



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

プロタミン由来ペプチドRPR (Arg-Pro-Arg) 及びプロタミンの脂質代謝改善作用

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2023-06-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Maihemuti, Mijiti メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/00101286

プロタミン由来ペプチド RPR (Arg-Pro-Arg)
及びプロタミンの脂質代謝改善作用

2022 年

岐阜大学大学院連合農学研究科

生物資源科学

(岐阜大学)

Maihemuti Mijiti

プロタミン由来ペプチド RPR (Arg-Pro-Arg)
及びプロタミンの脂質代謝改善作用

Maihemuti Mijiti

目 次

緒 論	1
第 1 章 プロタミンの PeptideCutter によるインシリコ消化影響	4
第 2 章 プロタミン由来トリペプチド Arg-Pro-Arg (RPR) の 50 日間投与が高脂肪食を摂取したマウスの脂質代謝に与える影響	6
第 3 章 オレイン酸による脂質負荷をした HepG2 細胞への RPR 添加に対する脂質代謝に及ぼす影響	
第 1 節 HepG2 細胞における RPR 添加による細胞増殖に対する影響	16
第 2 節 オレイン酸負荷をした HepG2 細胞への RPR 添加に対する細胞内・培地中トリグリセリドレベルへの影響	18
第 3 節 オレイン酸負荷をした HepG2 細胞への RPR 添加に対する脂質代謝関連遺伝子 mRNA レベルへの影響	21
第 4 節 オレイン酸負荷をした HepG2 細胞への RPR 添加に対する脂質代謝関連遺伝子タンパク質レベルへの影響	25
第 5 節 オレイン酸負荷をした HepG2 細胞への RPR および R+P+R 添加に対する細胞内トリグリセリドレベルへの影響	27
第 6 節 HepG2 細胞における RP および PR 添加による細胞増殖に対する影響	29
第 7 節 オレイン酸負荷をした HepG2 細胞への RP および PR 添加に対する細胞内トリグリセリドレベルへの影響	31
第 4 章 オレイン酸負荷をした HepG2 細胞における PepT1 siRNA を用いた PepT1 ノックダウンが RPR の作用に及ぼす影響	

第1節	PepT1 の mRNA レベルに対する PepT1 siRNA の影響	34
第2節	オレイン酸負荷をした HepG2 細胞における PepT1 ノックダウン条件下での RPR の細胞内トリグリセリドレベルへの影響	36
第3節	オレイン酸負荷をした HepG2 細胞における PepT1 ノックダウン条件下での RPR の脂質代謝関連遺伝子 mRNA レベルへの影響	38
第5章	総合討論	41
第6章	基本的実験操作法	47
参考文献		91
謝 辞		96

緒論

WHO の統計によると、2019 年の世界における死因の第一位は虚血性心疾患で 16%、第二位が脳卒中で 11%であり、これらの 2 つの疾患が約 27%を占めている。これらの心疾患や脳卒中は主に動脈硬化が原因となっておこる病気であるため、動脈硬化の予防・改善のための研究は、私達の健康増進のために非常に重要であると考えられる。動脈硬化の危険因子として、高血圧、糖尿病、肥満、運動不足、喫煙、ストレス、家族歴などが知られており、多くの危険因子は生活習慣病を改善することで、そのリスクを低下させることが可能である¹⁾。その中でも肥満は、「BMI (Body Mass Index) が 25 以上のもののなかで、肥満に起因ないしは関連する健康障害（脂質代謝異常、2 型糖尿病、高血圧を含む 10 項目）を合併するか、その合併が予測され、医学的に減量を必要とする病態、ならびに BMI25 以上のもののなかで上半身肥満が疑われ、臍部 CT 検査によって確定診断された内臓脂肪型肥満となっているもの」と定義され、糖尿病や高血圧、脂質異常症などの疾患を合併症として引き起こしやすく、動脈硬化による様々な疾病の要因となっている²⁾。

細胞レベルにおける肥満とは、脂肪細胞に中性脂肪（トリグリセリド）が過剰に蓄積し、脂肪細胞が肥大化した状態であり、肥満を始めとする生活習慣病患者の急増は、近年の食生活の欧米化に伴う脂肪摂取量の増加が要因の一つであると言われている。食事の中の脂質の大部分を占めており、長鎖脂肪酸により構成されるトリグリセリドはそのままの形では吸収されず、胃の中の蠕動によってエマルジョンとなり、その後、リパーゼによる消化が行われる。胃内で消化されなかった脂質は十二指腸にて膵リパーゼによって消化され、2-モノグリセリドと脂肪酸に分解される。腸管に到達した、脂肪酸やモノグリセリド、コレステロールなどが胆汁酸と結合し、ミセルを形成して、小腸上皮細胞の非攪拌水層を経て吸収される。吸収された長鎖脂肪酸は再びトリグリセリドへと再合成される。その後、カイロミクロンによってリンパ管より胸管を経て全身へ輸送されるため、過剰な脂質摂取は肥満の重大な要因の一つとなっている。よって、食生活の変化に応じた、肥満を予防するための機能性成分の探索が非常に盛んに行われており、商品化も進められている。

また、肥満とともに、お酒を飲んでいないにも関わらず、内臓肥満とインスリン抵抗性を主な原因とし、メタボリックシンドロームを高確率で発症する非アルコール性脂肪性肝疾患（non-alcoholic fatty liver disease : NAFLD）が急増している³⁾。NAFLD は一般に非進行性の非アルコール性脂肪肝（non-alcoholic fatty liver : NAFL）と肝硬変や肝臓がんに進行しうる非アルコール性脂肪肝炎（non-alcoholic steatohepatitis : NASH）が存在する。また、NASH/NAFLD は先進国を中心に増加傾向にある⁴⁾。日本人間ドック学会の集計によると、成人における肝障害は全体の 30%であり、特に男性においては 30～70 歳代まで 40%程度、女性では若者で 15%程度、閉経後に約

30%程度となっており、さらに、NAFLD を成人男性で約 30%、女性で約 20%が合併しており、NASH は男女とも 2~5%の有病率と予測されている⁵⁾。同様に、8,000 名以上の健診受診者を対象とする大規模疫学調査の結果、約 30%が NAFLD を罹患しており、この結果は、近年のメタ解析でのアジアにおける有病率とほぼ同じであるとされている⁶⁾。

NAFLD は最も一般的な慢性肝疾患であり、肝臓内の過剰なトリグリセリドの蓄積を特徴としている。肝臓内のトリグリセリドは食事性のものと内因性のもののいずれかに由来している。食事性のトリグリセリドは主に膵臓リパーゼ⁷⁾によって加水分解されたあと、腸管内腔で胆汁酸によって乳化され、モノアシルグリセロールと遊離脂肪酸が得られる。乳化後、これらの脂質は腸細胞に取り込まれ、トリグリセリドに再合成される。トリグリセリドはカイロミクロンに包まれ、リンパ系に分泌され、最終的に血中に到達する^{8,9)}。トリグリセリドはカイロミクロンに包まれ筋肉や脂肪組織に運ばれ、カイロミクロンに残存しているトリグリセリドは肝臓へと取り込まれる¹⁰⁾。また、糖質が豊富に存在する場合、肝臓はグルコースから脂肪酸を生成する *de novo* 合成を行う¹¹⁾。肝臓の脂質代謝は関連する複数のシグナル伝達経路によって厳密に制御されているものの、過栄養やインスリン抵抗性の状態では、脂肪酸の取り込みや *de novo* 合成による脂質の獲得と、ミトコンドリアでの脂肪酸β酸化や VLDL 粒子成分としての分泌の間の不均衡が生じ、結果として肝臓に過剰な脂質が蓄積され、脂肪肝が進行する¹²⁾。しかしながら、NASH/NAFLD に対する特異的な治療薬は発見されておらず、運動や食事等の習慣の改善が重要である。他にも、高確率で併発するメタボリックシンドロームや 2 型糖尿病に合わせた治療薬が勧められるが、それらの副作用について指摘されている。よって肥満とともに肝臓に脂質が蓄積した脂肪肝の予防・改善をするような安全性の高い成分の探索も同様に求められている。

脂質代謝改善作用を有する有用成分の探索は非常に活発に行われているが、安全であることや有用性が特に重要視されている。そこで私達は食経験が豊富なサケ由来のプロタミンに着目した。プロタミンとは魚介類の精巢に含まれている分子量 4~5 kDa の塩基性タンパク質であり、DNA の保護に寄与している¹³⁾。プロタミンのアミノ酸組成の約 70%はアルギニンで構成されている¹⁴⁾。また、強い抗菌作用を有していることが報告されているプロタミンは食品添加物として広く用いられている¹⁵⁾。プロタミンは *in vitro* 試験で膵リパーゼ活性の阻害作用をもつことが明らかになっている¹⁶⁾。ラットを用いた *in vivo* 試験では経口脂質負荷試験において脂肪の吸収を抑制することが報告されている¹⁷⁾。さらに、プロタミンを長期間投与されたラットにおいて、血漿中のトリグリセリド濃度が有意に低下し^{16,18)}、糞便中のトリグリセリド濃度が有意に上昇することが報告されている¹⁹⁾。プロタミンの主な構成成分であるアルギニンに関しても抗肥満作用を有することが発見されている²⁰⁻²²⁾。上記の報告からも、プロタミンが脂質代謝改善作用を有する有力な成分であることが示されている。しかしながら、プロタミン由来ペプチドの脂質代謝に関する研究の報告は見受けられない。

そこで、私達は魚介類のプロタミンの中でもシロサケ (*Oncorhynchus keta*) 由来のプロタミンに注目した。シロサケ由来のプロタミンは 33 残基のアミノ酸配列 (MPRRRRSSSRPVRRRRRPRVSRRRRRRRGRRRR) を持つ²³⁾。

これらの研究背景から、本研究では、プロタミンが誘導する抗肥満作用とコレステロール低下作用の両方に関連するプロタミン由来の活性ペプチドの同定を目指した。私たちの研究に基づいて、プロタミン由来の RPR は、プロタミンによって誘発される抗肥満作用とコレステロール低下作用の両方に関連する活性ペプチドであると仮定した。RPR の脂質代謝に与える影響をマウスを用いて評価し、さらに RPR の小腸や肝臓における詳細な作用を細胞を用いて評価することとした。まず、第一章ではプロタミンの PeptideCutter による *in silico* 消化の影響、第 2 章では、プロタミン由来ペプチド RPR をマウスに 50 日間混餌投与し、脂質代謝に及ぼす影響を評価した。第 3 章では、オレイン酸による脂質負荷をした肝臓モデル細胞株 HepG2 細胞に RPR を添加したときの脂質代謝に与える影響を評価した。また、第 4 章では、オレイン酸負荷をした HepG2 細胞における PepT1 siRNA を用いた PepT1 ノックダウンが RPR の作用に及ぼす影響を評価した。

第1章 プロタミンのPeptideCutterによる*in silico*消化影響

1. 目的

私達は魚介類のプロタミンの中でもシロサケ (*Oncorhynchus keta*) 由来のプロタミンに注目した。プロタミンの抗肥満作用やコレステロール低下作用の活性ペプチドや分子機構は未だ解明されていない。さらに、プロタミン加水分解物およびプロタミン由来ペプチド、特にそれらの生理活性ペプチドは、研究者からほとんど注目されていない。そこで、第1章では、プロタミンが誘導する抗肥満作用とコレステロール低下作用の両方に関連するプロタミン由来の活性ペプチドの同定を目指した。

2. 方法

シロサケ由来のプロタミンは、PeptideCutterを用いて*in silico*分析を使用して消化された(https://web.expasy.org/peptide_cutter/、2019年3月1日にアクセス)。プロタミンは33個のアミノ酸(MPRRRRSSSRPVRRRRRRRRPRVSRRRRRRRRRRRRR)で構成されており、アルギニンは構成アミノ酸の約70%を占めている²³⁾。

3. 結果

プロタミンについてPeptideCutterを用いて加水分解シミュレーションを行ったところ、ペプシンでは消化されず、トリプシンで加水分解され、MPR、RRR、SSSRPV、RRRRPR、VSR、RRRRR、GGR、RRRというアミノ酸配列が得られ、さらにRRRRPRはトリプシンによってN末端からアルギニンが一つずつ加水分解され²⁴⁾、最終的にトリペプチドRPRが分解されずに腸内に残る可能性が示唆された。

Simulation of protamine tryptic hydrolysis by PeptideCutter
(protamine is not hydrolyzed by pepsin)

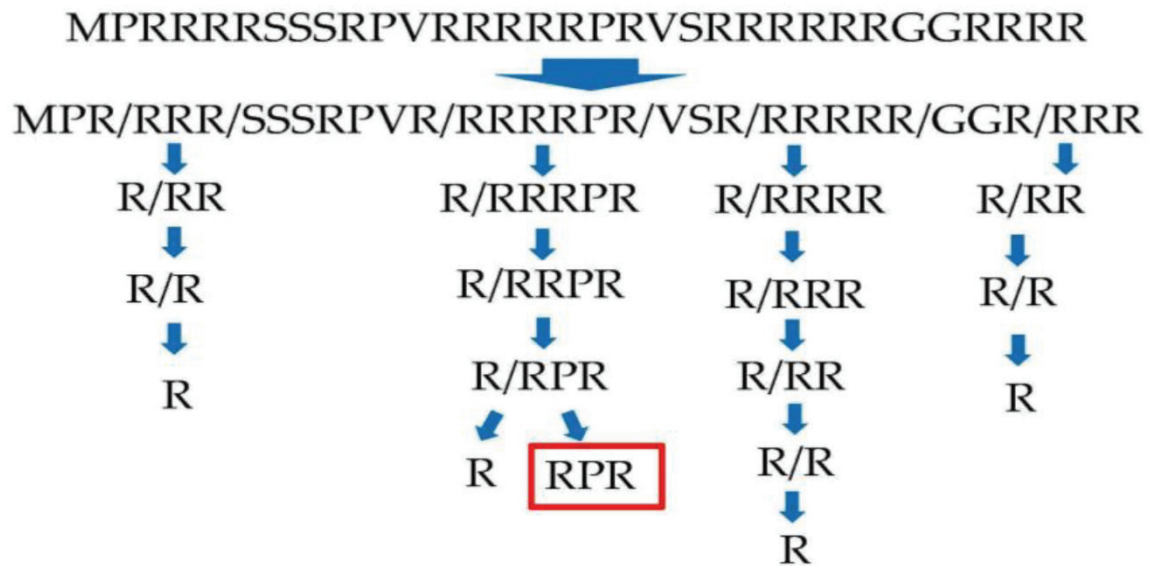


Figure 1. Simulation of protamine tryptic hydrolysis by PeptideCutter
(https://web.expasy.org/peptide_cutter/, accessed on 1 March 2019) *in silico*.

4. 考察

RPRはトリプシンおよびペプシンによって加水分解されることができないため、我々はこのRPRが分解されずに小腸等に働きかけることで脂質代謝改善作用を発揮するのではないかと予測した。

第2章 プロタミン由来トリペプチドArg-Pro-Arg (RPR) の50日間投与が高脂肪食を 摂取したマウスの脂質代謝に与える影響

1. 目的

第1章では、プロタミンがトリプシンで加水分解され、MPR、RRR、SSSSRPVR、RRRRPR、VSR、RRRRR、GGR、RRRという配列が得られ、さらにRRRRPRはトリプシンによってN末端からアルギニンが一つずつ加水分解され²⁴⁾、最終的にトリペプチドRPRの形にまで分解されることを発見した。我々はこのRPRが分解されずに小腸等に働きかけることで脂質代謝改善作用を発揮するのではないかと予測した。また、私達の研究室では、5%プロタミンを含む高脂肪食をマウスに混餌投与したときに抗肥満作用を発揮することを明らかにしている²⁵⁾。もし、RPRがプロタミンの作用の主要な役割を有しているとすれば、プロタミンの分子量のおよそ1/10の分子量であるRPRを1/10の濃度で投与しても同程度の効果を発揮するのではないかと予想した。そこで、食餌添加レベルをプロタミンは5%、RPRは0.5%とした。

第2章では、まず、RPRが実際に生体内で脂質代謝改善作用を有するのかを明らかにするために、マウスへの50日間RPR混餌投与試験を行い、脂質代謝への影響を評価した。

2. 方法

初体重20～25 g前後（6週齢）のC57BL/6J雄マウス（日本エスエルシー株式会社）に、市販の固形飼料（MF；オリエンタル酵母工業株式会社）を3日間与え、体重に有意差がないように8匹ずつ3群に分けた。実験群として、以下のように分けた。

〈混餌投与群〉

- ① 高脂肪食群：control群
- ② 高脂肪食+0.5% RPR群：RPR群
- ③ 高脂肪食+5% protamine群：protamine群

〈飼育方法〉

25%カゼインを食餌性タンパク質源とする30%ラードを含む高脂肪食に、0.5% RPR（ペプチド研究所、AH-187）もしくは5% protamine（Sigma、P4380）を混餌することでマウスに自由摂取させ、50日間飼育した。食餌組成はTable 1に示した。食餌摂取量の測定は0日目から50日目にかけて毎日行った。解剖前の絶食は10時から8時までの22時間を行い、飼育50日目にマウスをイソフルラン麻酔下にて心臓採血により屠殺して、血液を採取し、肝臓、脂肪組織（精巣上体、腎周囲、腸管膜、皮下）を摘出した。

血清は血液を遠心分離 (3,000 rpm、15 min) することにより得て、-20°Cで凍結保存した。血清脂質の分析は基本的実験操作法の「3. 血清脂質の定量」に準じて行った。

肝臓は0.9% NaCl溶液で洗浄後、湿重量を測定し、-20°Cで凍結保存した。また、肝臓の一部は基本的実験操作法「6. 動物からのRNAの回収」に準じてtotal RNAを抽出、精製し、RT反応を行ったあと、real-time PCRを用いて、Fatty acid synthase (*FAS*)、Stearoyl-CoA desaturase 1 (*SCD1*)、Acyl-CoA oxidase (*ACOX1*)、AMP-activated protein kinase (*AMPK*)、Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (*PPARα*)、Carnitine palmitoyltransferase 1 (*CPT1*)、Sterol regulatory element-binding protein 1 (*SREBP1*)、ATP-binding cassette protein A1 (*ABCA1*)、Cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1 (*CYP7A1*)、3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (*HMGCR*)、low density lipoprotein receptor (*LDLR*)、Sterol regulatory element-binding protein 2 (*SREBP2*) のmRNAレベルを測定した。

肝臓分析は「4. 肝臓脂質の抽出・精製および定量」に準じて行った。

糞は46～50日目を回収し、糞分析は、「5. 糞中脂質の抽出・精製および定量」に準じて行った。

精巢上体脂肪組織、腸管膜脂肪組織、腎周囲脂肪組織、皮下脂肪組織は0.9% NaCl溶液で洗浄後、湿重量を測定した。さらに精巢上体脂肪組織の一部を基本的実験操作法「6. 動物からのRNA回収」に準じてtotal RNAを抽出、精製し、RT反応を行ったあと、real-time PCRを用いて、*FAS*、*SCD1*、*ACOX*、*AMPK*、*PPARα*、Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1 (*PPARγ1*)、Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 (*PPARγ2*)、*CPT1*、*SREBP1*、*adiponectin*、Hormone-sensitive lipase (*HSL*) のmRNAレベルを測定した。

詳細は以下の基本的実験操作法に示した。

1. 実験動物と飼料
2. 食餌摂取量測定方法
3. 血清脂質の定量
4. 肝臓脂質の抽出・精製および定量
5. 糞中脂質の抽出・精製および定量
6. 動物からのRNA回収

実験結果の統計学的分析には、Dunnett's testを用いた。

3. 結果

体重増加量はcontrol群と比較して、protamine群において有意に低下した (Fig.2)。食餌摂取量、肝臓重量は群間で有意差は見られなかった (Fig.2)。脂肪組織重量においては、RPR群とprotamine群がcontrol群と比較して、腎周囲および皮下脂肪組織重量が有意に低下し、RPR群においては精巣上体脂肪組織重量も有意に低下し、総脂肪組織重量はRPRとprotamine群がcontrol群と比較して有意に低下した (Fig.3)。血清総コレステロールはRPR群とprotamine群がcontrol群と比較して有意に低下し、non-HDL-cholesterolはprotamine群において有意に低下し、Atherogenic indexはprotamine群で有意に低下した (Fig.4)。HDL-cholesterolはRPR群とprotamine群の両群で有意に低下し、血清トリグリセリドレベルは群間で有意差は見られなかった (Fig.4)。肝臓脂質分析の結果、総脂質、トリグリセリド、コレステロール、リン脂質レベルにおいて有意差は見られなかった (Fig.4)。糞中脂質分析の結果、糞重量、糞中総脂質、トリグリセリド、遊離脂肪酸、リン脂質レベルに群間で有意差は見られなかったが、コレステロールおよび胆汁酸レベルがRPR群とprotamine群において有意に増加した (Fig.5)。肝臓においては、SCD1、SREBP1 mRNAレベルはcontrol群と比較してprotamine群で有意に減少し、LDLR mRNAレベルはcontrol群と比較してRPR群とプロタミン群で有意に増加した (Fig. 6)。また、脂肪組織においては、FAS mRNAレベルがprotamine群において有意に低下し、PPAR γ mRNAレベルが有意に増加した (Fig.7)。

Table 1. Composition of diet			
	control	RPR	protamine
Casein	25.00%	25.00%	20.00%
protamine hydrochloride	0.00%	0.60%	5.00%
Corn Starch	17.40%	20.80%	17.80%
Sucrose	8.70%	10.40%	8.90%
Cellulose	6.50%	6.50%	6.50%
Soybean oil	4.00%	4.00%	4.00%
Lard	30.00%	30.00%	30.00%
Mineral *1	3.50%	3.50%	3.50%
Vitamin *2	1.00%	1.00%	1.00%
Choline chloride	0.40%	0.40%	0.40%
SUM (g)	100.00%	100.00%	100.00%
Casein			
	Protein		87.50%
	Lactose		0.00%
	Mineral		1.80%
	Fat		1.00%
	Water		9.70%
Casein was generously supplied from Meiji milk Co.,Ltd.			
*1			
AIN-93G mineral mixture.The diets contain following(mg/kg diet):			
Ca:5000, P:1561, K:3600, S:300, Na:1019, Cl:1571, Mg:507, Fe:35, Zn:30, Mn:10, Cu:6, I:0.2, Mo:0.15, Se:0.15, Si:5, Cr:1.0, F:1.0, Ni:0.5, B:0.5, Li:0.1, V:0.1.			
*2			
AIN-93 vitamin mixture.The diets contain following(mg/kg diet):			
vitamin A(all-trans-retinyl palmitate):4000IU, vitamin D3(cholecalciferol):1000IU, vitamin E(all-rac- α -tocopheryl acetate):751IU, vitamin K1(phyloquinone):0.75, thiamine-HCl:6.36, rivo flavine:6.0, pyridoxin-HCl:7.29, nicotinic acid:30, Ca-pantohtnate:16.31, folic acid:2.0, vitamin B12(cyanocobalamin):0.025, biotin:0.2.			

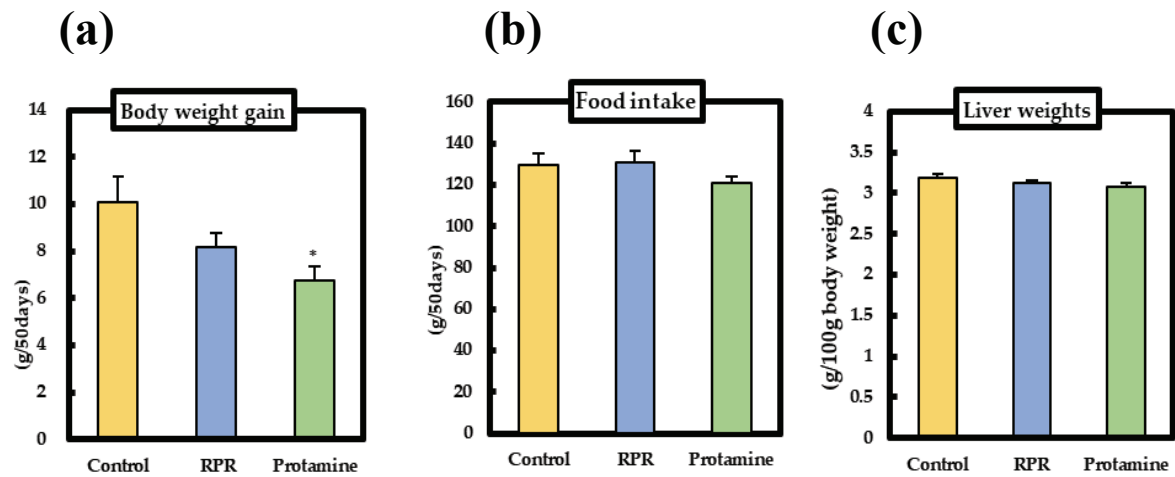


Fig.2 Effects on RPR or protamine on body weight gain, food intake, liver weights of 6-week-old male C57BL/6J mice.

1. Means $\pm$ SEM of 8 mice per group.

2. Statistical significance compared with control by Dunnett's test.

(* : $p < 0.05$).

Condition of experiment
2019.6.7~2019.8.1

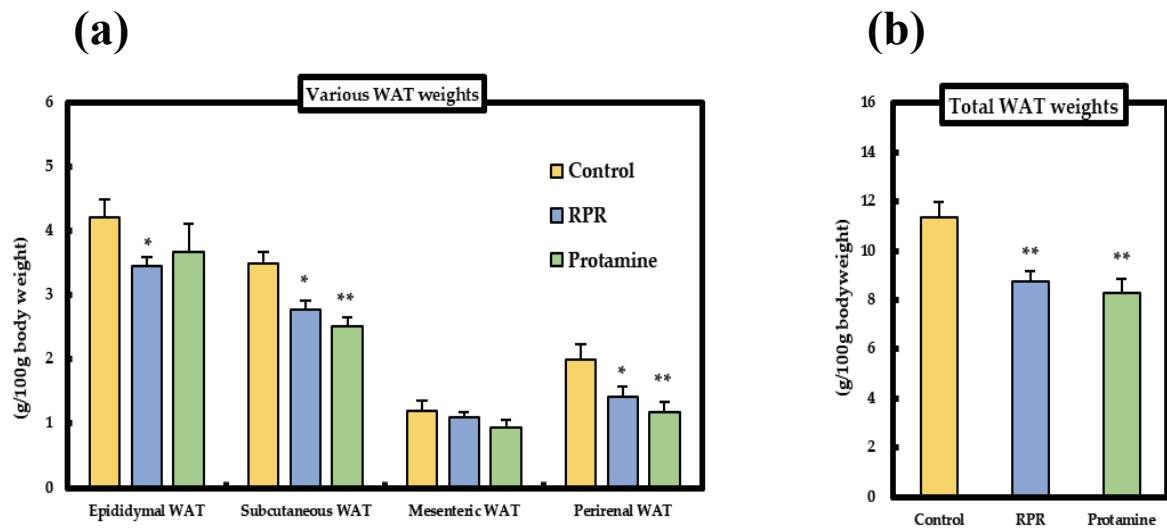


Fig.3 Effects on RPR or protamine on various WAT weights of 6-week-old male C57BL/6J mice.

1. Means $\pm$ SEM of 8 mice per group.

2. Statistical significance compared with control by Dunnett's test.

(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$).

