

## Cholesterol 12 $\alpha$ -Hydroxylase mRNA の合成に対する食事時間の影響

立 野 美 和 , 瀬戸口 賀 子

Effects of Scheduled Daily Feeding Time on the mRNA Synthesis of  
Cholesterol 12 $\alpha$ -Hydroxylase

Miwa Tateno and Yoshiko Setoguchi

---

脂肪の消化には、消化酵素リパーゼのほかに、リパーゼが働けるように脂肪を乳化してミセルの状態を形成させる胆汁酸が必要である。胆汁酸は、肝臓でコレステロールから一連の酵素反応を経て合成される。肝臓で合成される胆汁酸は、主としてコール酸とケノデオキシコール酸からなる。生合成の初発酵素である Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase の mRNA 合成には日内リズムが見られ、そのリズムは摂食によって影響をうけることが知られている。Cholesterol 12 $\alpha$ -hydroxylase はケノデオキシコール酸とコール酸合成の分岐点に位置する酵素で、本酵素の働きでコール酸への合成がすすめられる。Cholesterol 12 $\alpha$ -hydroxylase mRNA 合成の日内リズムの詳しい研究は殆どないが、山田らにより Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase と同じようなリズムがあることが近年見出されている。しかし摂食によるリズムの変動については、まだ報告されていない。今回、摂食時間を昼間6時間に限定したウサギで Cholesterol 12 $\alpha$ -hydroxylase mRNA の変動を検討したところ、Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase のような顕著な差は見られなかったが、Cholesterol 12 $\alpha$ -hydroxylase mRNA の合成についても摂食により、日内リズムに弱いながら逆転が見られることが判明した。

**Key words :** [Cholesterol 12 $\alpha$ -hydroxylase] [Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase]  
[Circadian rhythm] [Scheduled daily feeding]

---

(Received November 6, 2000)

## <緒言>

コレステロールは生体膜の重要な構成成分であるとともに、ビタミンDや副腎皮質ホルモン、性ホルモン、胆汁酸などの合成に用いられている。この中で、特に胆汁酸の合成は脂肪の消化吸収に不可欠であることと、コレステロールの異化の主要な経路であるという二つの点で重要な役割を担っている。胆汁酸は、コレステロールから肝臓で合成される<sup>1)</sup>。

その過程は、ヒトを含めていろいろな動物で研究され、その結果コレステロールの主な代謝排出経路は、ステロイド核の変換と側鎖酸化であり、胆汁酸はコレステロールの代謝終末産物であることが判明した<sup>2)</sup>。また、体内コレステロール異化の80~90%近くが肝臓における胆汁酸への変換であるといわれている<sup>3)</sup>。胆汁酸には主として、コール酸とケノデオキシコール酸の二種類がある。グリシンやタウリンと結合し抱合胆汁酸となり胆嚢に蓄えられ、食事をとると胆嚢から十二指腸へ胆汁とともに排泄され、脂肪を乳化しリパーゼの働きやすい環境を作っている。さらに脂肪の消化を助けた後は、全てが便とともに排泄されるのではなく、その95%は再び腸管から吸収され肝臓へと戻っていく腸肝循環を行っている<sup>4)</sup>。胆汁酸を合成する一連の酵素のうち、最初に働く酵素は、7位の $\alpha$ 位の水酸化を行うコレステロール7 $\alpha$ -水酸化酵素である<sup>5)</sup>。コレステロール7 $\alpha$ -水酸化酵素は、ウサギにおいて日内リズムがあり、そのmRNAの合成量が夜10時に最大になり、朝10時に最小になることが知られている<sup>6)</sup>。また、このリズムは摂食時間を8時から14時の昼間に限定すると夜10時には最低、朝11時に最大になり、リズムの逆転がみられることが正徳、枝松らにより報告されている<sup>7)</sup>。しかし、コール酸を合成するために最も大切な12位の水酸化(図1において(c)から(d)の反応)を行なう、コレステロール12 $\alpha$ -水酸化酵素が、食事時間の影響を受けるかどうかについては、まだ明らかにされていない。

本研究では、ウサギの摂食時間を8時から14時の昼間に限定して、各時間ごとに肝臓を摘出してRNAを調製し、コレステロール12 $\alpha$ -水酸化酵素cDNAをプローブにしてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行い、そのmRNAの合成量をnon RI法<sup>8)</sup>により比較検討した。本酵素は、7 $\alpha$ -ヒドロキシ-4-コレステレン-3-オンの12 $\alpha$ 位に水酸化を行う酵素でコール酸合成とケノデオキシコール酸合成の分岐点に位置しており、コール酸とケノデオキシコール酸の割合の調節に関与する重要な酵素である。本酵素はチトクロームP450を含む複合酵素系であることが知られている。

コレステロール代謝の異常が、胆石症、高脂血症、各種の脂質代謝異常、ひいては動脈硬化症やそれに伴う心疾患等の生活習慣病の原因となりうることを考慮すると本酵素は重要な酵素であることがいえる。

