

ビタミンE輸送蛋白質の生理機能の解明

有田 誠

①

＜博士論文＞

ビタミンE輸送蛋白質の生理機能の解明

平成六年度進学 有田 誠

指 導 教 官 井上 圭三

【目次】

Abbreviations

序論	1
第1章 α -TTPと先天性ビタミンE欠乏症	7
＜材料＞	
＜方法＞	
1、ヒト肝臓cDNAライブラリーからのスクリーニング	8
2、5'-RACE (rapid amplification of cDNA end)	9
3、Northern blotting	10
4、蛍光in situハイブリダイゼーション (FISH)	
5、各エクソンのPCRによる増幅	11
6、SSCP (single strand conformational polymorphism)法	12
7、direct sequencing	
8、 $[^3\text{H}]\alpha$ -tocopherolの調製	
9、 α -toc輸送活性の測定	13
＜実験と結果＞	
1-1、ヒト α TTPのcDNAクローニング	14
1-2、ヒト α TTPの発現臓器について	
1-3、ヒト α TTPのchromosomal localization	18
1-4、 α TTP遺伝子のゲノム構造解析	
1-5、先天性ビタミンE欠乏症患者の α TTP遺伝子からの 変異の検出	19
1-6、ミスセンス変異蛋白質(H101Q)の活性測定	20
＜考察＞	27

第2章 α TTPによる α -tocの細胞外への放出機構についての解析

<材料>

<方法>

1、細胞の培養	32
2、 α TTPを発現する細胞の樹立	
3、 $[^{14}\text{C}]\alpha$ -tocopherol acetateの合成	33
4、リボソームの調製	34
5、 $[^{14}\text{C}]\text{oleate-BSA}$ の調製	
6、脂質の抽出および分析	35
7、細胞にとりこまれた α -tocの細胞外への放出のアッセイ	
<実験と結果>	
2-1、 α TTPを発現する細胞の樹立	36
2-2、細胞にとりこまれた α -tocの細胞外への放出をアッセイ する系の確立	38
2-3、 α TTP依存的な α -tocの細胞外への放出	39
2-4、 α TTP依存的な α -tocの細胞外への放出に対する各種薬物 の効果（放出経路の解析）	44
2-5、25-OH cholesterolによる阻害効果についての解析	45
<考察>	55

第3章 α TTPと結合する細胞内蛋白質の同定

<材料>

<方法>

1、GST-TTPアフィニティーカラムの作製 59

2、ラット肝臓ミクロソーム画分の蛋白質溶液の調製

3、p50の部分アミノ酸配列の決定 60

4、p50のcDNAクローニング 62

<実験と結果>

3-1、 α TTP結合蛋白質(p50)の同定 63

3-2、p50の部分アミノ酸配列の決定 65

3-3、p50のcDNAクローニング

3-4、P50の発現臓器について 66

<考察> 71

総括と展望 73

References 80

謝辞 85

Abbreviations

ACAT : acyl coenzyme A / cholesterol acyltransferase

ALS : amyotrophic lateral sclerosis

α -toc : α -tocopherol

α TTP : α -tocopherol transfer protein

AVED : ataxia with isolated vitamin E deficiency

BHT : butylhydroxytoluene

b.p. : base pair

BSA : bovine serum albumin

CBB : coomassie brilliant blue

cDNA : complementary DNA

CE : cholesteryl ester

DCP : dicethylphosphate

DG : diacylglycerol

DMEM : Dulbecco's modified Minimum Essential Medium

E.R. : endoplasmic reticulum

FCS : fetal calf serum

FFA : free fatty acid

FISH : fluorescent in situ hybridization

FIVE deficiency : familial isolated vitamin E deficiency

GSH : glutathione

GST : glutathione S transferase

HDL : high density lipoprotein

HS : horse serum

LDL : low density lipoprotein

LPDS : lipoprotein deficient serum

mQ : milliQ (distilled water)

OSBP : oxysterol binding protein

PC : phosphatidylcholine

PI : phosphatidylinositol

PS : phosphatidylserine

RACE : rapid amplification of cDNA ends

RFLP : restriction fragment length polymorphism

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

SOD : superoxide dismutase

SREBP : sterol regulated element binding protein

SSCP : single strand conformational polymorphism

SM : sphingomyelin

TG : triglyceride

TLC : thin layer chromatography

tocAc : α -tocopherol acetate

VLDL : very low density lipoprotein

【序論】

近年、成人性疾患の多くに活性酸素が関与していることが報告されている。ビタミンE (α -tocopherol, α -toc) は脂溶性の抗酸化物質であり、生体内の不飽和脂肪酸の連鎖的な酸化を防ぐ活性を持つことが知られている(1)。そのようにして生体成分を酸素ストレスから防御することによって健康体を維持する栄養素であると考えられている。

動物は体内でビタミンEを合成することができず、その全てを食餌から摂取している。ところで、生体はビタミンE同族体を厳密に選別することが知られている(2)。すなわち天然には8種類のビタミンEの同族体が存在し(図1)、それぞれ α -, β -, γ -, δ -tocopherol、 α -, β -, γ -, δ -tocotrienolなどと銘々されているが、動物の体内ではそのほとんどが α -tocopherolであることが知られている。生体はどのようにして α -tocの選別を行なっているのだろうか。またビタミンE同族体は抗酸化活性という意味ではほとんど同等であるにもかかわらず、生体はなぜ α -tocを選ぶ必要があるのだろうか。

この疑問に対して、1980年代の後半にアメリカのKaydenらのグループによって、食餌として摂取されたビタミンE同族体の体内動態が詳細に解析された。その結果、生体内における同族体の選別は小腸からの吸収段階ではなく肝臓で行われていることが明らかになった(3-5)。

一方、当研究室では1981年にラット肝臓の可溶性画分中に α -tocと特異的に結合し、その膜間輸送を促進する活性があることを見いだしていた(6)。また、

外国のグループによっても同様の活性があることが報告されていた(7-11)が、その後本因子の精製に成功したグループはなく、その活性の実体は長らく不明のままであった。当研究室では、1991年にこの活性を担う蛋白質の完全精製に成功し、この蛋白質を α -tocopherol transfer protein, α TTP と名付け、さらに1993年にはcDNAクローニングに成功した(12,13)。

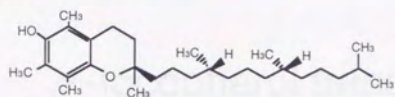
α TTPは α -tocを特異的に認識する分子として初めて同定されたものであり、現在知られる唯一の α -toc認識蛋白質である(図2)。 α -tocのような低分子化合物が生体内で作用するには α TTPのような特異的結合蛋白質によってその生理活性が制御されている可能性が考えられる。したがって α TTPはビタミンEの生理作用を理解する上で重要な手がかりとなる分子だと考えられた。

また、 α TTPの一次構造はレチナール結合蛋白質(CRALBP)(14-17)、SEC14p(18-24)などによく似ている(図3)。CRALBPは網膜の色素上皮細胞に存在し、ロドプシンの成分として必要な11-cis-レチナールを特異的に認識する蛋白質である。機能としては11-cis-レチナールのロドプシンへの選択的供給に関わっていると考えられるが、十分な解析はなされていない。一方SEC14pはもともと酵母においてゴルジ体からの分泌過程に必須な因子として同定されたものであり、可溶性の蛋白質でありながら一部ゴルジ体の表面に結合している。同時にSEC14pはホスファチジルイノシトール(PI)、およびホスファチジルコリン(PC)の交換輸送活性を持つ。このリン脂質輸送活性と分泌機能との関係についてはいくつかの提案はなされているがよく分かっていない。 α TTPも含めてこれらの蛋白質の共通点といえば、いずれもが脂質結合能をもつ可溶性蛋

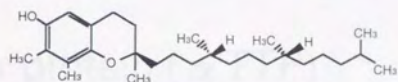
白質だという事である。C末端側には比較的疎水性アミノ酸が多く存在し、またPro, Glyなどのアミノ酸が一定の間隔で並んでおり、逆平行 β シート構造(25)のリガンド結合部位である可能性が高い。また、N末端側には約15アミノ酸にわたる高度に保存された領域 (FLLRFLRAR(D/K)FDVXLA) があり、1つの可能性として脂質のソーティングに関わるドメインではないかと考えられた。なお、これまでに細胞内で脂質と結合する蛋白質は数多く知られているが、その機能についてはよく分かっていないものが多く、とくに脂質のある特定のオルガネラへソーティングする機能となると解明された前例はない。

私は、 α TTPが α -tocを特異的に認識するという事、および α TTPの一次構造上に特徴的な配列が存在するという事から、 α TTPがユニークな蛋白質であると考えていたが、博士課程に進学した1993年当時はその生理機能については何も分かっていなかった。そこで、私は α TTPの機能を明らかにすることを目的とした。

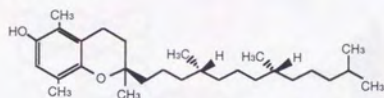
α -Tocopherol



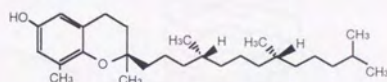
γ -Tocopherol



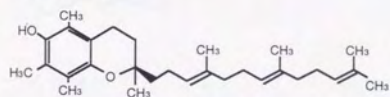
β -Tocopherol



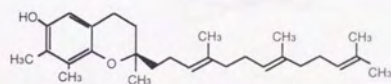
δ -Tocopherol



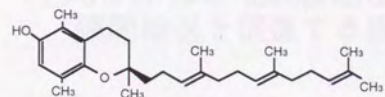
α -Tocotrienol



γ -Tocotrienol



β -Tocotrienol



δ -Tocotrienol

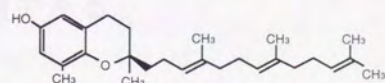
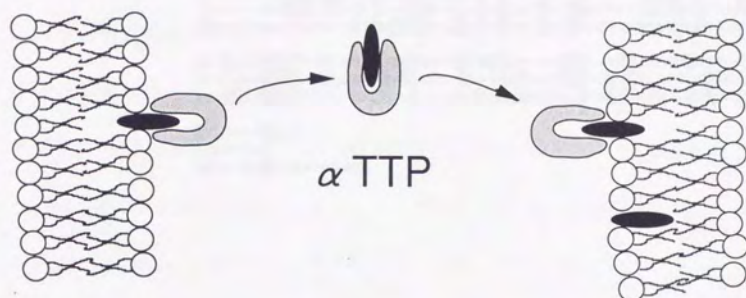


図1、ビタミンE同族体の構造式

図 2

α -tocopherol transfer protein (α TTP)



○ α TTPは α -tocopherolと特異的に結合し、その膜間輸送を促進する蛋白質である。

○ α TTPは肝臓にのみ特異的に発現している

α TTP (rat) MAEMRPGPVVGKQLNEQPDHSP
 CRALBP (human) SEGVGTFRMPVEEEQELRAQLEQLTTKDHGPFVFGPCSQLPRHTLQKAKDELNEREETREEAVREL
 SEC14p (S. Cerevisiae) MVTQQEKEFLESYPQNCPPDALPGTNGN

LVQPGLAELRRRAQEEGVPTPQPTDAFLRLRLRDEFDLDANRLMKNYKWRACPE--LSA
 QEMVQAQASGEELAVAVAEHVQEKDSQFLRFIRARKFNVGRAYELLRCYVNFRLQYPE--LFD
 LDSAQEKALAEELRLKLEDAGFIERLDDSTLLRFLRARKFDDVQAKEMFENCEKWRKDYGTDTILQ

DLHRSILGLKAGYHGVLASRDPTGS-----RVLIYRISYWDPKVFAYDVFRVSLITSE-
 SLSPFAVRCITIEAGYGVLSRDYGR-----VVMLFNIEHQSQEITFDEILQAYCFILE-
 DFHYDE-KPLIAKFYPQYHKTDKGRPVYFEELGAVNLHEMNKVTSEERMLKNLVWEXESVVQY

LIVQ---EVETQRNGVKATFDLEGWISHAFQITPSVAKKIAAVTDSFPLKVRGIHLINERVIF
 KLE---NEETQINGFCIIENFKGFTMQAASLRSDLRKMDMLQDSFPAKFKAHFHQPWYF
 RLPACSRAGHLVETSCTIMDLKGISISSAYSVM-SYVREASYISQNYPERMGKFYIINAPGE

HAVFSMIKPPLTEKIKGRHHLHGNNYKSSLLQHF-POILELEYGGNESSMEDICQEWTFIMKSE
 TTTYNNVVKPPLKSKLLERVFVHGDDL-SGFYQEIENILPSDFGGTLPRYDGRVAEQLEGPPAQ
 STAFRLFKPFLDPVTVKIIFILGSSYQKELKQIPAEENLVKFGGKSEVDSEKGGYLSDIGPWR

DYLSSISETIQ
 AQAENTAF
 DPKYIGPEGEAPEAFSMK

図 3、 α TTP と他の脂質輸送蛋白質とのホモロジー

CRALBP : 11-cis retinaldehyde binding protein の略。網膜の色素上皮細胞に発現しているが、機能は不明。

SEC14p : 酵母 (Saccharomyces cerevisiae) の分泌変異株の原因遺伝子 sec14 の産物。リン脂質輸送 (PI / PC 交換輸送) 活性をもつ。

網掛けは同一のアミノ酸

(□) で囲った部分は N 末端側で特に保存されている部分

(*) は C 末端側で保存されている Pro, Gly をあらわしている。

第1章 α TTPと先天性ビタミンE欠乏症

古くから先天的にビタミンEが欠乏する疾患が知られていた。ビタミンEが欠乏する原因としては、肝障害、胆管閉塞、膵機能低下などから2次的に起こる脂肪吸収障害 (malabsorption of lipids) (26)、および β リポ蛋白質欠損症 (abetalipoproteinemia) (27)などが知られていた。しかしこれらの疾患はいずれも他の脂質や脂溶性ビタミンの欠乏も伴っており、決してビタミンEが単独に欠乏するものではなかった。一方、ビタミンEが単独に欠乏し、神経障害を呈する疾患 (神経学的にはFriedreich病類似の症状を呈する) が報告されており、familial isolated vitamin E deficiency (FIVE deficiency)あるいはataxia with isolated vitamin E deficiency (AVED)と呼ばれていたが、その原因は不明だった(28-35)。1993年にフランスのKoenigらのグループはこの遺伝病家系から連鎖解析を行ない、原因遺伝子が8番染色体長腕上 (8q) に位置することを報告した(36,37)。私は α TTPがこの遺伝病の原因遺伝子ではないかと考え、ヒト α TTPのcDNAクローニングを行い、さらにフランスのグループとの共同研究で患者の α TTP遺伝子について解析を行なった(38-40)。

<材料>

λ gt11 human liver cDNA library : CLONTECH

Human liver poly A⁺ RNA : CLONTECH

Human multiple tissue northern blot : CLONTECH

Human genomic DNA library : CLONTECH

[α -³²P]dCTP (redivue)(3000Ci / mmol) : Amersham

[γ -³²P]ATP (redivue)(3000Ci / mmol) : Amersham

pBluescript SK(-) : Stratagene

[³H] α -tocopherol acetate (15Ci / mmol) : Amersham (特注)

[¹⁴C]trioleate (52mCi / mmol) : Amersham

<方法>

1、ヒト肝臓cDNAライブラリーからのスクリーニング

ライブラリーは λ gt11 human liver cDNA library (CLONTECH)を用い、プローブはラット α TTPのコーディング領域を用いた。ブランクハイブリダイゼーションは常法に従って行なった。すなわち、DNAを固定したニトロセルロースフィルターをprehybridize buffer (6xSSC, 5xDenhardt, 0.1%SDS, 1mg/ml ssDNA) 中インキュベーション(55℃,2h)し、その後ランダムプライマー法によって標識化したプローブを含むhybridization buffer (1x10⁶cpm/ml in prehybridize buffer) 中インキュベーションする(55℃,10-20h)。ハイブリが終了したら、2xSSCで

wash (5minx2 at r.t.) し、次に wash solution (0.1xSSC, 0.1%SDS) で wash (20minx2 at 50°C) する。なお、この条件は85%以上のホモロジーで検出できる条件である。このフィルターのオートラジオグラフィーをとり、陽性ブランクを検出した。シングル化したファージからDNAを精製し、*EcoRI*で消化し、切り出されたインサートをpBluescriptII SK(-)にサブクローニングして塩基配列を決定した。

2、5'-RACE (rapid amplification of cDNA end)

常法に従った。1μgのtotal RNA (from adult human liver)を用いた。まず、5'-TGCAGCAACGGAGAGTG-3' (codons His23-Asn28, antisense)をプライマーとして逆転写反応を行い、1st strand DNAを合成する。続いて、terminal-d-transferaseによって1st strand DNAの5'末端にpoly(A)を付加する。次に、dT17-adaptor primer : 5'-TTAGCGGCCGCGAATTCT17-3' 及び2つの gene specific primers : 5'-GAGAGTGGTCCGGTAGC-3' (codons Leu20-Ser24 ,antisense), 5'-CGGTAGCGCGTTGAGCT-3'(codons Leu17-Pro21, antisense) によって順次PCRを行って5'末端のcDNAを増幅した。得られたPCR産物はpBluescriptII SK(-)にblunt-end ligationでサブクローニングし、その中でα-TTPをコードしたものは標識化オリゴヌクレオチド:

5'-GCTGGGATCGCGCCTCT-3' (codons Glu3-Glu7)によって検出した。

3、Northern blotting

メンブレンはCLONTECHから購入した。各レーンに2 μ gのpoly(A)⁺ RNAが固定されたメンブレンに対し、ヒト α TTPcDNAのコーディング領域をプローブにしてハイブリダイゼーションを行なった。washの条件は0.1xSSC, 0.1% SDS, 20min x 2 at 65°Cで、いわゆるパーフェクトマッチの条件で行った。

4、蛍光in situハイブリダイゼーション (FISH) (41)

Direct R-banding FISHを行った。この方法では、R分染染色体上で目的の遺伝子の位置を直接的に知ることができる。R分染染色体標本は細胞周期S期の前半にチミジン、後半にブロモデオキシウリジン(BrdU)で処理し、その後Hoechst33258染色を行ない、紫外線と熱によってBrdUの取り込み部位を崩壊することによって作成する。なお、R-positive bandはGC-richなhouse keeping genesが比較的多いことが知られている。

5、各エクソンのPCRによる増幅

primers

AF1 : 5'-GGCAGCAGCGGCGGCGGGC-3'

AF2 : 5'-GCGGCGGGCATGGCAGAG-3'

AR : 5'-CCAGGCCAGGTCCAGATCG-3'

BF : 5'-ATCATTACCATGTATGCCAT-3'

BR : 5'-ACCGATTCTGTAAATAAGAAC-3'

CF : 5'-ACACAATGCTAAGATATGA-3'

CR : 5'-GGAAGTATTATGGCTGACA-3'

DF : 5'-CTTGACATTAGGTATCAGA-3'

DR : 5'-GTAGAGGAACACAGACTTG-3'

EF : 5'-AATGCGGTTTCCTTCTAAA-3'

ER : 5'-GGTTGGATATCACTCATG-3'

1 μ gのDNAをテンプレートにしてそれぞれ50pmolのプライマーでPCRを行った。PCRの条件は(94 $^{\circ}$ C 1min, 50 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 2min) x30 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 10min \rightarrow 4 $^{\circ}$ Cで行なった。ただし、エクソンA,Dについては10%DMSO存在下で反応し、とくにエクソンAはnested PCRを行なった。

6、SSCP (single strand conformational polymorphism)法

それぞれのエクソンに対するPCRを $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 存在下で行なう。2 μl のPCR産物を10 μl の10mM EDTA, 0.1%SDSに溶かし、このうち2 μl を8 μl の95%formamide, 20mM EDTA, 0.05% xylene cyanol, 0.05% BPBで希釈する。このDNA溶液を熱変性(80 $^{\circ}\text{C}$, 5min)で1本鎖にし、4 μl を非変性ゲル(10% glycerol, 6% polyacrylamide gel)にアプライする。20W, 8h at r.tの泳動後、オートラジオグラフィーをとって泳動度の差から変異を検出した。

7、direct sequencing

テンプレートとして用いるPCR産物は1.0pmol, プライマーは12.8pmol用いた。これらをtaq Dye terminator cycle sequencing kit (perkin elmer)に混合し、(96 $^{\circ}\text{C}$, 30sec \rightarrow 50 $^{\circ}\text{C}$, 15sec \rightarrow 60 $^{\circ}\text{C}$, 4min) x25cyclesのプログラムで反応した。

8、 $[\text{H}] \alpha\text{-toc}$ の調製

d- $\alpha\text{-}[\text{H}]\text{tocopherol acetate}$ (15Ci / mmol)を加水分解することによって調製した。120 μl のd- $\alpha\text{-}[\text{H}]\text{tocopherol acetate}$ (1mCi/ml)、および5 μl のd- $\alpha\text{-tocopherol acetate}$ (10mg/ml)を混合し、全体で2mlのEtOH溶液にする。そこに飽和アスコルビン酸水溶液を400 μl 加え、さらに50%KOHを250 μl 加え、遮光

しながら終夜攪拌する。翌日2ml hexaneで抽出を3回行ない、回収したhexane層を1ml mQで1回洗い、エバポレーションした後にTLCで展開した。TLC scannerでスポットの放射活性を測定し、 α -tocの部分をかきとり、酢酸エチルで抽出した。得られた $[^3\text{H}]\alpha$ -toc(1.5Ci / mmol)はEtOH溶液でN₂置換、遮光して-20℃で保存した。なお、この操作で放射活性の収率は80%以上であった。

9、 α -toc輸送活性の測定

リボソームから肝臓10,000xg沈殿画分への α -tocの膜間輸送を測定した。

1 アッセイ当たりのリボソームの組成は

eggPC / DCP / BHT / $[^3\text{H}]\alpha$ -toc(1.5Ci / mmol) / $[^{14}\text{C}]$ trioleate(52mCi / mmol)
=50nmol / 5nmol / 2.5nmol / 10000dpm / 5000dpm

これにラット肝臓10,000xg沈殿を500mg of proteinで加え、サンプルとSET bufferで全体の液量を1 mlにする。この混液を37℃で30minインキュベーションし、15000rpm, 10min遠心した上清を800mlとり、液体シンチレーターで放射活性を測定した。

なお、 α -toc輸送活性は以下の数式から算出した

$$\% \text{ of transfer} = \left(1 - \frac{{}^3\text{H}/{}^{14}\text{C after incubation}}{{}^3\text{H}/{}^{14}\text{C before incubation}} \right) \times 100 (\%)$$

<実験と結果>

1-1、ヒト α TTPのcDNAクローニング

プローブとしてラット α TTPのcDNAを用い、 λ gt11 human liver cDNA libraryからブラークハイブリダイゼーションを行なった。washは、85%以上のホモロジーで検出可能な条件で行なった。10万クローン当たり2,3個の確率で陽性クローンを得ることができたが、そのいずれもが開始コドンを含まなかったことから、5'末端に関しては5'-RACEを行ない、その結果全コーディング領域を含むcDNA配列を決定することができた(図4)。ヒト α TTPは278アミノ酸から成り、ラット α TTPとidentity 88.8%, similarity 94.2%のホモロジーがあった(図5)。従って、ラットとヒトにおいてほぼ同じ α TTPが存在し、同じ様な機能を担っていると考えられた。

1-2、ヒト α TTPの発現臓器について

cDNAをプローブにしてNorthernblottingを行なった結果、肝臓にのみ発現していることが明らかになった(図6)。この結果はラットと同様であり、 α TTPが肝臓における α -tocの選別に関わっている可能性が考えられた。mRNAのサイズは4.5kbと3.2kbに二本見られた。ラットの場合、3.2kbに一本だけ検出されたことから、ヒトではラットと異なりその非翻訳領域においてヘテロなカチで存在しているのではないかと考えられた。この点は今後の検討を要する。

10 20 30 40 50 60
 GCAGCAGCGCGCGCGGCATGGCAGAGCGCGGATCCAGCCCTCGGCGGGCGCGAGCT
 M A E A R S Q P S A G P Q L
 70 80 90 100 110 120
 CAACGCGCTACCGGACCACTCTCCGTGCTGCAGCGCGGCTGGCGGGCGCTCGCGGCGCG
 N A L P D H S P L L Q P G L A A L R R R
 130 140 150 160 170 180
 GGCCCGGGAAGCTGGCGTCCCGCTCGCGCGCTGCGCGCTCACCAGCTCCTTCTGTGCTGG
 A R E A G V P L A P L P L T D S F L L R
 190 200 210 220 230 240
 GTTCTGTGCGCGCGCGGATTTTCGATCTGGACCTGGCGCTGGCGGTTACTAAAAAATATTA
 F L R A R D F D L D L A W R L L K N Y Y
 250 260 270 280 290 300
 TAAGTGGAGAGCAGAATGTCCAGAAATAAGTGCAGATCTACACCTAGAAGTATTATTGG
 K W R A E C P E I S A D L H P R S I I G
 310 320 330 340 350 360
 CCTCTTAAAGGCTGGCTACCATGGAGTCTGAGATCCAGGATCCCACTGGCAGCAAGT
 L L K A G Y H G V L R S R D P T G S K V
 370 380 390 400 410 420
 TCTTATTACAGAATCGCACACTGGGACCCAAAGTTTTACAGCTTATGACGTATTTCG
 L I Y R I A H W D P K V F T A Y D V F R
 430 440 450 460 470 480
 AGTAAGTCTAATCACATCCGAGCTTATTGTACAGGAGGTAGAACTCAGCGGAATGGAAT
 V S L I T S E L I V Q E V E T Q R N G I
 490 500 510 520 530 540
 CAAGGCTATCTTTGATCTGGAAGGTTGGCAGTTTTCTCATGCTTTTCAAATCACTCCATC
 K A I F D L E G W Q F S H A F Q I T P S
 550 560 570 580 590 600
 CGTAGCCAAGAAAGATTGCTGCTGACTTACGGATTCTTCCATTGAAAGTTTCGTGGCAT
 V A K K I A A V L T D S F P L K V R G I
 610 620 630 640 650 660
 CCATTGTATAAATGAACAGTAATTTTCCATGCTGCTTTTCCATGATCAAAACCATTCCT
 H L I N E P V I F H A V F S M I K P F L
 670 680 690 700 710 720
 GACTGAAAAAATTAAGGAACGGATTACATGCATGGGAACAACACAAACAAGCTTGCT
 T E K I K E R I H M H G N N Y K Q S L L
 730 740 750 760 770 780
 TCAGCATTTCCAGACATTCTTCTCTGGAATATGGTGGTGAAGAATTCTCCATGGAGGA
 Q H F P D I L P L E Y G G E E F S M E D
 790 800 810 820 830 840
 CATTGTGAGGAATGGACAAATTTTATAATGAAGTCTGAAGATTATCTCAGCAGCATTTTC
 I C Q E W T N F I M K S E D Y L S S I S
 850 860 870 880 890 900
 TGAGAGCATTTCAATGAGAAGTTATGTCATGTGAATGGCTTCTTAATAAATAACATGAG
 E S I Q *
 910 920 930 940 950 960
 TGATATCCAACCTGGTTAAATGAATGAAAGAAAAGGAGCAAACTTTTAAACTAATGCTT
 970 980 990 1000 1010 1020
 GCCTGAACCTTTAAAAATGTAGAAATCTTCTGACATGAGCAACACAGGTGTTGGAAAAGAT
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 TTTTACTTTTTAAATGCTTTTTTCTCTACTTTTGAAGTAATTAATGTCAGTACATTTT
 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 AAGAGCATAAAAATCGGCGATTTTGTACTTGAAGAGAACATGAAAGTTATTGCTAAAGTA
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GCTGCTCATGTGCATCTTTGTATGTTTCTAGAAAGTTATATTTTAAACAAGTTCTCTGAT
 1210
 TAAATTGGTTTAGAAAA...

図4、ヒト α TTPのcDNA配列

<Human α TTP>	MAEaRSqPsaGpQLNaIPDHSPLLQPGLAaLRRRrE
<Rat α TTP>	---m-Pg-vv-k---eq-----V-----e-----q-
	aGVPlAPlPLTDSFLLRFLRARDFDLDLAWRLKKNYYKWRAECPEISADLHPRSIIIGLLK
	e---eT-q---A-----M-----L-----L---
	AGYHGVLRSRDPTGSKVLIYRIAhWDPKVFTAYDVFRVSLITSELIVQEVETQRNGIKAI
	-----R-----Sy-----V---
	FDLEGWQfSHAFQITPSVAKKIAAVLTDSFPLKVRGIHLINEPVIFHAVFSMIKPFLTEK
	-----i-----V-----
	IKeRIHMHGNNYKqSLLQHFPDILPLEYGGEefSMEDICQEWTFIMKSEDYLSSISESIQ
	--g--L-----s-----N-s-----T--

図5、ヒト α TTPのcDNAから予想されるアミノ酸配列とラット α TTPとの比較

同一のアミノ酸はハイフン(-)で、性質の似たアミノ酸は大文字で、性質の異なるアミノ酸は小文字で表している。分子全体でidentityが88.8%, similarityが94.2%である。

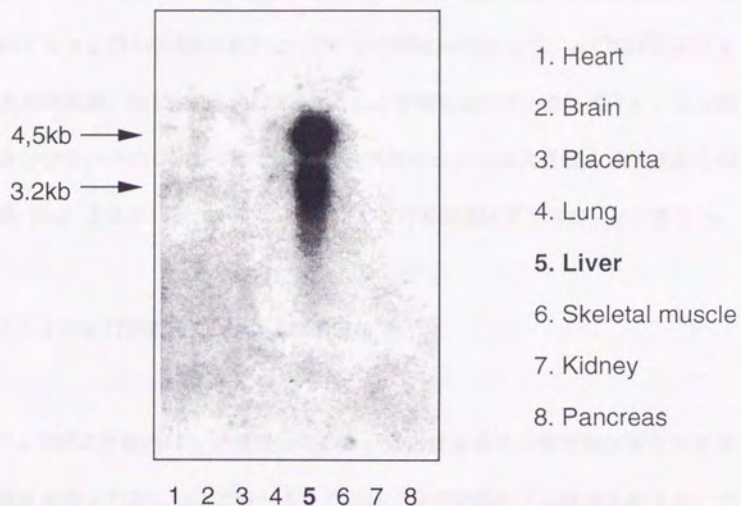


図 6、ヒト各臓器における α TTP の発現

ノザンブロッティング法によって α TTP の発現臓器について調べた。
各レーンには $2\mu\text{g}$ の poly(A)⁺ RNA がブロットされている。

1-3、ヒト α TTPのchromosomal localization

α TTP遺伝子のクロモソーム上の位置を決定するために、蛍光in situハイブリダイゼーション (FISH) を行なった。複製前中期型R-分染染色体標本に対してヒト α TTPのcDNAをプローブにして行なったところ、 α TTP遺伝子は8番染色体長腕、8q13.1-13.3に位置することが明らかになった(図7)。この結果は、フランスのグループが報告した先天性ビタミンE欠乏症の原因遺伝子の位置(8q)とほぼ一致したことから、 α TTPが原因遺伝子ではないかと考えた。

1-4、 α TTP遺伝子のゲノム構造解析

α TTPは肝臓内にしか発現していない蛋白質なので、先天性ビタミンE欠乏症患者の α TTPについて調べるためには、 α TTPのゲノム構造を明らかにする必要があった。human genomic DNA library (EMBL3)に対してブラークハイブリダイゼーションを行った結果、10万クローンから1クローンのpositiveを得た。インサートの配列を決定したところ、約9kbpの中に3つのエクソン(exons C,D,E)が含まれていた。さらに2つのエクソン(exons A,B)については、まずcDNAの配列をもとにプライマーをランダムに作り、ゲノムDNAに対してPCRを行ない、増幅されたプライマーの組み合わせから決定した。結果、 α TTP遺伝子は5つのエクソンから成ることが明らかになった(図8)。

1-5、先天性ビタミンE欠乏症患者の α TTP遺伝子からの変異の検出

変異の検出を試みるに当たり、とりあえず一番簡単な方法として RFLP(restriction fragment length polymorphism)を試みた。すなわち、患者および健常人の白血球から調製したゲノムDNAを適当な制限酵素で処理し、もし変異が制限部位に存在すれば切断断片の長さの違いとして検出できるという方法である。しかしながらこの方法では変異は検出されなかった。

そこで、次にSSCP法を試みた。すなわち、各エクソンをPCRで増幅し、変性して1本鎖にしたものを非変性条件下電気泳動を行なうと、1本鎖DNAの異なる高次構造の差が泳動距離の差に反映されるという方法である。この方法によって地中海沿岸の17家系を調べたところ、14家系から変異が検出された。そこで、そのエクソンについてdirect sequenceを行なった結果、3種類の変異が明らかとなり、そのいずれもがフレームシフト変異であった(表1)(図9)。

一方、日本にも1家系報告されていた(32)ので、この家系についても解析を行なった結果、地中海沿岸の家系とは異なり、エクソンB上の1塩基置換によるミスセンス変異(H101Q)であることが分かった。なお、この患者はある孤立地域の出身であったことから、さらにこの地域からランダムに抽出した800人について調べてみた。方法は、ちょうどこの変異がNcoIの切断部位の変異であったことから、PCRでエクソンBを増幅したものをNcoI処理を行なうことによって検出した。その結果、800人中21人がheterozygoteであることが明らかになった。