Condition of experiment
2019.6.7~2019.8.1

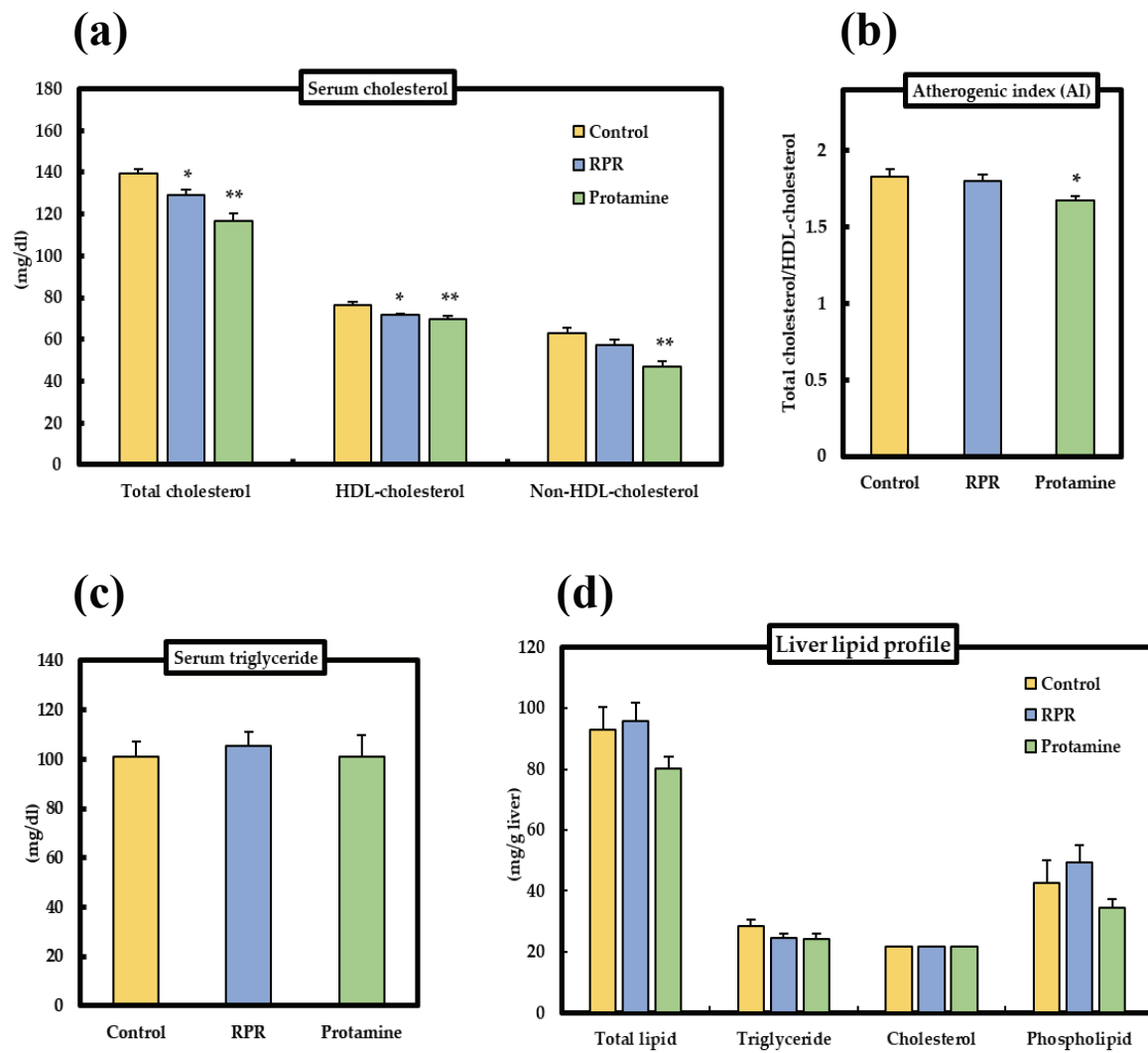


Fig.4 Effects on RPR or protamine on serum cholesterol, AI, serum triglyceride, liver lipid profile of 6-week-old male C57BL/6J mice.

1. Means $\pm$ SEM of 8 mice per group.

2. Statistical significance compared with control by Dunnett's test.

(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$).

Condition of experiment
2019.6.7~2019.8.1

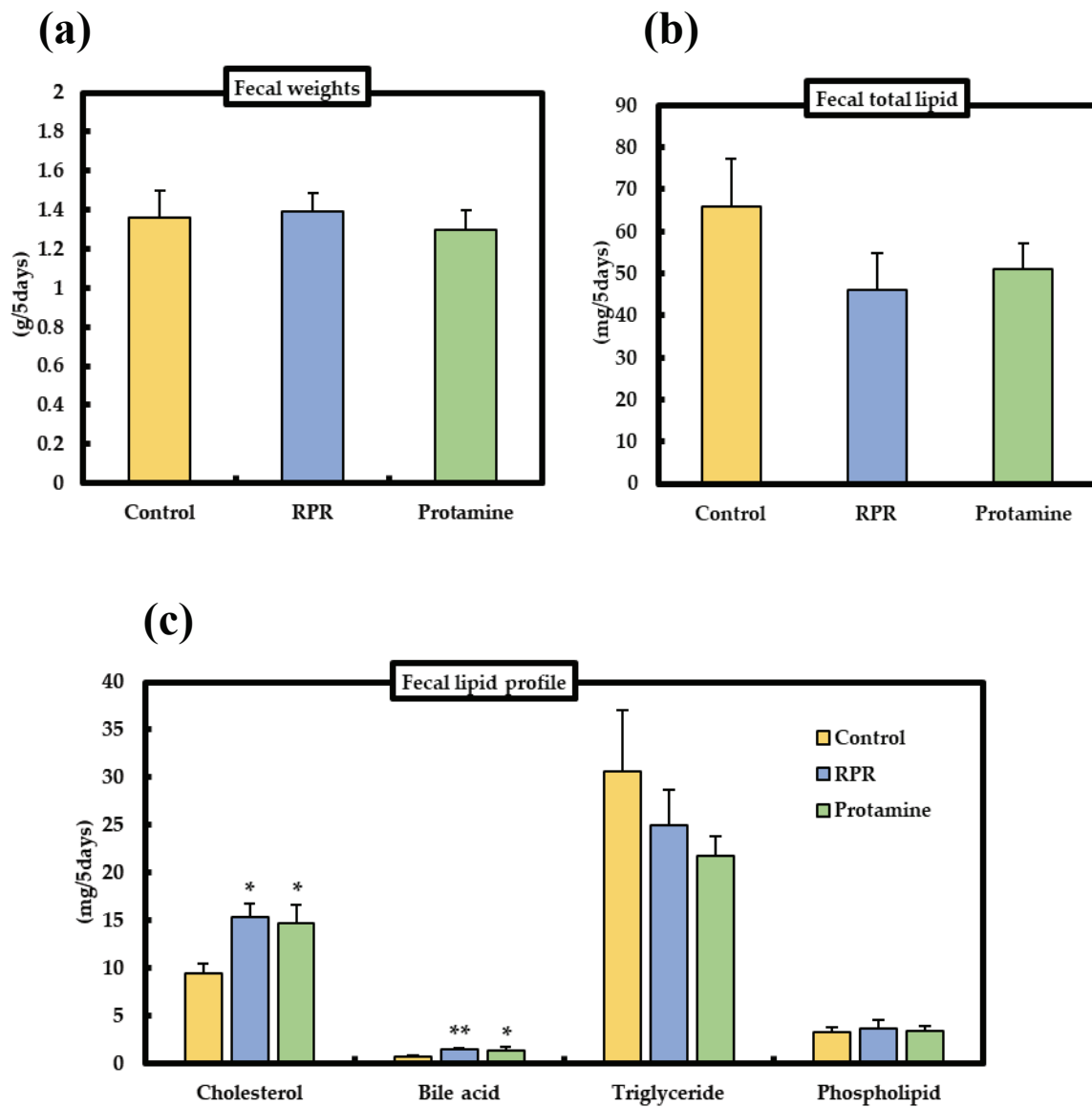


Fig.5 Effects on RPR or protamine on fecal weights, fecal total lipid, fecal lipid profile of 6-week-old male C57BL/6J mice.

1. Means $\pm$ SEM of 8 mice per group.

2. Statistical significance compared with control by Dunnett's test.

(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$).

**Condition of experiment
2019.6.7~2019.8.1**

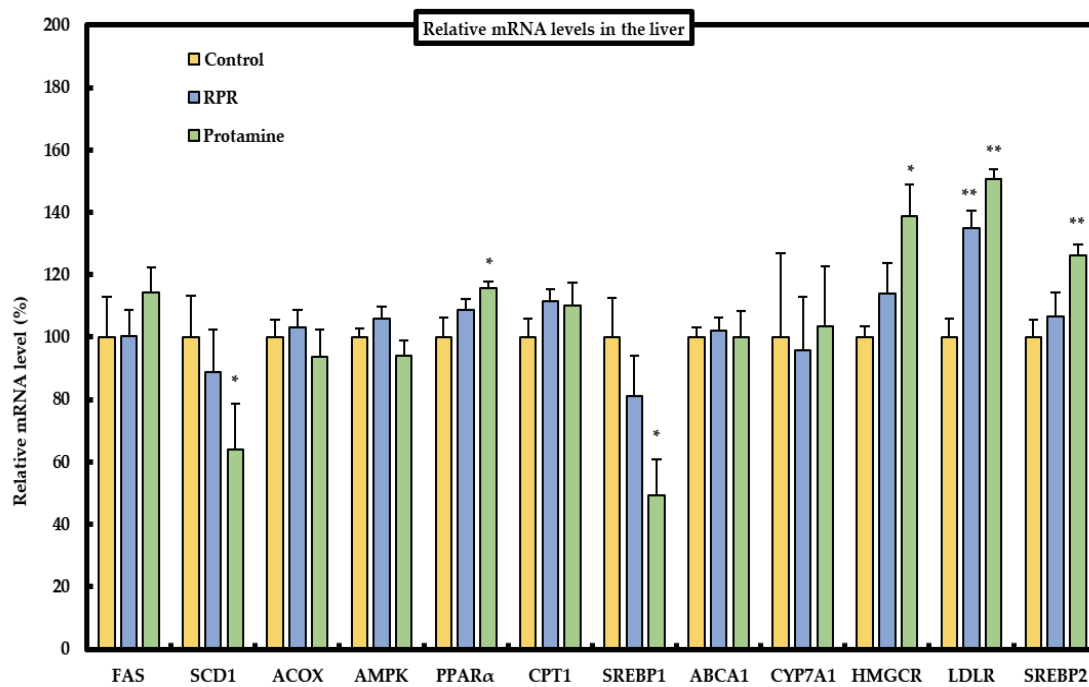


Fig.6 Effects on RPR or protamine on relative mRNA levels in the liver of 6-week-old male C57BL/6J mice.

1. Means $\pm$ SEM of 8 mice per group.

2. Statistical significance compared with control by Dunnett's test.

(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$).

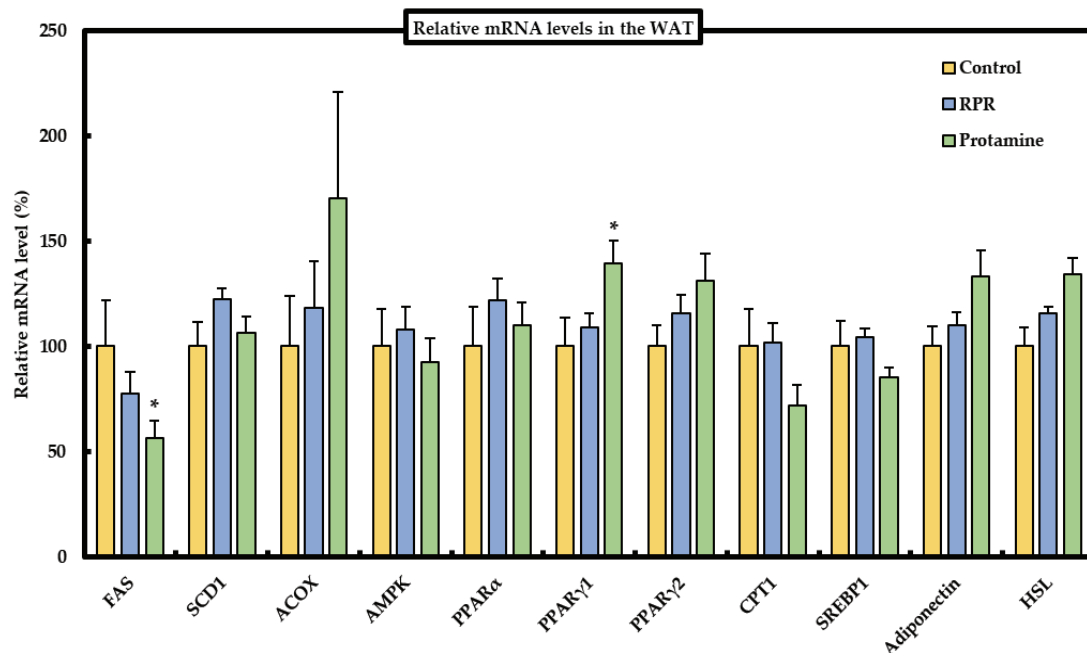


Fig.7 Effects on RPR or protamine on relative mRNA levels in the WAT of 6-week-old male C57BL/6J mice.

1. Means $\pm$ SEM of 8 mice per group.

2. Statistical significance compared with control by Dunnett's test. (* : $p < 0.05$).

4. 考察

RPR や protamine のコレステロール代謝改善作用は、糞便中のステロイド排泄量の増加によるものであることが示唆された³⁰⁾。LDLR の増加は肝細胞における LDL-コレステロールの取り込みを増加し、血漿 LDL-コレステロールを減少させる³¹⁾。RPR や protamine の血清コレステロール低下作用が、LDLR の活性化によって誘導されることを示唆している。プロタミンによるマウスの体重増加の減少は、SCD1-KO マウスにおける SCD1 欠損の影響と同様に、肝臓、筋肉、褐色脂肪組織における脂肪酸酸化および熱産生の亢進によるエネルギー消費および酸素消費の増加に起因していると考えられる³⁶⁾。この仮説の検証のために、今後は RPR やプロタミンを与えたマウスの褐色脂肪組織の測定や基礎代謝を調査していく必要がある。脂肪組織の FAS を特異的に欠損させると、WAT の褐色様脂肪細胞が増加して、エネルギー消費が増加し、食餌誘発性肥満が改善することが示されている³⁷⁾。PPAR γ アゴニストは、肥満によって誘発されるインスリン抵抗性を制御するために適用されてきた⁴⁰⁾。さらに、PPAR α は絶食状態で生理学的刺激として機能し、脂肪組織から肝臓に輸送された遊離脂肪酸がリガンドとして作用し、PPAR α を活性化するという仮説が立てられている⁴¹⁾。したがって、対照群と比較してプロタミン群で観察された肝 PPAR α mRNA レベルの有意な増加 (Fig. 6) は、WAT における脂質蓄積の減少に関連している

可能性がある (Fig. 3b)。プロタミン由来の RPR は、脂肪組織の体重減少の有効投与量を評価することにより、プロタミンの抗肥満作用において重要な役割を果たす。しかし、食餌性 RPR の脂質低下作用のメカニズムは、脂質代謝の遺伝子発現への影響が異なるため、プロタミンの脂質低下作用メカニズムとはわずかに異なる可能性がある。よって、本研究では、プロタミンの抗肥満効果は、肝臓 PPAR α mRNA と脂肪組織 PPAR γ 1 mRNA の増加、及び肝臓 SREBP1 mRNA を介した SCD1 mRNA と脂肪組織 FAS mRNA の低下に関連していると考えられる。RPR (0.5%) はプロタミン (5%) のわずか 1/10 の投与量で総脂肪組織重量は同程度有意に減少し、プロタミンの抗肥満作用において重要な役割を果たした。これらの研究から抗肥満作用及び血清コレステロール低下作用を発揮する新規トリペプチド RPR (Arg-Pro-Arg) を世界で最初に発見しました。

第3章 オレイン酸による脂質負荷をした HepG2 細胞への RPR 添加に対する 脂質代謝に及ぼす影響

第1節 HepG2 細胞における RPR 添加による細胞増殖に対する影響

1. 目的

第2章において、RPR が抗肥満作用を有する世界初のトリペプチドであることを発見した。そのときに、肝臓のトリグリセリドレベルには有意差はみられなかったものの、その遺伝子発現レベルの変化を調査したとこと、脂肪酸合成に関与する *SCD-1* やその転写因子である *SREBP1* の mRNA レベルに低下がみられ、また、脂肪酸 β 酸化に関連する *PPAR α* mRNA レベルに上昇がみられた。よって、RPR が肝臓における脂質の蓄積を抑制し、脂肪肝を改善する効果を有するのではないかと予想した。そこで、私達は HepG2 細胞にオレイン酸を添加することで脂肪肝モデルを作成している報告²⁶⁾をもとに、脂肪肝に対する RPR の影響を評価しようと考えた。

そこで、第3章ではオレイン酸による脂質負荷をした HepG2 細胞に対して RPR を添加したときの肝臓の脂質蓄積に対する影響を評価することを目的とした。第一節では、HepG2 細胞において、RPR 添加による細胞増殖に対する影響を WST-1 法により評価した。

2. 方法

1 日目、HepG2 細胞を 10 % FBS (Biosera、Lot No. 12868) 含有 MEM を用いて 96 well プレートに 2×10^4 cells/well の濃度 (100 μ l) で播き、CO₂ インキュベーター (37 °C、5 % CO₂) 内で 24 時間インキュベートした。2 日目、10 % FBS 含有 MEM を吸引除去し、血清フリー MEM 100 μ l で洗浄後、サンプル培地を n = 12 で 100 μ l / well となるように培地交換し、CO₂ インキュベーター (37 °C、5 % CO₂) 内で 24 時間インキュベートした。3 日目、サンプル培地を吸引除去し、血清フリー MEM 100 μ l に培地交換した後、WST-1 試薬 10 μ l を加え、CO₂ インキュベーター (37 °C、5 % CO₂) 内で 1 時間インキュベートする。マイクロプレートリーダーで 450 nm (参照波長 : 630 nm) における吸光度を測定した。

【サンプル】 RPR 酢酸塩 (ペプチド研究所、AH-187、純度 98.7%)

詳細は以下の基本的実験操作法に示した。

13. HepG2 細胞の継代、培養方法
14. HepG2 細胞へのサンプルの添加
15. HepG2 細胞における WST-1 法による細胞増殖に対する影響評価

実験結果の統計分析には、Tukey's test を用いた。

3. 結果

Control 群 (0 mM) と比較して、0.25~2 mM RPR の濃度では細胞増殖に有意な変化はみられなかった。

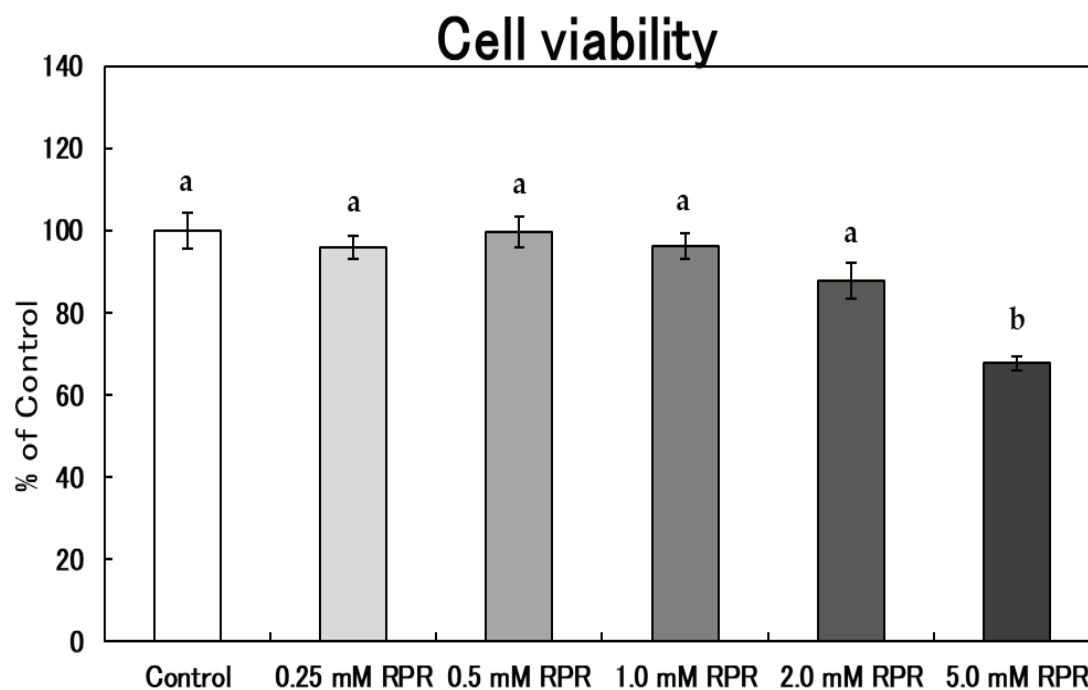


Fig. 8. The cytotoxicity of RPR on HepG2 cells.

1. Means $\pm$ SEM of 12 well per group

2. Different lowercase letters indicate the significantly different values ($p < 0.05$) determined via Tukey's test.

WST-1 法 : 2021 年 6 月 23 日実施

第2節 オレイン酸負荷をした HepG2 細胞への RPR 添加に対する 細胞内・培地中トリグリセリド・FFA レベルへの影響

1. 目的

第3章、第1節の実験結果より、HepG2 細胞において、2 mM RPR までの濃度では細胞増殖に影響を及ぼさなかった。そこで、第2節以降では RPR を 2 mM の濃度で HepG2 細胞に添加することとした。さらに、HepG2 細胞にオレイン酸を 2 mM の濃度で添加しても毒性がみられないことが報告されている²⁶⁾。

第2節では 24 時間オレイン酸負荷をした HepG2 細胞において、2 mM RPR 添加による細胞内トリグリセリドレベルへの影響を評価することを目的とする。

2. 方法

1 日目、10% FBS (Biosera、Lot No. 12868) 含有 DMEM (日水製薬 Code 05919) を用いて 11×10^5 cells/well となるように 6-well plate (FALCON、353046) に HepG2 細胞を播種し、培養 (37°C、5% CO₂) した。24 時間後に、培地を 0 もしくは 2 mM オレイン酸 (Sigma-Aldrich、O-1383) を含む 10% FBS 含有 DMEM 培地に培地交換を行い、さらに 24 時間培養 (37°C、5% CO₂) した。その後、すべての細胞を血清フリー DMEM 培地で 1 回洗浄し、サンプル添加培地 (Control 群、2 mM RPR 添加群、2 mM オレイン酸添加群、2 mM オレイン酸 + 2 mM RPR 添加群) をそれぞれ 2 mM オレイン酸 + 1% BSA (wako、017-15141) 含有 DMEM 培地を用いて添加し、24 時間培養した。培養後、各 well から培地を 1 mL 回収し、培地中のトリグリセリドレベルの測定を株式会社免疫生物研究所 (LipoSEARCH) に依頼した。また、細胞を回収し、市販のキット (トリグリセリド E-テストワコー ; 和光純薬工業(株) 432-40201) を用いて細胞内トリグリセリドレベルを測定した。

【サンプル】 RPR 酢酸塩 (ペプチド研究所、AH-187、純度 98.7%)

詳細は以下の基本的実験操作法に示した。

- 13. HepG2 細胞の継代、培養方法
- 14. HepG2 細胞へのサンプルの添加
- 17. HepG2 細胞からのトリグリセリド回収

実験結果の統計分析は Tukey's test を用いた。

3. 結果

オレイン酸を添加した群は Control 群と比較して細胞内トリグリセリドが有意に増加し、脂質蓄積が生じた (Fig. 9a,b)。さらに、オレイン酸+RPR 添加群においては、細胞内トリグリセリドがオレイン酸のみを添加した群と比較して、有意に減少し、RPR が肝臓における脂質蓄積抑制効果を有することが示唆された (Fig. 9a,b)。さらに、培地中のトリグリセリド濃度の結果、オレイン酸負荷をした HepG2 細胞においては、RPR 添加によって、培地中トリグリセリド濃度が有意に減少した (Fig. 10 a)。培地中の FFA 濃度は、群間で有意差はみられなかった (Fig. 10 b)。

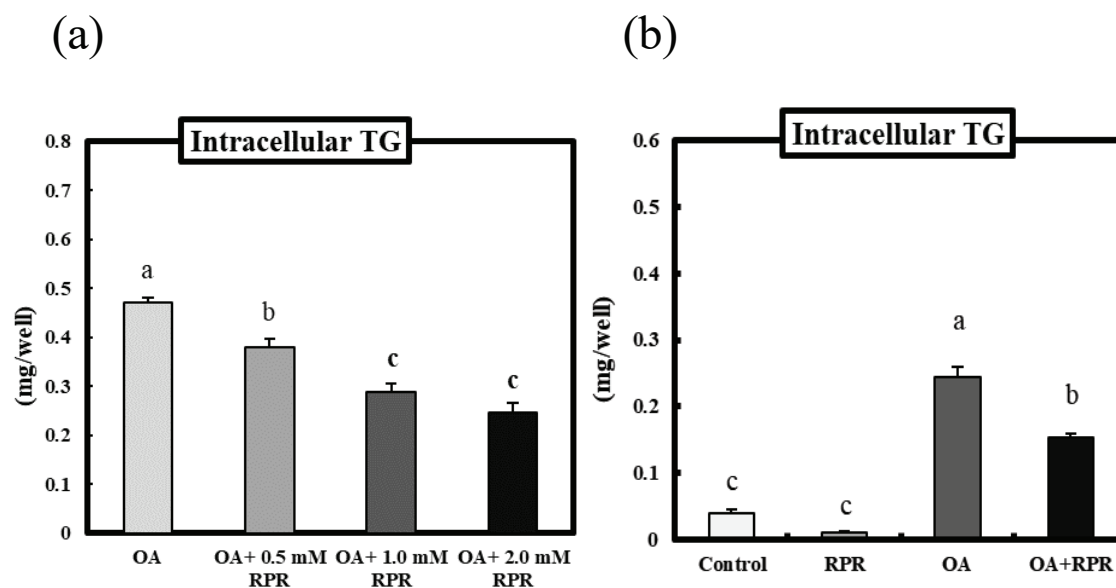


Fig. 9. Effects of 2 mM RPR on cellular triglyceride levels in HepG2 cells.

1. Means $\pm$ SEM of 3 well per group.

2. Different lowercase letters indicate the significantly different values ($p < 0.05$) determined via Tukey's test.

細胞内トリグリセリド回収 : 2021 年 5 月 13 日

細胞内トリグリセリド測定 : 2021 年 5 月 14 日

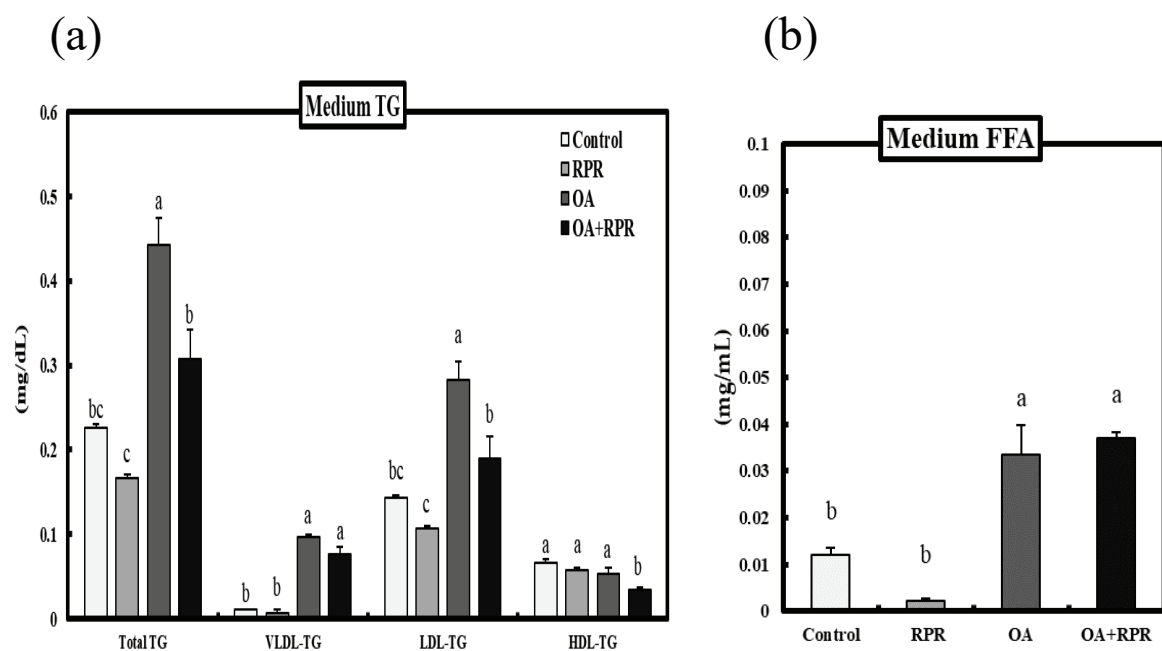


Fig. 10. Effects of 2 mM RPR on medium triglyceride levels in HepG2 cells.

