMWA の N 末端アミノ酸配列 (1-15 残基) から設計した 48 塩基の DNA 断片 (5'-

GAATCTGGCTCCGAGCTCTGAGCAAGGACCCCTGTTATGAAAGGAG-

## 方法および材料

### 実験動物

使用した LAP ウズラは全て宮崎大学獣医学部の那須哲夫助教から譲与していただいた。その他の方法は全て前節に順じた。

### 血清総アポタンパク質の調製

普通食を二週間投与した 15 羽の CA ウズラから血液を採取し、超遠心法により全てのリポタンパク質を回収した。超遠心は、比重  $d = 1.210$  で  $180000 \times g$ , 15 時間行った。得られたリポタンパク質は前節のイムノブロットに用いたサンプルと同様の方法で脱脂を行い、アポタンパク質サンプルとした。

### N 末端アミノ酸配列決定

血清総アポタンパク質を電気泳動で分離後、前節のウェスタンブロットハイブリダイゼーションで述べた方法に従い PVDF メンブラン上にエレクトロブロットした。メンブラン上の目的のタンパク質のバンドを切り出し、プロテインシーケンサー(モデル 473A(Applied Biosystems))により N 末端アミノ酸配列を決定した。

### 主要 LMWA cDNA のスクリーニングと塩基配列決定

cDNA ライブラリーは前節の実験で作製したものをを用いた。ブランクハイブリダイゼーションによるスクリーニングのためのプローブとして主要 LMWA の N 末端アミノ酸配列(1 - 15 残基)から設計した 45 塩基の DNA 断片(5' -

GA(C,T)GCICCCIGA(C,T)AAGAAGGAGGCIGTIATGAAGAAGA



TGCAGGAG - 3')を合成した。プローブの標識には 3' 末端の蛍光標識キット(ECL 3'-oligolabeling detection system (Amersham International))を用いた。標識プローブの検出にも市販のキット(Gene Image CDP-star detection module (Amersham International))を用いた。得られたポジティブクローンは、λファージ DNA 内部の EcoRI クローニングサイトの塩基配列を基に合成したのプライマー(5'-GCTGGGTAGTCCCCACCTTT-3' (forward), 5'-CTTATGAGTATTTCTTCCAGGGTA-3' (reverse))を用いた PCR によりインサート DNA を増幅した。PCR の増幅産物をアガロースゲルで分離後ゲルカッティング法により目的のインサート DNA を回収し、シーケンシング用の鋳型とした。Thermo Sequenase pre-mixed cycle-sequencing kit(Amersham International)を用いて塩基配列を決定した(蛍光式パーソナル DNA シーケンサー(日立))。

#### RNA の調製

RNA は前節の実験で調製したものをを用いた。

#### ノーザンブロットハイブリダイゼーション

LAP の小腸、肝臓、肺、胸筋、精巣、心臓から抽出した総 RNA を用い、定法に従ってノーザンブロットティングを行った<sup>20)</sup>。プローブ及び検出法は、先に述べたスクリーニングと同様に市販キットのプロトコールに従った。

#### 統計解析

本実験の有意差検定は二元配置の分散分析により行った<sup>21)</sup>。

グラフの肩文字の大文字は系統間、小文字は食餌の影響における有意差を表しており、危険率 5%以下で有意差のある場合には異なる文字を付した。

分子重 8200 のアミノ酸配列の設計とアミノ酸配列 (LMWA) がアミノ酸配列と一致していることが示され、分子重 14100 以下の低分子重のアミノ酸配列の設計とアミノ酸配列の一致がアミノ酸配列と一致していることが示された。

タンパク質のバンドを PVDF-メンブレンに転写し、プロテインゼンサーにより N 末端の 15 残基のアミノ酸配列を決定した。この N 末端のアミノ酸配列の 1 残基から 15 残基目までを基に設計した 45 種類のプローブを用いたアプターライブラリーライゼーションにより LAP、CA リズチの主要 LMWA の cDNA クローンを得た。日本リズチの主要 LMWA cDNA は全長 498bp で 17 番目から 230 番目までがコード領域を占めており、残基の ATG をコードしていた (Fig. 2)。LAP リズチの LMWA の cDNA 塩基配列は CA と一致しており塩基は認められなかった。cDNA より推定された N 末端のアミノ酸配列は、アミノ酸配列決定により明らかになった塩基と一致することから、目的の cDNA クローンを得られていることが示された。また、N 末端の上流の 21 残基はタグナルペプチドまたはアミノペプチドであると推定された。推定されたアミノ酸配列から算出される分子重は 60000 であり、SDS-PAGE から算出した約 60000 Da と一致していた。

日本リズチの主要 LMWA の構造的特徴を明らかにするため、ヒトを含む哺乳類のアミノ酸配列 (C-H、C-H、C-H) とアミノ酸配列とアミノ酸配列を比較した。その結果、リズチの LMWA の分子重では C-H に近接していたが、ヒトアミノ酸配列 (C-H、C-H) と

## 結果

総アポタンパク質を 15% の SDS-PAGE で分析した結果を Fig. 2-2-1 に示した。分子量 6200 のアポ C 相当の低分子量アポタンパク質(LMWA)がアポ A-I に次いで多量に存在していることが示され、分子量 14 kDa 以下の低分子量アポタンパク質の約 45% を占めていることがデンストメーターを用いた計測で明らかにされた。

タンパク質のバンドを PVDF メンブランに転写し、プロテインシーケンサーにより N-末端の 35 残基のアミノ酸配列を決定した。この N 末端アミノ酸配列の 1 残基から 15 残基目までを基に設計した 45 塩基のプローブを用いたブランクハイブリダイゼーションにより LAP, CA ウズラの主要 LMWA の cDNA クローンを得た。日本ウズラの主要 LMWA cDNA は全長 498 bp で 17 番目から 250 番目までに一つの ORF が存在しており 78 残基のアミノ酸をコードしていた(Fig. 2-2-2)。LAP ウズラの LMWA の cDNA 塩基配列は CA と同一であり変異は認められなかった。cDNA より推定された N 末端のアミノ酸配列は、アミノ酸配列決定により明らかになった 35 残基と一致することから、目的の cDNA クローンが得られていることが支持された。また、N 末端の上流の 21 残基はシグナルペプチドまたはプロペプチドであると推察された。推測されたアミノ酸配列から算出される分子量は 6420 Da で、SDS-PAGE から算出した約 6200 Da と近似していた。

日本ウズラの主要 LMWA の構造的特徴を明らかにするため、ヒトを含む各種哺乳類のアポ C-I, C-II, C-III 及びニワトリのアポ C-II<sup>39)</sup> とアミノ酸配列を比較した(Fig. 2-2-3)。ウズラの LMWA は分子量では C-I に近似していたが、ヒトアポ C-I, C-II, C-III 及び

ニワトリアポ C-II いずれとも高い相同性は示さなかった。しかしながら、相対的にはアポ C-III に対する相同性が最も高く、約 28% であった。

ニワトリアポ C-II と哺乳類アポ C-II の相同性は全体としては低い。リポタンパク質リパーゼ(LPL)との結合に関与していると考えられている。タンパク質の C 末端ドメインは哺乳類、鳥類を問わず高度に保存されていることが知られている<sup>39)</sup>。ウズラ LMWA にはこの LPL 結合ドメインの存在が確認できないことから、本アポタンパク質がアポ C-II 様に機能している可能性は少ないと判断された。

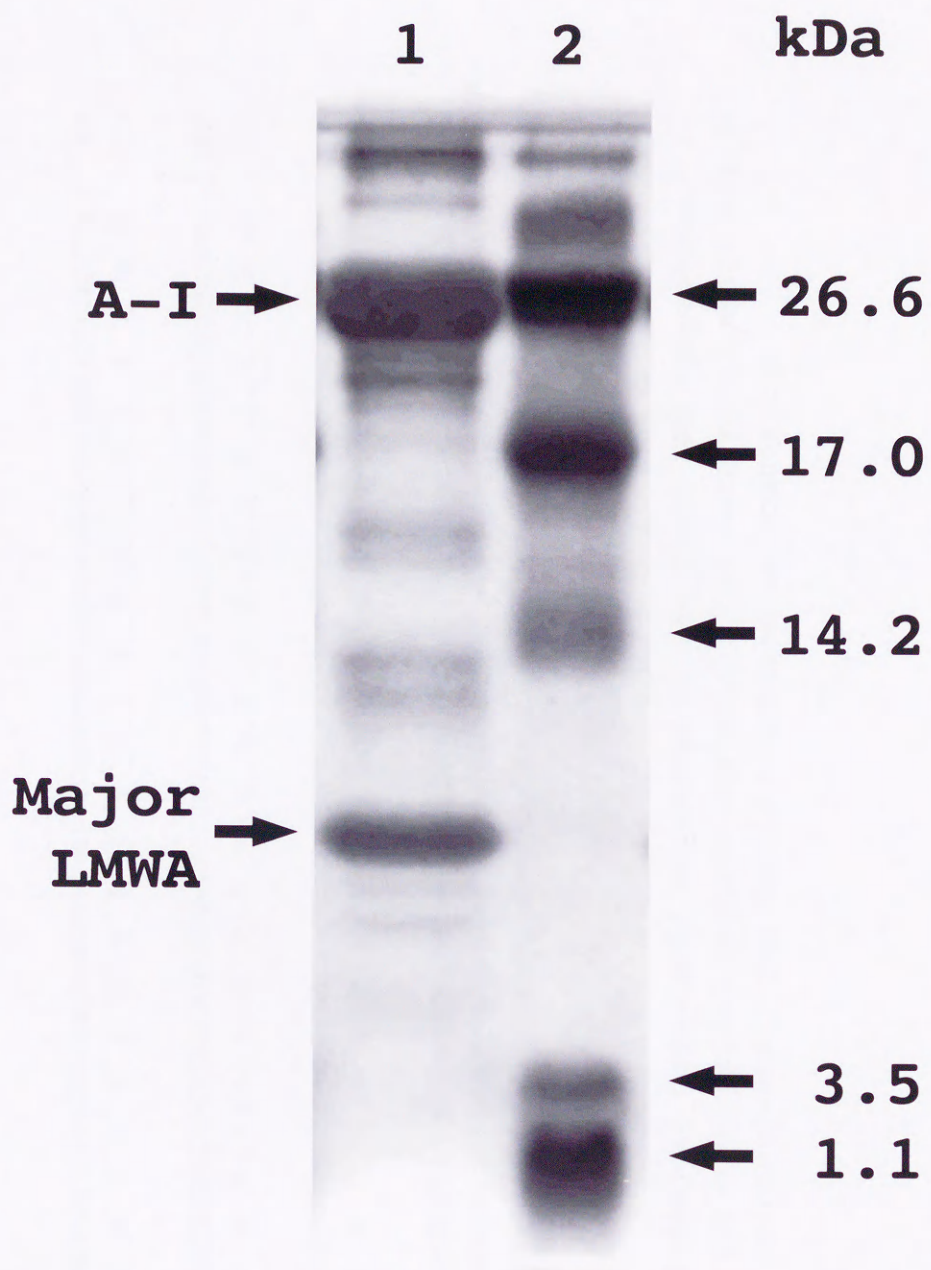
一次構造上の相同性を比較するだけでは主要 LMWA がアポ C タンパク質のどのサブグループに属するかは特定できなかった。そこでアミノ酸の配列を極性の大きさを表したときの配列のパターン(hydrophobicity profile)<sup>40-42)</sup>をヒトの C-I, C-II, C-III と比較した(Fig. 2-2-4)。このパターンはアミノ酸配列の疎水性を-1 から+1 までの範囲で表し、値が大きいほど疎水性が高いことを示す。主要 LMWA のアミノ酸残基数は 57 であるのに対し、ヒトアポ C-I, C-II, C-III はそれぞれ 57, 79, 79 とそれぞれアミノ酸残基数が異なるため、最小の 57 残基の範囲でパターン類似率を算出した。この場合のパターン類似率は-1 から 1 までの範囲で表され、1 に近いほど相同性が高いことを意味する。ウズラ LMWA とヒトアポ C-I とのパターン類似率は 0.21, C-II とはアミノ酸 2 から 58 残基の範囲が最大で 0.55, C-III においては 20 から 76 残基の範囲が最大で 0.62 であった。

アポタンパク質の構造に関するこれまでの研究において、ア

ポタンパク質に共通の性質である両親媒性を可能にさせる二次構造として、 $\alpha$ ヘリックス構造が報告されている<sup>43-45)</sup>。ウズラ主要 LMWA についても、二次構造を計算により推定した。アミノ酸の 9 から 33 残基に非常に明確な両親媒性  $\alpha$ ヘリックス構造が認められ、親水性の環境下で疎水性の脂質を輸送するのに都合の良い立体構造を持つことが示唆された(Fig. 2-2-5)。

次にこの LMWA の mRNA の各種組織における発現量の分布を測定した。ウズラ LMWA は主に肝臓で合成されており、肝臓以外では小腸においても僅かに合成されているようであった(Fig. 2-2-6)。またその他の末梢組織、心臓、肺、胸筋、精巣においてはほとんど LMWA mRNA の発現は認められなかった。

肝臓における LMWA mRNA 発現に及ぼす食餌性コレステロールの影響を LAP と CA で比較した。肝臓における LMWA mRNA の発現はコレステロール負荷により影響を受けず、系統間にも有意な差は観察されなかった(Fig. 2-2-7)。



**Fig. 2-2-1: Electrophoretic patterns of the quail serum apoproteins on 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).**

Lane 1: the partially purified apoproteins(10  $\mu$ g); Lane 2: molecular weight standard.

