



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

ラクトスタチン（IIAEK）による腸アルカリ性ホスファターゼの活性化とコレステロール代謝との関連性の解明

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2024-06-20 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 竹内, 朝陽 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/0002000737

ラクトスタチン（IIA EK）による
腸アルカリ性ホスファターゼの活性化と
コレステロール代謝との関連性の解明

2023 年

岐阜大学大学院連合農学研究科
生物資源科学専攻
(岐阜大学)
竹内朝陽

ラクトスタチン（IIAEK）による
腸アルカリ性ホスファターゼの活性化と
コレステロール代謝との関連性の解明

竹内朝陽

目次

緒論	4
第 1 章 <i>in vitro</i> におけるコレステロールミセル溶解性及び胆汁酸結合能に対する IIAEK の影響	7
第 2 章 高コレステロール食を摂取させたマウスのコレステロール代謝に与える IIAEK の影響	
第 1 節 高コレステロール食を摂取させたマウスの血清コレステロールレベルに与える IIAEK の影響	11
第 2 節 高コレステロール食を摂取させたマウスの肝臓脂質プロファイルに与える IIAEK の影響	16
第 3 節 高コレステロール食を摂取させたマウスの糞中ステロイド排泄量に与える IIAEK の影響	19
第 4 節 高コレステロール食を摂取させたマウスのコレステロール吸収に与える IIAEK の影響	22
第 3 章 ラット小腸粘膜タンパク質及び Caco-2 細胞から抽出された腸脂質ラフト画分に対する分子プローブ IIXEK を用いた光親和性標識実験の nano LC-MS/MS 再解析	27
第 4 章 ラット小腸粘膜タンパク質から得られた腸 ALP の IIXEK 結合配列と Caco-2 細胞の腸脂質ラフト画分から得られた腸 ALP の IIXEK 結合配列の比較	34
第 5 章 IIAEK が誘導する腸アルカリ性ホスファターゼ (腸 ALP) 活性化	
第 1 節 Caco-2 細胞のアルカリ性ホスファターゼ (ALP) 比活性に与える 2 mM IIAEK の影響	37
第 2 節 Caco-2 細胞の腸 ALP mRNA レベルに与える 2 mM IIAEK の影響	39

第3節	Caco-2細胞の腸ALPタンパク質レベルに与える2 mM IIAEKの影響-----	42
第6章	Caco-2細胞のコレステロール代謝関連遺伝子に与える2 mM IIAEKの影響	
第1節	Caco-2細胞のATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) mRNAレベルに与える2 mM IIAEKの影響-----	45
第2節	Caco-2細胞のABCA1タンパク質レベルに与える2 mM IIAEKの影響-----	48
第7章	8時間培養Caco-2細胞への腸アルカリ性ホスファターゼ(腸ALP) siRNA導入、24時間IIAEK添加がコレステロール代謝関連遺伝子mRNAレベルに与える影響	
第1節	8時間培養Caco-2細胞への48時間腸アルカリ性ホスファターゼ(腸ALP) siRNA導入、24時間IIAEK添加における腸ALP mRNAレベル-----	51
第2節	8時間培養Caco-2細胞への48時間腸ALP siRNA導入、24時間IIAEK添加におけるABCA1 mRNAレベル-----	54
第8章	総合討論-----	58
第9章	基本的実験操作法-----	67
第10章	参考文献-----	113
謝辞		

緒論

近年、世界的に、特に先進国を中心に、様々な代謝性疾患の発生率が増加しており、高脂肪・高コレステロール食の摂取は、動脈硬化、脂肪肝炎などの脂質代謝と密接な関連のある様々な疾患を引き起こす可能性がある¹⁾。特に血漿コレステロール値が高いと、動脈硬化のリスクが高まる²⁾。スタチン系薬剤はコレステロール生合成経路の重要な律速段階である3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA レダクターゼ (HMG-CoA 還元酵素) の阻害を介して低比重リポ蛋白コレステロール (LDL-C) を低下させるだけでなく、LDL-C を細胞内へ取り込む LDL 受容体の発現を上昇させ、血清 LDL-C を制御することにより、コレステロール代謝を改善する³⁾。しかし、スタチン系薬剤の投与により、けいれんなどの骨格筋関連症状や認知機能障害等の様々な副作用が生じることが報告されており、観察研究によればスタチン系薬剤投与患者の 10%~15% にスタチン系薬剤による副作用がみられ、臨床データによればスタチン系薬剤による副作用発現は、30% にものぼるとされている^{3, 4)}。このようなスタチン系薬剤による副作用が生じた場合、スタチン系薬剤の服薬中止を選択し、スタチン系薬剤の代替薬 (例: エゼチミブなど) を考える必要がある⁴⁾。したがって、我々は、日頃摂取する食品成分を活用し、少ない副作用でコレステロール代謝を改善するために、食品タンパク質由来のペプチドに着目した。ペプチドは予測可能な代謝を示すため、副作用の発生率が低く、ペプチドの消化吸収等により生じる代謝物が毒性を示すことはほとんどない⁵⁾。興味深いことに、食品タンパク質由来のペプチドが、脂質異常症や高コレステロール血症などの代謝障害を改善することが報告されている⁶⁾。これらのことと関連して、我々は、大豆タンパク質由来ペプチドである Val-Ala-Trp-Trp-Met-Tyr (ソイスタチン) が、コレステロールミセル溶解性低下や強い胆汁酸結合能を介して、コレステロール吸収を著しく低下させることを報告した⁷⁾。さらに、このようなコレステロールミセル溶解性低下作用や強い胆汁酸結合能を有する大豆ペプチドは、ソイスタチンと同様に、ラットやヒト小腸モデル (Caco-2 細胞) でコレステロール吸収を低下させることが我々の先行研究で明らかである⁸⁾。よって、これらの研究成果は、コレステロールミセル溶解性の阻害作用や胆汁酸結合能の強さがコレステロール吸収阻害の重要な因子であることを明確に示している。これらの研究と関連して、我々は Caco-2 細胞とラットを用いて、牛乳 β -ラクトグロブリンから新規コレステロール低下ペプチド IIAEK を同定した⁹⁾。特筆すべきは、IIAEK は医薬品の β -シトステロールと比較して、強いコレステロール低下作用を示した⁹⁾。また、牛乳 β -ラクトグロブリントリプシン加水分解物 (LTH) は、カゼイントリプシン加水分解物に比べ、血清、肝臓、腸における [³H]-コレステロールの分布を有意に低下させた⁹⁾。しかし、LTH 由来の IIAEK がコレステロールのミセル溶解性や胆汁酸結合能に影響を及ぼし、コレステロールの吸収を抑制するかどうか不明であり、IIAEK の経口投与が *in vivo* でコレステロール吸収を抑制するかどうかは不明であった。

先行研究より、IIAEK は、Caco-2 細胞の¹⁴C-コレステロールの取り込みを有意に減少させ、複数のコレステロール代謝関連遺伝子 (ATP-binding cassette trans-porter A1 (ABCA1)、acetyl-CoA acetyltransferase 2 (ACAT2)、microsomal triglyceride transfer protein (MTP)、scavenger receptor B-1 (SR-B1) 等) を下方調節する¹⁰⁾。また、興味深いことに、IIAEK はペプシンやトリプシンなどの消化酵素では分解されず、ペプチドの状態の小腸に到達する。一般的に、食品タンパク質はペプシンやトリプシンなどの消化酵素によって断片化され、アミノ酸やペプチドの形で吸収される¹¹⁾。例えば、ペプチドトランスポーターである PepT1 は、小腸でジまたはトリペプチドのみを吸収できるが、IIAEK を含むテトラペプチド以上のオリゴペプチドは吸収できない¹²⁾。以上より、IIAEK は Caco-2 細胞でコレステロール吸収を抑え、コレステロール代謝関連遺伝子 mRNA レベルを下方調節するのだが、IIAEK は上述のペプチドトランスポーターPepT1 を介して腸細胞内へ取り込まれない。そのため、我々は、IIAEK が小腸に存在する標的タンパク質 (G タンパク質共役型受容体など) と腸細胞表面で相互作用し、コレステロール代謝改善作用を発揮するのではないかと仮説した。そこで、IIAEK と小腸で相互作用する標的分子を探索するために、光親和性標識された IIAEK と相互作用する標的分子が結合した複合体を、蛍光物質の導入により可視化することができる分子プローブ IIXEK を化学合成した¹⁰⁾。光親和性標識実験は 1962 年に Singh らによって開発された実験手法であり、生理活性物質と標的タンパク質間で生じる可逆的な相互作用を利用するものである¹³⁾。一般的に、リガンドのような生理活性物質と標的タンパク質間で生じる相互作用は可逆的かつ瞬時に行われるというのが特徴である。しかし、光親和性標識実験は、このような瞬時に生じてしまうリガンド-タンパク質相互作用を光親和性標識した特殊なプローブを使用することにより捕捉することが可能であり、相互作用するアミノ酸配列を特定することも可能である¹⁴⁾。また、当研究室で実施した光親和性標識実験では、IIXEK-標的タンパク質複合体を検出するためにクリック反応を使用した¹⁵⁾。クリック反応は、Kolb らによって提案された共有結合を形成する反応であり、最も有名な反応はアジドとアルキンの環化反応 (Huisgen 環化反応) である¹⁵⁻¹⁷⁾。さらに、IIAEK と相互作用する標的タンパク質を特定するために、シグナル伝達のプラットフォームとして近年注目されている脂質ラフト画分を Caco-2 細胞から抽出する方法を当研究室で確立し、その画分に対する光親和性標識実験及び MS 解析を実施した。その結果、Caco-2 細胞由来脂質ラフト画分から IIAEK と相互作用する可能性のある複数の候補タンパク質を特定した¹⁰⁾。さらに、驚くべきことに、2 mM IIAEK 添加により Caco-2 細胞から抽出された脂質ラフト画分の ALP 比活性が Control 群と比較して約 3 倍に増加した¹⁰⁾。次に、ラット小腸粘膜抽出タンパク質に対する IIXEK を用いた光親和性標識実験及び MS 解析を実施したが、MS 解析から IIAEK と相互作用する標的タンパク質の同定には至らなかった¹⁰⁾。

本研究では、IIAEK が *in vivo* で腸のコレステロール吸収を抑制するという仮説を立て、*in vitro* でのコレステロールミセル溶解性及び胆汁酸結合能に対する IIAEK の影響や *in vivo* でのマウスの血清や肝臓中のコレステロール、糞中ステロイド排泄及び³H-コレステロー

ル吸収に対する IIAEK の影響を明らかにすることを目的とした¹⁸⁾。また、IIAEK と相互作用する標的分子として脂質代謝改善や長寿に寄与する腸アルカリ性ホスファターゼ（腸 ALP）を同定し、IIAEK が誘導する腸 ALP の特異的活性化とコレステロール代謝改善作用との関連性を明らかにすることを目的とした¹⁰⁾。

第1章 *In vitro* におけるコレステロールミセル溶解性及び胆汁酸結合能に対する IIAEK の影響

【実験目的】

当研究室では、IIAEK のラットへの経口投与では、血清コレステロールレベルを劇的に低下させ、医薬品の β -シトステロールと比較して強いコレステロール低下作用を示した⁹⁾。しかし、コレステロールのミセル溶解性や胆汁酸結合能に IIAEK が影響を及ぼし、コレステロールの吸収を抑制するかどうかは不明であった。そこで、本研究では、*in vitro* におけるコレステロールミセル溶解性及び胆汁酸結合能に対する IIAEK の影響を調査した。

【実験方法】

(1) *in vitro* におけるコレステロールミセル溶解性測定

実験群は以下に示した。

1. Control 群 (n=4)
2. IIAEK 群 (n=4)
3. コレスチラミン群 (n=4)

(実験操作)

コレステロールミセル溶解性に及ぼす IIAEK の影響は、既報⁷⁾に従い、評価した。以下の成分を含む[4-¹⁴C]-標識コレステロールミセル溶液 (1.0 mL) を超音波処理 (超音波ホモジナイザー、VP-5 型; Taitec、東京、日本) で混合した: 0.74 kBq [4-¹⁴C]-コレステロール (1.97 Gbq/mmol、パーキンエルマー・ライフサイエンス、横浜、日本)、0.1 mM コレステロール (Sigma Aldrich、セントルイス、ミズーリ、米国)、6.6 mM タウロコール酸ナトリウム (Sigma Aldrich)、1 mM オレイン酸 (Sigma Aldrich)、0.6 mM ホスファチジルコリン (Sigma Aldrich)、0.5 mM モノオレイン (Sigma Aldrich)、132 mM NaCl、15 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)。37°C で 24 時間インキュベートした後、サンプル[Control、IIAEK、コレスチラミン (C4650, Sigma Aldrich)、5 g/L]をミセル化溶液に加え、超音波処理で可溶化し、37°C で 1 時間インキュベートした後、100,000×g、37°C で 60 分間遠心分離した。得られた上清を回収し、液体シンチレーションカウンターを用いて[¹⁴C]-コレステロール含量を測定した。本実験の統計処理は、Turkey's test を行った。

(2) *in vitro* におけるタウロコール酸結合能の測定

実験群は以下に示した。

1. Control 群 (n=3)
2. IIAEK 群 (n=3)
3. コレスチラミン群 (n=3)

(実験操作)

IIAEK やコレスチラミンとタウロコールとの結合能は、既報⁷⁾に従い、測定した。1.85 kBq のタウロ [カルボニル-¹⁴C] コール酸 (ナトリウム塩) (Amersham International、Buckinghamshire、UK)、0.1 mol/L タウロコール酸ナトリウム (T4009、Sigma Aldrich)、0.1 mol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 2mL を含む混合液と結合基質 [Control (0 g/L)、IIAEK (5 g/L)、コレスチラミン (5 g/L)] を 37°C で 2 時間インキュベートした。その後、15,000×g で 15 分間遠心し、上清を回収した。上清中の放射能濃度は、液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。本実験の統計処理は、Turkey's test を行った。

【実験結果】

in vitro において、IIAEK は Control 群と比較して、コレステロールミセル溶解性と胆汁酸結合能に有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 1a、b)。その一方で、高コレステロール血症治療薬であるコレスチラミンでは、*in vitro* において、Control 群及び IIAEK 群と比較して、コレステロールミセル溶解性を有意に低下させ、胆汁酸結合能が有意に増加した (Fig. 1a、b)。

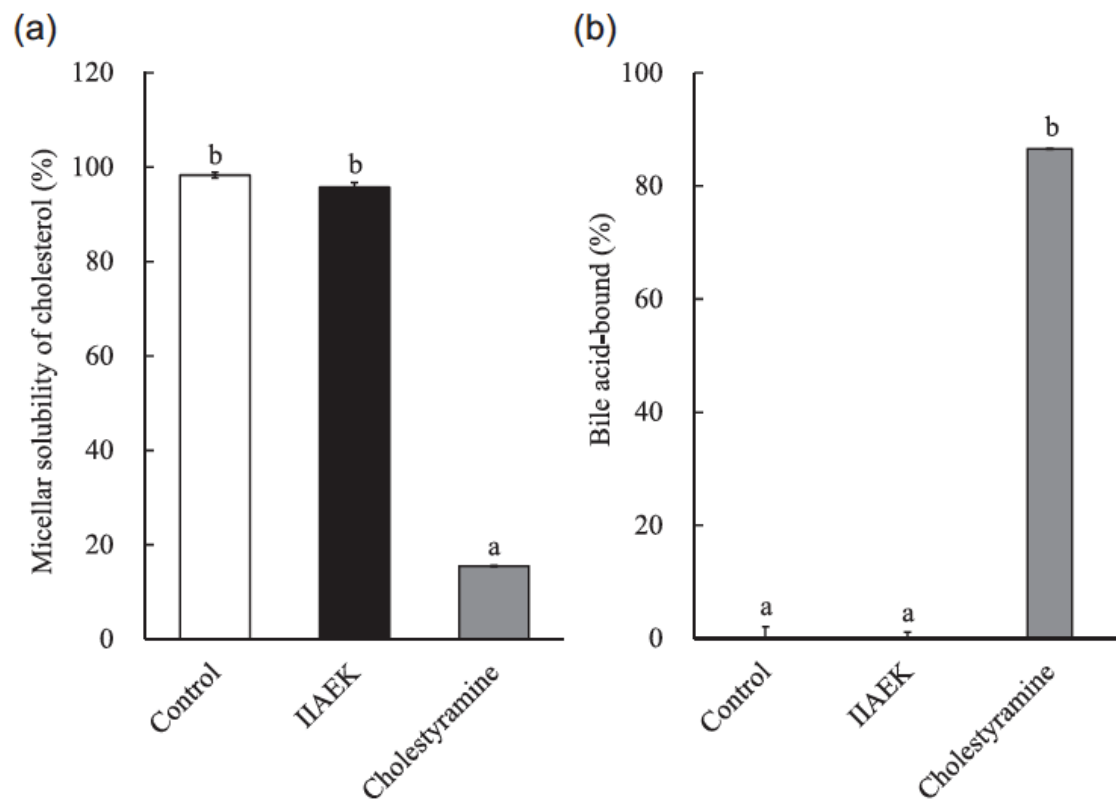


Fig. 1 *in vitro* におけるコレステロールミセル溶解性 (a) 及び胆汁酸結合能 (b) に対する IIAEK の影響

【考察】

食餌性コレステロールは、胆汁酸とコレステロールが形成するミセルが腸内を輸送することで吸収される¹⁹⁾。したがって、胆汁酸はコレステロールの腸管吸収において重要な役割を果たしている²⁰⁾。大豆タンパク質由来のペプチドである Val-Ala-Trp-Trp-Met-Tyr (ソイスタチン) は、コレステロールミセル溶解性を低下させ、強い胆汁酸結合能を有することから、ラットにおいてコレステロール低下薬であるコレステラミンに匹敵するほどコレステロールの吸収を著しく低下させる⁷⁾。我々の以前の研究では、コレステロールミセル溶解性阻害作用や高い胆汁酸結合能を持つ大豆ペプチドは、ソイスタチンと同様に、ラットや Caco-2 細胞において、コレステロール吸収を低下させる⁸⁾。したがって、これらの研究は、コレステロールのミセル溶解度の阻害と強い胆汁酸結合能が、*in vivo* でコレステロール吸収を抑制することを明確に示唆している。一方で、第 1 章より、本研究で使用了 IIAEK は、*in vitro* ではコレステロールのミセル溶解性及び胆汁酸結合能のいずれにも影響を及ぼさなかった。興味深いことに、IIAEK は側鎖が疎水性の IIA 部分と荷電性の EK 部分から構成されるペンタペプチドであり、疎水性の側鎖のみからなるソイスタチン (Val-Ala-Trp-Trp-Met-Tyr) とは構造が大きく異なり、IIAEK は界面活性剤作用を有している可能性がある。この IIAEK の界面活性剤様作用と関連して、IIAEK は緑茶成分である EGCG と同様に、混合ミセルの構成脂質であるコレステロールの拡散運動を有意に阻害することが *in silico* 研究で示されている²¹⁾。しかし、Giangreco らの *in silico* 研究で確認された IIAEK の界面活性剤様作用が、*in vivo* で起こるかどうかは依然として不明である。したがって、IIAEK 自体が界面活性剤様作用を有し、コレステロール排泄に寄与している可能性もあり、今後調査する課題である。

第2章 高コレステロール食を摂取させたマウスのコレステロール代謝に与える IIAEKの影響

第1節 高コレステロール食を摂取させたマウスの血清コレステロールレベルに与える IIAEKの影響

【実験目的】

IIAEKは、*in vitro*で、Caco-2細胞の $[^{14}\text{C}]$ -コレステロール取り込みを有意に減少させる¹⁰⁾。しかし、*in vivo*で、IIAEKがコレステロール吸収を抑制するかどうかは不明であった。そこで、本研究では、マウスの血清コレステロール、肝臓コレステロール、糞中ステロイド排泄及び $[^3\text{H}]$ -コレステロール吸収に対するIIAEKの影響を調べることを目的とした。

【実験方法】

実験群は以下に示した。

1. Control群 (n=6)
2. IIAEK群 (n=5)

(1) 動物および飼料

本研究では、6週齢の雄のC57BL/6Jマウス(日本SLC、浜松、日本)を用いた。すべてのマウスは、 $22\pm 2^\circ\text{C}$ 、12時間周期の明期(8:00~20:00)と暗期(8:00~20:00)で維持された環境制御室内の個別ケージに収容し、餌と水を自由に摂取できるようにした。市販の非精製飼料(MF、オリエンタル酵母工業、東京、日本)に6~7日間馴化させた後、体重(B.W.)が約22gのマウスをB.W.に基づいて5または6匹ずつの2群(Control群とIIAEK群)に分けた。Control群およびIIAEK群ともに、高コレステロール食の摂取期間は14日間であった。高コレステロール食の組成(%)は次のとおりであり、詳細はTable 1に示した:カゼイン 20.0;ラード 5.00;コーン油 1.00;セルロース 5.00;AIN-93 G ミネラル混合物 3.5; AIN-93 ビタミン混合物 1.00;コレステロール 1.00;コール酸ナトリウム 0.25;塩化コリン 0.20;スクロース 21.02及びコーンスターチ 42.03。なお、下記のように、高コレステロール食の調製に使用したCaseinのタンパク質含有量は製造ロット番号によって異なるため、Caseinのタンパク質含有量を考慮せずにCaseinのdiet(%)を20%とすると、タンパク質含有量に差が生じる。そのため、本研究では、Caseinのタンパク質含有量を考慮し、diet(g)の数値を230.15gとした。

(算出過程)

食餌 1000g あたり Casein の diet (%) は 20% なので、

$$\text{Casein の重量 (g)} = 1000 \text{ g} \times 0.2$$

$$= 200 \text{ g}$$

Table 1 より、タンパク質含有量は 86.90% なので、タンパク質含量を 100% に換算すると、下記のようにタンパク質含量で補正した Casein の重量 (g) が算出される。

$$\text{タンパク質含量で補正した Casein の重量 (g)} = 200 \times 100/86.90$$

$$= 230.149597$$

$$= 230.15$$

IIAEK (600 mg/kg B.W./日) を 5 g/L カルボキシメチルセルロースナトリウム塩 (CMC) (Sigma Aldrich) 溶液で溶解し、使い捨てゾンデ (CL-4596、CLEA Japan, Inc.) を用いて 1 日 1 回、午前 11 時に 14 日間マウスに経口投与した。Control 群には、IIAEK を含まない 5g/L CMC 溶液を同様に経口投与した。すべてのマウスは、イソフルラン麻酔下で心採血より安楽死させた。岐阜大学動物実験倫理委員会は、すべての実験プロトコルを承認した (許可番号: 2020-038)。本研究で用いたすべての動物実験は、岐阜大学の実験指針および規則に従って実施した。

Table 1 高コレステロール食餌組成

	diet (%) / group	diet (g) / group
Casein*1	20.00	230.15
Lard	5.00	50.00
Corn Oil	1.00	10.00
Cellulose	5.00	50.00
Mineral *2	3.50	35.00
Vitamin *3	1.00	10.00
Sucrose		200.12
Starch		400.23
Cholesterol	1.00	10.00
Sodium cholate	0.25	2.50
Choline chloride	0.20	2.00
SUM (g)		1000.00

Total (g) 1000.00

except for Sucrose and Starch (g) 399.65

Sucrose and Starch (g) 600.35

*1

Casein [NZMP Acid Casein (Fonterra Co-Operative Group Limited, Auckland, New Zealand)]

Protein 86.90%

Lactose 0.00%

Mineral 1.80%

Fat 1.00%

Water 9.70%

*2

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.

*3

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, riboflavin:6.0, pyridoxin-HCl:7.29, nicotinic acid:30,

Ca-pantothenate:16.31, folic acid:2.0, vitamin B12 (cyanocobalamin):0.025, biotin:0.2.

(2) 血清コレステロール分析

血清コレステロールレベルは、コレステロール E-テストワコー (439-17501、WAKO) を用いて測定した。

詳細な実験操作は基本的実験操作法 (2. 血清または肝臓脂質測定) に記載した。

統計処理は Student's *t*-test により、実施した (n.s.: not significance、* $p < 0.05$) 。

【実験結果】

高コレステロール食を 14 日間摂取させたマウス (IIAEK 群 vs Control 群) において、IIAEK 経口投与の有無にかかわらず、終体重、摂餌量、肝臓重量に有意差は認められなかった (Fig. 2a-c)。IIAEK の経口投与により、Control 群に比べて、血清コレステロールレベルは有意に低下した (Fig. 2d)。

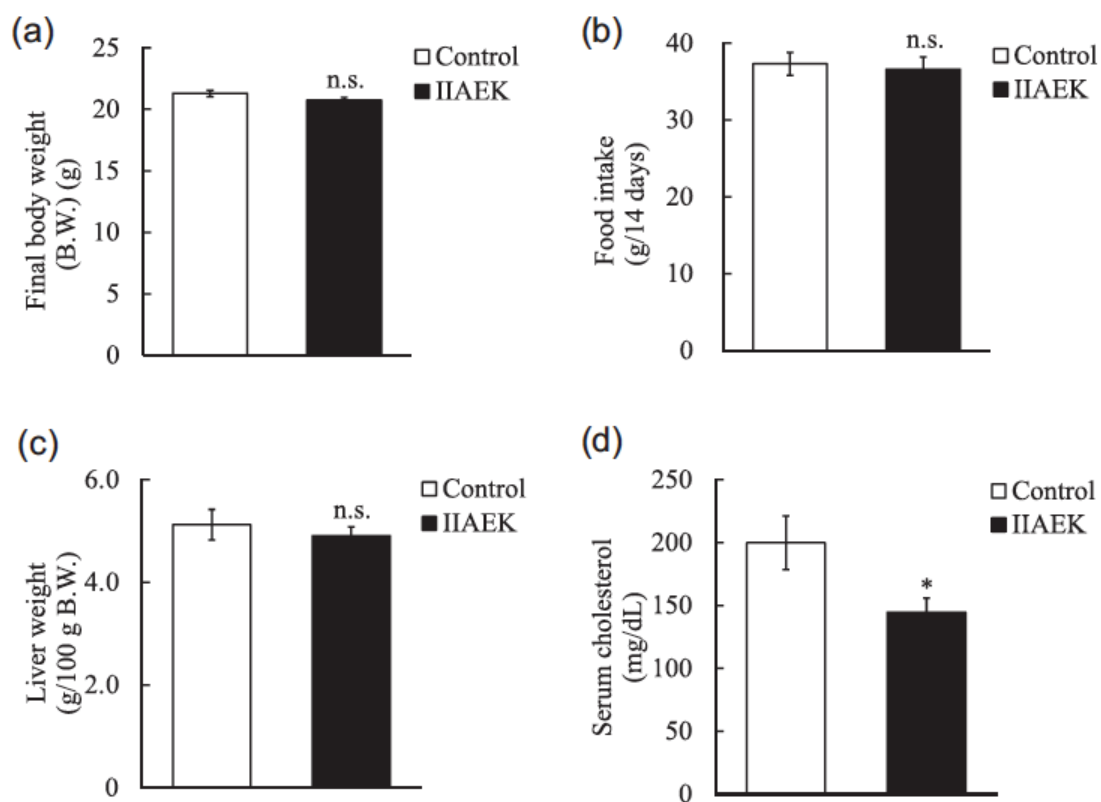


Fig. 2 高コレステロール食を摂取させたマウスの血清コレステロールレベルに IIAEK の経口投与が与える影響

(a) 終体重、(b) 食餌摂取量、(c) 肝臓重量、(d) 血清コレステロール

第 2 節 高コレステロール食を摂取させたマウスの肝臓脂質プロファイルに与える IIAEK の影響

【実験目的】

本研究では、マウスの肝臓総脂質、肝臓コレステロール及び肝臓トリグリセリドに与える IIAEK の影響を調べることを目的とした。

【実験方法】

実験群は以下に示した。

1. Control 群 (n=6)
2. IIAEK 群 (n=5)

(実験操作)

肝臓コレステロールレベルは、コレステロール E-テストワコー (439-17501、WAKO) を用いて測定した。肝臓トリグリセリドはトリグリセリド E-テストワコー (432-40201、WAKO) を用いて測定した。肝臓総脂質は既報²²⁾のように抽出した。肝臓総脂質量は、総肝脂質を含む抽出液を乾燥させ、乾燥前と乾燥後の重量差を算出する重量法により測定した。具体的には、肝臓 1g あたりの肝臓脂質量 (mg/g liver) を算出したのちに、この肝臓 1g あたりの肝臓脂質量 (mg/g liver) をマウス体重 100g あたりの肝臓重量 (g/100g B.W.) で乗じて算出した。マウス 100 g あたりで表記することで、肝臓 1g あたりの肝臓脂質量 (mg/g liver) と比較して、本研究で得られた肝臓重量やマウス体重を考慮することができるので、マウス 100 g あたりの肝臓脂質量 (mg/100 g B.W.) を本研究では採用した。

(算出過程)

マウス 100 g あたりの肝臓脂質量 (mg/100 g B.W.) = マウス肝臓 1g あたりの肝臓脂質量 (mg/g liver) × マウス体重 100g あたりの肝臓重量 (g/100 g B.W.)