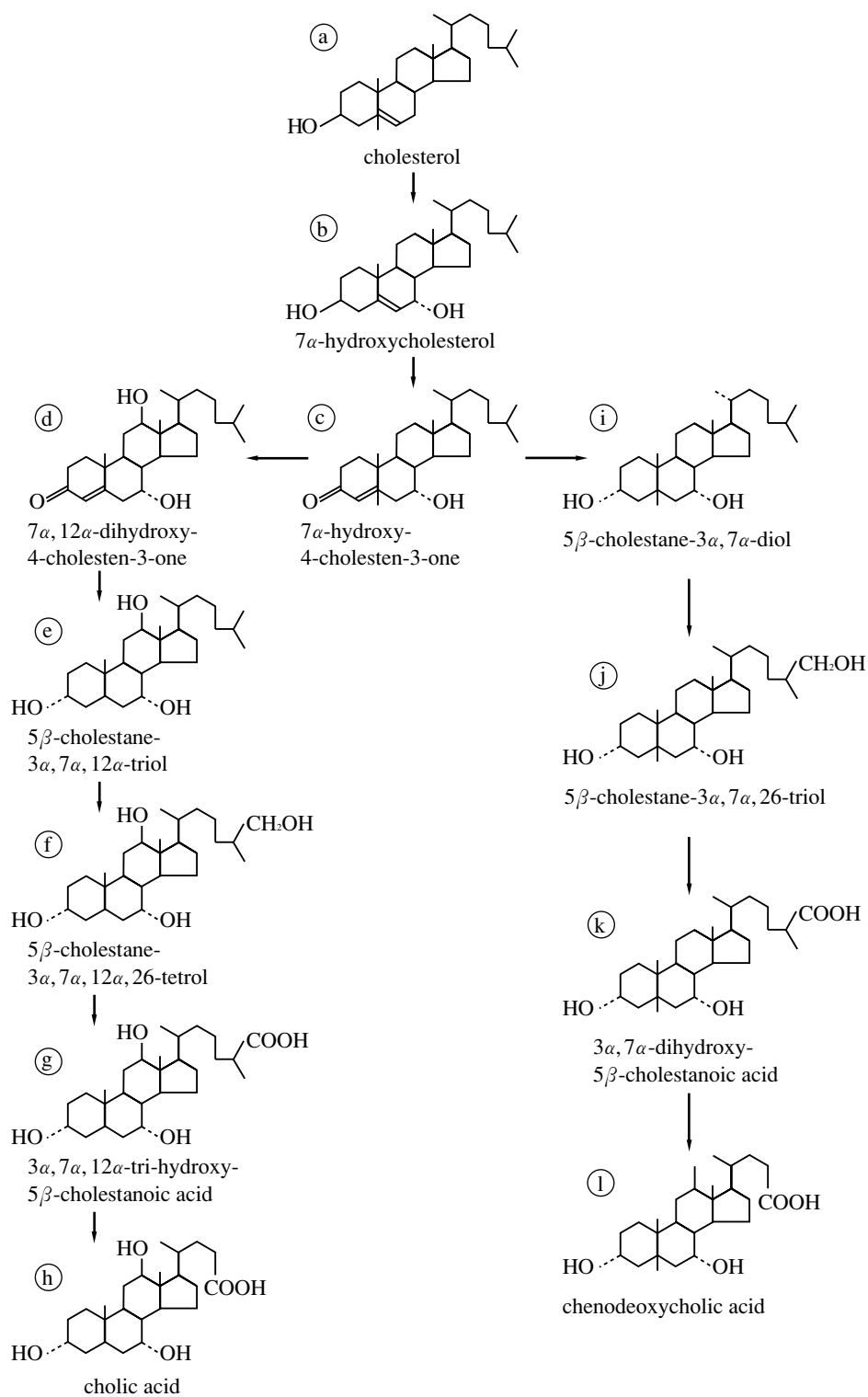


図1 胆汁酸代謝経路<sup>5)</sup>

## <実験方法>

### 1. 試薬

グアニジンチオシアネート, DMSO (Dimethyl Sulfoxide), エチジウムブロマイド:

生化学研究用特製試薬, ナカライテスク(株)製。8-ヒドロキシキノリン, フェノール, サルコシル (N-ラウリルサルコシンナトリウム塩), 2-メルカプトエタノール, エーテル, クロロホルム, イソアミルアルコール, イソプロパノール, エタノール, DEPC (Diethyl Pyrocarbonate), 酢酸ナトリウム, リン酸水素2ナトリウム, リン酸2水素ナトリウム, 塩化ナトリウム, クエン酸ナトリウム, 酢酸, 塩酸, トリス-ヒドロキシアミノメタン, EDTA (Ethylene Diamine Tetra acetic Acid), 塩化リチウム, 塩化マグネシウム, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), グリオキサール (40%水溶液): ナカライテスク(株)製。制限酵素 Sac I: 宝酒造(株)製。を用い, その他のものは方法の中に書き入れた。

### 2. 動物, 飼料および飼育方法

ウサギは, 日本白色種の雄, 2カ月齢で, 体重1.6~1.8kgのものを6匹購入し, 1週間ウサギ固形飼料(飼料用CR-3, 日本クレア株式会社)を自由に摂取させる予備飼育後, 2週目から午前8時に400gのウサギ固形飼料を与え, 摂取時間を午後2時までの昼間6時間に限定する本飼育を2週間行った。ウサギの飼育は1匹ずつ金網製飼育ケージに入れ室温25℃の動物室で飼育し, 飲料水は自由摂取にさせた。飼料の摂取量測定は毎日, 体重測定は1日おきに行った。

### 3. RNAの調製

#### (1) ウサギの解剖とRNAの調製

ウサギはエーテル麻酔し, ウサギ①18時, ウサギ②7時10分, ウサギ③7時55分, ウサギ④8時05分, ウサギ⑤8時30分, ウサギ⑥8時50分の各時間に開腹, 心臓穿刺による採血後ただちに肝臓0.3gを摘出し, AGPC (Acid Guanidium thiocyanate-Phenol-Chloroform) 法<sup>9)10)</sup>を用いてRNAの調製を行った。RNAは不安定で分解されやすく, 特にRNaseによる分解を避けるためウサギ解剖用の器具, ガラス器具, ピペット類は, 乾熱滅菌やオートクレーブで滅菌したものを使い, 全ての操作は使い捨ての手袋を用いて行った。

10mlのグアニジンチオシアネート試薬 (4Mグアニジンチオシアネート-25mMクエン酸ナトリウム, 0.5%サルコシル (N-ラウリルサルコシンナトリウム塩)-0.1M-2-メルカプトエタノール)の入った50mlのファルコンチューブに, 肝臓0.3gを入れポリトロンホモジナイザーでホモジナイズした。次に, 2mlの2M酢酸ナトリウム(pH4.0), 10mlのTris-HClバッファー(pH8.0)飽和フェノールを加え, 添加毎に静かに上下逆さにして混和し, 最後に2mlのクロロホルム-イソアミルアルコール(49:1)を加えて10秒間激しく振り混ぜ15分氷冷した。次に4℃, 3,500rpmで20分間遠心分離し, 2層に分離した上層を別のファルコンチューブに移し等量のイソプロパノールを加え, よく混和し-20℃で1時間以上置いた。その後, 4℃, 3,800rpmで15分間遠心分離し, 上清をすてRNAの白色沈殿にグアニジンチオシアネート試薬を1ml加え溶かし, 500μlずつ2本のエッペンドルフチューブに移し, 等量のイソプロパノールを加え, RNAを沈殿させ-20℃で保存した(グアニジンチオシアネートが入っ