1	GCACAGCGTAGCAGCCATGAGGGTCTCCATCCTACTCCTGTTACCTTTGTGGCCATCCTGGCAGTGGGAGCACGGGCTGATGCTCCCGA	90
1	<u>M R V S I L L L F T F V A I L A V G A R A</u> D A P D	25
91	TAAGAAAGAGGCGGTGATGAAGAAGATGCAGGAGCTCATCAAGGAAGCCACCGAGGCAGTCAAGACTGCCATGACCATAATGCGTGAGTC	180
26	<u>K K E A V M K K M Q E L I K E A T E A V K T A M T I M R E S</u>	55
181	AGATGCAGCTCAGCAAGCCAGGACATGGCTGTCAGACAACACCAACGTGGTGAAGCAGCAGCTGGCGCAGTGAGGGAGCAGGTGACCGCG	270
56	<u>D A A Q Q A R T W L S D N T N V V K Q Q L A Q *</u>	78
271	CTCTTGAAGCAGACACCAAGCGCATAGCCCGGCTGTGGGCTGGTGGGGTCTGCCCCCATCCCATACACAGCACCATTTACAGAATC	360
361	ACAGAATTATCAAGGTTGAAAAGACCTAGAAGATCATCTAGTCCAACCATCCCAATACTCCCGACTAAATCATATTCATCAACACAA	450
451	CATTTCTTTCTGTTGTGGTTCTTGCAATAAAGTGGAGCTGGAGTGAG -Poly(A)	498

Fig. 2-2-2: Nucleotide and deduced amino acid sequences of the quail LMW apoprotein.

The sequences of the putative signal peptide and determined N-terminal amino acids are boxed and underlined, respectively. The double underline indicates the polyadenylation signal.

### A

		10	20	30	40	50	
LMW apoprotein	1	DAPDKKEA	VMKKMQELIK	EATEAVKTAM	TIMRESDAAQ	QARTWLSDNT	48
Human C-I	1	TPDVSS	ALDKLKEFGN	TLEDKARELI	SRIKQSELSA	KMREWFSETF	46
Baboon C-I	1	APDVSS	ALDKLKEFGN	TLEDKAWIVI	NRIKQSEFPA	KTRDWFSETF	46
Dog C-I	1	AGEISSTFER	IPDKLKEFGN	TLEDKARAAI	ESIKKSDIPA	KTRNWFSEAF	50
Rat C-I	1	APDFSSAMES	LDPKLKEFGN	TLEDKARAAI	EHIKQKEIMI	KTRNWFSETL	50

		60	70	80	90	100	
LMW apoprotein	49	NVVKQQLAQ					57
Human C-I	47	QKVKEKLIKID	S				57
Baboon C-I	47	RKVKEKLIKIN	S				57
Dog C-I	51	KKVKEHLKTA	FS				63
Rat C-I	51	NKMKEKLIKTT	FA				63

### B

		10	20	30	40	50	
LMW apoprotein	1	DAPDKKEAVM	KKMQELIKEA	TEAVKTAMTI	MRESDAQQQA	RTWLSDNNTNV	50
Chicken C-II	1	RPTSSDPPQT	QPPQSSQLT	QLGSAAVGLL	GRGVKVAGGL	LERLRPPTTP	50
Human C-II	1	TQPPQQ	DEMPSPPTLT	QVKESLSSYW	ESAKTAAQNL	YEKTYLPAVD	46
Monkey C-II	1	AQLPQQ	DEPPSPALLS	RVQESLSSYW	ESAKAAAQKL	YEKTYLPAVD	46
Bovine C-II	1	AHVPQQ	DEASSPALLT	QVQESLLGYW	DTAKAAAQKL	YKKTYPAMD	46
Dog C-II	1	AHESQQ	DETTSSALLT	QMQESLYSYW	GTARSAEDL	YKKAYPTTMD	46
Rat C-II	1	TEE	DDPGSSALLD	TVQEHLSYW	NSAKAAAGEI	YQKTYLTSVD	43

		60	70	80	90	100	
LMW apoprotein	51	VKQQLAQ					57
Chicken C-II	51	QSILDAYEKG	TAAVMTYGTI	LTDQLYHWWQ	GDH		83
Human C-II	47	EKLRLDLYSKS	TAAMSTYGTI	FTDQVLSVLK	GEE		79
Monkey C-II	47	EKLRLDLYSKS	TAAMSTYGTI	FTDQVLSVLK	GEE		79
Bovine C-II	47	EKIRDIYSKS	TAAVTTYAGI	ITDQVFSVLS	GKD		79
Dog C-II	47	EKIRDIYSKS	TAAVSTYAGI	FTDQLLSMLK	GDS		79
Rat C-II	44	EKLRLMYSKS	SAAMTTYAGI	FTDQLLTLK	GE		75

### C

		10	20	30	40	50	
LMW apoprotein	1	DAPDKKEAVM	KKMQELIKEA	TEAVKTAMTI	MRESDAQQQA	RTWLSDNNTNV	50
Human C-III	1	SEAEDASLL	SFMQGYMKHA	TKTAKDALSS	VQESQVAQQA	RGWVTDGFSS	49
Pig C-III	1	EDTSLI	DKMQDYVKQA	TRTAQDALTS	VKESEVAQQA	RGWVTDSSIS	46
Dog C-III	1	LEEDPSLL	GLMQGYMQHA	TKTAQDTLTS	VQESQVAQRA	RGWMTDSFSS	49
Rat C-III	1	DEGEGSLLL	GSMQGYMEQA	SKTVQDALSS	MQESDIAVVA	RGWMDNRFKS	49

		60	70	80	90	100	
LMW apoprotein	51	VKQQLAQ					57
Human C-III	50	LKDYWSTVKD	KFSEFWLDLP	EVRPTSAAVA			79
Pig C-III	47	LKDYWSTFKG	KFTDFWDYTP	KPEPSSS			73
Dog C-III	50	LKDYCSTFKG	KFTGFWDGAS	EAKPTPASDA	F		80
Rat C-III	50	LKGYWSKFTD	KFTGLWESGP	EDQLTTPPLE	P		80

Fig. 2-2-3: Comparison of the deduced amino acid sequence of the quail LMW apoprotein with that of apo C-I(A), C-II(B), and C-III(C) of other animal species (chicken, human, monkey, bovine, dog, and rat).

The shaded portion denote the identical residues between species.



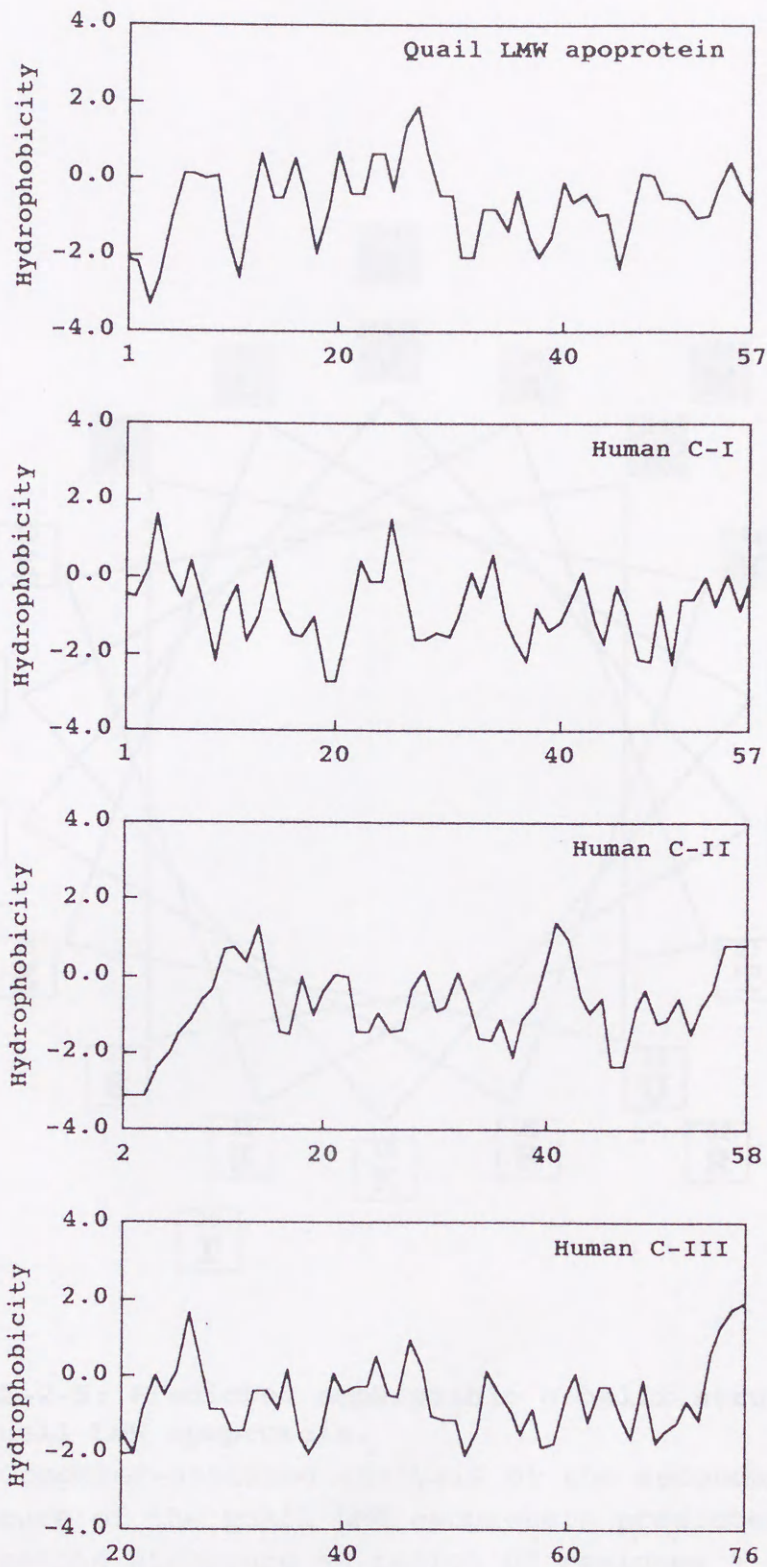


Fig. 2-2-4: Comparison of the hydrophobicity profiles of the quail LMW apoprotein with those of human apo C-I, C-II and C-III.

Prediction of hydrophobicity profiles (Kyte and Doolittle, 1982) was carried out with computer programs of DNASIS V2.0 (Hitachi Software Engineering Co., Ltd. 1991). The numbers below the figure are for the amino acid residues from N-terminus of mature protein.

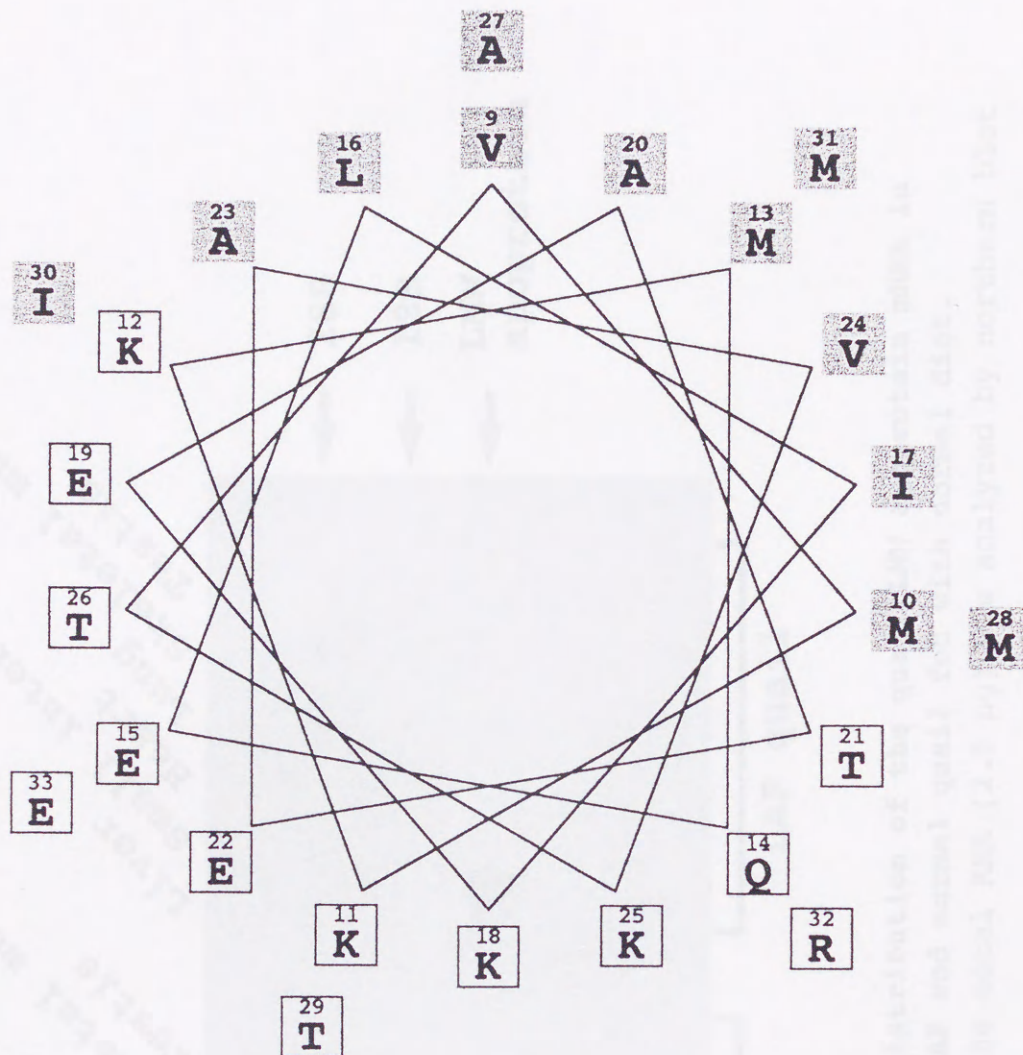


Fig. 2-2-5: Predicted amphipathic  $\alpha$ -helix structure of the quail LMW apoprotein.

Computer-assisted analysis of the secondary structure of the quail LMW apoprotein predicted the amphipathic structure at region of residues 9 to 33. The hydrophobic amino acids are shaded.