肝臓総脂質の一部は、肝臓コレステロールやトリグリセリドを測定するために使用した。なお、肝臓脂質の定量方法は、既報²²⁾を参照しました。

詳細な実験操作は基本的実験操作法 (1. 肝臓総脂質抽出と分析、2. 血清または肝臓脂質測定) に記載した。

統計処理は Student's *t*-test により、実施した (* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$)。

【実験結果】

IIAEK の経口投与により、肝臓総脂質、肝臓コレステロール及び肝臓トリグリセリドは、Control 群と比較して有意に低下した (Fig. 3a-c)。

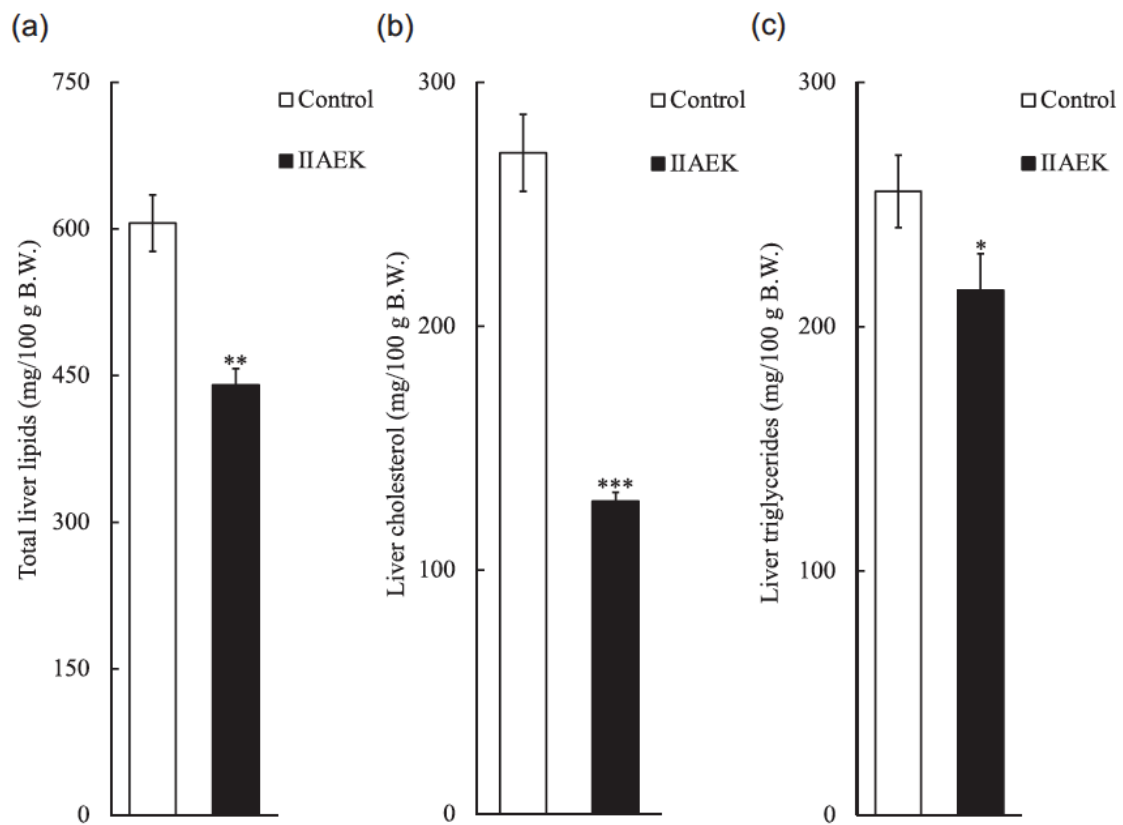


Fig. 3 高コレステロール食を摂取させたマウスの肝脂質プロファイルに与える IIAEK の影響

(a) 肝臓総脂質、 (b) 肝臓コレステロール、 (c) 肝臓トリグリセリド

第3節 高コレステロール食を摂取させたマウスの糞中ステロイド排泄に与える IIAEK の影響

【実験目的】

本研究では、マウスの糞中ステロイド排泄に与える IIAEK の影響を調べることを目的とした。

【実験方法】

実験群は以下に示した。

1. Control 群 (n=6)
2. IIAEK 群 (n=5)

(実験操作)

糞中総ステロイドは糞中胆汁酸と糞中中性ステロイドの総和である。糞中胆汁酸は、総胆汁酸-テストワコー (431-15001、WAKO) を用いて測定した。糞中中性ステロイド (コレステロール、コプロスタノール) は、KOH-エタノールでケン化した後、ヘキサンで抽出した。続いて、GC-14A 装置 (島津製作所) を用いて、TMS-HT (T0274、東京化成工業株式会社、東京都) を用いて分析した。5 α -コレスタン (C8003、Sigma Aldrich) を糞中中性ステロイド測定用の標準物質として用い、C-R8A (島津製作所) を定量分析に用いた。

詳細な実験操作は基本的実験操作法 (3. 酸性ステロイドの定量、4. 中性ステロイドの抽出、5. GC 分析) に記載した。

統計処理は Student's *t*-test により、実施した (n.s.: not significance、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$)。

【実験結果】

IIAEK の経口投与 1 週目 (0~7 日) では、糞重量及び糞中ステロイド排泄量に 2 群間で有意な差は見られなかった (Fig. 4a、b)。興味深いことに、IIAEK の経口投与 2 週目 (8~14 日) では、マウスへの IIAEK の経口投与により、Control 群と比較して、糞重量及び糞中ステロイド排泄量 (糞中コレステロール、糞中胆汁酸、糞中中性ステロイド、糞中総ステロ

イド) は有意に増加した (Fig. 4c、d) 。IIAEK を経口投与した全実験期間 (0~14 日) において、マウスへの IIAEK の経口投与により、Control 群と比較して、糞重量は増加傾向を示し (Fig. 4e) 、糞中ステロイド排泄量 (糞中コレステロール、糞中胆汁酸、糞中中性ステロイド、糞中総ステロイド) は有意に増加した (Fig. 4f) 。

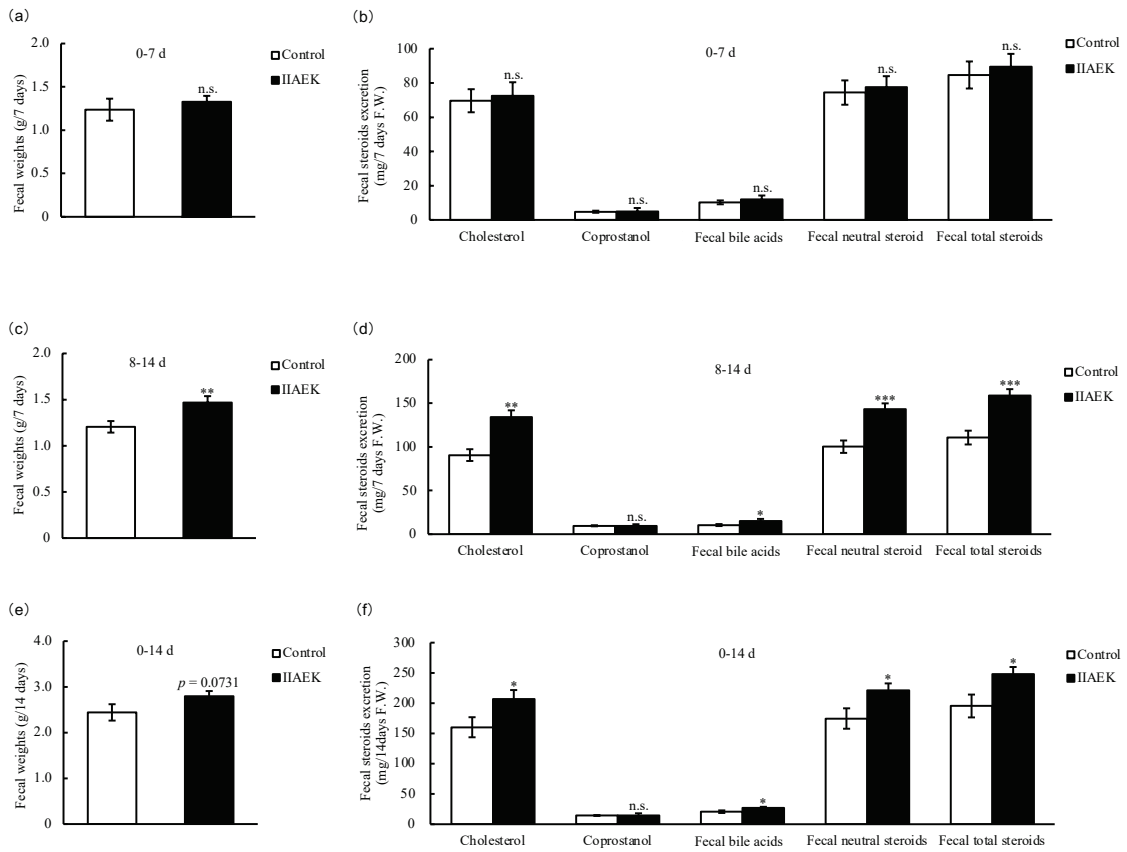


Fig. 4 高コレステロール食を摂取させたマウスの糞中ステロイド排泄量に与える IIAEK の影響

- (a) マウス糞重量 (0-7 d)、(b) マウス糞中ステロイド排泄 (0-7 d)、
 (c) マウス糞重量 (8-14 d)、(d) マウス糞中ステロイド排泄 (8-14 d)、
 (e) マウス糞重量 (0-14 d)、(f) マウス糞中ステロイド排泄 (0-14 d)

第4節 高コレステロール食を摂取させたマウスのコレステロール吸収に与える IIAEK の影響

【実験目的】

本研究では、マウスのコレステロール吸収に与える IIAEK の影響を調べることを目的とした。

【実験方法】

実験群は以下に示した。

1. Control 群 (n=5 or 6)
2. IIAEK 群 (n=4 or 5)

(実験操作)

マウスのコレステロール吸収に関する実験は、既報⁷⁾のように実施した。1 mmol/L モノオレイン (M7765、Sigma Aldrich)、5 mmol/L タウロコール酸 (T-4009、Sigma Aldrich)、0.1mM コレステロール (034-03002、WAKO)、37 kBq [1,2-³H]-コレステロール (1972.1 GBq/mmol、NEN) をそれぞれ含む 15 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を試験溶液とした。すべての試験溶液は超音波処理 (超音波ホモジナイザー、Model VP-5 ; Taitec、東京、日本) で乳化した。給餌期間終了時 (14 日間の給餌期間) に、マウスに試験溶液 0.2 mL を使い捨てゾンデ (CL-4596、CLEA Japan, Inc.) を用いて経口投与した。1 時間後、マウスをイソフルラン麻酔下で安楽死させ、血液、肝臓、小腸を採取した。血液は 845×g、4°C で 15 分間遠心分離し、血清を分析用に採取した。肝臓は氷冷生理食塩水で洗浄した。小腸は管腔内容物を 2 mmol/L タウロコール酸を含む氷冷生理食塩水で洗浄した。マウスの肝臓及び小腸の [³H]-コレステロールを、KOH-エタノールでケン化した後、ヘキサンを加え、抽出した (このとき、上層と下層の二層に分離する)。上層 (有機抽出液) を、既報²²⁾のように液体シンチレーションカウンターで分析した。

マウス血清中の [³H]-コレステロール値の測定には、マウス血清 0.14 mL を用いた。マウス血清は KOH-エタノールでケン化し、ヘキサンを加え、抽出した (このとき、上層と下層の二層に分離する)。上層 (有機抽出液) 中の [³H]-コレステロール値を液体シンチレーションカウンターで測定し、マウスの血清 0.14 mL 中の [³H]-コレステロール値を決定した。マウスの血清 0.14mL 中の [³H]-コレステロール値を用い、マウスの血清の体積をマウスの体重の 5%、血清の比重を 1.0 g/mL として、マウス 1 匹あたりの血清中の [³H]-コレステロール値を算出した。次に、マウス血清中の [³H]-コレステロール分布は、マウス 1 匹あたりの血清中の

[³H]-コレステロールの算出値を、マウスに経口投与した 0.2 mL の試験液中の [³H]-コレステロール値で除し、その商に 100 を乗じて算出した。以上の血清中の [³H]-コレステロール分布 (%/100gB.W.) の算出方法は、以下の式 (a 及び b) で示した。

a) マウス 1 匹当たりの血清中の [³H]-コレステロール値[[³H]-放射能 (dpm) /100 g B.W.] = [(マウスの血清 0.14 mL 中の [³H]-コレステロール値) (dpm) × (マウス 1 匹当たりの血清量) (mL) {マウスの体重 (g) × 0.05/1.0 (g/mL) } /0.14 (mL)] / [(マウスの体重) (g)] × 100

b) マウスの血清中の [³H]-コレステロール分布 (%/100 g B.W.) = [マウス 1 匹当たりの血清中の [³H]-コレステロール値 (dpm/100 g B.W.) / (マウスに経口投与した試験液 0.2 mL 中の [³H]-コレステロール値) (dpm)] × 100

なお、 [³H] -コレステロール吸収の値は、マウスの小腸、肝臓、血清中の [³H] -コレステロール分布の合計として計算した。

詳細な実験操作は基本的実験操作法 (6. 組織の [³H]-コレステロール定量) に記載した。

統計処理は Student's *t*-test により、実施した (n.s.: not significance、* *p* < 0.05、*** *p* < 0.001)。

【実験結果】

マウスへの IIAEK の経口投与により、Control 群と比較して、マウスの小腸及び肝臓の [³H]-コレステロール分布は有意に減少した (Fig. 5a、b)。しかし、血清中の [³H] -コレステロール分布には、2 群間で有意な差は認められなかった (Fig. 5c)。興味深いことに、マウスへの IIAEK の経口投与により、Control 群と比較して、高コレステロール食を摂取させたマウスの [³H]-コレステロール吸収は有意に減少した (Fig. 5d)。

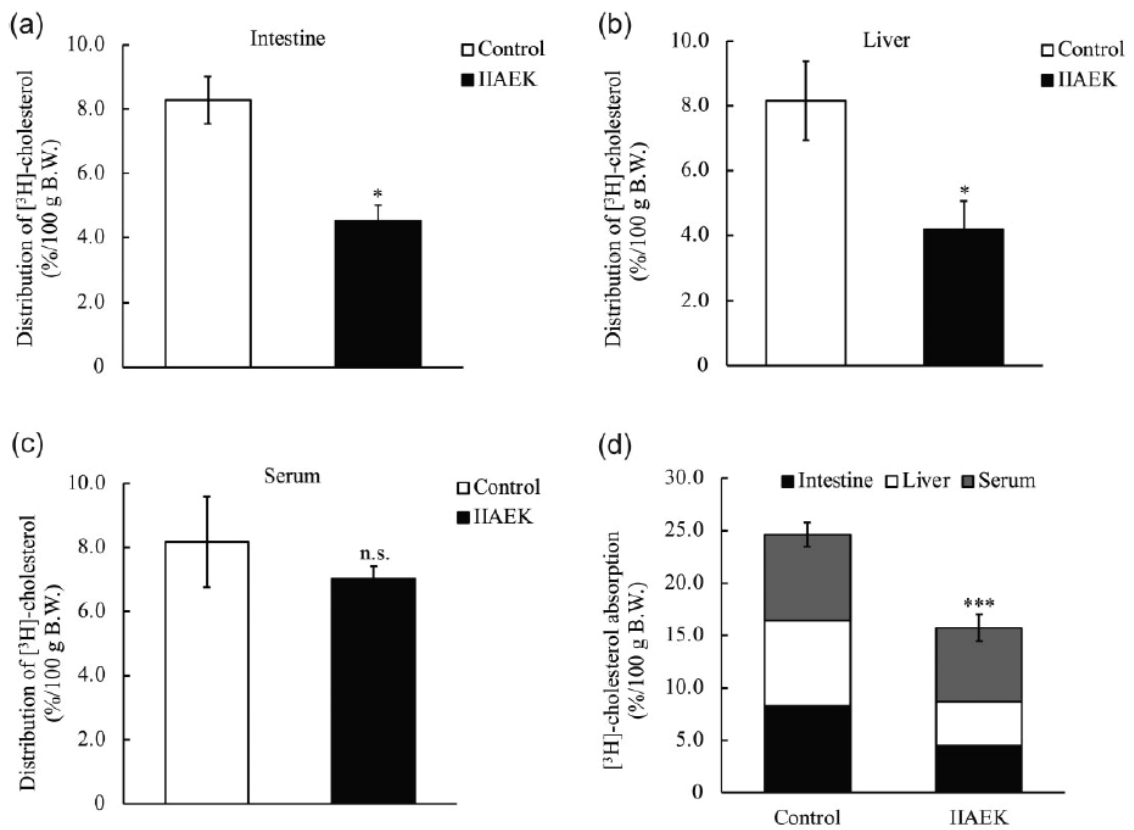


Fig. 5 高コレステロール食を摂取させたマウスのコレステロール吸収に与える

IIAEK の影響

- (a) マウス小腸の $[^3\text{H}]$ -コレステロール分布
- (b) マウス肝臓の $[^3\text{H}]$ -コレステロール分布
- (c) マウス血清中の $[^3\text{H}]$ -コレステロール分布
- (d) $[^3\text{H}]$ -コレステロール吸収

【考察】

先行研究において、牛乳 β -ラクトグロブリンのトリプシン加水分解物 (LTH) がラットの肝臓コレステロールと ^3H -コレステロール吸収を減少させたが、LTH 由来ペプチド IIAEK が *in vivo* で肝臓脂質プロファイル、糞中ステロイド排泄、コレステロール吸収に影響を及ぼすかどうかは不明であった⁹⁾。第2章では、IIAEK が肝臓総脂質、肝臓コレステロール、肝臓トリグリセリド、 ^3H -コレステロール吸収を顕著に抑制し、糞中ステロイドの排泄を増加させることを発見した (Fig. 2~5)。コレステロール低下薬であるエゼチミブがコレステロール吸収を担う NPC1L1 を阻害すると、腸でのコレステロール吸収が抑制され、腸から肝臓へのコレステロール流入が減少することが報告されている²³⁾。また、エゼチミブは、ヒトやマウスの糞中の中性ステロイドや胆汁酸の排泄を増加させることが報告されている²⁴⁾。同様に、我々の結果は、食品タンパク質由来ペプチド IIAEK による腸でのコレステロール吸収抑制が、*in vivo* での肝臓コレステロール低下と糞中ステロイド排泄の促進に寄与することを明確に示した。興味深いことに、IIAEK の経口投与 2 週目には、Control 群と比較して、糞中ステロイド排泄量が有意に増加した (Fig. 4)。この結果から、腸でのコレステロール吸収における IIAEK の効果は、IIAEK の投与 1 週間目以降より徐々に現れた可能性がある。しかし、ラットへの IIAEK の 3 日間経口投与では、コレステロール低下薬剤である β -シトステロールと同程度の血清コレステロール低下作用を示している⁹⁾。よって、0-7 日目でも IIAEK によるマウス糞中ステロイド排泄量の亢進は確認されると予想されたが、本研究では、予想に反して、0-7 日目の IIAEK 投与期間におけるマウス糞中ステロイド排泄量の亢進は確認されなかった。しかし、本研究では、IIAEK 投与における 0-7 日目のマウス血清コレステロールレベルやマウス糞中ステロイド排泄量の経時変化を確認しておらず、この結果だけでは、IIAEK 投与 0-7 日目におけるコレステロール代謝改善を説明することができない。よって、今後、これら IIAEK 投与の初期段階における血清コレステロールレベルや糞中ステロイド排泄量の経時変化を調査する予定である。具体的には、本実験では、実験期間 (0~14 日間) を 2 つに分け、マウス糞便を採取した (0~7 日間と 8~14 日間) ため、マウス糞便採取期間をより細分化し、短期間での IIAEK 投与による糞中ステロイド排泄量を確認することで、腸でのコレステロール吸収における IIAEK の効果の出現がより詳細に特定できる可能性がある。さらに、野生型マウスへの IIAEK の経口投与により、対照群と比較して、腸でのコレステロール吸収糞中ステロイド排泄に重要な十二指腸と空腸の *Abcg5* と *Abcg8* の mRNA レベルがそれぞれ有意に上昇し、腸でのコレステロール吸収を担う十二指腸と空腸の *Npc1l1* mRNA レベルを有意に減少した (未発表データ)。そのため、我々は、IIAEK によるコレステロール低下作用には、腸でのコレステロール吸収抑制だけでなく、糞中ステロイド排泄増加も関与していると考えている。今後、マウスへの IIAEK 投与時のコレステロール代謝関連遺伝子 mRNA レベルの経時変化を調査する予定である。

本研究では、既報²²⁾に従い、肝臓コレステロールやトリグリセリドの定量を行う際に、肝臓総脂質の一部を採取して、有機溶媒をとばし、残った脂質分画に蒸留水を入れて分散さ

せたのちに測定した。この肝臓脂質の定量方法の正確性であるが、今後あらかじめ決められた濃度のコレステロール等の脂質溶液を本研究で使用した肝臓脂質抽出の方法で実行し、確認する予定である。

第2章第4節で、IIAEKの経口投与により、マウスの小腸と肝臓における ^3H -コレステロールの分布がControl群に比べて有意に減少することが観察されたが、予想に反して、マウスの血清における ^3H -コレステロールの分布は、マウスの小腸及び肝臓における ^3H -コレステロールの分布ほど顕著には減少しなかった (Fig. 5)。本実験では、 ^3H -コレステロールを含む試験溶液をマウスに経口投与し、その1時間後にマウスの小腸、肝臓、血清を採取した。従って、試験溶液中の ^3H -コレステロールが小腸で吸収され、肝臓に到達し、血中に放出されるプロセスを考慮すると、マウスに試験溶液を経口投与した1時間後に採血した場合、小腸や肝臓と比較して、IIAEKの経口投与によるマウスの血清中の ^3H -コレステロールの明確な差を検出することは困難である。従って、マウスに ^3H -コレステロールを含む試験溶液を経口投与した後の採血時点を延長するなど、マウス血清中の ^3H -コレステロール分布の時間依存性を評価することにより、IIAEKがマウスの血清中の ^3H -コレステロール分布に及ぼす真の影響を明らかにすることができ、今後の検討課題である。また、本研究では、1 mM モノオレイン、5 mM タウロコール酸、0.1 mM コレステロール、37 kBq [1,2- ^3H]-コレステロール (1972.1 GBq/mmol, NEN) をそれぞれ含む 15 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を超音波処理した試験溶液をマウスに経口投与し、その1時間後にマウスの小腸、肝臓、血清を採取した。さらに、本研究で使用した試験溶液中の 37 kBq [1,2- ^3H]-コレステロールのモル濃度は $0.0418 \mu\text{M}$ であり、同じく試験溶液中に含まれている 0.1 mM コレステロールの 4.18×10^4 倍である。よって、放射性コレステロールの検出感度が、IIAEKの経口投与によるマウスの血清中の ^3H -コレステロールの明確な差を検出するのに十分ではなかった可能性がある。今後、放射線による急性効果等を考慮した上で、上述のマウスへ経口投与する試験溶液中の ^3H -コレステロール濃度を上げ、放射性コレステロールの検出感度を向上させる予定である。

本実験では、IIAEK 経口投与により変化するコレステロール代謝関連遺伝子の解析を行うことができなかった。その理由として、一般的に、コレステロールの吸収は主に十二指腸と空腸近位部で起こるが、十二指腸と空腸近位部の境界は曖昧であり、十二指腸と空腸のコレステロール吸収部位を特定することは不可能である^{25, 26)}。そのため、本実験では、実験方法の確実性・再現性を考慮し、既報⁹⁾に基づき、コレステロール吸収が起こる小腸全域 (十二指腸と空腸近位部) をサンプルとする必要があった。今後、IIAEK を経口投与したマウスの ABCA1 などのコレステロール関連遺伝子の発現を調べ、IIAEK による腸コレステロール吸収抑制の分子機構を解明する。

第3章 ラット小腸粘膜タンパク質及び Caco-2 細胞から抽出された腸脂質ラフト画分に対する分子プローブ IIXEK を用いた光親和性標識実験の nano LC-MS/MS 再解析

【実験目的】

IIAEK が誘導するコレステロール代謝改善作用に必須である IIAEK と腸で相互作用する標的分子を特定するために、光親和性標識された IIAEK への紫外線照射により捕捉し、ローダミン導入により可視化することができる新規分子プローブ IIXEK を開発した¹⁰⁾ (Fig. 6)。この IIXEK を用いて TM-PEK (Novagen, 71772) を用いて抽出されたラット小腸粘膜タンパク質に対する光親和性標識実験及び nano LC-MS/MS 解析を実施した¹⁰⁾。しかし、詳細な調査は未実施であった。また、IIAEK は新規情報伝達系を介して小腸の複数のコレステロール代謝改善遺伝子、特に、ABCA1 を下方調節することでコレステロール代謝改善作用を発揮する¹⁰⁾。そこで、当研究室では、細胞内シグナル伝達のプラットフォームである脂質ラフトを Caco-2 細胞から抽出する方法を開発し、その脂質ラフト画分に対する IIXEK を用いた光親和性標識実験及び nano LC-MS/MS 解析を実施したが、標的分子の特定までは至らなかった。このような背景から、本実験では、ラット小腸粘膜タンパク質及び Caco-2 細胞から抽出された腸脂質ラフト画分に対する IIXEK を用いた光親和性標識実験の nano LC-MS/MS 再解析を実施し、IIAEK と腸で相互作用する標的分子を特定することを目的とした。

【実験方法】

5 週齢の Wistar 系雄ラットの腸粘膜タンパク質に対する光親和性標識実験より得られた各蛍光バンド（推定分子量 94.4 kDa と 56.3 kDa）及び Caco-2 細胞から抽出された腸脂質ラフト画分に対する光親和性標識実験より得られた各バンド（推定分子量 87.4 kDa、57.8 kDa、52.6 kDa）の nano LC-MS/MS 解析を島津テクニクスに依頼した。また、その解析データから IIXEK に結合するタンパク質を調査し、IIXEK を用いた光親和性標識実験により得られた IIAEK と相互作用する標的タンパク質を同定した。

【実験結果】

ラット小腸粘膜タンパク質に対する光親和性標識実験で得られた推定分子量 94.4 kDa の蛍光バンドから脂質代謝改善及び長寿に寄与する腸アルカリ性ホスファターゼ-1（腸 ALP-1、Uniprot accession No. P15693）及び腸 ALP-2（Uniprot accession No. P51740）が検出された（Fig. 7）。また、56.3 kDa の蛍光バンドから ATP synthase subunit beta、mitochondrial（Uniprot accession No. P10719）が検出された（Fig. 7）。

腸脂質ラフト画分に対する光親和性標識実験で得られた推定分子量 87.4 kDa の蛍光バンドから、脂質代謝改善及び長寿に寄与する腸アルカリ性ホスファターゼ（腸 ALP）（Uniprot accession No. P09923）が検出された（Fig. 8）。また、57.8 kDa の蛍光バンドから ATP synthase

subunit beta、mitochondrial (Uniprot accession No. P06576) 、52.6 kDa の蛍光バンドから Trifunctional enzyme subunit beta、mitochondrial (Uniprot accession No. P55084) が検出された (Fig. 8) 。