ている状態では、RNAは分解されにくいので $-20^{\circ}\text{C}$ で長期保存できる)。

#### (2) RNAの定量及び20 $\mu\text{g}$ ずつの分注

沈殿したRNAをボルテックスで均等に混和し、その300  $\mu\text{l}$ を1.5mlのエッペンドルフチューブに移しとった。残りは次の使用時まで $-20^{\circ}\text{C}$ に保存した。移しとったRNAの懸濁液を $4^{\circ}\text{C}$ 、12,000rpmで15分間遠心分離し、上清を捨てRNAの沈殿を70%エタノールで洗浄し、10,000rpmで10分間遠心分離し上清を捨てた。70%エタノールでの洗浄は2回行った。上清が残らないように、エッペンドルフのイエローチップで完全に吸いとった後、デシケターに入れてアスピレーターで吸引し5分間乾燥させ、RNAの阻害剤であるDEPC (ジエチルピロカーボネート)を0.1%含む $\text{H}_2\text{O}$ を150  $\mu\text{l}$ 加え、冷室に1～3時間置き、時々ボルテックス (Vortex Genie 2, Scientific Industries, INC.)で攪拌して溶解させた。RNA濃度を知るために、RNA溶液を20  $\mu\text{l}$ とって980  $\mu\text{l}$ の水で50倍に希釈した後、紫外可視分光光度計 (日立 PERKIN ELMER Lambda 11 UV/VIS Spectrometer)で260nm、280nmにおける吸光度を測定した。RNAの濃度が1 mg/mlの時、260nmにおける吸光度は24なので、(式) RNA濃度 ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) =  $[A_{260} \times 50 (\text{希釈倍数}) \times 1 \text{ g/l}] / 24$ により、希釈前のRNA溶液1 mlあたりのRNA量を計算した。濃度決定後、RNAが20  $\mu\text{g}$ ずつ含まれるようにRNA溶液をとり、0.5mlのPCR用チューブに分注し、RNA溶液の1/10倍容量の3 M酢酸ナトリウム (pH5.2)、2.5倍容量のエタノールを添加ごとによく混和し、RNAを沈殿させ $-20^{\circ}\text{C}$ に次の使用時まで保存した。

その他の9時、11時、17時、22時、23時、23時45分、2時15分、4時30分にウサギを解剖して得たRNAは、同じ飼育条件のウサギの肝臓0.3 gから正徳ら<sup>7)</sup>により調製されたものを使用した。

#### 4. ノーザンブロッティング

ノーザンブロッティングは、Sambrookら<sup>11)</sup>の方法に従って行った。

20  $\mu\text{g}$ ずつ含むように分注して保存してあったtotal RNAを、微量遠心機 (Eppendorf Centrifuge 5415C)で10,000rpm、5分間遠心分離し、上清を捨て沈殿したRNAを70%エタノール100  $\mu\text{l}$ で洗浄した。遠心後、上清をよく除きアスピレーターで吸引乾燥し、5.6  $\mu\text{l}$ の0.1%-DEPC- $\text{H}_2\text{O}$ を加え10分間水中におきRNAを溶解させた。次に、6 Mグリオキサル 5.4  $\mu\text{l}$ 、DMSO (dimethyl sulfoxide) 16  $\mu\text{l}$ 、0.1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ バッファー (pH7.0) 3  $\mu\text{l}$ 加え、 $50^{\circ}\text{C}$ で1時間、次に水中において変性させた。変性後ただちに4  $\mu\text{l}$ のdye (50% glycerol-10mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH7.0)-0.25% bromophenol blue-0.25% xylene cyanol FF)を加えよく混合し、160mlのリン酸バッファー (10mM- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH7.0)で作成した1%アガロースゲル (Sea Kem GTG Agarose FMC Bio Products社)のwellに25  $\mu\text{l}$ 入れて、65V、90分間ペリスタポンプ (アトー株式会社)でバッファーを循環させながら定電圧装置 (Pharmacia LKB-GSP 200/400)を用いて、TAKARA HE-13型泳動槽で電気泳動を行った。ブロッティングによる差をなくす為に、15コーンを2列、計30 wellのゲルを用いた。また、12 $\alpha$ -水酸化酵素のmRNAの長さを知るために塩基数のわかっているマーカーRNA (GIBCO BRL)も同時に泳動した。

泳動後、RNAをナイロンメンブレン (Hybond<sup>TM</sup>-N Amersham Life Science社)にブロッ

ティングして移しとった。その方法は、ステンレスのバット（深さ 6 cm，幅16×21cm）に20×SSC（3 M塩化ナトリウム-0.3Mクエン酸ナトリウム，pH7.0）を500ml入れ，ガラス板をその上に置き，ワットマン 3 MMクロマトグラフィー用ペーパー（Amersham Life Science社）2枚を重ねて20×SSCにくぐらせて湿らせたものを，両端が20×SSCにひたるようガラス板上に置いた。電気泳動したゲルをペーパー上に置いて気泡を除き，ゲルのまわりをサララップで覆い，ナイロンメンブレンを2×SSCにひたしてゲルの上にのせ気泡を除いた。次に，その上にゲルと同じ大きさに切った3 MMペーパーを置き，キムタオル（十條キンバリ株式会社）を15cmの厚さほどのせ，さらにその上に1 kg程度の重りをのせた。20時間ブロッティングした後，キムタオルを除きナイロンメンブレンにゲルのwellの位置をボールペンで印をつけた後，2×SSCでさっと洗い，RNAをナイロンメンブレンに固定するために120mJの紫外線を照射した（UV Stratalinker<sup>TM</sup> 1800，フナコシ）。

また，RNAが分解していないか確認するために，グリオキザルで変性させdyeの入ったRNAの5  $\mu$  l を1 %アガロースのミニゲルで50V，30分間バッファーを循環させながらミニゲル電気泳動システム（ミューピッド2，アドバンス株式会社）で電気泳動した。次に，ゲルを200mlの50mMのNaOHで30分間振盪し，NaOH液を捨て，軽く水洗後，200mlの0.2M酢酸ナトリウム（pH5.5）にエチジウムブロマイド（5 mg/ml）を20  $\mu$  l 加えた液中で，30分間振盪しRNAの染色を行った。