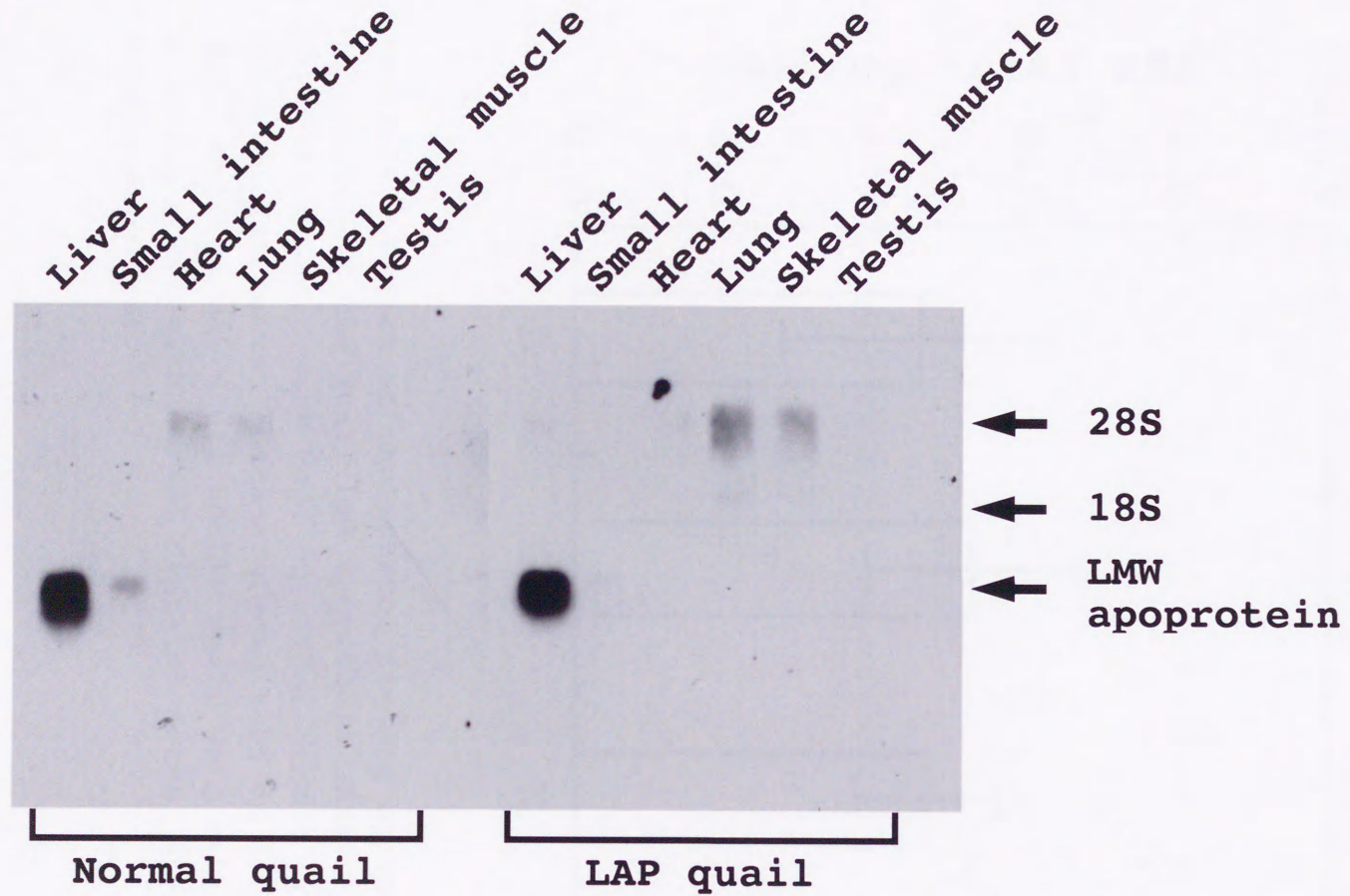


Fig. 2-2-6: Tissue distribution of the quail LMW apoprotein mRNA in various tissues of LAP and normal quail fed with normal diet.

mRNA level in the total RNA ( $2.5 \mu\text{g}$ ) was analyzed by northern blot hybridization.

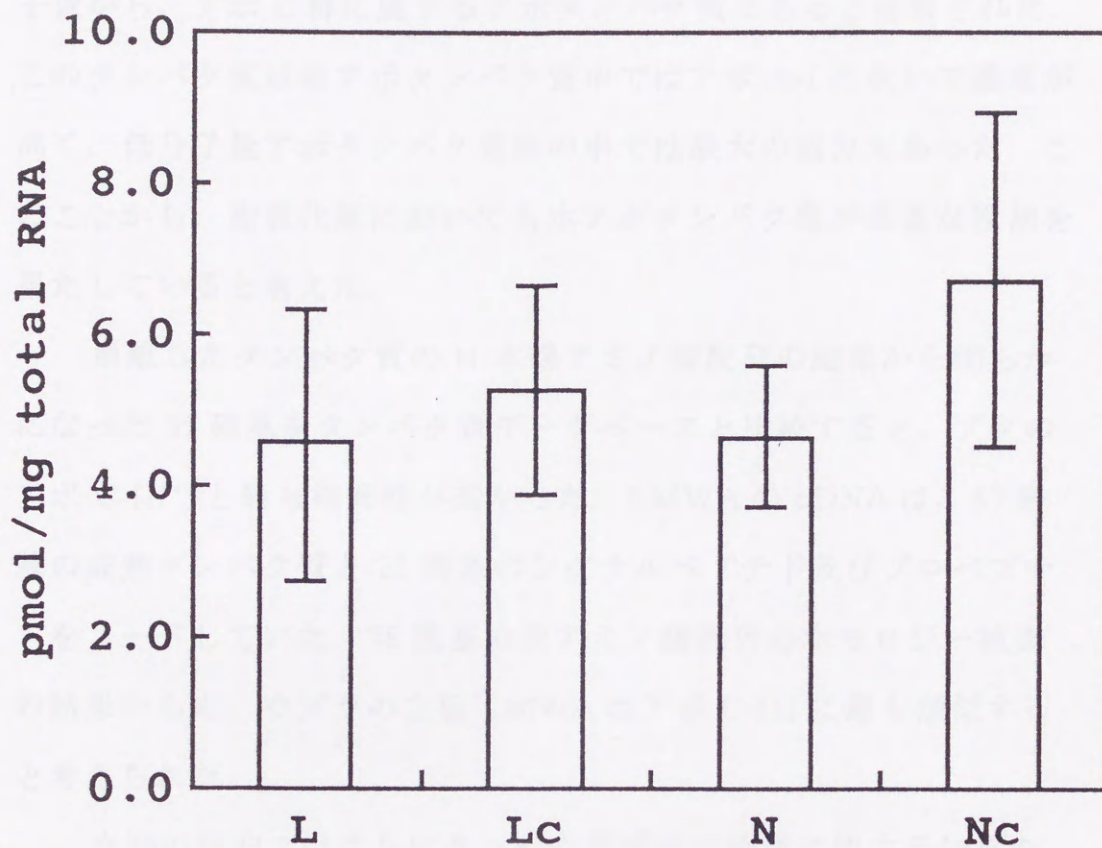


Fig.2-2-7: Effect of cholesterol feeding on the hepatic expression of the quail LMW apoprotein mRNA.

The animals were kept on either normal or atherogenic diet for two weeks. Data are mean  $\pm$  SE of 4 quail. L, LAP quail with normal diet; Lc LAP quail with atherogenic diet; N normal quail with normal diet; Nc normal quail with atherogenic diet.

## 考察

今回注目したタンパク質は SDS-PAGE の結果より算出した分子量から、アポ C 群に属するアポタンパク質であると推察された。このタンパク質は総アポタンパク質中ではアポ A-I に次いで濃度が高く、低分子量アポタンパク質群の中では最大の成分であった。このことから、脂質代謝においても本アポタンパク質が重要な役割を果たしていると考えた。

単離したタンパク質の N-末端アミノ酸配列の結果から明らかになった 35 残基をタンパク質データベースと比較すると、ブタのアポ C-III<sup>46)</sup>と最も相同性が高かった。LMWA の cDNA は、57 残基の成熟タンパク質と 21 残基のシグナルペプチド及びプロペプチドをコードしていた。78 残基の全アミノ酸配列のホモロジー検索の結果からも、ウズラの主要 LMWA はアポ C-III に最も類似すると考えられた。

今回の研究ではさらにタンパク質構造の特徴に関する知見を得るために、疎水性パターンを比較した。これはアミノ酸の親水性、疎水性に着目し、その配列をパターン化したもので、水系の媒体である血液中において疎水性の脂質を輸送するアポタンパク質の構造的特徴を理解する上で重要である。ウズラ LMWA の疎水性パターンはアポ C-III に最も類似していた。

予測される LMWA の二次構造を算出した結果からは、タンパク質全体において  $\alpha$  ヘリックス構造を有することが示され、特にアミノ酸 9 から 33 残基においては螺旋構造の一方に親水性アミノ酸、反対側に疎水性のアミノ酸が局在しており、非常に明確な両親媒性  $\alpha$  ヘリックス構造を呈していることが示唆された。この結果からは

本アポタンパク質の脂質輸送に関与するアポタンパク質としての構造的特徴は高度に保存されていることが明らかであった。

これまでの結果すなわち 1: 低分子量アポタンパク質中で最も濃度が高い. 2: アポ C 群中では C-III 最もアミノ酸配列が類似している. 3: 疎水性アミノ酸の配列パターンが C-III と比較的類似している. という事実から, 本アポタンパク質はアポ C-III と同様の働きをしている可能性が示唆された. 哺乳類におけるアポ C-III は, トリグリセリドに富んだりポタンパク質の肝臓への取り込み及びリポタンパク質リパーゼと肝臓リパーゼの両方を阻害すると報告されている.<sup>32-34)</sup>ウズラの主要 LMWA の生理機能についてはさらに研究が必要である.

本研究は, 動脈硬化易発性ウズラ(LAP)と正常な日本ウズラ(CA)の遺伝子レベルにおける変異を明らかにすることを目的とした. そこで, 各種組織における主要 LMWA mRNA の分布を調べた. 多くの哺乳類においてアポ C グループは主に肝臓及び小腸で合成されている<sup>27)47)</sup>のに対して, ウズラの主要 LMWA はほとんどが肝臓で合成されているという点で特徴的であった. しかしながら, LMWA の組織分布パターンは系統間ではほぼ同等と判断され, LMWA が動脈硬化易発に寄与する可能性は低いと考えられた.

## 小括

ウズラの血液中の総アポタンパク質中、量的にアポ A-I に次ぐ成分である低分子量アポタンパク質(LMWA)に着目し、その構造的特徴を明らかにすると共に、LAP, CA 間における構造上の差異について検討した。また、mRNA の組織分布と発現量に及ぼす食餌コレステロールの影響を比較した。

ウズラの主要 LMWA は 57 アミノ酸で構成されており、分子量は 6420 kDa であった。

タンパク質の発現レベル、一次構造の相同性、疎水性アミノ酸の配列パターンから、LMWA は哺乳類におけるアポ C-III に相当すると予想された。

予測される二次構造には非常に明確な両親媒性  $\alpha$  ヘリックス構造の存在が示唆されており、アポタンパク質としての構造的特徴はよく保存されていることが示された。

各種組織における mRNA の分布及び食餌コレステロールの影響について調べた結果、LMWA が LAP のコレステロール応答性の高さに関与する可能性は少ないと判断された。

### 第三章 動脈硬化易発性ウズラと、正常日本ウズラ の脂質吸収能の比較

#### 第一節 胃管栄養法を用いた動脈硬化易発性ウズラおよび 日本ウズラのコレステロール吸収能の測定

##### 緒言

これまでの研究では LAP, CA 間における, アポタンパク質の構造及び発現量の変化に焦点を絞った研究を行ってきた. LAP ウズラにおいて, アポタンパク質のアミノ酸配列を変化させる遺伝子変異は検出されなかったが, mRNA 発現レベルにおいて差が認められた. すなわち, LAP ウズラでは小腸においてアポ A-I mRNA レベルが恒常的に高いレベルで維持されており, LAP の脂質吸収能が高い可能性が考えられた.

LAP ウズラはコレステロールを投与することで動脈硬化症を惹起することから, 吸収に何らかの異常が生じていることは容易に想像できる. これまでに LAP における脂質吸収に関する研究がいくつか行われており, LAP では生体内におけるコレステロール合成の増大というよりもコレステロール吸収量が増加している可能性が示されている<sup>12)14)</sup>. しかしながら, コレステロールを含む食餌をウズラに自由摂取させ, 餌の摂取量および糞中へのステロール排泄量からコレステロール吸収量を算出する場合, 給餌器からの餌の混入は避けられず, 正確な吸収率の測定は不可能であった. そこでこの研究では, コレステロールの投与方法をこれまでの自由摂食から, コレステロールの摂取量および排泄量をより厳密に管理できる胃管



栄養法に換え、排泄物、血液、肝臓中の各種脂質濃度の測定を行い、食餌性コレステロールの吸収量と体内コレステロール濃度の変化をLAP, CA間で比較した。

実験動物は、それぞれLAPウズラとCAウズラを用いた。LAPウズラについては、富崎大学農学部畜産学部の研究員支助教授から23羽の雄ウズラを譲り受けた。正常な3カ月の雄ウズラは全て本所から購入した。飼育は、スパンレスケージにて室温23℃、12時間づつのライトサイクルで常照飼育(20%赤外線)を行った。2週間の馴染期間中、オーストラリアに毎日一個子の500μlのコーン油をオゾンデにより高濃度で投与した。LAP, CAウズラのオゾンデはコレステロール含有率として、コーン油に50mgのコレステロールを溶解して投与した。オゾンデの投与量は、3%のコーン油のみ、または、3%のコーン油に5倍のコレステロールを含む飼料を、ウズラが一日10g摂取した場合に相当する。

#### 試料の採取

2週間の飼育後、空腹状態より採取した血液を750×gで遠心し、得られた上清を血清サンプルとした。肝臓は迅速凍結に凍出し、総RNAを抽出した。また、動物飼育のためのサンプルは批検検疫を行うまで10%ホルムリンで下氷凍中に保存した。検疫物については、アルミ箔袋の上に、凍結の飼育期間中の全ての排泄物を回収し、貯蔵の容器を行きまで凍結で保存した。

#### 脂質の抽出

## 方法および材料

### 実験動物

本実験では 14 羽ずつの LAP ウズラと CA ウズラを用いた。LAP ウズラについては、宮崎大学獣医学部の那須哲夫助教授から 2-3 月齢の雄ウズラを譲り受けた。正常な 2-3 月齢の雄ウズラは全て九動から購入した。飼育は、ステンレスケージにて室温 25°C、12 時間ずつのライトサイクルで市販飼料(タンパク質 22%、脂肪 2.5%、食物繊維 5%、灰分 14%、2,700 kcal/kg)を自由摂食させて行った。二週間の飼育期間中、すべてのウズラに毎日一回ずつ 500  $\mu$ l のコーン油を胃ゾンデにより直接胃に投与した。LAP、CA ウズラの半分(7 羽)はコレステロール投与群として、コーン油に 50mg のコレステロールを懸濁して投与した。今回の脂質の投与量は、5%のコーン油のみ、または、5%のコーン油および 0.5%のコレステロールを含む飼料を、ウズラが一日 10 g 摂取した場合に相当する。