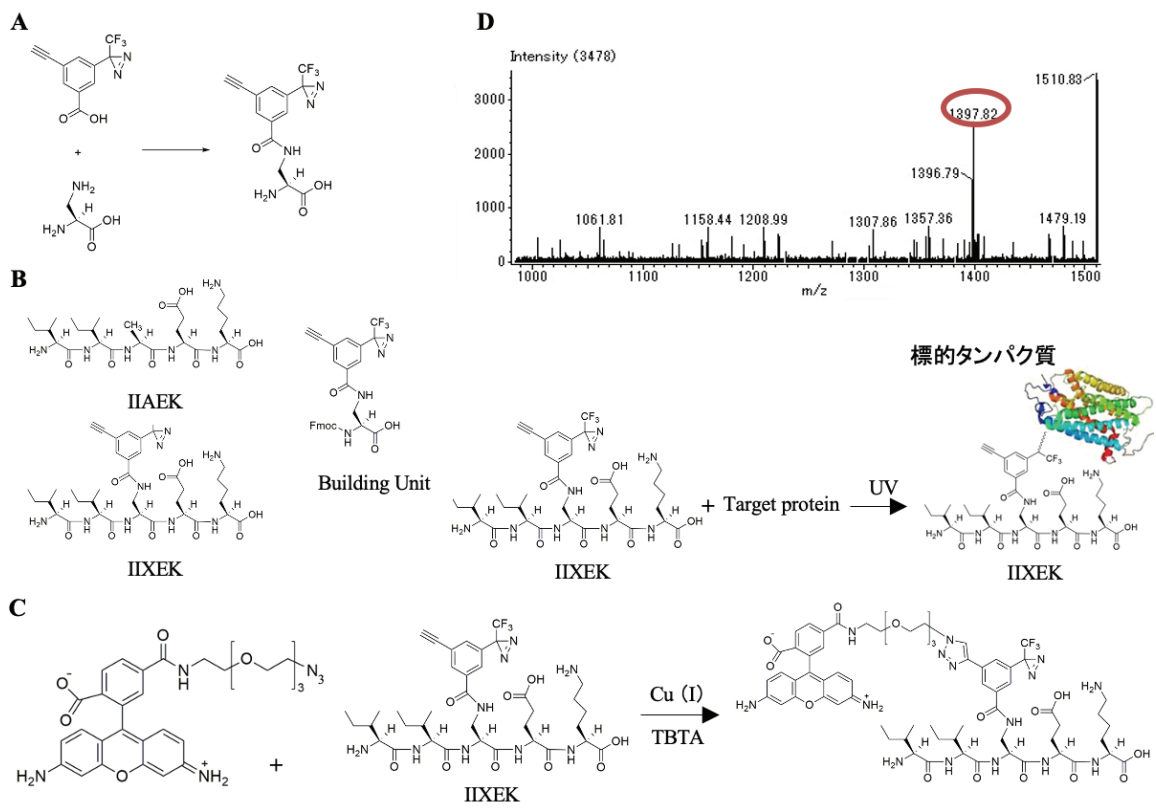


Fig. 6 分子プローブ IIXEK の開発

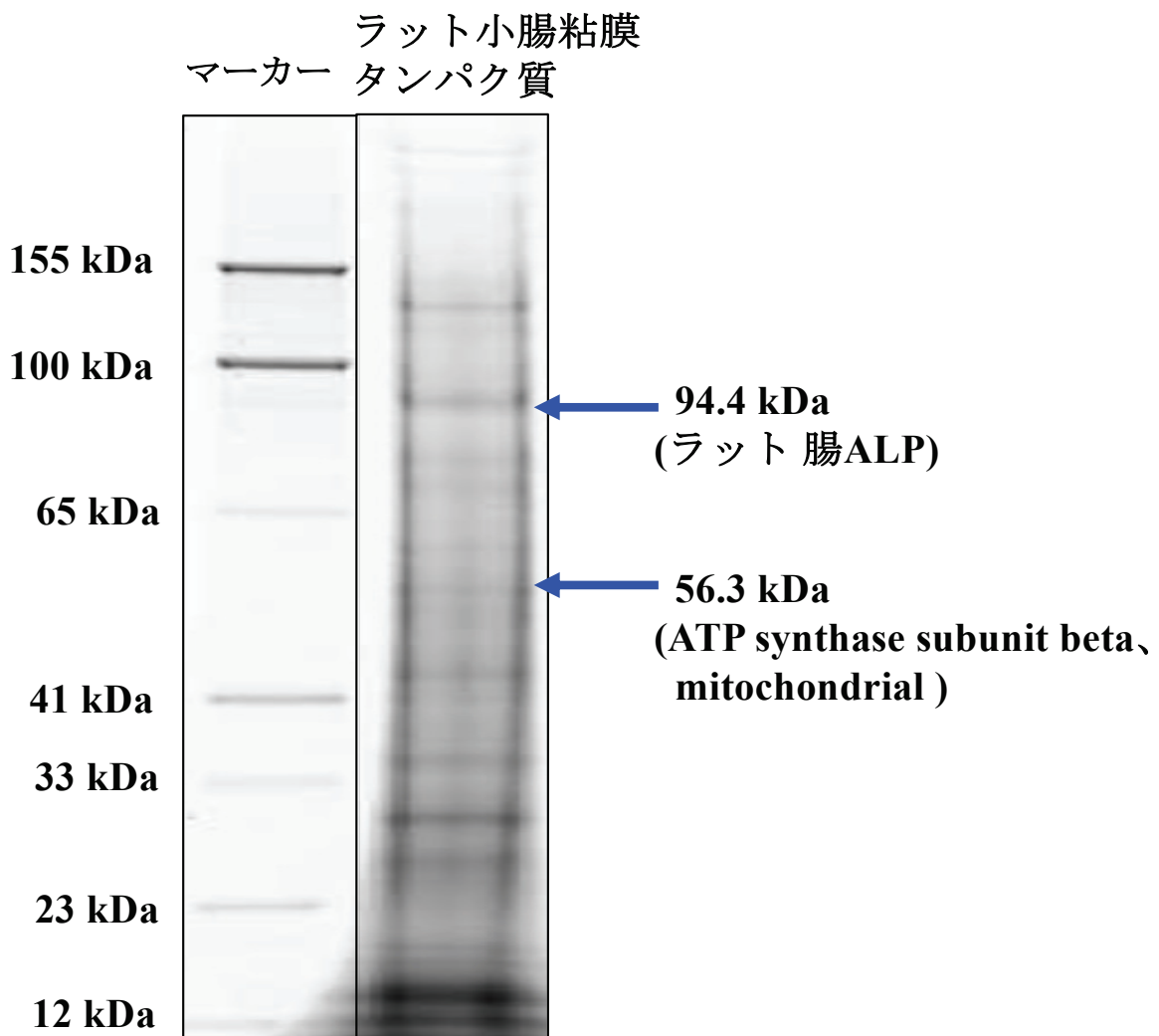


Fig. 7 ラット小腸粘膜タンパク質に対する IIXEK を用いた光親和性標識実験及び nano LC-MS/MS 解析の結果

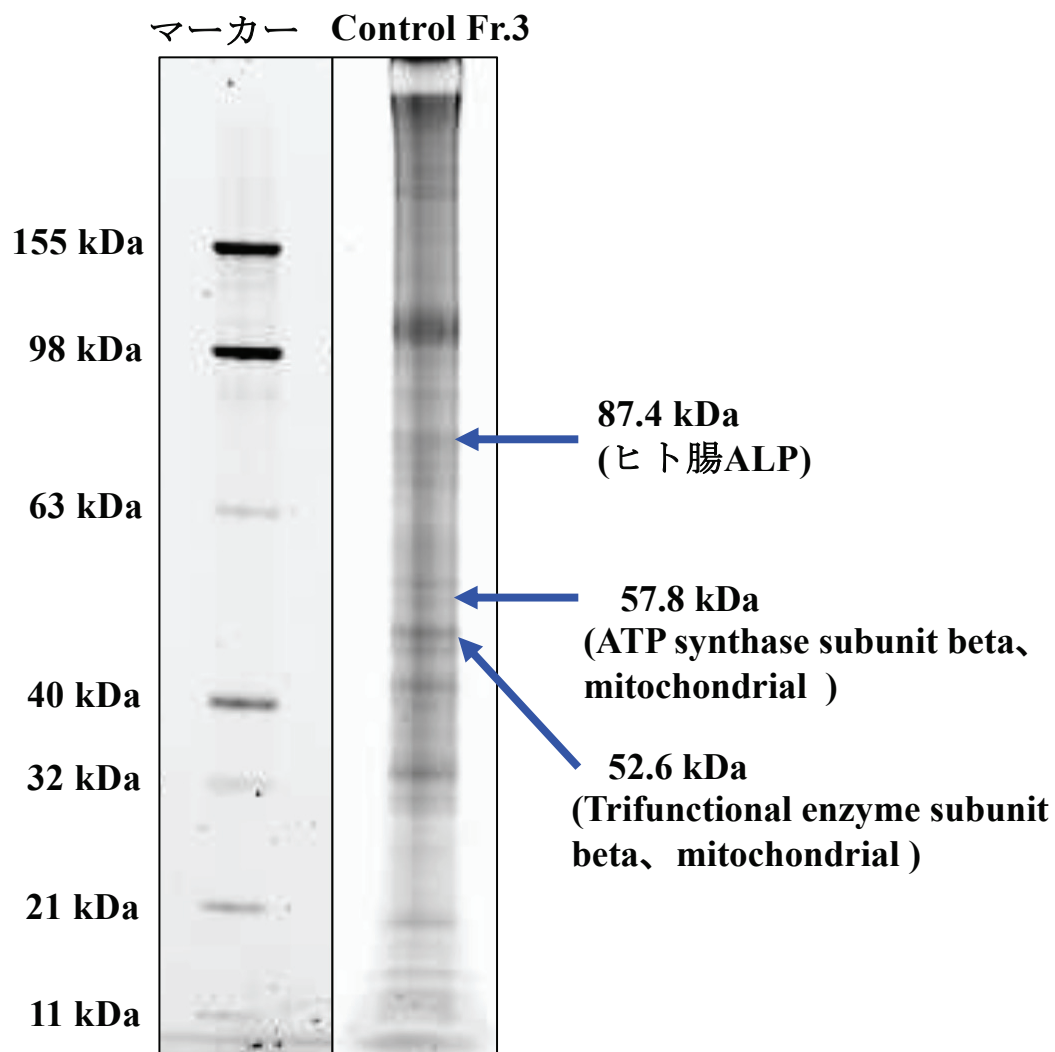


Fig. 8 Caco-2 細胞由来脂質ラフト画分に対する IIXEK を用いた
 光親和性標識実験及び nano LC-MS/MS 解析の結果

【考察】

第3章では、食品タンパク質（牛乳 β -ラクトグロブリン）由来ペントペプチド IIAEK が脂質代謝改善や長寿に寄与する腸アルカリ性ホスファターゼ（腸 ALP）と相互作用することをラット小腸粘膜タンパク質と Caco-2 細胞から抽出した脂質ラフト画分の両サンプルから世界で初めて明らかにした¹⁰⁾（Fig. 6~8）。腸 ALP は小腸上皮に高発現している刷子縁酵素である²⁷⁾。ヒトでは、腸 ALP を含むアルカリ性ホスファターゼ（ALP）は遺伝子の違いから4種類に分類される（組織非特異的 ALP、腸 ALP、胎盤型 ALP、生殖細胞型 ALP）²⁸⁾。興味深いことに、ラットでは、腸 ALP 遺伝子は2種類（*Akp3*：ラット腸 ALP-2 をコード、*Alpi*：ラット腸 ALP-1 をコード）存在することが報告されている²⁹⁾。本研究でも、2種類のラット腸 ALP（最上位：ラット腸 ALP-2、次点：ラット腸 ALP-1）が検出された。脂質代謝改善や長寿に寄与する腸 ALP は、マウス *Akp3* 遺伝子であり、ラット腸 ALP-2 のホモログにあたる²⁹⁾。興味深いことに、高脂肪高コレステロール食摂取でアテローム性動脈硬化を発症する *ldlr* 欠損マウスにヒトキメラ腸 ALP を過剰発現させると、アテローム性動脈硬化が改善するという報告がある³⁰⁾。しかし、この Ghosh らの報告³⁰⁾で使用されているヒトキメラ腸 ALP は、ヒト腸 ALP とヒト胎盤型 ALP の基質結合領域を含むことにより炎症因子であるリポ多糖への基質特異性を向上させた特殊なヒト腸 ALP であるので、内因性の腸 ALP の機能を全く反映していない³¹⁾。以上より、これら腸 ALP と脂質代謝改善の関係性に関する報告は、腸 ALP の酵素的側面（脱リン酸化触媒作用）に着目したものであり、腸 ALP が腸細胞膜に存在する栄養学的・生理学的な意味を論じていない。したがって、第3章の発見から、腸 ALP が基質の脱リン酸化を触媒するだけでなく、オリゴペプチド (IIAEK) と特異的に相互作用し、コレステロール代謝を改善する可能性が示唆された。

第3章で使用した分子プローブ IIXEK の分子量は 0.82387 kDa であり、この値は IIXEK の化学構造から算出された (Fig. 6)。IIXEK は UV 照射により相互作用する標的タンパク質と共有結合を形成し、形成された標的タンパク質-IIXEK 複合体はローダミン (0.57458 kDa) により検出された (Fig. 6)。また、ラット腸 ALP の分子量は 93 kDa であることが報告されている^{32, 33)}。さらに、5% SDS-PAGE により、ヒト腸 ALP 単量体の分子量は 86 kDa であり、ヒト腸 ALP 二量体では 170 kDa であることも報告されている³⁴⁾。以上のことを踏まえると、IIXEK の1分子 (0.82387 kDa) がラット腸 ALP 単量体 (93 kDa) もしくはヒト腸 ALP 単量体 (86 kDa) と結合し、IIXEK-腸 ALP 複合体を形成した結果、SDS-PAGE により IIXEK-腸 ALP-ローダミン複合体が 94.39847 kDa 付近または 87.39847 kDa 付近でそれぞれ検出されたと考えられる。

第3章より、ラット小腸粘膜タンパク質及び Caco-2 細胞由来脂質ラフト画分における光親和性標識実験で得られた蛍光バンドは複数確認されたことから、IIAEK と腸 ALP の相互作用はそれほど強いものではなく、結合特異性も高いものではない可能性があるが、腸で発現する酵素との相互作用を考慮すると妥当であることが考えられる。例えば、腸 ALP と同様に腸で高発現している DPP4 は GLP-1 と相互作用するが、その相互作用の強さは数十 μ M

レベルであり、その親和性は生体内基質であってもそれほど高くないことが知られている³⁵⁾。その上、DPP4 は GLP-1 以外にもいくつかの生体内基質と反応することからも、DPP4 とその基質との相互作用は低親和性であることが予想される³⁶⁾。腸 ALP を含む ALP は、ピリドキサルリン酸、リポ多糖、フラジェリン、CpG DNA モチーフ、細胞外ヌクレオチド等の様々な生体内基質を持っている³⁷⁻³⁹⁾。さらに、ALP は、アルカリ性条件下で最も高い酵素活性を示す⁴⁰⁾。以上より、腸 ALP の基質の多様性と至適 pH が原因で、腸 ALP と IIAEK の相互作用がそれほど高くないのではないかと考えた。

第4章 ラット小腸粘膜タンパク質から得られた腸 ALP の IIXEK 結合配列と Caco-2 細胞の腸脂質ラフト画分から得られた腸 ALP の IIXEK 結合配列の比較

【実験目的】

第3章では、ラット小腸粘膜タンパク質及び Caco-2 細胞の脂質ラフト画分の両画分から脂質代謝改善及び長寿に寄与する腸 ALP が検出された。そこで、この両画分から検出された腸 ALP の IIXEK 結合配列を比較し、共通なアミノ酸配列があるかどうかを評価した。

【実験方法】

ラット小腸粘膜タンパク質に対する光親和性標識実験で得られた腸 ALP の IIXEK 結合配列及び Caco-2 細胞の腸脂質ラフト画分に対する光親和性標識実験で得られた腸 ALP の IIXEK 結合配列を比較した。

【実験結果】

ラット小腸粘膜タンパク質から得られ、光親和性標識実験の 94.4 kDa のバンドで特定された腸 ALP-1 と腸 ALP-2 の IIXEK 結合配列を Fig. 9A、B に示した。また、56.3 kDa のバンドで特定された ATP synthase subunit beta、mitochondrial の IIXEK 結合配列を Fig. 9C に示した。

Caco-2 細胞の腸脂質ラフト画分から得られ、光親和性標識実験の 87.4 kDa のバンドで特定された腸 ALP の IIXEK 結合配列を Fig. 9D に示した。また、57.8 kDa のバンドで特定された ATP synthase subunit beta、mitochondrial の IIXEK 結合配列を Fig. 9E に示した。さらに、52.6 kDa のバンドで特定された Trifunctional enzyme subunit beta、mitochondrial の IIXEK 結合配列を Fig. 9F に示した。

ラット小腸粘膜タンパク質 (Fig. 9A、B) と Caco-2 細胞の脂質ラフト画分 (Fig. 9D) の両画分から腸 ALP の IIXEK 共通結合配列として GFYLFVEGGR を同定した (Fig. 9A、B、D)。この腸 ALP の IIXEK 共通結合配列 GFYLFVEGGR はラット小腸粘膜タンパク質及び Caco-2 細胞の脂質ラフト画分の両画分では、腸 ALP のアミノ酸配列の N 末端から 324-333 に位置している。

A

1 MQGDWVLLLL LGLRIHLSFG VIPVEENPV FWNQKAKEAL DVAKKLOPIO
51 TSAKNLIIFLG DGMGVPTVTA ATRILKQQLG GHLGPETPLA MDHFPPTALS
101 KTYNVDRQVP DSAGTATAYLC CGVKANYKTI GVSAARFNQC CNSTFGNEVF
151 SVMHRAKKAG KSYGVVTTTR VQHASPAGTY AHTVNRDWYS DADMPSSALQ
201 EGCKDIATQL ISNMDIDVIL GGRKFMFPK GTPDPEYPGD SDQSGVRLDS
251 RNLVEEWLAK YQGRYVWNR EQLMQASQDP AVTRLMGLFE PTEMKYDVNR
301 NASADPSLAE MTEVAVRLLS RNPQGFYLFV EGGRIDQGHG AGTAYLALTE
351 AVMFDSAIEK ASQLTNEKDT LTLITADHSH VFAFGGYTLR GTSIFGLAPL
401 NAQDGRKSYTS ILYGNPGYV LNSGNRPVNT DAESGDVNYK QQAAVPLSSE
451 THGGEDVAIF ARGPAHLVH VQEQQNYIAH VMAFAGCLEP YTDCLLAPPA
501 DENRPTTPVQ NSAITMNNVL LSLQLLVSM LLLVGTALVVS

B

1 MQGAWVLLLL GFRLQLSLV IPVEENPAF WTQKAADALN VAKKLOPIQT
51 SAKNLIIFLG DGMGVATVTA TRILKQLEG NLGPETPLAM DHEFYMALESK
101 TYSVDROVPD SASTATAYLC GVKINYK TIGVSAARFDQC NNTFGNEVLS
151 VMYRACKKAGK SVGVGDHTRV QHASPAGTYV HTVTSNWDYD ADMPALPQE
201 GCKDIATOLI SNMIDINVLG GGRKYMFPAG TPDPEYPNV NETGTRLDGK
251 NLYOEWSLKH OGSOYVWNR ELIQSLDPS VTYL MGLFEP VDTKFEIQR
301 DPLMDPSLKD TEAALHVLNR NPKGFYLFVE GGRIDRGHHL GTAYLALTEA
351 VMFDSAIERA SLQASEQDIL TIVTADHSHV FSFGGYTLRG TSIFGLAPL
401 ALDGKPYTSI LYGNPGYV TGERPNVTD ESHDPSYQQ AAAPVKSETT
451 VGKDVAIFAR GPQAHLHGV QEQNYIAHVM AFAAGCLEPT DCLLAPPADE
501 NRPTTPVQNS TTTTTTTTTT TTTTTTRVQ NSASSLGPAT APLAWHYWPR

C

1 MSLSLVGRVAS ASASGALRGL NPLAALPOAH LLLRTAPAGV HPARDYAAQS
51 SAAPKAGTAT GQIVAVIGAV VDVQFDEGLP PILNALEVQV RESRLVLEVA
101 QHLGESTVRT IAMDGTGLV RGQKVLDSGA PIKIPVGPET LGRIMNVIGE
151 PIDERGPIKT KOFAPIHAEA PEFMEMSVEQ EILATGIKYV DLLAPYAKGG
201 KIGLFGGAGV GKTYLIMELNNYAKAHGGY SVFAGVGERT REGNDLYHEM
251 IESGVINLKD ATSKVALVYG QMNEPPGARA RVALTGLTVA EYFRDQEGOD
301 VLLFIDNIER FTQAGSEVSA LLGRIPSAVG YOPLATDMG TMOERITTTK
351 KGSITSVQAI YVPADDLTD PATTFAHLD ATTVLSRAIA ELGIVPAVDP
401 LDSTSRIMDP NIVGSEHYDV ARGVQKILQD YKSLQDIIAI LGMDLSEED
451 KLTVSRARKI ORFLSOPFOV AEVFTGHMKG LVPLKETIKG FQOILAGDYD
501 HLPEQAFYMV GPIEEAVAKA DKLAEEHGS

D

1 MQGPWVLLLL GLRLQLSLV IPAEENPAF WNRQAAEALD AAKKLOPIQK
51 VAKNLIIFLG DGLGVPTVTA TRILKQKNG KLGPETPLAM DRFPYALASK
101 TYNVDRQVPD SAATATAYLC GVKANFQITIG LSAAARFNQC NTRRGNEVIS
151 VMNRAKQAGK SVGVVTTTRV QHASPAGTYA HTVNRNWYS DADMPASARQE
201 GCQDIATQLI SNMIDIDVILG GGRKYMFPAG TPDPEYPADA SONGIRLDGK
251 NLYOEWLAKH OGAWYVWNR ELMQASLDQS VTHLMGLFEP GDTKYEIHDR
301 PTLDPMLMEM TEAALRLSR NPRGFYLFVE GGRIDHGHHE GVAYQALTEA
351 VMFDDAIERA GQLTSEEDTL TLVTADHSHV FSFGGYTLRG SSIFGLAPSK
401 AQDSKAYTSI LYGNPGYV NSGVRPVDNE SESGSPDYQQ QAAVPLSSEI
451 HGGEDVAIFA RGPQAHLVH VQEQSFVAHV MAFAACLEPY TACDLAPPAC
501 TDDAHPVAA SLPLLAGTLL LLGASAAP

E

1 MLGFVGRVAA APASGALRRL TPSASLPPAQ LLLRAAPTAV HPVDRDYAAQT
51 SPSKAGAAAT GRIVAVIGAV VDVQFDEGLP PILNALEVQV RETRLVLEVA
101 QHLGESTVRT IAMDGTGLV RGQKVLDSGA PIKIPVGPET LGRIMNVIGE
151 PIDERGPIKT KOFAPIHAEA PEFMEMSVEQ EILATGIKYV DLLAPYAKGG
201 KIGLFGGAGV GKTYLIMELNNYAKAHGGY SVFAGVGERT REGNDLYHEM
251 IESGVINLKD ATSKVALVYG QMNEPPGARA RVALTGLTVA EYFRDQEGOD
301 VLLFIDNIER FTQAGSEVSA LLGRIPSAVG YOPLATDMG TMOERITTTK
351 KGSITSVQAI YVPADDLTD PATTFAHLD ATTVLSRAIA ELGIVPAVDP
401 LDSTSRIMDP NIVGSEHYDV ARGVQKILQD YKSLQDIIAI LGMDLSEED
451 KLTVSRARKI ORFLSOPFOV AEVFTGHMKG LVPLKETIKG FQOILAGDYD
501 HLPEQAFYMV GPIEEAVAKA DKLAEEHSS

F

1 MTLTYPFKN LPTASKWALR FSIRPLSCSS QLRAAPAVOT KTKKTLAKPN
51 IRNVVVVDGV RTPFLLSGTS YKDLMPHDLA RAALTGLLHR TSVPKEVVDY
101 IFGTIVIOEV KTSNVAREAA LGAGFSDKTP AHTVTMACIS ANQAMTTGVG
151 LIASGQDVI VAGGVELMSD VPIRHSRKM R KLMLDLNKA SGMQRSLSLIS
201 KFRENLAPE LPAVSEESTS ETMCHSADRL AAAFAVSRLE ODEVALRSHS
251 LAKKAODEGL LSDVVPFKVP GKDTVTKNG IRPSSLEQMA KLKPAFIKPY
301 GTVTAANSS LTDGASAMIL MAEEKALAMG YKPKAYLRDF MYVSDPKDO
351 LLLGPYATP KVLEKAGLTM NDIDAFEFHE AFSGOILANF KAMSDWFAE
401 NYMGRKTKVG LPPLEKFNW GGSLSLGHPP GATGCR LVMA AANLRKEGG
451 OYGLVAACAA GGOGHAMIVE AVPK

Fig. 9 nano LC-MS/MS による特定された腸 ALP の IIXEK 結合アミノ酸配列

- (A) ラット腸 ALP-1
(Uniprot accession No. P15693)
- (B) ラット腸 ALP-2
(Uniprot accession No. P51740)
- (C) ラット ATP synthase subunit beta、mitochondrial
(Uniprot accession No. P10719)
- (D) ヒト腸 ALP
(Uniprot accession No. P09923)
- (E) ヒト ATP synthase subunit beta、mitochondrial
(Uniprot accession No. P06576)
- (F) ヒト Trifunctional enzyme subunit beta、mitochondrial
(Uniprot accession No. P55084)

【考察】

第4章では、ラット腸 ALP とヒト腸 ALP 間で IIAEK が相互作用するアミノ酸配列に共通点があるかどうかを調査するために、nano-LC-MS/MS 解析からラット小腸粘膜タンパク質及び Caco-2 細胞由来脂質ラフト画分からそれぞれ検出された腸 ALP の IIXEK 結合配列を比較した。驚くべきことに、腸 ALP の IIXEK 共通結合配列として GFYLFVEGGR を同定した (Fig. 9)。この共通アミノ酸配列 (GFYLFVEGGR) は、マウス腸 ALP の1つであるマウス十二指腸型腸 ALP (遺伝子名: *Akp3*) にも存在する。この腸 ALP の IIXEK 共通結合配列中のグルタミン酸 (E) は、42 番目のアミノ酸残基であるアスパラギン酸 (D)、155 番目のアミノ酸残基であるセリン (S) 及び 317 番目の残基であるグルタミン (Q) とともに、ラット IAP において Mg^{2+} によって制御されている⁴¹⁾。また、セリン残基は、ラット腸 ALP の活性中心である⁴¹⁾。ラット腸 ALP は、1つの Mg^{2+} と 2つの Zn^{2+} の計 3つの金属イオンによって配位されており、酵素活性において重要な役割を果たしている⁴¹⁾。しかし、腸 ALP の IIXEK 共通結合配列 (GFYLFVEGGR) の特異性や IIAEK が誘導するコレステロール代謝改善作用との関連性については、今後さらなる検討が必要である。

第5章 IIAEK が誘導する腸アルカリ性ホスファターゼ（腸 ALP）活性化

第1節 Caco-2 細胞のアルカリ性ホスファターゼ（ALP）比活性に与える

2 mM IIAEK の影響

【実験目的】

本研究では、コレステロールミセル無添加・添加条件下で、Caco-2 細胞の ALP 比活性に 2 mM IIAEK 添加がどのような影響を及ぼすかを調査することを目的とした。

【実験方法】

実験群は以下に示した。

1. Control 群 (n=6)
2. 2 mM IIAEK 群 (n=6)

(実験操作)

6 well Transwell (Corning, 3412) の各 upper chamber に Caco-2 細胞を 10% 血清含有 DMEM (血清: FETAL BOVINE SERUM (FBS, biosera, FB-1061/500) で 2.0×10^5 cells/well とするよう調製し、播種を行なった。また、各 lower chamber に 10% 血清含有 DMEM を 2.6 ml ずつ加え、CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) で 14 日間培養した。第 3、5、8、10、12 日目に 10% 血清含有 DMEM で培地交換を行い、Caco-2 細胞の分化を誘導した。細胞播種から第 15 日目に、細胞を血清フリー DMEM で 2 回洗浄し、Control 群には、血清フリー DMEM を、2 mM IIAEK 群には 2 mM IIAEK を含む血清フリー DMEM をそれぞれ upper chamber に添加した。その後、Lower chamber には、10% 血清フリー DMEM を添加して 24 時間培養した。24 時間培養後、全タンパク質回収を行い、405 nm における Caco-2 細胞の ALP 比活性を測定した。また、上述と同様の方法でコレステロールミセル (250 μM コレステロール、5 mM タウロコール酸) を含む血清フリー DMEM を用いた実験もおこなった。詳細は基本的実験操作法 (6. Caco-2 細胞の継代、培養方法、7. Caco-2 細胞へのサンプルの添加、8. 分化確認のための Millicell ERS-2 抵抗値測定システムによる TER の測定方法、9. Caco-2 細胞におけるタンパク質回収、10. Lowry 法によるタンパク質濃度測定、11. アルカリ性ホスファターゼ (ALP) 比活性の測定) に記載した。統計処理は Student's *t*-test により、実施した (***) $p < 0.001$)。

【実験結果】

コレステロールミセル添加の有無に関わらず、2 mM IIAEK 添加により Caco-2 細胞の ALP 比活性は Control 群と比較して、有意に上昇した (Fig. 10 A、B)。

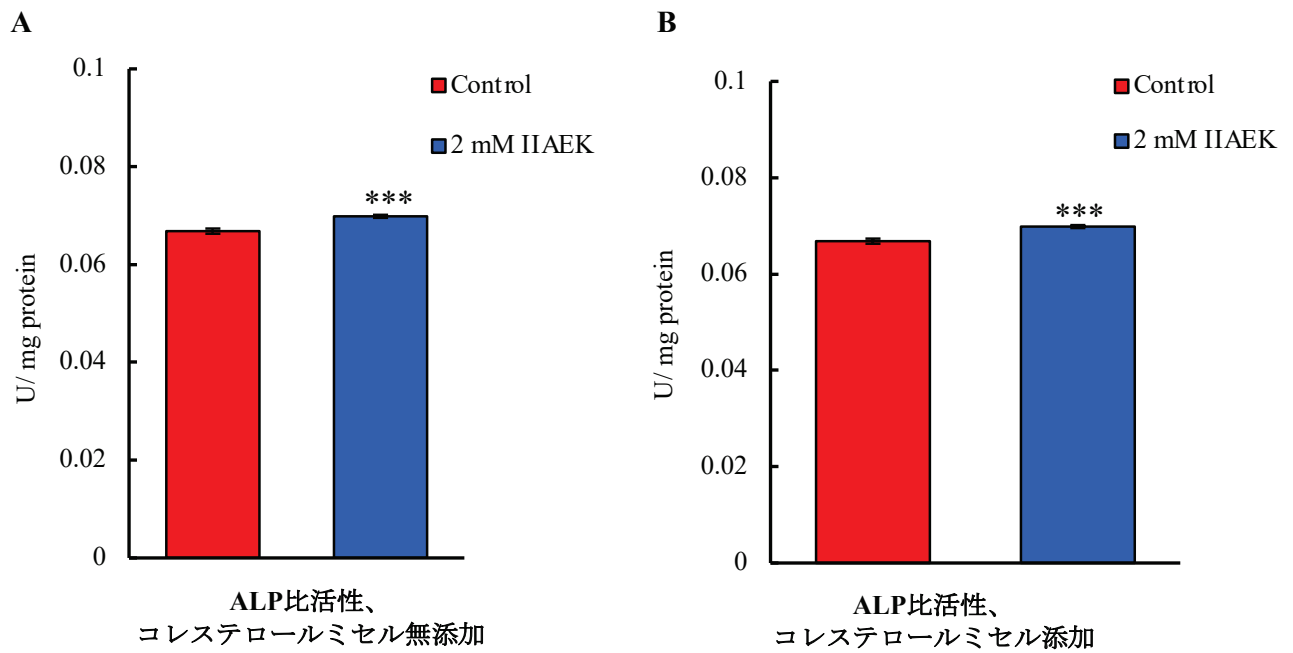


Fig. 10 Caco-2 細胞の ALP 比活性

(A) コレステロールミセル無添加 (B) コレステロールミセル添加

1. Means \pm SEM of 6 wells per group.
2. Statistical significance compared with Control by Student's *t*-test (***) $p < 0.001$.