1. Means $\pm$ SEM of 3 well per group.

2. Different lowercase letters indicate the significantly different values ($p < 0.05$) determined via Tukey's test.

細胞内トリグリセリド回収 : 2021 年 5 月 13 日

第3節 オレイン酸負荷をした HepG2 細胞への RPR 添加に対する

脂質代謝関連遺伝子 mRNA レベルへの影響評価試験

1. 目的

第3章第2節の結果から、オレイン酸負荷をした HepG2 細胞に RPR を添加すると細胞内トリグリセリドレベルが有意に低下し、RPR が脂質蓄積抑制作用を有することを明らかにした。しかしながら、その作用機構については不明である。

そこで第3章第3節では、オレイン酸負荷をした HepG2 細胞に 2 mM RPR を添加したときの脂肪酸代謝関連遺伝子 mRNA レベルに与える影響を Real-time 定量 PCR 法により評価した。

2. 方法

1 日目、10 % FBS (Biosera、Lot No. 12868) 含有 DMEM (日水製薬 Code 05919) を用いて 11×10^5 cells/well となるように 6-well plate (FALCON、353046) に HepG2 細胞を播種し、培養 (37°C、5% CO₂) した。24 時間後に、培地を 0 もしくは 2 mM オレイン酸 (Sigma-Aldrich、O-1383) を含む 10%FBS 含有 DMEM 培地に培地交換を行い、さらに 24 時間培養 (37°C、5% CO₂) した。その後、すべての細胞を血清フリー DMEM 培地で 1 回洗浄し、サンプル添加培地 (Control 群、2 mM RPR 添加群、2 mM オレイン酸添加群、2 mM オレイン酸+2 mM RPR 添加群) をそれぞれ 2 mM オレイン酸+1%BSA (wako、017-15141) 含有 DMEM 培地を用いて添加し、24 時間培養した。培養後、すべての細胞から total RNA を回収し、real-time 定量 PCR によって、HepG2 細胞中の、acyl-CoA dehydrogenase medium chain (*ACADM*)、acyl-CoA dehydrogenase very long chain (*ACADVL*)、acyl-coenzyme A oxidase (*ACOX*)、acyl-CoA synthetase long-chain (*ACSL*)、adipose triglyceride lipase (*ATGL*)、comparative gene identification-58 (*CGI-58*)、carnitine palmitoyl transferase I (*CPTI*)、and peroxisome proliferator-activated receptor α (*PPAR α*)、solute carrier family 25 member 20 (*SLC25A20*)、acetyl-CoA carboxylase alpha (*ACACA*)、acetyl-CoA carboxylase beta (*ACACB*)、ATP citrate lyase (*ACLY*)、apolipoprotein B (*APOB*)、cluster of differentiation 36 (*CD36*)、diacylglycerol O-acyltransferase 1 (*DGATI*)、diacylglycerol O-acyltransferase 2 (*DGAT2*)、elongation of very long chain fatty acids protein 6 (*EVOLV6*)、fatty acid binding protein 1 (*FABPI*)、fatty acid synthase (*FASN*)、G0/G1 Switch 2 (*GOS2*)、microsomal triglyceride transfer protein (*MTTP*)、stearoyl-CoA desaturase-1 (*SCD1*)、sterol regulatory element-binding transcription factor 1 (*SREBF1*) and β -actin の mRNA レベルを測定した。

β -actin mRNA レベルはデータ補正として用いた。

【サンプル】RPR 酢酸塩 (ペプチド研究所、AH-187、純度 98.7%)

詳細は以下の基本的実験操作法に示した。

13. HepG2 細胞の継代、培養方法
14. HepG2 細胞へのサンプルの添加
16. HepG2 細胞からの Total RNA の単離
11. RT 反応
12. Syber Green を用いたリアルタイム PCR ($\Delta\Delta C_t$ 法)

実験結果の統計分析には、Tukey's test を用いた。

3. 結果

ATGL mRNA レベルは、コントロールまたは OA 群と比較して、OA+RPR 処理群の HepG2 細胞で有意にアップレギュレートされた。 CGI-58 mRNA レベルは、OA 群よりも OA+RPR 添加群で増加する傾向 ($P=0.056$) を示した。 SCD1 の mRNA レベルは対照群よりも RPR 群で有意に低く、OA+RPR は OA 群よりも減少する傾向 ($P=0.051$) を示した。 ACACB ($P=0.072$) または SREBF1 ($P=0.078$) の mRNA レベルは、それぞれ OA 群と比較して OA+RPR 群で減少する傾向を示した。(Fig. 11, 12, 13)。

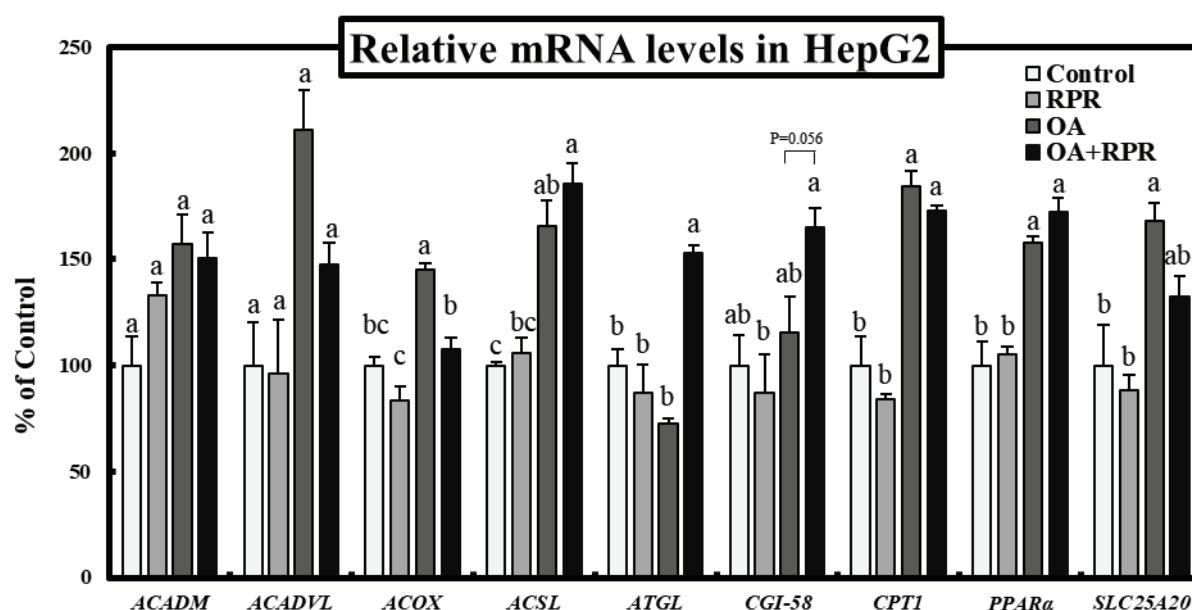


Fig. 11. Effects of 2 mM RPR on relative mRNA levels in HepG2 cells.

1. Means $\pm$ SEM of 3 well per group.
2. Different lowercase letters indicate the significantly different values ($p < 0.05$) determined via Tukey's test.

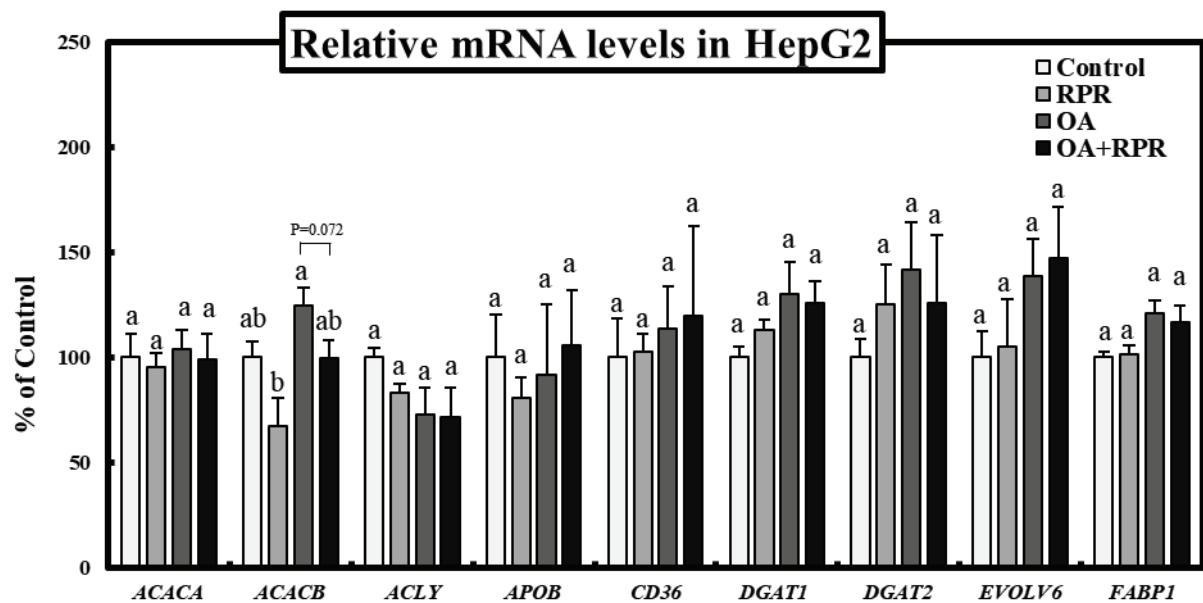


Fig. 12. Effects of 2 mM RPR on relative mRNA levels in HepG2 cells.

1. Means $\pm$ SEM of 3 well per group.

2. Different lowercase letters indicate the significantly different values ($p < 0.05$) determined via Tukey's test.

total RNA 回収 : 2021 年 2 月 18 日

Real-time PCR : 2021 年 2 月 22、24 日

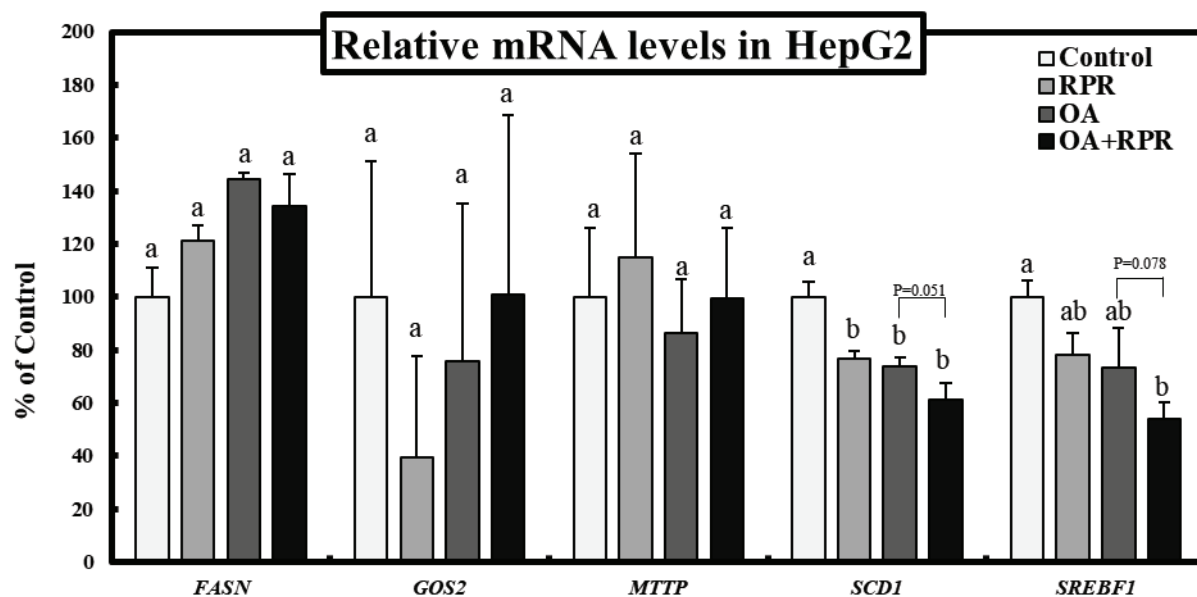


Fig. 13. Effects of 2 mM RPR on relative mRNA levels in HepG2 cells.

1. Means $\pm$ SEM of 3 well per group.

2. Different lowercase letters indicate the significantly different values ($p < 0.05$) determined via Tukey's test.

total RNA 回収 : 2021 年 2 月 18 日

Real-time PCR : 2021 年 2 月 22、24 日

第4節 オレイン酸負荷をした HepG2 細胞への RPR 添加に対する 脂質代謝関連遺伝子タンパク質レベルへの影響評価試験

1. 目的

第3章第2節の結果から、オレイン酸負荷をした HepG2 細胞に RPR を添加すると細胞内トリグリセリドレベルが有意に低下し、RPR が脂質蓄積抑制作用を有することを明らかにした。しかしながら、その作用機構については不明である。

そこで第3章第4節では、オレイン酸負荷をした HepG2 細胞に 2 mM RPR を添加したときの脂肪酸代謝関連遺伝子タンパク質レベルに与える影響をウエスタンブロット法により評価した。

2. 方法

1 日目、10% FBS (Biosera、Lot No. 12868) 含有 DMEM (日水製薬 Code 05919) を用いて 11×10^5 cells/well となるように 6-well plate (FALCON、353046) に HepG2 細胞を播種し、培養 (37°C、5% CO₂) した。24 時間後に、培地を 0 もしくは 2 mM オレイン酸 (Sigma-Aldrich、O-1383) を含む 10%FBS 含有 DMEM 培地に培地交換を行い、さらに 24 時間培養 (37°C、5% CO₂) した。その後、すべての細胞を血清フリー DMEM 培地で 1 回洗浄し、サンプル添加培地 (Control 群、2 mM RPR 添加群、2 mM オレイン酸添加群、2 mM オレイン酸 + 2 mM RPR 添加群) をそれぞれ 2 mM オレイン酸 + 1% BSA (wako、017-15141) 含有 DMEM 培地を用いて添加し、24 時間培養した。培養後、すべての細胞からタンパク質を回収し、ウエスタンブロットによって、HepG2 細胞中の、SCD1、SREBP1、ATGL、 β -actin のタンパク質レベルを測定した。
 β -actin タンパク質レベルはデータ補正として用いた。

【サンプル】RPR 酢酸塩 (ペプチド研究所、AH-187、純度 98.7%)

詳細は以下の基本的実験操作法に示した。

- 13. HepG2 細胞の継代、培養方法
- 14. HepG2 細胞へのサンプルの添加
- 16. HepG2 細胞からのタンパク質回収
- 11. Lowry 法によるタンパク質濃度測定
- 12. ウエスタンブロットによるタンパク質レベル測定

実験結果の統計分析には、Tukey's test を用いた。

3. 結果

2 mM RPR を添加した群は、無添加群と比較して SCD1 および、SREBP1 タンパク質レベルが有意に低下した (Fig. 14, 15)。ATGL のタンパク質レベルは有意差が見られなかった。

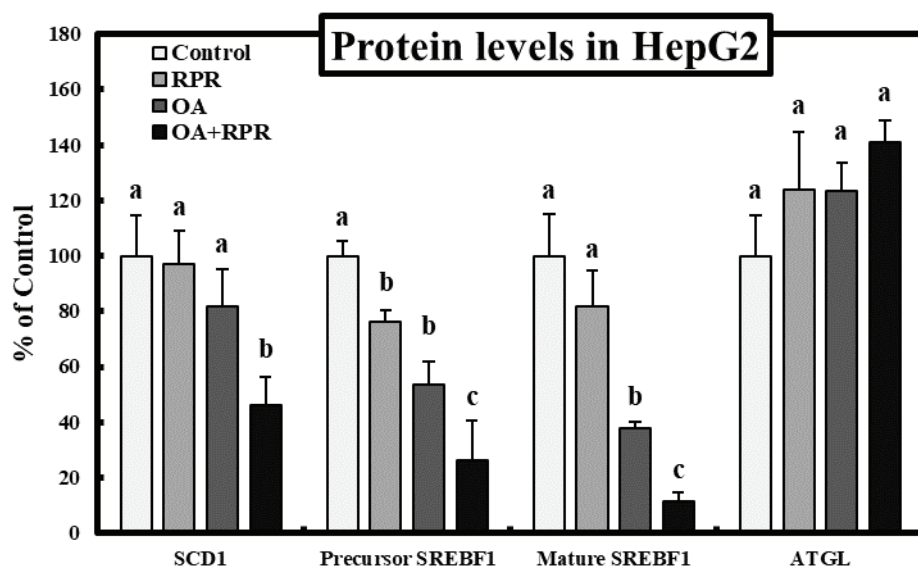
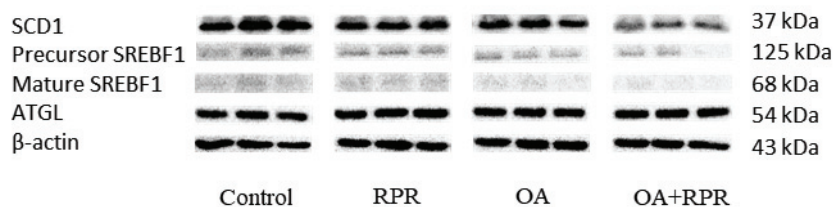


Fig. 14、15. Effects of 2 mM RPR on relative protein levels in HepG2 cells.

1. Means $\pm$ SEM of 3 well per group.

2. Different lowercase letters indicate the significantly different values ($p < 0.05$) determined via Tukey's test.

タンパク質回収 : 2021 年 5 月 18 日

Western blot : 2022 年 10 月 7、9 日

第5節 オレイン酸負荷をした HepG2 細胞への RPR および R+P+R 添加に対する細胞内トリグリセリドレベルへの影響

1. 目的

これまでの結果より、RPR はオレイン酸負荷をした HepG2 細胞において、脂肪酸代謝遺伝子 mRNA レベルの変化を引き起こすことで脂質蓄積抑制作用を有することが明らかになった。

そこで、第3章第5節では、RPR の構成アミノ酸であるアルギニン (R)、プロリン (P) のアミノ酸混合物を HepG2 細胞に添加したときの影響を評価した。

2. 方法

1 日目、10% FBS (Biosera、LotNo. 12868) 含有 DMEM (日水製薬 Code 05919) を用いて 11×10^5 cells/well となるように 6-well plate (FALCON、353046) に HepG2 細胞を播種し、培養 (37°C、5% CO₂) した。24 時間後に、培地を 0 もしくは 2 mM オレイン酸 (Sigma-Aldrich、O-1383) を含む 10% FBS 含有 DMEM 培地に培地交換を行い、さらに 24 時間培養 (37°C、5% CO₂) した。その後、すべての細胞を血清フリー DMEM 培地で 1 回洗浄し、サンプル添加培地 (Control 群、2 mM オレイン酸添加群、2 mM オレイン酸+2 mM RPR 添加群、2 mM オレイン酸+2 mM R+P+R 添加群) をそれぞれ 2 mM オレイン酸+1% BSA (wako、017-15141) 含有 DMEM 培地を用いて添加し、24 時間培養した。培養後、各 well から細胞を回収し、市販のキット (トリグリセリド E-テストワコー; 和光純薬工業(株) 432-40201) を用いて細胞内トリグリセリドレベルを測定した。

【サンプル】 RPR 酢酸塩 (ペプチド研究所、AH-187、純度 98.7%)

L(+)-Arginine (wako、015-04613)

L-Proline (ペプチド研究所、2718)

詳細は以下の基本的実験操作法に示した。

13. HepG2 細胞の継代、培養方法

14. HepG2 細胞へのサンプルの添加

17. HepG2 細胞からのトリグリセリド回収

実験結果の統計分析は Tukey's test を用いた。

3. 結果

オレイン酸による脂質蓄積に対して、RPR は今までの結果通り、脂質蓄積抑制作用を発揮した。しかしながら、その構成アミノ酸を添加しても脂質蓄積は抑制されず、RPR の効果は消失した (Fig. 16)。

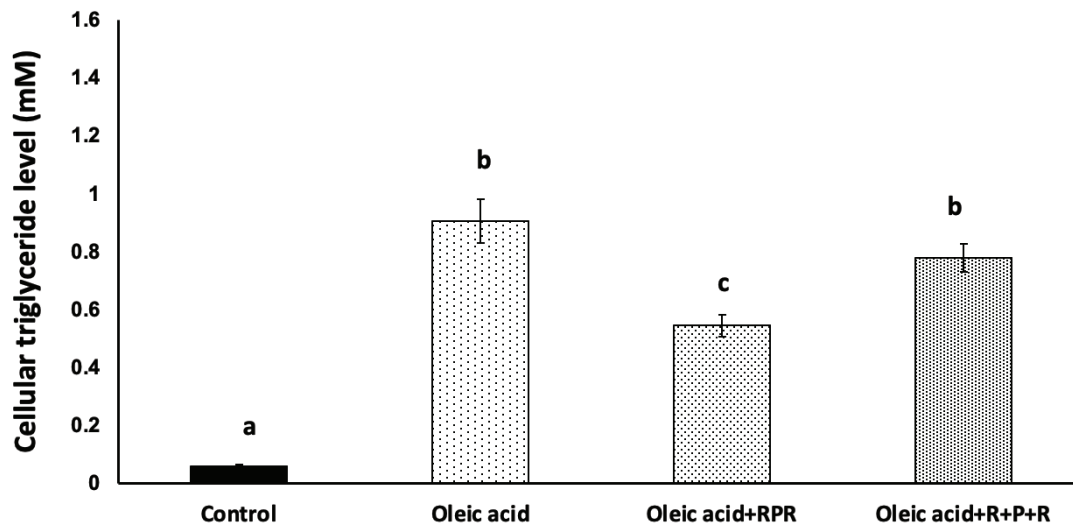


Fig. 16. Effects of 2 mM RPR or R+P+R on cellular triglyceride levels in HepG2 cells.

1. Means $\pm$ SEM of 6 well per group.

2. Different lowercase letters indicate the significantly different values ($p < 0.05$) determined via Tukey's test.

細胞内トリグリセリド回収 : 2021 年 6 月 24 日

細胞内トリグリセリド測定 : 2021 年 6 月 25 日

第6節 HepG2 細胞における RP 及び PR 添加による細胞増殖に対する影響

1. 目的

第3章第5節では、RPR の構成アミノ酸であるアルギニン (R)、プロリン (P) のアミノ酸混合物を HepG2 細胞に添加したときの影響を評価したところ、オレイン酸による脂質蓄積に対して、RPR は今までの結果通り、脂質蓄積抑制作用を発揮した。しかしながら、その構成アミノ酸を添加しても脂質蓄積は抑制されず、RPR の効果は消失した。

そこで、第3章6、7節ではオレイン酸による脂質負荷をした HepG2 細胞に対して RP、PR を添加したときの肝臓の脂質蓄積に対する影響を評価することを目的とした。第6節では、HepG2 細胞において、RP、PR 添加による細胞増殖に対する影響を WST-1 法により評価した。

2. 方法

1 日目、HepG2 細胞を 10 % FBS (Biosera, Lot No. 12868) 含有 MEM を用いて 96 well プレートに 2×10^4 cells/well の濃度 (100 μ l) で播き、CO₂ インキュベーター (37°C、5 % CO₂) 内で 24 時間インキュベートした。2 日目、10 % FBS 含有 MEM を吸引除去し、血清フリー MEM 100 μ l で洗浄後、サンプル培地を n = 12 で 100 μ l / well となるように培地交換し、CO₂ インキュベーター (37°C、5 % CO₂) 内で 24 時間インキュベートした。3 日目、サンプル培地を吸引除去し、血清フリー MEM 100 μ l に培地交換した後、WST-1 試薬 10 μ l を加え、CO₂ インキュベーター (37°C、5 % CO₂) 内で 1 時間インキュベートする。マイクロプレートリーダーで 450 nm (参照波長 : 630 nm) における吸光度を測定した。

【サンプル】 RP (Bachem AG, Bubendorf, Switzerland, G-3675.0250)

PR (Bachem AG, Bubendorf, Switzerland, G-2990.0250)

詳細は以下の基本的実験操作法に示した。

13. HepG2 細胞の継代、培養方法

14. HepG2 細胞へのサンプルの添加

15. HepG2 細胞における WST-1 法による細胞増殖に対する影響評価

実験結果の統計分析には、Tukey's test を用いた。

3. 結果

Control 群 (0 mM) と比較して、RP は 0.25~2 mM まで、PR は 0.25~5 mM までの濃度では細胞増殖に有意な変化はみられなかった。

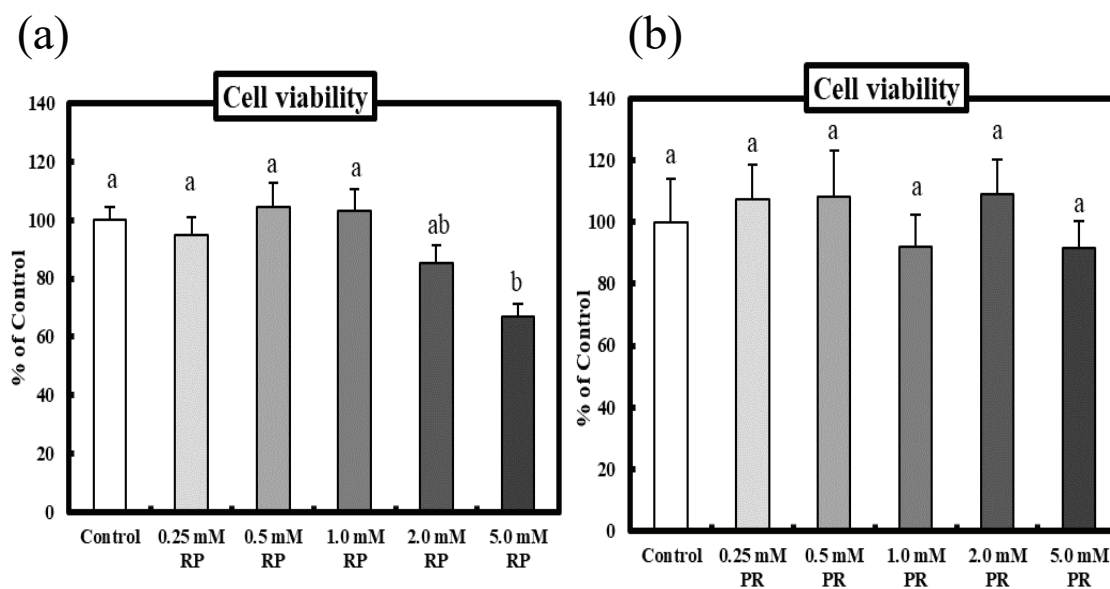


Fig. 17. The cytotoxicity of RPR on HepG2 cells.

1. Means $\pm$ SEM of 12 well per group

2. Different lowercase letters indicate the significantly different values ($p < 0.05$) determined via Tukey's test.

WST-1 法 : 2022 年 3 月 10 日実施

第7節 オレイン酸負荷をした HepG2 細胞への RP および PR 添加に対する 細胞内トリグリセリドレベルへの影響

1. 目的

第3章、第6節の実験結果より、HepG2 細胞において、RP は 0.25～2 mM まで、PR は 0.25～5 mM までの濃度では細胞増殖に影響を及ぼさなかった。そこで、第7節以降では RP、PR を 2 mM の濃度で HepG2 細胞に添加することとした。

第7節では 24 時間オレイン酸負荷をした HepG2 細胞において、2 mM RP、2 mM PR 添加による細胞内トリグリセリドレベルへの影響を評価することを目的とする。

2. 方法

1 日目、10% FBS (Biosera、Lot No. 12868) 含有 DMEM (日水製薬 Code 05919) を用いて 11×10^5 cells/well となるように 6-well plate (FALCON、353046) に HepG2 細胞を播種し、培養 (37°C、5% CO₂) した。24 時間後に、培地を 0 もしくは 2 mM オレイン酸 (Sigma-Aldrich、O-1383) を含む 10% FBS 含有 DMEM 培地に培地交換を行い、さらに 24 時間培養 (37°C、5% CO₂) した。その後、すべての細胞を血清フリー DMEM 培地で 1 回洗浄し、サンプル添加培地 (Control 群、2 mM オレイン酸添加群、2 mM オレイン酸 + 2 mM RPR 添加群、2 mM オレイン酸 + 2 mM R + P + R 添加群) をそれぞれ 2 mM オレイン酸 + 1% BSA (wako、017-15141) 含有 DMEM 培地を用いて添加し、24 時間培養した。培養後、各 well から細胞を回収し、市販のキット (トリグリセリド E-テストワコー；和光純薬工業(株) 432-40201) を用いて細胞内トリグリセリドレベルを測定した。

【サンプル】RPR 酢酸塩 (ペプチド研究所、AH-187、純度 98.7%)

RP (Bachem AG, Bubendorf, Switzerland, G-3675.0250)

PR (Bachem AG, Bubendorf, Switzerland, G-2990.0250)

詳細は以下の基本的実験操作法に示した。

13. HepG2 細胞の継代、培養方法

14. HepG2 細胞へのサンプルの添加

17. HepG2 細胞からのトリグリセリド回収

実験結果の統計分析は Tukey's test を用いた。

3. 結果

オレイン酸による脂質蓄積に対して、RPR は今までの結果通り、脂質蓄積抑制作用を発揮した。また、RP、PR 添加した時も脂質蓄積は抑制され、RP はもっとも強い脂質蓄積抑制作用を示した (Fig. 18)。

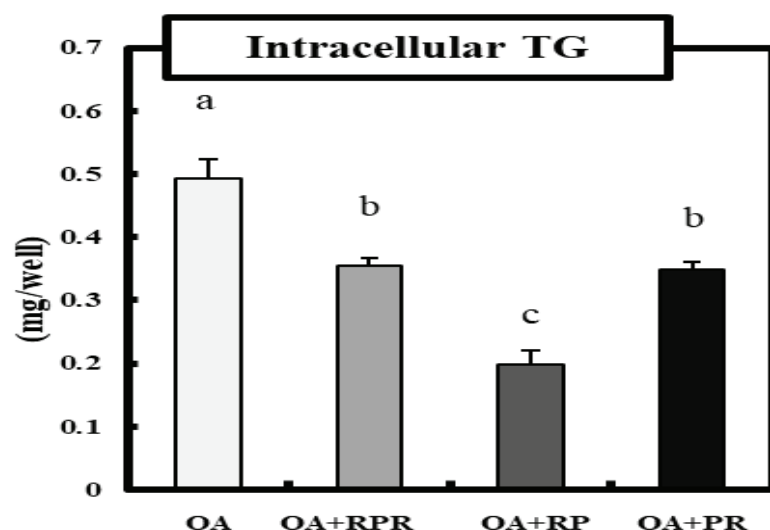


Fig. 18. Effects of 2 mM RPR or R+P+R on cellular triglyceride levels in HepG2 cells.