### 試料の回収

二週間の飼育後、断頭屠殺により回収した血液を 1000 x g で遠心し、得られた上清を血液サンプルとした。肝臓は屠殺直後に摘出し、総 RNA を抽出した。また、脂質抽出のためのサンプルは抽出操作を行うまで 10%ホルムアルデヒド溶液中に保存した。排泄物については、アルミホイル上に二週間の飼育期間中の全ての排泄物を回収し、脂質の分析を行うまで -20°C で保存した。

### 脂質の抽出

排泄物中の脂質は定法に従った。まず 20 倍量のエタノールに糞を懸濁し、60°C、1 時間インキュベートした。これを遠心分離して得られた上清を各脂質分析に用いた。

肝臓脂質も定法に従い、メタノール：クロロホルム(2:1)液中でホモジナイズし、これを数回繰り返す。得られたホモジネートは 40°C、3 分間インキュベートし、濾過したものを 1/5 量の水と混和、低温で放置する。上層の水層を除去した後エバポレーターで濃縮し、石油エーテルに溶解して脂質濃度測定まで保存した。

#### 排泄物中の脂質の定量

コレステロール濃度測定：Allain, C. C. らの方法に従って測定した<sup>48)</sup>。排泄物の熱エタノール抽出物を NaOH でケン化し、不ケン化物を石油エーテルで抽出した。抽出物を乾涸させた後、コレステロールオキシダーゼを反応させ、生成される  $\Delta^4$ -コレステノン を O.D. 240 nm で測定した。

胆汁酸の定量：Eaton, D. L. らの方法に従って、NAD 存在下における、胆汁酸を基質としたヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ活性による NADH の生成量を測定した<sup>49)</sup>。反応前後の O.D. 340 nm の吸光度変化を測定し、増加した吸光度を反応液中の胆汁酸に換算した。標準物質としてはコール酸を用いた。

脂肪の定量：脂肪の定量は Van de Kamer 法の変法に従った<sup>50)</sup>。一定重量の乾燥排泄物を水酸化ナトリウムのアルコール溶液中で煮沸し、脂肪、脂肪酸をケン化した。塩酸を加えて脂肪酸を遊離させ、石油エーテルで脂肪酸を抽出した。石油エーテル蒸発させ、残渣に中性アルコールを加え水酸化ナトリウムで遊離脂肪酸を滴定

し、脂肪量を算出した。

#### 血中の脂質の定量

血中の各種脂質濃度は全て市販のキットを用いて測定した。

総コレステロール：血中のコレステロールエステル類はコレステロールエステラーゼの作用により遊離のコレステロールとなり、既存の遊離型コレステロールとともにコレステロールオキシダーゼの作用を受けて酸化され、同時に過酸化水素を生じる。この過酸化水素は、ペルオキシダーゼの作用により 3,5-ジメトキシ-N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-アニリンナトリウム(DAOS)と 4-アミノアンチピリンとを定量的に酸化縮合させ、青色の色素を生成する。この色素の吸光度を O.D. 600 nm で測定することにより、total コレステロール濃度を測定した(コレステロール E-テスト(和光純薬工業株式会社))。

遊離コレステロール：試料にコレステロールオキシダーゼのみを作用させる以外は上記の遊離コレステロール E-テストと同様の原理で遊離コレステロール濃度を測定した(遊離コレステロール E-テスト(和光純薬工業株式会社))。

トリグリセリド：トリグリセリドはリポプロテインリパーゼの作用によりグリセリンと脂肪酸に分解される。グリセリンは ATP の存在下でグリセロールキナーゼの作用でグリセロール-3-リン酸になり、さらにグリセロール-3-リン酸オキシダーゼの作用で酸化され、過酸化水素を生じる。この過酸化水素は、ペルオキシダーゼの作用により 3,5-ジメトキシ-N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-アニリンナトリウム(DAOS)と 4-アミノアンチピ

リンとを定量的に酸化縮合させ、青色の色素を生成する。この色素の吸光度を O.D. 600 nm で測定することにより、トリグリセリド濃度を測定した(トリグリセライド E-テスト(和光純薬工業株式会社))。

リン脂質：リン脂質(レシチン，リゾレシチン，スフィンゴミエリン)は，ホスホリパーゼ D の作用により加水分解されコリンを遊離する。コリンはコリンオキシダーゼの作用でベタインに酸化され，同時に過酸化水素を生成する。この過酸化水素は，ペルオキシダーゼの作用によりフェノールと 4-アミノアンチピリンとを定量的に酸化縮合させ，赤色の色素を生成する。この色素の吸光度を O.D. 505 nm で測定することにより，リン脂質濃度を測定した(リン脂質 B-テスト(和光純薬工業株式会社))。

#### 肝臓中の脂質の定量

総コレステロールと遊離型コレステロール：肝臓中のコレステロール濃度測定は Sperry and Webb 法により行った<sup>51)</sup>。肝臓の脂質抽出物を KOH でケン化し酢酸で中和した後，ジキトニンと反応させた。遠心により沈殿を回収しエーテルで洗浄した後，再び遠心して得られた沈殿を 110°C，30 min 熱乾させた。熱いうちに酢酸を加えて沈殿を溶解し，無水酢酸：濃硫酸=20:1 の溶液を発色試薬として先の沈殿溶解液に加えた。正確に 30 min，25°C で反応させ，O.D. 620nm で測定した。コレステロールの酢酸溶解液を標準液として，サンプル同様に処理し，検量線を作成した。

トリグリセリド：トリグリセリド濃度は Fletcher 法により測定した<sup>52)</sup>。まず，抽出した脂質溶液を乾涸しクロロホルムに溶解した。妨害成分を除去するためにケイ酸を加え，上清をアルカリ下

で加温してケン化した。生成したグリセロールをメタ過ヨウ素酸ナトリウムで酸化すると2分子のホルムアルデヒドを生じる。このホルムアルデヒドにアセチルアセトンを加え縮合させ、生じた黄色のルチジン誘導体を O.D. 405 nm で測定し、濃度を算出した。

リン脂質：リン脂質は Rouser, G. らの方法で測定した<sup>53)</sup>。まず、肝臓脂質抽出物を乾涸し、過塩素酸を加えて加熱灰化する。これに水、モリブデン酸アンモニウム、アスコルビン酸を加えて反応させ、生じるリンモリブデン酸アンモニウムの青色を O.D. 820 nm で測定した。得られたリン濃度をホスファチジルコリンとしてのリン脂質濃度に換算した。

#### 肝臓コレステロール 7 $\alpha$ -ヒドロキシラーゼ mRNA 発現量

抽出した肝臓からの total RNA の抽出及びブロッティングは第二章第一節の mRNA 発現量測定の方法に準じた。既知のニワトリのコレステロール 7 $\alpha$ -ヒドロキシラーゼ cDNA の活性中心の 767 bp の両端から一組のプライマー(forward(F-1 primer): TTGGGCATGGTAGCATTGACCCAGC, reverse(R-2 primer): TAGCCTCAATTGCCTCCTTG)を設計し、ウズラの cDNA ライブラリーを鋳型として PCR を行った。PCR 条件は、50 $\mu$ l の反応液中に 1 x Taq buffer, 2.5 $\mu$ g の cDNA ライブラリー, 15 pmol の各プライマー, 10 nmol の dNTP Mix, 2 U の Taq DNA polymerase を加え、94 $^{\circ}$ C-6 min. , 60 $^{\circ}$ C-1 min. , 72 $^{\circ}$ C-2 min. (1 cyc), 94 $^{\circ}$ C-1 min. , 58 $^{\circ}$ C-1 min. , 72 $^{\circ}$ C-2 min. (29 cyc), 72 $^{\circ}$ C-10 min. (1 cyc)の温度条件で増幅を行った。得られた DNA を鋳型として 50 $\mu$ l の反応液中に 1 x Taq buffer, 150 ng の PCR 産物, 15 pmol の各プライ

マー, 10 nmol の dNTP Mix, 2 U の Taq DNA polymerase に, 6.6  $\mu$  mol の [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP [500 Ci] と 3.4  $\mu$  mol の [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dGTP [250 Ci] を加え, PCR を行うことで PCR 産物を RI 標識し, コレステロール 7 $\alpha$ -ヒドロキシラーゼのプローブとした. ウズラの肝臓から抽出した総 RNA を用いてドットブロットハイブリダイゼーションを行った. ハイブリダイゼーションは第二章第一節の mRNA 発現量測定の方法に従った. プローブとのハイブリダイゼーションは 5 x SSC, 5 x Denhardt, 0.5% SDS に 20  $\mu$  g/ml のサケ精子 DNA を含むハイブリダイゼーションバッファー(0.2 ml/cm<sup>2</sup> メンブラン)中で, 65°C, 1 時間のプレハイブリダイゼーションを行った後, RI 標識した PCR 産物を 95°C, 2 分間熱変性させた後, 氷中で急冷しハイブリダイゼーションバッファーに加えた(0.4  $\mu$  l/ml ハイブリダイゼーションバッファー). ハイブリダイゼーションは 65°C で一晩, ゆっくり振倒しながら行った. ハイブリダイゼーション後, 一次洗浄バッファー(2 x SSC, 0.1% SDS)で 65°C, 10 分間, 二回洗浄し, さらに二次洗浄バッファー(1 x SSC, 0.1% SDS)で 65°C, 10 分間洗浄した. 洗浄後のメンブランは風乾し, イメージングプレート(富士写真フィルム株式会社)に感光させた. イメージングプレートは BAS-1000 バイオイメージングアナライザー(富士写真フィルム株式会社)で検出し, 得られた画像データはコンピュータソフト(NIH image)で画像解析し, シグナルの強度を算出した.

#### 統計解析

本実験の統計解析は二元配置の分散分析により行った<sup>21)</sup>. グラフの肩文字の大文字は系統間, 小文字は食餌の影響における有意

差を表しており、危険率 5%以下で有意差のある場合には異なる文字を付した。

コレストロールの減少は、LAP、CA  
ワズアアと表した。危険率 5%以下で有意差のある場合には異なる文字を付した。コレストロール  
を減少させることにより、LAP、CAと表した。危険率 5%以下で有意差のある場合には異なる文字を付した。  
mg/day)を減少させることにより、LAP、CAと表した。危険率 5%以下で有意差のある場合には異なる文字を付した。  
LAP、CAと表した。危険率 5%以下で有意差のある場合には異なる文字を付した。コレストロール  
を減少させることにより、LAP、CAと表した。危険率 5%以下で有意差のある場合には異なる文字を付した。  
LAP、CAと表した。危険率 5%以下で有意差のある場合には異なる文字を付した。コレストロール  
を減少させることにより、LAP、CAと表した。危険率 5%以下で有意差のある場合には異なる文字を付した。  
LAP、CAと表した。危険率 5%以下で有意差のある場合には異なる文字を付した。コレストロール  
を減少させることにより、LAP、CAと表した。危険率 5%以下で有意差のある場合には異なる文字を付した。  
LAP、CAと表した。危険率 5%以下で有意差のある場合には異なる文字を付した。コレストロール  
を減少させることにより、LAP、CAと表した。危険率 5%以下で有意差のある場合には異なる文字を付した。

#### 血中脂質濃度

血中の総コレステロール濃度は、LAPと比べてのみコレステ  
ロール濃度の減少が認められた。また、危険率 5%以下で有意差のある場合には異なる文字を付した。  
LAP、CAと表した。危険率 5%以下で有意差のある場合には異なる文字を付した。コレストロール  
を減少させることにより、LAP、CAと表した。危険率 5%以下で有意差のある場合には異なる文字を付した。  
LAP、CAと表した。危険率 5%以下で有意差のある場合には異なる文字を付した。コレストロール  
を減少させることにより、LAP、CAと表した。危険率 5%以下で有意差のある場合には異なる文字を付した。  
LAP、CAと表した。危険率 5%以下で有意差のある場合には異なる文字を付した。コレストロール  
を減少させることにより、LAP、CAと表した。危険率 5%以下で有意差のある場合には異なる文字を付した。  
LAP、CAと表した。危険率 5%以下で有意差のある場合には異なる文字を付した。コレストロール  
を減少させることにより、LAP、CAと表した。危険率 5%以下で有意差のある場合には異なる文字を付した。



## 結果

### コレステロール, 胆汁酸, 脂肪の排泄量

コレステロールの投与群のコレステロール排泄量を LAP, CA ウズラで比較した. 普通食を与えた場合, 系統間に差は認められなかったが(8.22 mg/day (LAP), 9.69 mg/day (CA)), コレステロールを投与することで LAP, CA ともに排泄量が上昇し, LAP(34.22 mg/day)よりも CA(38.67 mg/day)の排泄量が有意に高かった(Fig. 3-1-1 A). 普通食を投与した場合の平均コレステロール排泄量と, 一日当たりのコレステロール投与量から, 見かけの吸収量を算出すると, LAP で一日あたり 16 mg, CA で 11 mg のコレステロールを吸収しているの見積もられた(Fig. 3-1-1 B). 胆汁酸の排泄量は, 普通食を与えた場合では LAP より CA の排泄量が有意に高かった. コレステロール投与によりいずれの系統においても胆汁酸の排泄は上昇する傾向を示した(Table 3-1-1). 一方, 脂肪の排泄量にはコレステロール投与の影響は認められず, 脂肪排泄量は常に LAP よりも CA が有意に高いことが示された.