## 5. ノーザンハイブリダイゼーション

ノーザンハイブリダイゼーションはnon RI法<sup>8)</sup>で，ベーリンガー社のマニュアルに従って行った<sup>12)</sup>。

### (1) プローブDNAの作製

コレステロール12 $\alpha$ -水酸化酵素（ウサギ）のプローブcDNAは黒木ら<sup>13)</sup>により調製されたものを用いた。pBluescript II-SK<sup>+</sup>ファージミド（東洋紡-STRATAGENE）にクローニングされたものを，制限酵素Sac Iで切り，TAEバッファー（0.04MTris-acetate-1mM-EDTA，pH8.0）を用いて作成した1% Low Melting agarose gel (Sea Plaque Agarose FMC Bio Products社) 中で泳動槽（ミューピッド2，アドバンス株式会社）を氷につけ50V，60分間の電気泳動を行った。泳動後，コーディング領域を含む1.1kbの長さのSac I断片のゲルをメスで切りとり，0.3 gを1.5mlエッペンドルフチューブに入れて70℃でゲルを溶かした後，Wizard PCR Preps DNA Purification System（Promega社）のレジン懸濁液1 mlを加えてゲル溶液と混合した。この混合液を，ミニカラムを3 mlの注射器の先に装着したものに入れ，注射器に圧をかけて液を流出させた。次に，80%イソプロパノール2 mlを注射器に入れ同様にしてカラムを洗浄した。最後に，ミニカラムを1.5mlのふたを切りとったエッペンドルフチューブにのせて，カラムに50  $\mu$  l のH<sub>2</sub>Oを入れ1分間放置し，20秒間10000×gで遠心して吸着していたDNA断片を流出させ分離，精製した。

### (2) DNAの標識

ジゴキシゲニン-dUTPを用いたDNAの標識には，DIG DNA 標識キット（Cat.No.1175033，ベーリンガー・マンハイム株式会社）を用いた。

(1) で作製した1.1kbの塩基数をもつDNA断片（100ng/ $\mu$  l）をエッペンドルフチューブ

に15  $\mu$ l (全量1.5  $\mu$ g) 入れ沸騰水中で10分間加熱した後, 5分間水冷しDNAを1本鎖に変性させた。次に10  $\mu$ l のヘキサヌクレオチドミックスをプライマーとして加え, 10  $\mu$ l のdNTP (デオキシヌクレオチドトリフォスフェイトのラベリングミックス), 60  $\mu$ l の滅菌蒸留水, 5  $\mu$ l のDNAポリメラーゼ (Klenow fragment) を入れ, 全体を100  $\mu$ l とし37°Cで20時間反応させ, ジゴキシゲニン-dUTPでラベルした。ラベリング後, 反応液量の1/10倍容量の0.2M EDTA (pH 8.0) を10  $\mu$ l 加え反応を停止させ, 反応液の1/10倍容量の4M塩化リチウム11  $\mu$ l と3.0倍容量の-20°C に冷却しておいた100%エタノールを330  $\mu$ l 加えて混和し, -70°Cで30分間静置してラベルされたDNAを沈殿させた。

次に, 13,000rpmで15分間遠心し上清を捨て, -20°C に冷却しておいた70%エタノール100  $\mu$ l でDNAの沈殿を洗浄した。洗浄は2回行った。洗浄後, 13,000rpmで15分間遠心し, 上清が残らないようにエッペンドルフのイエローチップで完全に吸いとった後, デシケーター中でアスピレーター吸引を行って5分間乾燥させ, 50  $\mu$ l のTEバッファー (10mM トリス塩酸-1 mM EDTA, pH8.0) に溶解させた。ラベルしたDNAは, 使用時まで-20°C に保存した。ラベリングは同じ条件で2回行った。即ち, 全量3.0  $\mu$ l のプローブDNAをラベルした。

### (3) ジゴキシゲニン-dUTPでラベルされたプローブDNAの収量検定

ラベルされたプローブDNAの量を検定するために, ラベルされたプローブDNA溶液を2  $\mu$ l とり38  $\mu$ l のDNA希釈バッファー (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0) 中にニシンの精子DNAを50  $\mu$ g/mlに溶解したもの) に入れ20倍希釈液を作った。さらに, これを10倍ずつ希釈した倍数希釈液を作り, ナイロンメンブレン (Hybond<sup>TM</sup>-N, Amersham社) に1  $\mu$ l ずつスポットした。また, 比較用にキット中に入っているラベル済みのコントロールDNA (pBR 328を5.2ng/ $\mu$ l 含む) も同じように希釈液を作り, 同様に1  $\mu$ l ずつスポットした。メンブレンを120mJの紫外線 (UV Stratalinker<sup>TM</sup> 1800 フナコシ) にあてDNAを固定させた。次に, ナイロンメンブレンをバッファー 1 (0.1Mマレイン酸-0.15M塩化ナトリウム, pH7.5) 30ml 入ったステンレスバット中に入れて5分間シェイカー (Personal 11, TAITEC) で振盪した。次に, これを捨ててバッファー 2 (バッファー 1にブロッキング試薬を10%となるように溶かしたもの) で30分間振盪した後, 20mlのバッファー 2に4  $\mu$ l のアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を入れた抗体の5000倍希釈液中で30分間振盪し, メンブレン上のジゴキシゲニンと反応させた。その後, 抗体溶液を捨てて30mlのバッファー 1で15分間を2回, 30mlのバッファー 3 (100mM トリス塩酸-100mM塩化ナトリウム-50mM塩化マグネシウム, pH9.5, 20°C) で2分間振盪し, pHをアルカリフォスファターゼの至適pHにした。バッファー 3を捨て, 200  $\mu$ l のNBT/BCIP溶液 (ニトロブルー テトラゾリウム塩 / 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-フォスフェート) を10mlのバッファー 3に入れた発色基質を遮光下でメンブレンの上に静かに流し, そのまま静置してアルカリフォスファターゼにより基質を加水分解して, 加水分解物とニトロブルー テトラゾリウム塩による発色反応を進行させた。望みの濃度に達した時, 50mlのTEバッファーで5分間インキュベートし発色反応を停止させた。キット中のラベル済みコントロールDNAと12 $\alpha$ -水酸化酵素cDNAの1.1kbプローブDNAのシグナル濃度を比較して, ジゴキシゲニン-dUTPでラベルされたプローブDNAの収量を推定した。