1-6、ミスセンス変異蛋白質 (H101Q) の活性測定

ミスセンス変異 (H101Q) は、101番目のヒスチジンがグルタミンに置き換わるだけであとは正常に翻訳されと考えられる。従って、H101Q変異が α -toc輸送活性に及ぼす影響について調べてみた (図10)。正常および変異蛋白質を動物細胞COS-7で一過性に発現したところ、両者はほぼ同じ量の蛋白質に翻訳されていた。しかしながら、変異蛋白質の α -toc輸送活性はほとんど失われていた。従って、101番目のヒスチジンが活性において重要な残基の1つであると考えられた。さらに、別の実験から α TTPの活性がヒスチジン修飾剤DEPC (diethylpyrocarbonate)によって一部阻害されることも確認している。

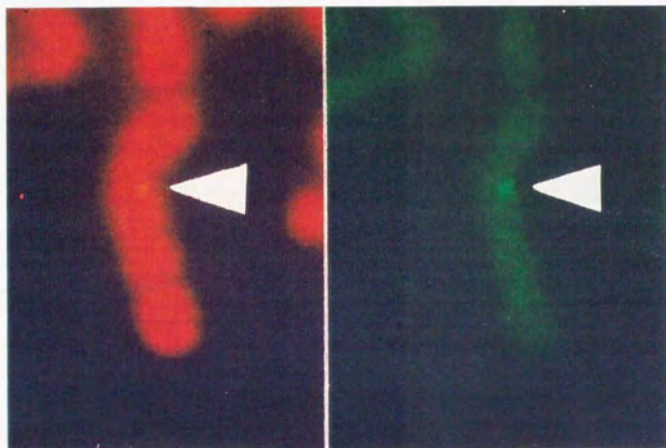


図 7、 α TTP遺伝子のchromosomal localization

蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）を行なった。
その結果、 α TTP遺伝子は 8 番染色体長腕上、8q13.1-13.3
に位置することが明らかになった。

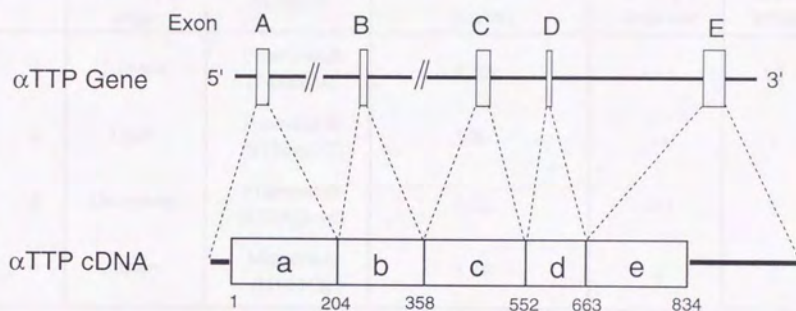


図 8、 α TTP遺伝子のエクソン-イントロン構造

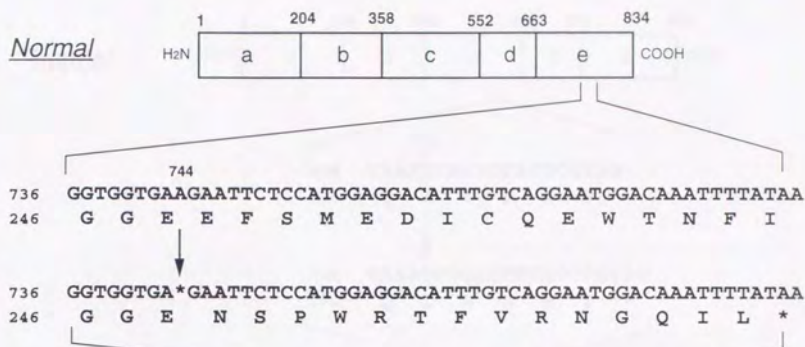
α TTPのコーディング領域はa, b, c, d, e 5つのエクソンから成る。

	Country of origin	Mutation	Serum vitamin E * ($\mu\text{g/ml}$)	Severity of disease	No. of families
1	Tunisia	Frameshift (744delA)	0.55	+++	12
2	USA	Frameshift (513insTC)	1.6	++	1
3	Germany	Frameshift (530AG->G)	0.52	+++	1
4	Japan	Missense (H101Q)	1.16	+	1

* : normal range 10-15 $\mu\text{g/ml}$

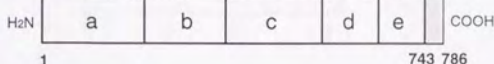
表1、先天性ビタミンE 欠乏症の家系における
 α TTPの変異と臨床データ

Normal

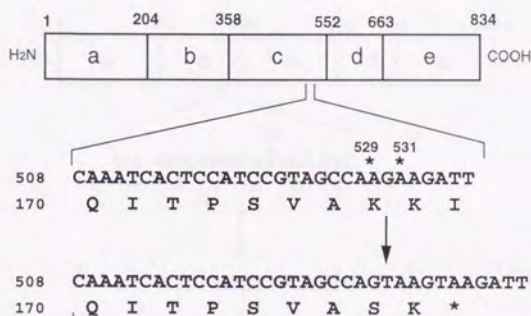


Patient

(North Africa)



Normal



Patient

(Germany)

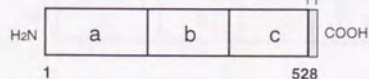
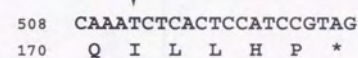
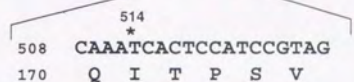
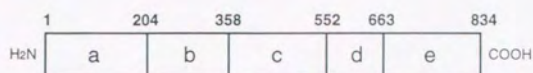
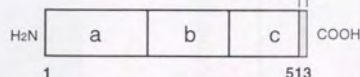


図9、先天性ビタミンE欠乏症患者から検出された
 α -TTP遺伝子上の変異 (その1)

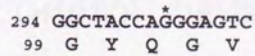
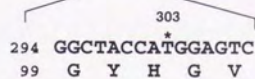
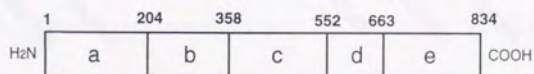
Normal



Patient
(U.S.A.)



Normal



Patient
(Japan)

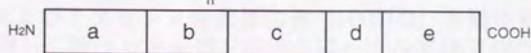


図9、先天性ビタミンE 欠乏症患者から検出された
 α TTP遺伝子上の変異 (その2)

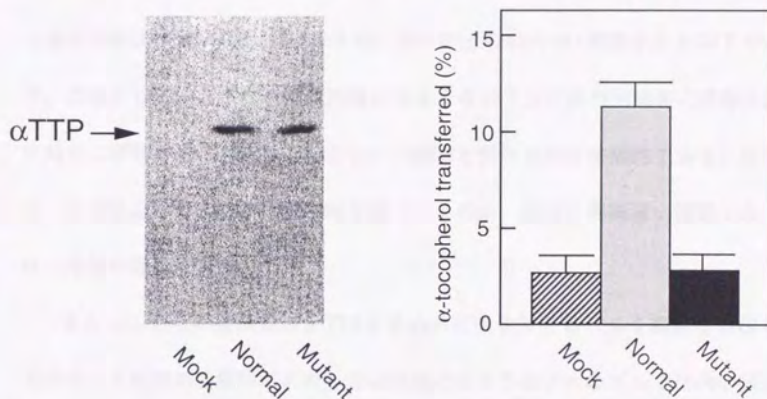


図10、変異蛋白質（H101Q）の動物細胞での発現

正常なヒト α TTP、およびミスセンス変異蛋白質（H101Q）を動物細胞COS-7で一過性に発現し、抗ラット α TTPポリクローナル抗体で検出した。

さらに発現細胞からcell lysateを調製し、それぞれの α -toc輸送活性を比較した。

<考察>

以上の結果から、 α TTPが先天性ビタミンE 欠乏症の原因遺伝子であることが明らかになった。なお、先天性ビタミンE 欠乏症の家系は我々の報告以後、現在までに新たに10家系が報告されている(42)。これらの患者の血中ビタミンE 値は健常人が10-15 μ g/mlであるのに対してその10分の1程度かそれ以下である。症状としては、多くの場合20歳にも満たないうちに歩行困難等の運動失調に陥り、脊髄後根の感覚神経節がとくに障害を受けるのが特徴的である。ビタミンE が欠乏するとなぜ感覚神経が侵されるのか、非常に興味深い問題であるが、今後の課題である。

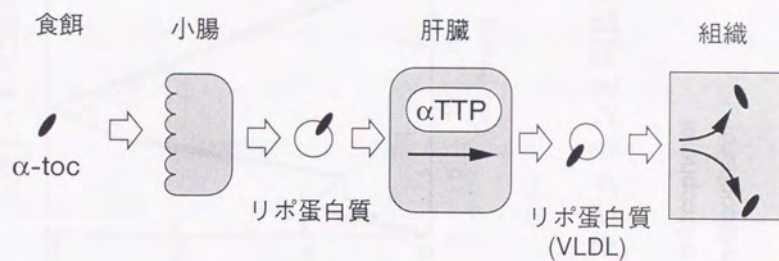
また、これらの結果から α TTPが体内のビタミンE レベルを調節する因子であることが初めて証明された。では一体どのようなメカニズムで体内のビタミンE レベルは調節されているのだろうか。最近、Kaydenらのグループによって健常人と患者におけるビタミンE の体内動態を比較した結果が報告されている(5) (図11)。それによると、ビタミンE は他の脂質と同様に小腸から吸収され、リポ蛋白質に結合してリンパ管に現れる。このリポ蛋白質は血液中で代謝され、一部のビタミンE は組織にとりこまれるが、残りはリポ蛋白質とともに肝臓に取り込まれる。しかし、肝臓に取り込まれたビタミンE は肝臓から新たに分泌される超低密度リポ蛋白質(VLDL)に結合して再び体内を循環する。すなわち、ビタミンE は肝臓を介してリサイクリングしているということになる。なお、1日あたり体内のビタミンE のおよそ5分の4以上がこのようなリサイクリングを繰り返していると考えられている(43)。一方 α TTPが欠損している

ビタミンE欠乏症の患者では、一旦小腸から吸収されても肝臓からの再循環が起こらず、その結果ビタミンEが体内に保持されない。

また、ビタミンE欠乏症の患者は α -tocを選別する能力も失っている。すなわち、 α -tocと γ -tocの血中濃度推移を比較すると（図12）、健常人では α -toc、 γ -toc共に一過性に血中濃度が上昇し、その後 α -tocはかなりが維持されていくが、一方の γ -tocは速やかに消失する。一方、患者では γ -toc同様に α -tocもすみやかに血中から消失した。すなわち α TTPは α -tocを選別する因子そのものであり、患者はこの選別能を失ったとも言える。

以上のことから、 α TTPの機能は一旦肝臓に取り込まれたビタミンE同族体のうち α -tocだけを選別し、これを再び血液中へ放出することであると考えられた。そうすると α TTPは体内を循環するビタミンE（ α -toc）レベルの律速、すなわち肝臓内で α TTPに結合できたものだけが再び体内を循環することができるといことになるだろう。もしかすると α TTPの発現レベルを変化させたりあるいは活性を修飾することによって体内のビタミンEレベルを調節するしくみを生体は兼ね備えているのかもしれない。このような調節機構を明らかにしていくことも今後の課題である。

健常人



ビタミンE 欠乏症

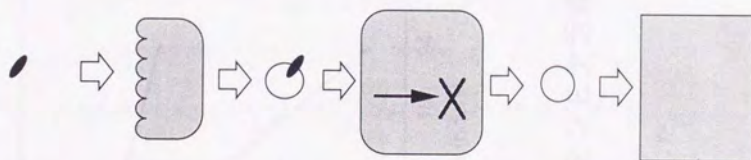


図11、健常人と先天性ビタミンE 欠乏症患者の
ビタミンE の体内動態の比較

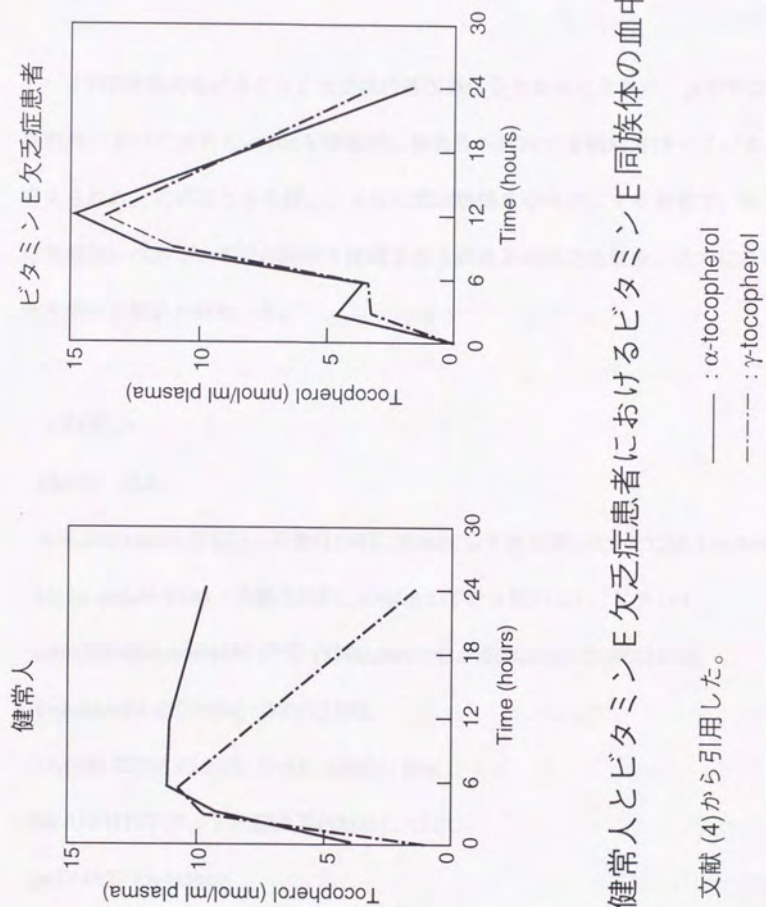


図12、健康人とビタミンE欠乏症患者におけるビタミンE同族体の血中濃度推移

文献 (4) から引用した。

第2章 α TTPによる α -tocopherolの細胞外への 放出機構についての解析

α TTPが先天性ビタミンE欠乏症の原因遺伝子であることから、 α TTPは肝細胞内にとりこまれた α -tocを積極的に細胞外へ放出する機能を持っていると考えられた。このことを実証し、さらに放出機構を明らかにする目的で、私は培養細胞レベルで α TTPの機能を評価できる実験系の確立を試み、さらにこの系を用いた解析を行なった。

<材料>

DMEM : 日水

fetal calf serum (FCS) (非働化(56°C, 30min)してから用いた) : CSL Limited

horse serum (HS) (非働化(56°C, 30min)してから用いた) : ニチレイ

penicillin/streptomycin (P/S) (5000units/ml, 5000 μ g/ml) : GIBCO BRL

L-glutamine (200mM) : GIBCO BRL

Trypsin-EDTA (0.25%, 1mM) : GIBCO BRL

McARH7777(ラット肝癌由来細胞株) : ATCC

pcDNA3 : Invitrogen

d- γ -tocopherol : (株) エーザイから御供与いただいた

[14 C] paraformaldehyde (50mCi/mmol) : Amersham (特注)

[14 C] oleic acid (50mCi/mmol) : Amersham

リン脂質 : Avanti Polar Lipids

その他試薬類 : 和光純薬、シグマなど

<方法>

1、細胞の培養

McARH7777細胞はDMEMに10%FCS, 10% HS, 100units/ml penicillin, 100μg/ml streptomycin, 2mM L-glutamineを加えた培地で培養した。

培養容器はコラーゲンコートしたものを用いた。Lipoprotein deficient serum (LPDS)(d>1.21g/ml)は文献(44)に従って調製した。

2、 α TTPを発現する細胞の樹立

細胞はラット肝癌由来細胞株のMcARH7777、そして動物細胞用発現ベクターはpcDNA3(Invitrogen)を用いた。ラット α TTPのcDNAのコーディング領域を組み込んだ発現ベクター(pcDNA3-TTP)を作製し、エレクトロポレーションによってMcARH7777細胞にpcDNA3-TTPを導入した。なおエレクトロポレーションにはGene Pulser (BIO-RAD)を用いた。条件は 1×10^7 cells/mlの濃度でPBSにsuspendした細胞懸濁液(0.45ml)に対してpcDNA-TTP (30μg)を加え、氷上で10min放置した後、0.2cmのキューベツトで300V, 960μFDの電気ショックを与えた。さらに氷上で10min放置した後、無血清DMEM(P/S(-)) (1ml)を加え、