### 血中脂質濃度

血中の総コレステロール濃度は, LAP においてのみコレステロール投与の影響が認められ, 血中濃度は普通食を投与した場合の約 6 倍, コレステロールを投与した CA の約 5 倍に上昇した(Table 3-1-2). 同様の傾向は, 血中の遊離型コレステロール濃度にも認められた. 血中のトリグリセリド濃度は LAP で高く, またコレステロールを投与することにより LAP で濃度が上昇する傾向が見られた. リン脂質濃度については, 普通食を投与した場合には系統間に

差は認められず，コレステロール投与により LAP ウズラのリン脂質濃度が有意に上昇し，系統間に差が認められた。

#### 肝臓脂質濃度

肝臓の総コレステロール濃度も血中濃度とほぼ同様の傾向を示し，コレステロールを投与した LAP のみが顕著なコレステロール濃度の上昇を示した (Table 3-1-3)。総コレステロール濃度ほど著しい変化ではなかったが，遊離型コレステロール濃度にも同様の傾向があった。一方，肝臓中のトリグリセリド及びリン脂質濃度には系統間，及びコレステロール投与の影響は認められなかった。

#### 肝臓コレステロール 7 $\alpha$ -ヒドロキシラーゼ mRNA 発現量

普通食を摂取した LAP の肝臓におけるコレステロール 7 $\alpha$  ヒドロキシラーゼ mRNA の発現量は CA よりも有意に高かった (Fig. 3-1-2)。両系統において，コレステロール投与による mRNA 発現量の有意な変化は認められなかったが，LAP では発現量が減少する傾向にあり，逆に CA では増加する傾向にあった。

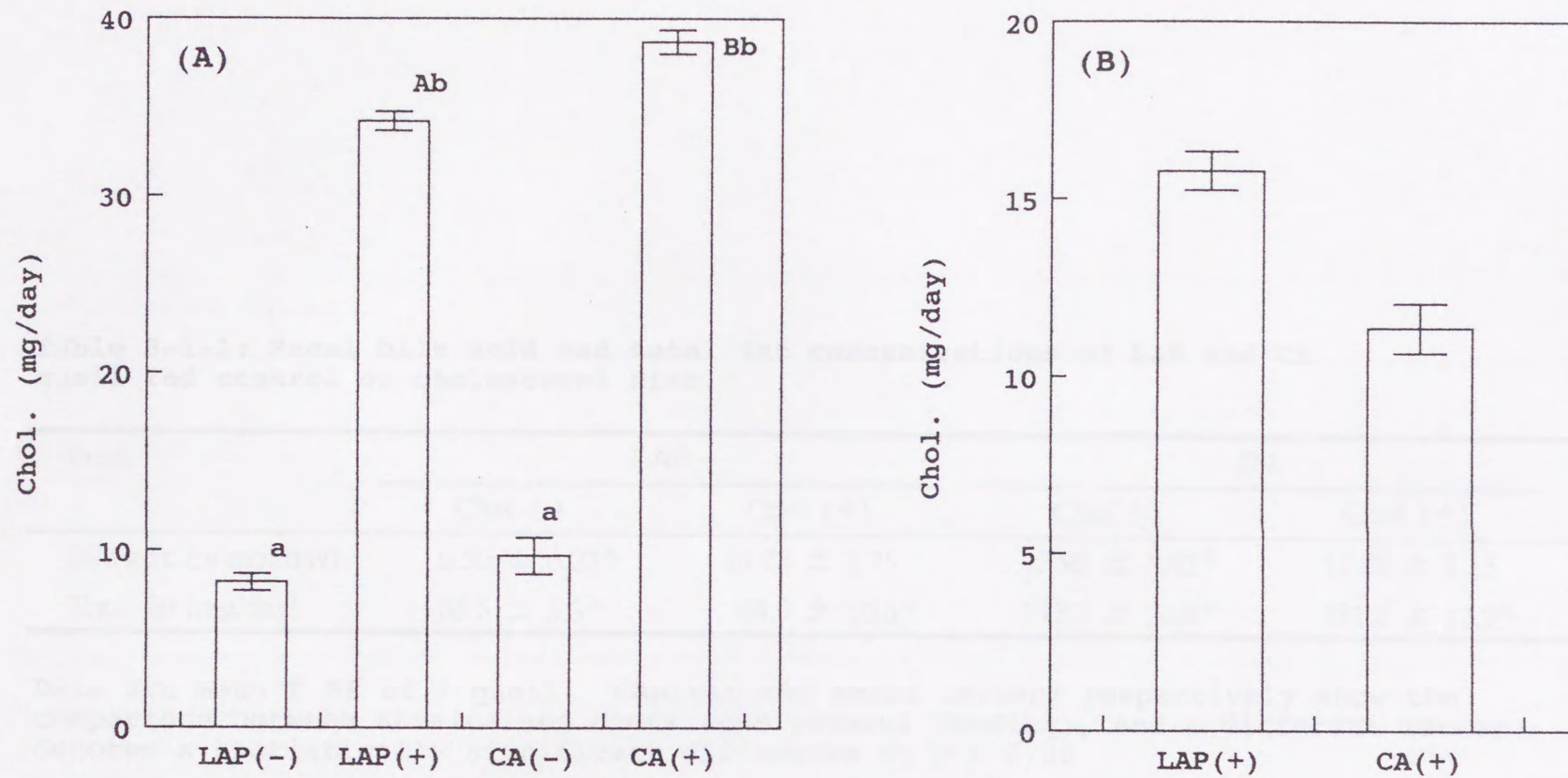


Fig. 3-1-1: Fecal cholesterol concentration of LAP and CA quail fed control or cholesterol diet.

A, cholesterol concentration of feces.; B, apparent cholesterol absorption of cholesterol-fed quail. Capital and small letters respectively show the comparison between strains and diets (cholesterol feeding), and a different letter denotes a statistically significant difference at  $p < 0.05$ .

Table 3-1-1: Fecal bile acid and total fat concentrations of LAP and CA quail fed control or cholesterol diet.

feces	LAP		CA	
	Chol. (-)	Chol. (+)	Chol. (-)	Chol. (+)
Bile acid ( $\mu$ mol/day)	6.56 $\pm$ 0.27 <sup>A</sup>	11.78 $\pm$ 1.75	13.95 $\pm$ 3.52 <sup>B</sup>	17.70 $\pm$ 1.13
Total fat (mg/day)	68.5 $\pm$ 5.3 <sup>A</sup>	64.0 $\pm$ 10.6 <sup>A</sup>	173.1 $\pm$ 20.9 <sup>B</sup>	181.5 $\pm$ 12.9 <sup>B</sup>

Data are mean  $\pm$  SE of 7 quail. Capital and small letters respectively show the comparison between strains and diets (cholesterol feeding), and a different letter denotes a statistically significant difference at  $p < 0.05$ .

Table 3-1-2: Serum lipid concentrations of LAP and CA quail fed control or cholesterol diet.

Serum (mg/dl)	LAP		CA	
	Chol. (-)	Chol. (+)	Chol. (-)	Chol. (+)
Total chol.	219.1 ± 22.5 <sup>a</sup>	1353.3 ± 229.5 <sup>Ab</sup>	198.3 ± 13.7	256.6 ± 20.8 <sup>B</sup>
Free chol.	72.7 ± 4.4 <sup>a</sup>	347.1 ± 44.7 <sup>Ab</sup>	62.6 ± 3.6	60.9 ± 4.8 <sup>B</sup>
TG	109.1 ± 8.0 <sup>A</sup>	137.3 ± 14.6 <sup>A</sup>	75.6 ± 7.1 <sup>B</sup>	73.3 ± 7.5 <sup>B</sup>
PL	418.3 ± 31.9 <sup>a</sup>	558.4 ± 57.7 <sup>Ab</sup>	447.7 ± 33.7	431.6 ± 45.3 <sup>B</sup>

Data are mean ± SE of 7 quail. Capital and small letters respectively show the comparison between strains and diets (cholesterol feeding), and a different letter denotes a statistically significant difference at  $p < 0.05$ .

Table 3-1-3: Liver lipid concentrations of LAP and CA quail fed control or cholesterol diet.

Liver (mg/g liver)	LAP		CA	
	Chol. (-)	Chol. (+)	Chol. (-)	Chol. (+)
Total chol.	2.99 ± 0.11 <sup>a</sup>	14.67 ± 2.29 <sup>Ab</sup>	2.81 ± 0.08	3.04 ± 0.20 <sup>B</sup>
Free chol.	2.38 ± 0.08 <sup>a</sup>	4.17 ± 0.13 <sup>Ab</sup>	2.20 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.48 ± 0.10 <sup>Bb</sup>
TG	3.57 ± 0.41	3.76 ± 0.54	3.39 ± 0.38	3.62 ± 0.66
PL	0.39 ± 0.03	0.42 ± 0.02	0.39 ± 0.03	0.43 ± 0.06

Data are mean ± SE of 7 quail. Capital and small letters respectively show the comparison between strains and diets (cholesterol feeding), and a different letter denotes a statistically significant difference at  $p < 0.05$ .

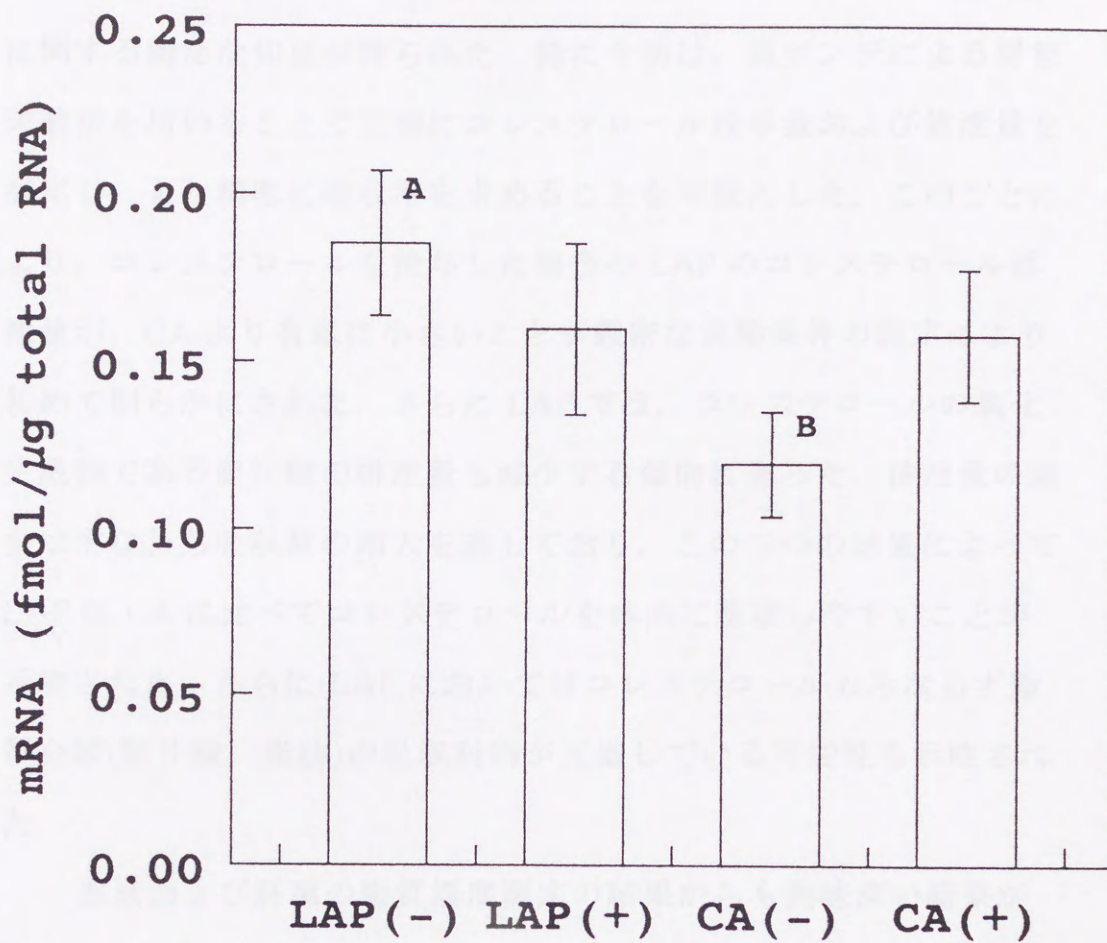


Fig. 3-1-2: Effects of cholesterol feeding on the expression of hepatic cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase mRNA.

Data are mean  $\pm$  SE of 7 quail. Capital shows the comparison between strains, and a different letter denotes a statistically significant difference at  $p < 0.05$ .

## 考察

今回の研究によって LAP ウズラの食餌コレステロール吸収能に関する新たな知見が得られた。特に今回は、胃ゾンデによる胃管栄養法を用いることで正確にコレステロール投与量および排泄量を測定し、より精密に吸収率を求めることを可能にした。このことにより、コレステロールを投与した場合の LAP のコレステロール排泄量が、CA より有意に小さいことが厳密な実験条件の設定により初めて明らかにされた。さらに LAP では、コレステロールの異化生成物である胆汁酸の排泄量も減少する傾向にあった。排泄量の減少はすなわち吸収量の増大を表しており、この二つの結果によって LAP は CA に比べてコレステロールを体内に蓄積しやすいことが示唆された。さらに LAP においてはコレステロールのみならず脂質全般(胆汁酸、脂肪)の吸収利用が亢進している可能性も示唆された。

血液および肝臓の脂質濃度測定の結果からも興味深い結果が得られた。すなわち、コレステロールを投与した LAP ウズラにおいてのみ、血液、肝臓中のコレステロール濃度が有意に上昇していた。CA ウズラでも食餌コレステロールにより、血液、肝臓中のコレステロール濃度の有意な上昇が認められていたが<sup>7)(12)(14)</sup>。今回の現象はおそらく、コレステロール投与法の違いに起因していると考えられた。本実験では、一日に摂取するコレステロール量を一度にまとめて投与したため、消化管でのコレステロールの滞留時間は、これまでの実験に比べて極端に短かったと考えられる。このような比較的短い時間でも LAP はコレステロールを吸収できるのに対し、CA では吸収が不十分であったためと推察された。すなわち、LAP ウ



ズラは食餌性コレステロールを投与していない状態においても常にコレステロールを吸収し易い状態にあり、潜在的に脂質の吸収能力が高いことを示唆している。さらに LAP において肝臓コレステロール 7 $\alpha$ -ヒドロキシラーゼ mRNA の発現量は CA より有意に高く、より多くの胆汁酸供給が行われている可能性ともこの推察は一致する。一般的にコレステロール負荷は生体内におけるコレステロール異化を促進する。事実、CA ウズラのコレステロール 7 $\alpha$ -ヒドロキシラーゼ活性はコレステロール投与により上昇する傾向にあった。一方、LAP ウズラではこのような feed - forward 調節が行われておらず(図 3-1-2)、コレステロール吸収が活発に行われるにもかかわらず、コレステロール異化は抑制される傾向にあった。すなわち、LAP ウズラではコレステロール異化経路の代謝調節に異常をきたし、高コレステロール血症をより悪化させる代謝傾向にあるものと理解された。