第2節 Caco-2 細胞の腸 ALP mRNA レベルに与える 2 mM IIAEK の影響

【実験目的】

本研究より、コレステロールミセル添加の有無に関わらず、Control 群と比較して、2 mM IIAEK の添加により、ALP 比活性が有意に上昇することが明らかになった¹⁰⁾。また、腸 ALP は脂質代謝改善や長寿と密接に関連しているという報告がある⁴²⁻⁴⁴⁾。そこで、本実験では、コレステロールミセル無添加・添加条件で、2 mM IIAEK 添加が Caco-2 細胞の腸 ALP mRNA レベルにどのような影響を与えるかを明らかにすることを目的とした。

【実験方法】

実験群は以下に示した。

1. Control 群 (n=6)
2. 2 mM IIAEK 群 (n=6)

(実験操作)

6 well Transwell (Corning, 3412) の各 upper chamber に Caco-2 細胞を 10%血清含有 DMEM (血清: FETAL BOVINE SERUM (FBS, biosera, FB-1061/500)) で 2.0×10^5 cells/well となるように調製し、播種を行なった。また、各 lower chamber に 10%血清含有 DMEM を 2.6 ml ずつ加え、CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) で 14 日間培養した。第 3、5、8、10、12 日目に 10%血清含有 DMEM で培地交換を行い、Caco-2 細胞の分化を誘導した。細胞播種から第 15 日目に、細胞を血清フリー DMEM で 2 回洗浄し、Control 群には、血清フリー DMEM を、2 mM IIAEK 群には 2 mM IIAEK を含む血清フリー DMEM をそれぞれ upper chamber に添加した。その後、Lower chamber には、10%血清フリー DMEM を添加して 24 時間培養した。24 時間培養後、NucleoSpin® RNA (50) (MACHEREY-NAGEL、740 955.50) を用いて Total RNA 回収を行い、リアルタイム PCR ($\Delta\Delta Ct$) 法により、腸 ALP mRNA レベルを測定した。補正は 18S rRNA レベルを測定することでおこなった。また、コレステロールミセル (250 μ M コレステロール、5 mM タウロコール酸) を含む血清フリー DMEM を用いて同様の 2 mM IIAEK 添加実験もおこなった。詳細は基本的実験操作法 (6. Caco-2 細胞の継代、培養方法、7. Caco-2 細胞へのサンプルの添加、8. 分化確認のための Millicell ERS-2 抵抗値測定システムによる TER の測定方法、12. NucleoSpin® RNA を用いた Caco-2 細胞からの Total RNA 抽出、13. RT 反応、14. SYBR Green を用いたリアルタイム PCR ($\Delta\Delta Ct$ 法)) に記載した。統計処理は Student's *t*-test により、実施した (* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)。

【実験結果】

コレステロールミセル添加の有無に関わらず、Control 群と比較して、2 mM IIAEK 添加により Caco-2 細胞の腸 ALP mRNA レベルは有意に上昇した (Table 2、Fig. 11A、B)。

Table 2 Caco-2 細胞において IIAEK が腸 ALP mRNA 発現レベルに与える影響
 (コレステロールミセル無添加：無、コレステロールミセル添加：有)

Target gene	Group	Target gene/18S rRNA	
		Ratio	% of Control
腸 ALP (無)	Control	1.01172 ± 0.07067	100 ± 6.99
	IIAEK	1.37035 ± 0.08328**	135.4 ± 6.08**
腸 ALP (有)	Control	1.00862 ± 0.06001	100 ± 5.95
	IIAEK	1.20179 ± 0.05268*	119.2 ± 4.38*

1. Means ± SEM of 6 wells per group.

2. Statistical significance compared with control by Student's *t*-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

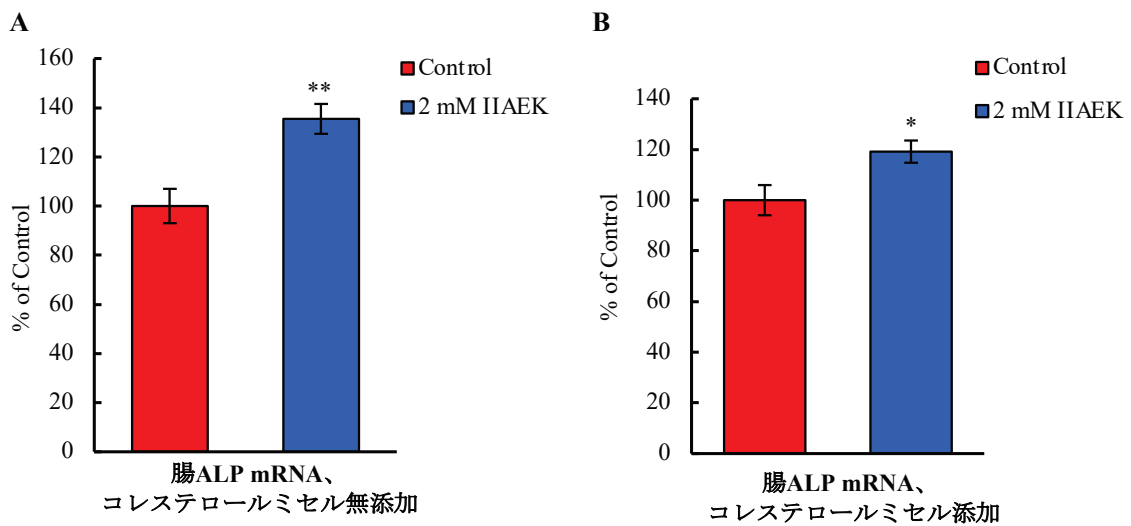


Fig. 11 腸 ALP mRNA レベル

(A) コレステロールミセル無添加 (B) コレステロールミセル添加

第3節 Caco-2 細胞の腸 ALP タンパク質レベルに与える 2 mM IIAEK の影響

【実験目的】

本研究より、コレステロールミセル添加の有無に関わらず、Control 群と比較して、2 mM IIAEK の添加により、腸 ALP mRNA レベルが有意に上昇し、ABCA1 mRNA レベルが有意に減少することが明らかになった¹⁰⁾。そこで、本実験では、コレステロールミセル無添加条件で、2 mM IIAEK 添加が Caco-2 細胞の腸 ALP タンパク質レベルにどのような影響を与えるかを明らかにすることを目的とした。

【実験方法】

実験群は以下に示した。

1. Control 群 (n = 5)
2. 2 mM IIAEK 群 (n = 5)

(実験操作)

6 well Transwell (Corning, 3412) の各 upper chamber に Caco-2 細胞を 10% 血清含有 DMEM (血清: FETAL BOVINE SERUM (FBS, biosera, FB-1061/500)) で 2.0×10^5 cells / well となるように調製し、播種を行なった。また、各 lower chamber に 10% 血清含有 DMEM を 2.6 ml ずつ加え、CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) で 14 日間培養した。第 3、5、8、10、12 日目に 10% 血清含有 DMEM で培地交換を行い、Caco-2 細胞の分化を誘導した。細胞播種から第 15 日目に、細胞を血清フリー DMEM で 2 回洗浄し、Control 群には、血清フリー DMEM を、2 mM IIAEK 群には 2 mM IIAEK を含む血清フリー DMEM をそれぞれ upper chamber に添加した。その後、Lower chamber には、10% 血清フリー DMEM を添加して 24 時間培養した。24 時間培養後、全タンパク質を回収し、ウェスタンブロット法により、腸 ALP タンパク質レベルを測定した。補正は β -actin タンパク質レベルを測定することでおこなった。詳細は基本的実験操作法 (6. Caco-2 細胞の継代、培養方法、7. Caco-2 細胞へのサンプルの添加、8. 分化確認のための Millicell ERS-2 抵抗値測定システムによる TER の測定方法、10. Lowry 法によるタンパク質濃度測定、15. SDS-PAGE、16. Western blot 法) に記載した。統計処理は Student's *t*-test により、実施した (**p* < 0.05)。

【実験結果】

コレステロールミセル無添加において、Control 群と比較して、2 mM IIAEK 添加により Caco-2 細胞の腸 ALP タンパク質レベルは有意に上昇した (Fig. 12)。

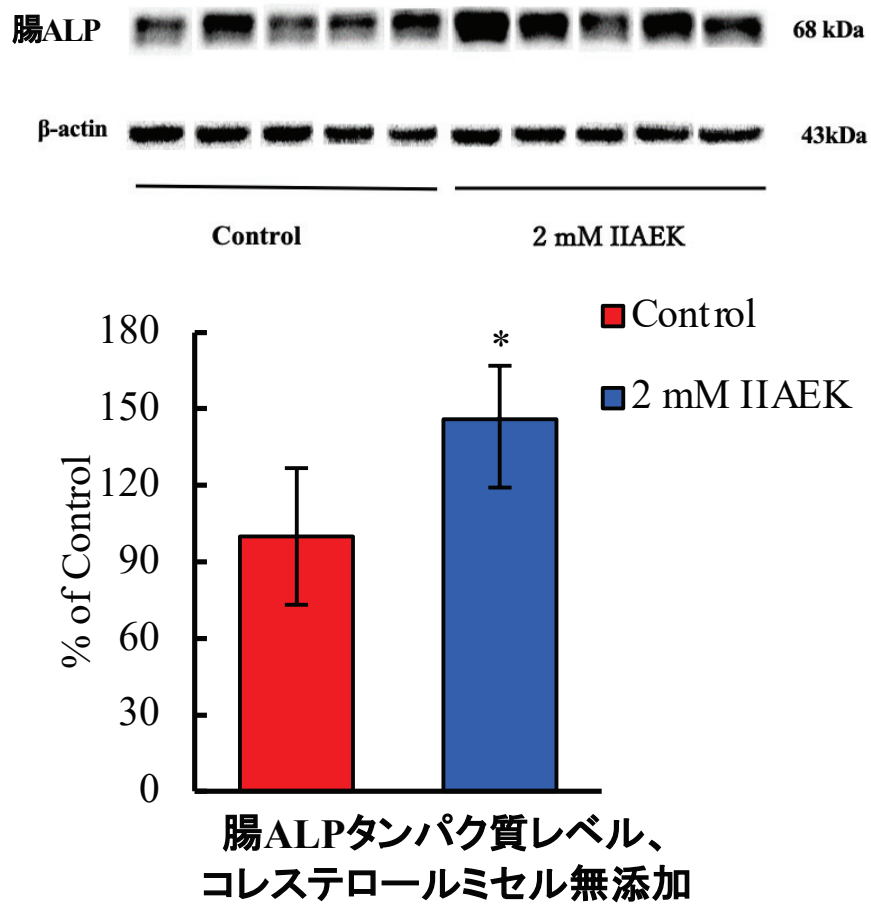


Fig. 12 腸 ALP タンパク質レベル

1. Means \pm SEM of 5 wells per group.
2. Statistical significance compared with Control by Student's *t*-test (* $p < 0.05$).

【考察】

第5章では、ヒト小腸モデルである Caco-2 細胞への 2 mM IIAEK の 24 時間添加により、脂質代謝改善や長寿に寄与する腸アルカリ性ホスファターゼ（腸 ALP）の mRNA レベル及びタンパク質レベルが Control 群と比較して有意に増加した¹⁰⁾。私が調査した限りでは、食品タンパク質由来のオリゴペプチドが腸 ALP を活性化する報告は、本研究で発見した IIAEK 以外にない。しかし、第3、4章で IIAEK は腸 ALP と相互作用することが明らかになった。IIAEK が腸 ALP と相互作用し、新規情報伝達系により腸 ALP 自身を活性化するメカニズムは、今後調査すべき課題である。リガンドと受容体の相互作用によりその受容体自身の発現が亢進する例として、ジペプチド WR と PPAR α の報告がある⁴⁵⁾。しかし、この報告では、なぜ外因性リガンド（WR）と受容体（PPAR α ）との相互作用によりその受容体（PPAR α ）自身が上昇するのかに関する明確な解答については言及されていない。よって、IIAEK と腸 ALP との相互作用により誘導される新規情報伝達系で刺激される転写因子等の中に腸 ALP 遺伝子発現を制御する転写因子が含まれている可能性があり、今後の調査課題である。

第5章第3節より、Caco-2 細胞での腸 ALP は 68 kDa のバンドで検出されたが、ヒト腸 ALP の分子量は 86 kDa である³⁴⁾。両者の分子量の相違が生まれた理由として、本実験のウェスタンブロットで使用した腸 ALP 抗体の製品情報（abcam、ab186422）によれば、腸 ALP は 68 kDa 付近で検出される。一方で、既報³⁴⁾は SDS-PAGE から算出された推定分子量であると考えられる。これらのことから、分子量の相違が生まれたと考えられるが、腸 ALP に修飾されている糖鎖の影響も考えられる。

第6章 Caco-2細胞のコレステロール代謝関連遺伝子に与える2 mM IIAEKの影響

第1節 Caco-2細胞のATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) mRNAレベルに与える2 mM IIAEKの影響

【実験目的】

本実験では、コレステロールミセル無添加・添加で、2 mM IIAEK 添加が Caco-2 細胞の ABCA1 mRNA レベルにどのような影響を与えるかを明らかにすることを目的とした。

【実験方法】

実験群は以下に示した。

1. Control 群 (n=6)
2. 2 mM IIAEK 群 (n=6)

(実験操作)

6 well Transwell (Corning, 3412) の各 upper chamber に Caco-2 細胞を 10%血清含有 DMEM (血清: FETAL BOVINE SERUM (FBS, biosera, FB-1061/500)) で 2.0×10^5 cells/well となるように調製し、播種を行なった。また、各 lower chamber に 10%血清含有 DMEM を 2.6 ml ずつ加え、CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) で 14 日間培養した。第 3、5、8、10、12 日目に 10%血清含有 DMEM で培地交換を行い、Caco-2 細胞の分化を誘導した。細胞播種から第 15 日目に、細胞を血清フリー DMEM で 2 回洗浄し、Control 群には、血清フリー DMEM を、2 mM IIAEK 群には 2 mM IIAEK を含む血清フリー DMEM をそれぞれ upper chamber に添加した。その後、Lower chamber には、10%血清フリー DMEM を添加して 24 時間培養した。24 時間培養後、NucleoSpin® RNA (50) (MACHEREY-NAGEL、740 955.50) を用いて Total RNA 回収を行い、リアルタイム PCR ($\Delta\Delta Ct$) 法により、ABCA1 mRNA レベルを測定した。補正は 18S rRNA レベルを測定することでおこなった。また、コレステロールミセル (250 μ M コレステロール、5 mM タウロコール酸) を含む血清フリー DMEM を用いて同様の 2 mM IIAEK 添加実験もおこなった。詳細は基本的実験操作法 (6. Caco-2 細胞の継代、培養方法、7. Caco-2 細胞へのサンプルの添加、8. 分化確認のための Millicell ERS-2 抵抗値測定システムによる TER の測定方法、12. NucleoSpin® RNA を用いた Caco-2 細胞からの Total RNA 抽出、13. RT 反応、14. SYBR Green を用いたリアルタイム PCR ($\Delta\Delta Ct$ 法)) に記載した。統計処理は Student's *t*-test により、実施した (**p*<0.05、***p*<0.01)。

【実験結果】

コレステロールミセル添加の有無に関わらず、Control 群と比較して、2 mM IIAEK 添加により Caco-2 細胞の ABCA1 mRNA レベルは有意に減少した (Table 3、Fig. 13A、B)。

Table 3 Caco-2 細胞において IIAEK が ABCA1 mRNA レベルに与える影響
 (コレステロールミセル無添加：無、コレステロールミセル添加：有)

Target gene	Group	Target gene/18S rRNA	
		Ratio	% of Control
ABCA1 (無)	Control	1.02753 ± 0.11073	100 ± 10.78
	IIAEK	0.70957 ± 0.01803*	69.1 ± 2.54*
ABCA1 (有)	Control	1.00658 ± 0.05180	100 ± 5.15
	IIAEK	0.79595 ± 0.01750**	79.1 ± 2.20**

1. Means ± SEM of 6 wells per group.

2. Statistical significance compared with control by Student's *t*-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

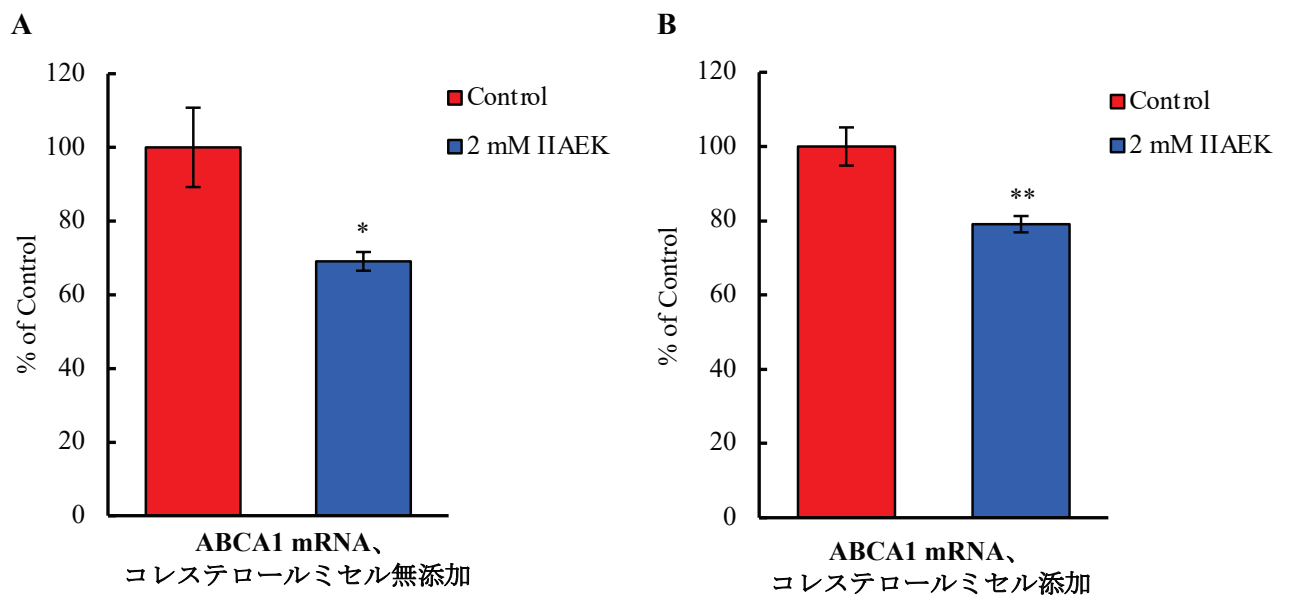


Fig. 13 ABCA1 mRNA レベル

(A) コレステロールミセル無添加 (B) コレステロールミセル添加

第2節 Caco-2 細胞の ABCA1 タンパク質レベルに与える 2 mM IIAEK の影響

【実験目的】

本研究より、コレステロールミセル添加の有無に関わらず、Control 群と比較して、2 mM IIAEK の添加により、ABCA1 mRNA レベルが有意に減少することが明らかになった。そこで、2 mM IIAEK 添加が Caco-2 細胞の ABCA1 タンパク質レベルにどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的とした。

【実験方法】

実験群は以下に示した。

1. Control 群 (n = 5)
2. 2 mM IIAEK 群 (n = 5)

(実験操作)

6 well Transwell (Corning, 3412) の各 upper chamber に Caco-2 細胞を 10%血清含有 DMEM (血清:FETAL BOVINE SERUM (FBS、biosera、FB-1061/500) で 2.0×10^5 cells/well となるように調製し、播種を行なった。また、各 lower chamber に 10% 血清含有 DMEM を 2.6 ml ずつ加え、CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) で 14 日間培養した。第 3、5、8、10、12 日目に 10% 血清含有 DMEM で培地交換を行い、Caco-2 細胞の分化を誘導した。細胞播種から第 15 日目に、細胞を血清フリーDMEM で 2 回洗浄し、Control 群には、血清フリー DMEM を、2 mM IIAEK 群には 2 mM IIAEK を含む血清フリーDMEM をそれぞれ upper chamber に添加した。その後、Lower chamber には、10% 血清フリーDMEM を添加して 24 時間培養した。24 時間培養後、全タンパク質を回収し、ウェスタンブロット法により、ABCA1 タンパク質レベルを測定した。補正は β -actin タンパク質レベルを測定した。詳細は基本的実験操作法 (6. Caco-2 細胞の継代、培養方法、7. Caco-2 細胞へのサンプルの添加、8. 分化確認のための Millicell ERS-2 抵抗値測定システムによる TER の測定方法、10. Lowry 法によるタンパク質濃度測定、15. SDS-PAGE、16. Western blot 法) に記載した。統計処理は Student's *t*-test により、実施した (* $p < 0.05$)。

【実験結果】

コレステロールミセル無添加で、Control 群と比較して、2 mM IIAEK 添加により Caco-2 細胞の ABCA1 タンパク質レベルは有意に減少した (Fig. 14)。

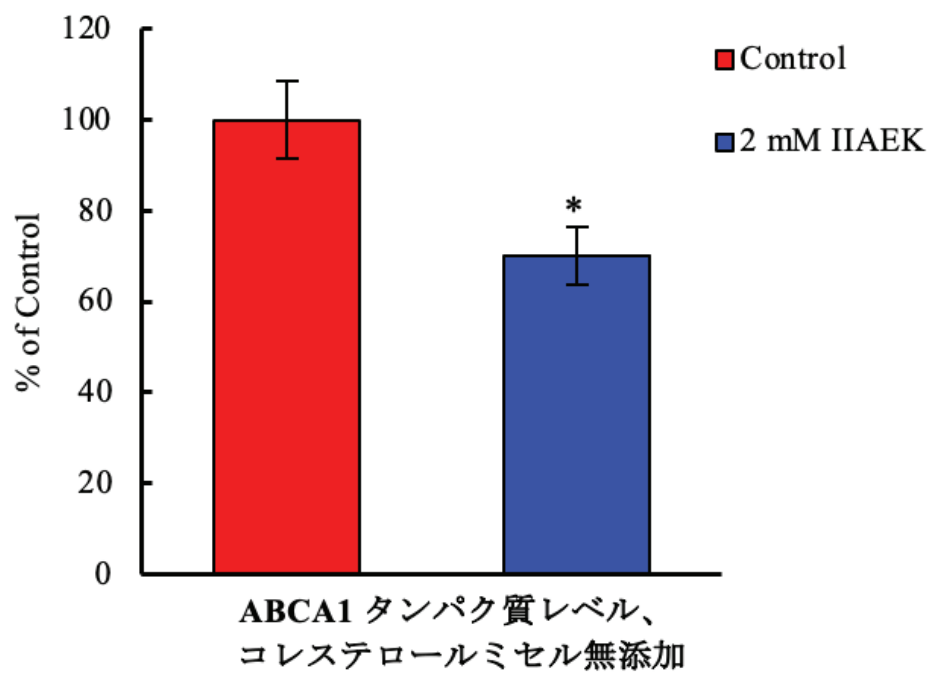
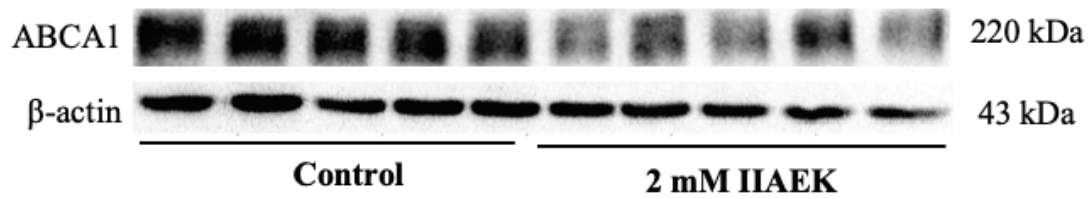


Fig. 14 ABCA1 タンパク質レベル

1. Means \pm SEM of 5 wells per group.
2. Statistical significance compared with Control by Student's *t*-test (* $p < 0.05$).

【考察】

第6章では、ヒト小腸モデルである Caco-2 細胞への 2 mM IIAEK の 24 時間添加により、コレステロール代謝改善遺伝子である ABCA1 の mRNA 及びタンパク質レベルが Control 群と比較して有意に減少した¹⁰⁾。腸 ABCA1 は、コレステロール吸収の調節因子として機能する⁴⁶⁾。興味深いことに、腸 ABCA1 欠損マウスでは、コレステロール吸収が 28%程度、血漿中総コレステロールが 30%程度それぞれ減少することが報告されている⁴⁶⁾。我々の先行研究では、新規コレステロール低減化ジペプチドであるフェニルアラニル-プロリン (FP) による腸でのコレステロール吸収抑制が、腸 ABCA1 発現レベルの低下と関連していることを明らかにした²²⁾。また、先行研究において、IIAEK は腸のコレステロール代謝関連遺伝子 (SR-B1、ABCA1、ACAT2、MTP) を下方調節し、Caco-2 細胞におけるコレステロール吸収を抑制することを発見しており、特に、IIAEK は、Control 群と比較して、ABCA1 タンパク質レベルを有意に低下させるとともに、ABCA1 遺伝子プロモーター活性も有意に低下させた¹⁰⁾。また、上述の IIAEK に関する報告では、27-OH コレステロールは LXR のリガンド⁴⁷⁾ であるので、IIAEK による CYP27A1 の mRNA レベルの有意な低下は、27-OH コレステロールレベルの低下を誘導し、LXR α の mRNA レベルの低下を伴い、最終的に ABCA1 の mRNA 及びタンパク質レベルをそれぞれ低下させると推測された¹⁰⁾。さらに、IIAEK による ABCA1 の下方調節に必須な ABCA1 遺伝子プロモーター部位を同定するために、いくつかの ABCA1 プロモーター欠失変異体を用いてルシフェラーゼアッセイを行い、ABCA1 プロモーター内の LXR 及び SP1 応答エレメントの欠失が、IIAEK により誘導された ABCA1 プロモーター活性の低下を妨げることを発見し、LXR 応答エレメントが ABCA1 mRNA レベルの減少に重要であることを明らかにした¹⁰⁾。これらの研究結果から、IIAEK は腸 ABCA1 発現の低下を介して、コレステロール吸収抑制作用を発揮することが示唆された。

第7章 8時間培養 Caco-2 細胞への腸アルカリ性ホスファターゼ (腸 ALP) siRNA 導入、24時間 IIAEK 添加がコレステロール代謝関連遺伝子 mRNA レベルに与える影響

第1節 8時間培養 Caco-2 細胞への48時間腸アルカリ性ホスファターゼ (腸 ALP) siRNA 導入、24時間 IIAEK 添加における腸 ALP mRNA レベル

【実験目的】

第3～6章より、IIAEKは、脂質代謝改善や長寿に寄与する腸ALPを標的とし、新規情報伝達系を介して、腸ALPの特異的活性化とABCA1発現の下方調節を伴って、Caco-2細胞のコレステロール代謝を改善することが明らかになった¹⁰。しかし、腸ALPとの相互作用とABCA1等のコレステロール代謝関連遺伝子の関係性に関する報告はない。そこで、本章では、8時間培養したCaco-2細胞に腸ALP siRNAを導入し、腸ALP遺伝子発現が低下したCaco-2細胞に2 mM IIAEKを添加した際、ABCA1等のコレステロール代謝関連遺伝子のmRNAレベルにどのような影響が生じるのかを調査することを目的とした。まず、本実験では、腸ALP siRNAの48時間導入、2 mM IIAEKを24時間添加した8時間培養Caco-2細胞の腸ALP mRNAレベルを測定した。

【実験方法】

実験群は以下に示した。

1. Control siRNA、Control 群 (n=3)
2. Control siRNA、2 mM IIAEK 群 (n=3)
3. 腸 ALP siRNA、Control 群 (n=3)
4. 腸 ALP siRNA、2 mM IIAEK 群 (n=3)

(実験操作)

6 well Transwell (Corning, 3412) の各 upper chamber に Caco-2 細胞を 10% 血清含有 DMEM (血清: FETAL BOVINE SERUM (FBS, biosera, FB-1061/500) で 2.0×10^5 cells/well とする) に調製し、播種を行なった。また、各 lower chamber に 10% 血清含有 DMEM を 2.6 ml ずつ加え、CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) で 8 時間培養した。その後、20 nM Control siRNA-siLentFect 複合体または 20 nM 腸 ALP siRNA-siLentFect 複合体 122.4 μL を upper chamber に加え、プレートを穏やかにゆすり混和し、CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) で 48 時間トランスフェクションした。48 時間後、Caco-2 細胞を血清フリー DMEM で 2 回洗浄し、Control 群には、血清フリー DMEM を、2 mM IIAEK 群には 2 mM IIAEK を含む血清フリー DMEM をそれぞれ upper chamber に添加した。その後、Lower chamber には、10%

血清フリーDMEM を添加して 24 時間培養した。24 時間培養後、NucleoSpin® RNA (MACHEREY-NAGEL、740 955.50) を用いて Total RNA を回収し、リアルタイム PCR ($\Delta\Delta Ct$ 法) により、Caco-2 細胞の腸 ALP mRNA レベルを測定した。補正は 18S rRNA レベルを測定することでおこなった。詳細は基本的実験操作法 (6. Caco-2 細胞の継代、培養方法、7. Caco-2 細胞へのサンプルの添加、12. NucleoSpin® RNA を用いた Caco-2 細胞からの Total RNA 抽出、13. RT 反応、14. SYBR Green を用いたリアルタイム PCR ($\Delta\Delta Ct$ 法)) に記載した。なお、統計処理は二元配置分散分析を用いて、IIAEK、腸 ALP siRNA 及び IIAEK と腸管 ALP の交互作用の影響を評価した。さらに、Tukey's test を用いて多重比較を行った。

【実験結果】

Control siRNA、Control 群と比較して、8 時間培養 Caco-2 細胞への腸 ALP siRNA 導入により、腸 ALP mRNA 発現レベルは、顕著に減少した (Table 4、Fig. 15) 。また、2 mM IIAEK 添加により、Control siRNA、Control 群と比較して腸 ALP mRNA レベルは有意に増加した (Table 4、Fig. 15) 。

Table 4 48 時間腸 ALP siRNA 導入及び 2 mM IIAEK を添加した 8 時間培養 Caco-2 細胞の腸 ALP mRNA レベル

Target gene	Group	Target gene/18S rRNA		Two-way ANOVA	
		Ratio	% of Control, Control siRNA	Factor	<i>p</i> -value
腸 ALP	Control、Control siRNA	1.00026 ± 0.01612 ^a	100 ± 1.61 ^a	IIAEK 添加	0.000134*
	2 mM IIAEK、Control siRNA	3.02775 ± 0.2783 ^b	303 ± 27.8 ^b	腸 ALP siRNA 添加	1.76E-05*
	Control、腸 ALP siRNA	0.263470 ± 0.03017 ^a	26.3 ± 2.40 ^a	Interaction	6.21E-05*
	2 mM IIAEK、腸 ALP siRNA	0.86201 ± 0.02872 ^a	68.6 ± 2.29 ^a		

- Means ± SEM of 3 wells per group.
- A two-way ANOVA was used to assess the effect of IIAEK, 腸 ALP siRNA, and the interaction between IIAEK and 腸 ALP (* *p* < 0.05).
- Further multiple comparisons were performed with Tukey's test when the interaction was significant (*p* < 0.05).
- Different superscripts indicate significant differences determined by Tukey's test (*P* < 0.05).