1. Means $\pm$ SEM of 6 well per group.

2. Different lowercase letters indicate the significantly different values ($p < 0.05$) determined via Tukey's test.

細胞内トリグリセリド回収：2022 年 4 月 14 日

細胞内トリグリセリド測定：2022 年 4 月 15 日

4. 考察

第二章の結果は、食餌中のプロタミンが PPAR α と LDLR の mRNA レベルを有意に活性化し、肝臓の SCD1 と SREBF1 の mRNA レベルを有意に低下させることを示した 24)。これに基づいて、RPR も肝細胞に影響を与える可能性があるという仮説を立てた。

図 8 に示す細胞生存率と、図 9a に示す細胞 TG の用量依存的減少に関連する予備実験の両方が、HepG2 細胞の実験では 2 mM RPR が適切であることを示唆した。HepG2 細胞への OA 負荷は、肝臓の細胞内脂質蓄積を増加させ、NAFLD のモデルとして利用可能性である 42)。私たちのデータでも、図 9b、図 16 に示すように、HepG2 細胞の OA 誘導 NAFLD が細胞内 TG レベルを増加させることを示した。RPR は、OA 添加の HepG2 細胞の細胞内または培地の TG レベルを大幅に減少させた (Fig. 9a、b、Fig.16)。アミノ酸混合物 R+P+R 処理群の細胞内 TG 含有量は、OA 群の TG 含有量と有意な差は見られなかった (Fig. 16)。興味深いことに、ジペプチド RP ま

たは PR は、OA 群と比較して細胞内 TG を大幅に減少させた (Fig. 18)。

いくつかの研究で、SREBP1 が SCD1 の調節に影響を与えることが示されている^{48,49)}。私たちの以前の結果は、肝臓の *SCD1* または *SREBF1* mRNA レベルが、対照群のマウスと比較して RPR 群のマウスで減少する傾向があることを示していた²⁴⁾。同様に、本研究はまた、*SCD1* mRNA レベルが対照群と比較して RPR 群で有意に減少し、OA+RPR 群は OA 群と比較して減少する傾向があり ($P=0.051$)、OA 群と比較した OA+RPR 群の *SREBF1* mRNA レベルは ($P=0.078$) で減少する傾向があることを示した (Fig. 13)。興味深いことに、SCD1 または SREBP1 レベルは、OA 群と比較して OA+RPR 群で有意に減少した (Fig. 14, 15)。この結果は、OA 添加 HepG2 細胞における RPR による SREBP1 レベルに関連して、SCD1 タンパク質レベルがダウンレギュレートされたことを示唆している。これらの結果は、マウスでの以前の研究の結果と似ている²⁴⁾。まとめると、SREBP1-SCD1 経路は、細胞内 TG レベルの減少を誘発する RPR の調節において重要な役割を果たす。したがって、今後の研究では、OA+RPR 添加による SREBP1 と ACAC または FAS などとの関係を調査する必要がある。

第4章 オレイン酸負荷をした HepG2 細胞における PepT1 siRNA を用いた PepT1 ノックダウンが RPR の作用に及ぼす影響

第1節 PepT1 の mRNA レベルに対する PepT1 siRNA の影響

1. 目的

第3章の結果より、トリペプチド RPR はオレイン酸負荷をした HepG2 細胞における脂質蓄積抑制作用を有することを明らかにした。しかしながら、RPR が HepG2 細胞にどのように作用するのかという詳細な作用機構は不明なことが多い。肝臓においても、PepT1 というペプチドトランスポーターの発現が確認されており、ジ・トリペプチドの吸収に関与していることがわかっている²⁷⁾。私達は、RPR も同様に肝臓の PepT1 を介して肝臓に取り込まれるのではないかと予想した。そこで、PepT1 siRNA により PepT1 をノックダウンしたときの RPR の作用を評価した。

そこで本章の第1節では、HepG2 細胞における PepT1 siRNA を用いた PepT1 のノックダウン条件を検討することとした。

2. 方法

1日目、10% FBS (Biosera、Lot No. 12868) 含有 DMEM (日水製薬 Code 05919) を用いて 11×10^5 cells/well となるように 6-well plate (FALCON、353046) に HepG2 細胞を播種し、培養 (37°C、5% CO₂) した。その後、各群に 20 nM の Control siRNA または PepT1 siRNA を 2 mM オレイン酸含有 10%FBS 含有 DMEM 培地を用いてトランスフェクションした。その後、すべての細胞を血清フリーDMEM 培地で1回洗浄し、サンプル添加培地 (Control siRNA 群、Control siRNA+2 mM RPR 添加群、PepT1 siRNA 群、PepT1 siRNA+2 mM RPR 添加群) をそれぞれ 2 mM オレイン酸+1%BSA (wako、017-15141) 含有 DMEM 培地を用いて添加し、24 時間培養した。培養後、すべての細胞から total RNA を回収し、real-time 定量 PCR によって、HepG2 細胞中の PepT1 mRNA レベルを測定した。18S の mRNA レベルはデータ補正として用いた。

詳細は以下の基本的実験操作法に示した。

13. HepG2 細胞の継代、培養方法
14. HepG2 細胞へのサンプルの添加
16. HepG2 細胞からの Total RNA の単離
11. RT 反応
12. Syber Green を用いたリアルタイム PCR ($\Delta\Delta C_t$ 法)

18. siLentFect™Lipid Reagent を用いた HepG2 細胞への siRNA の導入

実験結果の統計分析には Tukey's test を用いた。

3. 結果

10 nM PepT1 siRNA のトランスフェクションによって、PepT1 mRNA レベルが有意に低下し、約 60%程度ノックダウンされた (Fig. 19)。

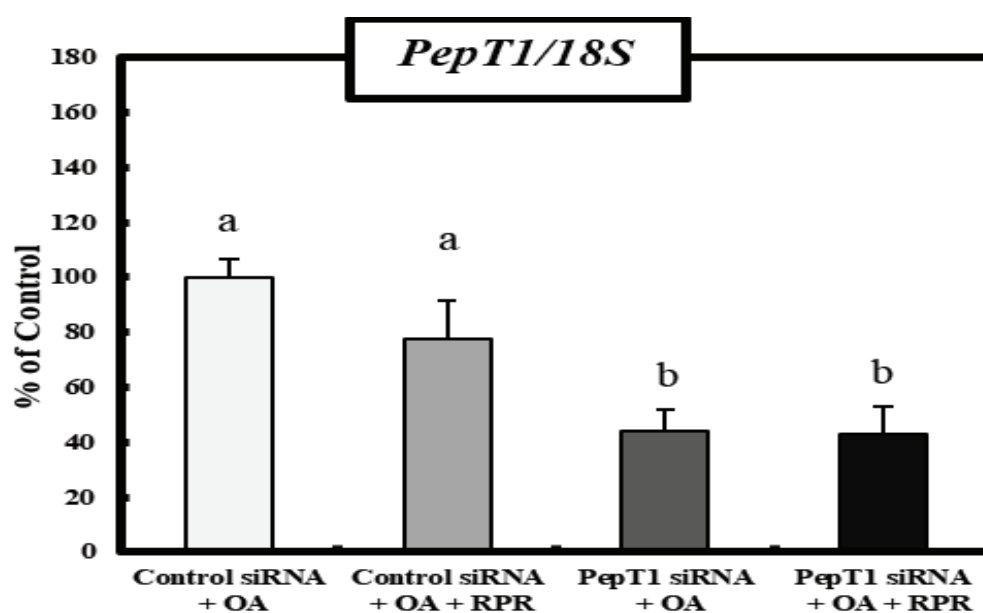


Fig. 19. Effects of 20 nM PepT1 siRNA on PepT1 mRNA levels in HepG2 cells.

1. Means $\pm$ SEM of 6 well per group.

2. Different lowercase letters indicate the significantly different values ($p < 0.05$) determined via Tukey's test.

Total RNA 回収 : 2022 年 1 月 27 日

Real-time PCR : 2022 年 2 月 1 日

第 2 節 オレイン酸負荷をした HepG2 細胞における PepT1 ノックダウン条件下での RPR の影響評

1. 目的

肝臓においても PepT1 を介してジペプチドやトリペプチドが吸収されることが報告されている²⁷⁾。よって、RPR も PepT1 を介して肝臓で吸収され、脂質蓄積抑制効果を発揮するのではないかと予想した。また第 4 章第 1 節の結果より、PepT1 siRNA のトランスフェクションによって、PepT1 mRNA レベルが 60%程度ノックダウンされた。

これらを踏まえて、本実験では、オレイン酸負荷をした HepG2 細胞において PepT1 siRNA による PepT1 ノックダウン条件下で RPR が脂質蓄積に与える影響を評価した

2. 方法

1 日目、10%FBS (Biosera、LotNo. 12868) 含有 DMEM (日水製薬 Code 05919) を用いて 11×10^5 cells/well となるように 6-well plate (FALCON、353046) に HepG2 細胞を播種し、培養 (37°C、5% CO₂) した。その後、各群に 20 nM の Control siRNA または PepT1 siRNA を 2 mM オレイン酸含有 10%FBS 含有 DMEM 培地を用いてトランスフェクションした。その後、すべての細胞を血清フリーDMEM 培地で 1 回洗浄し、サンプル添加培地 (Control siRNA 群、Control siRNA+2 mM RPR 添加群、PepT1 siRNA 群、PepT1 siRNA+2 mM RPR 添加群) をそれぞれ 2 mM オレイン酸+1%BSA (wako、017-15141) 含有 DMEM 培地を用いて添加し、24 時間培養した。培養後、各 well から細胞を回収し、市販のキット (トリグリセリド E-テストワコー; 和光純薬工業(株) 432-40201) を用いて細胞内トリグリセリドレベルを測定した。

詳細は以下の基本的実験操作法に示した。

13. HepG2 細胞の継代、培養方法
14. HepG2 細胞へのサンプルの添加
17. HepG2 細胞からのトリグリセリド回収
18. siLentFect™Lipid Reagent を用いた HepG2 細胞への siRNA の導入

実験結果の統計分析には Tukey's test を用いた。

3. 結果

Control siRNA に対して RPR を添加したところ、細胞内トリグリセリドレベルが有意に低下したが、PepT1 siRNA に対して RPR を添加したところ、RPR の効果は消失した (Fig. 20 a)。siRNA+OA または PepT1 siRNA+OA グループと比較して、コントロール siRNA+OA+RPR または PepT1 siRNA+OA+RPR グループでは、培地 FFA 濃度が有意に増加した (Fig. 20 b)。

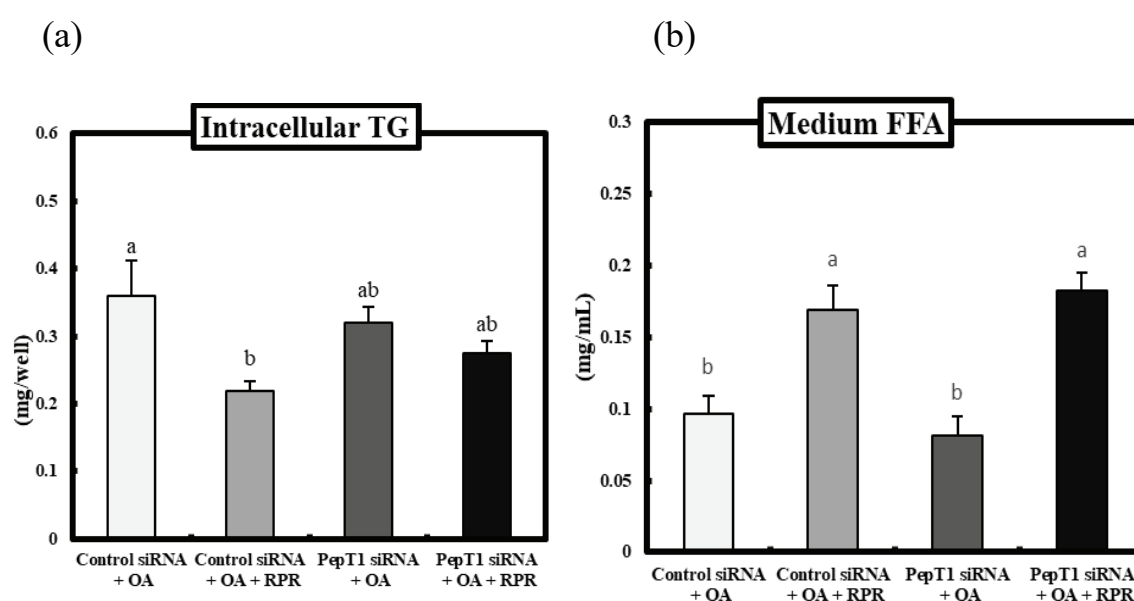


Fig. 20 Effects of 20 nM PepT1 siRNA on cellular triglyceride levels in HepG2 cells.

1. Means $\pm$ SEM of 3 well per group.

2. Different lowercase letters indicate the significantly different values ($p < 0.05$) determined via Tukey's test.

細胞内トリグリセリド回収 : 2022 年 1 月 24 日

細胞内トリグリセリド測定 : 2022 年 1 月 25 日

第3節 PepT1 siRNA 導入による HepG2 細胞における OA 添加時に RPR が及ぼす脂質代謝関連遺伝子 mRNA レベルへの影響評価

1. 目的

第3章の結果より、トリペプチド RPR はオレイン酸負荷をした HepG2 細胞における脂質蓄積抑制作用を有することを明らかにした。しかしながら、RPR が HepG2 細胞にどのように作用するのかという詳細な作用機構は不明なことが多い。肝臓においても、PepT1 というペプチドトランスポーターの発現が確認されており、ジ・トリペプチドの吸収に関与していることがわかっている²⁷⁾。私は、RPR も同様に肝臓の PepT1 を介して肝臓に取り込まれるのではないかと予想した。そこで、PepT1 siRNA により PepT1 をノックダウンしたときの RPR の作用を評価した。

そこで第3節では、HepG2 細胞における PepT1 siRNA を用いて PepT1 のノックダウンした時の脂質代謝関連遺伝子 mRNA レベルへの影響を評価することとした。

2. 方法

1日目、10% FBS (Biosera、Lot No. 12868) 含有 DMEM (日水製薬 Code 05919) を用いて 11×10^5 cells/well となるように 6-well plate (FALCON、353046) に HepG2 細胞を播種し、培養 (37°C、5% CO₂) した。その後、各群に 20 nM の Control siRNA または PepT1 siRNA を 2 mM オレイン酸含有 10%FBS 含有 DMEM 培地を用いてトランスフェクションした。その後、すべての細胞を血清フリーDMEM 培地で1回洗浄し、サンプル添加培地 (Control siRNA 群、Control siRNA+2 mM RPR 添加群、PepT1 siRNA 群、PepT1 siRNA+2 mM RPR 添加群) をそれぞれ 2 mM オレイン酸+1%BSA (wako、017-15141) 含有 DMEM 培地を用いて添加し、24 時間培養した。培養後、すべての細胞から total RNA を回収し、real-time 定量 PCR によって、HepG2 細胞中の SCD1、SREBP1、ATGL mRNA レベルを測定した。18S の mRNA レベルはデータ補正として用いた。

詳細は以下の基本的実験操作法に示した。

13. HepG2 細胞の継代、培養方法
14. HepG2 細胞へのサンプルの添加
16. HepG2 細胞からの Total RNA の単離
11. RT 反応
12. Syber Green を用いたリアルタイム PCR ($\Delta\Delta C_t$ 法)
18. siLentFect™Lipid Reagent を用いた HepG2 細胞への siRNA の導入

実験結果の統計分析には Tukey's test を用いた。

3. 結果

Control siRNA 群と比較して Control siRNA+RPR 群 SCD1 及び SREBF1 mRNA レベルは有意に減少した。PepT1 siRNA+RPR の SCD1 及び SREBF1 mRNA レベルは Control siRNA 及び PepT1 siRNA 群と比較して有意差は見られなかった。ATGL mRNA レベルは siRNA+OA または PepT1 siRNA+OA 群と比較して、Control siRNA+OA+RPR または PepT1 siRNA+OA+RPR 群では増加傾向を示した (Fig. 21)。

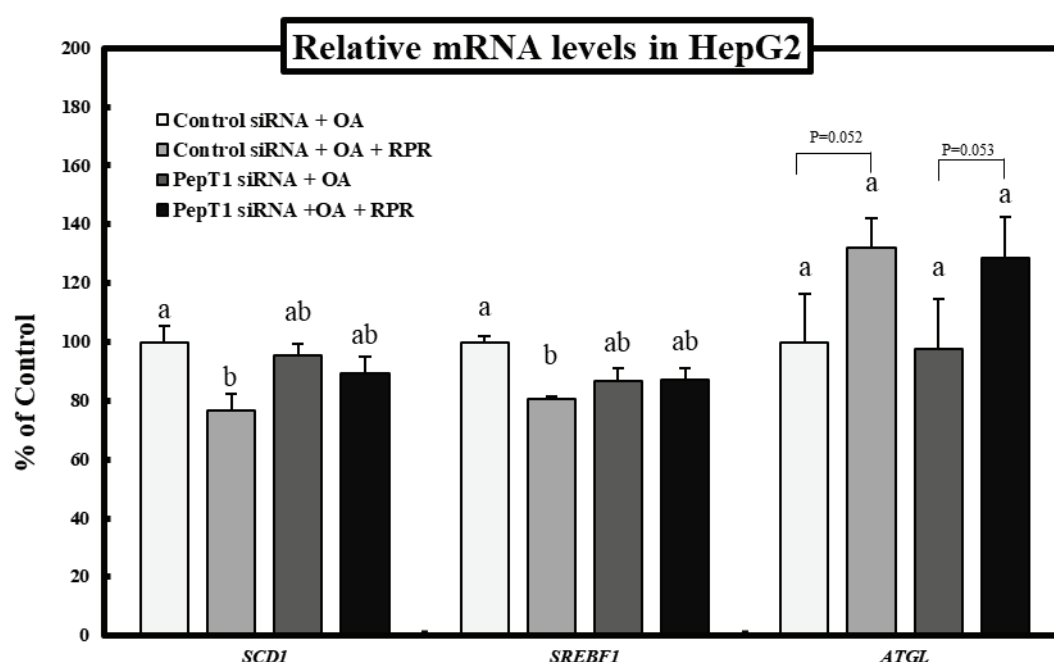


Fig. 21. Effects of 20 nM PepT1 siRNA on relative mRNA levels in HepG2 cells.

1. Means $\pm$ SEM of 6 well per group.

2. Different lowercase letters indicate the significantly different values ($p < 0.05$) determined via Tukey's test.

Total RNA 回収 : 2022 年 1 月 27 日

Real-time PCR : 2022 年 2 月 1 日

4. 考察

消化されたタンパク質の約 80% は、遊離アミノ酸ではなくジペプチドまたはトリペプチドとして吸収されるため、PepT1 はタンパク質同化において重要な生理学的役割を果たす 52)。以前に、フェニルアラニン-プロリン (FP) が *in vivo* でラットのコレステロール低下作用を示すことを発見した 53)。特に、FP によるコレステロール低下作用が PepT1 ノックアウト マウスで消失

したため、この作用がマウスの PepT1 によって媒介されていることが明らかになった 53)。本研究では、RPR が PepT1 を介して腸管吸収後に肝細胞に入る可能性があり 55)、RPR が生体内の肝細胞で機能する可能性がある 24)という仮説を立てた。我々の結果は、細胞内 TG が Control siRNA + OA 群と比較して Control siRNA + OA + RPR 群で有意に減少したことを示した。興味深いことに、図 20a に示すように、PepT1 siRNA + OA + RPR 群の TG 含有量は、Control siRNA + OA および PepT1 siRNA + OA 群の TG 含有量と有意な差は見られなかった。これらの結果は、RPR によって誘導された TG 低下作用が PepT1 siRNA 処理後に消失したことを明確に示唆した。したがって、RPR 誘導 TG 低下作用は、HepG2 細胞の PepT1 経路を介して媒介された。さらに、我々の結果は、Control siRNA + OA 群と比較して、Control siRNA + OA + RPR 群で SCD1 または SREBF1 mRNA レベルが有意に減少したことも示した (Fig. 21)。興味深いことに、図 21 に示すように、PepT1 siRNA + OA + RPR 群の mRNA レベルは、Control siRNA + OA 群または PepT1 siRNA + OA 群と比較して有意差を示さなかった。RPR は PepT1 経路によって肝細胞に輸送される可能性があるため、RPR は SCD1 および SREBF1 mRNA レベルをダウンレギュレートする可能性がある。したがって、これらの結果は、SREBP1-SCD1 経路が細胞内 TG レベルの減少を誘発する RPR の調節に重要な役割を果たしていることを示唆している。また、ジペプチド RP または PR は HepG2 細胞の細胞内 TG を有意に減少させたため、それらは PepT1 経路を介して細胞内に輸送される可能性もあるため、今後の研究で HepG2 細胞における RP または PR と PepT1 経路との関係を調査する必要がある。

本研究は、RPR(Arg-Pro-Arg)をマウスのプロタミンに由来する新しい抗肥満および低コレステロール血症トリペプチドとして特定した最初の研究である。RPR 処理の抗肥満作用の程度は、WAT 重量で測定すると、プロタミン処理の程度とほぼ同じだった(Fig. 3)。したがって、プロタミン由来の RPR は、脂肪組織重量減少の有効用量(プロタミン:4.71±0.17 g/kg 体重、RPR:0.5±0.02 g/kg 体重)を評価することにより、プロタミンの抗肥満作用に重要な役割を果たした。任意のタンパク質起源に由来する RPR の様なトリペプチドによる抗肥満作用および低コレステロール血症作用の両方の報告はない。したがって、RPR は、抗肥満機能と低コレステロール血症機能の両方を有する唯一のトリペプチドである。内臓脂肪の蓄積は、インスリンの耐性に起因する耐糖能異常や高インスリン血症による 2 型糖尿病などの慢性変性疾患の進行の主要な危険因子であるため、内臓脂肪組織の体重減少に対する RPR またはプロタミンの効果は特に重要である²⁸⁾。血清 HDL コレステロール値はプロタミン群及び RPR 群で有意に低下し、非 HDL コレステロールはプロタミン群で有意に低下した(Fig. 4a)。総コレステロール、HDL コレステロール、および LDL コレステロールは、プロタミンを 7 週間投与されたラットで有意に減少したことが報告されている¹⁷⁾。これらの結果は私たちの研究に似ている。さらに、遊離脂肪酸のレベルを調査し、今後の研究でプロタミン効果を明らかにする。血漿インスリンおよびグルコースレベルもまた、肥満および低コレステロール血症の重要な要素である。したがって、将来の研究では、RPR またはプロタミンを与えられたマウスのインスリンおよびグルコースレベルを測定する必要がある。

循環総コレステロールおよび LDL コレステロール濃度の低下は、心血管疾患のリスクの低下と関連している²⁹⁾。したがって、心血管疾患の予防をサポートする可能性のある低コレステロール血症機能を持つ栄養素を特定することは興味深いことである。RPR またはプロタミン食を与えられたマウスは、対照マウスよりも血清コレステロール濃度が低かった。コレステロールの糞便排泄量は、対照群よりもプロタミン群または RPR 群で有意に高く、対照群と比較して、プロタミンおよび RPR 処置動物では糞便胆汁酸排泄が有意に増加した(Fig. 5c)。これらの知見は、RPR またはプロタミンの低コレステロール血症作用が腸コレステロール吸収の阻害に関連しており、以前の知見と同様に、糞便ステロイド排泄の増加によって測定されたことを示唆している^{13,30)}。コレステロール代謝に関しては、*SREBP2*、*HMGCR*、*LDLR* の mRNA レベルを評価した。*LDLR* mRNA レベルは、対照群のものと比較して、RPR 食を与えられたマウスで有意に増加した。HFD にプロタミンを添加すると、対照群と比較して *SREBP2*、*HMGCR*、および *LDLR* mRNA レベルがアップレギュレーションされた (Fig. 6)。これらの発見は、コレステロール合成がダウンレギュレーションされていなくても、サポニンの食事添加が肝細胞における LDL コレステロールの

取り込みを増加させたことを実証した以前の研究の知見に類似しており、これは血漿 LDL コレステロールの減少を説明する可能性がある³¹⁾。本研究では、RPR またはプロタミンの血清コレステロール低下作用が LDLR 活性化によって誘導されることが示唆された。

肝臓 *SCD1* または *SREBP1* の mRNA レベルは、対照群と比較してプロタミン群で有意に低下した(Fig. 6)。いくつかの研究は、SREBP がコレステロールと脂肪酸を共調節し、SREBP1 が肝インスリンシグナル伝達に応答して脂肪生成遺伝子の発現を活性化する重要な調節因子であることを示している³²⁾。SREBP1 は、de novo 脂質生成遺伝子を制御するための転写因子であり、例えば、FAS³³⁾または *SCD1*³⁴⁾である。以前の研究では、トリグリセリド合成の亢進は *SCD1* 遺伝子の発現に強く依存しており、*SCD1*-KO マウスは高炭水化物摂食による脂肪酸とトリグリセリド合成の減少を示したことが示唆されていた³⁴⁾。*SCD1* アブレーションは *SREBP1* mRNA レベルを有意に低下させ、これは *SCD1*-KO マウスがオレイン酸処理によって特異的にレスキューされた *SREBP1* の発現および成熟の低下を示したという観察と一致した。オレイン酸は *SREBP1* タンパク質を修飾し、その核移行を増強することができ、脂肪生成遺伝子の発現を増加させる³⁵⁾。したがって、肝臓 *SCD1* の抑制は、プロタミン供給による脂肪生成遺伝子に関連する *SREBP1* を介して、WAT 重量の減少の原因である。プロタミン摂食によるマウスの体重増加の減少は、*SCD1*-KO マウスの *SCD1* 欠乏症の影響と同様に、肝臓、筋肉、および褐色脂肪組織における脂肪酸酸化および熱発生の増強によるエネルギー消費および酸素消費量の増加に起因する可能性がある³⁶⁾。私たちの仮説を確認するために、褐色脂肪組織を測定するか、RPR またはプロタミンを与えられたマウスの基礎代謝率を将来の研究で確認する。

Lodhi らの研究は、脂肪組織における FAS の特定の欠失が WAT の褐色脂肪様脂肪細胞を増加させ、エネルギー消費を増加させ、食事誘発性肥満を改善することを示している³⁷⁾。したがって、脂肪細胞 FAS mRNA レベルは対照群と比較してプロタミン群で有意に低下したため、プロタミンによって誘導される FAS の発現抑制は WAT における脂質蓄積の抑制に関連している可能性がある(Fig. 3b)。ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体(PPAR)は、核内受容体スーパーファミリーのメンバーであり、 α 、 γ 、および δ の 3 つの異なるアイソフォームを持ち、そのリガンド特異性と組織分布は異なる³⁸⁾。PPAR α は主に褐色脂肪組織と肝臓で発現しますが、PPAR γ の発現は脂肪組織に豊富にあり、脂肪細胞分化における重要な転写因子として機能する³⁹⁾。したがって、PPAR γ アゴニストは、肥満によって誘発されるインスリン抵抗性を制御するために適用されてきた⁴⁰⁾。さらに、PPAR α は絶食状態で生理学的刺激として機能し、脂肪組織から肝臓に輸送された遊離脂肪酸がリガンドとして作用し、PPAR α を活性化するという仮説が立てられている⁴¹⁾。したがって、対照群と比較してプロタミン群で観察された肝 PPAR α mRNA レベルの有意な増加(Fig. 6)は、WAT における脂質蓄積の減少に関連している可能性がある(Fig. 3b)。これらの結果は、食餌性プロタミンが肝臓 *SREBP1* および *SCD1* mRNA レベルを低下させ、脂肪細胞 PPAR γ 1 およ