まとめとして、今回のコレステロールの投与実験により、高いコレステロール吸収能がコレステロールに対する LAP の高い感受性の一因であることが初めて明らかにされた。しかしながら、今回のコレステロール投与に対する LAP における特異的な血清コレステロール濃度の上昇は、コレステロール吸収の上昇のみによっては説明されず、代謝的な因子が付加関与することを示唆しているものと考えられた。

小括

今回の実験では、従来の自由摂食によるコレステロール投与ではなく、胃管栄養法を用いることでより正確なコレステロール吸収率を測定した。その結果、LAPのコレステロール吸収量が有意に増大していることが初めて明らかにされた。

血液および肝臓のコレステロール濃度はコレステロールを投与したLAPウズラにおいてのみ顕著に増大していた。

LAPの肝臓コレステロール7 $\alpha$ -ヒドロキシラーゼ mRNA 発現量は普通食の場合CAよりも高く、コレステロール投与により低下する傾向にあった。

今回の実験結果から、LAPのコレステロールに対する高い応答性は、小腸におけるコレステロールの吸収亢進により一部説明されるが、コレステロールの胆汁酸への異化を含めた代謝的要因がLAPの高コレステロール血症に関与する可能性も指摘された。

## 第四章 LAP ウズラの小腸の高い脂質吸収能に関 わる因子の検索と解明

### 第一節 LAP と CA ウズラの小腸における mRNA の種類 と発現量の差異の検出

#### 緒言

ここまでの研究で、LAP のコレステロールに対する高い応答性は、一部はその吸収亢進によると考えられた。しかしながら、LAP の高いコレステロール吸収能に関係する遺伝子変異についてはこれまで報告されていない。

現在、遺伝子工学の分野において、数多くの遺伝子変異の検出法が確立されており、ガンなどの病変における損傷を受けた遺伝子の検出や、いくつかの遺伝病における染色体異常の検出に貢献している。しかしながら、今回の実験のように、遺伝子構造上に変化は認められなくても、その発現量が顕著に変化することで生体に影響を及ぼしている場合は、従来の染色体 DNA をターゲットとした方法では、変化を検出することは不可能である。そこで現在、異なる条件下の細胞で発現しているポリ(A)配列をもつ mRNA の差異を簡単に見つけられる方法として、Differential Display (DD)法が Liang と Pardee によって開発されている。この方法は、基本的にはまず 3'末端に余分なヌクレオチドを付加したオリゴ d(T)プライマー(アンカープライマー)と、任意の 10 から 20 塩基のプライマー(任意プライマー)を用いて PCR を行う。得られた PCR 産物を電気泳動で展開し、DNA バンドの泳動パターンを比較することで、

発現している mRNA の種類および量の差異が検出できる。この方法はプライマーの設計と組み合わせにより、発現量の低い転写物も検出可能な点で優れており、近年注目されている。

そこで今回の実験では、LAP のコレステロール吸収能亢進に関与している遺伝子を明らかにする目的で、小腸で発現している総 mRNA を DD 法を用いて LAP, CA 間で比較した。

#### mRNA 抽出

ラットに用いる小腸の総 RNA 抽出は、第一巻第一巻の mRNA 発現解析法に詳しい実験法に従って実施した。

#### Differential Display 法による mRNA 発現解析

今回用いたアンカープライマー、任意プライマーは Table 1 にまとめられた。まず、2.5 μg の総 RNA に、50 pmol のアンカープライマーを加え、32°C に調整し、70°C、10 分間の熱変性の後、水中で変性した。32 mM Tris-HCl (pH 8.0)、25 mM KCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、15 mM DTT を含む緩衝液に RNA サンプル、1 U の RNase inhibitor、10 amp の dNTP mix、2 U の reverse transcriptase (RAV-2 府立総合研究センター) を添加して 10 μl に調整し、25°C-15 分、42°C-40 分、75°C-15 分間反応させ、DNA を合成した。反応後、2.5 μl の無菌水を加えて、100 μl の時間増幅とした。

続いて、合成した cDNA サンプル 1 μl につき、dNTP mix を 1.25 μmol、アンカープライマー 10 μmol、任意プライマー 10 μmol を 10 μmol、1 × Tag Buffer, 5 μg DNA ポリメラーゼを 10

## 方法および材料

### 実験動物

CA ウズラは全て九動(株)から 2-3 月齢のウズラを購入した。LAP ウズラについては、宮崎大学獣医学部の那須哲夫教授から同じく 2-3 月齢のウズラを譲り受けた。飼育条件は、第二章第一節の方法に従い、全てのウズラにコレステロール食を投与し、高コレステロール血症を誘導した。

### RNA 抽出

DD 法に用いる小腸の総 RNA サンプルは、第二章第一節の mRNA 発現量解析に用いた調整法に従って調製した。

### Differential Display 法による mRNA 発現量分析

今回用いたアンカープライマー、任意プライマーは Table 4-1-1 にまとめた。まず、 $2.5\mu\text{g}$  の総 RNA に、 $50\text{ pmol}$  のアンカープライマーを加え、 $10\mu\text{l}$  に調製し、 $70^\circ\text{C}$ 、10 分間の熱変性の後、水中で急冷した。 $50\text{ mM Tris-HCl}$  (pH 8.3),  $75\text{ mM KCl}$ ,  $8\text{ mM MgCl}_2$ ,  $10\text{ mM DTT}$  を含む緩衝液中に RNA サンプル、 $11.7\text{ U}$  の RNase inhibitor,  $10\text{ nmol}$  の dNTP mix,  $9\text{ U}$  の reverse transcriptase(RAV-2(宝酒造株式会社))を添加して  $20\mu\text{l}$  に調製し、 $25^\circ\text{C}$ -10 分、 $42^\circ\text{C}$ -60 分、 $70^\circ\text{C}$ -15 分間反応させ、DNA を合成した。反応後、 $80\mu\text{l}$  の滅菌水を加えて、 $100\mu\text{l}$  の鋳型溶液とした。

続いて、合成した cDNA サンプル  $1\mu\text{l}$  につき、dNTP mix を  $1.25\text{ nmol}$ 、アンカープライマー T(15)AA を  $5\text{ pmol}$ 、任意プライマー(10bp)を  $10\text{ pmol}$ 、 $1\times\text{ Taq Buffer}$ 、Taq DNA ポリメラーゼを  $1\text{ U}$

添加し、20 $\mu$ lの反応系でPCRを行った。温度条件は、94 $^{\circ}$ C - 3min. , 33 $^{\circ}$ C - 5min. , 72 $^{\circ}$ C - 5min. (x 1 cyc. ), 94 $^{\circ}$ C - 15sec. , 36 $^{\circ}$ C - 1min. , 72 $^{\circ}$ C - 2min. (x 35 cyc. ), 72 $^{\circ}$ C - 10min. (x 1 cyc. )と、94 $^{\circ}$ C - 3min. , 35 $^{\circ}$ C - 5min. , 72 $^{\circ}$ C - 5min. (x 1 cyc. ), 94 $^{\circ}$ C - 15sec. , 38 $^{\circ}$ C - 1min. , 72 $^{\circ}$ C - 2min. (x 35 cyc. ), 72 $^{\circ}$ C - 10min. (x 1 cyc. )で行った。得られたPCR産物は、全て未変性のポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、銀染色キット(第一薬品)またはSYBR Green I(宝酒造株式会社)によりゲル染色を行った後、DNAバンドを紫外線照射下で検出した。系統間で差異の認められるDNAバンドをメスで切り出し、dNTP mixを6.25 nmol, アンカープライマー T(15)AAを25 pmol, 任意プライマー(10bp)を50 pmol, 1 x Taq Buffer, Taq DNAポリメラーゼを5 U添加し、80 $\mu$ lの反応系で二次PCRを行った。温度条件は、94 $^{\circ}$ C - 3min. , 35 $^{\circ}$ C - 5min. , 72 $^{\circ}$ C - 5min. (x 1 cyc. ), 94 $^{\circ}$ C - 15sec. , 38 $^{\circ}$ C - 1min. , 72 $^{\circ}$ C - 2min. (x 35 cyc. ), 72 $^{\circ}$ C - 10min. (x 1 cyc. )で行った。得られたPCR産物は濃縮後、2%アガロースで電気泳動を行い、目的のバンドを切り出した。アガロースゲルからのDNAの抽出は、専用のフィルターカップ付きマイクロチューブ(Ultrafree - DA (MILLIPORE 社))を用いて行い、回収したDNAはエタノール沈殿を行い、滅菌水に溶解してDNAフラグメント溶液として、次項のハイブリダイゼーションのプローブ合成に使用した。

#### ノーザンブロットハイブリダイゼーション

DD法で発現量に差異の認められたDNAクローンをプローブとしてLAP, CAウズラ小腸の総RNAについてノーザンブロット

ハイブリダイゼーションを行った。条件は全て第2章第1節の方法に従った。

今回の実験では、35S標識の作成プライマーを用いた結果、B12、B74のプライマーを用いた場合に基質型において顕著な差を見出すことが出来た(表4-1-2)。B74-100が検出された(表4-1-2)。これらの結果を考慮し、B74-100をプライマーとして、B74-100のハイブリダイゼーションを行った。LAPではB74-100と相補的なmRNAの発現がCAよりも高かったが、B74-100と相補的なmRNAについては本実験には検出されなかった(表4-1-2)。

## 結果

今回の実験では、18種類の任意プライマーを用いた結果、B10, B74プライマーを用いた場合に系統間において顕著な差異を示す2つのバンド(B10-230, B74-160)が確認された(Fig. 4-1-1). これらのDNAクローンをプローブとしてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った. LAPではB10-230に相補的なmRNAの発現がCAよりも高かったが、B74-160に相補的なmRNAについては系統間に差は認められなかった(Fig. 4-1-2).

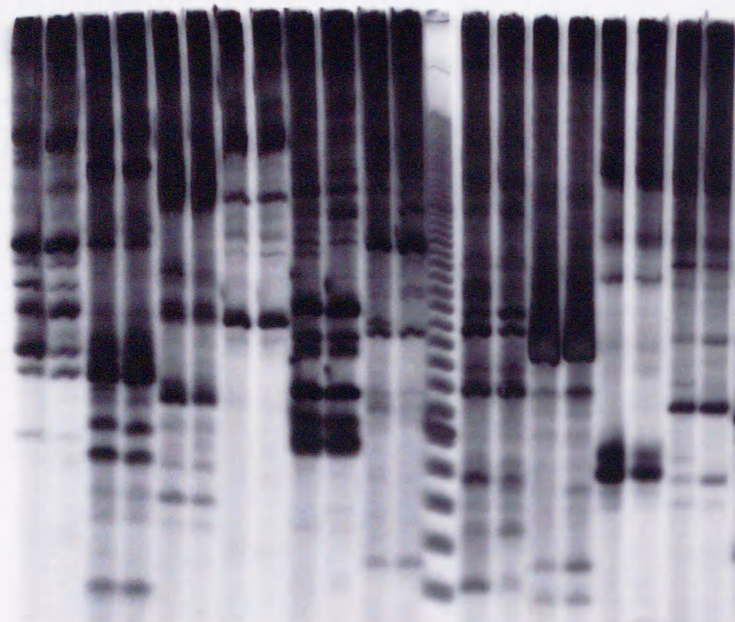


Table 4-1-1: DNA sequence of optional primers

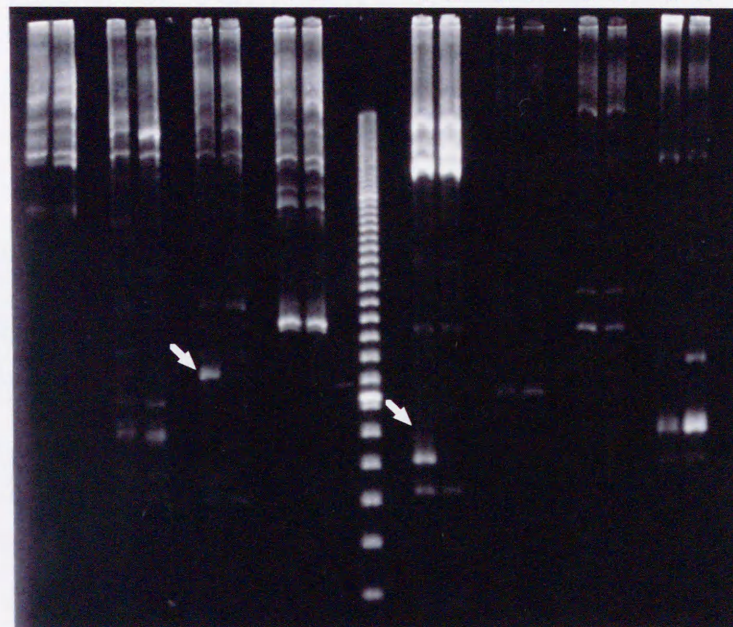
A00	ATCAGCGCACCA	A09	AGAATTGGACGA
A01	AGCAGCGCCTCA	A46	TGGCCTATTGGC
A02	GCCAGCTGTACG	A51	AAGTCGTTTGGG
A03	TGCCTCGCACCA	B10	TTCATTCTGGGG
A04	GCCCCGTTAGCA	B36	ACTTTCCTACGG
A05	CCGCAGTTAGAT	B74	ACCATCAAACGG
A06	ACTGGCCGAGGG	B75	GTGCAATTGGC
A07	GATGGATTGGG	B76	GTTTTGTCACCG
A08	TTCGGACGAATA	B84	CTTATGGATCCG

Fig. 4-1-1: Differentiated display comparing small intestine RNA from LAF and CA quail. Total small intestine RNA was reverse transcribed using (15) as anchor primer. The cDNA was amplified by PCR with an additional optional primer (A00, A01, A02, A03, A04, A05, A06, A07, A08, A09, A46, A51, B10, B36, B74, B75, B76, B84). The PCR products were separated on a 2% polyacrylamide gel. The arrow indicates a cDNA band, which was then amplified in CA or LAF quail. This band was reamplified and labeled with 32-P-ATP. All stained by silver staining MS. R. Stained by SYBR Green I.