(4) プレハイブリダイゼーション

RNAをプロットしたメンブレン (10cm×13cm) は0.1×SSC (15mM塩化ナトリウム-1.5mMクエン酸-3-ナトリウム, pH7.0) 1ℓをステンレスバットに入れ、沸騰させた中で20分間加熱してグリオキザールを分解させた。ハイブリダイゼーション用ナイロンバックにメンブレンを入れ、メンブレン10cm×10cmにつき20mlのハイブリダイゼーション液 (DIG Easy Hybペーリンガー・マンハイム株式会社) を入れ、気泡が入らないように注意して閉じメンブレン全体に溶液がまんべんなく広がるようにして、37℃で3時間プレハイブリダイゼーションを行った。

(5) ハイブリダイゼーション

次に、プレハイブリダイゼーション液を捨ててバックからメンブレンを取り出し、新しいバックにメンブレンを入れた。50mlのファルコンチューブに10mlのハイブリダイゼーション液を用意し、さきにラベルしたプローブ (50μℓのTEバッファーに溶かしたものが2本) を沸騰水中で10分間加熱した後、5分間水冷しDNAを1本鎖に変性させその中に加え、準備しておいた新しいバックにプローブの入ったハイブリダイゼーション液を加え、気泡が入ないように注意して閉じ、37℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。

(6) メンブレンの洗浄

ハイブリダイゼーション終了後、バックの中のプローブを含むハイブリダイゼーション液は、50mlのファルコンチューブに移し-20℃で保存した。ラベルされたDNAは1年間保存でき、再利用時は解凍して沸騰水で10分間加熱し、プローブを1本鎖にしてから使用した。

バックからメンブレンを取り出し0.1% SDS-2×SSCが100ml入ったステンレスバット中に移し室温で5分間、2回洗浄し、引き続き200mlの0.1%SDS-0.1×SSCが入ったふた付きポリプロピレンの容器にメンブレンを移し、50℃で15分間振盪した。液を捨て同じ操作をさらにもう一度行って洗浄した。

(7) ジゴキシゲニン-dUTPでラベルされたコレステロール12α-水酸化酵素cDNAがハイブリダイズしたmRNAの免疫学的検出

洗浄の終わったメンブレンは、150mlのバッファー1 (0.1Mマレイン酸-0.15M塩化ナトリウム, pH7.5) の入ったステンレスバット中で5分間振盪した後、100mlのバッファー2 (バッファー1にブロッキング試薬を10%となるように溶かしたもの) で30分間振盪した。次に、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体をバッファー2で5,000倍希釈 (12μℓの抗体/60mlのバッファー2) した溶液中で30分間振盪し抗原抗体反応をさせた。その後、抗体溶液を捨てて150mlのバッファー1で15分間振盪して2回洗浄し、バッファー3 (100mMトリス塩酸-100mM塩化ナトリウム-50mM塩化マグネシウム, pH9.5) 150mlで2分間振盪し、pHをアルカリフォスファターゼの至適pHにした。バッファー3を捨て、1.2mlのNBT/BCIP溶液 (ジメチルフォルマミドで溶解されたニトロブルーテトラゾリウム塩/5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-フォスフェート) を60mlのバッファー3に入れた溶液を遮光下、暗室でメンブレンの上に静かに流しそのまま静置して発色反応を進行させた。一晩置き、望みの濃度に達した時、50mlのTEバッファーで5分間インキュベートし発色反応を停止させた。発色の終わったメンブレンはシールバックに入れTEバッファーの中で保存した。



## <結果及び考察>

### 1. ウサギの体重変化

飼育中のウサギの体重は、図2に示すように、予備飼育及び本飼育を通して、ウサギ①を除いてそれぞれゆるやかに増加し、ウサギは全て健康であった。

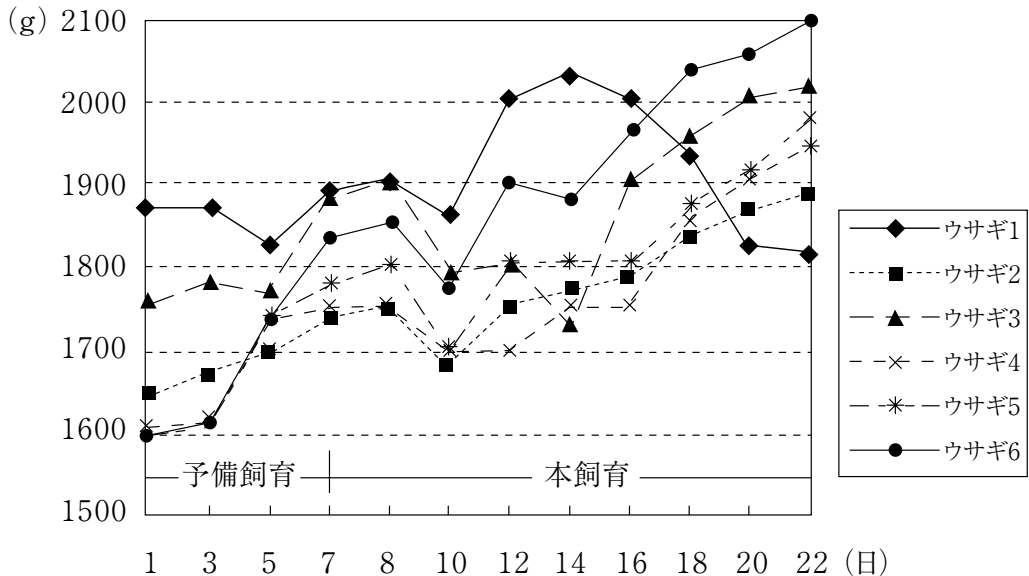


図2 ウサギの体重変化

ウサギは1週間の自由摂食後、8時から14時の昼間の6時間に摂食時間を限定する本飼育を2週間行った。

### 2. RNAの収量

各時間ごとに解剖したウサギの肝臓から調製したRNAの収量と260nmと280nmにおける吸光度の比 ( $A_{260}/A_{280}$ ) を表1に示した。

肝臓のtotal RNAの収量は、ウサギ⑥を除いて摂食に伴い上昇していた。

また、RNAの純度は、 $A_{260}/A_{280}$ が1.7~2.0になった時が理想的である。これは、タンパク質の吸収が280nmであるので、 $A_{260}/A_{280}$ が低いということは、タンパク質（不純物）が多く含まれているということである。今回の実験では、 $A_{260}/A_{280}$ が1.51~1.94の間にありややばらつきがあるが、全体としては純度の高いRNAが調製できたことがわかった。