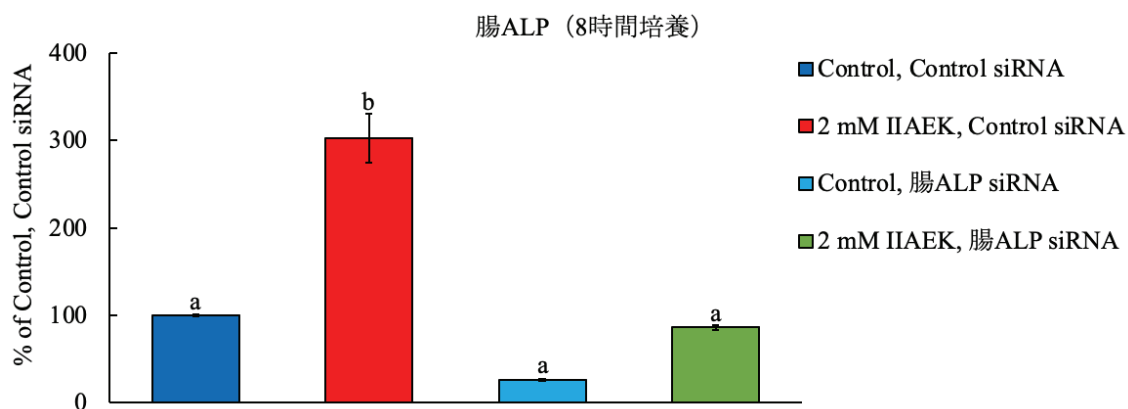


Fig. 15 48 時間腸 ALP siRNA 導入及び 2 mM IIAEK を添加した 8 時間培養 Caco-2 細胞の腸 ALP mRNA レベル

第2節 8時間培養 Caco-2 細胞への 48 時間 腸 ALP siRNA トランスフェクション、
24 時間 IIAEK 添加における ABCA1 mRNA レベル

【実験目的】

本実験では、腸 ALP siRNA の 48 時間導入、2 mM IIAEK を 24 時間添加した 8 時間培養 Caco-2 細胞の ABCA1 mRNA レベルを測定した。

【実験方法】

実験群は以下に示した。

1. Control siRNA、Control 群 (n=3)
2. Control siRNA、2 mM IIAEK 群 (n=3)
3. 腸 ALP siRNA、Control 群 (n=3)
4. 腸 ALP siRNA、2 mM IIAEK 群 (n=3)

(実験操作)

6 well Transwell (Corning, 3412) の各 upper chamber に Caco-2 細胞を 10%血清含有 DMEM (血清:FETAL BOVINE SERUM (FBS、biosera、FB-1061/500) で 2.0×10^5 cells/well となるように調製し、播種を行なった。また、各 lower chamber に 10% 血清含有 DMEM を 2.6 ml ずつ加え、CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) で 8 時間培養した。その後、20 nM Control siRNA-siLentFect 複合体または 20 nM 腸 ALP siRNA-siLentFect 複合体 122.4 μL を upper chamber に加え、プレートを穏やかにゆすり混和し、CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) で 48 時間トランスフェクションした。48 時間後、Caco-2 細胞を血清フリーDMEM で 2 回洗浄し、Control 群には、血清フリーDMEM を、2 mM IIAEK 群には 2 mM IIAEK を含む血清フリーDMEM をそれぞれ upper chamber に添加した。その後、Lower chamber には、10% 血清フリーDMEM を添加して 24 時間培養した。24 時間培養後、NucleoSpin® RNA (MACHEREY-NAGEL、740 955.50) を用いて Total RNA を回収し、リアルタイム PCR ($\Delta\Delta Ct$ 法) により、Caco-2 細胞の ABCA1 mRNA レベルを測定した。補正は 18S rRNA レベルを測定することでおこなった。詳細は基本的実験操作法 (6. Caco-2 細胞の継代、培養方法、7. Caco-2 細胞へのサンプルの添加、12. NucleoSpin® RNA を用いた Caco-2 細胞からの Total RNA 抽出、13. RT 反応、14. SYBR Green を用いたリアルタイム PCR ($\Delta\Delta Ct$ 法)) に記載した。なお、統計処理は二元配置分散分析を用いて、IIAEK、腸 ALP siRNA 及び IIAEK と腸管 ALP の交互作用の影響を評価した。また、Control, Control siRNA vs. 2 mM IIAEK, Control siRNA 間または Control, 腸 ALP siRNA vs. 2 mM IIAEK, 腸 ALP siRNA 間の比較は、Student's *t*-test を用いて行った。

【実験結果】

2 mM IIAEK 添加により、Control、Control siRNA 群と比較して ABCA1 mRNA レベルは有意に低下した (Table 5、Fig. 16)。興味深いことに、腸 ALP siRNA 導入により、IIAEK 添加による ABCA1 mRNA レベルの有意な減少は消失した (Table 5、Fig. 16)。

Table 5 48 時間腸 ALP siRNA 導入及び 2 mM IIAEK を添加した 8 時間培養 Caco-2 細胞の ABCA1 mRNA レベル

Target gene	Group	Target gene/18S rRNA		Two-way ANOVA	
		Ratio	% of Control, Control siRNA	Factor	<i>p</i> -value
ABCA1	Control、Control siRNA	1.00 ± 0.0602	100 ± 5.99	IIAEK 添加	0.0264*
	2 mM IIAEK、Control siRNA	0.597 ± 0.100*	59.5 ± 10.0*	腸 ALP siRNA 添加	0.400
	Control、腸 ALP siRNA	1.00 ± 0.0562	77.4 ± 4.34	Interaction	0.197
	2 mM IIAEK、腸 ALP siRNA	0.836 ± 0.197	64.5 ± 15.2		

1. Means ± SEM of 3 wells per group.
2. A two-way ANOVA was used to assess the effect of IIAEK, 腸 ALP siRNA, and the interaction between IIAEK and 腸 ALP (* *p* < 0.05).
3. Statistical analyses between Control、Control siRNA vs. 2 mM IIAEK、Control siRNA or Control、腸 ALP siRNA vs. 2 mM IIAEK、腸 ALP siRNA were conducted using Student's *t*-test (* *p* < 0.05).

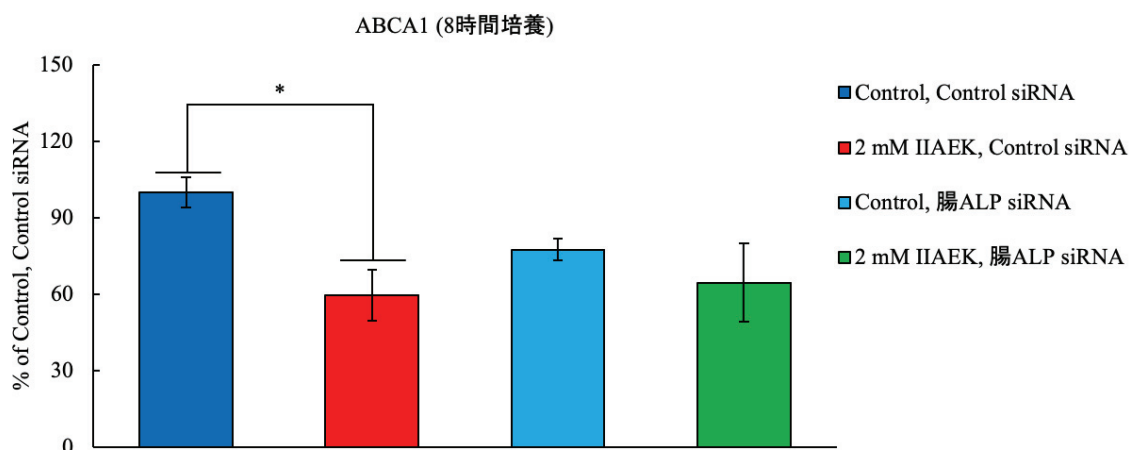


Fig. 16 48 時間 腸 ALP siRNA 導入及び 2 mM IIAEK を添加した 8 時間培養 Caco-2 細胞の ABCA1 mRNA レベル

【考察】

第7章第1節より、8時間培養の Caco-2 細胞の腸 ALP mRNA レベルは、2 mM IIAEK 添加により、Control、Control siRNA 群と比較して、有意に上昇した (Fig. 15、Table 4)。腸 ALP は出生前、ラット腸では発現しておらず、出生後に発現する⁴⁸⁾。興味深いことに、生後間もないラットの十二指腸では、腸 ALP は絨毛の基部から先端まで発現するが、10日目の授乳期及び25日目の離乳期では、腸 ALP は絨毛の先端に発現しない⁴⁸⁾。このことは、食事摂取の段階で絨毛に沿った腸 ALP の空間的・時間的発現分布が異なることを示唆している⁴⁸⁾。以上より、食事段階で腸 ALP の分布が異なることから、IIAEK が腸 ALP の腸での発現分布に影響を与える可能性がある。

第7章第2節より、興味深いことに、腸 ALP siRNA 導入により、IIAEK による ABCA1 mRNA レベルの有意な減少は消失した (Fig. 16、Table 5)。本研究では、Caco-2 細胞における IIAEK が誘導するコレステロール代謝改善作用に特に重要である ABCA1 に着目したが、IIAEK が下方調節する ABCA1 以外の腸コレステロール代謝関連遺伝子¹⁰⁾ (SR-B1、ACAT2、MTP) mRNA レベルに腸 ALP siRNA 導入がどう影響するかを今後調査する予定である。また、第2章より、マウスへの IIAEK の経口投与により、腸でのコレステロール吸収抑制を介してコレステロール代謝を改善した。本研究では、コレステロール代謝改善遺伝子 ABCA1 mRNA レベル低下を介した IIAEK のコレステロール代謝改善作用には、腸 ALP との相互作用が必須であることを *in vitro* で明らかにしたが、*in vivo* でも同様な IIAEK と腸 ALP の関係性が再現できるかどうかを腸 ALP 欠損マウスで詳細に調査する予定である。

第8章 総合討論

第1、2章では、IIAEKは、*in vitro*ではコレステロールミセル溶解性及び胆汁酸結合能のいずれにも有意な影響を及ぼさなかったが、*in vivo*ではマウスへの経口投与により腸コレステロール吸収抑制を介してコレステロール代謝を改善した¹⁸⁾。しかしながら、IIAEKがコレステロールミセル溶解性や胆汁酸結合能に影響を与えることなく、*in vivo*で腸コレステロール吸収を抑制する分子機序は不明である。我々はIIAEKがCaco-2細胞において複数のコレステロール代謝関連遺伝子(ABCA1、ACAT2、MTP、SR-B1)の発現を低下させることを報告した¹⁰⁾。腸でのコレステロールの吸収は、ABCA1依存性HDL経路及びMTP依存性カイロミクロン経路と関連していると報告されている²⁾。また、腸ABCA1欠損マウスでは、コレステロール吸収が約28%減少し、血漿総コレステロールが約30%減少した⁴⁶⁾。腸特異的MTPあるいはMTPとACAT2の両方を欠損させたマウスでは、血漿コレステロール濃度と³H-コレステロール取り込みが減少する²⁾。興味深いことに、腸ABCA1と腸MTPの両方を欠損させたマウスでは、コレステロールの吸収が92~95%減少する⁴⁶⁾。さらに、腸SR-B1は遊離コレステロールとエステル化コレステロールの取り込みに寄与している⁴⁹⁾。以上より、今後、IIAEKを経口投与したマウスのABCA1などのコレステロール関連遺伝子レベルを調べ、IIAEKによる腸コレステロール吸収抑制の分子機構を*in vivo*レベルで解明する予定である。

第2章では、IIAEKが肝臓コレステロールを含む肝臓総脂質と³H-コレステロール吸収を顕著に抑制し、糞中ステロイド排泄を増加させることを見出した¹⁸⁾。IIAEKによる糞中ステロイド排泄促進作用と関連して、*in vitro*レベルであるが、IIAEKをHepG2細胞(ヒト肝癌由来細胞)に添加すると、胆汁酸合成の律速酵素であるコレステロール7 α -水酸化酵素(CYP7A1)の発現が上昇する^{50, 51)}。したがって、IIAEKがCYP7A1を含む胆汁酸合成に関連する標的遺伝子に影響を与え、マウスの胆汁酸の糞中排泄を促進している可能性がある。また、大豆タンパク質由来のペプチド(ALEPDHRVESEGGLとSLVNNDRDSYRLQSGDAL)を7週間経口投与すると、ATP-binding cassette subfamily G members 5(ABCG5)とABCG8の腸での発現亢進を伴う糞中コレステロール排泄増加や線維芽細胞増殖因子15/19の発現抑制を介したCYP7A1の下方調節を含む肝臓での胆汁酸合成低下を誘導する⁵²⁾。さらに、カゼイン加水分解物から単離した2種類の生理活性ペプチド(SQSKVLPVPQKとHPHPHSF)は、高コレステロール食を与えたマウスにおいて、腸ABCG8ではなく腸ABCG5の発現を上昇させることにより、糞中コレステロール排泄量を増加させる⁵³⁾。今後、IIAEKが胆汁酸合成や糞中コレステロール排泄に関連する遺伝子の発現に及ぼす影響、マウスにおけるABCA1とコレステロール吸収との関連について、Caco-2細胞を用いた先行研究と比較検討する予定である。

第1、2章をまとめると、ペプタペプチド IIAEK の経口投与が、高コレステロール食を与えたマウスにおいて、コレステロールのミセル溶解性や胆汁酸結合能に影響を与えることなく、腸コレステロール吸収抑制を介してコレステロール代謝を改善することを初めて明らかにした¹⁸⁾ (Fig. 17 参照)。コレステロール低下作用などの脂質代謝改善ペプチドに関する研究は多いが、*in vivo* で生理機能を有する生理活性ペプチドの研究は少ない^{54, 55)}。本研究の知見は、食品タンパク質由来の生理活性ペプチドが生体内で腸でのコレステロール吸収を抑制する体系的メカニズムを解明する上で重要な役割を果たすかもしれない。

IIAEK が媒介するコレステロール吸収抑制作用の分子メカニズムを解明するために、第3～7章までの研究を展開した。驚くべきことに、IIAEK を含む食品由来の生理活性ペプチドが標的とする受容体に関する報告はない。第3、4章で、我々は IIAEK と相互作用する標的タンパク質を特定するために、ラット小腸粘膜タンパク質及び Caco-2 細胞由来脂質ラフト画分に対して、当研究室で化学合成した新規分子プローブ IIXEK を用いた光親和性標識実験及び nano LC-MS/MS 解析を実施した解析結果を詳細に再解析した (Fig. 6～9)。その結果、ラット小腸粘膜タンパク質及び Caco-2 細胞由来脂質ラフト画分の両画分から脂質代謝改善や長寿に寄与する腸アルカリ性ホスファターゼ (腸 ALP) が検出された (Fig. 6～9)。腸 ALP は小腸に高発現している刷子縁酵素である²⁷⁾。ヒトでは、腸 ALP を含むアルカリ性ホスファターゼ (ALP) は遺伝子の違いから4種類に分類される (組織非特異的 ALP、腸 ALP、胎盤型 ALP、生殖細胞型 ALP)²⁸⁾。また、腸 ALP を含む ALP は糖タンパク質であり、小腸の局在箇所によって、様々な糖鎖修飾を受ける可能性があることが知られている^{56, 57)}。さらに、腸 ALP を含む ALP はグリコシルフォスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型と分泌型の2つの形態で存在する^{58, 59)}。興味深いことに、GPI アンカー型タンパク質は細胞膜のシグナル伝達ドメインである脂質ラフトに存在し、細胞内シグナル伝達に関与する受容体である⁶⁰⁾。例えば、GPI アンカー型タンパク質である CD59 は通常、二量体で存在するが、細胞外リガンドによる刺激により、安定な四量体を形成し、その後、細胞内シグナル伝達を惹起する⁶⁰⁾。また、同じく GPI アンカー型タンパク質である CD55 は、NF- κ B リガンドの受容体活性化関連 Rac シグナル伝達経路により、破骨細胞の機能を調節する⁶¹⁾。このように、腸 ALP は CD59 や CD55 と同様に GPI アンカー型タンパク質であり、細胞膜受容体であるが、受容体としての生理的機能に関する報告はない。

第5章では、Caco-2 細胞を用いて、IIAEK が腸 ALP 活性化に寄与するかどうかを研究した。Control 群と比較して、IIAEK は Caco-2 細胞の ALP 比活性、腸 ALP mRNA レベル、腸 ALP タンパク質レベルをそれぞれ有意に上昇させた。この成果は、IIAEK が腸 ALP と相互作用し、IIAEK 受容体である腸 ALP 自身の遺伝子発現を上昇させる点で興味深い。腸細胞ではないが、骨芽細胞様細胞株⁶²⁾ や骨芽細胞前細胞⁶³⁾ では、ALP 遺伝子発現は Wnt/ β -カテニンシグナルによって制御されていることが報告されている。よって、IIAEK が誘導する腸 ALP 遺伝子発現も Wnt/ β -カテニンシグナルによって誘導される可能性があり、今後の調査課題である。また、IIAEK が膜結合型の腸 ALP と相互作用することと IIAEK による ALP

活性上昇の関連性に関しては、今後の課題である。腸 ALP は GPI アンカー型酵素⁶⁴⁾ であるため、細胞膜貫通領域を有していないので、腸 ALP と相互作用した情報を細胞内へ直接伝達することはできない。そのため、我々は、IIAEK 等のリガンド-腸 ALP の複合体が、細胞膜貫通領域を有する膜タンパク質と相互作用することにより、細胞内へ直接情報伝達すると仮説した。未発表のデータであるが、IIAEK-腸 ALP の複合体が、細胞膜貫通領域を有するカドヘリン-17⁶⁵⁾ と相互作用することを明らかにした。カドヘリン-17 が関与するシグナル伝達経路には、Hippo 経路が知られている⁶⁶⁾。興味深いことに、Hippo 経路で中心的な役割を果たす LATS2 がコレステロール代謝のマスターレギュレーターである SREBP2 の活性を直接阻害することが知られている⁶⁷⁾。今後、このカドヘリン-17 が誘導するシグナル伝達経路の下流に腸 ALP 活性化に重要な転写因子等がないかどうかを調査する予定である。

今までのところ、腸 ALP を含む ALP の生体内基質として知られているのは、ピリドキサノール 5'-リン酸、ピロリン酸、ホスホエタノールアミン、リポ多糖等であるが、ALP とこれら基質がどのような親和性で結合するかという報告はほとんどない³⁷⁻³⁹⁾。Liu らの報告によれば、ビタミン B₆ (50mg/kg/day) を含む高脂肪食餌を野生型マウス及び *ApoE* 欠損マウスにそれぞれ 8 週間混餌投与した結果、肝臓コレステロールレベル、肝臓トリグリセリドレベル、肝臓脂質蓄積がそれぞれ低下する⁶⁸⁾。また、Kitagawa らはビタミン B₆ 欠乏により肝臓ホスファチジルコリン合成が減少し、この合成減少は、VLDL タンパク質分泌の減少を招き、その結果、肝臓脂質蓄積抑制と血漿脂質の減少をもたらすと報告している⁶⁹⁾。さらに、興味深いことに、脂肪肝を有する患者では血清ビタミン B₆ 濃度が低下することが報告されている⁶⁸⁾。以上より、ビタミン B₆ の経口摂取は、脂質代謝の改善と関連があることが示唆された。しかし、一般的に、ビタミン B₆ は、ピリドキサーール、ピリドキシン、ピリドキサミンおよびそれらのリン酸化された形態の計 6 つの物質を指し、その中でも、ピリドキサーールリン酸 (PLP) は、酵素の補酵素として働く唯一のビタミン B₆ である⁷⁰⁾。しかし、上記の報告で使用されたビタミン B₆ は、これら 6 つのビタミン B₆ の形態の何を与えたのかは不明である。また、ビタミン B₆ が肝臓だけでなく小腸の脂質吸収や脂質代謝にどのような影響を与えているのかも不明であり、驚くべきことに、ヒトでは、脱リン酸化されたビタミン B₆ の取り込みを担う遺伝子とタンパク質はまだ同定されていない⁷⁰⁾。さらに、ビタミン B₆ が有する脂質代謝改善作用と腸アルカリ性ホスファターゼとの相互作用の関連性も不明である。このようにビタミン B₆ が有する脂質代謝改善作用の本質的な部分は明らかではない。

腸 ALP の生体内基質と関連して、腸 ALP は脂肪酸トランスポーターである CD36⁷¹⁾ と複合体を形成して存在することが報告されている⁷²⁾。興味深いことに、腸細胞内への脂肪酸吸収は CD36 の脱リン酸化により増加し、リン酸化により減少する⁷³⁾。しかし、リン酸化 CD36 は腸細胞でマウスの腸 ALP の 1 つである腸全体型腸 ALP (gIAP) と特異的に共沈したが、十二指腸特異的腸 ALP (dIAP) は共沈しないことが報告されている⁷²⁾。さらに、最近の報告では、腸 ALP (dIAP) KO マウスの小腸における脂肪酸や血清トリグリセリドの吸

収充進は、gIAP と複合体を形成する CD36 が関係している可能性があることが示されている⁷³⁾ が、その真偽は不明である。私が調べた限りでは、マウス dIAP (本研究の標的のホモログ) と生体内で相互作用する標的分子は見つかっていない。よって、今回の光親和性標識実験を応用して、今後、マウス dIAP (本研究の標的のホモログ) と生体内で相互作用する標的分子を特定する予定である。

第 5、6 章では、2 mM IIAEK を Caco-2 細胞に 24 時間添加し、ALP 比活性、腸 ALP と ABCA1 の各 mRNA レベル、腸 ALP と ABCA1 の各タンパク質レベルを測定した (Fig. 10~14、Table 2、3)。その結果、Control 群と比較して、2 mM IIAEK 添加により、ALP 比活性、腸 ALP mRNA レベル、腸 ALP タンパク質レベルはそれぞれ有意に上昇した (Fig. 10~12、Table 2)。また、Control 群と比較して、2 mM IIAEK 添加により、ABCA1 mRNA レベル、ABCA1 タンパク質レベルはそれぞれ有意に低下した (Fig. 13、14、Table 3)。腸 ALP の生理機能は小腸内環境の恒常性の維持と関連しており、小腸での脂肪酸吸収⁴²⁾、脱リン酸化による炎症性メディエーターの無毒化^{74、75)}、十二指腸表面での pH 調節⁷⁶⁾、遺伝子レベルでのタイトジャンクション関連タンパク質発現の調節⁷⁷⁾ など多岐にわたる。興味深いことに、腸 ALP は脂質代謝改善⁴³⁾ や長寿⁴⁴⁾ と密接に関連している。具体的には、腸 ALP KO マウスでは血漿コレステロールレベル、血清トリグリセリドレベルの上昇、耐糖能異常といったメタボリックシンドロームを発症する⁴³⁾。さらに、腸 ALP は腸バリアを標的とすることで老化抑制や長寿に貢献している可能性がある⁴⁴⁾。このように、腸 ALP 活性化は、脂質代謝改善や寿命延長の実現を可能にする潜在性がある。IIAEK が腸 ALP 活性化剤であることと関連して、いくつかの食餌由来成分、特に牛乳中には、腸 ALP 活性化を促す成分を含有している⁷⁸⁾。今回の実験で腸 ALP を活性化することが明らかになった IIAEK は牛乳由来のペプチドである⁹⁾。Lallès は、ALP がフレンチパラドックス (フランス人は飽和脂肪を大量に消費する一方で、心血管疾患 (CVD) が低いという疫学的観察) を解明するために重要な役割を果たしているとして主張している⁷⁸⁾。また、乳脂肪中の脂肪酸である酪酸は、結腸癌細胞の腸 ALP 遺伝子プロモーター活性を KLF5 依存的に誘導することが報告されている⁷⁹⁾。さらに、ウシラクトフェリン (bLF) 投与は、Caco-2 細胞とヒト腸管上皮細胞 (HIECs) の ALP 活性を用量依存的に増加させ、Caco-2 細胞と HIECs の分化を誘導することが報告されている⁸⁰⁾。ヨーグルトやプロバイオティクス (*Lactobacillus casei*) がマウス小腸での腸 ALP 活性を刺激することが報告されている⁸¹⁾。一方で、タンパク質を含まない飼料を与えたラットでは、腸 ALP 活性が低下することが報告されている⁸²⁾。さらに、カゼインを大豆由来のマメ科植物性タンパク質に置き換えた食事を与えたラットでは、腸 ALP 活性が低下することが報告されている⁸³⁾。したがって、腸 ALP 発現調節は食品タンパク質、特に動物性タンパク質摂取と関連していることを示している。さらに、腸 ALP は食物繊維によっても活性化される。グルコマンナンは食物発酵性可溶性食物繊維であり、高脂肪食ラットでは腸 ALP-I の発現を上方調節することで大腸 ALP 活性を上昇させる⁸⁴⁾。難消化性・発酵性のオリゴ糖は大腸の ALP 活性と腸 ALP-1 発現を上昇させ、ラット腸の恒常性に寄与すると考

えられている⁸⁵⁾。しかし、食物繊維による腸 ALP の発現誘導の分子機構について、ほとんど報告がない。以上のことから、食品成分の中には、腸 ALP の発現を刺激して腸の恒常性に貢献するものがあることがわかったが、食品成分が腸 ALP の発現を上方調節、または下方調節するメカニズムは不明である。また、ALP はミルク中にも含有していることが知られており、どのような機能を有しているのかは謎である⁷⁸⁾。上記のペプチド研究を基盤とすることで、食品タンパク質由来ペプチド IIAEK の生体への作用の本質的理解及び生命の本質的理解、長寿関連遺伝子活性化のメカニズム解明に貢献できるのではないかと考える。

第7章では、我々はコレステロール代謝改善遺伝子として ABCA1 に注目し、腸 ALP との関連性について調査した (Fig. 15、16、Table 4、5)。先行研究において、IIAEK は腸コレステロール代謝関連遺伝子 (SR-B1、ABCA1、ACAT2、MTP) に作用し、Caco-2 細胞におけるコレステロール吸収を抑制することを発見しており、特に、IIAEK は、ABCA1 遺伝子プロモーター活性を有意に低下させた¹⁰⁾。また、ABCA1 プロモーター内の LXR 及び SP1 応答エレメントの欠失により、IIAEK が誘導する ABCA1 プロモーター活性の有意な低下が消失したことから、LXR 応答エレメントが ABCA1 mRNA レベルの減少に重要であることを明らかにした¹⁰⁾。これらの先行研究と本研究結果を踏まえると、IIAEK-腸 ALP 間の相互作用が誘導する新規情報伝達系が、ある特定の転写因子を介して、腸 ALP や ABCA1 の遺伝子発現を下方調節している可能性がある。しかし、私が調査した限りでは、脂質代謝改善や長寿と密接な関わりのある腸 ALP と腸コレステロール吸収を調節する ABCA1 間の遺伝子レベルでの関係を論じている報告はない。そこで、我々は、Caco-2 細胞に腸 ALP siRNA を導入し、腸 ALP 遺伝子発現を抑制することで、2 mM IIAEK が誘導する ABCA1 遺伝子発現の低下が消失するのではないかと仮説を立てた。その結果、驚くべきことに、腸 ALP siRNA 導入により、IIAEK が誘導する ABCA1 mRNA レベルの有意な低下は消失した (Fig. 16、Table 5)。この注目すべき結果から、腸 ALP と ABCA1 の mRNA レベルの変化は逆相関の関係にあることが示唆された。また、我々は腸 ALP と ABCA1 遺伝子プロモーターの両方に結合する共通の転写因子が存在しているのではないかと仮説している。腸 ALP 遺伝子プロモーターに結合する転写因子としては、HNF-4 α ⁸⁶⁾、KLF5⁷⁹⁾、TR-RXR α ヘテロダイマー⁸⁷⁾、ZBP-89⁸⁸⁾、Cdx-1⁸⁹⁾ などがあり、ABCA1 遺伝子プロモーターに結合する転写因子としては、LXR/RXR (転写活性化)、TR β /RXR (転写抑制)、SREBP-2 などがある⁴⁵⁾。しかし、IIAEK がある特定の共通の転写因子に影響を与え、腸 ALP と ABCA1 の両遺伝子転写活性を制御するかどうかは、今後ルシフェラーゼアッセイ等でさらなる研究が必要である。

第3～7章をまとめると、IIAEK は小腸に高発現している GPI アンカー型腸 ALP と相互作用し、新規細胞内情報伝達系を介して、腸 ALP の特異的活性化と ABCA1 の下方調節を伴ってコレステロール代謝を改善することを明らかにした¹⁰⁾ (IIAEK-腸 ALP 仮説: Fig. 18 参照)。また、未発表データであるが、驚くべきことに、腸 ALP (*Akp3*) 欠損マウスでは、野生型マウスで IIAEK が誘導するコレステロール代謝改善作用は消失した。以上より、(1)

IIAEK は GPI アンカー型腸 ALP (腸 ALP) と特異的に相互作用し、IIAEK-IAP 二量体複合体は膜貫通ドメインを有するカドヘリン-17 と相互作用する。(2) IIAEK-腸 ALP 複合体とカドヘリン-17 の相互作用により、Hippo 経路に関連する新規シグナル伝達経路が誘導され、*Akp3*、*Abcg5/8*、*Npc1l1*、*Hmgcr*、*Srebf2* などのコレステロール代謝関連遺伝子やコレステロール代謝関連酵素・タンパク質の mRNA レベルを制御する。(3) その結果、コレステロール吸収、肝臓コレステロール及び血清コレステロールの抑制、糞中コレステロール排泄促進といったコレステロール代謝改善を発揮すると我々は仮説を立てた (Fig. 19)。今回の研究成果は、オリゴペプチド (IIAEK) を腸で認識する分子メカニズムの解明に貢献するだけでなく、腸 ALP が腸表面でいったい何をしているのかという科学的疑問に対する答えの一部を提供するものである。