**A** A00 A01 A02 A03 A04 A05 M A06 A07 A08 A09  
 N L N L N L N L N L N L N L N L N L



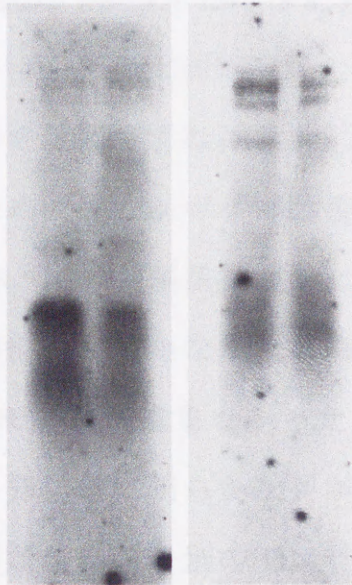
**B** A46 A51 B10 B36 M B74 B75 B76 B84  
 N L N L N L N L N L N L N L N L



**Fig. 4-1-1: Differential display comparing small intestine RNA from LAP and CA quail.**

Total small intestine RNA was reverse transcribed using T(15)AA anchor primer. The cDNA was amplified by PCR with an additional optional primer (A00, A01, A02, A03, A04, A05, A06, A07, A08, A09, A46, A51, B10, B36, B74, B75, B76, B84). The PCR products were separated on a 6% polyacrylamide gel. The arrow indicates a cDNA band, which was less amplified in CA or LAP quail. This band was reamplified and labeled with Fl-dUTP. A; Stained by silver staining kit. B; Stained by SYBR Green I.

B10-230      B74-160  
N    L      N    L



**Fig. 4-1-2: Northern blot analysis of mRNA from quail small intestine.**

Total RNA was probed with B10-230 and B74-160 DNA as described in Materials and Methods.

## 考察

今回の研究では、B10-230 に相補的な mRNA の発現量に DD 法およびノーザンブロット法いずれにおいても差が認められた。B10-230 に相補的な mRNA の塩基配列を現在決定中である。B74-160 と相補的な mRNA については、ノーザンブロット法により発現量の差を確認できなかった。原因として、1: プローブ濃度が高すぎたために傾向シグナル強度に明確な差が現れなかった。2: 実際には mRNA の発現量には差はないにも関わらずプライマーの結合する部位のわずかな配列の違いによりアニーリングがうまくいかず、PCR 反応が進まなかった。などの原因が考えられた。また、実際には発現量に明らかな差があるにもかかわらず、分子サイズが同一で種類が異なる別の DNA バンドにより、差異がマスクされてしまった可能性もあると判断された。このような問題を解決するために、プライマーの組み合わせ、PCR 条件、検出法を変えて現在実験を行っている。LAP の高い脂質吸収能を説明できる mRNA の差異を検出するために、今後も更に実験を継続する計画である。

## 小括 要 結 語

LAP のコレステロール吸収の亢進に関連する因子を明らかにすることを目的として、Differential Display 法により小腸で発現される mRNA の種類および量を系統間で比較した。DD 法においては、二つの cDNA バンドに系統間で差が認められ、うち一つにおいては、ノーザンブロット法によっても発現量に差異を確認した。

本研究では、LAP におけるコレステロール吸収の亢進に関連する因子を明らかにすることを目的として、Differential Display 法により小腸で発現される mRNA の種類および量を系統間で比較した。DD 法においては、二つの cDNA バンドに系統間で差が認められ、うち一つにおいては、ノーザンブロット法によっても発現量に差異を確認した。

本研究では、LAP におけるコレステロール吸収の亢進に関連する因子を明らかにすることを目的として、Differential Display 法により小腸で発現される mRNA の種類および量を系統間で比較した。DD 法においては、二つの cDNA バンドに系統間で差が認められ、うち一つにおいては、ノーザンブロット法によっても発現量に差異を確認した。

本研究では、LAP におけるコレステロール吸収の亢進に関連する因子を明らかにすることを目的として、Differential Display 法により小腸で発現される mRNA の種類および量を系統間で比較した。DD 法においては、二つの cDNA バンドに系統間で差が認められ、うち一つにおいては、ノーザンブロット法によっても発現量に差異を確認した。

## 第五章 総括

動脈内皮表面における脂肪沈着に端を発する粥状動脈硬化症病変には、コレステロールの代謝が大きく関わっており、これまでに多くの研究成果が報告されている。しかしながら、動脈硬化発症には多因子が関与しており、発症メカニズムには依然不明な点が多い。筆者等の研究グループは、小型で取り扱いが簡単かつ動脈硬化を誘導しやすいとの理由から、日本ウズラを動脈硬化モデル動物として利用してきた。日本ウズラについてはさらに食餌性コレステロールに応答して容易に動脈硬化症を惹起する動脈硬化易発性ウズラ(LAP)の系統が選抜交配により確立されてきている<sup>8)</sup>。このウズラは脂質輸送の傾向もヒトと類似しているようであり、動脈硬化発症に関わる因子と、その生体内での動態を知る上で有用な実験動物であるが、動脈硬化易発の成因に関する遺伝子レベルでの研究はない。

本研究では、LAPにおける動脈硬化易発性の原因遺伝子を明らかにすることを目的として、脂質輸送に関与するアポタンパク質に着目し、主要なアポタンパク質であるアポ A-I と C-III の cDNA の塩基配列および mRNA の発現量を LAP と CA 間で比較した。cDNA から推定される LAP のアポ A-I 及び C-III のアミノ酸配列に高コレステロール血症ひいては動脈硬化症を易発するような変異は認められなかった。しかしながら、LAP 小腸におけるアポ A-I mRNA の発現は CA よりも著しく高く、両系統間では小腸機能に何らかの差異があると判断された。そこで、脂質吸収に焦点を絞り、より厳密な実験条件下で正確なコレステロール吸収率を測定した。

上述のように、いずれのアポタンパク質についても生体に影響を及ぼす遺伝子変異は認められなかったが、LAP においてはア

ポ A-I 合成が亢進している可能性が初めて遺伝子レベルで指摘された。食餌性コレステロールの投与により LAP の肝臓でも mRNA の発現量が増大しており、これは吸収蓄積した体内のコレステロールを末梢組織から肝臓へ逆輸送あるいは VLDL として末梢組織へ再分配するため肝臓においてアポ A-I 合成が促進されていることを反映していると考えられた。また、小腸に関しては、コレステロールの投与に関係なく常に LAP でアポ A-I mRNA 発現量が増大していた。コレステロールの吸収実験からは、LAP におけるコレステロール、胆汁酸排泄量の低下が認められた。肝臓ではコレステロール 7 $\alpha$ -ヒドロキシラーゼ mRNA の発現量の増大と、コレステロールの投与による減少が認められた。これに加えて、コレステロール投与による体内コレステロール濃度の増加は、血液、肝臓ともに LAP ウズラのみで認められ、CA ウズラではコレステロール濃度に変化は認められなかった。LAP ウズラに特異的なこのような血清及び肝臓脂質濃度の上昇は LAP ウズラと CA ウズラの脂質吸収能の差が胃管を用いたコレステロール投与方法によってより増幅されたためとも考えられた。換言すれば、LAP ウズラと CA ウズラの脂質吸収能の差異は、本研究室で用いた胃管栄養法のような特殊な方法によってのみ顕現され、検出可能となるのかもしれない。

吸収亢進による体内コレステロール濃度の上昇は、コレステロール 7 $\alpha$ -ヒドロキシラーゼ mRNA の発現量を低下させた。LAP ウズラにおける胆汁酸排泄量は、CA ウズラよりも少ないことから、LAP ウズラは胆汁酸の吸収量も高いと考えられる。コレステロール 7 $\alpha$ -ヒドロキシラーゼの合成は胆汁酸濃度によりコントロールされていることが知られている。LAP ウズラでは普通食条件下に

においても糞中への胆汁酸の排泄量が少ないことから、肝臓への胆汁酸の回収量も多いと見積もられる。にもかかわらず、コレステロール7 $\alpha$ -ヒドロキシラーゼ mRNA の発現量は CA よりも有意に高く、常に高い胆汁酸合成レベルを維持していた。このことより、LAP ウズラにおいて胆汁酸の feed-back 調節が CA ウズラよりも鋭敏に機能しているとは考え難い。一方、コレステロール投与による feed-forward の活性調節も LAP においては作動していないと判断され、コレステロール異化の調節系に何らかの異常があることが示唆された。

これまでの研究で、LAP の高いコレステロール応答性は、小腸におけるコレステロール吸収の亢進に一部は起因することが明らかになった。次の研究では、実際にどのような因子が小腸のコレステロール吸収亢進に関与しているかを明らかにするために、Differential Display 法を用いて、小腸で発現している mRNA の種類および量を LAP, CA 間で比較した。現在までの実験では、数種類の mRNA の発現に系統間で差のあることが示されているが、今後、LAP と CA ウズラ小腸でそれぞれ特異的に発現している mRNA のカタログ作りを進め、コレステロール吸収亢進の原因遺伝子を特定したいと考えている。



## 第六章 要約

動脈硬化発症には種々の因子が関与するとされているが、発症メカニズムの遺伝的要因については不明な点が多い。そこで、今回の研究は、動脈硬化を発症しやすい動脈硬化易発性ウズラ (Hyperlipidemia atherosclerosis prone: LAP) の遺伝子変異を解明し、動脈硬化症の予防或いは改善に寄与する基礎的知見を提供することを目的とした。

動脈硬化症の発症と進展には血清脂質代謝が大きく影響することから、本研究では脂質代謝に関与する遺伝子の構造を LAP と正常日本ウズラ (Commercially available: CA) 間で比較し、LAP における動脈硬化易発のメカニズムを明らかにすることを試みた。

まず、末梢組織のコレステロールを肝臓へ逆輸送することで抗動脈硬化作用を示す高比重リポタンパク質 (HDL) の、主要構成アポタンパク質であるアポ A-I に着目した。LAP のアポ A-I cDNA 塩基配列上にコドン冗長性の変異は認められたものの、アミノ酸配列に差異は認められなかった。アポ A-I mRNA 発現量に関しては LAP の小腸、肝臓において顕著な発現の増大が認められた。

続いて、ウズラの主要な低分子量アポタンパク質 (LMWA) について同様の実験を行った。ウズラの主要 LMWA のアミノ酸配列は、哺乳類アポ C 群に対して低い相同性を示した。しかしながら、疎水性アミノ酸の配列パターンはヒトアポ C-III と類似しており、タンパク質の N 末端には両親媒性の  $\alpha$  ヘリックス構造が高度に保存されていた。これらの結果から、この LMWA は鳥類におけるアポ C-III 相当のアポタンパク質と考えられた。ウズラ LMWA の cDNA 塩基配列、mRNA 発現量を LAP、CA 間で比較したところ、

系統間で顕著な差異は認められず，LAP ウズラにおける動脈硬化易発性と本アポタンパク質との関連性はないと判断された。

過去の LAP に関する研究報告と今回のアポ A-I mRNA 発現量の結果は，LAP の小腸におけるコレステロールの吸収昂進を反映している可能性が考えられた。そこで，胃管栄養法を用いたコレステロール吸収実験を行い，LAP と CA ウズラにおける食餌コレステロールの吸収をより詳細に調査した。その結果，糞中へのコレステロール，脂肪及び胆汁酸の排泄量は LAP において有意に低くなるのが初めて明らかになり，LAP の脂質吸収能は CA よりも高いことが示唆された。これに伴い LAP においてのみ血液及び肝臓コレステロール濃度の上昇が認められた。また，コレステロールを投与しない場合は肝臓コレステロール 7 $\alpha$ -ヒドロキシラーゼ mRNA 発現量が LAP で有意に高くなっていた。以上の実験結果から，LAP の食餌コレステロールに対する高い応答性はコレステロール吸収昂進によって一部は説明されるものと考えられた。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり，終始御指導，御鞭撻を賜りました琉球大学農学部 of 知念功教授，屋宏典助教授，永田純一助手に深く感謝いたします。

また，本論文の審査にあたり，御指導，ご助言を賜りました佐賀大学農学部 of 柳田晃良教授，貴重なウズラの譲与に快くお答えくださった宮崎大学農学部 of 那須哲夫助教授，医学的な御指摘を下さった琉球大学医学部 of 戸田隆義助教授に厚く感謝いたします。

さらに，本実験の遂行にあたり共同研究者として多大なご協力を頂いた小田浩司氏，宮城剛氏に深く感謝するとともに，実験の遂行にあたり御協力いただいた大学院生 of 武井幸子女史，大学生 of 大城洋平氏に感謝いたします。

また，本実験をご支援下さった本講座 of 学生の皆様に深く感謝いたします。

最後に，ウズラの飼料を無料で御提供頂いた沖縄県飼料協同組合株式会社に深く感謝いたします。

## 参考文献

<sup>1</sup> Coronary atherosclerosis in the pig. Induced plaque injury and platelet response. Reddick RL; Read MS; Brinkhous KM; Bellinger D; Nichols T; Griggs TR *Arteriosclerosis*, (1990) Jul, 10:4, 541-50

<sup>2</sup> Inhibition of atherosclerosis in the rabbit by cyclandelate. Middleton A; Edwards E; White DA; Middleton B *Br J Clin Pract Suppl*, (1984) 34, 39-42

<sup>3</sup> Relationship of an abnormal plasma lipoprotein to protection from atherosclerosis in the cholesterol-fed diabetic rabbit. Brecher P; Chobanian AV; Small DM; Van Sickle W; Tercyak A; Lazzari A; Baler J *J Clin Invest*, (1983) Nov, 72:5, 1553-62

<sup>4</sup> Spontaneous aortic atherosclerosis in chicken. Gupta PP; Grewal GS *Indian J Med Res*, (1980) Mar, 71, 410-5

<sup>5</sup> Atherosclerosis in Japanese quail and the effect of lipoic acid. Shih JC *Fed Proc*, (1983) May, 42:8, 2494-7

<sup>6</sup> Genetic selection, general characterization, and histology of atherosclerosis-susceptible and -resistant Japanese quail. Shih JC; Pullman EP; Kao KJ *Atherosclerosis*, (1983) Oct, 49:1, 41-53

<sup>7</sup> The response of serum and hepatic lipids and the aortic wall to different levels of dietary cholesterol: a comparative study between hyperlipidemia-and- atherosclerosis-prone quail and commercially available quail. Inoue Y; Toda T; Igawa T; Tani T; Kimura *Tohoku J Exp Med*, (1995) Jan, 175:1, 1-13