### 3. ノーザンハイブリダイゼーション

#### (1) ラベルされたプローブDNAの収量検定

キット中のラベル済みコントロールDNAは、50  $\mu\text{l}$  中に1  $\mu\text{l}$  のpBR 328 鋳型DNAと260ngの標識DNAを含むので標識DNA濃度は5.2ng/ $\mu\text{l}$  である。メンブレンにコントロールDNAの希釈液と自分でラベルしたプローブDNAの希釈液をスポットし、発色の程度を比較した。図3に示すようにコントロールDNAは200倍希釈まで発色しており、一方、プローブDNAはその10

ウサギ No. (解剖した時間)	50倍RNA希釈			Total RNA (肝0.3 g) (mg)	Total RNA RNAの収量 (mg)
	(A260)	(A280)	A260/A280		
① 18:00	0.382	0.225	1.69	0.795	2.651
② 7:10	0.371	0.246	1.51	0.770	2.569
③ 7:55	0.426	0.220	1.94	0.887	2.956
④ 8:05	0.485	0.308	1.58	1.004	3.346
⑤ 8:30	0.493	0.262	1.88	1.027	3.423
⑤ 8:50	0.164	0.087	1.88	0.341	1.136

表1 RNAの定量

倍希釈の2,000倍希釈まで発色しているの、52ng/ $\mu$ l のラベルされたDNAが得られたことがわかった。したがって、プローブ液50ul中には2.6  $\mu$ gのラベルされたDNAが含まれていることがわかった。

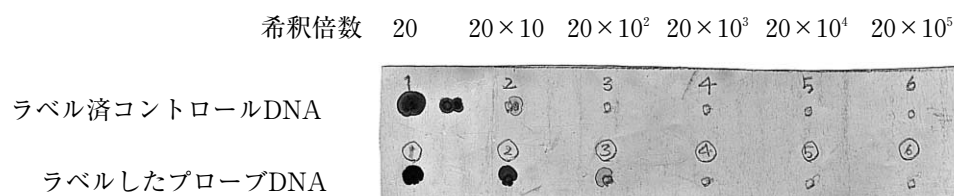


図3 ラベルされたプローブDNAの収量検定

## (2) 12 $\alpha$ -水酸化酵素のmRNAの免疫学的検出

8時に摂食を開始し、14時に摂食を終止する飼育を2週間行ったウサギから、各時間毎に肝臓を摘出しRNAを調製して行ったノーザンハイブリダイゼーションの結果を図4に示した。シグナルの濃さを各時間毎のRNAと比較すると、著しい差は認められなかった。しかし、7時10分（絶食17時間10分後）、7時55分（絶食17時間55分後）に比較して、8時30分（摂食開始30分後）、9時（摂食開始1時間後）では、微妙ではあるがシグナルが濃くなっており、摂食によるmRNAの上昇が認められた。さらに、11時（摂食開始3時間後）では9時より微妙ではあるがmRNAの上昇が認められた。また、17時はすでに絶食後3時間たっているが、11時と同程度のmRNA量がみられることから、まだ摂食の影響が残っているものと思われる。その後、絶食の時間経過により22時（絶食開始8時間後）、23時（絶食開始9時間後）、2時15分（絶食開始12時間15分後）、4時30分（絶食開始14時間30分後）と絶食時間が長くなるにつれてシグナルが薄くなっておりmRNA量が減少していくことが観察された。コレステロール7 $\alpha$ -水酸化酵素のノーザンハイブリダイゼーションと比較すると、図5に示すように、コレステロール7 $\alpha$ -水酸化酵素のmRNA量は、11時が最大値であり22時には顕著に低く、摂食によるmRNA量の増加と絶食によるmRNA量の減少がはっきりと示されている<sup>7)</sup>。

しかし、コレステロール12 $\alpha$ -水酸化酵素では、摂食によりmRNA量はわずかに上昇するが、コレステロール7 $\alpha$ -水酸化酵素ほど顕著な上昇は見られなかった。ノーザンハイブリダイゼーションのインターナルコントロール（比較するものさし）として、肝臓で常に同じ量のmRNA

が作られている解糖系中のG 3 PDH（グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素）が利用されている。この実験での、9時、11時、17時、22時、23時、2時15分、4時30分のRNAは正徳らが調製したものをを用いた。これらのG 3 PDHのmRNAは、図5に示すようにどの時間も一定だったので、今回の実験（図4）ではG 3 PDHによるコントロール実験は行わなかった。

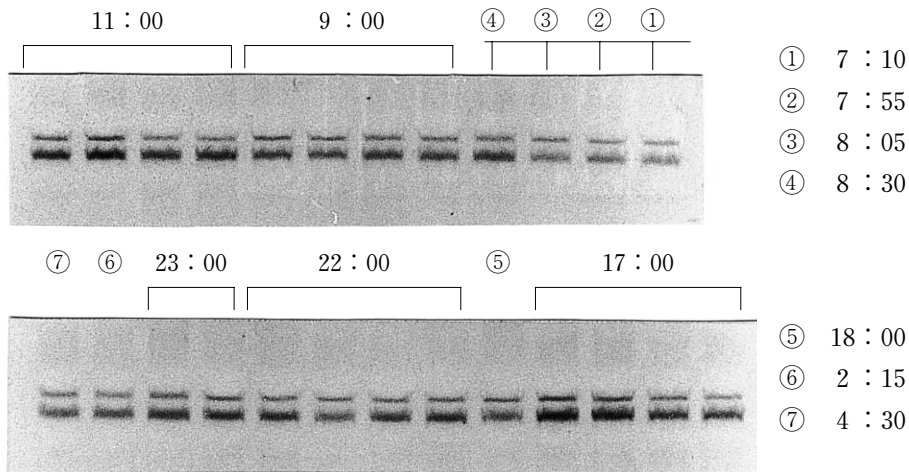


図4．コレステロール12 $\alpha$ -水酸化酵素 mRNA量の摂食及び絶食による影響

12 $\alpha$ -水酸化酵素のcDNAプローブによるノーザンハイブリダイゼーションは、各時間毎に解剖したウサギの肝臓のtotalRNA20  $\mu$ gを変性後、電気泳動しナイロンメンブレンにプロットングして行った。①②③④⑤以外のRNAは、正徳らが調製したものをを用いた。