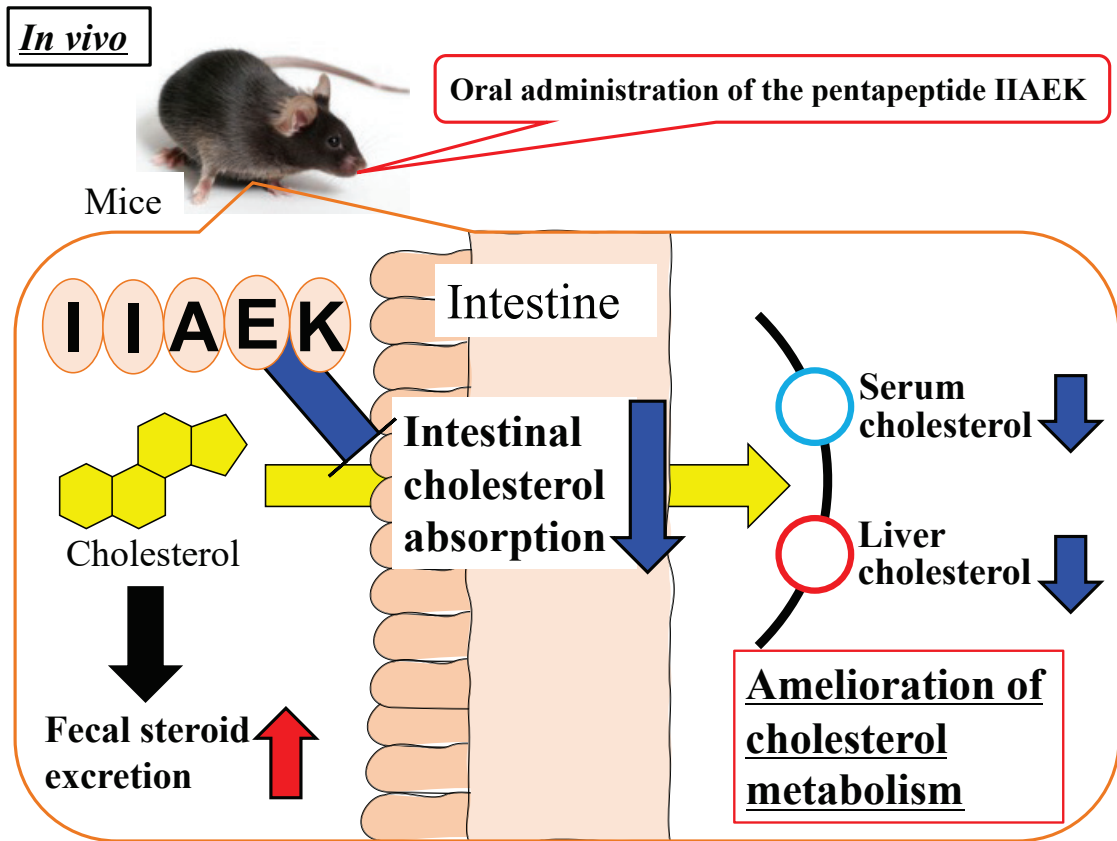


Fig. 17 IIAEK はマウスの腸コレステロール吸収抑制を介して、
コレステロール代謝を改善する¹⁸⁾

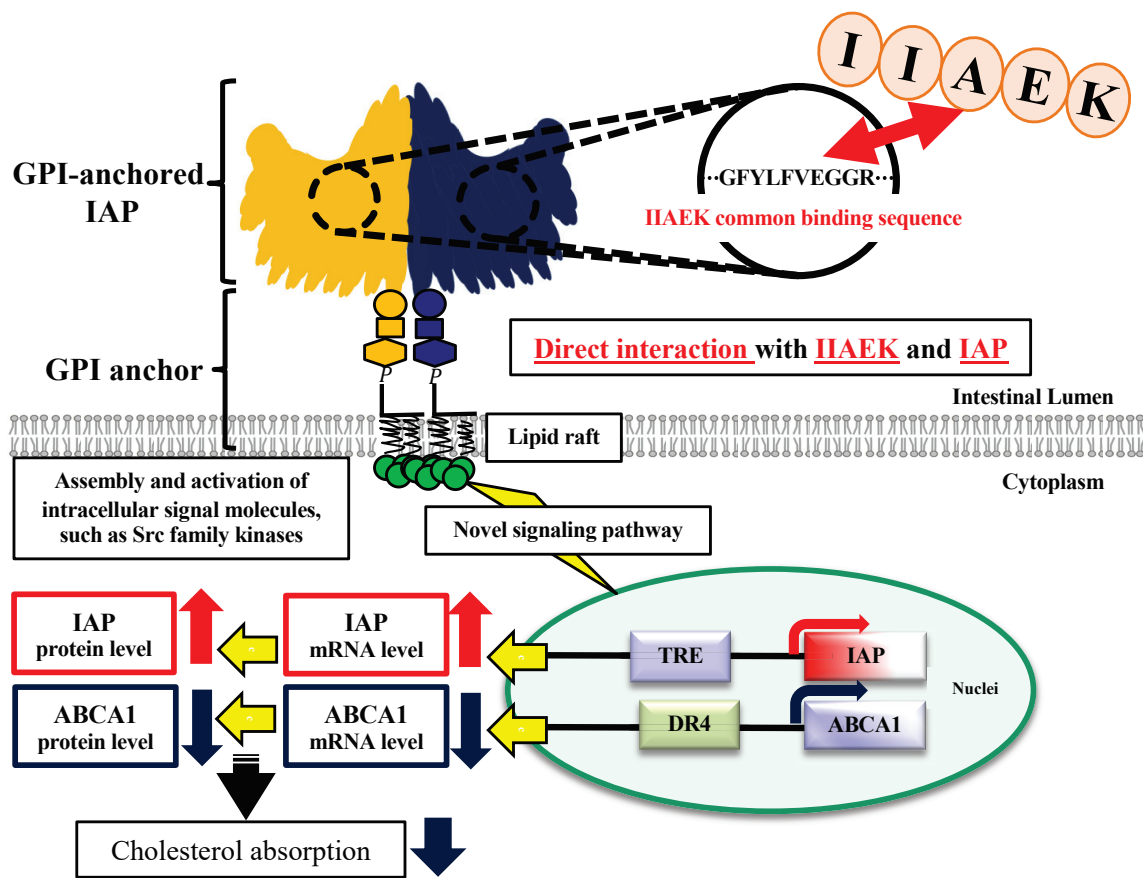


Fig. 18 IIAEK-腸 ALP 仮説¹⁰⁾

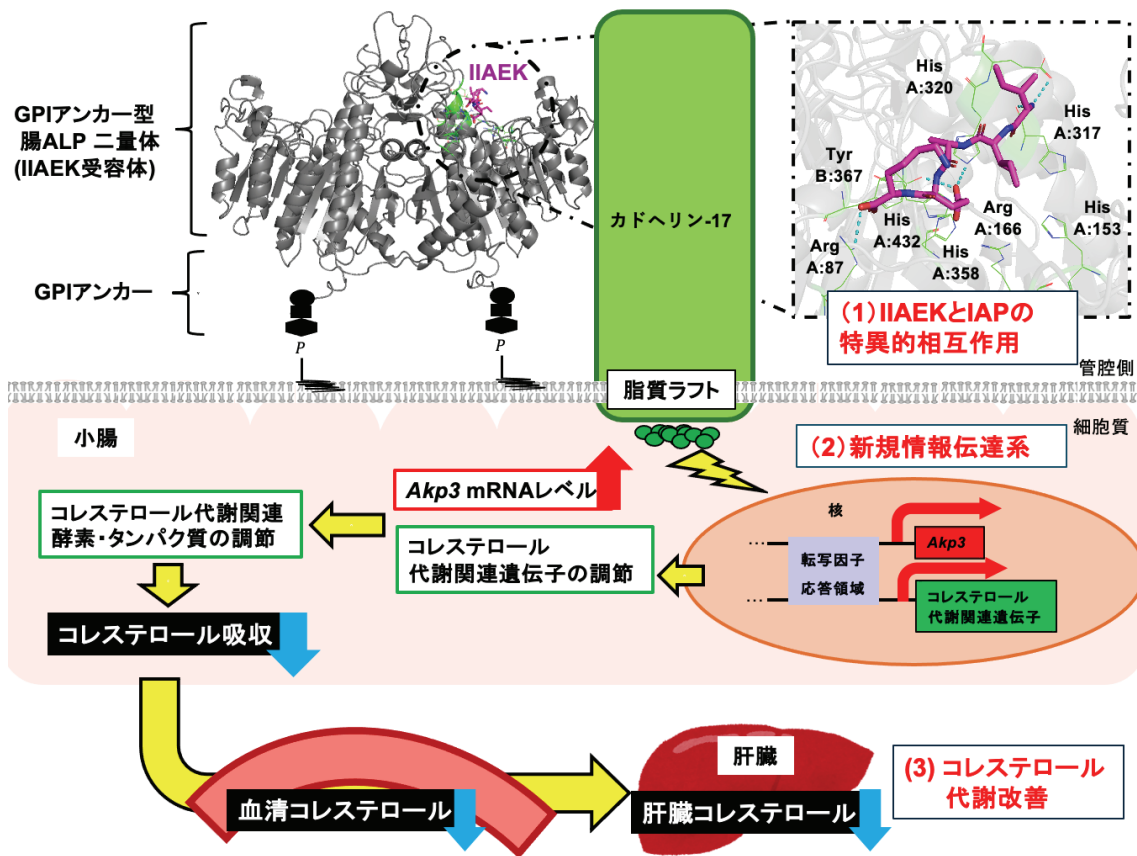


Fig. 19 IIAEK-腸 ALP-カドヘリン-17 仮説

第9章 基本的実験操作法

1. 肝臓総脂質抽出と分析

【試薬調製】

① クロメタ (クロロホルム：メタノール=2：1)

1級クロロホルム 1200 mL、1級メタノール 600 mL 加え、1800 mL 調製する。

② 0.05% CaCl_2

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を 0.081 g 量りとり、150 ml まで milliQ でメスアップして調製する。

③ クロメタ水 (クロロホルム：メタノール：水=3：48：47)

1級クロロホルム 10 mL、1級メタノール 160 mL、milliQ 156.6 mL 加え、326.6 mL 調製する。

【使用器具】

・大試験管、短試験管、200 mL 三角フラスコ漏斗、15mL ホールピペット、ピンセット、短・長パスツール、スパーテル。

【実験手順】

1日目

- ① パラフィン巻いて保存したバイアルから、15 mL ホールピペットと安全ピペッターで大試験管に正確に移す。
- ② 肝臓コレステロール測定用に短試験管に2連で 50 μL 、肝臓トリグリセリド測定用に短試験管に2連で 50 μL で分注し、ラップと輪ゴムをかけて放置。余った濾液をサンプル瓶に入れ、パラフィンを巻いて保存。
- ③ 大試験管に 0.05% CaCl_2 を 3 mL 加えてボルテックスし、ラップと輪ゴムをかけて一晩放置。

2日目

大試験管の上層の半分未満を長パスツールで吸引除去し、クロメタ水を 3 mL 加えてボルテックスし、一晩放置。

3日目

大試験管の上層の半分未満を長パスツールで吸引除去し、クロメタ水を 3 mL 加えてボルテックスし、一晚放置。

4 日目

- ① 大試験管の上層の半分未満を長パスツールで吸引除去し、クロメタ水を 3 mL 加えてボルテックスし、一晚放置。
- ② 翌日の時間に合うように 200 mL 三角フラスコに群、番号を油性ペンで記入し、乾燥機で 120°C、24h で乾燥させる。

5 日目

- ① 24h 後にデシケーターに移して 4 時間放冷し、恒量測定。(三角フラスコ扱う時は軍手着用)
- ② 大試験管の上層 2 mm 残して吸引除去し、大試験管を攪拌しながら 1 級メタノールを少量ずつ加え、溶液が白色から無色透明になるまで加える。
- ③ 恒量測定済みの三角フラスコにその溶液を移し、クロメタで大試験管を洗ってボルテックスし、三角フラスコに移す。これをもう一度繰り返す
- ④ ホットプレート进行全面、80°C に設定し、三角フラスコを置いて薄茶色になるまで溶媒を除去する。
- ⑤ 乾燥機で 120°C、24h で乾燥させる。

6 日目

24h 後にデシケーターに移して 4 時間放冷し、重量測定。

2. 血清または肝臓脂質測定

血清及び肝臓コレステロールは、コレステロール E-テストワコー (439-17501、WAKO) を用いて測定した。同様に、肝臓トリグリセリドもトリグリセリド E-テストワコー (432-40201、WAKO) を用いて測定した。

【血清コレステロール測定】

- ① 3 μ L の酵素試薬を 20 μ L の血清に添加する。
- ② ボルテックスし、37°C で 5 分間インキュベートする。
- ③ 600 nm の吸光度を測定する。

【肝臓コレステロール測定】

- ① 一晩以上放置させて溶媒を除去した短試験管に DDW 20 μ L 加え、1 分間ボルテックス。
- ② サンプル各 2 連を 20 μ L、盲検 (DDW) 2 連を 20 μ L、標準液 3 連を 20 μ L とし、短試験管に発色試薬 3 mL 加え、30 秒間ボルテックス。
- ③ 37°C で 5 分間インキュベートし、600 nm で測定

肝臓コレステロール濃度 = $200 \times \text{Sample O.D} / \text{Std O.D} \times 0.02 \text{ mL} \times 1 / 2.0 \times 50 \text{ mL} / 0.2 \text{ mL}$

【肝臓トリグリセリド測定】

- ① 一晩以上放置させて溶媒を除去した短試験管に DDW 20 μ L 加え、1 分間ボルテックス。
- ② サンプル各 2 連を 20 μ L、盲検 (DDW) 2 連を 20 μ L、標準液 3 連を 20 μ L とし、短試験管に発色試薬 3 mL 加え、30 秒間ボルテックス。
- ③ 37°C で 5 分間インキュベートし、600 nm で測定

肝臓トリグリセリド濃度 = $300 \times \text{Sample O.D} / \text{Std O.D} \times 0.02 \text{ mL} \times 1 / 2.0 \times 50 \text{ mL} / 0.1 \text{ mL}$

3. 酸性ステロイドの定量

使用試薬

- 酢酸エタノール：6 mL / サンプル
…酢酸（Wako, 017-00256）、D.D.W.、エタノール（Wako, ）を1：1：18で混合。

- 0.1 N NaOH：2 mL / サンプル
…水酸化ナトリウム（nacalai, 315-11）2 g を D.D.W. 500 mL に溶解。
プラスチック容器に作成

- 1 N HCl：2 mL / サンプル
…塩酸（Wako, 080-01066, 12 N）を D.D.W. で 12 倍希釈
塩酸原液を取扱う際は、ドラフト内で行う、原液はガラスピペットで分取

- 酢酸エチル（Wako, 051-00351）：4 mL / サンプル
- メタノール（Wako, 137-01823）
- 石油エーテル（nacalai, 266-18）：6 mL / サンプル
- 総胆汁酸-テストワコー（Wako, 431-15001）：サンプル数 + 検量線分

器具

- ネジ付き試験管：3 本/サンプル（少なくとも最後の1本は広口のもの）
- N₂ ガス
- 遠心機

操作

1. ネジ付き試験管に乾燥、粉末化した糞を 0.2 g 秤量、重量記録
2. 酢酸エタノール 2 mL を加え、1 分間 vortex で攪拌
3. 3000 rpm で 5 min. 室温（20℃）で遠心
4. 上清をパスツールピペットで別のネジ付き試験管に採取
5. 沈殿に酢酸エタノール 2 mL を加え、2. - 4. を 2 回繰返す（計 3 回抽出）

6. 抽出液の入った試験管を 40°C でインキュベートしながら、N₂ ガスで溶媒を除去
7. 0.1 N NaOH を 2 mL 加え、完全に懸濁するまで vortex
8. 40°C で 10 分間インキュベートした後、2 分間 vortex
9. 石油エーテル 2 mL を加え (P-1000) 、1 分間 vortex
10. 3000 rpm で 1 min. 室温 (20°C) で遠心
11. 上層をパスツールピペットで除く
12. 9. - 11. を 2 回繰返す (計 3 回抽出)
13. 下層に 1N HCl を 2 mL 加え、1 分間 vortex
14. 酢酸エチルを 2 mL 加え、1 分間 vortex
15. 3000 rpm で 5 min. 室温 (20°C) で遠心
16. 上層をパスツールピペットで別のネジ付き試験管 (広口) へ採取
17. 14. - 16. を繰返す (計 2 回抽出)
18. 抽出液の入った試験管を 40°C でインキュベートしながら、N₂ ガスで溶媒を除去
19. メタノール 1 mL を加え (P-1000) 、溶けるまで vortex した後、溶液を回収
20. メタノール溶液を D.D.W. で 100 倍希釈
21. 総胆汁酸-テストワコー (Wako, 431-15001) のマニュアルに従って、胆汁酸量を測定
 - (ア) ガラス試験管にサンプル、標準液、D.D.W. を 200 uL とる
 - (イ) 酵素液または盲検用酵素液を 500 uL 添加し、vortex で軽く攪拌する
 - (ウ) 37°C で 10 分間インキュベート
 - (エ) 反応停止液を 500 uL 添加し、vortex で軽く攪拌する
 - (オ) 120 分以内に OD560 を測定する。
 - (カ) 各々相当する試薬盲検を対照として、値を算出する。

計算式

$$\begin{aligned} & (\text{検量線より算出した胆汁酸濃度}[\mu\text{M}]) \times (\text{希釈率}) \times (\text{溶解した MeOH 量}[0.001 \text{ L}]) \\ & = (\mu\text{mol 胆汁酸} / 0.2 \text{ g 糞}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & (\mu\text{mol} / 0.2 \text{ g 糞}) \times (\text{胆汁酸平均分子量 ; } 537.7) / 1000 \\ & = (\text{mg 胆汁酸} / 0.2 \text{ g 糞}) \end{aligned}$$

X日分の糞量より、X日間の糞中胆汁酸量を算出

$$\begin{aligned} & (\text{umol 胆汁酸} / 0.2 \text{ g 糞}) \times (\text{X日分の糞量}[\text{g}] / 0.2 [\text{g}]) \\ & = (\text{umol 胆汁酸} / \text{X days}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & (\text{mg 胆汁酸} / 0.2 \text{ g 糞}) \times (\text{X日分の糞量}[\text{g}] / 0.2 [\text{g}]) \\ & = (\text{mg 胆汁酸} / \text{X days}) \end{aligned}$$

4. 中性ステロイドの抽出

試薬

- 4N KOH : 3 mL / サンプル
...水酸化カリウム (Wako, 168-21851) 44.888 g を D.D.W. 200 mL に溶解
プラスチック容器に作成
- 0.8 mg/mL コレステロール / 酢酸エチル (GC 標準用)
...コレステロール (Wako, 034-03002) 20 mg を酢酸エチル 25 mL に溶解、冷蔵保存
- 0.8 mg/mL コプロスタノール / 酢酸エチル (GC 標準用)
...コプロスタノール (5beta-コレスタン-3bata-OL) (STERALOIDS, Inc., C5080-000)
20 mg を 酢酸エチル 25 mL に溶解、冷蔵保存
- 0.8 mg/mL 5alpha-コレスタン / 酢酸エチル (GC 標準用・内部標準用=抽出率計算用)
...5alpha-コレスタン (SIGMA, C8003-1G) 20 mg を 酢酸エチル 25 mL に溶解、
冷蔵保存
- TMS (東京化成, T0274) ・ ・ ・ シリル化剤
- エタノール (Wako, 057-00451) : 2 mL / サンプル
- n-ヘキサン (Wako, 085-00411) : : 15 mL / サンプル

器具

- 10 uL 用ガスタイトシリンジ (4015-41001、ハミルトン)
- 100 uL 用ガスタイトシリンジ (4015-41010、ハミルトン)
- ネジ付き試験管
- ロータリーエバポレーター
- 遠心機
- ガスクロマトグラフィー分析装置 (GC-14A, 島津製作所)

- ・分析用カラム (Glass Spiral, 信和化工株)

操作

1. ネジ付き試験管に上記のサンプルを秤量、重量記録
2. 別の試験管にコレステロール 5 mg を試験管に入れたものも用意する。
3. 各サンプル試験管に、0.8 mg/mL 5 α -コレスタン / 酢酸エチルを 0.5mL 加える。
4. 4N KOH を 3 mL 加え (P-5000) 、1 分間 vortex
5. エタノールを 2 mL 加え (P-5000) 、1 分間 vortex
6. 70°Cで 1 時間インキュベート
7. n-ヘキサンを 5 mL 加え (P-5000) 、1 分間 vortex
8. 3000 rpm で 2 min.室温 (20°C) で遠心
9. 上層をパスツールピペットでバイアルに採取
10. 6. - 8.を 2 回繰返す (計 3 回抽出)
11. GC 用スタンダードの調製
 - ① 0.8 mg/mL コレステロール / 酢酸エチル、0.8 mg/mL コプロスタノール / 酢酸エチルを各 1 mL 加える。
 - ② そこへ 0.8 mg/mL 5 α -コレスタン / 酢酸エチル溶液を 0.25 mL バイアルに加え、混和
12. エバポレーターで溶媒を除去
13. 溶媒除去後はフタをして、GC 分析まで室温保存する。
16. GC 分析

サンプル、スタンダード調製

1. TMS 試薬を 200 μ L、エバポレーター済サンプルに添加 (100 μ L シリンジ)
...・100 μ L シリンジは使用開始前 (その日の最初) に、
エタノール : 5 回、台所洗剤 : 5 回、D.D.W. : 5 回、エタノール : 5 回、TMS 試薬 : 2 回
で洗浄する。1 回使用する度 (サンプル注入直後) に、エタノール : 3 回、台所洗剤 : 3 回、D.D.W. : 3 回、エタノール : 3 回で洗浄する。

注)

- ① シリンジで TMS 試薬吸入時に白濁する場合あり。その場合は白濁した TMS 試薬を捨て、新たに TMS 試薬を吸入する。また、その日の最後に使用した後は、エタノール：5 回、台所洗剤：5 回、D.D.W.：5 回、エタノール：5 回で洗浄する。
 - ② TMS 試薬添加の際には、バイアルを回転させながら、壁面を伝わせるように添加する
 - ③ TMS 試薬添加後もバイアルを回転させ、壁面にも TMS 試薬を行渡らせる
 - ④ TMS 試薬ビンの底部に白沈が生じるが、その部分は吸わない様に注意
 - ⑤ TMS 試薬は開封後、パラフィルムで密栓し、冷蔵保存。使用時に取り出す。
2. サンプル注入時、バイアルから 2 uL 採取 (10 uL シリンジ)
- ① 10 uL シリンジは使用開始前 (その日の最初) に、エタノール：5 回、台所洗剤：5 回、D.D.W.：5 回、エタノール：5 回、TMS 試薬：2 回で洗浄する。
 - ② 1 回使用する度 (サンプル注入直後) に、エタノール：5 回、台所洗剤：5 回、D.D.W.：5 回、エタノール：5 回で洗浄する。
 - ③ 2 uL 採取前に、サンプル溶液で 5 回共洗い (白沈を吸わないように)

GC 操作

1. シリカゲルが吸湿状態で無いことを確認 (青色なら OK、ピンク色なら交換)
2. Air ポンプ始動
3. N₂ ガスボンベ、H₂ ガスボンベを開ける
4. コントロールパネルで空気が入ったかを確認し、カラム内の空気を追い出す為に GC 本体の扉を開けて 5~10 分放置
5. GC-14A 本体の起動
 - (ア) 本体の電源 ON、HEATER も ON
 - (イ) HEATER と FID 検出器のランプ (緑色) の点灯を確認
6. GC-14A の設定後(電源入れた直後は FILE 0 番になっている→いつも使っている設定登録済み)、"START"を押す。

〈設定の確認方法〉

(ファイル番号の選択) "FILE" + "0" + "ENTER"

(検出器温度の確認) "DET.T" + "280" + "ENTER"

(内部温度の確認) "INJ" + "280" + "ENTER"

(コラム温度の確認) "CLAM" + "INIT TEMP" + "260" + "ENTER"

赤字の数字は変更したい時にのみ押す。通常は設定してあるので押す必要なし。

〈温度の確認〉

(検出器温度の確認) "MONIT" + "DET.T"

(内部温度の確認) "MONIT" + "INJ"

(コラム温度の確認) "MONIT" + "CLAM" + "INIT TEMP"

7. 温度が上昇後、上部パネル（下）の左上のボタン(IGNIT ボタン)を押しながら、Inject. PORT 奥の点火部位をライターで点火し、鏡を当てて曇りが生じるか確認
8. クロマトパックの設定
9. クロマトパック (C-R8A) の電源 ON
 - (ア) "COMMAND", "PLOT", "ENTER" (プロットが始まる)
 - (イ) "SHIFT", "MONITER(ベースライン表示される)" or "MONITOR"を押す。
 - (ウ) 画面に数値が表示されるので GC 本体のつまみを回して"0 μ V"に近付ける。
(左に回すと"-", 右に回すと"+")

その後、安定するのを待つ。

- (エ) "OPER", "D", "0", "ENTER", "100", "ENTER" (測定回数は 100 回にしておく)
- (オ) "COMMAND", "METHOD", "1", "ENTER" (METHOD1 : スタンダード用)
- (カ) "PARAM", "STOP. TM"の表示まで↓, "30", "ENTER" (流す時間 : 30 分)
- (キ) スタンダード注入後、"START"
- (ク) "COMMAND", "METHOD", "4", "ENTER" (METHOD4 : 試料分析用)
- (ケ) "PARAM", "STOP. TM"の表示まで↓, "60", "ENTER" (流す時間 : 60 分)
- (コ) "PARAM", "WIN.BAND"の表示まで↓, "1", "ENTER" (BAND 法選択)
- (サ) スタンダード試料をもとに ID テーブルを作成する。
- (シ) "SIFT 押しながら PARAM", "D", "N", "ENTER" ("NAME は 5-CH"のまま)
- (ス) "ENTER" (TIME の項目で 5-CH のリテンションタイム設定)
- (セ) "ENTER" (BAND の項目で 5-CH のリテンションタイムの幅 0.3 を入れる)

- (ソ) "ENTER" (CONC の項目で 5-CH の濃度 2 を入れる)
- (タ) "ID No.2 (コプロスタノール)"、"ID No.3 (コレステロール)"も同様に設定
- (チ) ...注) コプロスタノールの BAND は 0.3 とコレステロールの BAND は"0.5"、
- (ツ) CONC は両方 8 で設定
- (テ) "EXIT"
- (ト) "OPER", "C", "1", "ENTER" (キャリブレーション設定)
- (ナ) "COMMAND", "PROC", "1", "ENTER"
- (ニ) サンプル注入後、"START" (60 分間測定)
- (ヌ) 測定終了後、7-27 -7-28.を繰り返す (ピークの帰属を確認しつつ)

10. GC の終了

- (ア) H₂ ガスボンベを閉じる
- (イ) Air ポンプのコンセントを抜き、停止させた後、ポンプ下部のバルブ左回りに開き、空気圧を 0 にする
- (ウ) HEATER のスイッチ OFF (GC 本体の緑のスイッチ)
- (エ) "FILE", "9", "ENTER", "START"検出器、内部温度が 100°Cより下がるまで放置
- (オ) "MONIT" + "DET. T" ; "INJ" ; "CLAM" + "INIT TEMP"
- (カ) GC-14A 本体の電源 OFF
- (キ) N₂ ガスボンベを閉じる
- (ク) 元栓を時計回りに、3 次弁を時計回りに閉じる。

11. データ保存(クロマトの電源を消す前に SD カードの分析データを移す)

- (ア) SD カードの保存番号を確認する
- (イ) "COMMAND", "SIFT"押しながら "BACKUP1", "ENTER"
- (ウ) 「DCOPY (スペース) “1:✳️✳️” (スペース) TO (スペース) “2:”」が表示される。
- (エ) ✳️がある時はドライブ内全てのデータを写せる。名前を指定すれば 1 つずつも可能。
- (オ) "DIR", "スペース", "2", "ENTER" (SD カードに入ったかの確認)
- (カ) "KILL", "スペース", " (ドライブ:ファイル名) ", "ENTER" (データ消去)

〈クロマトパックデータについて〉

(ドライブの中身を見る) "DIR", "スペース", "見たいドライブ番号", "ENTER"

→1: クロマト本体 2: SD カード 8: クロマトパックのシステムファイル 9: 波形パラメータ

12. 計算式

抽出効率の検討

...サンプル試験管には、5alpha-コレスタンが 400 ug/試験管で存在 (抽出前)。

スタンダードより算出した各サンプルの 5alpha-コレスタン量は、

抽出効率 100%であれば、 $400 \text{ [ug]} \times (2 \text{ uL} / 200 \text{ uL}) = 4 \text{ [ug]}$

(抽出効率[%]) = (スタンダードより算出した 5alpha-コレスタン量) / (4 ug) x 100

(スタンダードより算出したステロイド量[ug]) x (200 uL / 2 uL) x (抽出効率[%]/100)

= (バイアル中のステロイド量[ug]) = (0.1 g 糞中のステロイド量[ug])

(0.1 g 糞中のステロイド量[umol])

= (0.1 g 糞中のステロイド量[ug]) / ステロイド分子量

注) ステロイド分子量: コレステロール, 386.64、コプロスタノール, 388.65

X 日分の糞量より、X 日間の糞中ステロイド量を算出

$(0.1 \text{ g 糞中ステロイド量[ug]} \times (X \text{ 日分の糞量[g]} / 0.1 \text{ [g]} / 1000 =$

(mg ステロイド / X days)

$(0.1 \text{ g 糞中のステロイド量[umol]} \times (X \text{ 日分の糞量[g]} / 0.1 \text{ [g]} =$

(umol ステロイド / X days)

5. 組織の ^3H -コレステロール定量

【方法】

最終濃度が $1\ \mu\text{Ci}/0.5\ \text{mL}$ となるように、 ^3H -Cholesterol (Perkin Elmer Life Sciences, NET-139 CHOLESTEROL, $[1,2\text{-}^3\text{H}(\text{N})]$ -, $1.0\ \text{mCi}/\text{mL}$ ($37\ \text{MBq}/\text{ml}$) in Ethanol) 原液 $18\ \mu\text{L}$ 、 $0.1\ \text{mM}$ コレステロールとなるように $0.01\ \text{M}$ Cholesterol (片山化学工業 9859) / Chloroform (Wako 033-02619) 溶液 $90\ \mu\text{L}$ 、 $1\ \text{mM}$ monoolein となるように $0.05\ \text{M}$ monoolein (SIGMA M7765) / Chloroform (Wako 033-02619) 溶液 $180\ \mu\text{L}$ をバイアルに分注し N_2 乾固する。このバイアルに $5\ \text{mM}$ Taurocholate (SIGMA T-4009) を含む $15\ \text{mM}$ sodium phosphate buffer $9\ \text{ml}$ を加え、ボルテックスミキサーで攪拌 ($2\ \text{min.}$) する。その後ソニケーション (output 6、 $3\ \text{min.}\times 2$) を行い、 37°C で 24 時間振とうすることによりエマルジョン溶液を調製する。

$15\ \text{mL}$ プラスチックチューブにペプチドが $30\ \text{mg}/0.5\ \text{ml}$ となるように各サンプルを秤取り、ここにエマルジョン溶液を $2.5\ \text{ml}$ 加え、ボルテックスミキサーで攪拌 ($2\ \text{min.}$) し、ソニケーション (output 6、 $3\ \text{min.}$) を行い投与液とする。

投与液は当日調製し、 $100\ \mu\text{L}$ をバイアルにとり、乳化シンチレーター $10\ \text{mL}$ を加え液体シンチレーションカウンターで ^3H -コレステロール量を2連でカウントし、 $1\ \mu\text{Ci}/0.5\ \text{mL}$ であることを確認する。投与液は常温で保存する。

【試薬調製】

(1) $1\ \mu\text{Ci}/0.5\ \text{mL}$ ^3H -Cholesterol (放射能濃度 $1.0\ \text{mCi}/\text{ml}$ 、比放射能 $47.9\ \text{mCi}/\text{mmol}$)

$18\ \mu\text{L}$ 中に含まれる RI は

$$1.0\ \text{mCi}/\text{ml}\times 0.014\ \text{mL} = 18\ \mu\text{Ci}$$

$$\text{エマルジョン中の濃度} : 18\ \mu\text{Ci} / 9.0\ \text{mL} = 2\ \mu\text{Ci}/\text{mL}$$