室温で10min放置した後に ϕ 10cm dishに播いた。翌日培地を交換し、transfection後60-72 h培養した時点で選択培地に換えた。G418 (600 μ g/ml)に対して耐性になった細胞のコロニーは選択培地に換えてから10日を過ぎたあたりから観察され、これらのコロニーを単離して、さらにimmunoblottingによって α TTPを発現しているクローンを選択した。全部で5クローン単離したが、代表して1クローン(McA-TTP21)を以下の実験で用いた。

3、 $[^{14}\text{C}]$ α -tocopherol acetate(tocAc)の合成 (45)

まず、d- γ -tocopherol (72mg, 0.17mmol) と $[^{14}\text{C}]$ paraformaldehyde (12.5mCi, 50mCi/mmol), boric acid (13mg, 0.2mmol), acetic acid (1 drop) を 0.6mlトルエン中混合し、 N_2 ガス存在下110 $^\circ\text{C}$, 3h攪拌しながら反応する。反応液を放冷した後、10mlのトルエンを加え、mQ(10ml)で4回洗う。続いてこの反応液にacetic acid (0.8ml), concHCl (1.2ml), zinc dust (0.13g)を加え、室温で3h攪拌しながら反応する。反応終了後、mQ (10ml)で2回、5% NaHCO_3 (10ml)で2回、mQ (10ml)で2回、順次洗い、 Na_2SO_4 で乾燥する。 CHCl_3 でTLC展開を行い、 α -tocの部分をかきとり、酢酸エチルで抽出し、最終的にエタノール溶液にした。この時点で5-methyl $[^{14}\text{C}]$ α -tocopherolになっており、放射能の収率は20%だった。

次に、5-methyl $[^{14}\text{C}]$ α -toc(0.77mg, 100 μ Ci)に対して無水酢酸(6.0mg), N,N-dimethylaminopyridine (DMAP) (3.5mg)を0.9mlの蒸留 CHCl_3 中混合し、

50°C, overnightで反応する。反応終了後、MeOH (0.85ml), 0.1N HCl (0.75ml)を加えて攪拌し、下層を回収し、Na₂SO₄で乾燥する。CHCl₃でTLC展開を行い、バイオイメージアナライザー(FUJI FILM)で露光して、tocAcの部分をかきとり、酢酸エチルで抽出して最終的にはCHCl₃溶液にした。この操作での収率は約20%で、最終的に[¹⁴C]α-tocopherol acetate (50mCi/mmol)を500μCi調製することができた。

4、リポソームの調製

[¹⁴C]tocAcを細胞に取り込ませるために、[¹⁴C]tocAcを含むmulti lamellar liposomeを調製した。なお、リポソームの組成は

PC/PS/DCP/Chol/[¹⁴C]tocAc = 50/50/10/75/2 nmol/well (0.05 μCi/well)

これら脂質のCHCl₃溶液をロータリーエバポレーターでとばしてlipid filmにしたものに0.3M glucose溶液を加えてvortex, sonicしてリポソーム懸濁液を調製した。

5、[¹⁴C]oleate-BSAの調製

[¹⁴C]oleate(10μCi)をとり、N₂ガスで溶媒をとばした後、3%BSA-DMEMを0.8ml加え、37°Cで攪拌する。透明になったらOKである。これで20well分になる。

6、脂質の抽出および分析

培地および細胞からの脂質の抽出はヘキサン抽出で行なった。プレートに付着した細胞をPBSで2回洗浄後、0.1mlの0.1% SDS, 6% pyrogallolを加え、さらにmQを0.4ml加えてよくsuspendする。この細胞懸濁液を1mlの6% pyrogallol in EtOHに加え、さらに1.5mlの65% EtOHを加え、ここに3mlのヘキサンを加えた後、激しく攪拌した後遠心(3000 rpm, 5min)し、上層(ヘキサン層)を回収した。エバポレーターでヘキサンをとばした後、残査を酢酸エチルにとかしてTLCプレートにアブライした。

展開溶媒：ヘキサン／ジエチルエーテル／酢酸 = 55／45／1

この展開系でtocAc, toc, CE, TG, FFA, Chol, DGの分離を行った。各脂質の放射活性はバイオイメージアナライザーで検出した。

7、細胞にとりこまれた α -tocの細胞外への放出のアッセイ

細胞は 5×10^4 cells / cm^2 の密度で24well collagen coated plateにまいた。翌日、培地をDMEM, 13% LPDSに交換し、この培養系(0.5ml)に対して $[^3\text{H}]\text{tocAc}$ を含むリポソーム($0.05 \mu\text{Ci} / \text{well}$)、および $[^3\text{H}]\text{oleate-BSA}$ ($0.5 \mu\text{Ci} / \text{well}$)を加えた。各種薬剤はリポソーム添加5分前にエタノール溶液で100分の1を越えないようにして加えた。一定時間培養後、細胞より脂質を抽出し、TLCで展開した。各脂質の放射活性はスポットをかきとって液体シンチレーションカウンター

で測定した。

なお、 α -tocの放出は以下の数式から算出した

$$\alpha\text{-toc secreted (\%)} = \frac{[^{14}\text{C}]\alpha\text{-toc in medium}}{[^{14}\text{C}]\alpha\text{-toc in cell} + [^{14}\text{C}]\alpha\text{-toc in medium}} \times 100 (\%)$$

<実験と結果>

2-1、 α TTPを発現する細胞の樹立

α TTPは肝臓に特異的に発現している蛋白質である。しかも、臓器としての肝細胞に特異的であり、肝細胞を初代培養に移すと速やかに消失することが分かっていた(46)。

McARH7777細胞はラット肝癌由来の細胞株であり、多くの肝機能を保持していることからリボ蛋白質代謝の研究などによく使われる細胞株である(47-49)。しかしながら、McARH7777細胞には α TTPがほとんど発現していなかった。そこで私はcDNAをトランスフェクトすることによって α TTPを恒常的に発現した細胞(McA-TTP)を樹立した(図13)。なお、この細胞の α TTPの発現レベルは肝実質細胞とほぼ同等であった。

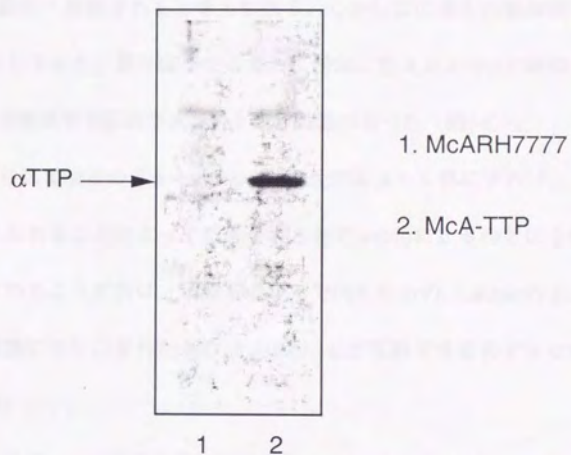


図13、 α TTP発現細胞 (McA-TTP) の樹立

McARH7777細胞にcDNAをトランスフェクトすることによって
 α TTPを恒常的に発現する細胞株 (McA-TTP) を樹立した。
 α TTPの発現は抗 α TTPポリクローナル抗体で検出した。

2-2、細胞に取り込まれた α -tocの細胞外への放出をアッセイする系の確立

肝細胞はリポ蛋白質に結合した α -tocを細胞内に取り込み、取り込まれた α -tocは再び細胞外へ放出されると考えられる。しかしこの事を培養細胞レベルで再現しようとする、取り込ませるために培地に加えた α -tocと細胞が放出した α -tocとが培地中で区別できないという問題があった(図14)。

私は、取り込ませるのを α -tocでなく α -tocのエステル体にすれば、これが細胞に取り込まれることによって加水分解されて α -tocになるのではないかと考えた。すなわちこうすれば、培養系のなかで加えたもの(α -tocのエステル体)と一旦細胞にとりこまれたもの(α -toc)とが区別できるのではないかと考えた(図15)。

そこで、早速 α -tocのエステル体である α -tocopherolacetate(tocAc)の ^{14}C ラベルを合成し、細胞の培養系に加えてみた。なお、加える方法としては、tocAcを含むリボソームを調製し、これを培地に加えた。すると、加えたtocAcは培地だけでは何の変化もないのに対して、細胞があると経時的に加水分解されて α -tocになった(図16)。すなわちtocAcは細胞によって加水分解されて α -tocになることが確認された。さらに分解された α -tocは細胞内だけでなく細胞外からも検出されたことから、この細胞外の α -tocは一旦細胞内に取り込まれた後に細胞外へ放出されたものを反映しているのではないかと考えられた。

2-3、 α TTP依存的な α -tocの細胞外への放出

そこで、次に α TTPを発現した細胞であるMcA-TTPと α TTPを発現していない親株それぞれの培養系にtocAcを加えてみた。すると、加えたtocAcはそれぞれの細胞ではほぼ同程度に加水分解されて α -tocになっていたが、この α -tocが細胞内および細胞外にそれぞれどれだけ存在しているのかを調べたところ、

α TTPを発現していない細胞ではその約7割が細胞内に存在していたのに対して、 α TTPを発現した細胞では2割しか細胞内にとどまらず残りの8割は細胞外に存在していた（図17）。この結果は α TTPを発現すると細胞内に取り込まれた α -tocの細胞外への放出が促進された結果であると解釈された。では一体この放出はどのような機構によるものなのだろうか。

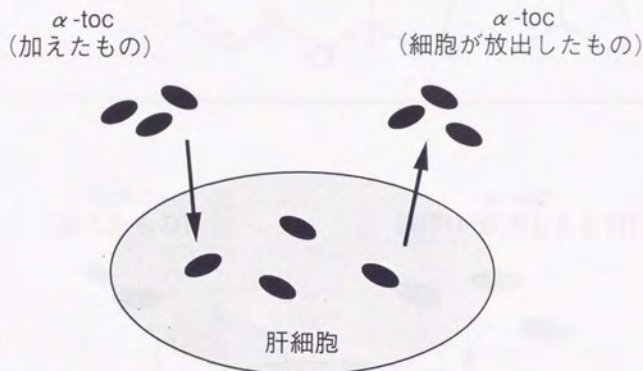


図14、培養細胞レベルで α TTPの機能をアッセイする上での問題点

α TTPは細胞内に取り込まれた α -tocを細胞外へ放出する機能をもつことが遺伝病の解析から示唆された。
しかし、この事を培養細胞レベルで再現しようとするすると培地に加えた α -tocと、一旦細胞内に取り込まれてから新たに培地中に分泌された α -tocとが区別できないという問題があった。

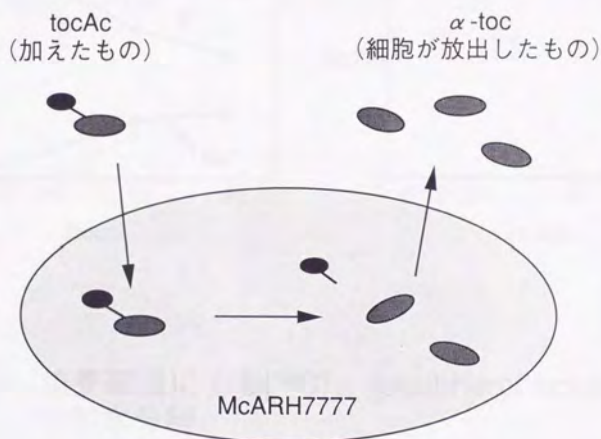
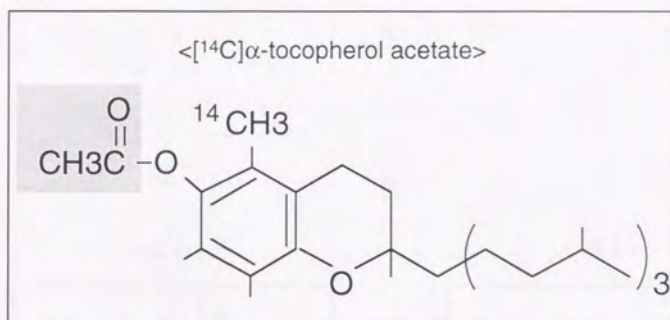


図15、培養細胞からのα-tocの放出をアッセイする系の確立

細胞の培養系にtocAcを含みリポソームを加えると、細胞内に取り込まれる。取り込まれたtocAcは細胞内で加水分解されてα-tocになる。細胞内で生じたα-tocは細胞内および細胞外から検出され、このうち細胞外のα-tocが細胞から放出されたα-tocを反映している。すなわちこの系では、加えたtocAcと細胞が放出したα-tocが同じ培地中で区別することができる。

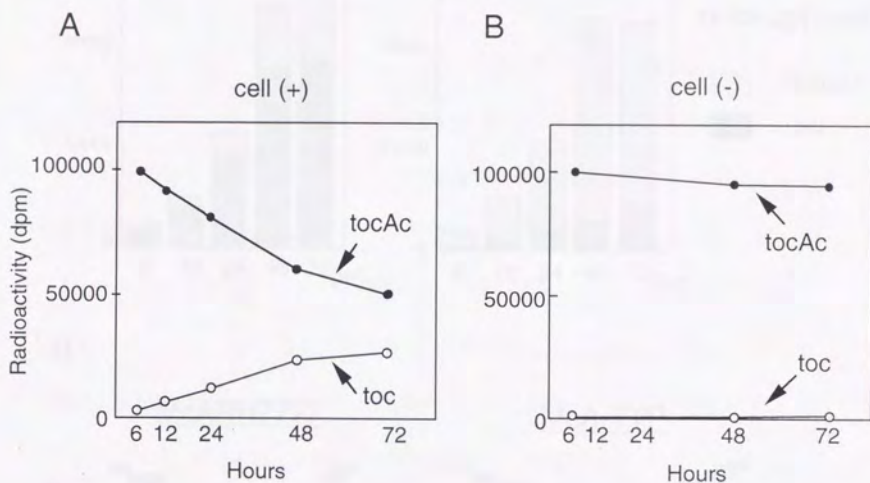
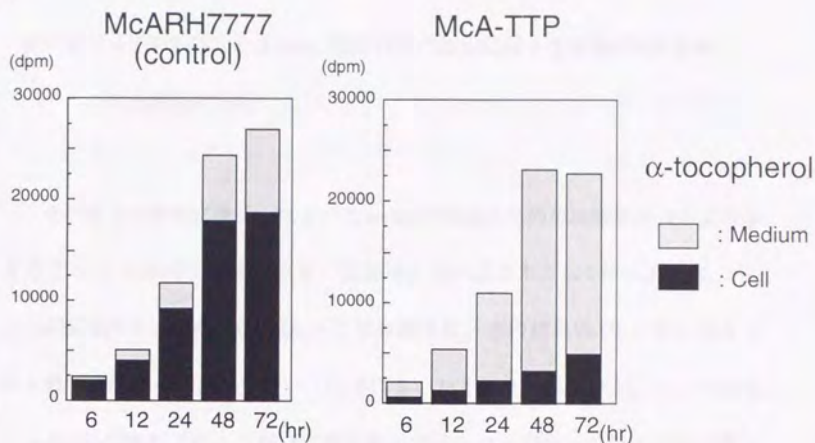


図16、培養細胞による $[^{14}\text{C}]$ α -tocopherol acetateの加水分解

リポソーム($[^{14}\text{C}]$ tocAc, $0.05\mu\text{Ci}$ を含む)をMcARH7777細胞の培養系(2×10^5 cells/ml, 0.5ml)(A)、および培地のみ(B)に加え、一定時間培養後細胞および培地から脂質を抽出し、 α tocおよびtocAc画分の放射活性を測定した。

A



B

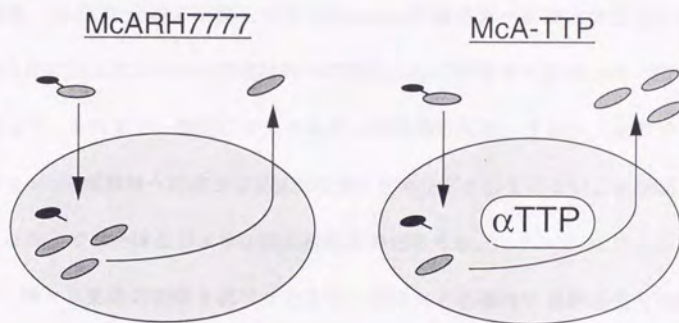


図17、 α TTP依存的に細胞内の α -tocは細胞外へ放出される

McARH7777およびMcA-TTP (2×10^5 cells/ml, 0.5ml)に対してリポソーム ($[^{14}\text{C}]\text{tocAc}$, 0.05 μCi を含む)を与え、一定時間培養後細胞および培地から脂質を抽出し、 α -toc画分の放射活性を測定した。
この結果(A)から細胞内に取り込まれた α -tocは一部細胞外へ放出されるが、 α TTP依存的に細胞外への放出が促進されていると考えられた(B)。

2-4、 α TTP依存的な α -tocの細胞外への放出に対する各種薬物の効果

(放出経路の解析)