び肝臓 PPAR α mRNA レベルを活性化することにより、WAT 重量を減少させることを示唆した。したがって、プロタミン由来の RPR およびプロタミンは、高コレステロール血症と肥満誘発性代謝障害の両方に対して有用であることが期待できる。要約すると、本研究の結果は、プロタミンまたはプロタミン補給に由来する RPR が HFD マウスの高コレステロール血症と肥満を改善することを示唆している。RPR またはプロタミン摂食は、糞便コレステロールおよび胆汁酸排泄を介してコレステロール低下作用を示した。これは、アップレギュレーションされた肝臓 LDLR mRNA レベルに関連する LDLR の発現の増加が原因である可能性がある。プロタミンは、SREBP1 および脂肪細胞 FAS を介して肝 SCD1 の mRNA 発現を有意に抑制した。プロタミンは脂肪細胞 PPAR γ 1 mRNA および肝臓 PPAR α mRNA レベルをアップレギュレートした。これらの mRNA レベルによって引き起こされるタンパク質発現の変化は、WAT 重量の抑制に影響を与えた可能性がある。プロタミン由来の RPR は、脂肪組織の体重減少の有効用量を評価することにより、プロタミンの抗肥満作用において重要な役割を果たす。しかし、食餌性 RPR の脂質低下作用のメカニズムは、脂質代謝の遺伝子発現への影響が異なるため、プロタミンのそれとはわずかに異なる可能性がある。これらの知見は、プロタミンおよびプロタミンに由来する食餌性 RPR が肥満を予防または改善できることを示している。

私たちの以前の結果は、食餌中のプロタミンが PPAR α と LDLR の mRNA レベルを有意に活性化し、肝臓の SCD1 と SREBF1 の mRNA レベルを有意に低下させることを示した²⁴⁾。これに基づいて、RPR も肝細胞に影響を与える可能性があるという仮説を立てた。したがって、この次の研究では、OA で処理した HepG2 細胞で RPR が NAFLD を誘発することにより肝脂質レベルを低下させるかどうかを調査した。

この研究では、HepG2 細胞への OA の添加により脂質蓄積を誘導することにより、NAFLD の誘導に成功しました。RPR は、脂質代謝関連遺伝子 SCD1 または SREBF1 の mRNA およびタンパク質レベルを調節することにより、NAFLD を予防する。

WST-1 アッセイを用いた HepG2 細胞における RPR、RP または PR の *in vitro* 細胞毒性評価では、RPR および RP は 2 mM 濃度まで毒性がなく、PR は 5 mM 濃度まで毒性がないことが示された (Fig. 8, Fig. 17a,b)。プロタミンによる RPR の血清濃度または動物の RPR 給餌に関する情報は無い。したがって、今後の研究では、動物にプロタミンまたは RPR を与えて RPR の血清濃度を測定する。これらの状況に関連して、図 8 に示す細胞生存率と、図 9a に示す細胞 TG の用量依存的減少に関連する予備実験の両方が、HepG2 細胞の実験では 2 mM RPR が適切であることを示唆している。

HepG2 細胞への OA 負荷は、肝臓の細胞内脂質蓄積を増加させ、NAFLD のモデルとして利用

可能性である⁴²⁾。私たちのデータでも、図 9b、図 16 に示すように、HepG2 細胞の OA 誘導 NAFLD が細胞内 TG レベルを増加させることを示した。RPR は、OA 添加の HepG2 細胞の細胞内または培地の TG レベルを大幅に減少させた (Fig. 9a、b、Fig. 16)。RPR は、OA 処理の HepG2 細胞の LDL-TG レベルを大幅に低下させ、HDL-TG も大幅に低下させたが、RPR は総 TG レベルの大幅な低下を誘発すると予想される (Fig. 10a、b)。アミノ酸混合物 R + P + R 処理群の細胞内 TG 含有量は、OA 群の TG 含有量と有意な差は見られなかった (Fig. 16)。興味深いことに、ジペプチド RP または PR は、OA 群と比較して細胞内 TG を大幅に減少させた (Fig. 18)。RPR はジグリセリド (DG) レベルに影響を与える可能性があるため、今後の研究で HepG2 細胞の細胞および培地中の DG レベルを測定する。

ATGL は、TG の最初のエステル結合の切断を特異的に触媒し、細胞内 TG 加水分解における最初の最も重要な律速段階に関与している⁴³⁾。ATGL 活性は、主に 2 つの調節タンパク質、CGI-58 と G0S2 によって調節されている⁴⁴⁾。ATGL の活性化は、ATGL を脂肪滴の表面に導入する CGI-58 との会合によって起こる⁴⁵⁾。ATGL mRNA レベルは、OA 群よりも OA+RPR 群で有意に高かった (Fig. 11)。しかし、ATGL タンパク質レベルは実験群間で変化が見られなかった (Fig. 14,15)。また、ATGL mRNA は、OA+RPR 処理によって増加する傾向を示した (P=0.052) (Fig. 21)。したがって、これらの結果は、ATGL が細胞内 TG レベルの減少を誘発する RPR の主要な調節因子ではないことを示唆している可能性がある。今後の研究では、RPR 添加による RPR と ATGL の詳細な関係を調査する必要がある。

ステロールと脂肪酸代謝の間の界面で機能する転写因子である SREBP1 は、脂質生成経路の調節に関連して広く研究されてきた^{46,47)}。いくつかの研究で、SREBP1 が SCD1 の調節に影響を与えることが示されている^{48,49)}。私たちの以前の結果は、肝臓の SCD1 または SREBF1 mRNA レベルが、対照群のマウスと比較して RPR 群のマウスで減少する傾向があることを示している²⁴⁾。同様に、本研究はまた、SCD1 mRNA レベルが対照群と比較して RPR 群で有意に減少し、OA + RPR 群は OA 群と比較して減少する傾向があり (P=0.051)、OA 群と比較した OA + RPR 群の SREBF1 mRNA レベルは (P=0.078) で減少する傾向があることを示した (Fig. 13)。興味深いことに、SCD1 または SREBP1 レベルは、OA 群と比較して OA+RPR 群で有意に減少した (Fig. 14, 15)。この結果は、OA 添加 HepG2 細胞における RPR による SREBP1 レベルに関連して、SCD1 タンパク質レベルがダウンレギュレートされたことを示唆している。これらの結果は、マウスでの以前の研究の結果と似ている²⁴⁾。まとめると、SREBP1-SCD1 経路は、細胞内 TG レベルの減少を誘発する RPR の調節において重要な役割を果たす。ACAC または FAS も SREBP1 によって媒介されるため^{50,51)}、我々の結果は、ACACB mRNA レベルが減少する傾向 (P=0.072) であることを示しているが、ACACA または FASN mRNA レベルは OA+RPR 添加で有意な変化が見られなかった (Fig. 12)。ACACA や FASN の mRNA レベルが OA+RPR 処理によって有意に

変化しなかった理由は不明である。したがって、今後の研究では、OA+RPR 添加による SREBP1 と ACAC または FAS などとの関係を調査する必要がある。

消化されたタンパク質の約 80% は、遊離アミノ酸ではなくジペプチドまたはトリペプチドとして吸収されるため、PepT1 はタンパク質同化において重要な生理学的役割を果たす⁵²⁾。PepT1 は、ヒト、ラット、およびマウスを含むいくつかの哺乳類種で発現する高度に保存された流入トランスポーターである。PepT1 は、腸、腎臓、および肝臓でのジペプチドおよびトリペプチドの取り込みを仲介する、高容量で低親和性のペプチド輸送体である。以前に、フェニルアラニン-プロリン (FP) が *in vivo* でラットのコレステロール低下作用を示すことを発見した⁵³⁾。特に、FP によるコレステロール低下作用が PepT1 ノックアウト マウスで消失したため、この作用がマウスの PepT1 によって媒介されていることが明らかになった⁵³⁾。これは、PepT1 がコレステロール代謝を改善するための重要なターゲットであることを明確に示している⁵³⁾。Zhang らは PepT1 が HepG2 細胞とマウス肝臓で発現していることを示した⁵⁴⁾。ジペプチド Pro-Gly は、HepG2 細胞において、PepT1-Janus キナーゼ 2/シグナルトランスデューサーおよび転写タンパク質 5 経路の活性化因子を介して、インスリン様成長因子 -1 の発現と分泌を促進する⁵⁴⁾。我々は、RPR が PepT1 を介して腸管吸収後に肝細胞に入る可能性があり⁵⁵⁾、RPR が生体内の肝細胞で機能する可能性がある²⁴⁾という仮説を立てた。我々の結果は、細胞内 TG が対照 siRNA+OA 群と比較して対照 siRNA+OA+RPR 群で有意に減少したことを示した。興味深いことに、図 20a に示すように、PepT1 siRNA + OA + RPR 群の TG 含有量は、Control siRNA + OA および PepT1 siRNA + OA 群の TG 含有量と有意な差は見られなかった。これらの結果は、RPR によって誘導された TG 低下作用が PepT1 siRNA 処理後に消失したことを明確に示唆した。したがって、RPR 誘導 TG 低下作用は、HepG2 細胞の PepT1 経路を介して媒介された。さらに、我々の結果は、Control siRNA + OA 群と比較して、Control siRNA + OA + RPR 群で *SCD1* または *SREBF1* mRNA レベルが有意に減少したことも示した (Fig. 21)。Control siRNA または PepT1 siRNA 処理により、培地の FFA レベルは RPR 添加により有意に増加した (Fig. 20b)。ただし、ATGL mRNA レベルは、Control siRNA + OA + RPR ($P = 0.052$) または PepT1 siRNA + OA + RPR ($P = 0.053$) 処理によって増加する傾向が示した (Fig. 21)。今後の研究では、ATGL mRNA レベルが増加する傾向にあるときに、培地中の FFA レベルが大幅に増加した理由を調査する必要がある。興味深いことに、図 21 に示すように、PepT1 siRNA+OA+RPR 群の mRNA レベルは、Control siRNA+OA 群または PepT1 siRNA+OA 群と比較して有意差を示さなかった。RPR は PepT1 経路によって肝細胞に輸送される可能性があるため、RPR は *SCD1* および *SREBF1* mRNA レベルをダウンレギュレートする可能性がある。したがって、これらの結果は、SREBP1-SCD1 経路が細胞内 TG レベルの減少を誘発する RPR の調節に重要な役割を果たしていることを示唆している。SREBP1-SCD1 経路のダウンレギュレーションの根底にある詳細な分子メカニズムは、今後の研

究で明らかになるのである。また、ジペプチド RP または PR は HepG2 細胞の細胞内 TG を有意に減少させたため、それらは PepT1 経路を介して細胞内に輸送される可能性もあるため、今後の研究で HepG2 細胞における RP または PR と PepT1 経路との関係を調査する必要がある。

以前に、我々は、ヒト肝細胞におけるコレステロール分解のための新規 Ca²⁺ チャンネル関連マイトジェン活性化プロテインキナーゼ経路を媒介する、in vivo で活性な新規コレステロール低下ペンタペプチド、IIAEK (ラクトスタチン) を発見した⁵⁶⁾。腸のコレステロール吸収のための新しい腸のアルカリホスファターゼ依存の腸の ATP 結合カセットトランスポーターA1 シグナル伝達経路⁵⁷⁾。IIAEK は、PepT1 を介して肝細胞に入ることができない。ただし、RPR による TG 低下作用は HepG2 細胞では PepT1 経路を介して媒介されるため、RPR は核内受容体などの細胞内標的分子と接触する可能性がある。現在、RPR 誘導による SREBP1-SCD1 経路および PepT1 を介した他の経路のダウンレギュレーションの詳細な分子メカニズムを明らかにしている。

以上を総合すると、プロタミン由来の RPR が、肥満や高コレステロール血症及び NAFLD の予防・改善が期待される機能性食品や医薬品の創製のための新たな生物製剤であることを明らかにした。

基本的実験操作法

1. 実験動物と飼料

C57BL/6J系雄マウスを、約22°Cの動物室で、1匹ずつプラスチックのケージに入れ、12時間の明暗周期で水と飼料を自由に摂取させた。

2. 食餌摂取量測定方法

高脂肪食を餌鉢（エル・エム・エス(株)：NSS KN-675-4-A）に入れ、総重量を正確に測定した。翌日再び総重量を測定し、前日の餌鉢総重量から翌日の餌鉢総重量を差し引いた値を食餌摂取量とした。

3. 血清脂質の定量

(1) 血清総コレステロールの定量

市販のキット（コレステロール E-テストワコー；和光純薬工業(株) 439-17501）を用いて測定した。血清20 μ Lに酵素試液を3 mL加え攪拌した後、37°Cで5分間インキュベート（TAITEC株式会社、SM-05）し、600 nmにおける吸光度を測定した。

(2) 血清トリグリセリドの定量

市販のキット（トリグリセリド E-テストワコー；和光純薬工業(株) 432-40201）を用いて測定した。血清20 μ Lに酵素試液を3 mL加え攪拌した後、37°Cで5分間インキュベート（TAITEC株式会社、SM-05）し、600 nmにおける吸光度を測定した。

4. 肝臓脂質の抽出・精製および定量

(1) 肝臓脂質の抽出および精製

肝臓0.7 gを正確に秤量し、抽出液（1級クロロホルム（Wako；035-02611）：1級メタノール（Wako；134-01833）=2:1 (V/V)）とともにホモジナイザー（佐久間製作所）で摩砕した。これを50 mLのメスフラスコに移し、一晩放置後定容し、濾過した。濾液15 mLを大試験管にとり、0.04% CaCl_2 （Wako；031-00435）水溶液3 mLを加えて攪拌した。一晩放置後、上層を捨てクロロホルム：メタノール：水=3:48:47の組成の溶液を3 mL加えて攪拌した。一晩放置後、上層を捨て同様の操作を3回繰り返し、脂質の精製を行った。

(2) 肝臓脂質の定量

精製を行った後、上層を除去し、少量の1級メタノールを加えて上層を完全に消去させた。

抽出液で洗いながら、全量をあらかじめ秤量しておいた50 mL三角フラスコに移した。ホットプレートで溶媒を除去した後、24時間、乾熱器（120℃）で乾燥させ、デシケーターに入れて室温に戻し、4時間後、重量を測定した。三角フラスコの重量との差を総脂質量とした。

(3) 肝臓総コレステロールの定量

50 mLに定容し、濾過したものから、試験管に50μLとり、一晚以上放置することで、溶媒を除去する。その後、測定の直前に水20 μLを加えて攪拌し、それから、血清総コレステロールの定量と同様のキットを用いて測定する。

(4) 肝臓トリグリセリドの定量

50 mLに定容し、濾過したものから、試験管に50μLとり、一晚以上放置することで、溶媒を除去する。その後、測定の直前に水20 μLを加えて攪拌し、それから、血清トリグリセリドの定量と同様のキットを用いて測定する。

(5) 肝臓リン脂質の定量

肝臓総脂質量から、肝臓総コレステロール量、肝臓トリグリセリド量を差し引いた値をリン脂質量とする。

5. 糞中脂質の抽出・精製および定量

(1) 糞の処理

糞はバイアルに集めた後、72時間、60℃で乾燥し、その後、デシケーター中で分析まで保存した。集めた糞は、毛や餌などのゴミを取り除いてから、重量を測定し、ミルサーで粉砕した（1サンプルにつき1分間の粉砕を2回行った）。

(2) 糞中脂質の抽出および精製

糞粉末0.2 gを正確に秤量し、抽出液（1級クロロホルム（Wako ; 035-02611）：1級メタノール（Wako ; 134-01833）=2:1 (V/V)）とともにホモジナイザー（佐久間製作所）で摩砕した。これを50 mLのメスフラスコに移し、一晚放置後定容し、濾過した。濾液15 mLを大試験管にとり、0.04% CaCl₂（Wako ; 031-00435）水溶液3 mLを加えて攪拌した。一晚放置後、上層を捨てクロロホルム：メタノール：水=3：48：47の組成の溶液を3 mL加えて攪拌した。一晚放置後、上層を捨て同様の操作を3回繰り返し、脂質の精製を行った。

(3) 糞中総脂質の定量

精製を行った後、上層を除去し、少量の1級メタノールを加えて上層を完全に消去させた。抽

出液で洗いながら、全量をあらかじめ秤量しておいた50 mL三角フラスコに移した。ホットプレートで溶媒を除去した後、24時間、乾熱器（120℃）で乾燥させ、デシケーターに入れて室温に戻し、4時間後、重量を測定した。三角フラスコの重量との差を総脂質量とした。

（3）糞中総コレステロールの定量

50 mLに定容し、濾過したものから、試験管に200 μ Lとり、一晩以上放置することで、溶媒を除去する。その後、測定の直前にDDWを20 μ Lを加えて攪拌し、それから、血清総コレステロールの定量と同様のキットを用いて測定した。

（4）糞中トリグリセリドの定量

50 mLに定容し、濾過したものから、試験管に500 μ Lとり、一晩以上放置することで、溶媒を除去する。その後、測定の直前にDDW20 μ Lを加えて攪拌し、それから、血清トリグリセリドの定量と同様のキットを用いて測定した。

（5）糞中リン脂質の定量

50 mLに定容し、濾過したものから、試験管に400 μ Lとり、一晩以上放置することで、溶媒を除去する。その後、測定の直前にDDW20 μ Lを加えて攪拌し、市販のキット（リン脂質C—テストワコー；wako：433-36201）を用いて測定した。溶液10 μ Lに酵素試薬を1.5 mL加え、攪拌した後、37℃で5分間インキュベートし、600 nmにおける吸光度を測定した。

（6）糞中胆汁酸の定量

50 mLに定容し、濾過したものから、試験管に200 μ Lとり、一晩以上放置することで、溶媒を除去する。その後、測定の直前にDDW20 μ Lを加えて攪拌し、市販のキット（総胆汁酸—テストワコー；wako：431-15001）を用いて測定した。溶液20 μ Lに酵素試薬を0.5 mL加え、攪拌した後、37℃で10分間インキュベートした。さらに、反応停止液を0.5 mL加えて混合し、560 nmにおける吸光度を測定した。

（7）糞中遊離脂肪酸の定量

50 mLに定容し、濾過したものから、試験管に50 μ Lとり、一晩以上放置することで、溶媒を除去する。その後、測定の直前にDDW20 μ Lを加えて攪拌し、市販のキット（NEFA C—テストワコー；wako：279-75401）を用いて測定した。溶液20 μ Lに発色試薬Aを1 mL加えて混合し、37℃で10分間インキュベート後、さらに発色試薬Bを2 mL加えて、攪拌し、37℃で10分間インキュベートした。その後、550 nmにおける吸光度を測定した。

6. 動物からのRNA回収

(1) 動物の精巣上体脂肪組織からのRNA抽出法

【使用キット・試薬】

- RNeasy Protect Mini Kit (50) [QIAGEN, Cat.No.74124]
- RNase-Free DNase Set (50) [QIAGEN, Cat.No.79254]

(DNase処理をする場合に使用)

- QIAzol™ Lysis Reagent (200ml) [QIAGEN, Cat.No.79306]

【試薬調製】

解剖用

- DEPC処理水

1 Lの三角フラスコにMilliQ水1 Lをメスシリンダーを用いて入れ、さらに、DEPC1 mLを加えて、スターラーを用いて攪拌する。その後、121℃、20分間オートクレーブして、DEPCを除去する。

- 生理食塩水 (0.9%食塩水)

ビーカーに9 gの塩化ナトリウムを測り、991 mLのMilliQをシリンダーを用いて入れ、溶けるまでスターラーを用いて攪拌する。その後、121℃、20分間オートクレーブする。

RNeasy Protect Mini Kit (50) について、

- Buffer RPE

11 ml入ったボトルに直接、4倍量の特級エタノール (44ml)を添加する。

- 70% エタノール

特級エタノール 70 mlに0.1 % Diethyl Pyrocarbonate (DEPC) 処理水30 mlを添加する。必要量のみ調製する。

RNase-Free DNase Set (50) について、(DNase処理をする場合に調製)

- DNase Iストック溶液

凍結乾燥されたDNase I (1,500 Kunitz units) の入ったバイアルに対して、RNase-free water (付属) を550μl添加し、穏やかに転倒混合する。Vortexしてはいけない。-20℃で最低9ヶ月保存可能。

- DNase I Incubation Mix

1サンプルにつき、DNase Iストック溶液10 μlとBuffer RDD 70 μl (付属) を穏やかに混合して80 μlとする。必要量のみ調製する。2～8℃で最高6週間保存可能。凍結させてはいけない。

【実験方法 ―脂肪組織から抽出する時―】

- ① 動物を心臓採血により屠殺した後、直ちに精巣上体脂肪組織を摘出する。このとき、左右どちらか一方の睾丸からサンプリングするように全匹統一する。また、睾丸の付け根に副睾丸という組織があってわかりにくいため、睾丸より遠い位置から脂肪組織を回収する。
- ② 滅菌生理食塩水で精巣上体脂肪組織を洗浄し、ろ紙で拭く。この操作を2回行い、湿重量を測定する。
- ③ 100 mg程度切り出し、DEPC処理水に浸け、キムワイプで拭いてから5mlサンプルカップに入れる。これを正確に100 mg（100 mgを越さないように）入れて液体窒素で瞬間凍結させた後、冷凍保存する（ -80°C で数ヶ月保存可）。

<Gene Quantの使用方法>

- ① Gene Quantの電源、プリンターの電源を入れる。
- ② RNAのボタンを押す。
- ③ Gene Quantの左上の棚にある黒色セルを水道水→MilliQ水で洗い、エタノールを十分に除き、水切りをした後、キムワイプで表面の水分を拭き取ってから、滅菌MilliQ水（約120 μl ）を入れてset refボタンを押してゼロ合わせを行う。
この時、セルの向きは、Qの文字が書いてある側を前に向ける。
- ④ セルにサンプル（100 μl 全量）を入れ、RNAボタンを押して測定を行う。
- ⑤ 全てのサンプルの測定が終わったら、セルを洗剤を用いて洗うが、決して内部及び測定部分に手を触れない。水の力だけで洗浄を行い、50% エタノール中に戻す。

解剖日以降 ※実験開始前に遠心機 4°C にする。

- ① 正確に100mgを計り、とってある組織の入った5mlサンプルカップにQIAzol Lysis Reagent を1.0ml加える(100mg以上は不可、脂肪の量に合わせる)。QIAzol Lysis Reagentを入れる前に組織を解凍しない。
- ② Rotor-stator (POLYTORON®PT10-35 KINEMATICA) により、5mlサンプルカップに入った組織を、サンプルが均一になるまでホモジナイズする（通常20～40秒，value 4～5）。ポリトロンシャフトの洗浄は1サンプル毎に行う。DEPC水で洗浄後、70%エタノールで洗う。洗浄用DEPC水は1群ごとに換える。

- ③ ホモジネートの入った5mlサンプルカップを室温(15°C~25°C)で5分間実験台に放置する。このステップは核タンパク質コンプレックスの解離を促進する。
- ④ 200µlのクロロホルムを添加する。ホモジネートの入ったサンプルカップの蓋をしっかりと閉め、15秒間ボルテックスした後、オートクレーブしてある1.5ml エッペンドルフチューブにピペットマンを用いて全量を移す。完全な混和は続く液層分離に重要である。
- ⑤ ホモジネートの入ったチューブを室温で2~3分間実験台に放置する。
- ⑥ 11440rpm、4°Cで15分間、遠心操作をする。同じ遠心機を次のプロトコールの遠心ステップで使用する場合には遠心後、空の状態にし、15,000rpmで数分間遠心し、室温(15~25°C)に戻す。遠心後、サンプルは3層、すなわち上層にRNAを含む無色の水層、白色の中間層、および下層の赤い有機溶媒層に分かれる。脂肪濃度が特別に高い組織では、透明な層が赤色の有機溶媒層の下に観察されることがある。水層の容量は約600µl。
- ⑦ 上層にある水層を新しい2 mlエッペンドルフチューブに移す。1容量(通常600µl)の70%エタノールを添加し、ボルテックスにより完全に混和する。遠心操作をしない。即座に次のステップに続く。このステップ中に水層液が全量採取できなかった場合にはエタノール容量を適宜調節する。エタノール添加後、沈殿が生じることがあるが、RNeasy操作には影響しない。
- ⑧ 形成した沈殿物を含め600µlのサンプルを、2ml のCollection tube (添付)にセットしたRNeasy Mini Spin Columnにピペットで入れる。10,000rpm以上、室温(15~25°C)で15秒間遠心操作する。フロースルー分画を捨てるが2 ml Collection tubeは再利用する。
- ⑨ 再利用の2 ml Collection tubeを付けたまま、残りのサンプルで⑧を繰り返す。フロースルー分画を捨てるが2 ml Collection tubeは再利用する。
- ⑩ 再利用の2 ml Collection tubeを付けたまま、350 µlのBuffer RW1をRNeasy mini spin columnに添加し、5分静置する。その後、10,000 rpmで15秒遠心する。遠心後、フロースルーは捨てるが2 ml Collection tubeは再利用する。
- ⑪ 再利用の2 ml Collection tubeを付けたまま、RNeasy mini spin columnのシリカゲルメンブレンに80 µlのDNase I Incubation Mixを直接添加し、室温 (20~30°C) で15分間インキュベートする。
- ⑫ 再利用の2 ml Collection tubeを付けたまま、350 µlのBuffer RW1をRNeasy mini spin columnに添加し、5分静置する。その後、10,000 rpmで15秒遠心する。遠心後、フロースルーと2 ml Collection tubeを捨てる。
- ⑬ 新しい2 ml Collection tubeを付け替えて、500 µlのBuffer RPEをRNeasy mini spin columnに添加し、10,000 rpmで15秒遠心する。遠心後、フロースルーは捨てるが2 ml Collection tubeは再利用する。

- ⑭ 再利用の2 ml Collection tubeを付けたまま、500 μ lのBuffer RPEをRNeasy mini spin columnに添加し、15,000 rpmで2分遠心する。遠心後、フロースルーと2 ml Collection tubeを捨てる。
- ⑮ RNeasy mini spin columnを新しい1.5ml Collection tubeに付け替え、RNeasy mini spin columnのシリカゲルメンブレンに40 μ lのRNase-free waterを直接添加する。15,000 rpm以上で1分遠心し、Total RNAを溶出させる。さらに、同様に40 μ lのRNase-free waterを使って同様の操作を繰り返す。最終的に、1.5 mlのCollection tubeに80 μ lの溶液が得られる。抽出したTotal RNAはパラフィルムで巻いて、-80°Cで保存する。

Total RNA濃度の測定

- ① 回収を行ったTotal RNAサンプルを氷上で融解させ、試験管に2 μ lずつ分注する。滅菌MilliQ水 498 μ lを試験管に加え、合計 2 mlにする (250倍希釈)。二連で測定する。
- ② vortexで混合する。
- ③ 吸光度計（日本分光, V-250）を用い、波長 260 nmで石英セルを使って吸光度を測定する。続いて、波長280 nmでの吸光度を測定する。260 nm Abs/280 nm Absの値が1.8～2.0の間であれば理想的である。
- ④ 計算

Total RNA濃度 (ng/ μ l) = (260 nm 2連の平均吸光度)×250倍×40(変換定数)

(2) 動物の肝臓、小腸からのRNA抽出法

【使用キット・試薬】

- RNeasy Protect Mini Kit (50) [QIAGEN, Cat.No.74124]
- RNase-Free DNase Set (50) [QIAGEN, Cat.No.79254]

(DNase処理をする場合に使用)

【試薬調製】

解剖用

- DEPC処理水

1 Lの三角フラスコにMilliQ水1 Lをメスシリンダーを用いて入れ、さらに、DEPC 1 mL加えて、スターラーを用いて攪拌する。その後、121°C、20分間オートクレーブしてDEPCを除去する。

- 生理食塩水 (0.9%食塩水)

ビーカーに9 gの塩化ナトリウムを測り、991 mLのMilliQをシリンダーを用いて入れ、溶けるまでスターラーを用いて攪拌する。その後、121°C、20分間オートクレーブする。

RNeasy Protect Mini Kit (50) について、

- Buffer RLT

1 mlのBuffer RLTあたり10 μ Lの β -mercaptoethanol (β -ME)を添加する。必要量のみ調製する。 β -ME添加後は1ヶ月以内に使用する。

- Buffer RPE

11 mL入ったボトルに直接、4倍量の特級エタノール (44mL)を添加する。

- 70% エタノール

特級エタノール 70 mLに0.1 % Diethyl Pyrocarbonate (DEPC) 処理水30 mLを添加する。必要量のみ調製する。

RNase-Free DNase Set (50) について、(DNase処理をする場合に調製)

- DNase Iストック溶液

凍結乾燥されたDNase I (1,500 Kunitz units) の入ったバイアルに対して、RNase-free water (付属)を550 μ L添加し、穏やかに転倒混合する。Vortexしてはいけない。-20°Cで最低9ヶ月保存可能。

・ DNase I Incubation Mix

1サンプルにつき、DNase Iストック溶液10 μ LとBuffer RDD 70 μ L (付属) を穏やかに混合して80 μ Lとする。必要量のみ調製する。2~8°Cで最高6週間保存可能。凍結させてはいけない。

【実験方法】

解剖日

オートクレーブした新しい1.5 mLエッペンにRNA *later* RNA stabilization Reagentをオートクレーブした1 mLチップを用いて1 mLずつ解剖当日分注する。