エマルジョン中のモル濃度は、データシートの比放射能 $47.9\ \text{Ci}/\text{mmol}$ より、

$$2\ (\mu\text{Ci}/\text{mL}) / 47.9\ (\text{Ci}/\text{mmol}) = 0.0418\ \text{nmol}/\text{ml} = 0.0418\ \mu\text{M}$$

(2) $0.1\ \text{mM}$ Cholesterol 溶液

$0.01\ \text{M}$ Cholesterol 溶液を調製→ $90\ \mu\text{L}$

$0.003867\ \text{g}$ の Cholesterol (M.W.386.66)を $1\ \text{mL}$ の CHCl_3 に溶解

$$0.003867(\text{g}/\text{mL}) / 386.66\ (\text{g}/\text{mol}) = 0.01\ \text{M}$$

エマルジョン中の濃度は、

$$(0.01\ \text{M}\times 0.09\ \text{mL}) / 9.0\ \text{ml} = 0.1\ \text{mM}$$

(3) 1mM monoolein 溶液

0.05 M mono olein 溶液を調製→180 μ L

0.01783 g の monoolein (M.W.356.6) を 1 mL の CHCl_3 に溶解

$$0.01783(\text{g/mL}) / 356.6 (\text{g/mol}) = 0.05 \text{ M}$$

エマルション中の濃度は、

$$(0.05\text{M} \times 0.18\text{mL}) / 9\text{mL} = 1 \text{ mM}$$

(4) 5 mM Taurocholate を含む 15 mM sodium phosphate buffer

① $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (WAKO 192-02815、 M.W.=156.01) 0.117 g と Taurocholate (SIGMA T-4009、 M.W.=537.7) 0.1345g を 50 mL の蒸留水に溶解する。

② $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (WAKO 196-02835、 M.W.=358.14) 0.537 g と Taurocholate 0.269 g を 100 mL の蒸留水に溶解する。②に①を加え、pH 7.4 に調整する。

(5) 0.9%NaCl 溶液

NaCl (Wako 191-01665) 9.0 g を蒸留水に溶解し、1L にメスアップする。

(6) 2 mM タウロコール酸ナトリウム / 生理食塩水溶液

タウロコール酸 (SIGMA T-4009、 M.W.=537.7) 0.420 g を生理食塩水に溶解し、400 mL にメスアップする。

(7) 4N KOH 水溶液

KOH (Wako 168-03855, M.W.=56.11) 89.78g を蒸留水に溶解し、400mL にメスアップする。

(8) 親脂性シンチレーター

DPO (2,5-ジフェニルオキサゾール) (DOJINDO 344-01112) 6.0g と POPOP (1,4-Bis[2-(5-フェニルオキサゾール)]ベンゼン) (DOJINDO 342-02252) 0.3 g を 1L ビーカーに秤取し、トルエン(Wako 204-01861) 1L を加えてスターラーで一日攪拌し、シンチレーターとした。

(9) 乳化シンチレーター

①DPO (2,5-ジフェニルオキサゾール、DOJINDO 344-01112) 6 g と POPOP (1,4-Bis (2- (5-フェニルオキサゾール)]ベンゼン、DOJINDO 342-02252) 0.5 g を 1000 mL 容ビーカーにとり、Toluene (Wako、Cat.No. 204-01861) 667 mL を加え、スターラーで一晩攪拌する。

②Polyethylene glycol mono-*p*-isooctylphenyl ether (nacalai tesque、Code 12968-93) 333 mL を加え、スターラーでしばらく攪拌する。

【投与と解剖】

投与はコントロール群、IIAEK (600mg/kg B.W/day) の順でマウス 1 匹あたり 0.2 mL 投与する。投与はフレキシブル経ロゾンデマウス用 MZ-1 (日本クレア、CL-4596) を用いて経口投与する。投与前にボルテックスミキサーで攪拌してから投与する。1 時間後イソフルラン麻酔下で開腹、心臓採血により屠殺し、肝臓と小腸上部 (幽門から 1/3) を摘出する。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 で凍結保存する。肝臓は 0.9%NaCl 溶液 (生理食塩水) で洗浄後、湿重量を測定し、-20°C で凍結保存する。小腸は内容物と粘膜をピンセットを用いて取り出して切り開き、2mM タウロコール酸ナトリウム (SIGMA T-4009) / 生理食塩水溶液で洗浄後、小腸上部 (幽門から 1/3) の 3 分の 1 のところで切断し上部と 3 分の 2 を (中・下部) に分け、内容物をしごき出し、湿重量を測定し、-20°C で凍結保存する。

【³H]-コレステロールの定量】

血清 0.25 mL、肝臓 0.25 g、小腸粘膜を 15 ml 共栓付試験管にとり、4N KOH (Wako 168-03855) を 3 mL 加えてボルテックスミキサーで攪拌 (1min.) する。さらに特級エタノール (Wako 057-00451) を 2 mL 加えてボルテックスミキサーで攪拌 (1min.) する。70°C で 1 時間インキュベートし、ケン化する。その後 n-ヘキサン (Wako 085-00411) を 5 mL 加え、ボルテックスミキサーで攪拌 (1min.) し、静置して上層と下層に分かれた後、丁寧に上層をバイアルに取り、下層には再度 n-ヘキサンを 5 mL 加え同様な操作を行う (計 2 回)。取り出した上層 (約 10 mL) をドラフト内に放置して溶媒を飛ばし、特級エタノールを 200 μL 加えバイアルの壁面についたコレステロールを落とし、親脂性シンチレーターを 10 mL 加えて液体シンチレーションカウンターでカウントを測定する。

【データ処理】

カウントから次の計算式に従って体内への分配率を求めた。

<血清>

血清を体重の 5%、血清の比重を 1.0 g/mL とし、血清中に取り込まれた^[3H]-コレステロール量を次のように計算した。

$$\text{マウス 1 匹あたりの血清(g)} = \text{体重 (g)} \times 0.05$$

$$\text{マウス 1 匹あたりの血清(ml)} = \text{体重 (g)} \times 0.05 \div 1.0 \text{ (g/ml)}$$

マウス 1 匹の血清に取り込まれた^[3H]-コレステロール(dpm/mouse)=体重 (g) × 0.05 × (血清 500 μ l のカウント(dpm)) / 0.5(mL)

<組織 (肝臓、小腸粘膜) >

肝臓全体に取り込まれた^[3H]-コレステロール量(dpm)=(肝臓 1 g あたりのカウント(dpm)) × 組織重量 (g)

小腸に取り込まれた^[3H]-コレステロール量(dpm)=(小腸のカウント(dpm))

血清 (dpm/100g B.W.)、肝臓 (dpm/100g B.W.)、小腸 (dpm/100g B.W.) の値を合計して、Total (dpm)とした。

組織それぞれに取り込まれた^[3H]-コレステロール量 (dpm) をマウス 1 匹あたりの^[3H]-コレステロール投与量 (dpm) で割り、100 を乗じて体内分布率 (%) を求めた。同じく、血清、肝臓、小腸について血清 (%/100g B.W.)、肝臓 (%/100g B.W.)、小腸 (%/100g B.W.) の値を合計して、Total (%) とした。

6. Caco-2 細胞の継代、培養方法

<10%血清含有 DMEM の調製 (pH 調整用) >

① DMEM

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium (日水製薬 Code 05919)) 4.75 g を 1000 ml ビーカーに入れ、419 ml の MilliQ 水を加えてラップをし、スターラーで攪拌した。

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 (GIBCO BRL 21051-024) 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/45 mm 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。

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 (Sigma P7794-10MU) 434mg、ストレプトマイシン硫酸塩 (Wako 196-08511) 871 mg、ゲンタマイシン硫酸塩 (Wako 077-02974) 312.5 mg を 0.9% NaCl MilliQ 水溶液 50 ml に溶解させ、濾過滅菌 (CORNING 430624; 150 mL Bottle Top Filter w/33 mm 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。

⑤ 8%炭酸水素ナトリウム溶液

炭酸水素ナトリウム (Wako 191-01305) 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。

⑥ ウシ胎児血清 (10%)

-20 °Cにて保存したウシ胎児血清 (FBS : FETAL BOVINE SERUM (biosera Cat No.FB-1061/500 LOT No.12868)) を 37 °Cで融解し、56 °Cで 30 分間非動化する。手で攪拌した後、50 ml 滅菌チューブに分注し、培地の調製まで-20°Cで保存する。

(調製方法)

500 ml ビーカーに入った DMEM 419 ml に、非必須アミノ酸 5 ml、3% L-グルタミン溶液 10 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、8%炭酸水素ナトリウム溶液 12 ml を加えて混合する。1 N HCl で pH を 7.1 に調整し、濾過滅菌 (CORNING、

430513; 500 mL Bottle Top Filter w/45 mm Neck .22 μm CA (Cellulose Acetate) Sterilizing、Low Protein Binding Membrane Non-Pyrogenic Polystyrene) する。その後、 -20°C で凍結保存したウシ胎児血清 50 ml を加えて混合し、使用まで 4°C で保存し、細胞培養用培地とする。

<PBS (Phosphate buffer saline) の調製>

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Wako、196-02835) 26.2 g、 KH_2PO_4 (Wako、169-04245) 5 g、 NaCl (Wako、191-01665) 2.34 g を 1 L の MilliQ 水に溶解し、 120°C で 20 分間オートクレーブした後、 4°C で保存する。

<トリプシン-EDTA-2Na 溶液の調製>

① 5%トリプシン溶液の調製

Trypsin (TRYPSIN、DIFCO 0152-13-1) 25 g を 500 ml の PBS に調製し、 4°C で一晩攪拌する。翌日、振盪しながら 37°C で 30 分間インキュベートする。その後、8000 rpm で 30 分間遠心分離し、上清を濾過滅菌 (NALGENE、25943-500) し、 4°C で保存する。

② 3% EDTA-2Na 溶液の調製

EDTA-2Na (SIGMA、E-5134) が PBS に対して 3%になるよう溶解し、 121°C で 20 分間オートクレーブした後、 4°C で保存する。

(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 溶液とし、 4°C で保存する。

<細胞の継代方法>

コンフルエントに達した 10 cm dish (CORNING、430167) から DMEM をパスツールピペットで吸引除去し、トリプシン-EDTA-2Na 溶液 2ml を加えて dish 全体に行き渡らせ、吸引除去する。もう一度同様な操作を行った後、 CO_2 インキュベーター (37°C 、5% CO_2) にて 5 分間インキュベートする。DMEM 10 ml を添加し、ピペッティングを繰り返して細胞を剥がして 50 ml チューブに移し、さらにピペッティングを行って細胞を懸濁する。この中から 200 μl を滅菌したエッペンドルフチューブにとり、10 μl のトリパンブルーを混合し、その 10 μl を取って 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ルエントに達する量の細胞を 10 cm dish に播種する。ここに 10 ml の DMEM を加え、 CO_2 インキュベーター (37°C 、5% CO_2) にて培養する。

<3%トリパンブルー染色溶液の調製>

トリパンブルー (Wako、207-03252) を 30 mg/ml となるように滅菌 MilliQ 水に溶解し、4°Cで保存する。

7. Caco-2 細胞へのサンプルの添加

<サンプル添加用培地の作製>

(血清フリーDMEM の調製 (pH 調整))

500 ml ビーカーに入った DMEM 469 ml に、非必須アミノ酸 5 ml、3 % L-グルタミン溶液 10 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、8 %炭酸水素ナトリウム溶液 12 ml を加えて混合する。

1 N HCl で pH を 7.1 に調整し、濾過滅菌 CORNING、430513; 500 mL Bottle Top Filter w/45 mm Neck .22 μ m CA (Cellulose Acetate) Sterilizing、Low Protein Binding Membrane Non-Pyrogenic Polystyrene) する。使用まで 4 °C で保存し、サンプル添加用培地とする。

(IIAEK 添加培地の調製)

- ・ ラクトスタチン (IIAEK ペプチド、ペプチド研究所、MW: 572.4 g/mol; Lot No. 991-710031; HPLC purity 97.4%、 $C_{26}H_{48}N_6O_8 \cdot 0.6CH_3COOH \cdot 3.1H_2O$) 保存場所 : Rm641、SANYO MEDICOOL 冷凍庫

(※25 ml 調製の場合)

50 ml 滅菌チューブに lactostatin 34.1 mg 量り取り、25 ml の血清フリーDMEM を加えて、よく混合し、1 M HCl を加えて pH7.1 とし、Control 群または 2 mM lactostatin 群の培地を調製した。

8. 分化確認のための Millicell ERS-2 抵抗値測定システムによる TER の測定方法

※下記のような時に分化を確認した方がよい。

- ・血清を変えたとき。
- ・細胞を起こす・買い替えたとき。

〈器具・機器〉

Millicell[®] ERS-2 (MILLIPORE MERS00002)

〈試薬・溶液〉

6-well transwell plate (Corning Incorporated costar、3412)もしくは、12-well transwell plate (Corning Incorporated costar)、10% FBS 含有 DMEM、70%エタノール、PBS

〈準備〉

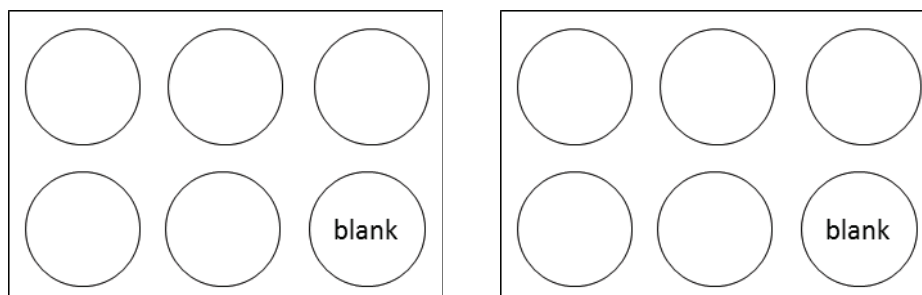
- ・ Millicell[®] ERS-2 は十分に充電しておく。
- ・ 計測機能チェック
 1. Millicell から充電プラグを外し、「STX04 test electrode」を「INPUT」につなぐ
 2. 電源を ON にし、“ Ω ”モードにする。
 3. メーターが 1000 Ω を示すまで、「R Adj」をドライバーで調節する。
 4. “millivolt”モードにし、メーターが 0 を示すことを確認する。

〈細胞播種〉

使用する transwell の well 数によって異なるが、少なくとも blank は設定しなければならない。

(例：6-well transwell plate (Corning Incorporated costar 3412)の場合)

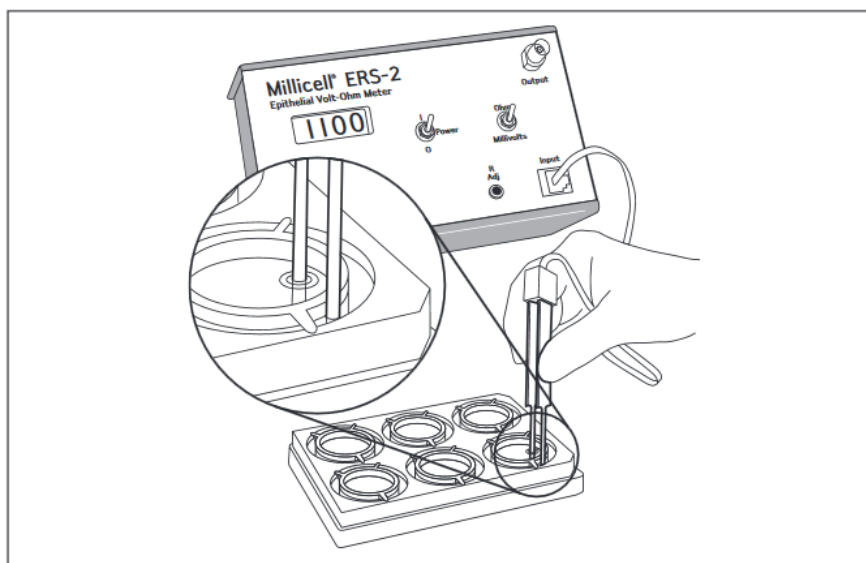
n=10 で細胞を培養し、1well に培地のみを入れて blank とする。



〈測定方法〉

※電圧測定時は電極の平衡化（24時間前にPBS溶液もしくは培地に浸しておく）が必要。しかし電気抵抗の測定のみの場合は必要がない。※電圧測定の場合は説明書参考

- ①Millicell をエタ綿で拭き、クリーンベンチ内に入れる。
- ②電極を 70%エタノールに 15 min 浸し、15 sec 乾かす。
※電極を 30 min 以上エタノールに浸してしまうと、電極の保護が弱まるので注意
- ③FBS 含有 DMEM で電極を洗浄する。
- ④Millicell を充電器から外し、上記のように計測機能をチェックする。
- ⑤電極を浸すときは、短い方は apical 側へ、長い方は basolateral 側へ挿入する。
※短い方は細胞に触れないようにし、長い方は well の底にあてるようにする。
結果を安定させるために、電極を安定させ、90°に挿入する。
- ⑥電気抵抗を記録する。
blank → 細胞 → blank の順番で測定する。
※各 well 毎に DMEM 培地で共洗いをを行う。



〈抵抗計算〉

透過性膜面積と抵抗値の積によって、膜の面積に依存しない単位面積抵抗(Ωcm^2)を求める。

※6-well transwell plate (Corning Incorporated costar 3412)の場合

$$\text{TER}(\Omega\text{cm}^2) = (\text{測定値} - \text{blank}) [\Omega] \times \text{培養面積}(4.67 \text{ cm}^2)$$

TER(Ωcm^2)と培養日数でグラフを作成し、TER がプラトーに達する日数を検討する。

〈取扱い上の注意〉

・バッテリーの保管

バッテリーの寿命は使用頻度によるが1~2年。使用していなくとも自己放電によりバッテリーへのダメージがあるので、少なくとも2か月に一度は充電を行った方がよい。

・電極の保管

①短期間の保管（2週間以下）

抵抗測定では、測定後、エタ綿で電極を拭き、乾燥空気中に保管する。

電極ケーブルはINPUTに差し込んだままでよい。

電圧測定では、電極の先端を電解質溶液に浸し、電極の平衡化を維持しておく。

②長期間の保管（2週間以上）

電極をMilliQで洗浄し、乾燥雰囲気中の暗所に保管しておく。

※これを怠ると電極機能が低下する可能性があるので、注意。

9. Caco-2 細胞におけるタンパク質回収

【試薬調製】

- 0.9 % NaCl (250 mL)

NaCl () 2.25 g に MilliQ 247.75 mL を加えスターラーで攪拌し、溶解させる。

- 50 mM Tris buffer (pH 7.5) (50 ml)

Trizma Base 分子量 : 121.14

$$\frac{\frac{x(g)}{121.14(\frac{g}{mol})}}{0.05(L)} = 50.0 \times 10^{-3}(\frac{mol}{L})$$

$$x = 0.30285(g)$$

1. ビーカーに Trizma Base (SIGMA、T1503-500G) 0.3029 g (50 mM となる) を入れ、MilliQ 30 mL で溶かす。
2. 溶液が透明になり完全に溶けたことを確認した後、1 N HCl で pH7.5 にする。
3. 全ての溶液を 50 mL 容メスフラスコに移し、標線まで MilliQ を加える。

【実験方法】

- ① 6 well transwell plate (Costar、3412) 2 枚に Caco-2 細胞を 2.0×10^5 cells/well の細胞数となるように播種し、2 週間培養する。
- ② 2 週間後、細胞を血清フリーDMEM で一度洗浄し、upper chamber と lower chamber にそれぞれ 2 mM IIAEK を 1.5 mL、血清フリーDMEM を 2.6 mL 添加し、24 時間培養する。
- ③ 24 時間後、培地を除去し、0.9 % NaCl で 2 回洗浄する。(upper chamber と lower chamber をそれぞれ 1.5 mL、2.6 mL の 0.9 % NaCl で洗浄。)
- ④ 冷えた 50 mM Tris buffer を 6 well transwell plat の upper chamber に 691 μ l 加え、plate を安全キャビネットの中から発砲スチロールの蓋の上にひいた氷上に移し、ラバーポリスマンで 1.5 mL エッペンチューブに回収する。
- ⑤ 注射針 (26 G \times 1/2)(TERUMO : NN-2613S) を 1.0 ml 容シリンジ (TERUMO : 180514F) につけたものを、回収した 1.5 mL エッペンドルフチューブに入れ、吸って出す操作を計 5 回行いホモジナイズする。ホモジナイズ後の溶液のタンパク質濃度を 100 μ g/mL とするよう希釈し、ALP 活性測定用サンプルとして用いる。

10. Lowry 法によるタンパク質濃度測定

<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> ※試薬は全て院生部屋の染色液があるところ

- ・ A 試薬 (Bio-Rad、500-0113)
- ・ B 試薬 (Bio-Rad、500-0114)
- ・ S 試薬 (Bio-Rad、500-0115)

<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 を混合して A'試薬とする。

※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 (0.1 N NaOH)

- 検量線用 BSA 溶液

2 ml チューブに 4 mg の牛血清アルブミン(グロブリンフリー)(nacalai tesque、01281-84)を量り取り、1.333 ml (1333 μ l) の extraction buffer(0.1 N NaOH)を加えて溶解させ、3 mg/ml の BSA 溶液を調製する。

- スタンダード BSA 溶液

検量線用 BSA 溶液を 1.5 ml のエッペンドルフチューブに以下のように希釈する。

	BSA 溶液(μ l)	加える extraction buffer (μ l)	BSA 濃度(μ g/ml)
Blank	0	50	0
1	60	60	1500
2	60 of Step1	30	1000
3	50 of Step2	50	500
4	50 of Step3	125	200

<実験操作>

- ① 96well プレートに、スタンダード希釈溶液とサンプル(extraction buffer で希釈したもの)をそれぞれ 2 連で 5 μ l ずつ入れた。
- ② A'試薬を、それぞれの well に 25 μ l ずつ入れる。
- ③ B 試薬を、それぞれの well に 200 μ l ずつ入れる(反応がスタートする)。
- ④ 室温で 15 min 放置後、マイクロプレートリーダーを用いて、630 nm (650~750 nm で測定可)の吸光度を測定する。

11. アルカリ性ホスファターゼ (ALP) 比活性の測定

●試薬の調製方法

・緩衝液

MgCl₂ · 6H₂O (Wako : 135-00165) 101.65 mg (5mmol/L) と Trizma base (SIGMA、T1503-500G) 2.1028 g (200mmol/L) を milliQ 水で溶解し、1N HCl で pH を 10.0 とした後に 100 ml にメスアップする。

・ *p*-ニトロフェノールリン酸二ナトリウム基質溶液 (pNPP 基質溶液)

p-ニトロフェノールリン酸二ナトリウム (ナカライテスク、25019-81) 15.0 mg (1.25 mg/mL) を緩衝液 12 ml に溶解させる。

・ 3 N NaOH (ALP 酵素反応停止試薬)

氷の上においた milliQ 水 200 mL を入れたビーカーに NaOH (Wako、198-13765) 30 g を入れ、スターラーで攪拌しながら溶かす。250 mL 容量メスフラスコを用いて milliQ 水で 250 mL にメスアップする。

※刺激臭が発生するため、作業はドラフトの中で行う。また、手袋、防護メガネを装着する。

・ 100 µg/mL *p*-ニトロフェノール溶液 (検量線作成用)

p-ニトロフェノール (ナカライテスク、24921-42) 4.2 mg を 42 mL の緩衝液で溶解し、100 µg/mL の *p*-ニトロフェノール溶液を調製する。

●実験操作

① Caco-2 細胞から回収し、100 µg/mL となるように希釈したタンパク質溶液 20 µL を 1.5 mL エッペンドルフチューブに入れる。

② 各 1.5 mL エッペンドルフチューブに、緩衝液を 30 µl ずつ加える。

③ 200 µL の pNPP 基質溶液を酵素液が入っている各 1.5 mL エッペンドルフチューブに加え、5 秒間 Vortex-Genie 2 Digital (Scientific Industries : SI-A286) で vortex する。この際、各 1.5 mL エッペンドルフチューブ間で 1 分の差をつけて行う。

④ そして、37°C となるように設定したお湯の中で、各 1.5 mL エッペンドルフチューブを 30 分間インキュベート(液相)する。各 1.5 mL エッペンドルフチューブを 37 °C で 30 分間インキュベートする。この際、先程最初に pNPP 基質溶液を入れた 1.5 mL エッペンドルフチューブから順番に 1 分の差をつけてインキュベートしていく。

- ⑤ インキュベート後、酵素反応を停止させるために各 1.5 mL エッペンドルフチューブに 3 N NaOH を 62.5 μ l 入れ、5 秒間 vortex する。この際、先程最初にインキュベートをした 1.5 mL エッペンドルフチューブから順番に 1 分の差をつけて入れていく。
- ⑥ 酵素反応停止後、各 1.5 mL エッペンドルフチューブ内の液のうち 220 μ l を Assat Plate 96 well、No Lid Vinyl (Costar : 2595) に移し、405 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて読み取る。
- ・検量線作成
- ① 100 μ g/mL の p-ニトロフェノール溶液を下記の表に従い希釈する。

Table 1. p-ニトロフェノール希釈方法

希釈後濃度(μ g/mL)	100 μ g/mLのp-ニトロフェノール溶液(μ l)	緩衝液(μ l)
0	0	500
1	5	495
2	10	490
3	15	485
4	20	480
6	30	470
8	40	460
10	50	450
20	100	400
30	150	350

- ② 調製した各濃度の p-ニトロフェノール溶液を 37°C となるように設定したお湯の中で、30 分間インキュベート(液相)する。
- ④ インキュベート後、各 1.5 mL エッペンドルフチューブ内の液のうち 220 μ l を Assat Plate 96 well、No Lid Vinyl (Costar : 2595) に移し、405 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (Multiskan FC) (Thermo Scientific、51119050) を用いて測定する。

12. NucleoSpin® RNA を用いた Caco-2 細胞からの Total RNA 抽出

<使用キット>

- ・ NucleoSpin® RNA (50) [MACHEREY-NAGEL cat. No. 740 955.50] (常温保存)

<使用機器>

- ・ 高速遠心機 (Eppendorf 5424R)

<試薬調製> (当日調製)

- ・ Buffer RA3 (購入して初めてキットを使う場合にのみ調製する) (事前調製)
Buffer RA3(12.5ml)のボトルに特級エタノール 50 ml を加えよく振り混ぜる。
- ・ DNaseI (当日調製、使用して余った場合は-20°Cで保存)
DNaseI、RNase-free (lyophilized)のバイアルに RNase-free water 550 µl を加え、室温で 1 分間インキュベートする。
- ・ Buffer RA1 containing β-me (当日調製)
1 サンプルあたり、Buffer RA1 700 µl に β-me 7.0 µl を加えて調製する。
- ・ 70 % EtOH (当日調製)
特級 EtOH 7 ml に滅菌 MilliQ 水 3 ml を加えて調製する。
- ・ DNase reaction mixture (当日調製)
1 サンプルあたり Reconstituted DNaseI 10 µl に DNase reaction buffer 90 µl を添加して調製する。
- ・ 85%EtOH (当日調製)
特級 EtOH 8.5 ml に MilliQ 水 1.5 ml を加えて調製する。

<実験方法>

(P2 施設のクリーンベンチ)

- ① 6well transwell plate (Corning、3412) で培養した細胞の培地を除いた後、トリプシン-EDTA-2Na 溶液を 1 ml ずつ各 well に加え、すぐに吸引除去する。もう一度同様の操作を行う。その後、CO₂ インキュベーター内で 5 分間インキュベートする。

②PBS を 0.5 ml ずつ各 well に加えラバーポリスマンを用いて細胞をはがす(この操作を 2 回繰り返す)。全量を 1.5 ml エッペンドルフチューブに移す。氷中に入れて、P2 施設から Rm653 に急いで移動する。

(Rm653)

③eppendorf 5424R で 11000 rpm (11000 x g)、5 分間遠心し、ペレットを残し、上澄みを p-200 ピペットで除去する。

④Buffer RA1 containing β -me 707 μ l を細胞ペレットに添加し、P-1000 ピペットによるピペッティングにより細胞溶解する。

⑤2 ml 遠心チューブがセットしてある violet のカラムにアプライし eppendorf 5424R で 11000 rpm (11000 x g)、1 分間遠心する。

⑥濾過物に 70 % EtOH 700 μ l 添加し、ピペッティングにより混合する。これを 2 ml 遠心チューブをセットした light blue のカラムにアプライし、eppendorf 5424R で 11000 rpm (11000 x g)、30 秒間遠心する。もう一度同様の操作を行う。カラムを新しいチューブにセットする。

⑦MDB 350 μ l をカラムに加え、eppendorf 5424R で 11000 rpm (11000 x g)、1 分間遠心し、膜を乾燥させる。フロースルーを捨てる。フロースルーが膜とコンタクトした時は再度行う。

⑧DNase reaction mixture 95 μ l を膜中央にアプライ、室温で 15 分間インキュベートする。

⑨DNase を不活性化するために、Buffer RA2 200 μ l をカラムに添加し、eppendorf 5424R で 11000 rpm (11000 x g)、30 秒間遠心する。カラムを新しいコレクションチューブにつけかえる。

⑩Buffer RA3 600 μ l をカラムに添加し、eppendorf 5424R で 11000 rpm (11000 x g)、30 秒間遠心する。フロースルーを捨て再利用のコレクションチューブに戻す。

⑪Buffer RA3 250 μ l をカラムに添加し、eppendorf 5424R で 11000 rpm (11000 x g)、2 分間遠心する。次に、85% EtOH 250 μ l をカラムに添加し、eppendorf 5424R で 11000 rpm (11000 x g)、5 分間遠心して膜を乾燥させる。カラムをオートクレーブした核酸フリーの nuclease-free 1.5 ml 遠心チューブ (付属) に取り付ける。

⑫H₂O (RNase-free) 60 μl を膜の中央にアプライし、11000 rpm (11000 x g)、1 分間遠心する (-80°C保存)。

【Total RNA 濃度の測定】

回収した Total RNA サンプル 2 μl を、滅菌 MilliQ 水 98 μl に添加・混合し、50 倍希釈する。

波長 260 nm と 280 nm で石英セルを使って吸光度を測定する(Gene Quant pro“S”：アマシャム ファルマシア バイオテック)。

計算方法：RNA 濃度(ng/μl) = Abs₂₆₀ × 40 μg/ml × 50 倍

13. RT 反応

【使用キット】

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

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

<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 1.5ml エッペンドルフチューブにまとめて作る。

<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。

14. SYBR 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、Rm643 冷凍庫 SANYO (-20°C 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)