それまで一般的に考えられていた α -tocの細胞外への放出機構は次のようなものだった(図18)。すなわち、細胞内に取り込まれて α TTPに結合した α -tocは細胞内で α TTPからVLDLへと受け渡され、その結果VLDLと共にゴルジ体を経て細胞外へ放出されていくのではないかと考えられていた。そこで本当に α -tocの放出がこのようなりボ蛋白質の分泌とカップルしているのかを調べる目的で、ゴルジ体を消失させる薬物であるBrefeldinAの効果を試した。その結果、VLDLの分泌の指標となるtriglycerideの細胞外への放出は完全に抑えられたのに対して、 α -tocの細胞外への放出は全く影響されなかった(図19)。従って、それまで一般的に考えられていた仮説は間違っており、 α -TTPを介する α -tocの細胞外への放出はVLDLの分泌とカップルしていないことが明らかになった。では一体どのような放出経路なのだろうか。

様々な薬物の効果を調べたところ、ほとんどの薬物に効果が見られない中で、25-OH cholesterolおよびchloroquineによって有意に抑制されることを見いだした(図20)。25-OH cholesterolはコレステロール代謝の調節作用があることが知られている薬物である。この物質を細胞に作用させたところtriglycerideの分泌は全く影響されないにも関わらず α -tocの細胞外への放出は完全ではないまでも有意に抑制された(図21)。なお、25-OH cholesterolが α TTPに対して直接的に作用しないことが確認できたことから、 α TTPによる α

-tocの細胞外への放出の少なくとも一部には25-OH cholesterolによって制御される新たな脂質輸送系が介在していることが示唆された。一方、chloroquineは細胞内の酸性コンパートメントを中和することが知られている薬物である。しかしながら、細胞内の酸性コンパートメント形成に必要なV-type ATPaseの阻害剤であるBafilomycinA1の効果がなかったことから考えるとchloroquineの作用点は謎である。今後の検討を要する。

2-5、25-OH cholesterolによる阻害効果についての解析

ではこの25-OH cholesterolの作用はどのような機構によるものなのだろうか。まず、25-OH cholesterolの濃度を振ってみたところ、2.5 μ g/mlあたりで α -tocの放出は約半分に抑えられ、さらに高濃度にしてもそれ以上は抑えられなかった(図22)。なお、 α TTPを発現していない親株細胞からの α -tocの放出も25-OH cholesterolによって一部抑制された(data not shown)。この結果から、 α TTPによって促進された α -tocの放出経路は、25-OH cholesterol感受性な部分と非感受性な部分があると考えられた。

先ほども述べたように25-OH cholesterolは細胞内コレステロール代謝を調節する作用があることが知られている(図23)。具体的にはHMG CoA reductase, HMG CoA synthase, farnesyl-2P synthase等のコレステロール生合成系の酵素やLDL receptorの不活性化、ならびにACAT活性化を引き起こし、そのいずれもが細胞内遊離コレステロールが減少する方向へはたらく。しかし、

その作用機構はほとんど分かっていない。最近、細胞質に結合蛋白質 (oxysterol binding protein, OSBP) が存在し、この蛋白質は 25-OH cholesterol が結合するとゴルジ体へ移行することが報告された(50)。さらに BrefeldinA 処理によってゴルジ体を消失させると 25-OH cholesterol の効果がなくなることが報告された(51)。

そこで私は α -toc の放出の抑制効果も OSBP を介したもののなかを調べる目的で、まず 25-OH cholesterol の効果に対する BrefeldinA の効果を調べてみた。その結果、25-OH cholesterol によって抑制されていた α -toc の放出が BrefeldinA によって完全に回復することが分かった (図24)。すなわちこの結果から 25-OH cholesterol の効果が単なる細胞毒性ではない事、さらに OSBP を介している事が強く示唆された。

また、25-OH cholesterol 以外のステロイド化合物の α -toc の放出に対する効果も検討した。その結果、阻害効果の強さは 25-OH cholesterol > 20-OH cholesterol > 7-keto cholesterol の順で、この傾向は OSBP に対するアフィニティーの強さ(52)と平行であった (図25)。さらに各ステロイドの IC₅₀ 値を求める必要があるが、この結果からも α -toc の放出に対する抑制効果が OSBP を介したものであることが示唆された。

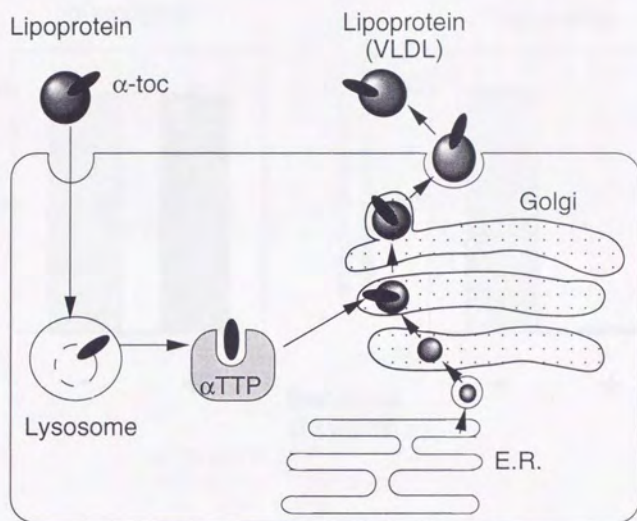


図18、それまで考えられていた α TTPによる α -tocの細胞外への放出経路についての仮説

細胞内で α TTPに結合した α -tocは細胞内でリポ蛋白質VLDLに受け渡されと考えられていた。

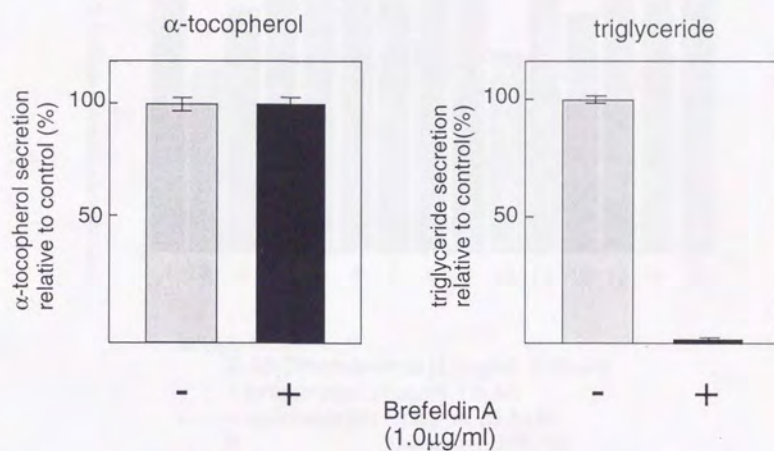
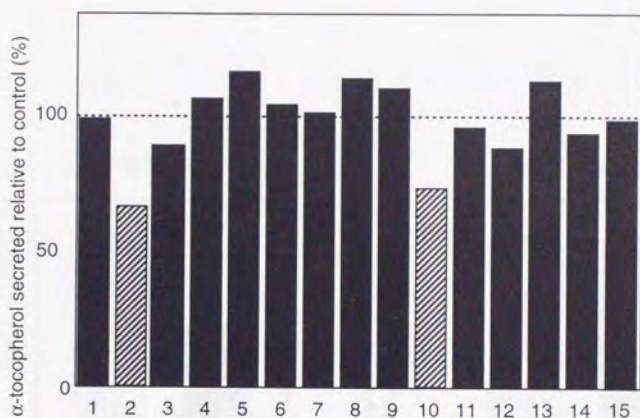


図19、 α TTP依存的な α -tocの細胞外への放出に対する BrefeldinAの効果

BrefeldinA(1.0μg/ml)存在下、McA-TTP (2×10^5 cells/ml, 0.5ml)に対してリボソーム($[^{14}\text{C}]$ tocAc, 0.05μCiを含む) および $[^{14}\text{C}]$ oleate-BSA (0.5μCi)を与え、24時間培養後各画分の放射活性を測定した。



- lane.1 control
 2 25-OH cholesterol (2.5μg/ml, 6.25μM)
 3 tunicamycin (10μg/ml, 12μM)
 4 cycloheximide (10μg/ml, 35.5μM)
 5 (100μg/ml, 355μM)
 6 monensin (5μM)
 7 bafilomycinA1 (100nM)
 8 ilimaquinone (25μM)
 9 PMA (1μM)
 10 chloroquine (100μM)
 11 wortmannin (1μM)
 12 calphostinC (1.25μM)
 13 nocodazole (10μg/ml, 33μM)
 14 YM17E (ACAT inhibitor) (1μM)
 15 Brefeldin A (1μg/ml)

図20、 α TTP依存的な α -tocの細胞外への放出に対する各種薬物の効果

各種薬物の存在下、McA-TTP (2×10^5 cells/ml, 0.5ml) に対してリボソーム ($[^{14}\text{C}]\text{tocAc}$, 0.05μCiを含む) を与え、8時間培養後各画分の放射活性を測定した。

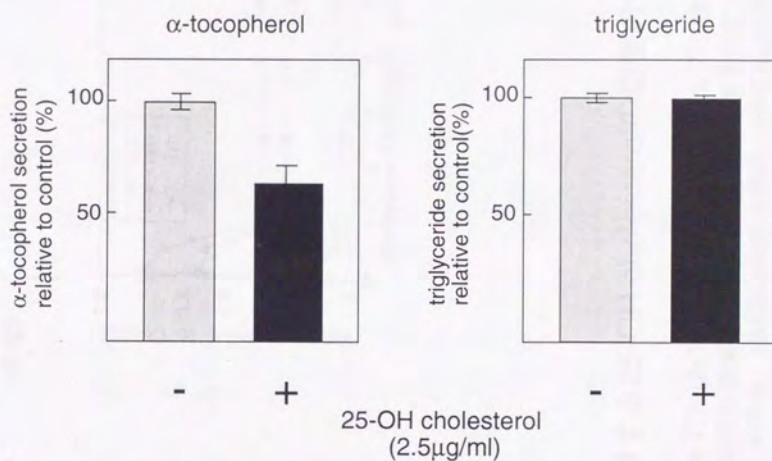
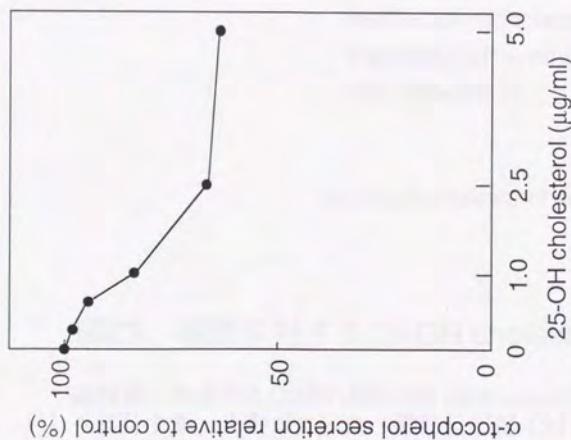


図21、 α TTP依存的な α -tocの細胞外への放出に対する 25-OH cholesterolの効果

25-OH cholesterol (2.5 μg/ml)存在下、McA-TTP (2×10^5 cells/ml, 0.5ml)に対してリボソーム($[^{14}\text{C}]\text{tocAc}$, 0.05 μCiを含む) および $[^{14}\text{C}]\text{oleate-BSA}$ (0.5 μCi)を与え、24時間培養後各画分の放射活性を測定した。



(参考)

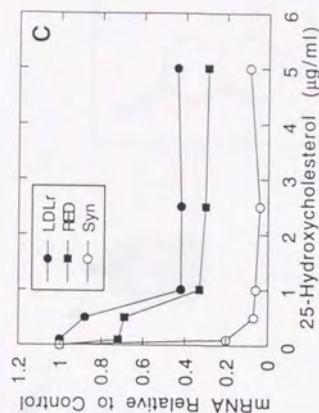


図22、 α -tocの細胞外への放出に対する25-OH cholesterolの阻害の容量曲線

各濃度の25-OH cholesterol存在下、McA-TTP (2×10^5 cells/ml, 0.5ml)に対してリポソーム ($[^{14}\text{C}]\text{tocAc}$, 0.05 μCi を含む)を与え、24時間培養後に α -toc画分の放射活性を測定した。なお、参考としてCHO細胞におけるLDL受容体、HMGCoA還元酵素、HMGCoA合成酵素の転写レベルに対する25-OH cholesterolの効果のデータを引用した(58)。

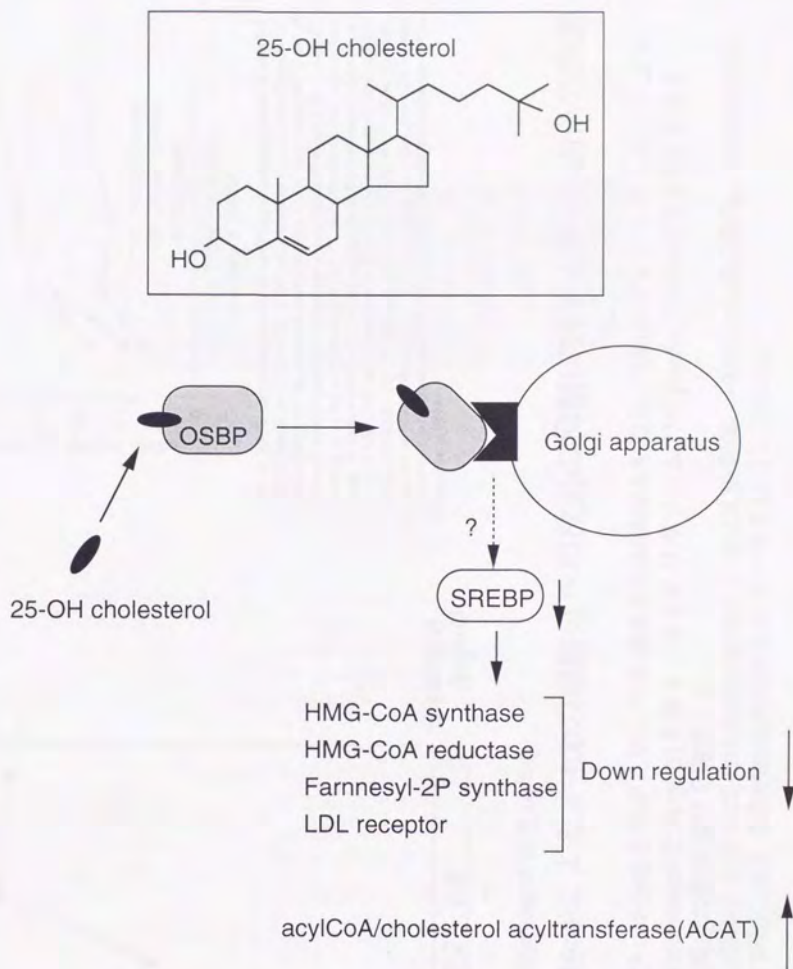


図23、細胞に対する25-OH cholesterolの作用機構

細胞質に存在するOSBPは25-OH cholesterolが結合するとゴルジ体へ移行する。このゴルジ体への移行が25-OH cholesterolの作用にとって必須である。

(参考)

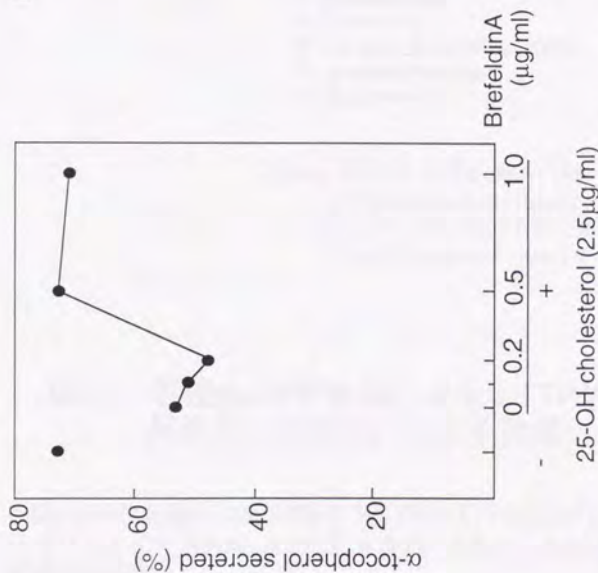


図24、25-OH cholesterolによる α -tocの細胞外への放出の抑制に対するBrefeldinAの効果

まず、McA-TTP (2×10^5 cells/ml, 0.5ml)に対して各濃度のBrefeldinAを加え、15minプレインキュベーションした。続いて25-OH cholesterol (2.5 μ g/ml)を加え、さらにリポソーム($[^{14}\text{C}]\text{tocAc}$, 0.05 μ Ciを含む)を与え、24時間培養後に α -toc画分の放射活性を測定した。
なお、参考としてCHO細胞における25-OH cholesterolによるLDL受容体、HMGCoA還元酵素、HMGCoA合成酵素の転写レベルの抑制に対するBrefeldinAの効果のデータを引用した(51)。

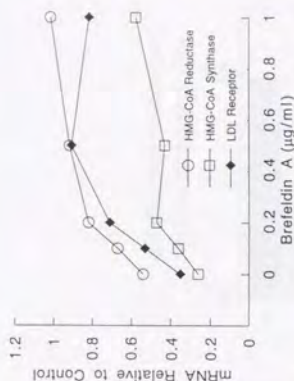
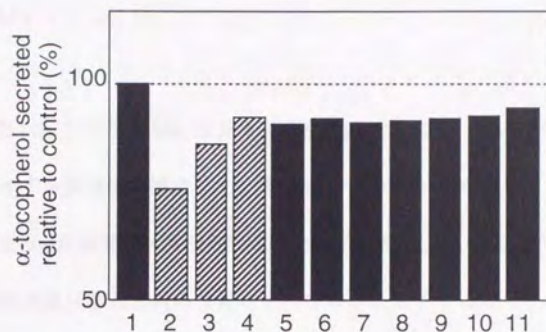


FIG. 1. 25-Hydroxycholesterol-mediated suppression of mRNA in BFA-treated CHO cells. CHO cells were cultured in medium B for 18–24 h prior to the start of experiments. Cells then received 6 ml of medium B containing the indicated concentrations of BFA (0–2 μ g/ml). Following a 15-min incubation at 37 $^{\circ}$ C, new medium was added containing 25-hydroxycholesterol (2.5 μ g/ml) and the indicated concentrations of BFA. Cells were incubated for 4 h and harvested, and mRNA was quantitated. The results are expressed relative to values for cells grown in medium B without additions and are the average of two separate experiments normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA.