【肝臓から抽出する時】

- ①動物を心臓採血により屠殺した後、直ちに肝臓を摘出する。
- ②滅菌生理食塩水で肝臓を洗浄し、濾紙で拭く。この操作を2回行い、湿重量を測定する。
- ③30 mg程度切り出し、これを合計で100 mg未満になるように切り出す(合計約30 mgを3回)。DEPC処理水(0.1% DEPC処理滅菌MilliQ水)に浸け、キムワイプで拭いてからRNA *later* RNA stabilization Reagentが1 mL入ったエッペンドルフチューブに浸す。これを100 mg入れて冷蔵保存する (2-8°Cで最大4週間)。
- ④脂質分析用に2.0 g切り分け、アルミホイルに包んで水中保存後、-30°Cで保存する。残りは液体窒素で保存後、-80°Cで保存する。

【小腸から抽出する時】 ※氷上のアルミ板の上で行うこと。

- ①屠殺した動物から小腸を摘出する。胃側から取り出し、盲腸側を切断する。
- ②滅菌生理食塩水で洗浄 (1サンプル毎に交換する) し、キムワイプで水分を拭き取る。この操作を2回行う。
- ③胃と十二指腸を切断し、さらに上部、中部、下部に切断し、中部を破棄する。
- ④小腸を切り開く。上部は胃側から切り開き、下部は盲腸側から切り開くこと。
- ⑤滅菌生理食塩水で洗浄後、キムワイプで水分を軽く拭き取る。この操作は2回行う。
- ⑥滅菌したスパーテルで粘膜を掻き取る。
- ⑦粘膜を滅菌生理食塩水で洗浄後、キムワイプで水分を軽く拭き取る。この操作は2回行う。
- ⑧粘膜をDEPC処理水で洗浄し、キムワイプで軽く水分を拭き取る。この操作は1回で良い。
- ⑨粘膜120 mgを、RNA *later* RNA stabilization Reagentが1 mL入ったエッペンドルフチューブに浸し、冷蔵保存する (2-8°Cで最大4週間)。

〈小腸・肝臓からのRNAの抽出、精製〉

(注意)RNaseの混入を防ぐために、以下の操作はすべてゴム手袋を着用して行うこと。

- ①RNA later RNA stabilization Reagent中の組織を取り出し、キムワイプで液体を拭き取り、30 mgを正確に測り取って、新しい2.0 mLエッペンドルフチューブに移す。
- ②組織の入った2 mLエッペンドルフチューブに1 % β -ME含有Buffer RLT (β -ME添加済)を600 μ L加える(水中保存)。
- ③Rotor-stator (Value 4.5、30秒、(POLYTORON®PT10-35KINEMATICA))により、2.0 mLエッペンドルフチューブに入った組織をホモジナイズしてサンプルを均一にする。ポリトロンシャフトの洗浄は1サンプル毎に行う。DEPC水で洗浄後、70%エタノールで洗う。洗浄用DEPC水は1群ごとに換える。
- ④組織ライセートをさらにマイクロ遠心機 (eppendorf 5424R) を用いて15000 rpmで3分遠心操作を行う。600 μ L上清全量をピペットで新しい1.5 mLエッペンドルフチューブに移す。この上清のみを次のステップで使用する。
- ⑤上清と同量の600 μ Lの70% EtOHを加えて、すぐピペットでよく混合する。沈殿を含む1200 μ Lのうち600 μ Lを2.0 mLコレクションチューブにセットしたRNeasyミニスピнкаラムに供する。
- ⑥15000 rpmで15秒遠心する。遠心後フロースルーを捨てる。さらに残りの600 μ Lをカラムに加えて15000 rpmで15秒遠心し、遠心後フロースルーを捨てるがコレクションチューブは再利用する。
- ⑦再利用のコレクションチューブをつけて、350 μ LのRW1 Bufferをカラムに加える。10000 rpmで15秒遠心し、遠心後フロースルーを捨てるがチューブは再利用する。
- ⑧再利用のコレクションチューブをつけて、カラムのシリカゲルメンブランに80 μ LのDNaseIincubation Mixを直接ピペットで添加し、室温で15分インキュベートする。
- ⑨再利用のコレクションチューブをつけて、350 μ LのRW1 Bufferをカラムに加える。10000 rpmで15秒遠心し、遠心後フロースルーとコレクションチューブを捨てる。
- ⑩新しい2.0 mLコレクションチューブにつけかえて、500 μ LのEtOH含有Buffer RPEをカラムに加える。15000 rpmで15秒遠心操作する。フロースルーは捨てるがチューブは再利用する。
- ⑪再利用のコレクションチューブをつけて、500 μ LのEtOH含有Buffer RPEをカラムに加える。15000 rpmで2分遠心操作する。フロースルーとコレクションチューブを捨てる。
- ⑫カラムを新しい1.5 mLコレクションチューブに移し、RNeasyシリカゲルメンブランに50 μ LのRNase-free waterを直接ピペットで添加する。15000 rpmで1分遠心分離を行い溶出させる。2度目の溶出は、50 μ LのRNase-free waterを使って同じエッペンドルフチューブに溶出する(パラフィルムで巻いて、-80°C保存)。

<トータルRNAの濃度測定>

(4)RNA濃度の測定

①エッペンドルフチューブにRNAサンプル原液2 μL を2連でとり、滅菌水98 μL を加え、合計100 μL にする(50倍希釈)。

②vortexで混合する。

③波長260 nmと280 nmで石英セルを使って吸光度を測定する。

“計算方法”：RNA濃度($\mu\text{g/mL}$)= $\text{Abs}_{260} \times 50$ (希釈倍率) $\times 40$ (固有値)

<Gene Quantの使用方法>

①Gene Quantの電源、プリンターの電源を入れる。

②RNAのボタンを押す。

③Gene Quantの左上の棚にある黒色セルを水道水→MilliQ水で洗い、エタノールを十分に除き、水切りをした後、キムワイプで表面の水分を拭き取ってから、滅菌MilliQ水（約120 μl ）を入れてset refボタンを押してゼロ合わせを行う。この時、セルの向きは、Qの文字が書いてある側を前に向ける。

④セルにサンプル（100 μl 全量）を入れ、RNAボタンを押して測定を行う。

⑤全てのサンプルの測定が終わったら、セルを洗剤を用いて洗うが、決して内部及び測定部分に手を触れない。水の力だけで洗浄を行い、50% エタノール中に戻す。

7. RT 反応

【使用キット】

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems、Part Number: 4368813)

※ 各操作は氷上で行い、冷凍の試薬および Total RNA サンプルは氷中で融解させる。

<2X RT Master Mix の作製方法>

以下の表を使用して、必要量の 2X RT Master Mix を計算し、調製する。

表. 1 サンプル当たりの 2X RT Master Mix に必要な量

Component	Volume (μl) / Reaction
10X Reverse Transcription Buffer	2.0
25X dNTPs	0.8
10X random primers	2.0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0
Nuclease-free H ₂ O (滅菌 MilliQ 水)	4.2
Total Volume	10.0

2X RT Master Mix を必要なサンプル数+α の用量を滅菌した 1.5 ml エッペンドルフチューブにまとめ作る。

<RT 反応に用いる Total RNA サンプルの調製>

細胞から回収した Total RNA サンプルを 100 ng/μl (動物の肝臓から回収した Total RNA サンプルは 200 ng/μl)となるように、滅菌したマイクロチューブ (RIKAKEN、RS-PCR-1F) にて希釈し、これを希釈 Total RNA サンプルとする。※RT 反応に必要な希釈 Total RNA サンプルの量は 10 μl なので、それ以上の量を調製する。

<RT 反応の実行>

滅菌した 0.2 ml チューブ (RIKAKEN、RS-PCR-1F) に調製した 2X RT Master Mix を 10 μl ずつ分注し、そこへ希釈 Total RNA サンプルを 10 μl 加える。サーマルサイクラー (TaKaRa TP-3000) で下記の条件に従い、RT 反応を行う。

サーマルサイクルの条件

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4 ^(※)
Temp	25°C	37°C	85°C	4°C

Time	10 min	120 min	5 min	99 min
------	--------	---------	-------	--------

※ Step 4 の 4°C は予備冷却であり、4°C で 99 min 置いておく必要はない。

RT 反応後にできた溶液 20 μ l から 10 μ l を別の 0.2 ml チューブに分注し、90 μ l の滅菌 MilliQ 水をそれぞれに加えて 10 倍希釈する。これを cDNA サンプルとし、Real-time 定量 PCR 等に使用する。保存する場合は、-20°C にて保存を行う。

8. Syber Green を用いたリアルタイム PCR ($\Delta\Delta C_t$ 法)

<試薬保管場所> 以下の試薬などは、Rm322 冷凍庫 SANYO (−20℃保管)

SYBR® Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (2×) (TAKARA RR420S)

ROX Reference Dye (50×) (TAKARA RR420S)

Forward プライマー (Star Oligo、理科研)

Reverse プライマー (Star Oligo、理科研)

標的遺伝子のプライマー配列 (マウス)

Gene	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
ABCA1	CTTCCCACATTTTGCCTGG	AAGGTTCCGTCCTACCAAGTCC
ACOX	AGCGAGCCAGAGCCCCAG	TCAGGCAGCTCACTCAGG
Adiponectin	TACAACCAACCAACAGAATCATTATGACGG	GAAAGCCAGTAAATGTAGAGTCGTTGA
AMPK	CATGGCTGAGAAGCAGAAGCAC	CTTAAGTCCACTTTATGGCCTG
CPT1	GGATCTACAATTCCCCTCTGC	GCAAAATAGGTCTGCCGACA
CYP7A1	AGCAACTAAACAACCTGCCAGTACTA	GTCCGGATATTCAAGGATGCA
FAS	TTCCAAGACGAAAATGATGC	AATTGTGGGATCAGGAGAGC
HMGCR	CCTGGGCCCCACATTCA	GACATGGTGCCAACTCCAATC
HSL	ACCGAGACAGGCCTCAGTGTG	GAATCGGCCACCGGTAAAGAG
LDLR	TGTGAAAATGACTCAGACGAACAA	GGAGATGCACTTGCCATCCT
PPAR α	TCAGGGTACCACTACGGAGTTCA	CCGAATAGTTCGCCGAAAGA
PPAR γ 1	GGTGAACCACTGATATTCAGGACA	TGTGTCAACCATGGTAATTTTCAGT
PPAR γ 2	TGAGCACTTCACAAGAAATTACC	TGCGAGTGGTCTTCCATCAC
SCD-1	TTCTTGCGATACACTCTGGTGC	CGGGATTGAATGTTCTTGTCGT
SREBP1	CTTTGGCCTCGCTTTTCGG	TGGGTCCAATTAGAGCCATCTC
SREBP2	GTGCGCTCTCGTTTTACTGAAGT	GTATAGAAGACGGCCTTCACCAA
β -actin	TGTCCACCTTCCAGCAGATGT	AGCTCAGTAACAGTCCGCCTAGA

標的遺伝子のプライマー配列 (ヒト)

Gene	Forward primers (5'→ 3')	Reverse primers (5'→ 3')
<i>ACACA</i>	GGCATTGCCTTCATGGGTC	GCCACTATGGAAGATGCAATCTTA
<i>ACACB</i>	AGGTCCTGGGAAGAGAGGTC	GTAGGGAGCTCTGGATGGGA
<i>ACADM</i>	ACAGGGGTTCAGACTGCTATT	TCCTCCGTTGGTTATCCACAT
<i>ACADVL</i>	ACAGATCAGGTGTTCCCATACC	CTTGGCGGGATCGTTCACTT
<i>ACLY</i>	TCGGCCAAGGCAATTCAGAG	CGAGCATACTTGAACCGATTCT
<i>ACOX1</i>	TCCTGCCCACCTTGCTTCAC	TTGGGGCCGATGTCACCAAC
<i>ACSL1</i>	CTTCTGGTACGCCACGAGAC	GTCGCTGTCAAGTAGTGCG
<i>APOB</i>	GCCATTGCGACGAAGAAAATA	TGACTGTGGTTGATTGCAGCTT
<i>ATGL</i>	GGACCTGCTGACCACCCTCT	CGTCTGCTCCTTCATCCACC
<i>CD36</i>	CAATTAAAAAGCAAGTTGTCCTCGA	ATCACTTCCTGTGGATTTTGCA
<i>CGI-58</i>	TGGATTCTTGGCTGCTGCTTAC	TTAAAGGGAGTCAATGCTGCTC
<i>CPT1</i>	TGAGCGACTGGTGGGAGGAG	GAGCCAGACCTTGAAGTAGCG
<i>DGAT1</i>	GGCCTTCTTCCACGAGTACC	GGCCTCATAGTTGAGCACG
<i>DGAT2</i>	TGGGGGCTGGTGGCCTACTC	AATTGGCCCCGAAGGCTGGC
<i>EVOLV6</i>	GAAGATCAGCCCCAATGAA	CAGAGACCAGAGCACTAAT
<i>FABP1</i>	TGTCGGAAATCGTGCGAG	GATTATGTCGCCGTTGAGTT
<i>FASN</i>	AGTGCCAGAGTCGGAGAAC	TGTAGCCCACGAGTGTCTCG
<i>GOS2</i>	CCTCTTCGGCGTGGTGCT	CTGCTGCTTGCCTTTCTCC
<i>MTTP</i>	ACCTGCAGACGTGTATTCATTC	CCCAGCTAGGAGTCACTGAGA
<i>PepT1</i>	GGCCAGTTCAGCAAACAGTG	GTCCATCCTCCACTTGCCCTC
<i>PPARα</i>	CCTCTCAGGAAAGGCCAGTA	TCCACAGCAAATGATAGCAG
<i>SCD1</i>	TGGTTTCACTTGGAGCTGTG	GGCCTTGGGAGACTTTCTTCC
<i>SLC25A20</i>	GGGGTCACTCCCATGTTTG	TGTGGTGAATACGCCAGATAAC
<i>SREBF1</i>	GGAGGGGTAGGGCCAACGGCCT	CATGTCTTCGAAAGTGCAATCC
<i>β-actin</i>	CCAACCGCGAGAAGATGA	CCAGAGGCGTACAGGGATAG
<i>18S</i>	CTCAACACGGGAAACCTCAC	CGCTCCACCAACTAAGAACG

<測定機器> StepOnePlus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems)

<サンプルの調製>

1. 18S 以外の測定用 : 5 ng/μl cDNA サンプルを使用する。
2. 18S 測定用 : 滅菌超純水 998 μl を加えた 1.5 mL チューブ (Eppendorf、0030 120.086) に、1.の 5 ng/μL cDNA サンプルを 2 μl 加え、500 倍希釈 cDNA (0.01 ng/μl) サンプルを調製する。

<プライマーの調製>

1. ネジ付チューブに入った凍結乾燥プライマー (Star Oligo、理科研) に、付属のデータシートに記載された量の滅菌超純水を加え、ボルテックスし、100 μM に調製する (通常 -20°C 保存)。
2. 滅菌超純水 90 μl を加えた 1.5 mL チューブ (Eppendorf、0030 120.086) に、1. で調製した 100 μM プライマーを 10 μl 加え、ボルテックスし、10 μM に調製する (通常 -20°C 保存) (→この 10 μM のプライマーを PCR に使用)

<PCR 反応液の調製>

1. 以下の反応液を、「サンプル数+1」の容量で 1.5 mL チューブ (Eppendorf、0030 120.086) に調製し、氷中保存する。

SYBR® Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (2×)	10.0 μl	(TAKARA RR420S)
ROX Reference Dye (50×) (蓋に黄色丸)	0.4 μl	(TAKARA RR420S)
Forward プライマー (10 μM)	0.4 μl	(Star Oligo、理科研)
Reverse プライマー (10 μM)	0.4 μl	(Star Oligo、理科研)
滅菌超純水	6.8 μl	
Total		18.0 μl

2. 氷上に置いた BIO-BIK 96well PCR プレート (イナオプティカ、3426-00) に、1. で調製した反応液を転倒混和後に、18 μl ずつ壁をつたわせて加える。ただし、サンプル数が少ない場合は、PCR プレートではなく BIO-BIK 8chPCR チューブ (イナオプティカ、3246-00) を使用する (要検討)。なお、PCR プレートには、マジックなどで記載しない。
3. 2. の反応液が入ったプレートに、cDNA 溶液を転倒混和後、2 μl ずつ壁につけるよう加える。
4. プレートにクリアシール (イナオプティカ、3612-00) を、青色のヘラを用いて密着させ、約 10 秒間遠心 (Labnet、mini plate spinner mps1000) した後 (遠心後に気泡が残っても OK)、氷上保存する。

<StepOnePlus™ Real Time PCR System の操作>

1. PC を起動させ、User name : 「Administrator」のまま、Password : 空欄のまま、[OK] ボタンをクリックする。
2. StepOnePlus 本体裏にある電源を入れる (安定したら本体の画面表示が切り替わる、約 10 分)。
3. PC のデスクトップ上にあるショートカット [StepOnePlus™ Software V2.2.2] をクリックし、ソフトを起動させる。
4. Login 画面が出てきたら、User Name : 「GUEST」のまま [OK] をクリックする。

5. [Advanced Setup] をクリックすると [Experiment Properties] の項目に移動する。
6. Experiment Name 「日付+測定遺伝子名など」をアルファベットで入力し、以下にある4つの項目を上から [StepOnePlus™ Instrument (96 wells)], [Quantitation-Comparative Ct ($\Delta\Delta Ct$)], [Syber®Green Reagents], [Fast (~40 minutes to complete a run)] をクリックし選択する。
7. 画面左側にある Setup のうち、[Plate Setup] をクリックし [Plate Setup] の項目に移動する。
8. タブ [Define Targets and Samples] の設定が表示されるがそのままでよい。
9. タブ [Assign Targets and Samples] をクリックし、実際にサンプルを入れたウェルと同じところを、画面右の [View Plate Layout] で選択する。
10. [Assign target(s) to the selected wells] と [Assign sample(s) to the selected wells] の2ヶ所の Assign ☐ をクリックし、チェック ☒ を入れる。
11. [Select the dye to use as the passive reference] は、「ROX」を選択する。
12. 画面左側にある Setup のうち、[Run Method] をクリックし [Run Method] の項目に移動する。
13. タブ [Graphical View] の設定で、Reaction Volume Per Well : 「20」 μL と入力する。
14. [Open Run Method] をクリックし PCR 反応条件を設定したテンプレート [kinou takara syber] を選択し、[OK] をクリックする。

～SYBR® Premix Ex Taq の反応条件 (2 ステップ PCR) ～

• Holding Stage	95°C	30 秒	1 サイクル	
• Cycling Stage	95°C	5 秒	40 サイクル	}
	60°C	30 秒		
• Melt Curve Stage	95°C	15 秒	1 サイクル	}
	60°C	60 秒		
	95°C	15 秒		

上記反応条件であることを確認する。

15. StepOnePlus 本体にプレートを設定する。
16. [START RUN] をクリックし、名前 (日付+遺伝子名など) をつけてファイルを保存する (save をクリックする) と、測定を開始する。
17. 測定終了後、StepOnePlus 本体からプレートを取り出す。
18. StepOnePlus 本体に USB を差し、本体画面右上の [Collect Results] を押しデータを回収する。
19. StepOnePlus 本体から USB を取り外した後、本体画面左下の青いボタンを押すと、Power Off が表示されるので、[Yes] を押す。

20. StepOnePlus 本体裏にある電源を切る。
21. PC の電源を切る。
22. 遺伝子実験施設の StepOnePlus 使用記録を指定ノートに記入する。

<データ解析>

1. StepOnePlusTM Software V2.2.2 をインストールした Rm643 の PC で、StepOnePlusTM Software V2.2.2 を開く。
2. USB で回収したデータを開く。
3. [Export]をクリックし、データの保存場所（たとえば、デスクトップ）した後に、[Start Export]をクリックし、データをエクセルファイルでエクスポートする。
4. エクセル上に記載された Ct 値を使用して、 $2^{-\text{(ターゲット遺伝子 Ct - 補正遺伝子 Ct)}}$ で相対 mRNA 発現量を計算する。

9. HepG2 細胞の継代、培養方法

(1) MEM の調製 (pH 調整用)

MEM

MEM (MP Biochemicals、1110020) 4.705 g を 422.63 ml の MilliQ 水に溶解した。

非必須アミノ酸

MEM Non-Essential Amino Acids solution 10 mM 100 × (GIBCO、11140-050)

3% L-グルタミン溶液

L-グルタミン (GIBCO、21051-024) 15 g を 500 ml の MilliQ 水に溶解させ、濾過滅菌 (CORNING、430513) した後、培地の調製まで -20℃ にて保存した。

ペニシリン-ストレプトマイシン-ゲンタマイシン溶液

ペニシリン G カリウム (Wako、023-07731) 437 mg、ストレプトマイシン硫酸塩 (Wako、077-02974) 871 mg、ゲンタマイシン硫酸塩 (Wako、196-08511) 312.5 mg を 0.9% NaCl MilliQ 水溶液 50 ml に溶解させ、濾過滅菌 (CORNING、430624) した後、培地の調製まで 4℃ にて保存した。

0.5M pyruvate

Sodium Pyruvate (Wako、199-03062) 5.5 g をとり、100 ml の MilliQ 水に溶解させ、濾過滅菌 (CORNING、430624) し、4℃ にて保存した。

8 % NaHCO₃ (炭酸水素ナトリウム) 溶液

炭酸水素ナトリウム (Wako、191-0130) 8 g を 100 ml の MilliQ 水に溶解する。その後、オートクレーブ (121℃、20 分) し、4℃ にて保存した。

ウシ胎児血清(FBS)

-20℃ にて保存したウシ胎児血清 (Biosera、Lot No. 015BS482) を 37℃ で融解し、非動化 (56℃、30 分) でした。攪拌後、滅菌した 50 ml チューブ (CORNING、430291) に分注し、-20℃ にて保存した。

【調製方法】

MEM 422.63 ml に、非必須アミノ酸 5 ml、3% L-グルタミン溶液 4.87 ml、ペニシリン-ストレプトマイシン-ゲンタマイシン溶液 4 ml、pyruvate 1 ml、炭酸水素ナトリウム 12.5 ml を加えて混合した。1 M HCl で pH を 7.1 に調製し、濾過滅菌 (CORNING、430513) した。

その後、ウシ胎児血清 50 ml を加え混合し、使用まで 4℃ で保存し細胞培養用培地とした。

(2) PBS (Phosphate buffer saline) の調製

Na₂HPO₄ · 12H₂O (Wako、196-02835) 13.1 g、KH₂PO₄ (Wako、169-04245) 2.5 g、NaCl (Wako、191-01665) 1.17 g を MilliQ 水 500 mL に溶解し、オートクレーブ (121℃、20 分) 後、4℃ で保存した。

(3) トリプシン-EDTA-2Na 溶液の調製

5 %トリプシン溶液の調製

Trypsin (TRYPSIN 1 : 250、Wako、525-00921) 25 g を 500 ml の PBS に調製し、スターラーで、4°C、一晚撹拌した。翌日振とうしながら 37°C、30 分間インキュベートした。その後 8000 rpm、30 分間遠心分離し、上清を濾過滅菌 (Nalgene、155-0020) し、4°Cで保存した。

3 % EDTA-2Na 溶液の調製

EDTA-2Na (SIGMA、E5134) が PBS に対して 3 % になるように溶解し、オートクレーブ (121°C、20 分) 後、4°Cで保存した。

【調製方法】

PBS 470 ml、5 %トリプシン溶液 25 ml、3 % EDTA-2Na 溶液 5 ml をクリーンベンチ内で混合してトリプシン-EDTA-2Na 溶液を調製した。

(4) トリパンブルーの調製

Trypan Blue (Wako、207-03252) を 30 mg/ml となるように滅菌 MilliQ 水に溶解し、4°Cで保存した。

(5) 細胞の継代方法

※パスツールピペット (10 本ほど)、短い 10 ml ピペット (1 本+ α)、長い 10 ml ピペット (2 本+ α)、25 ml ピペット(2 本+ α)、50 ml チューブ (2 本)、p-200 ピペットマン (1 本)、エッペンドルフチューブ (1 個)、p-200 チップ (1 本) がクリーンベンチ内に入っているかどうかを確認し、湯浴で MEM を 37°Cに温める。

【細胞の継代方法】

- ① 細胞がコンフレントに達した 10 cm dish (CORNING、430167) から MEM をパスツールピペットで吸引除去し、短い 10 ml ピペットでトリプシン-EDTA-2Na 溶液 4 ml を加え、吸引除去し、再びトリプシン-EDTA-2Na 溶液 4 ml を加え、吸引除去した。
- ② CO₂ インキュベーター (37°C、5 % CO₂) にて 5 分間インキュベートした。
- ③ 長い 10 ml ピペットで MEM 10 ml を添加し、dish の中でピペッティングを繰り返し、細胞を剥がして 50 ml チューブ (CORNING、430291) に移し、さらにピペッティングを数回行い懸濁した。
- ④ この懸濁液を、p-200 ピペットマンで 200 μ l とり、滅菌したエッペンドルフチューブ (eppendorf、0030 120.086) に入れ、フタを閉じ、クリーンベンチから出した。

- ⑤ エッペンドルフチューブの中の懸濁液に、トリパンブルー (Wako、207-03252) を 10 μ l 入れ、数回ピペッティングした後、その 10 μ l をとって Neubauer 型血球計算盤を用いて細胞数を求め、次の継代までにコンフレントに達するために必要な細胞量と MEM 量を計算した。
- ⑥ クリーンベンチ内で、新しい 50 ml チューブ (CORNING、430291) に 25 ml ピペットで MEM を必要量入れ、さらに長い 10 ml ピペットで細胞を必要量入れ、ピペッティングを数回行い懸濁した。(※細胞を死なせないために、長い 10 ml ピペットは培地を吸って出して、冷まして使う。)
- ⑦ クリーンベンチ内に新しい 10 cm dish (CORNING、430167) を 4 枚入れ、⑥で作った細胞懸濁液を、dish の中へ 10 ml ずつ加えた。
- ⑧ CO₂ インキュベーターに入れ、dish を縦方向、横方向に 3 回ほど揺らして細胞を均一にした後、37°C、5 % CO₂ で培養した。

【培地交換の方法】

- ① 細胞の入った 10 cm dish (CORNING、430167) から MEM をパスツールピペットで吸引除去し、25 ml ピペットで新しい MEM を 10 ml 入れた。
- ② CO₂ インキュベーター (37°C、5 % CO₂) に入れて培養した。

10. HepG2 細胞へのサンプル添加

(1) 血清フリーMEM 培地の作製

MEM

MEM (MP Biochemicals、1110020) 4.705 g を 472.63 ml の MilliQ 水に溶解した。

非必須アミノ酸

MEM Non-Essential Amino Acids solution 10 mM 100 × (GIBCO、11140-050)

3% L-グルタミン溶液

L-グルタミン (GIBCO、21051-024) 15 g を 500 ml の MilliQ 水に溶解させ、濾過滅菌 (CORNING、430513) した後、培地の調製まで-20℃にて保存した。

ペニシリン-ストレプトマイシン-ゲンタマイシン溶液

ペニシリン G カリウム (Wako、023-07731) 437 mg、ストレプトマイシン硫酸塩 (Wako、077-02974) 871 mg、ゲンタマイシン硫酸塩 (Wako、196-08511) 312.5 mg を 0.9% NaCl MilliQ 水溶液 50 ml に溶解させ、濾過滅菌 (CORNING、430624) した後、培地の調製まで 4℃にて保存した。

0.5M pyruvate

Sodium Pyruvate (Wako、199-03062) 5.5 g をとり、100 ml の MilliQ 水に溶解させ、濾過滅菌 (CORNING、430624) し、4℃にて保存した。

8 % NaHCO₃ (炭酸水素ナトリウム) 溶液

炭酸水素ナトリウム (Wako、191-0130) 8 g を 100 ml の MilliQ 水に溶解する。その後、オートクレーブ (121℃、20 分) し、4℃にて保存した。

【調製方法】

MEM 472.63 ml に、非必須アミノ酸 5 ml、3%L-グルタミン溶液 4.87 ml、ペニシリン-ストレプトマイシン-ゲンタマイシン溶液 4 ml、pyruvate 1 ml、炭酸水素ナトリウム 12.5 ml を加えて混合した。1 M HCl で pH を 7.1 に調製し、濾過滅菌 (CORNING、430513) した。

使用まで 4℃で保存し、血清フリーMEM 培地とした。

(2) 血清フリーDMEM 培地の作製

① DMEM

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 4.75 g を 1000 ml ビーカーに入れ、469 ml の MilliQ 水を加えてラップをし、スターラーで攪拌した。

ダルベッコ変法イーグル培地「ニッスイ」② 粉末 (日水製薬 Code 05919)

② 非必須アミノ酸 (1 %)

MEM Non-Essential Amino Acids Solution 10 mM 100× (GIBCO 11140-050)

③ 3% L-グルタミン溶液 (0.6 mg/ml)