<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 1.5mL 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) 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 1.5mL 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 1.5mL 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 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 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 μ L 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 μ L 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 50 サイクル
 60°C 30 秒
- Melt Curve Stage 95°C 15 秒
 60°C 60 秒 1 サイクル
 95°C 15 秒

上記反応条件であることを確認する。

15. StepOnePlus 本体にプレートセットする。
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⁻ (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。
15. SDS-PAGE

<使用器具>

P10、P200、P1000、P5000、エッペンチューブ、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、溶液の調製>

① 30% アクリルアミド溶液 (A 溶液) (2~8°C保存)

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。

② 1.5 M Tris-HCl 緩衝液 pH8.8 (B 溶液) (2~8°C保存)

Tris (SIGMA T-1503) 36.4 g に DDW を加えて、HCl で pH8.8 に調整後、DDW で 200 ml にメスアップする。

③ 0.5 M Tris-HCl 緩衝液 pH6.8 (C 溶液) (2~8°C保存)

Tris (SIGMA T-1503) 6.05 g に DDW を加えて、HCl で pH6.8 に調整後、100 ml にメスアップする。

④ 10% SDS 溶液 (D 溶液) (室温保存)

ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) (BIO-RAD 162670A) 1.0 g を 10 ml の DDW で溶解する。

⑤ 10% 過硫酸アンモニウム (E 溶液) (当日調製)

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。

⑥ 泳動槽用緩衝溶液 (0.025M Tris、0.192M 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。

⑦ 2×サンプル buffer

0.5 M Tris-HCl (pH6.8) 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 6 μ l/lane で用いる。

<実験操作>

(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

- ① 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。
- ② 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。
- ③ 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。

<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：E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、D、E、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。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、D、E、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。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。

<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。

- ① 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。）
- ② 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。）
- ③ 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）

- ④ 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。
- ⑤ 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。

<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測定し、全てのサンプルが 5000 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 2500 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 4 µl/lane (10 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。

<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 100V、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）

16. Western blot 法

<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、185mm、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

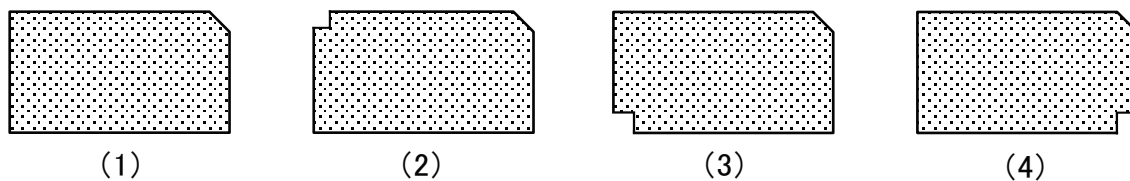
① 転写 buffer (当日調製、メタノールが揮発性のため保存不可)

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。

② 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)



③ 濾紙 (No.2、185mm、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)

④ 槽内冷却用ケース (乳白色もしくは青色)

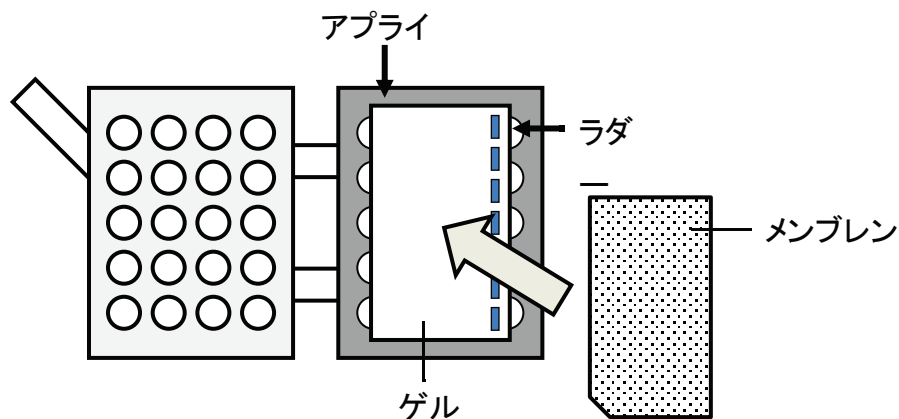
(乳白色のケース) あらかじめ使用する前に、氷と DDW を満たし、凍結させておく。

(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)

- ① 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。
- ② 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。
- ③ 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。
- ④ 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。



- ⑤ 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。
- ⑥ 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。)
- ⑦ 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。
- ⑧ 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、(200W)、120 min で通電を開始する。

<転写膜のブロッキングと抗体反応>

(試薬・溶液)

① 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。

② 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。

③ 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。

④ 一次抗体溶液

	一次抗体溶液	希釈倍率	メーカー	コード
Flotillin-1	Purified Mouse Anti-Flotillin-1	1:1000	BD Transduction Laboratories	610820
ABCA1	Anti ABCA1 (AB.H10)	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc	sc-58219
腸 ALP	Anti-intestinal alkaline phosphatase antibody、Rabbit、monoclonal	1:10000	abcam	ab186422
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。

⑤ 二次抗体溶液

	二次抗体溶液	希釈倍率	メーカー	コード
ABCA1、 β -actin、Flotillin-1	Goat Anti-Mouse IgG (H+L) - HRP Conjugate	1:4000	BIO-RAD	170-6516
腸 ALP	Anti-Rabbit IgG、HRP-linked Antibody	1:1000	Cell Signaling Technology	#7074
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。

⑥ 検出試薬（直前に調製）

イムノスター® LD（Wako、296-69901）

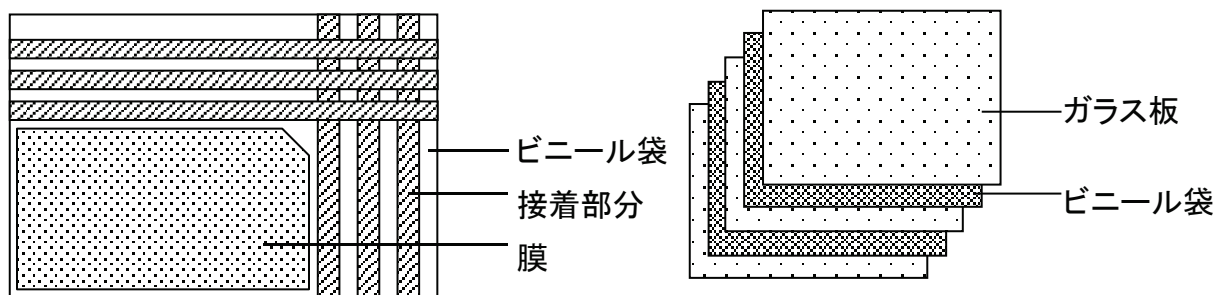
添付されている Luminescence Solution A および Luminescence Solution B を 250 μ l ずつ等量で混合する。（1枚につき 500 μ l 必要）

（※SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate で検出されなかった場合に使用。）

<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）

このような順で重ね、固定する。



- ④ 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。
- ⑤ 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。）
- ⑥ 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。
- ⑦ 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。

<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>

- ① 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。
- ② Typhoon Scanner Control ウィンドウメニューを設定する。
 - 1) スキャンモードを Chemiluminescence モードにする。
 - 2) 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。
 - 3) 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。
 - 4) User Comment にサンプル条件、スキャン条件を記入する。
 - 5) スキャンするエリアをマウスでドラッグして指定する。
- ③ 上記の設定後、15 ml チューブに検出試薬を調製する。
- ④ 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。

- ⑤ 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 のスキャ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。）
- ⑥ スキャナ部のカバーを閉じ、コンピューター上の Typhoon Scanner Control ウィンドウの Scan ボタンを押す。Scan ボタンを押すと画面に Save As ウィ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）
- ⑦ スキャンが始まる。
- ⑧ 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。
- ⑨ 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。）
- ⑩ Typhoon Scanner Control を終了し、コンピューター、Typhoon、主電源を切る。
- ⑪ 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。

<Image J による画像解析>

- ① パソコンで ImageJ を立ち上げ、File の Open から画像を表示させる。
- ② 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。）
- ③ Control を押しながら[1]を押す。（四角の中に①と表示される。）
- ④ 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。
- ⑤ Control を押しながら[2]を押す。（四角の中に②と表示される。）
- ⑥ 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。）
- ⑦ 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。

- ⑧ 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。

第 10 章 参考文献

- 1) Liang H, Jiang F, Cheng R, Luo Y, Wang J, Luo Z, Li M, Shen X and He F. A high-fat diet and high-fat and high-cholesterol diet may affect glucose and lipid metabolism differentially through gut microbiota in mice. *Exp. Anim.* 70, 73-83, 2021.
- 2) Iqbal J, Boutjdir M, Rudel LL and Hussain MM. Intestine-specific MTP and global ACAT2 deficiency lowers acute cholesterol absorption with chylomicrons and HDLs. *J. Lipid Res.* 55, 2261-2275, 2014.
- 3) German CA and Liao JK. Understanding the molecular mechanisms of statin pleiotropic effects. *Arch. Toxicol.* 97, 1529-1545, 2023.
- 4) Ward NC, Watts GF and Eckel RH. Statin Toxicity. *Circ. Res.* 124, 328-350, 2019.
- 5) Erak M, Bellmann-Sickert K, Els-Heindl S and Beck-Sickinger AG. Peptide chemistry toolbox - transforming natural peptides into peptide therapeutics. *Bioorg. Med. Chem.* 26, 2759-2765, 2018.
- 6) Caponio GR, Wang DQ, Di Ciaula A, De Angelis M and Portincasa P. Regulation of cholesterol metabolism by bioactive components of soy proteins: novel translational evidence. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 227, 2020.
- 7) Nagaoka S, Nakamura A, Shibata H and Kanamaru Y. Soystatin (VAWWMY), a novel bile acid-binding peptide, decreased micellar solubility and inhibited cholesterol absorption in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 1738-1741, 2010.
- 8) Nagaoka S, Miwa K, Eto M, Kuzuya Y, Hori G and 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.
- 9) Nagaoka S, Futamura Y, Miwa K, Awano T, Yamauchi K, Kanamaru Y, Tadashi K and Kuwata T. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk beta-lactoglobulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 11-17, 2001.
- 10) Takeuchi A, Hisamatsu K, Okumura N, Sugimitsu Y, Yanase E, Ueno Y and 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.
- 11) Ballegaard AR and Bøgh KL. Intestinal protein uptake and IgE-mediated food allergy. *Food Res. Int.* 163, 112150, 2023.

- 12) Wang CY, Liu S, Xie XN and Tan ZR. Regulation profile of the intestinal peptide transporter 1 (PepT1). *Drug Des. Devel. Ther.* 11, 3511-3517, 2017.
- 13) Singh A, Thornton ER and Westheimer FH. The photolysis of diazoacetylchymotrypsin. *J. Biol. Chem.* 237, 3006–3008, 1962.
- 14) Tomohiro T and Hatanaka Y. Diazirine-based multifunctional photo-probes for affinity-based elucidation of protein-ligand interaction. *Heterocycles* 89, 2697–2727, 2014.
- 15) Kolb HC, Finn MG and Sharpless KB. Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 2004–2021, 2001.
- 16) Rostovtsev VV, Green LG, Fokin VV and Sharpless KB. A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper (I)-catalyzed regioselective “Ligation” of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 2596–2599, 2002.
- 17) Tornøe CW, Christensen C and Meldal M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper (I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.* 67, 3057–3064, 2002.
- 18) Takeuchi A, Ye Y, Takada K, Mori R, Nakamura T, Oda N, Mijiti M, Banno A and Nagaoka S. Pentapeptide IIAEK ameliorates cholesterol metabolism via the suppression of intestinal cholesterol absorption in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 87, 1345-1353, 2023.
- 19) Stellaard F. From Dietary cholesterol to blood cholesterol, physiological lipid fluxes, and cholesterol homeostasis. *Nutrients* 14, 1643, 2022.
- 20) de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ and Edwards PA. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metab.* 17, 657-669, 2013.
- 21) Giangreco F, Höfninger S, Bakalis E and Zerbetto F. Impact of the green tea ingredient epigallocatechin gallate and a short pentapeptide (Ile-Ile-Ala-Glu-Lys) on the structural organization of mixed micelles and the related uptake of cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1862, 1956-1963, 2018.
- 22) Banno A, Wang J, Okada K, Mori R, Maihemuti M and 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, 19416, 2019.
- 23) Dayar E and Pechanova O. Targeted strategy in lipid-lowering therapy. *Biomedicines* 10, 1090, 2022.

- 24) Jakulj L, van Dijk TH, de Boer JF, Kootte RS, Schonewille M, Paalvast Y, Boer T, Bloks VW, Boverhof R, Nieuwdorp M, Beuers UH, Stroes ES and Groen AK. Transintestinal cholesterol transport is active in mice and humans and controls ezetimibe-induced fecal neutral sterol excretion. *Cell Metab.* 24, 783-794, 2016.
- 25) Duan LP, Wang HH and Wang DQ. Cholesterol absorption is mainly regulated by the jejunal and ileal ATP-binding cassette sterol efflux transporters *Abcg5* and *Abcg8* in mice. *J. Lipid Res.* 45, 1312-1323, 2004.
- 26) Tsukahara T, Kishino E, Inoue R, Nakanishi N, Nakayama K, Ito T and Ushida K. Correlation between villous height and the disaccharidase activity in the small intestine of piglets from nursing to growing. *Anim. Sci. J.* 84, 54-59, 2013.
- 27) Goldstein DJ, Rogers CE and Harris H. Expression of alkaline phosphatase loci in mammalian tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 2857–2860, 1980.
- 28) Lallès JP. Recent advances in intestinal alkaline phosphatase, inflammation, and nutrition. *Nutr. Rev.* 77, 710–724, 2019.
- 29) Narisawa S, Hoylaerts MF, Doctor KS, Fukuda MN, Alpers DH and Millán JL. A novel phosphatase upregulated in *Akp3* knockout mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293, 1068-1077, 2007.
- 30) Ghosh SS, Wang J, Yannie PJ, Cooper RC, Sandhu YK, Kakiyama G, Korzun WJ and Ghosh S. Over-expression of intestinal alkaline phosphatase attenuates atherosclerosis. *Circ. Res.* 128, 1646-1659, 2021.
- 31) Ghosh SS, He H, Wang J, Korzun W, Yannie PJ and Ghosh S. Intestine-specific expression of human chimeric intestinal alkaline phosphatase attenuates Western diet-induced barrier dysfunction and glucose intolerance. *Physiol. Rep.* 6, e13790, 2018.
- 32) Xie QM, Zhang Y, Mahmood S and Alpers DH. Rat intestinal alkaline phosphatase II messenger RNA is present in duodenal crypt and villus cells. *Gastroenterology* 112, 376–386, 1997.
- 33) Malik N and Butterworth PJ. Molecular properties of rat intestinal alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 446, 105–114, 1976.
- 34) Hirano K, Sugiura M, Miki K, Iino S, Suzuki H and Oda T. Characterization of tissue-specific isozyme of alkaline phosphatase from human placenta and intestine. *Chem. Pharm. Bull.* 25, 2524–2529, 1977.

- 35) Hinke SA, Kühn-Wache K, Hoffmann T, Pederson RA, McIntosh CH and Demuth HU. Metformin effects on dipeptidylpeptidase IV degradation of glucagon-like peptide-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 1302-1308, 2002.
- 36) Huang J, Liu X, Wei Y, Li X, Gao S, Dong L, Rao X and Zhong J. Emerging role of dipeptidyl peptidase-4 in autoimmune disease. *Front. Immunol.* 13, 830863, 2022.
- 37) Fedde KN and Whyte MP. Alkaline phosphatase (tissue-nonspecific isoenzyme) is a phosphoethanolamine and pyridoxal-5'-phosphate ectophosphatase: normal and hypophosphatasia fibroblast study. *Am. J. Hum. Genet.* 47, 767-775, 1990.
- 38) Komazin G, Maybin M, Woodard RW, Scior T, Schwudke D, Schombel U, Gisch N, Mamat U and Meredith TC. Substrate structure-activity relationship reveals a limited lipopolysaccharide chemotype range for intestinal alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.* 294, 19405-19423, 2019.
- 39) Millan JL and Whyte MP. Alkaline phosphatase and hypophosphatasia. *Calcif. Tissue Int.* 98, 398-416, 2016.
- 40) Kaufmann CM, Graßmann J, Treutter D and Letzel T. Utilization of real-time electrospray ionization mass spectrometry to gain further insight into the course of nucleotide degradation by intestinal alkaline phosphatase. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 28, 869-878, 2014.
- 41) Ghosh K, Mazumder Tagore D, Anumula R, Lakshmaiah B, Kumar PP, Singaram S, Matan T, Kallipatti S, Selvam S, Krishnamurthy P and Ramarao M. Crystal structure of rat intestinal alkaline phosphatase—Role of crown domain in mammalian alkaline phosphatase. *J. Struct. Biol.* 184, 182-192, 2013.
- 42) Narisawa S, Huang L, Iwasaki A, Hasegawa H, Alpers DH and Millán JL. Accelerated fat absorption in intestinal alkaline phosphatase knockout mice. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7525-7530, 2003.
- 43) Kaliannan K, Hamarneh SR, Economopoulos KP, Nasrin Alam S, Moaven O, Patel P, Malo NS, Ray M, Abtahi SM, Muhammad N, Raychowdhury A, Teshager A, Mohamed MM, Moss AK, Ahmed R, Hakimian S, Narisawa S, Millán JL, Hohmann E, Warren HS, Bhan AK, Malo MS and Hodin RA. Intestinal alkaline phosphatase prevents metabolic syndrome in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 7003-7008, 2013.
- 44) Kühn F, Adiliaghdam F, Cavallaro PM, Hamarneh SR, Tsurumi A, Hoda RS, Munoz AR, Dhole Y, Ramirez JM, Liu E, Vasan R, Liu Y, Samarbafzadeh E, Nunez RA, Farber MZ, Chopra V,

- Malo MS, Rahme LG and Hodin RA. Intestinal alkaline phosphatase targets the gut barrier to prevent aging. *JCI Insight*. 5, e134049, 2020.
- 45) Jia Y, Kim JH, Nam B, Kim J, Lee JH, Kim KO, Hwang KY and Lee SJ. The dipeptide H-Trp-Arg-OH (WR) is a PPAR α agonist and reduces hepatic lipid accumulation in lipid-loaded H4IIE cells. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 175, 1211-1220, 2015.
- 46) Iqbal J, Parks JS and Hussain MM. Lipid absorption defects in intestine-specific microsomal triglyceride transfer protein and ATP-binding cassette transporter A1-deficient mice. *J. Biol. Chem*. 288, 30432–30444, 2013.
- 47) Schmitz G and Langmann T. Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim. Biophys. Acta*. 1735, 1–19, 2005.
- 48) Gomes JR, Ayub LC, Dos Reis CA, Machado MJ, da Silva J, Omar NF and de Miranda Soares MA. Goblet cells and intestinal Alkaline phosphatase expression (IAP) during the development of the rat small intestine. *Acta Histochem*. 119, 71-77, 2017.
- 49) Goncalves A, Gontero B, Nowicki M, Margier M, Masset G, Amiot MJ and Reboul E. Micellar lipid composition affects micelle interaction with class B scavenger receptor extracellular loops. *J. Lipid Res*. 56, 1123-1133, 2015.
- 50) Morikawa K, Kondo I, Kanamaru Y and Nagaoka S. A novel regulatory pathway for cholesterol degradation via lactostatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 352, 697–702, 2007.
- 51) Wang Y, Gunewardena S, Li F, Matye DJ, Chen C, Chao X, Jung T, Zhang Y, Czerwiński M, Ni HM, Ding WX and Li T. An FGF15/19-TFEB regulatory loop controls hepatic cholesterol and bile acid homeostasis. *Nat. Commun*. 11, 3612, 2020.
- 52) Lee H, Shin E, Kang H, Youn H and Youn B. Soybean-derived peptides attenuate hyperlipidemia by regulating trans-intestinal cholesterol excretion and bile acid synthesis. *Nutrients* 14, 95, 2021.
- 53) Lee S and Youn B. Hypolipidemic roles of casein-derived peptides by regulation of trans-intestinal cholesterol excretion and bile acid synthesis. *Nutrients* 12, 3058, 2020.
- 54) Dang Y, Zhou T, Hao L, Cao J, Sun Y and Pan D. In vitro and in vivo studies on the angiotensin-converting enzyme inhibitory activity peptides isolated from broccoli protein hydrolysate. *J. Agric. Food Chem*. 67, 6757-6764, 2019.

- 55) Patil SP, Goswami A, Kalia K and Kate AS. Plant-derived bioactive peptides: a treatment to cure diabetes. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 26, 955-968, 2020.
- 56) Yedlin ST, Young GP, Seetharam B, Seetharam S and Alpers DH. Characterization and comparison of soluble and membranous forms of intestinal alkaline phosphatase from the suckling rat. *J. Biol. Chem.* 256, 5620–5626, 1981.
- 57) Sogabe N, Mizoi L, Asahi K, Ezawa I and Goseki-Sone M. Enhancement by lactose of intestinal alkaline phosphatase expression in rats. *Bone* 35, 249–255, 2004.
- 58) Nakano T, Inoue I, Alpers DH, Akiba Y, Katayama S, Shinozaki R, Kaunitz JD, Ohshima S, Akita M, Takahashi S, Koyama I, Matsushita M and Komoda T. Role of lysophosphatidylcholine in brush-border intestinal alkaline phosphatase release and restoration. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 297, 207–214, 2009.
- 59) Harada T, Koyama I, Sato K and Komoda T. Induction of rat alkaline phosphatase isozymes bearing a glycan-phosphatidylinositol anchor modified by in vivo treatment with a benzimidazole derivative linked to ethylbenzene. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 127, 193–202, 2000.
- 60) Suzuki K, Kasai R, Hirosawa K, Nemoto Y, Ishibashi M, Miwa Y, Fujiwara T and Kusumi A. Transient GPI-anchored protein homodimers are units for raft organization and function. *Nat. Chem. Biol.* 8, 774–783, 2012.
- 61) Shin B, Won H, Adams DJ and Lee SK. CD55 regulates bone mass in mice by modulating RANKL-mediated Rac signaling and osteoclast function. *J. Bone Miner. Res.* 35, 130–142, 2020.
- 62) Matsuzaki E, Takahashi-Yanaga F, Miwa Y, Hirata M, Watanabe Y, Sato N, Morimoto S, Hirofuji T, Maeda K and Sasaguri T. Differentiation-inducing factor-1 alters canonical Wnt signaling and suppresses alkaline phosphatase expression in osteoblast-like cell lines. *J. Bone Miner. Res.* 21, 1307–1316, 2006.
- 63) Rawadi G, Vayssiere B, Baron R and Roman-Roman S. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J. Bone Miner. Res.* 18, 1842–1853, 2003.
- 64) Giocondi MC, Besson F, Dosset P, Milhiet PE and Le Grimellec C. Temperature-dependent localization of GPI-anchored intestinal alkaline phosphatase in model rafts. *J. Mol. Recognit.* 20, 531-537, 2007.

- 65) Su MC, Yuan RH, Lin CY and Jeng YM. Cadherin-17 is a useful diagnostic marker for adenocarcinomas of the digestive system. *Mod. Pathol.* 21, 1379-1386, 2008.
- 66) Chang YY, Yu LC, Yu IS, Jhuang YL, Huang WJ, Yang CY and Jeng YM. Deletion of cadherin-17 enhances intestinal permeability and susceptibility to intestinal tumour formation. *J. Pathol.* 246, 289–299, 2018.
- 67) Aylon Y, Gershoni A, Rotkopf R, Biton IE, Porat Z, Koh AP, Sun X, Lee Y, Fiel MI, Hoshida Y, Friedman SL, Johnson RL and Oren M. The LATS2 tumor suppressor inhibits SREBP and suppresses hepatic cholesterol accumulation. *Genes Dev.* 30, 786-797, 2016.
- 68) Liu Z, Li P, Zhao ZH, Zhang Y, Ma ZM and Wang SX. Vitamin B6 prevents endothelial dysfunction, insulin resistance, and hepatic lipid accumulation in *ApoE (-/-)* mice fed with high-fat diet. *J. Diabetes Res.* 2016, 1748065, 2016.
- 69) Kitagawa E, Yamamoto T, Yamamoto K, Nakagawa T and Hayakawa T. Accumulation of lipid in rat liver was induced by vitamin B₆ deficiency and was ameliorated by supplemental phosphatidylcholine in the diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79, 1320-1326, 2015.
- 70) Wilson MP, Plecko B, Mills PB and Clayton PT. Disorders affecting vitamin B₆ metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* 42, 629-646, 2019.
- 71) Choromańska B, Mysliwiec P, Choromańska K, Dadan J and Chabowski A. The role of CD36 receptor in the pathogenesis of atherosclerosis. *Adv. Clin. Exp. Med.* 26, 717–722, 2017.
- 72) Lynes M, Narisawa S, Millán JL and Widmaier EP. Interactions between cd36 and global intestinal alkaline phosphatase in mouse small intestine and effects of high-fat diet. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301, 1738–1747, 2011.
- 73) Lynes MD and Widmaier EP. Involvement of CD36 and intestinal alkaline phosphatases in fatty acid transport in enterocytes, and the response to a high-fat diet. *Life Sci.* 88, 384–391, 2011.
- 74) Moss AK, Hamarneh SR, Mohamed MMR, Ramasamy S, Yammine H, Patel P, Kaliannan K, Alam SN, Muhammad N, Moaven O, Teshager A, Malo NS, Narisawa S, Millán JL, Shaw Warren H, Hohmann E, Malo MS and Hodin RA. Intestinal alkaline phosphatase inhibits the proinflammatory nucleotide uridine diphosphate. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 304, 597-604, 2013.
- 75) Chen KT, Malo MS, Moss AK, Zeller S, Johnson P, Ebrahimi F, Mostafa G, Alam SN, Ramasamy S, Warren HS, Hohmann EL and Hodin RA. Identification of specific targets for the

- gut mucosal defense factor intestinal alkaline phosphatase. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 299, 467–475, 2010.
- 76) Mizumori M, Ham M, Guth PH, Engel E, Kaunitz JD and Akiba Y. Intestinal alkaline phosphatase regulates protective surface microclimate pH in rat duodenum. *J. Physiol.* 587, 3651–3663, 2009.
- 77) Liu W, Hu D, Huo H, Zhang W, Adiliaghdam F, Morrison S, Ramirez JM, Gul SS, Hamarneh SR and Hodin RA. Intestinal alkaline phosphatase regulates tight junction protein levels. *J. Am. Coll. Surg.* 222, 1009–1017, 2016.
- 78) Lallès JP. Dairy products and the French paradox: Could alkaline phosphatases play a role? *Med. Hypotheses* 92, 7–11, 2016.
- 79) Shin J, Carr A, Corner GA, Tögel L, Dávalos-Salas M, Tran H, Chueh AC, Al-Obaidi S, Chionh F, Ahmed N, Buchanan DD, Young JP, Malo MS, Hodin RA, Arango D, Sieber OM, Augenlicht LH, Dhillon AS, Weber TK and Mariadason JM. The intestinal epithelial cell differentiation marker intestinal alkaline phosphatase (ALPi) is selectively induced by histone deacetylase inhibitors (HDACi) in colon cancer cells in a Kruppel-like Factor 5 (KLF5)-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 289, 25306–25316, 2014.
- 80) Zhao X, Xu XX, Liu Y, Xi EZ, An JJ, Tabys D and Liu N. The in vitro protective role of bovine lactoferrin on intestinal epithelial barrier. *Molecules* 24, 1–14, 2019.
- 81) Alvarenga L, Cardozo LFMF, Lindholm B, Stenvinkel P and Mafra D. Intestinal alkaline phosphatase modulation by food components: predictive, preventive, and personalized strategies for novel treatment options in chronic kidney disease. *EPMA J.* 11, 565-579, 2020.
- 82) Montoya CA, Leterme P and Lalles JP. A protein-free diet alters small intestinal architecture and digestive enzyme activities in rats. *Reprod. Nutr. Dev.* 46, 49–56, 2006.
- 83) Montoya CA, Lallés JP, Beebe S, Montagne L, Souffrant WB and Leterme P. Influence of the *Phaseolus vulgaris* phaseolin level of incorporation, type and thermal treatment on gut characteristics in rats. *Br. J. Nutr.* 95, 116–123, 2006.
- 84) Okazaki Y and Katayama T. Glucosamin consumption elevates colonic alkaline phosphatase activity by up-regulating the expression of IAP-1, which is associated with increased production of protective factors for gut epithelial homeostasis in high-fat diet-fed rats. *Nutr. Res.* 43, 43–50, 2017.

- 85) Okazaki Y and Katayama T. Consumption of non-digestible oligosaccharides elevates colonic alkaline phosphatase activity by up-regulating the expression of IAP-I, with increased mucins and microbial fermentation in rats fed a high-fat diet. *Br. J. Nutr.* 121, 146–154, 2019.
- 86) Olsen L, Bressendorff S, Troelsen JT and Olsen J. Differentiation-dependent activation of the human intestinal alkaline phosphatase promoter by HNF-4 in intestinal cells. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 289, 220–226, 2005.
- 87) Malo MS, Zhang W, Alkhoury F, Pushpakaran P, Abedrapo MA, Mozumder M, Fleming E, Siddique A, Henderson JW and Hodin RA. Thyroid hormone positively regulates the enterocyte differentiation marker intestinal alkaline phosphatase gene via an atypical response element. *Mol. Endocrinol.* 18, 1941–1962, 2004.
- 88) Malo MS, Mozumder M, Xiao BZ, Biswas S, Chen A, Bai LC, Merchant JL and Hodin RA. Intestinal alkaline phosphatase gene expression is activated by ZBP-89. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 290, 737–746, 2006.
- 89) Alkhoury F, Malo MS, Mozumder M, Mostafa G and Hodin RA. Differential regulation of intestinal alkaline phosphatase gene expression by Cdx1 and Cdx2. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 289, 285–290, 2005.

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、研究室生活を共にした、博士課程の葉宇陽氏、修士課程の會田拓巳氏、章妮氏、高田敬梧氏、中村斗茉氏、平石萌音氏、山本真子氏、小田夏暉氏、西野七海氏、松葉翔也氏、4年生の黒田大輝氏、中田なつこ氏、林碩迪氏の諸氏に感謝申し上げます。