- lane.1 control
 2 25-OH cholesterol (2.5μg/ml, 6.25μM)
 3 20-OH cholesterol
 4 7-keto cholesterol
 5 pregnenolone
 6 progesterone
 7 testosterone
 8 β-estradiol
 9 cholecalciferol (VitaminD3)
 10 dexamethasone
 11 β-sitosterol

(参考) OSBPに対するaffinity (52)
 25-OH cholesterol: $K_d=0.03$ (μM)
 20-OH cholesterol: $K_d=0.06$
 7-keto cholesterol : $K_d=1.4$

図25、各種sterol化合物による α TTP依存的な α -tocの細胞外への放出に対する効果

各種sterol化合物 (6.25μM)存在下、McA-TTP (2×10^5 cells/ml, 0.5ml)に対してリボソーム($[^{14}\text{C}]\text{tocAc}$, 0.05μCiを含む)を与え、24時間培養後 α -toc画分の放射活性を測定した。

<考察>

以上私は α TTP 依存的に変化する細胞機能として α -tocの細胞外への放出をアッセイする実験系を確立した。すなわちこのアッセイ系で α TTP 依存的に細胞内の α -tocが細胞外へ放出されることが示された。さらに、この α -tocの細胞外への放出はリポ蛋白質の分泌とカップルしたものではなく、むしろOSBPを介して25-OH cholesterolによって一部抑制されるような新たな脂質輸送系が介在していることが示唆されてきた(図26)。このような輸送系について過去の文献を調べてみたところ、小胞体で生合成されたコレステロールがゴルジ体を介さない経路で形質膜へ輸送される事(53-56)、およびcis-, medial-ゴルジ体で生合成されるスフィンゴミエリンがゴルジ体を介さない経路で形質膜へ輸送される事(57)などが報告されていた。これらの脂質はエネルギー依存的でかつ温度依存的な輸送小胞によって輸送されていると考えられているが、これら輸送小胞の実体については全く分かっていない。一方、25-OH cholesterol処理によってこれらの脂質の生合成レベルなどが大きく変化すること($\text{Chol} \downarrow, \text{SM} \uparrow$)(58)から考えると、1つの可能性としてOSBPを介してこのような輸送小胞がコントロールされ、その結果として α -tocの放出が抑制されたと考えられる。さらに最近、25-OH cholesterolの作用にはSREBPの不活性化が介在していることが報告され(59)、これはERのコレステロール量が増加した結果ではないかと考えられる。ACATが見かけ上活性化されるのもERに存在する本酵素に対して基質となるコレステロールが多く供給されるためだと考えられる。すなわち、

OSBPを介する25-OH cholesterolの作用点はコレステロールのERから形質膜への輸送を阻害していると考えれば全て説明できる。するともしかしたら α TTPによる α -toc輸送のターゲットはコレステロール輸送小胞かもしれない。あくまでこれらは現時点での私の仮説に過ぎないが、今後 α TTPとOSBPとを手がかりにこのような新たな輸送小胞の実体が明らかになるのではないかと期待している。

また、今回データは示していないが、細胞から放出された α -tocは細胞外でどのように存在しているのか調べた。密度勾配遠心によって培地を分画したところ、細胞から放出された α -tocは蛋白質画分($d > 1.21$)およびHDL画分($1.063 < d < 1.21$)にほとんどが存在しており、ごく一部がVLDL画分($d < 1.006$)に存在していた。in vivoのデータから考えると、最終的にはVLDLに受け渡されることになるが、もしかしたらその前に何らかの蛋白質カリボ蛋白質が介在しているのかもしれない。最近血清中のリン脂質輸送蛋白質がリボ蛋白質間で α -tocを輸送する活性をもつことが報告された(60)。このような可能性を含めた今後の検討が必要である。

あと気になった点としては、 α -tocと常に挙動を共にする脂質が存在した点である。TLCの位置から考えておそらくdiacylglycerol(DG)だと思われる。DGの細胞外への放出はBrefeldin Aで阻害されず、25-OH cholesterolによって合成が低下すると同時に細胞外への放出もなくなり、しかも培地中では主にHDL画分に存在していた。DGが細胞外へ放出されるという報告ですらかつてなされていない事であり、これは大変興味深い現象である。

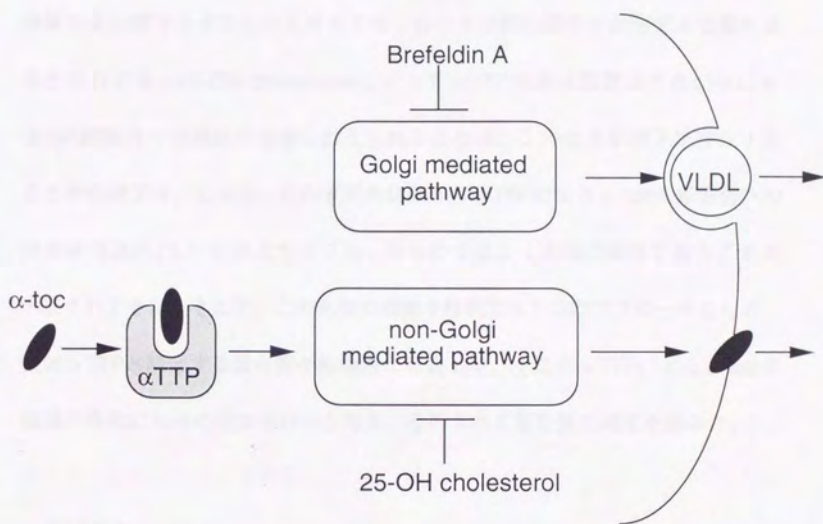


図25、 α TTP依存的な α -tocの細胞外への放出経路

第3章 α TTPと結合する細胞内蛋白質の同定

そもそも α TTPが細胞内の α -tocを細胞外へ放出するためには、 α TTPが細胞質の蛋白質であることから考えても、もう1つ別の因子が介在する必要があると思われる。25-OH cholesterolによって α TTP自身は阻害されないのに α -tocの細胞外への放出が有意に抑えられたことは、このような因子が存在することを示唆する。しかも、これまでの結果から α TTPによる α -tocの細胞外への放出経路はVLDLの分泌とカップルしたものではなく未知の機構であることが示唆されてきた。そこで、この未知の機構を解明する1つのアプローチとして、私は α TTPと結合する蛋白質が細胞内に存在して、そこが α TTPによる α -tocの輸送の標的になるのではないかと考え、そのような蛋白質の同定を試みた。

<材料>

DEAE 5PW : TOSO

pGEX4T-1 : Pharmacia

GSH sepharose 4B : Pharmacia

Wistarラット male 10W : 日生材

逆相カラム(Mightysil RP-18(ϕ 2mm x 5cm)) : 関東化学

λ gt11 rat liver cDNA library : CLONTECH

Marathon cDNA Amplification Kit : CLONTECH

MATCHMAKER Library (rat liver cDNA) : CLONTECH

<方法>

1、GST-TTPアフィニティーカラムの作製

まずラット α TTPcDNAのコーディング領域をpGEX4T-1(Pharmacia)に ligationし、E. coli JM109に導入する。これを200mlのSB medium (Amp+)で振とう培養し、OD₆₀₀=1.0になったところで1mMになるようにIPTGを加え、25℃で20h培養する。その後大腸菌を回収し、30mlのPBS中でsonicateし、10000xg, 20min, 4℃で遠心して上清を回収する。

この上清を1mlのGSH-Sepharose4B(Pharmacia)にアブライし、溶出バッファー(5mM GSH, 50mM Tris-HCl(pH8.0))で溶出する。この画分をovernightで透析(20mM Tris-HCl(pH7.5), 2mM EDTA, 1mM DTT)し、得られたGST-TTPのタンパク量はCBB染色で定量した。

このように調製したGST-TTP (2-4nmol)をGSH-Sepharose4B(200 μ l)と混合し、4℃で1h rotateする。PBSで2回洗った後、ゲルをカラム(1mlシリンジにナイロン綿をつめたもの)に充填した。

2、ラット肝臓ミクロソーム画分の蛋白質溶液の調製

ラット(wistar, male, 10w)の肝臓を2.5x volumeのSET buffer中でホモジェナイズし、常法に従ってP10, P100, S100を調製し、それぞれLowry法でタンパク定量を行なった。そのうち、ミクロソーム画分(P100)の50mg protein相当に対

して氷冷した10mlの1M KClを加え、氷上に1h置いた後、10万xgの遠心を行ない、その上清を回収した。得られた上清は高塩濃度であるため、overnightで透析(PBS, 2mM EDTA, 1mM DTT)した。透析するとやや沈殿が析出するが、粗遠心で沈殿を除いた上清をサンプルとして用いた。なお、肝臓40g当たりP10, P100, S100としてはそれぞれ0.2g, 0.6g, 0.75gの蛋白質が回収できた。

3、p50の部分アミノ酸配列の決定

GST-TTPアフィニティーカラムから0.5M NaClで溶出したフラクションをエッペンドルフチューブに1mlずつ分注し、ここに110 μ lのTCAを均一になるように加え(final 10%TCA)、氷上で1h置いた後に遠心(15000rpm, 20min, 4°C)を行ない、上清を捨てる。このチューブでさらにTCA沈殿を重ねうちする(6回ぐらい)。最終的に得られた沈殿は壁にへばりついてやや白く見えるが、これを1mlのice-cold acetoneで1回洗ってTCAを完全に除く(TCAが残っているとサンプルが酸性になり、バッファーが黄色くなり電気泳動がうまくいかない)。TCA除去後100 μ lのmQを加え、遠心エバポレーターに約1hかける。乾燥した沈殿に直接サンプルバッファーを加えてよく溶かし、これを12.5%のSDS-PAGEにかけた。なお、この時用いたゲルはovernightで固めたものを使用した。

泳動後のゲルをCBB染色し、ゲルを完全にmQに置換した後、p50のバンドの部分をカッターナイフで切り出した。ただしゲルの体積は全体で100 μ l以下におさえる(1レーン当たり約10 μ lになる)。そこに100 μ lの2x reaction buffer

(200mM Tris-HCl(pH9.0), 2mM EDTA, 0.2% SDS)を加え、10minほど慣らした後にリジリエンドペプチダーゼ(Lys-C, Achromobacter protease I)をサンプルのタンパク量の数10分の1加える。pHがアルカリ(>8.0)であることを確認し、37℃で終夜反応を行なった。

反応後のサンプルをウルトラフリーC3HV(0.45 μ m)へ移し、遠心(10000rpm, 5min, r.t.)する。さらに50 μ lの1x reaction bufferで1回、50 μ lのmQで2回洗い、最後に70 μ lのAcCNで洗った後に、遠心エボレーターに10minほどかけて有機溶媒をとばした。このサンプル(約100 μ l)を逆相HPLCにかける直前に70%ギ酸を2 μ l加えて酸性にした。

逆相カラムはMightysil RP-18(ϕ 2mm x 5cm) (関東化学)を用い、SDSを除くためのプレカラムはDEAE-5PW(ϕ 2mm x 2cm)(TOSO)を用いた。流速は200 μ l/minで、bufferA (0.09% TFA), bufferB (80% AcCN, 0.075% TFA)で1% AcCN/minのグラジェントで溶出した。OD₂₁₅のピークが出た部分は手動のコレクターで回収した。

それぞれのピークのフラクションから1 μ lほどを使って、マトリックスアシステッドレーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS)によってマススペクトルを測定した。残りの全量をアミノ酸シーケンサーにアプライしてシーケンスを決定した。

4、p50のcDNAクローニング

(5'-GGGCTGTACGACCGACTACCG-3') (5'-CACCTCGTGCTTGCTGGC-3')

これら2つのプライマーを用いてRT-PCRを常法に従って行なった。ラット肝臓totalRNAに対してrandom 9merをプライマーとして逆転写反応を行い、この反応液に対して上記2つのプライマーでPCR反応 ((94℃ 30sec, 59℃ 30sec, 72℃ 1min) x40 cycles) を行なった。増幅されたDNA断片をプローブにしてλgt11 rat liver cDNA library (CLONTECH) からブランクハイブリダイゼーションを行なった。また、Marathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH) を用いて5'-RACE, 3'-RACEを試みた。

＜実験と結果＞

3-1、 α TTP結合蛋白質(p50)の同定 (図27)

α TTPのN末端側にGST(glutathione-S-transferase)をフュージョンした蛋白質を大腸菌で発現してGSH sepharose 4Bに固定し、これを担体とするアフィニティーカラムを作製した。このカラムにラット肝臓から調製した蛋白質溶液をアプライし、グルタチオンで溶出した。P10, P100, S100についてそれぞれ検討した結果、P100から1M KClで可溶化されてくる画分、すなわち肝ミクロソームの膜に表在的に結合していると思われる画分に、GST-TTPとは結合するがGSTだけでは結合しない分子量50kDaの蛋白質(p50)を見いだした。

そこで、さらにp50の実体を明らかにする目的で部分精製を試みた。まず、GST-TTPカラムからグルタチオンで溶出したフラクションをmonoQ, HydroxyapatiteなどのFPLCカラムにかけたが、バンドがブロードになってしまい、精製には使えなかった。そこで次に、GST-TTPカラムからの溶出をグルタチオンではなく塩で試みたところ、0.5M NaClでp50がメジャーに溶出することが分かった。そこで、ラット5匹分の肝臓からこのフラクションを集め、10%TCA沈殿で濃縮後にSDS-PAGEを行い、p50のバンドを切り出して部分アミノ酸配列の決定を試みた。

方法

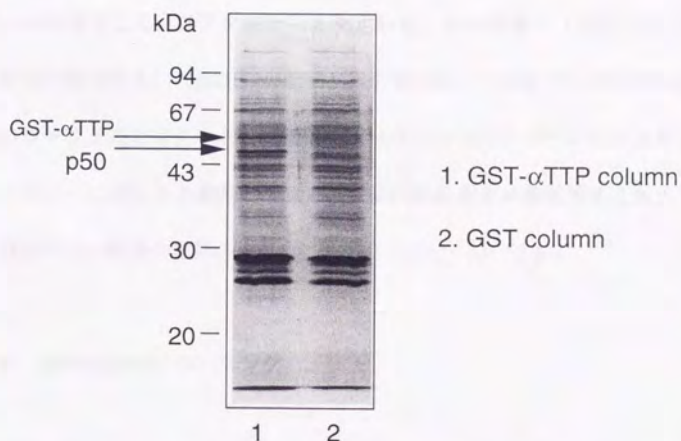
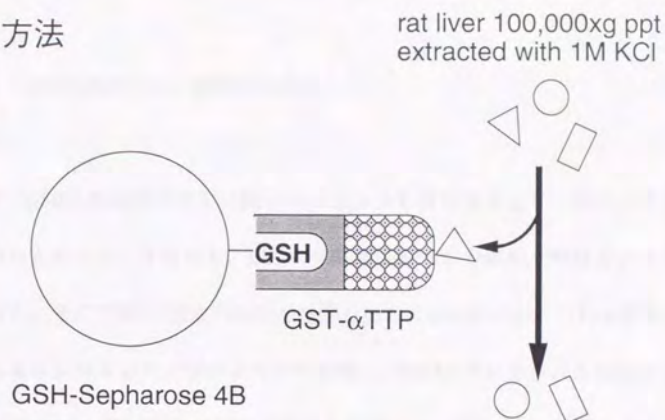