L-グルタミン 15 g を 500 ml の MilliQ 水に溶解させ、濾過滅菌 (CORNING 430513; 500 mL Bottle Top Filter w/45mm Neck .22 µm CA(Cellulose Acetate) Sterilizing、Low Protein Binding Membrane Non-Pyrogenic Polystyrene) した後、50 ml 滅菌チューブに分注し、培地の調製まで-20 °Cにて保存する。

L-Glutamine (GIBCO BRL 21051-024)

④ ペニシリン-ストレプトマイシン-ゲンタマイシン溶液

ペニシリン G カリウム 437mg、ストレプトマイシン硫酸塩 871 mg、ゲンタマイシン硫酸塩 312.5 mg を 0.9% NaCl MilliQ 水溶液 50ml に溶解させ、濾過滅菌 (CORNING 430624; 150 mL Bottle Top Filter w/33mm Neck .22 µm CA(Cellulose Acetate) Sterilizing、Low Protein Binding Membrane Non-Pyrogenic Polystyrene) した後、培地の調製まで-20 °Cにて保存する。

ペニシリン G カリウム (Wako 023-07731)

ストレプトマイシン硫酸塩 (Wako 196-08511)

ゲンタマイシン硫酸塩 (Wako 077-02974)

⑤ 8%炭酸水素ナトリウム溶液

炭酸水素ナトリウム 8 g を 100 ml の MilliQ 水に溶解する。その後、121 °Cで 20 分間オートクレーブし、培地の調製まで 4 °Cで保存する。

炭酸水素ナトリウム (Wako 191-01305)

(3) サンプル添加用の培地調製

- ・ 2 mM Arg-Pro-Arg (RPR) 調製の場合

50 ml 滅菌チューブ (CORNING、430291) に 11.65 mg の RPR 酢酸塩 (ペプチド研究所、AH-187、121-905161) を秤りとり、10 ml の以下に記載するオレイン酸含有 DMEM 培地を加えて攪拌した。その後、1 N HCl を添加することにより、pH を 7.1 に調整した。0.20 μ m Cellulose Acetate フィルター (ADVANTEC、Cat No. 25CS020AS) で滅菌濾過し、2 mM RPR を調製した。

- ・ 2 mM オレイン酸 (Sigma-Aldrich、O-1383) + 10% FBS 含有 DMEM の調製

105.9 mg のオレイン酸をはかり取り、1.5 mL の 50% エタノールに溶解する。(250 mM オレイン酸を調製)。その後、160 μ L の 250 mM オレイン酸を 20 mL の 10% FBS 含有 DMEM (w/v) に加え (125 倍希釈 = 2 mM オレイン酸を調製、EtOH 終濃度 0.4%)、125 回/分、37°C で 2 時間振盪する。n=6 で 4plate を使って実験をするときは、1 時間後に同様の操作を行い、後半の培地を調製する。添加前に濾過滅菌する。

- ・ 1% BSA (脂肪酸フリー) 含有 DMEM の調製

100 mg の BSA (脂肪酸フリー) (wako、017-15141) を 50 mL チューブにはかり取り、10 mL の DMEM を加えてろ過滅菌する。

- ・ 2 mM オレイン酸 (Sigma-Aldrich、O-1383) +

1% BSA (wako、017-15141) 含有 DMEM の調製

105.9 mg のオレイン酸をはかり取り、1.5 mL の 50% エタノールに溶解する。(250 mM オレイン酸を調製)。その後、160 μ L の 250 mM オレイン酸を 20 mL の 1% BSA 含有 DMEM (w/v) に加え (125 倍希釈 = 2 mM オレイン酸を調製、EtOH 終濃度 0.4%)、125 回/分、37°C で 2 時間振盪する。1 時間後に同様の操作を行い、後半の培地を調製する。添加前に濾過滅菌する。

11. HepG2 細胞における WST-1 法による細胞増殖に対する影響評価

<使用キット>

TaKaRa Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System 25ml (MK400)

※試薬溶液は 4℃、遮光保存で数週間安定。

長期保存する場合は 1.5 ml エッペンドルフチューブに使い切り量 (410 μ l) に分注し、アルミホイルで遮光し、-20℃で保存する。

<実験操作>

- ① 1 日目、HepG2 細胞を 10% FBS 含有 MEM を用いて 96 well plate (Costar、3596) に 2×10^4 cells/well の濃度 (100 μ l/well) で播き、CO₂ インキュベーター (37℃、5% CO₂) 内で 24 時間インキュベートした。
- ② 2 日目、細胞の接着を確認後、10% FBS 含有 MEM を吸引除去し、血清フリーMEM 100 μ l で洗浄、Control 群 (サンプル無添加群) の場合は血清フリーMEM を、サンプル添加群の場合はサンプルを含んだ血清フリーMEM を 100 μ l/well となるよう培地交換し、CO₂ インキュベーター (37℃、5% CO₂) 内で 24 時間インキュベートした。
- ③ 3 日目、Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System を 1 well あたり 10 μ l ずつ加え、CO₂ インキュベーター (37℃、5% CO₂) 内で 1.0 時間インキュベートした。
- ④ インキュベート後、マイクロプレートリーダーで最大吸光 450 nm (参照波長: 630 nm) における吸光度を測定した。

12. HepG2 細胞からの Total RNA の単離

<使用試薬・機器>

- RNeasy Protect Mini Kit (50) (Qiagen、74124)
- RNase-Free DNase Set (50) (Qiagen、79254)
- QIAshredder (250) (Qiagen、79656)
- GeneQuant pro (GE Healthcare)

<試薬調製>

Buffer RLT

1 ml の Buffer RLT あたり 10 μ l の β -mercaptoethanol (β -ME) (Wako、137-06862) を添加した。

Buffer RPE

11 ml 入ったボトルに直接、44 ml の特級 Ethanol (Wako、057-00451) を添加した。

70 % Ethanol

特級 Ethanol (Wako、057-00451) 70 ml と MilliQ 水 30 ml を混合した。

DNaseI ストック溶液

凍結乾燥された DNaseI の入ったバイアルに対して、RNase-free water (付属) を 550 μ l 添加し、穏やかに混合した。(Vortex はしない。) -20°C で最高 9 ヶ月間保存可能。

DNaseI Incubation Mix

1 サンプルにつき、DNaseI ストック溶液 10 μ l と Buffer RDD 70 μ l (付属) を穏やかに混合して 80 μ l とした。(2~8°C で最大 6 週間保存可能。凍結させてはいけない。)

【実験操作方法】

- ① 6 well plate (FALCON、353046) で培養した細胞の培地を 1 ml 回収し、残りの培地を除去した後、トリプシンを 1 ml ずつ各 well に加え、すぐに吸引除去した (これを 2 回繰り返す)。その後、CO₂ インキュベーター内で 5 分間インキュベートした。
- ② PBS を 1ml ずつ各 well に加え、ピペットマンを用いて細胞をはがし、全量をそれぞれ 1.5ml エッペンドルフチューブに移した。
- ③ 25°C、5,000×g で 5 分間遠心し、ペレットを残し、上澄みをピペットマンで除去した。
- ④ ペレットの入った 1.5 ml エッペンドルフチューブに Buffer RLT を 350 μ l 加え、ペレットが見えなくなるまで 1 分間以上 vortex してよく混合した。
- ⑤ ライセートを 2 ml Collection tube を付けた QIAshredder spin column に直接ピペットマンで添加し、15,000 rpm で 2 分間遠心した。

- ⑥ ライセートと同量の 350 μ l の 70 % Ethanol をクリアなライセートに添加し、直ちにピペットマンでよく混合した。
- ⑦ 沈澱を含む 700 μ l を、2ml Collection tube を付けた RNeasy mini spin column に添加し、8,000 $\times$ g で 15 秒間遠心した。遠心後、フロースルーは捨てるが、2 ml Collection tube は再利用した。
- ⑧ 再利用の 2 ml Collection tube を付けたまま、350 μ l の Buffer RW1 を RNeasy mini spin column に添加し、8,000 $\times$ g 以上で 15 秒間遠心する。遠心後、フロースルーは捨てるが 2ml Collection tube は再利用した。
- ⑨ 再利用の 2 ml Collection tube を付けたまま、RNeasy mini spin column のシリカゲルメンブレンに 80 μ l の DNaseI Incubation Mix を直接添加し、室温 (20-30°C) で 15 分間インキュベートした。
- ⑩ 再利用の 2ml Collection tube を付けたまま、350 μ l の Buffer RW 1 を RNeasy mini spin column に添加し、8,000 $\times$ g 以上で 15 秒間遠心する。遠心後、フロースルーと 2 ml Collection tube を捨てた。
- ⑪ 新しい 2 ml Collection tube に付け替えて、500 μ l の Buffer RPE を RNeasy mini spin column に添加し、8,000 $\times$ g 以上で 15 秒間遠心した。遠心後、フロースルーは捨てるが 2 ml Collection tube は再利用した。
- ⑫ 再利用の 2 ml Collection tube を付けたまま、500 μ l の Buffer RPE を RNeasy mini spin column に添加し、8,000 $\times$ g で 2 分遠心した。遠心後、フロースルーと 2 ml Collection tube を捨てた。(この時、ろ液とスピнкаラムが接触しないよう注意深くカラムを取り出す。スピнкаラムの外側にろ液が残った場合は、RNeasy mini spin column を新しいスピнкаラムに移し、15,000 rpm で 1 分間遠心する。)
- ⑬ RNeasy mini spin column を新しい 1.5 ml Collection tube に付け替え、RNeasy mini spin column のシリカゲルメンブレンに 50 μ l の RNase-free water を直接添加した。8,000 $\times$ g 以上で 1 分間遠心し、Total RNA を溶出させた。さらに、同様に 50 μ l の RNase-free water を使って同じ 1.5 ml Collection tube に溶出した。抽出した Total RNA は-80°Cで保存した。

13. HepG2 細胞からのトリグリセリド回収

細胞を回収する前に細胞を培養した全ての well から 1 mL ずつ培地を回収する。この培地は-20 °C で保存する。その後は以下に従って細胞を回収する。※実験前に氷を用意する。

- ①クリーンベンチ内で細胞を冷 PBS で 1 回洗浄した後、5% NP-40 (CALEIOCHEM、492016) 含有 MilliQ 溶液を 1 mL 加える。その後 P2 の外に出す。
- ②氷上に細胞を置きながら、ラバーポリスマン（群ごとにエタノールで滅菌、その後 MilliQ で洗浄）で細胞をはがし、p-1000 を使って全量を 1.5 mL エッペンチューブに移す（ここで終わるなら試料を-20 °Cで保存する）。
- ③それを 15 秒間ボルテックスし、27G 注射針と 1 mL シリンジを用いて吸引と排出の往復を 5 回繰り返して、ホモジナイズを行う。
- ④その後、試料の入った 1.5 mL エッペンチューブを 80 °Cの湯浴中（サーモミNDER SM-05N, TAITEC とステンレス恒温槽を用いる。温度計で湯浴の温度を確認する）で 5 分加温した後、手で触って熱いと感じなくなるくらいまで冷却（室温放置）する。この加温操作を再度繰り返し、すべてのトリグリセリドを可溶化させる。
- ⑤最高速度の 15000 rpm で 10 分間遠心分離（Centrifuge 5424R、Eppendorf、5404 000.430）を行う。溶液が 2 層に分離していることを確認して、別の 1.5 mL エッペンチューブに上清を 600 μ L 移す。これをサンプルとする。回収後、実験に使用するまでは-20 °Cで保存する。
- ⑥市販のキット（トリグリセライドE-テストワコー；和光純薬工業（株）432-40201）を用いて細胞内トリグリセリドを測定した。サンプル10 μ Lに酵素試薬を1.5 mL加え、攪拌した後、37°Cで 5分間インキュベートし、600 nmにおける吸光度を測定した。

14. HepG2 細胞からのタンパク質抽出

【試薬】

■ Cell Lysis buffer の調製

0.33 M NaCl (Wako, 191-01665)、1.1 M urea (Bio-RAD, 161-0731)、1 % Nonidet P-40 (Calbiochem, 492016)、25 mM HEPES (pH7.6) (Wako, 346-01373)、Complete proteinase inhibitors (1 錠/10 ml) (Roche, 11-836-153-001)

【調製方法】 (50 ml 調製する場合)

HEPES (Wako, 346-01373) 297.89 mg を 30~40 ml の MilliQ に溶かし、NaOH で pH7.6 にする。こへ、NaCl (Wako, 191-01665) 964.26 mg、urea (Bio-RAD, 161-0731) 3.3033 g、Nonidet P-40 (Calbiochem, 492016) 0.5 ml、Complete proteinase inhibitors (Roche, 11-836-153-001) 5 錠、これらを加えてよく混合し、MilliQ で 50 ml にメスアップする。保存は、4 °C で保存する。

※オートクレーブはかけないこと。細胞溶解に使うのは 1 回のみ。(希釈液などに使うので捨てない)

【実験方法】

<実験方法>

- ① 第 1 日目、HepG2 細胞が 80 %コンフルエントに培養された 10 cm dish (Corning 430167) の培地を吸引除去した。トリプシン-EDTA-2Na 溶液 1 ml をゆっくりと加え、吸引除去した。この操作を再び行ったのち、CO₂ インキュベーター(37 °C、5 % CO₂) 中で 5 min インキュベートした。10 % FBS (Hyclone Lot No.: FRH27077) 含有 DMEM (日水製薬 Code 05919) 10 ml 添加し、ピペッティングを繰り返し、細胞を剥がして 50 ml チューブ (CORNING Code No. 430291)に移し、さらにピペッティングを行い懸濁した。この細胞懸濁液 200 µl を滅菌した 1.5 ml 容エッペンドルフチューブ (Eppendorf AG 0030 120.086) にとり、10 µl のトリパンプルを混合した後、その 10 µl をとって Neubauer 型血球計算盤を用いて細胞数を求めた。2 × 10⁵ cells/well となるように細胞と 10 % FBS 含有 DMEM を 50 ml の遠心チューブで混合し細胞懸濁液を得た。6-well transwell plate (Corning 3412) の各 lower chamber に 10 % FBS 含有 DMEM 2.6 ml ずつ加えたのち、細胞懸濁液 1.5 ml を各 upper chamber に加えて、CO₂ インキュベーター(37 °C、5 % CO₂)にて培養した。
- ② 第 3、5、8、10、12 日目に 10% FBS 含有 DMEM で培地交換を行い、14 日間培養し、Caco-2 細胞の分化を誘導した。transwell plate における培地交換は lower chamber → upper chamber の順に培地を吸引除去し、upper chamber → lower chamber の順に培地を加えた。
- ③ 15 日目、well の upper chamber と lower chamber をそれぞれ血清フリーDMEM 1.5 ml、2.6 ml で洗浄した。1 mM H-Phe-Pro-OH (BACHEM, G2935.0005) 含有血清フリーDMEM 1.5 ml をそれぞれ upper chamber に加えて、lower chamber には FBS フリーDMEM 2.6 ml 加え、CO₂ インキュ

ベーター (37 °C、5 % CO₂)の中で 24 時間インキュベートした。コントロールとして、血清フリーDMEM を 1.5ml 、upper chamber に加えた。

※必ずサンプル溶液の pH 合わせを行うこと。

サンプル溶液 1ml をコンパクト pH メーターにアプライし、1N HCl で pH7.1 に調整する。

そして、サンプル溶液 1ml に用いた 1N HCl 量とチューブのサンプル溶液残量から比計算で 1N HCl のチューブ溶液への添加量を求めて pH 調整を行う。

24 時間培養後、細胞を冷 PBS で 2 回洗った後、Cell Lysis buffer 500 µl を加え、氷上に細胞を置きながら、P-2 から移動する。その後、ラバーポリスマン(エタノールで滅菌・MilliQ 用意)で細胞をはがし、全量を 1.5 ml エッペンチューブに移した。それを室温で 10 分間放置し、5 秒間の vortex 後、氷上で 15 分間放置した。そして、20,000×g、4 °C、15 分で遠心を行い、得られた上清を別の 1.5 ml エッペンチューブに回収し、細胞全タンパク質抽出物とする。保存は、-80 °Cで保存する。

15. Lowry 法 (Bio-Rad、DC プロテインアッセイ) を用いたタンパク質の定量

【器具、機械】

- ・ 96well プレート (NUNC、446612)
- ・ マイクロプレートリーダー (ImmunoMini NJ-2300)

【試薬】

- ・ A 試薬 (Bio-Rad、500-0113)
- ・ B 試薬 (Bio-Rad、500-0114) (分注して遮光)
- ・ S 試薬 (Bio-Rad、500-0115)

※試薬は全て院生部屋の真ん中の棚にある (染色液があるところ)

【試薬の調製】

- ・ A'試薬 (使用時に調製)

A 試薬 750 μ l に S 試薬 15 μ l を混合 (vortex またはピペッティング) して A'試薬とした。

(サンプル数に合わせて、A 試薬と S 試薬を 50 : 1 の分量で混合する。)

- ・ extraction buffer (Cell Lysis buffer)

※extraction buffer の調製に関しては、「HepG2 細胞からの細胞内タンパク質抽出」を参照。また、extraction buffer を用いるのはサンプルとバッファーを揃えるため。

- ・ 検量線用 BSA 溶液

5 mg の牛血清アルブミン (nacalai tesque; 01281-84) (黒冷中段の正面) を extraction buffer に溶解し、メスフラスコで 50 ml にメスアップした。(100 μ g/ml)

※何 mg かをエッペンに取り、濃い濃度の溶液を調製し、それを希釈していけばよい。

- ・ スタンダード BSA

上記 BSA 溶液を 1.5ml のエッペンドルフチューブに以下のように希釈した。

Step	BSA 溶液 (μ l)	加える extraction buffer (μ l)	タンパク質濃度 (μ g/ml)
0	0	50	0
1	60	0	2000
2	30 of Step1	30	1000
3	30 of Step2	30	500
4	30 of Step3	30	250

5	30 of Step4	30	125
---	-------------	----	-----

<実験方法>

96well プレートに、スタンダード希釈溶液とサンプル (タンパク質抽出の最後の遠心後、得られた上清を extraction buffer で 10 倍希釈したもの) をそれぞれ 2 連で 5 μ l ずつ入れた。

A'試薬を、それぞれの well に 25 μ l ずつ入れた。

B 試薬を、それぞれの well に 200 μ l ずつ入れた。

室温で 15 分間インキュベート後、マイクロプレートリーダーを用いて、630 nm の吸光度を測定した。

16. SDS-PAGE

<準備>

P10、P200、P1000、P5000、エッペンドルフチューブ、ミニプロテイン 1-D セル(1-D 電気泳動のセット) (Bio-Rad, 165-2940J)、電圧・電流装置[power station 1000VC model AE-8450] or [power station 1000XP model AE-8750] (ATTO)

<試薬、溶液>

30 % アクリルアミド溶液 (A 溶液)

アクリルアミド(nacalai tesque 00809-85) 29.2 g、N,N'メチレンビスアクリルアミド(Bis)(nacalai tesque 22402-02) 0.8 g に DDW を加えて 100 ml にメスアップする。

1.5M Tris-HCl 緩衝液 pH8.8 (B 溶液)

Tris (SIGMA T-1503) 18.17 g、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS) (BIO-RAD 162670A) 0.4 g に DDW を加え、塩酸で pH 8.8 に調整後、100 ml にメスアップする。

0.5M Tris-HCl 緩衝液 pH6.8 (C 溶液)

Tris (SIGMA T-1503) 6.06 g、SDS (BIO-RAD 162670A) 0.4 g に DDW を加え、塩酸で pH6.8 に調整後、100 ml にメスアップする。

10% 過硫酸アンモニウム (当日調製) (D 溶液)

ペルオキシ二硫酸アンモニウム(Wako 012-08023) 0.02 g (20 mg) に DDW 200 μ l 加える。

泳動槽用緩衝溶液(0.025 M Tris、0.192 M グリシン、0.1 % SDS)

Tris (Trizma® base SIGMA T-1503) 1.5 g、SDS (BIO-RAD 161-0301) 0.5 g、グリシン(BIO-RAD 161-0718) 7.2 g に DDW を加えて 500 ml とする。

2×サンプル buffer

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 20 ml、SDS (BIO-RAD 161-0301) 4 mg、 β -メルカプトエタノール (Wako 137-06862) 12 ml、グリセロール(Wako 075-00616) 20 ml、MilliQ 水 44 ml、CBB-R250 (Wako 031-17922) 0.04 g (40 mg)を混合して作製する。

※短期の保存の場合は冷蔵保存。長期保存する場合は β -メルカプトエタノールを加えずに混合液を調製する。この混合液 4.4 ml に対して β -メルカプトエタノールを 0.6 ml 加える。

分子量マーカー

Biotinylated Protein Ladder (Cell Signaling Technology、#7727) を 3 μ l/lane で用いる。

<実験操作>

(1) ゲル板の組み立て

使用する全ての実験器具・実験台はキムワイプを用いて一級メタノールでふいてから使うこと(タンパク質除去のため)。ゲル板の底面や角をよく見て、水漏れしていないか確認すること。ゲル作成に用いるガラス板は断面の角が丸く加工されていないものを使うこと。

器具をメタノールでふいたら、長いガラス板(0.75 mm 用)と短いガラス板を重ね、短いゲル板が手前に来るように、クランプ(緑色の器具)に入れ固定する。このとき、長いガラス板と短いガラス板の下がきちんとそろっているかを確認する。

スタンドの溝の上にゴム板(灰色)を置く。ゴム板の上にゲル板を挟んだクランプを置き、長いガラス板をスタンドについているつまみで固定する。

水漏れをチェックするために DDW をゲル板の 1 番上まで入れてしばらく放置する。水漏れがある場合、水面がだんだん下がっていく。そのときはもう 1 度ゲル板を組み立てなおす。10 分ほど放置して水面に変化がなければ良い。水漏れがなければ、2 枚のガラス板の間に残った水滴を、ろ紙で完全に吸い取り、ホコリが入らないようにラップで覆う。

(2) ゲルの作製 (単一濃度ゲル)

試薬	分離ゲル (8%)	濃縮ゲル (3%)
(A) 30%アクリルアミド溶液	4.29 ml	0.6 ml
(B) 1.5M Tris-HCl 緩衝液 pH 8.8	4.00 ml	—
(C) 0.5M Tris-HCl 緩衝液 pH 6.8	—	1.5 ml
DDW	7.71 ml	3.9 ml
TEMED	10 μ l	10 μ l
(D) 10%過硫酸アンモニウム	63 μ l	20 μ l
Total	16.0 ml	6.0 ml

(注意：D 液はチューブ内でよくピペッティングして添加すること。)

【分離ゲルの作成】

50 ml チューブに A、B、DDW を加え、軽く振って混ぜる。アスピレーターを用いて、チューブ内の空気を抜く(脱気する)。このとき、アスピレーターの白い部分の穴を指で押さえて、泡が 50 ml チューブ上部にきたら押さえている指を離すことで減圧する。チューブ内の空気が完全になくなるまで行う。D、TEMED を加えてよく混ぜ、すぐに 2 枚のガラス板の間にそのまま流し入れる。分離ゲルはクランプの上枠の真ん中あたりまで加え、その上から静かに DDW をゲル板の 1 番上まで加える。ゲル化するまで放置する。(ゲル化すると、ゲルと DDW の間に境界が見えるようになる。)

【濃縮ゲルの作成】

50 ml チューブに A、C、DDW を加え、軽く振って混ぜる。分離ゲルの時と同様に脱気する。分離ゲルの上にある DDW を濾紙で完全に吸い取る。D、TEMED を加え、よく混ぜ、分離ゲルの上にそのまま流し入れる。濃縮ゲルは短いガラス板の一番上まで入れる。すぐに、サンプルコームを差し込み、正方形の well ができるようにコームを差し込む深さを調節する。ゲル化するまで放置する。ゲル板の上の方に隙間ができたなら、適宜必要量作ってゲルをつぎ足す。

(3) 泳動槽の組み立て

※分離・濃縮ゲルのゲル化中に泳動槽用緩衝液を作成する。

※泳動槽用緩衝液が完成したら、泳動槽を組み立てる。器具は全て一級メタノールでふく。

濃縮ゲルのゲル化を確認したら、ゲル板をクランプ(緑色)から外して U 字型電極器具に長いゲル板が手前にくるように下側から差し込む。短いゲル板の上部と U 字型電極器具の緑色パッキン上方の凸部分とが密着するように合わせる。(※ここで隙間があると、泳動槽用緩衝液が漏れて電気がうまく流れなくなる。)

ゲル板が入った U 字型電極器具を、透明のクランプのついた白い容器にはめ込み、透明のクランプで留める。(※透明のクランプは固いが、しっかり留めること。)

②で組み立てたものを、泳動槽(透明の容器)にセットし、2 枚のゲル板の間に泳動槽用緩衝液を注ぐ。このとき、2 枚のゲル板の間には泳動槽用緩衝液が完全に満たされているようにし、かつ、ゲル板の外側にゲル板の下部が浸かる量(泳動槽の下から 1/3 ほど)の泳動槽用緩衝液を加える。

(約 450 ml)

ゲルの底に入った空気の泡を除去し、緩衝溶液をいっぱいまで入れる。

サンプルコームを静かにゆっくりと抜き、使用するまでラップをかけて 4°C で放置した。

※この段階で 1 晩放置することが可能。ただし、1 晩放置する場合は、サンプルコームを抜かずに 4°C で放置する。

(4) サンプルのアプライ

電気泳動に用いるタンパク質溶液の濃度を定量(Bradford 法や Lowry 法など)し、全てのサンプルが 2400 µg/ml となるように Cell Lysis buffer で希釈する。希釈後、2×サンプル buffer と等量混合することで、終濃度を 1800 µg/ml とする。その後、エッペンチューブの口をパラフィルムで巻き、沸騰させた湯浴中で 5 min 煮沸した後、ゲル板のウェルに 11.1 µl/lane (20 µg protein/lane) でアプライする。

分子量マーカーについては 10 µl を 2×サンプル buffer 10 µl と等量混合し、同様に煮沸を行った後、6 µl/lane でアプライする。

(5) 電気泳動

泳動槽に、赤色と黒色のリード線がついたフタ(緑色)を、リード線と電極の色が合うように泳動槽に取り付け、リード線の先とパワーサプライを接続する。電源を入れて、SET を押し、電圧を 100 V、電流を 500 mA にして、RUN を押して通電する。

サンプルが濃縮ゲルと分離ゲルの境界線を越えたら(約 1 mm)、STOP を押して通電を中止し、同様の方法で 1000 V、30 mA にセットし、再び泳動を開始する。サンプルがゲル板の下から 5 mm ぐらいの所に来たら、STOP を押して通電を中止し、電源を切り、フタをはずし、泳動槽から U 字型電極器具を取り外す。

ゲルはガラス板から取り出し、Western blot に使用する。(ゲルが膨潤するのを防ぐため、転写までを迅速に行えるように、転写で使用する試薬などを準備しておく)

17. Western blot 法

(1) SDS-PAGE サンプルのイモビロン PVDF 膜への転写

<器具・機器>

イモビロン PVDF 膜(Immobilon Transfer Membranes, Millipore, IPVH340F0)、濾紙(No.2、185 mm、ADVANTEC)、転写装置(BIO-RAD)、ピンセット、プラスチックケース、槽内冷却用ケース、サンプルカップ、スポンジ(BIO-RAD)、マグネットスターラー、スターラーバー、電圧・電流装置 [power station 1000VC model AE-8450] or [power station 1000XP model AE-8750] (ATTO)

<試薬・溶液> ※転写膜 2 枚分での必要量

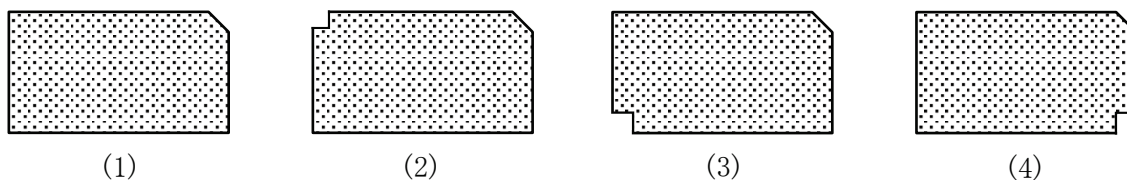
転写 buffer (当日調製、メタノールが揮発性のため保存不可)

Tris (Trizma® base、SIGMA、T1503) 3.03 g、グリシン (BIO-RAD Cat. 161-0718) 14.4 g を MilliQ 水 850 ml に溶解し、よく攪拌した後、特級メタノール (Wako 137-01823) 150 ml を加える。

イモビロン PVDF 膜

ゲルより数 mm 大きめに切り、右上の角を切る。(ゲル 1 枚あたり 1 枚必要)

例)



濾紙 (No.2、185 mm、ADVANTEC)

イモビロン膜より数 mm 大きめに切る。(ゲル 1 枚あたり 2 枚必要)