<sup>8</sup> The localization of methallothionein in atheromatous aorta. Nakajima K; Adachi M; Igawa T; Yamamoto K *J Jpn Atheroscler*

Soc, (1989) 17, 254

<sup>9</sup> Ultrastructural and immunohistochemical study of experimental atherosclerosis in Japanese quails Yamamoto K; Igawa T Jikken Dobutsu, (1991) Apr, 40:2, 173-82

<sup>10</sup> Apo-lipoprotein profile in subjects with extracranial carotid atherosclerosis. Barbagallo CM; Averna MR; Novo S; Cavera G; Noto D; Liquori M; Spano L; Notarbartolo A Int Angiol, (1994) Sep, 13:3, 223-8

<sup>11</sup> The lipoprotein profile of young adults with cerebral atherosclerosis. Chen WH; Chang YY; Chou MS; Liu JS Southeast Asian J Trop Med Public Health, (1996) Mar, 27:1, 178-83

<sup>12</sup> Lipoprotein and apoprotein profile of Japanese quail. Oku H; Ishikawa M; Nagata J; Toda T; Chinen I Biochim Biophys Acta, (1993) Mar, 1167:1, 22-8

<sup>13</sup> Lipoprotein and apoprotein profiles of hyperlipidemic atherosclerosis-prone Japanese quail. Nagata J; Maeda G; Oku H; Toda T; Chinen I J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), (1997) Feb, 43:1, 47-57

<sup>14</sup> Effect of dietary cholesterol on the activities of key enzymes of cholesterol metabolism in hyperlipidemia- and atherosclerosis-prone Japanese quail. Nagata J; Oku H; Toda T; Chinen I J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), (1996) Aug, 42:4, 287-300

<sup>15</sup> The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Ross R Nature, (1993) Apr, 362:6423, 801-9

<sup>16</sup> High density lipoprotein plasma fractions inhibit aortic fatty

streaks in cholesterol-fed rabbits. Badimon JJ; Badimon L; Galvez A; Dische R; Fuster V *Lab Invest*, (1989) Mar, 60:3, 455-61

<sup>17</sup> Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. Badimon JJ; Badimon L; Fuster V *J Clin Invest*, (1990) Apr, 85:4, 1234-41

<sup>18</sup> Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. Rubin EM; Krauss RM; Spangler EA; Verstuyft JG; Clift SM *Nature*, (1991) Sep, 353:6341, 265-7

<sup>19</sup> Apolipoprotein A-1 of Japanese quail: cDNA sequence and modulation of tissue expression by cholesterol feeding. Oku H; Toda T; Nagata J; Ishikawa M; Neyazaki K; Shinjyo C; Chinen I *Biosci Biotechnol Biochem*, (1997) Feb, 61:2, 286-90

<sup>20</sup> *Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL -SECOND EDITION-* (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press

<sup>21</sup> *STATISTICAL METHODS(7 th ed.), TWO-WAY TABLES WITH UNEQUAL NUMBERS AND PROPORTIONS*, G. W. Snedecor, W.G. Cochran, in: ed. by The Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A., (1980) 414-433.

<sup>22</sup> Structure, evolution, and regulation of chicken apolipoprotein A-I. Rajavashisth TB; Dawson PA; Williams DL; Shackelford JE; Lebherz H; Lusis AJ *J Biol Chem*, (1987) May, 262:15, 7058-65

<sup>23</sup> Apolipoprotein CII from chicken (*Gallus domesticus*). The amino-terminal domain is different from corresponding domains in mammals. Andersson Y; Nilsson S; Lindberg A; Thelander L; Olivecrona G *J Biol Chem*, (1996) Dec, 271:51, 33060-6

<sup>24</sup> The mouse apolipoprotein C1 gene: structure and expression. Hoffer MJ; van Eck MM; Havekes LM; Hofker MH; Frants RR *Genomics*, (1993) Oct, 18:1, 37-42

<sup>25</sup> Nucleotide sequence of cDNA for rat apolipoprotein C-I. Shen PY; Howlett GJ *Nucleic Acids Res*, (1989) Aug, 17:15, 6405

<sup>26</sup> Structure and expression of dog apolipoprotein A-I, E, and C-I mRNAs: implications for the evolution and functional constraints of apolipoprotein structure. Luo CC; Li WH; Chan L *J Lipid Res*, (1989) Nov, 30:11, 1735-46

<sup>27</sup> Structure and expression of dog apolipoprotein C-II and C-III mRNAs. Implications for the evolution and functional constraints of apolipoprotein structure. Datta S; Li WH; Ghosh I; Luo CC; Chan L *J Biol Chem*, (1987) Aug, 262:22, 10588-93

<sup>28</sup> A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. LaRosa JC; Levy RI; Herbert P; Lux SE; Fredrickson DS *Biochem Biophys Res Commun*, (1970) Oct, 41:1, 57-62

<sup>29</sup> Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein C-II. Breckenridge WC; Little JA; Steiner G; Chow A; Poapst M *N Engl J Med*, (1978) Jun, 298:23, 1265-73

<sup>30</sup> Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III. Wang CS; McConathy WJ; Kloer HU; Alaupovic P *J Clin Invest*, (1985) Feb, 75:2, 384-90

<sup>31</sup> Further observations on the activation and inhibition of lipoprotein lipase by apolipoproteins. Krauss RM; Herbert PN;

Levy RI; Fredrickson DS *Circ Res*, (1973) Oct, 33:4, 403-11

<sup>32</sup> Inhibition of lipoprotein lipase activity by synthetic peptides of apolipoprotein C-III. McConathy WJ; Gesquiere JC; Bass H; Tartar A; Fruchart JC; Wang CS *J Lipid Res*, (1992) Jul, 33:7, 995-1003

<sup>33</sup> Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of human very low density lipoprotein. Brown WV; Baginsky ML *Biochem Biophys Res Commun*, (1972) Jan, 46:2, 375-82

<sup>34</sup> Effect of serum and C-apoproteins from very low density lipoproteins on human postheparin plasma hepatic lipase. Kinnunen PK; Ehnolm C *FEBS Lett*, (1976) Jun, 65:3, 354-7

<sup>35</sup> Effect of apoproteins on hepatic uptake of triglyceride emulsions in the rat. Shelburne F; Hanks J; Meyers W; Quarfordt S *J Clin Invest*, (1980) Mar, 65:3, 652-8

<sup>36</sup> Inhibitory effects of C apolipoproteins from rats and humans on the uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants by the perfused rat liver. Windler E; Havel RJ *J Lipid Res*, (1985) May, 26:5, 556-65

<sup>37</sup> *Mebio* 15:4, 6-14

<sup>38</sup> Familial apolipoprotein A-I, C-III, and A-IV deficiency and premature atherosclerosis due to deletion of a gene complex on chromosome 11. Ordovas JM; Cassidy DK; Civeira F; Bisgaier CL; Schaefer EJ *J Biol Chem*, (1989) Oct, 264:28, 16339-42



<sup>39</sup> Apolipoprotein CII from chicken (*Gallus domesticus*). The amino-terminal domain is different from corresponding domains in mammals. Andersson Y; Nilsson S; Lindberg A; Thelander L; Olivecrona G *J Biol Chem*, (1996) Dec, 271:51, 33060-6

<sup>40</sup> pH-dependent hydrophobicity profile of hemagglutinin of influenza virus and its possible relevance in virus fusion. Korte T; Ludwig K; Herrmann A *Biosci Rep*, (1992) Oct, 12:5, 397-406

<sup>41</sup> Comparative studies on the effect of growth conditions on adhesion, hydrophobicity, and extracellular protein profile of *Streptococcus sanguis* G9B. Knox KW; Hardy LN; Markevics LJ; Evans JD; Wicken AJ *Infect Immun*, (1985) Nov, 50:2, 545-54

<sup>42</sup> Site-saturation mutagenesis of the PALTAVETG motif in coxsackievirus A9 capsid protein VP1 reveals evidence of conservation of a periodic hydrophobicity profile. Airaksinen A; Roivainen M; Stanway G; Hovi T *J Gen Virol*, (1999) Aug, 80 ( Pt 8):, 1919-27

<sup>43</sup> Contribution of alpha helix formation in human plasma apolipoproteins to their enthalpy of association with phospholipids. Massey JB; Gotto AM Jr; Pownall HJ *J Biol Chem*, (1979) Oct, 254:19, 9559-61

<sup>44</sup> Design of a new class of amphipathic helical peptides for the plasma apolipoproteins that promote cellular cholesterol efflux but do not activate LCAT. Labeur C; Lins L; Vanloo B; Baert J; Brasseur R; Rosseneu M *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, (1997) Mar, 17:3, 580-8

<sup>45</sup> The influence of apolipoprotein structure on the efflux of cellular free cholesterol to high density lipoprotein. Davidson WS; Lund Katz S; Johnson WJ; Anantharamaiah GM; Palgunachari MN; Segrest JP; Rothblat GH; Phillips MC J Biol Chem, (1994) Sep, 269:37, 22975-82

<sup>46</sup> Sequences and expression of the porcine apolipoprotein A-I and C-III mRNAs. Trieu VN; Hasler Rapacz J; Rapacz J; Black DD Gene, (1993) Jan, 123:2, 173-9

<sup>47</sup> Linkage, evolution, and expression of the rat apolipoprotein A-I, C-III, and A-IV genes. Haddad IA; Ordovas JM; Fitzpatrick T; Karathanasis SK J Biol Chem, (1986) Oct, 261:28, 13268-77

<sup>48</sup> Enzymatic determination of total serum cholesterol. Allain CC; Poon LS; Chan CS; Richmond W; Fu PC Clin Chem, (1974) Apr, 20:4, 470-5

<sup>49</sup> Effects of acute administration of taurocholic and taurochenodeoxycholic acid on biliary lipid excretion in the rat. Eaton DL; Klaassen CD Proc Soc Exp Biol Med, (1976) Jan, 151:1, 198-202

<sup>50</sup> 消化吸收試験, 正宗 研, 日本臨床, (1979), 37, 2314-2315

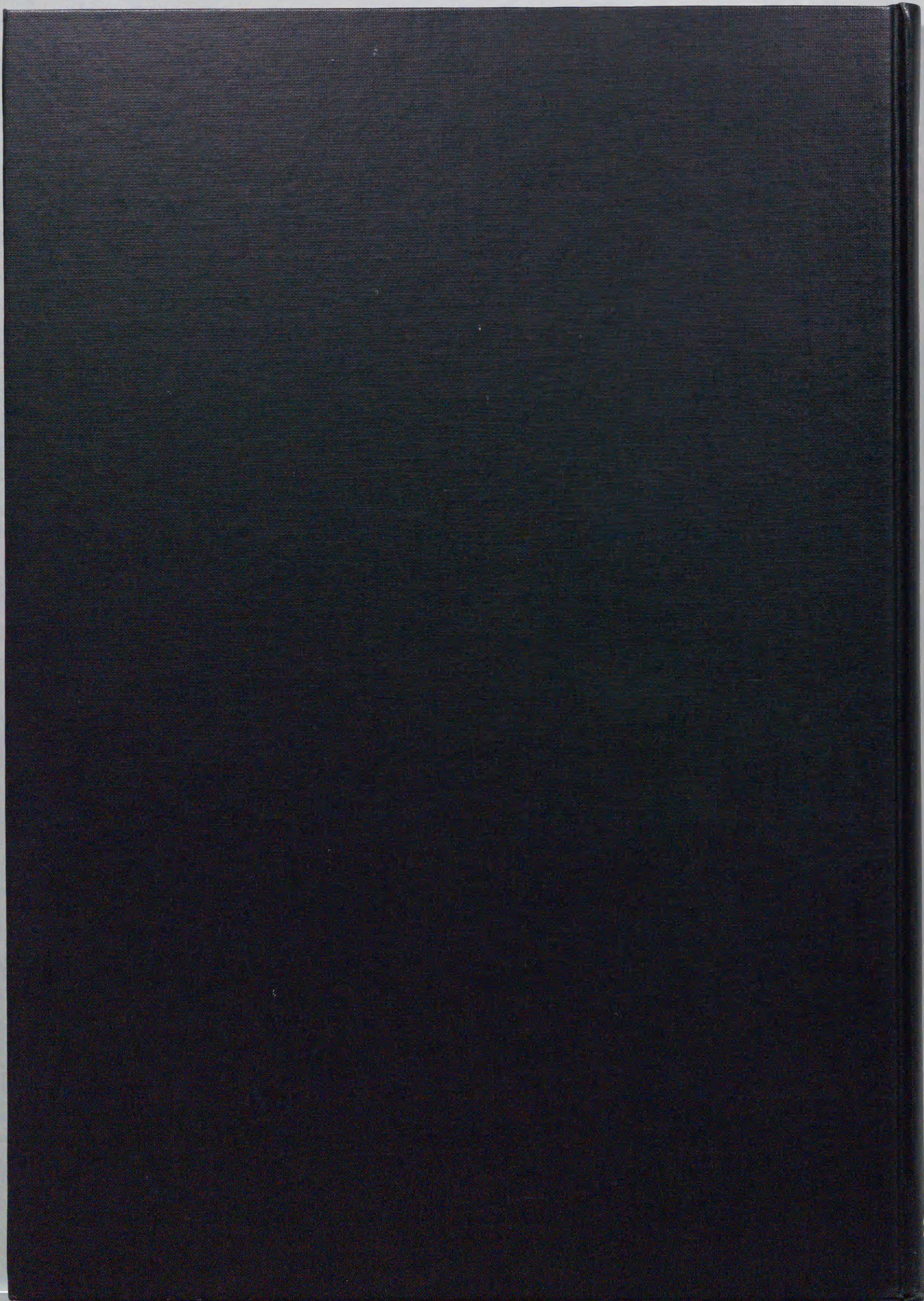
<sup>51</sup> Neutral steroid concentrations in the faeces of North American White and South African Black populations at different risks for cancer of the colon. Salyers AA; Sperry JF; Wilkins TD; Walker AR; Richardson NJ S Afr Med J, (1977) Jun, 51:23, 823-7

<sup>52</sup> Standardization of triglyceride methodology. Fletcher MJ Ann Clin Lab Sci, (1972) Sep, 2:5, 389-92

<sup>53</sup> Species variations in phospholipid class distribution of organs.

I. Kidney, liver and spleen. Rouser G; Simon G; Kritchevsky G

Lipids, (1969) Nov, 4:6, 599-606



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