図26、GST- α TTPアフィニティーカラムによる
 α TTPと結合する蛋白質の同定

ラット肝臓100,000xg pptから1M KClで可溶化された画分をGST- α TTPアフィニティーカラムにアプライし、0.5M NaClで溶出した。GST- α TTPとは結合するがGSTだけでは結合しない蛋白質として50kDa蛋白質(p50)を同定した。

3-2、p50の部分アミノ酸配列の決定

まず、p50のN末端のアミノ酸シーケンスを行ったところ、全くシグナルが得られなかった。すなわち、p50のN末端は何らかの修飾を受けていると考えられた。そこで次にSDS-PAGEから切り出したp50のバンド(5 μ g相当)をそのままリジエンドペプチダーゼで処理し、DEAEプレカラムの付いた逆相HPLC(Mightysil RP-18)でペプチド断片を分離した(図28)。各ピークのアミノ酸シーケンスを行ない、さらにペプチド断片の大きさを知る目的でマスマスペクトルも測定して、アミノ酸配列を決定した。その結果、(表2)に示すような配列が得られた。一部GSTの配列が得られたが、これはバンドの切り出しの際のコンタミだと考えられた(実際にシーケンスのシグナルも小さかった)。メジャーに得られた配列、すなわちp50の部分アミノ酸配列はこれまでに全く報告のない新規の配列だった。

3-3、p50のcDNAクローニング

確かにp50は新規の蛋白質だが、データベースを検索した結果ヒトのゲノムDNA配列のなかで蛋白質と推定される配列として部分的に登録されていた(61)。そこで私はこの情報をもとにプライマーをデザインし、RT-PCRでcDNA断片の増幅を試みた。その結果、約300b.p.のcDNAを得ることに成功した。次に、この断片をプローブにしてラット肝臓cDNAライブラリーからスク

リーニングを行った。現在までに約50万クローンをスクリーニングした結果、5つの陽性クローンが得られたが、まだ全長には至っていない。また、同時に5'-RACE, 3'-RACEを試みているがまだ全長には至らない。

しかし、これまでに分かった範囲のアミノ酸配列をもとにホモロジー検索を行ったところ、シビレイイ(Torpedo)のVAT-1と呼ばれる蛋白質とホモロジーが高いことが明らかになった(図29)。これまでに分かっている範囲で約50%のホモロジーがあった。

VAT-1はTorpedoの電気器官のシナプス小胞に表在的に結合していると思われる分子量41kDaの蛋白質である。 Ca^{2+} 結合能があり、 Ca^{2+} 存在下で多量体(3 or 4mer)を形成する事、 Ca^{2+} 依存的に形質膜へ移行する事、またATPase活性がある事などが報告されているが、その生理機能は不明である(62-67)。また、VAT-1自身はquinone oxide reductaseやalcohol dehydrogenaseなどのファミリーに属しており(68)、何らかの酸化還元酵素である可能性も高い。

3-4、p50の発現臓器について

p50のcDNA断片をプローブにしてラット各臓器に対するノザンブロットティングを行なった(図30)。その結果、ほとんど全ての臓器に発現しており、とくに肺、肝臓、小腸、腎臓に多く発現していることが分かった。mRNAのサイズは約2.8kbだった。また、いくつかの培養細胞についても検討したところ、McARH7777, PC12に発現していることを確認した(data not shown)。

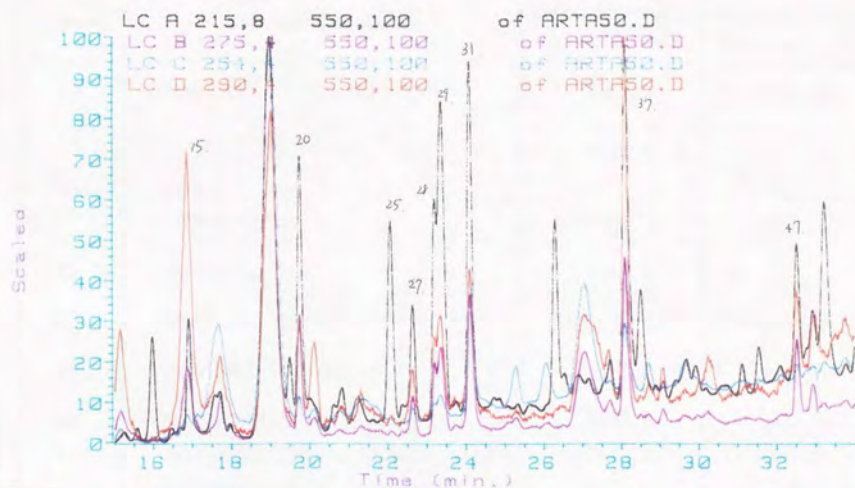


図27、Lys-C処理で断片化されたp50のペプチド断片の逆相HPLCパターン

逆相カラム：Mightysil RP-18 (関東化学)

プレカラム：DEAE-5PW (TOSO)

Buffer A：0.09% TFA

Buffer B：80% AcCN, 0.075% TFA

time (min)	A(%)	B(%)
0	100	0
48	40	60
53	0	100
54	100	0

peak No.	Amino acid sequence	Mass determined by MALDI-MS	Mass calculated from sequence
12	FLQPGSQRK (GSTYa, Yc)	1062.3	1061.2
15		1307.9 1324.3	
20	GYHLLK LIQSPED (GSTYa)		730.1
25	VLLVPGPEK	952.6	952.2
27	NRYLPAFEK (GSTYa)	1138.9	1138.3
28	ENGVTHPIDYHTTDYVDEIK	2351.0	2347.5
29	ENGVTHPIDYHTTDYVDEIK XVTYGMANLLTGPK (oxidized?) GVDIVMDPLGGSDAK (oxidized?) ARNRYFPAFEK (GSTYc1)	2350.4 1482.6 1593.6 1401.0	2347.5 1464.8 1575.8 1398.7
31	no sequence (blocked N-terminal?)	2330.0	
33	GVDIVMDPLGGSDAK	1577.4	1575.8
37	VVTYGMANLLTGPK PHIDSVWPFKEK	1463.7 1373.5	1464.8 1355.5
38	LVQTRAILNYIATK (GSTYc1)	1607.0	1604.1
47		2317.2	

表 2、p50の部分アミノ酸配列

VAT-1	MTGEEVKEPKEQQEITEVKEQEPEISYNAIVLNGVGGYDKVKVEVKKGVP
P50	-----
VAT-1	TLKSDEILVRVQACGLNFSDLLVRQGAFGKHHSL----GTECAGVVEAIG
P50	-----LPPPPVTPGMEGAGVVVAVG
VAT-1	DLVIDRKVGDKIIMLNIDGGLWTELVVTTVNRTFLMPDGMSEFAAAISV
P50	EGVSDRKAGDRVMVLN-RSGMWQEEVTVPSAQTFMPEAMTFEEAAALLV
VAT-1	NYTAAYVMIYDFANLRPSQSILIHMAAGGVGIAATQLCKLVHDVTIFGTA
P50	NYITAYMVLFDGFLNLRPGHSVLVHMAAGGVGMAALQLCRTVENVTVFGTA
VAT-1	SPSKHETIKENGVTYPIDYTTLDYAEVVRKIAPKGVDIVLDPLGGADDSK
P50	SASKHEVLKENGVTHTPIDYHTTDYVDEIKKISPKGVDIVMDPLGGSDTAK
VAT-1	GFGLLKPLGKLVLYGSANQVTAPKRSSLAAKVWWHKFNIDALQLINSNK
P50	GYHLLKPMGKVVTYGMANLLTGPKRNLMMAMARTWWNQESVTALQLLQANR
VAT-1	AVCGFHLG--RTDPDHVAEVIRKLISLYKEGKIKPKVDSVWSFEQVGDAM
P50	AVCGFHLGYLDGEVELVSRVVTHLLALYNQGHKPRIDSVWPFEKVADAM
VAT-1	RHRNRNTRTLEKSSWSLKSRLMPQLEIKSVSKRQG
P50	RQMQEKKNIGK-----VLLVPGFEKET-----

図29、p50とシビレエイVAT-1とのアミノ酸配列の比較

網掛け部分は同一のアミノ酸をあらわす。
ただしp50はこれまでに分かった範囲の部分配列である。

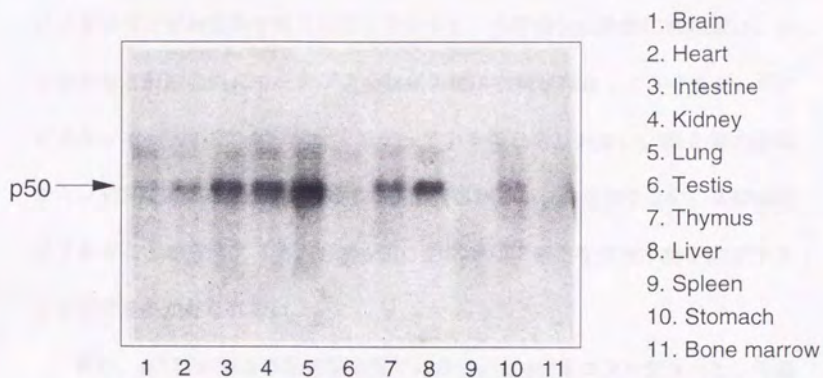


図29、ラット各臓器におけるp50の発現

ノザンブロットリング法によってp50の発現臓器について検討した。
各レーンには2 μ gのpoly(A)⁺ RNAがブロットされている。
なお、p50のmRNAのサイズは2.8kbだった。

<考察>

以上、 α TTPと細胞内で相互作用すると考えられる分子の候補が初めて同定され、しかもこれまでに報告のない新規の蛋白質であることが明らかになった。仮にp50と名付けたが、 α TTPがシナプス小胞に表在的に結合する蛋白質のホモログと肝細胞内で相互作用しているという可能性は非常に興味深い。もしかすると肝細胞内にもシナプス小胞様の輸送小胞が存在して、それが α TTPによる α -tocの輸送のターゲットになっているのかもしれない。第2章の結果から α TTPによる α -tocの細胞外への放出経路がゴルジ体を介さない、未知の経路であることから考えても、今後p50を手がかりに新たな輸送小胞を同定することができるかもしれない。

また、 α TTPが単なる輸送蛋白質ではなく、 α -tocをコファクターとした機能蛋白質と考えると、p50はそのエフェクターということになる。 α TTPとp50との結合性が α TTPに α -tocが結合した状態と結合していない状態で差がでるのかなど、検討してみたい。

今後p50を手がかりとして以下のような実験を考えている。

- 1) まずはp50と α TTPが実際に細胞内でinteractionしていることを確認する。
- 2) p50に対する特異的抗体を樹立して、これを用いてp50の細胞内局在を調べる。また、その局在が25-OH cholesterolをはじめ様々な薬物の処理によって変化するのかどうか検討する。これらの結果からp50の機能が類推できるかもしれない。

3) p50の一次構造上にはおそらくATP結合部位および Ca^{2+} 結合部位と思われる配列が存在している。そこで、この部分に変異を導入した蛋白質を細胞に発現することによってドミナントネガティブ効果がみられるかもしれない。まずは細胞内コレステロール代謝や、ビタミンEの細胞外への放出に対する効果を見るのがよいだろう。

4) p50と α TTPとの結合はどのような制御をうけるのだろうか。例えば α -tocが結合した状態と結合していない状態で違うのだろうか。

5) p50の抗体を用いて細胞から免疫沈降を行い、p50が結合しているオルガネラを精製する。そこにはどんな蛋白質や脂質が濃縮されてくるのだろうか、とても興味深い。

なお、現在までにこのようなアフィニティーカラムによる方法の他に酵母のtwo-hybrid systemによるスクリーニングを行っているが、未だ有力な候補は見つかっていない。

【総括と展望】

これまでの結果をまとめると、(図31) (図32)

- 1) α TTPが先天性ビタミンE欠乏症の原因遺伝子であることを明らかにした。すなわち α TTPがビタミンE同族体の中から α -tocを選別し、その体内循環量を調節する因子であることが明らかになった。
- 2) α TTPが細胞内の α -tocを積極的に細胞外へ放出する機能を持つことを培養細胞レベルの実験から明らかにした。しかもその細胞外への放出経路はこれまでに知られていない未知の経路である可能性を示唆した。
- 3) 今後この未知の経路について調べていく上での重要な手がかりとして、 α TTPと結合する細胞内蛋白質p50を同定した。

これまで長らく原因が不明であった先天性ビタミンE欠乏症の原因遺伝子が見つかったことは、医学的に非常に重要である。なぜならば、これらの患者は一旦神経が変性してしまう前にビタミンEを過剰投与することによって症状の進行を止めることができると考えられるからである(28)。遺伝子診断とそれに伴う予防的治療が今後期待される。

α TTPが細胞内の α -tocを細胞外へ放出するためには、 α TTPが細胞質の蛋白質であることから考えてもう1つ別の因子が介在する必要があると思われる。25-OH cholesterolによって α TTP自身は阻害されないのに α -tocの細胞外への放出が有意に抑えられたことは、このような因子が存在することをさらに強く示唆する。すなわち25-OH cholesterolによって影響される脂質輸送系が介在していると考えられるが、その様な輸送系はこれまで全く知られていなかった。

た。序論で述べたように α -TTP の一次構造は他の脂質輸送蛋白質 (CRALBP, SEC14p) と似ている。とくに SEC14p は可溶性蛋白質でありながら一部が細胞内オルガネラの膜に結合していることが知られており、これらの蛋白質が特定のオルガネラに対する脂質のソーティングを行なっている可能性がある。なお、私はこれら 3 つ蛋白質の N 末端側に約 15 アミノ酸にわたって高度に保存された配列 (FLLRFLRAR(D/K)FDVXLA) が存在することに注目しており、あるいはこの部分がソーティングのシグナル配列ではないかと推察している。実際に α -TTP に α -toc が結合することによってこのドメインが分子の表面に露出してくるといいう結果も得ている (data not shown)。一方で、受け手となる側のオルガネラには輸送のターゲットとなる分子が存在すると考えられ、その候補として今回 p50 を同定した。今後このような分子を手がかりにして、新たなオルガネラが同定されるのではないかと期待している。

また、今回の研究から肝細胞内においてビタミン E の輸送とコレステロールの代謝がクロストークしていることが初めて示唆された。コレステロールは細胞にとって必須な成分であり、生体膜の主要な構成成分として、あるいは各種ステロイドホルモンや胆汁酸の前駆体として重要な脂質である (69-71)。また、最近 caveolae と呼ばれる部分にコレステロールが密集しており、しかもそこには三量体 G 蛋白質や Ras などをはじめとした情報伝達分子が局在していることが報告されている (71-74)。従ってコレステロールの細胞内輸送機構は非常に興味深い問題であるが、ほとんど分かっていないのが現状である。細胞内でコレステロールは小胞輸送されていると考えられており、その輸送によって代謝が

制御されていると考えられている(55,56)。私は諸々の理由から、25-OH cholesterolによるコレステロール代謝調節作用は、合成酵素に対する直接作用ではなく、コレステロールの小胞輸送に対する作用ではないかと考えている。すなわち、小胞体で生合成されたコレステロールはゴルジ体とは独立した輸送小胞を介して小胞体から形質膜へ移行すると考えられており(53)、25-OH cholesterolはこの輸送の過程を阻害しているのではないかと考えられた。そうすると α TTPの輸送のターゲットはコレステロール輸送小胞かもしれない、もしくはp50はコレステロール輸送小胞の表面に結合する蛋白質なのかもしれない。このような新たな切り口からのアプローチによってもコレステロールの細胞内輸送機構が解明されれば、将来的にはこれらを標的とした新たな抗動脈硬化薬の開発などに応用されることも期待される。

臨床においてもコレステロールとビタミンEの血中濃度には相関関係があることが数多く報告されている。例えばビタミンEが欠乏すると体内のコレステロール値が上昇し、これにビタミンEを投与するとコレステロール値が低下するという報告(75-78)があり、しかもその効果はBHTなどの合成抗酸化剤では観察されないことから、単なる抗酸化剤としての作用では説明しにくいとされている。一方、逆にビタミンEによってコレステロール値が上昇するという報告もある(79,80)。また、生体異物の投与によってコレステロールの生合成レベルが上がると、同時に血液中のビタミンE値も上昇するという報告もある(81)。しかしながらこれら一連の現象に対する十分な説明はなされておらず、 α TTPが関わっている可能性を含めた今後の検討が必要である。

創薬という観点から言えば、 α TTPの機能をうまく利用できないだろうか。

すなわち、 α TTPに結合する薬物は肝臓で代謝されずに再び体内を循環することになると考えられ、できるだけ長時間作用してほしい薬物の開発に応用できないだろうか。また、薬物を細胞内の特定のオルガネラへ作用させたい場合に α TTPのような細胞内輸送蛋白質を担体として利用できるかもしれない。