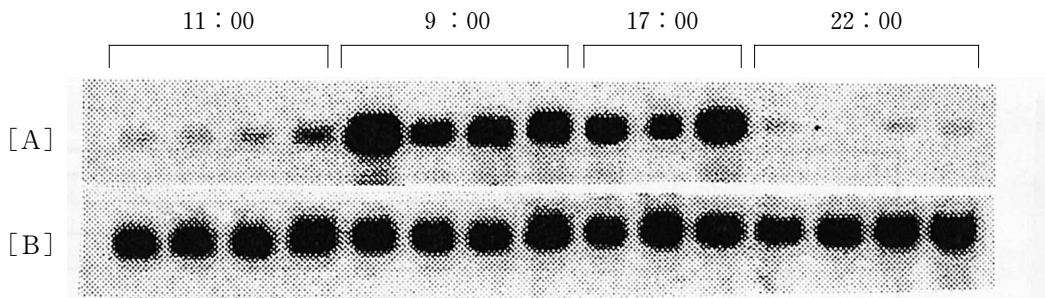


図5．コレステロール7 $\alpha$ -水酸化酵素とglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G 3 PDH) mRNA量に対する摂食及び絶食の影響<sup>5)</sup>

A. コレステロール7 $\alpha$ -水酸化酵素

B. glyceraldehyde-3-phospha dehydrogenase (G 3 PDH)

ノーザンハイブリダイゼーションに用いたRNAが分解していないことを確認するために1%アガロースのミニゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した結果を図6に示した。28S, 18S, 5.8SのリボゾームRNAがはっきり染色されており、このことから分解されていないmRNAを用いたことが確かめられた。

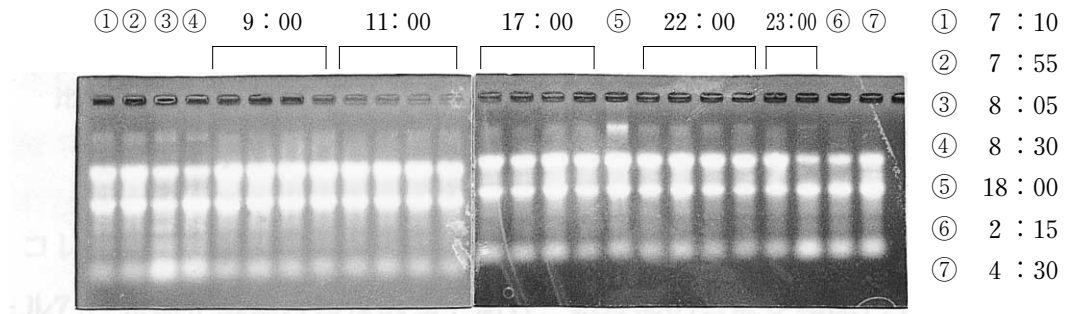


図6. RNAの染色

ノーザンハイブリダイゼーション(図4)に用いた変性RNAを電気泳動し、50mM-NaOHで30分間振盪後、2 M酢酸ナトリウム (pH5.5, 500ng/mlーエチジウムブロマイド) で染色した。

コレステロール12 $\alpha$ -水酸化酵素のmRNAは、図4に示すように、二種類あることが確認された。マーカー RNA (GIBCO BRL) の塩基数と泳動距離を片対数のグラフにした(図7)。コレステロール12 $\alpha$ -水酸化酵素の二種類のmRNAは、2 cmと2.3cm泳動したので塩基数は、3.9kbと2.8kbであることがわかった。コレステロール12 $\alpha$ -水酸化酵素のクローニングは、スウェーデンのEggertsenら<sup>14)</sup>によりなされ、そのcDNAはアミノ酸500個のコーディング領域をもつ全長2.9 k塩基であり、mRNAは3.9kbのものと2.9kbの二種類あると報告されており、今回の実験とほぼ同じであった。

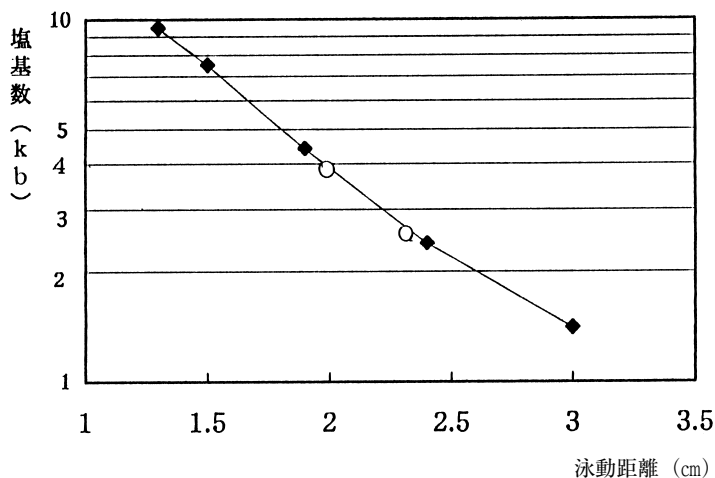


図7. コレステロール12 $\alpha$ -水酸化酵素mRNAの長さ(塩基数)

塩基数の判明しているRNA (9.5kb, 7.9kb, 4.4kb, 2.4kb, 1.4kbをそれぞれ500ng含む) マーカー RNA 3  $\mu$  l に2.6  $\mu$  lの水を加え、変性後、ノーザンハイブリダイゼーション用のRNAと同じゲルの一番端のwellに入れ、電気泳動した。泳動後、マーカーRNAのレーンを切りとり、50mM-NaOH中で30分、2 M酢酸ナトリウム (pH5.5, 500ng/mlエチジウムブロマイド) 中で30分染色した。染色された各マーカー RNAの泳動距離を測り、12 $\alpha$ -水酸化酵素mRNAの泳動距離と比較した。(◆マーカー RNA, ○12 $\alpha$ -水酸化酵素mRNA)

コレステロールから胆汁酸を合成する一連の酵素の中で、最初の反応を行うコレステロール 7 $\alpha$ -水酸化酵素は律速酵素であり、胆汁酸の合成を調節している。Gielenら<sup>15)</sup> はラットにおいて、7 $\alpha$ -水酸化酵素の活性が昼低く、夜高いという日内リズムがあることを見出し、このリズムは明暗とラットが夜間に摂食することにより形成されているのではないかと推定し、摂食時間を昼間に限定したところ、リズムが逆転することを見出した。一方、ウサギにおいてもKaiらにより、コレステロール 7 $\alpha$ -水酸化酵素の酵素活性とmRNA量は夜10時に最大、朝10時に最小になり日内リズムがあることが報告されている<sup>6)</sup>。正徳、枝松らはウサギにおいて摂食時間を昼間の8時から14時に限定して、そのリズムの変化を検討したところ、Kaiらのリズムとは逆転して夜10時には最小になり朝11時には最大になることを見出した<sup>7)</sup>。