槽内冷却用ケース (乳白色もしくは青色)

(乳白色のケース) あらかじめ使用する前に、氷と DDW を満たし、凍結させておく。

(青色のケース) あらかじめ使用する前に凍結させておく。

<実験操作>

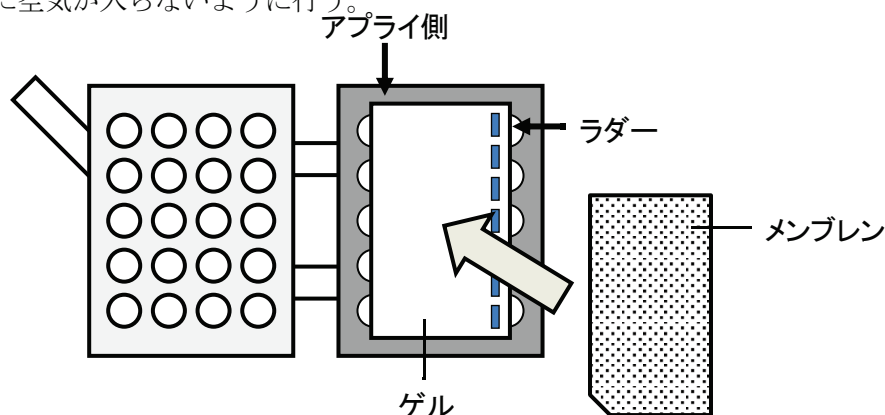
プラスチックケースに一級メタノールを、ケースの底から 5 mm ほど入れた。他のケースには転写 buffer を底から 1 cm ほど入れる。

ゲルの大きさに切り取ったイモビロン膜をメタノールに 5 秒くらい浸して、(DDW で直ちにすすぎ、)その後、転写 buffer の入ったケースに入れて 5 分間振盪する。

別のケースに転写 buffer を底から 2 cm ほど入れ、ろ紙、スポンジ、ゲルホルダーを浸す。

短いガラス板に乗るようにゲルをはがし、転写 buffer に浸したまま、ゲルホルダーカセット(白＋、黒－)に黒を下にして、スポンジ、ろ紙、ゲル、イモビロン膜、ろ紙、スポンジの順にセットする。

この際、カセットの連結部と反対側にバンドがくるようにゲルをセットする。また、(スポンジの上で P-1000 チップを押しながら転がすことで空気抜きをした後)、カセットを閉じる。特に、ゲルと膜の間に空気が入らないように行う。



カセットの黒い方がカセットホルダーの黒い側に向くようにセットする。

氷水で凍らせた槽内冷却用ケースを転写槽内へ入れる。(※黒側に冷却ケースを入れる。)

転写槽内を転写 buffer で満たし、そのまま大きめの発泡スチロール箱に入れる。

リード線付きのフタをし、発泡スチロール内を氷で完全に満たす。低温室に移動し、パワーサプライを接続後、1000 V、500 mA、(200 W)、120 min で通電を開始する。

(2) 転写膜のブロッキングと抗体反応

<試薬・溶液>

- 10×TBS

Tris (Trizma® base、SIGMA、T1503) 24.2 g、NaCl (Wako 191-01665) 80 g を MilliQ 水に溶解し、HCl で pH 7.6 に調製した後に全量を 1L にメスアップする。

- TTBS (1X TBS)

200 ml の 10×TBS を MilliQ 水 1800 ml と混合し、Tween 20 (Wako 163-11512) 2 ml を加えてよく攪拌する。

- blocking buffer (6%スキムミルク)

スキムミルク(雪印、北海道スキムミルク) 9.0 g を MilliQ 水 135 ml に溶解させ、スターラーで攪拌しながら 10×TBS を 15 ml、Tween 20 を 30 μ l 加える。

- 一次抗体溶液

	一次抗体溶液	希釈倍率	メーカー	コード
ATGL	ATGL (30A4) Rabbit mAb	1:1000	Cell Signaling Technology	#2439
SCD1	Anti-SCD1 antibody [EPR21963]	1:1000	Abcam	ab236868
SREBP1	SREBP-1 Antibody (2A4)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Inc	sc-13551
β -actin	β -Actin (C4)	1:10000	Santa Cruz Biotechnology, Inc	sc-47778

それぞれ blocking buffer を用いて 2 ml に希釈する。

● 二次抗体溶液

	二次抗体溶液	希釈倍率	メーカー	コード
ATGL	Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)	1:1000	Abcam	ab6721
SCD1	Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)	1:1000	Abcam	ab6721
SREBP1	Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate	1:1000	BIO-RAD	170-6516
β -actin	Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate	1:4000	BIO-RAD	170-6516
Biotinylated Protein Ladder	Anti-biotin, HRP-linked Antibody	1:1000	Cell Signaling Technology	#7075

それぞれ blocking buffer を用いて 2 ml に希釈する。また、Biotinylated Protein Ladder のビオチン抗体は他のタンパク質の二次抗体と同じ溶液中に希釈して使用する。

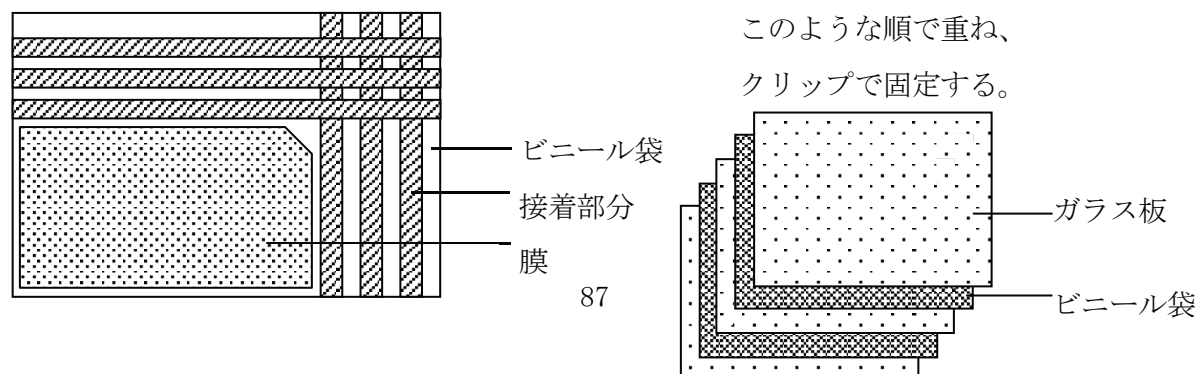
・検出試薬 (直前に調製)

イムノスター® LD (Wako, 296-69901)

添付されている Luminescence Solution A および Luminescence Solution B を 250 μ l ずつ等量で混合する。(1 枚につき 500 μ l 必要)

<実験操作>

- ① (転写後の膜を MilliQ 水で軽く洗った後、)プラスチックケースに blocking buffer を膜が浸る程度に注ぎ、膜の転写面を上にして室温、1 hr 振盪する(TAITEC WAVE-SI)。
- ② ケース内の blocking buffer をデカンテーションで捨て、ケースに TTBS を膜が十分浸る程度に注ぎ、5 min、2 回振盪して膜を洗浄する。
- ③ 透明なビニール袋にメンブレンを挿入し、転写面側から 2 ml の一次抗体溶液を注ぎ入れ、膜から 0.5 cm 程度離れた位置を気泡が入り込まないように注意しながら、SEALER(HAKKO FV-801)でビニール袋を接着、密封し、ガラス板の間に挟んでクリップで留め、4 °C、オーバーナイトでインキュベートする。(この操作でメンブレンを傷付けないよう注意する)



ケースにTTBSを膜が十分浸る程度に注ぎ、5 min、4回振盪して膜を洗浄する。

ケース内のTTBSをデカンテーションで捨てる。水平な実験台の上にラップを敷き、その上に膜を転写面が上になるように置き、二次抗体溶液 2 mlを膜の上に直接添加し、室温、1 hrインキュベートする。(この間、膜を保護するために、空のケースでカバーする。)

ケースにTTBSを膜が十分浸る程度に注ぎ、5 min、4回振盪して膜を洗浄する。

ケースにTTBSを膜が十分浸る程度に注ぎ、その中に膜を入れ、ゲノムセンターへ移動する。

(3) バリアブルアナライザーTyphoonによるバンドの検出

<遺伝子施設へ行く際の準備>

15 mlチューブ、ラップ、キムワイプ、ピンセット、検出試薬、氷、転写膜、ストップウォッチ、P-1000、P-1000チップ、一級メタノール、CD-ROM(画像データ保存用)

※実験台やピンセットなど、全て一級メタノールで拭く。

※Typhoonのフタを開け、ガラスプレート(読取り部分)の上にラップを敷く。

<実験操作>

Typhoonを起動する。主電源、コンピューター、Typhoonの電源を入れ、パソコンのデスクトップ上にあるTyphoon Scanner Controlを立ち上げる。

Typhoon Scanner Controlウインドウメニューを設定する。

スキャンモードをChemiluminescenceモードにする。

Set up ボタンを押してSet upモードを開く(Chemiluminescenceモード)。

Sensitivityはhighを、PMT voltageは950Vに選択する。

Option設定で、サンプルを置いた方向を選択する。(通常は)



Pixel sizeは100を選択する。

Focal Planeはplatenを選択する。Press Sampleをチェックする。

User Commentにサンプル条件、スキャン条件を記入する。

スキャンするエリアをマウスでドラッグして指定する。

上記の設定後、15 mlチューブに検出試薬を調製する。

ラップを実験台の上に敷く。調製した検出試薬を全量ラップの上に滴下する。

ピンセットでメンブレンをつまみ、反対側の角をキムワイプにつけて、余分なバッファーを切り、膜の転写面が下になるように試薬の上に置く。

ピンセットで膜の四隅を持ち上げて試薬を均一にした後、数秒 ~ 5 分間静置する。

ピンセットで膜をつまみ、キムワイプに一端をつけて余分な試薬を切り、Typhoonのスキナ部

に膜を転写面が下になるようにして置く。(※この際、気泡が入り込まないように注意して置き、置いた座標を確認する。)

スキャナ部のカバーを閉じ、コンピューター上のTyphoon Scanner ControlウインドウのScanボタンを押す。Scanボタンを押すと画面にSave Asウインドウが表示されるので、マイコンピュータ→ローカルディスク→Data→AG15内に自分のファイルを作り、そこに保存する。(※ファイル名はアルファベットと数字とアンダーバーのみ使用可能)

スキャンが始まる。

スキャンが終了すると自動的にファイルが保存される。保存されたファイルを選択するとビューワーが立ち上がるので、ここで他のパソコンでもイメージが開けるようにSave Asで拡張子をBMP形式に変換する。変換した画像データはCD-ROMに保存する。

スキャン終了後、ガラスプレート上のサンプルとラップは速やかに回収する。(※ガラスプレートやフタの裏についた発光試薬はキムワイプで拭きとる。)

Typhoon Scanner Controlを終了し、コンピューター、Typhoon、主電源を切る。

Typhoonの使用者名簿に記名し、部屋を出る。

※その他の検出試薬を使用する場合、メンブレンをTTBSで十分洗浄し、④以降のステップを行う。

(4) Image Jによる画像解析

パソコンでImageJを立ち上げ、FileのOpenから画像を表示させる。

バンドを四角形で囲む。(※四角形の横の長さが縦の長さの2倍を越えないこと。)

Controlを押しながら[1]を押す。(四角の中に①と表示される。)

左右のカーソルキーを押して水平方向に移動させ、次のバンドを囲む。

Controlを押しながら[2]を押す。(四角の中に②と表示される。)

操作4と5を残り全てのバンドに対して行う。(四角の中に③、④、...と表示される。)

Controlを押しながら[3]を押す、色の濃さを表す折れ線グラフを表示させる。

全てのグラフに対して、山部分(立ち上がる直前)を線で区切ったあと、Image Jの左から8番目のアイコン(Wand tool)を押して、グラフの山部分の中心を上のグラフから順にクリックしていき、面積値を表示させる。その結果をSave asで保存し、統計解析を行う。

18. siLentFect™Lipid Reagentを用いたHepG2細胞へのsiRNAの導入

<使用試薬>

- siLentFect™Lipid Reagent (BIO RAD、170–3361)
- Silencer Select Pre-designed siRNA (Ambion、4392420, siRNA ID: s13061)
- Silencer® Select Negative Control #2 siRNA (Ambion、4390846)

<実験操作>

※6 wellプレート使用かつn = 6で1つの遺伝子をノックダウンする場合。

- ①トランスフェクション前日に、翌日に50～70%コンフルエントになるように6well plateに 11×10^5 cells/wellで細胞を播種し、血清を含む培地 (2.5 mL) で37°C、5% CO₂で一晩培養した。
- ②トランスフェクション15～60分前に培地を除去し、1.25 mLの2 mM オレイン酸+10%FBS含有DMEM培地を各wellに添加した。
- ③1wellあたりsiLentFect 2.5μLを無血清培地125μLで希釈した。
- ④siRNAストック溶液を付属のRNase-free waterで必要量希釈し、10 μM siRNA溶液を調製した。
- ⑤④で調製したsiRNA溶液を用いて1wellあたり120 nMのsiRNAを含む培地を125 μL調製した。
120 nMの溶液を調製することでトランスフェクション培地におけるsiRNA終濃度が10 nMとなる。siRNA終濃度20 nMの場合は1 wellあたり240 nMのsiRNAを含む培地を同量調製した。
- ⑥③で調製したsiLentFect溶液と⑤で調製したsiRNA希釈溶液を当量混合し、タッピングまたはピペッティングで混和し、20分間室温でインキュベートした。
- ⑦②で調整した血清培地中の細胞に、250 μLのsiLentFect-siRNA複合体溶液を加え、プレートを穏やかにゆすり混和した。その後、37°C、5% CO₂で一晩培養した。
- ⑧トランスフェクションから24時間後、培地を吸引除去し、各wellを2.5 mLの血清フリー培地で洗浄した。その後、サンプル等を含む培地を2.5 mL/wellで加え、実験方法に従ってインキュベートした。

その後の操作は、「16. HepG2細胞からのTotal RNAの単離及びTotal RNA濃度の測定」や「17. HepG2細胞からのトリグリセリド回収」のプロトコルに準拠して行った。

参考文献

1. 佐々木淳. 生活習慣病の予防. 日本動脈硬化学会. **51**, 119–123 (2011).
2. 宮崎滋. 肥満症診療ガイドライン2016. 日本内科学会雑誌. **107**, 262–268 (2018).
3. 日本消化器学会. NAFLD / NASH 診療ガイドライン 2014. 南江堂 (2014).
4. Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., Charlton, M., Cusi, K., Rinella, M., Harrison, S. A., Brunt, E. M., Sanyal, A. J. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. **67**, 328–357 (2018).
5. 笹森典雄. 人間ドック全国集計成績. 人間ドック. **24**, 71–118 (2009).
6. Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., Wymer, M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. **64**, 73–84 (2016).
7. Lowet, M. E. The triglyceride lipases of the pancreas. *J. Lipid Res.* **43**, 2007–2016 (2002).
8. Masuda, D., Yamashita, S. Postprandial hyperlipidemia and remnant lipoproteins. *J. Atheroscler. Thromb.* **24**, 95–109 (2017).
9. Iqbal, J., Hussain, M. M. Intestinal lipid absorption. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **296**, E1183–E1194 (2009).
10. Cohen, D. E., Fisher, E. A. Lipoprotein metabolism, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin. Liver Dis.* **33**, 380–388 (2013).
11. Hudgins, L. C., Hellerstein, M., Seidman, C., Neese, R., Diakun, J., Hirsch, J. Human fatty acid synthesis is stimulated by a eucaloric low fat, high carbohydrate diet. *J. Clin. Invest.* **97**, 2081–2091 (1996).
12. Kawano, Y., Cohen, D. E. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol.* **48**, 434–441 (2013).
13. Hosomi, R., Fukunaga, K., Arai, H., Kanda, S., Nishiyama, T., Yoshida, M. Effect of dietary protamine on lipid metabolism in rats. *Nutr. Res. Pract.* **4**, 462–469 (2010).
14. Hoffmann, J. A., Chance, R. E., Johnson, M. G. Purification and analysis of the major components of chum salmon protamine contained in insulin formulations using high-performance liquid chromatography. *Protein Expr. Purif.* **1**, 127–133 (1990).
15. Aspedon, A., Groisman, E. A. The antibacterial action of protamine: Evidence for disruption of cytoplasmic membrane energization in *Salmonella typhimurium*. *Microbiology*. **142**, 3389–3397 (1996).
16. Tsujita, T., Matsuura, Y., Okuda, H. Studies on the inhibition of pancreatic and carboxylester lipases by protamine. *J. Lipid Res.* **37**, 1481–1487 (1996).
17. Takahashi, Y., Konishi, T., Enari, H., Lee, H. sik., Lee, W. K., Lee, Y. S., Park, H. K., Yamamoto, S.

- Effects of protamine hydrochloride from chum salmon milt on lipid metabolism in rats. *Fish. Sci.* **77**, 1045–1052 (2011).
18. Duarte-Vázquez, M. A., García-Padilla, S., Olvera-Ochoa, L., González-Romero, K. E., Acosta-Íguez, J., De La Cruz-Cordero, R., Rosado, J. L. Effect of protamine in obesity induced by high-fat diets in rats. *Int. J. Obes.* **33**, 687–692 (2009).
 19. Kang, N. H., Lee, W. K., Yi, B. R., Lee, H. R., Park, M. A., Park, S. K., Park, H. K., Choi, K. C. Risk of cardiovascular disease is suppressed by dietary supplementation with protamine and chitoooligosaccharide in Sprague-Dawley rats. *Mol. Med. Rep.* **7**, 127–133 (2013).
 20. Jobgen, W., Meininger, C. J., Jobgen, S. C., Li, P., Lee, M. J., Smith, S. B., Spencer, T. E., Fried, S. K., Wu, G. Dietary L-arginine supplementation reduces white fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats. *J. Nutr.* **139**, 230–237 (2009).
 21. Jobgen, W., Fu, W. J., Gao, H., Li, P., Meininger, C. J., Smith, S. B., Spencer, T. E., Wu, G. High fat feeding and dietary L-arginine supplementation differentially regulate gene expression in rat white adipose tissue. *Amino Acids.* **37**, 187–198 (2009).
 22. Fu, W. J., Haynes, T. E., Kohli, R., Hu, J., Shi, W., Spencer, T. E., Carroll, R. J., Meininger, C. J., Wu, G. Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats. *J. Nutr.* **135**, 714–721 (2005).
 23. 星野躍介, 高橋義宣, 河原崎正貴, 秋田涼子, 江成宏之, 山本茂. サケ由来プロタミンの脂質吸収抑制効果. 日本食品科学工学会誌. **55**, 360–366 (2008).
 24. Mijiti, M., Mori, R., Huang, B., Tsukamoto, K., Kiriya, K., Sutoh, K., Nagaoka, S. Anti-obesity and hypocholesterolemic actions of protamine-derived peptide rpr (Arg-pro-arg) and protamine in high-fat diet-induced C57BL/6J mice. *Nutrients.* **13**, 2501 (2021).
 25. 浅野智哉. 修士論文: プロタミン及びプロタミン由来ペプチドの脂質代謝に対する影響. (2019).
 26. Vidyashankar, S., Sandeep Varma, R., Patki, P. S. Quercetin ameliorate insulin resistance and up-regulates cellular antioxidants during oleic acid induced hepatic steatosis in HepG2 cells. *Toxicol. Vitr.* **27**, 945–953 (2013).
 27. Gong, Y., Zhang, J., Wu, X., Wang, T., Zhao, J., Yao, Z., Zhang, Q., Liu, X., Jian, X. Specific expression of proton-coupled oligopeptide transporter 1 in primary hepatocarcinoma-a novel strategy for tumor-targeted therapy. *Oncol. Lett.* **14**, 4158–4166 (2017).
 28. Bergstrom, R. W., Newell-Morris, L. L., Leonetti, D. L., Shuman, W. P., Wahl, P. W., Fujimoto, W. Y. Association of elevated fasting C-peptide level and increased intra-abdominal fat distribution with development of NIDDM in Japanese-American men. *Diabetes.* **39**, 104–111 (1990).
 29. Ingelsson, E., Schaefer, E. J., Contois, J. H., McNamara, J. R., Sullivan, L., Keyes, M. J., Pencina, M. J.,

- Schoonmaker, C., Wilson, P. W., D'Agostino, R. B. Clinical utility of different lipid measures for prediction of coronary heart disease in men and women. *JAMA*, **298**, 776–785 (2007).
30. Nagaoka, S., Miwa, K., Eto, M., Kuzuya, Y., Hori, G., Yamamoto, K. Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rats and Caco-2 cells. *J. Nutr.* **129**, 1725–1730 (1999).
 31. Leal-Díaz, A. M., Noriega, L. G., Torre-Villalvazo, I., Torres, N., Alemán-Escondrillas, G., López-Romero, P., Sánchez-Tapia, M., Aguilar-López, M., Furuzawa-Carballeda, J., Velázquez-Villegas, L. A., Avila-Nava, A., Ordáz, G., Gutiérrez-Urbe, J. A., Serna-Saldivar, S. O., Tovar, A. R. Agumiel concentrate from Agave salmiana and its extracted saponins attenuated obesity and hepatic steatosis and increased Akkermansia muciniphila in C57BL6 mice. *Sci. Rep.* **6**, 1–15 (2016).
 32. Shimomura, I., Bashmakov, Y., Ikemoto, S., Horton, J. D., Brown, M. S., Goldstein, J. L. Insulin selectively increase SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin- induced diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 13656–13661 (1999).
 33. Osborne T. F. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): Key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J. Biol. Chem.* **275**, 32379–32382 (2000).
 34. Miyazaki, M., Kim, Y. C., Ntambi, J. M. A lipogenic diet in mice with a disruption of the stearoyl-CoA desaturase 1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis. *J. Lipid Res.* **42**, 1018–1024 (2001).
 35. Lounis, M. A., Bergeron, K. F., Burhans, M. S., Ntambi, J. M., Mounier, C. Oleate activates SREBP-1 signaling activity in SCD1-deficient hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **313**, E710-E720 (2017).
 36. Miyazaki, M., Dobrzyn, A., Sampath, H., Lee, S. H., Weng, C. M., Chu, K., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Ntambi, J. M. Reduced adiposity and liver steatosis by stearoyl-CoA desaturase deficiency are independent of peroxisome proliferator-activated receptor- α . *J. Biol. Chem.* **279**, 35017–35024 (2004).
 37. Lodhi, I. J., Yin, L., Jensen-urstad, A. P. L., Funai, K., Coleman, T., Baird, H., Ramahi, M. K. El, Razani, B., Song, H., Fu-hsu, F., Turk, J., Semenkovich, C. F. Inhibiting adipose tissue lipogenesis reprograms thermogenesis and PPAR γ activation to decrease diet-induced obesity. *Cell Metab.* **16**, 189–201 (2013).
 38. Kersten, S., Desvergne, B., Wahli, W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature*. **405**, 421–424 (2000).
 39. Braissant, O., Foulle, F., Scotto, C., Dauca, M., Wahli, W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in the adult rat. *Endocrinology*. **137**, 354–366 (1996).
 40. Iwase, M., Yamamoto, T., Nishimura, K., Takahashi, H., Mohri, S., Li, Y., Jheng, H. F., Nomura, W., Takahashi, N., Kim, C. S., Yu, R., Taniguchi, M., Baba, K., Murakami, S., Kawada, T., Goto, T.

- Suksdorfin promotes adipocyte differentiation and improves abnormalities in glucose metabolism via PPAR γ activation. *Lipids*. **52**, 657–664 (2017).
41. Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Desvergne, B., Wahli, W. Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.* **103**, 1489–1498 (1999).
 42. Cui, W., Chen, S. L., Hu, K. Q. Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. *Am J Transl Res.* **2**, 95-104 (2010).
 43. Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T. O., Kohlwein, S. D., Haemmerle, G., Lass, A., Madeo, F. FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab.* **15**, 279-91 (2012).
 44. Schweiger, M., Paar, M., Eder, C., Brandis, J., Moser, E., Gorkiewicz, G., Grond, S., Radner, F. P., Cerkl, I., Cornaciu, I., Oberer, M., Kersten, S., Zechner, R., Zimmermann, R., Lass, A. G0/G1 switch gene-2 regulates human adipocyte lipolysis by affecting activity and localization of adipose triglyceride lipase. *J Lipid Res.* **53**, 2307-17 (2012).
 45. Cornaciu, I., Boeszoermyenyi, A., Lindermuth, H., Nagy, H. M., Cerkl, I. K., Ebner, C., Salzburger, B., Gruber, A., Schweiger, M., Zechner, R., Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M. The minimal domain of adipose triglyceride lipase (ATGL) ranges until leucine 254 and can be activated and inhibited by CGI-58 and G0S2, respectively. *PLoS One.* **6**, e26349 (2011).
 46. Horton, J. D., Goldstein, J. L., Brown, M. S. SREBPs: Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* **109**, 1125–1131 (2002).
 47. Hagen, R. M., Rodriguez-Cuenca, S., Vidal-Puig, A. An Allostatic Control of Membrane Lipid Composition by SREBP1. *FEBS Lett.* **584**, 2689–2698 (2010).
 48. Shimomura, I., Shimano, H., Korn, B. S., Bashmakov, Y., Horton, J. D. Nuclear Sterol Regulatory Element-Binding Proteins Activate Genes Responsible for the Entire Program of Unsaturated Fatty Acid Biosynthesis in Transgenic Mouse Liver. *J Biol Chem.* **273**, 35299-35306 (1998).
 49. Bené, H., Lasky, D., Ntambi, J. M. Cloning and Characterization of the Human Stearoyl-CoA Desaturase Gene Promoter: Transcriptional Activation by Sterol Regulatory Element Binding Protein and Repression by Polyunsaturated Fatty Acids and Cholesterol. *Biochem Biophys Res Commun.* **284**, 1194–1198 (2001).
 50. Latasa, M. J., Griffin, M. J., Moon, Y. S., Kang, C., Sul, H. S. Occupancy and function of the -150-sterol regulatory element and -65 E-box in nutritional regulation of the fatty acid synthase gene in living animals. *Mol Cell Biol.* **23**, 5896-5907 (2003).
 51. Oh, S. Y., Park, S. K., Kim, J. W., Ahn, Y. H., Park, S. W., Kim, K. S. Acetyl-CoA carboxylase beta gene is regulated by sterol regulatory element-binding protein-1 in liver. *J Biol Chem.* **278**, 28410-28417 (2003).
 52. Hu, Y., Smith, D. E., Ma, K., Jappara, D., Thomas, W., Hillgren, K. M. Targeted Disruption of Peptide

- Transporter Pept1 Gene in Mice Significantly Reduces Dipeptide Absorption in Intestine. *Mol. Pharm.* **5**, 1122-1130 (2008).
53. Banno, A., Wang, J., Okada, K., Mori, R., Mijiti, M., Nagaoka, S. Identification of a novel cholesterol-lowering dipeptide, phenylalanine-proline (FP), and its down-regulation of intestinal ABCA1 in hypercholesterolemic rats and Caco-2 cells. *Sci. Rep.* **9**, 1–12 (2019).
 54. Zhang, M., Xu, J., Wang, T., Wan, X., Zhang, F., Wang, L., Zhu, X., Gao, P., Shu, G., Jiang, Q., Wang, S. The dipeptide Pro-Gly promotes IGF-1 expression and secretion in HepG2 and female mice via PepT1-JAK2/STAT5 pathway. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **9**, 1–10 (2018).
 55. Toyobuku, H., Sai, Y., Tamai, I., Tsuji, A. Enhanced Delivery of Drugs to the Liver by Adenovirus-Mediated Heterologous Expression of the Human Oligopeptide Transporter PEPT1. *J Pharmacol Exp Ther.* **301**, 812-819 (2002).
 56. Morikawa, K., Kondo, I., Kanamaru, Y., Nagaoka, S. A novel regulatory pathway for cholesterol degradation via lactostatin. *Biochem Biophys Res Commun.* **352**, 697-702 (2007).
 57. Takeuchi, A., Hisamatsu, K., Okumura, N., Sugimitsu, Y., Yanase, E., Ueno, Y., Nagaoka, S. IIAEK targets intestinal alkaline phosphatase (IAP) to improve cholesterol metabolism with a specific activation of IAP and downregulation of ABCA1. *Nutrients.* **12**, 2859 (2020)

謝辞

本研究の遂行ならびに論文の作成に際し、終始御指導賜りました長岡 利教授に深甚の謝意を表します。

また、実験の遂行にあたり、終始御協力頂いた、博士課程の坂野新太氏、葉宇陽氏、竹内朝陽氏、修士課程の中島悠賀氏、中野綾音氏、兪蘭花氏、會田拓巳氏、章妮氏、高田敬梧氏、中村斗茉氏、平石萌音氏、山本真子氏、四年生の小田夏暉氏、西野七海氏、松葉翔也氏に深く感謝いたします。