ビタミンEが欠乏することによってなぜ神経が変性するのかということも重要な問題である。筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因はsuper oxide dismutase (SOD)が欠損することであり、SODが欠損すると運動神経が変性することが報告されている(82)。一方のビタミンE欠乏の場合は感覚神経が変性する。SOD、ビタミンEはともに生体内で生じた活性酸素種を消去する因子である。それぞれが欠損することによってなぜ別々の神経が変性するのだろうか、興味深い問題である。

現在我々は α TTPのノックアウトマウスの作製を進行中である。この動物はビタミンE欠乏による神経障害のモデル動物になるばかりでなく、酸素ストレス高感受性の実験動物として期待される。また、これまでに「なぜ生体内には α -tocが多いのか」という疑問は解決したが、「ではなぜ生体は α -tocだけを利用するのか」という疑問が次に浮かんでくる。ノックアウトマウスでは α TTPによる α -tocの選別が行われないので、ビタミンE同族体の生物活性を体内濃度が同じレベルで比較できると思われる。それでも α -tocの活性が高いとすると生体内には α -tocを必要とする別の機構が存在すると解釈でき、次なるターゲットを探す糸口になるとと思われる。

生物にとってなぜ α TTPのような蛋白質が必要なのかという質問をよく受けることがある。私は、血中濃度をある一定範囲にとどめておくために有効なシステムなのではないかと考えている。すなわち α TTPに対する結合容量が律速になって体内を再循環するビタミンE量の上限と下限が保つことができると考えられる。実際にビタミンEについては他の脂溶性ビタミンとは異なり、めったに欠乏状態になることはなく、また過剰症もないことが知られている(83)。さらに、もしかすると α TTPの活性を調節することによって体内のビタミンEレベルを調節するようしくみを生体は兼ね備えているのかもしれない。このような可能性についても今後検討すべきである。

しかし、肝臓の細胞の中にある1つの蛋白質によって体全体のビタミンEレベルが調節されているという事実は大変興味深く思われる。 α TTPは肝細胞自身のためというよりむしろ体全体のために働いている蛋白質であるように思われる。単細胞生物から多細胞生物、そして現在の哺乳動物に至る進化の過程で、このような機能をもつ蛋白質はいつ獲得されたものなのだろうか。

以上のように、私は α TTPという蛋白質について研究していく過程で、最初は思いもつかなかった様な興味深い事実に遭遇することになった。「 α TTPは暗闇を照らす明かりのようなものであり、 α TTPの周辺には α TTPによってはじめて照らし出される真実があり、その姿がおぼろげに見えてきた」といったところだろうか。本研究をきっかけとして、今後さらに新たな生命のしくみが解き明かされていくことを期待する。

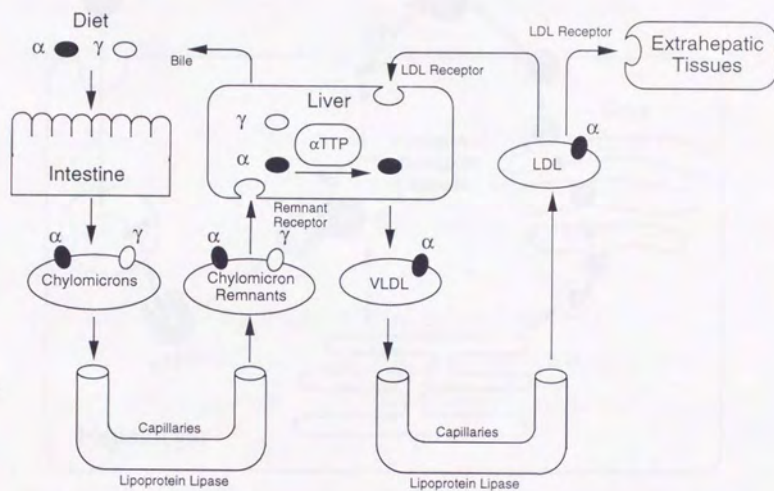


図30、 α TTPによるビタミンE同族体の体内動態制御

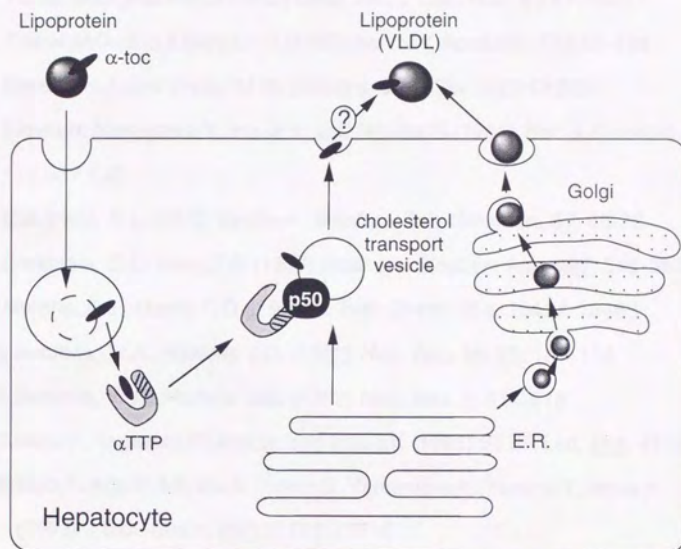


図31、 α TTPを介する α -tocの肝細胞外への放出経路
(現時点での仮説)

【References】

1. Chow, C.K., and Tappel, A.L. (1973) Arch. Environ. Health 26, 205-206
2. Chow, C.K. (1975) Am. J. Clin. Nutr. 28, 756
3. Traber, M.G., and Kayden, H.J. (1989) Am. J. Clin. Nutr. 49, 517-526
4. Traber, M.G., and Kayden, H.J. (1989) Ann. N.Y. Acad. Sci. 570, 95-108
5. Kayden, H.J., and Traber, M.G. (1993) J. Lipid Res. 34, 343-358
6. Mowri, H., Nakagawa, Y., Inoue, K., and Nojima, S. (1981) Eur. J. Biochem. 117, 537-542
7. Catignani, G.L. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 66-72
8. Catignani, G.L., Bieri, J.G. (1977) Biochem. Biophys. Acta 497, 349-357
9. Murphy, D.J., Mavis, R.D. (1981) J. Biol. Chem. 256, 10464-10468
10. Behrens, W.A., Madere, J.G. (1982) Nutr. Rep. Int. 25, 107-112
11. Behrens, W.A., Madere, J.G. (1982) Nutr. Res. 2, 611-618
12. Sato, Y., Hagiwara, K., Arai, H., and Inoue, K. (1991) FEBS Lett. 288, 41-45
13. Sato, Y., Arai, H., Miyata, A., Tokita, S., Yamamoto, K., Tanabe, T., Inoue, K. (1993) J. Biol. Chem. 268, 17705-17710
14. Saari, J.C., Bredberg, D.L. (1987) Biochem. Biophys. Acta 716, 266-272
15. Saari, J.C., and Bredberg, D.L. (1987) J. Biol. Chem. 262, 7618-7622
16. Crabb, J.W., and Saari, J.C. (1988) J. Biol. Chem. 263, 18678-18687
17. Crabb, J.W., and Saari, J.C. (1988) J. Biol. Chem. 263, 18688-18692
18. Bankaitis, V.A., and Greene, R. (1989) J. Cell. Biol. 108, 1271-1281
19. Bankaitis, V.A., Aitken, J.R., Cleves, A.E., Dowhan, W. (1990) Nature 347, 561-562
20. Cleves, A.E., McGee, T.P., Whitters, E.A., Champion, K.M., Aitken, J.R., Dowhan, W., Goebel, M., and Bankaitis, V.A. (1991) Cell 64, 789-800
21. Singer, S.J., and Oster, G.F. (1992) Trends Cell Biol. 2, 69-70

22. Skinner, H.B., Alb, J.G., Whitters, E.A., Helmkamp, G.M., and Bankaitis, V.A.
(1993) *EMBO J.* 12, 4775-4784
23. McGee, T.P., Skinner, H.B., Whitters, E.A., Henry, S.A., and Bankaitis, V.A.
(1994) *J. Cell Biol.* 124, 273-287
24. Skinner, H.B., McGee, T.P., McMaster, C.R., Fry, M.R., Bell, R.M., and
Bankaitis, V.A. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 112-116
25. Branden, C., Tooze, J. : Introduction to Protein Structure (Garland
Publishing, Inc.) chapter 5
26. Rosenblum, J.L., Keating, J.P., Prensky, A.L., Nelson, J.S. (1981)
New Engl. J. Med. 304, 503-508
27. Sharp, D., Blinderman, L., Gordon, D.A., Wetterau, J.R. (1993)
Nature 365, 65-69
28. Sokol, R.J. (1988) *Annu. Rev. Nutr.* 8, 351-373
29. Burck, U., et al. (1981) *Neuropediatrics* 12, 267-278
30. Muller D.P.R., Lloyd, J.K., Wolff, O.H. (1983) *Lancet* 1, 225-228
31. Harding, A.E. et al. (1985) *New Engl. J. Med.* 313, 32-35
32. Yokota, T., and Watabiki, S. (1987) *Ann. Neurol.* 22, 84-87
33. Stumpf, D.A., Sokol, R., Bettis, D. et al. (1987) *Neurology* 37, 68-74
34. Yokota, T., and Hasumura, Y. (1990) *J. Neurol.* 237, 103-106
35. Traber, M.G., and Kayden, H.J. (1990) *J. Clin. Invest.* 85, 397-407
36. Hamida, C.B., and Koenig, M. (1993) *Nature Genet.* 5, 195-200
37. Hamida, M.B., and Middleton, L. (1993) *Neurology* 43, 2179-2183
38. Arita, M., Sato, Y., Miyata, A., Tanabe, T., Takahashi, E., Arai, H., Inoue, K.
(1995) *Biochem. J.* 306, 437-443
39. Ouauchi, K., Arita, M., Kayden, H., Hentati, F., Hamida, M.B., Sokol, R.,
Arai, H., Inoue, K., Mandel, J.L., Koenig, M. (1995) *Nature Genet.* 9, 141-145

40. Gotoda, T., Arita, M., Arai, H., Inoue, K., Yokota, T., Fukuo, Y., Yazaki, Y., Yamada, N. (1995) *New Engl. J. Med.* 333, 1313-1318
41. Takahashi, E., Hori, T., O'Connell, P., Leppert, M., White, R. (1990) *Hum. Genet.* 86, 14-16
42. Ouahchi, K., Cavalier, L., Kayden, H.J., Donato, S.D., Reutenauer, L., Mandel, J.L., Koenig, M. *Am. J. Hum. Genet.* in press
43. Traber, M.G., Ramakrishnan, R., Kayden, H.J. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10005-10008
44. Goldstein, J.L., Baus, S.K., and Brown, M.S. (1983) *Methods Enzymol.* 98, 241-260
45. Nakamura, T., Kijima, S. (1972) *Chem. Pharm. Bull.* 20, 1681-1686
46. Kim, H., Arai, H., Arita, M., Sato, Y., Ogihara, T., Tamai, H., Inoue, K., Mino, M. (1996) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 42, 11-18
47. White, A., Graham, D.L., LeGros, J., Pease, R., Scott, J. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 15657-15664
48. Boren, J., Rustaeus, S., Olofsson, S. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 25879 -25888
49. Rustaeus, S., Lindberg, K., Boren, J., Olofsson, S. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 28879-28886
50. Ridgway, N., Dawson, P., Ho, Y., Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1992) *J. Cell Biol.* 116, 307-319
51. Ridgway, N.D., Lagace, T.A. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 8023-8031
52. Taylor, F., Saucier, S., Shown, E., Parish, E., Kandusch, A.A. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 12382-12387
53. Urbani, L., Simoni, R.D. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 1919-1923

54. Lange, Y., Echevarria, F., Steck, T. (1991) J. Biol. Chem. 266, 21439-21443
55. Liscum, L., Underwood, K.W. (1995) J. Biol. Chem. 270, 15443-15446
56. Lange, Y., Steck, T. (1996) Trends in Cell Biol. 6, 205-208
57. Shiao, Y., Vance, J.E. (1993) J. Biol. Chem. 268, 26085-26092
58. Ridgway, N.D. (1995) J. Lipid Res. 36, 1345-1358
59. Hua, X., Nohturfft, A., Goldstein, J.L., Brown, M.S. (1996) Cell 87, 415-426
60. Kostner, G.M., Oettl, K., Jauhainen, M., Ehnholm, C., Esterbauer, H., Dieplinger, H. (1995) Biochem. J. 305, 659-667
61. Friedman, L. et. al. (1995) Genomics 25, 256-263
62. Linial, M., Miller, K., Scheller, R.H. (1989) Neuron 2, 1265-1273
63. Linial, M. (1993) Eur. J. Biochem. 216, 189-197
64. Linial, M., Levius, O. (1993) FEBS Lett. 315, 91-94
65. Linial, M., Levius, O. (1993) Neurosci. Lett. 152, 155-157
66. Levius, O., Linial, M. (1993) Cell Mol. Neurobiol. 13, 483-492
67. Linial, M., Levius, O., Ilouz, N., Parnas, D. (1995) J. Physiol. 89, 103-112
68. Persson, B., Zigler, J., Jornvall, H. (1994) Eur. J. Biochem. 226, 15-22
69. Samuels, L.T., Nelson, D.H. (1975) Endocrinology 6, section 7
70. Danielsson, H. (1973) The Bile Acids 2, 1-32
71. Haslewood, G.A.D. (1978) The biological importance of bile salts, 78-118
72. Li, S., Okamoto, T., Chun, M., Sargiacomo, M., Casanova, J., Hansen, S., Nishimoto, I., Lisanti, M.P. (1995) J. Biol. Chem. 270, 15693-15701
73. Song, K., Li, S., Okamoto, T., Quilliam, L., Sargiacomo, M., Lisanti, M.P. (1996) J. Biol. Chem. 271, 9690-9697
74. Schnitzer, J.E., Oh, P., McIntosh, D.P. (1996) Science 274, 239-242

75. Wilson, R.B., Middleton, C.C., Sun, G.Y. (1978) J. Nutr. 108, 1858-1867
76. Westrope, K.L., Miller, R.A., Wilson, R.B. (1982) Nutr. Rep. Inter. 25, 83-88
77. Chen, L.H., Liao, S., Packett, L.V. (1972) J. Nutr. 102, 729-732
78. Greenblatt, I.J. (1957) Circulation 16, 508
79. Desai, I., Lee, M. (1974) Am. J. Clin. Nutr. 27, 334-338
80. Serfontein, W.J., Ubbink, J.B., de Villiers, L.S. (1983) Am. J. Clin. Pathol. 79, 604-606
81. Kato, N. (1992) Vitamins (Japan) 66, 25-34
82. Rosen, D.R. (1993) Nature 362, 59-62
83. Traber, M.G. (1994) Free Rad. Biol. Med. 16, 229-239

【謝辞】

本研究を進めるにあたり、御指導くださいました、東京大学薬学部衛生化学教室の井上圭三教授、新井洋由助教授、青木淳賢助手、服部光治助手に感謝致します。とくに直接御指導頂きました新井洋由助教授に感謝いたします。

修士までの3年間御指導頂きました元東京大学薬学部衛生化学教室助教授、現昭和大学薬学部、工藤一郎教授に感謝いたします。

研究の心得をはじめ多くの事を教えて頂きました元東京大学薬学部衛生化学教室助手、現東京都臨床医学研究所、梅田真郷先生に感謝いたします。

先天性ビタミンE欠乏症の原因遺伝子の解析に当たり、共同研究者としてお世話になりました、東京大学医学部第三内科、後藤田貴也博士、および東京医科歯科大学医学部神経内科、横田隆徳博士に感謝いたします。

p50の部分アミノ酸配列を決定するに当たり、御指導くださいました、理化学研究所、瀧尾擴士先生、堂前直先生に感謝いたします。

GSTフュージョン蛋白質を用いたアフィニティーカラムの方法を教えて頂き、研究に関する多くのアドバイスを頂きました大阪大学医学部、高井義美教授、藤田恭之博士に感謝いたします。

放射標識 α -toc類の合成法や扱い方を教えて頂きました(株)エーザイ、中村哲也様に感謝いたします。

遺伝子関連の実験について多くのアドバイスを頂きました元サントリー生物医学研究所、現理化学研究所、安達栄樹博士に感謝いたします。

日々の生活を共にし、数々の助言、援助してくださいました、東京大学薬学部衛生化学教室の皆様にご感謝いたします。とくに同じビタミン E 研究グループとして、研究の心得を教えてくださいました佐藤雄治博士をはじめ、苦楽を共にして頂きました小川雅子修士、細見昭大学士、野村和弘学士、丸橋祐子さんに感謝いたします。

最後に、これまでの自分を暖かいまなざしで見守って下さった、両親、弟、そして祖父母に深く感謝いたします。

1997.1.20

有田 誠

東京大学薬学部衛生化学教室 研究室にて