コレステロール12 $\alpha$ -水酸化酵素については、日内リズムの詳しい研究は殆どないが、ラットにおいてコレステロール 7 $\alpha$ -水酸化酵素と同じような日内リズムがあることが近年見いだされた(山田ら、私信)。しかし、摂食によるコレステロール12 $\alpha$ -水酸化酵素の変動についてはまだ報告されていない。今回、摂食時間を昼間に限定したウサギでのコレステロール12 $\alpha$ -水酸化酵素のmRNA量の変動を検討したところ、コレステロール 7 $\alpha$ -水酸化酵素のような顕著な変動はないが、摂食による弱いリズムの逆転がみられることが判明した。

本酵素は、Wikvallら<sup>16)</sup> によるとラットでは絶食によって活性が上昇することが知られている。3日間の絶食により酵素活性は約5倍に上昇するという。しかし、今回の実験では絶食中に上昇は見られず、かえって絶食によりそのmRNA量は、やや減少していることがわかった。

肝臓で合成される胆汁酸は主として、コール酸とケノデオキシコール酸から成る。胆汁酸合成経路(図1)からわかるように本酵素は、7 $\alpha$ -ヒドロキシ-4-コレステレン-3-オンからコール酸へ変換される経路と、12 $\alpha$ -水酸化を受けることなく $\Delta$ 4-3-オキソステロイド5 $\beta$ -リダクターゼの作用を受け、ケノデオキシコール酸へと変換される経路の分岐点に位置する酵素である。したがって、本酵素はコール酸とケノデオキシコール酸の生成比を決定する重要な酵素であることがわかる。ウサギの胆汁酸ではコール酸が多く、ケノデオキシコール酸が少ないことが知られおり、他の動物に比べてコレステロール12 $\alpha$ -水酸化酵素活性が高い<sup>14)</sup>。そのため、ラットのような絶食による上昇が見られなかったのかもしれないと思われる。

## <要約>

胆汁酸合成酵素のひとつであるコレステロール12 $\alpha$ -水酸化酵素について、コレステロール 7 $\alpha$ -水酸化酵素と同じように、そのmRNAの合成量は摂食時間の影響を受けるかどうか検討した。

ウサギ(日本白色種、雄、2ヶ月齢)を用い、1週間予備飼育後400gの固形飼料を8時から14時の昼間に限定して与え2週間本飼育した。各時間毎にエーテル麻酔し、心臓穿刺による採血後、肝臓を摘出してAGPC法によりRNAを調製し、コレステロール12 $\alpha$ -水酸化酵素のcDNAをプローブにして、そのmRNAの発現量をnon RI法<sup>6)10)</sup>によるノーザンブロットハイブリダイゼーションで比較検討した。

その結果、コレステロール12 $\alpha$ -水酸化酵素のmRNA量は、微妙ではあるが摂食により上昇することがわかった。すなわち、コレステロール12 $\alpha$ -水酸化酵素の日内リズムは、摂食によって

弱いリズムの逆転がみられることが判明した。しかし、コレステロール 7 $\alpha$ -水酸化酵素ほど顕著な変化は見られなかった。

<文献>

- 1) Bloch, K., Berg, B. N. & Rittenberg, D. 1943. Biological conversion of cholesterol to cholic acid. *J. Biol. Chem.* **149** : 511-517.
- 2) Haslewood, G. A. D. 1964. The biological significance of chemical differences in bile salts. *Biol. Rev.* **39** : 537-574
- 3) Danielsson, H. 1973. *The Bile Acids* Nair, P. P., & Kritchevsky, D., Editor. Plenum Press, New York : 1-32.
- 4) Carey, M. C. 1982. *The Liver Biology and Pathobiology* Arias, I., Popper, H., Schachter, D., & Shafritz, D. A., Editor. Raven Press, New York : 429-465.
- 5) 牧野勲, 中川昌一. 1980. 胆汁酸. 中外医学双書 : 10-22.
- 6) Kai, M-H., Eto, T-A., Kondo, K-H., Setoguchi, Y., Maeda, Y., Higasi, S. & Setoguchi, T. 1995. Synchronous circadian rhythms of mRNA levels and activities of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase in the rabbit and rat. *J. Lipid Res.* **36** : 367-373.
- 7) 正徳千恵, 枝松敦子, 吉田みゆき, 指宿りえ, 瀬戸口賀子 1996. Cholesterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase mRNAの摂食による変動. 第50回日本栄養・食糧学会 西日本支部 第29回日本栄養・食糧学会 中国・四国支部合同大会 講演要旨集. 40
- 8) 野村慎太郎, 稲澤譲治 1994. DIGハイブリダイゼーション. 脱アイソトープ実験プロトコール 細胞工学分冊 9 秀潤社 : 45-60.
- 9) Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. Single-step method for RNA isolation by acid guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162** : 156-159.
- 10) 辻 孝, 中村敏一. 1991. 速くて確実なRNA分離法 (AGPC法). 実験医学, **9** : 99-101.
- 11) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 7. 37-7. 51.
- 12) 1997. DIGシステムを用いてハイブリダイゼーションを行うためのユーザーガイド, ベーリンガー・マンハイム著作権所有 : 24-49.
- 13) 準備中
- 14) Eggertsen, G., Olin, M., Andersson, U., Isida, H., Kubota, S., Hellman, U., Okuda, K., and Bjorhem, I. 1996. Molecular Cloning and Expression of Rabbit Sterol 12 $\alpha$ -Hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **271** : 32269-32275.
- 15) Ramirez, M.I., Karaoglu, D. and Haro, D. 1994. Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase expression at the transcriptional level in culture and in transgenic mice. *Mol Cell Biol.* **14** : 2809-2821.
- 16) Wikvall, K., Bostrom, H., Hansson, R. & Kalles, I. 1982. *Microsomes, Drug Oxidations, and Drug Toxicity*. Sato, R. & Kato, R. Editor. Japan Scientific Societies Press, Tokyo. 265-278.