

Cholesterol 7 α -Hydroxylase 及び Cholesterol 12 α -Hydroxylase mRNA の合成に対するインスリンの影響

酒 匂 麻紀子, 瀬戸口 賀 子

Effects of Scheduled Daily Feeding Time and Insulin on the mRNA Synthesis of Cholesterol
7 α -Hydroxylase and Cholesterol 12 α -Hydroxylase

Makiko Sakoh and Yoshiko Setoguchi

肝臓で、コレステロールからの胆汁酸生合成をおこなう初発酵素である Cholesterol 7 α -hydroxylase は、その mRNA 合成量に、夜間高く昼間低い遺伝子発現の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。

また肝臓で主として合成される、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 Cholesterol 12 α -hydroxylase 酵素の mRNA 合成についても Cholesterol 7 α -hydroxylase と同じような日内リズムがあり、摂食によるリズムの変動も弱いながら認められている。このような摂食による変動が現れる理由を明らかにするために、摂食時間を昼間に限定したウサギについて、最後に摂食させるかわりに、インスリンを投与し Cholesterol 7 α -hydroxylase および Cholesterol 12 α -hydroxylase の mRNA 合成の変動を見た。その結果、Cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA の合成はインスリン投与によって、摂食と同様に日内リズムの著しい逆転がみられ、また Cholesterol 12 α -hydroxylase mRNA についても摂食により弱い日内リズムの逆転が観察された。この結果より、摂食による Cholesterol 7 α -hydroxylase および Cholesterol 12 α -hydroxylase の日内リズムの変動は、摂食により分泌されるインスリンの作用もその一因と推定される。

Key words : [Insulin] [Cholesterol 7 α -hydroxylase] [Cholesterol 12 α -hydroxylase] [Circadian rhythm] [Scheduled daily feeding]

(Received November 6, 2000)

<緒言>

胆汁酸はもっとも代表的なコレステロールの代謝産物である。ヒトやラットでは体内代謝性のコレステロールの80～90%が肝臓で胆汁酸に転換される。胆汁酸は脂質の消化吸収に不可欠であり、その合成は食事由来のコレステロールの量に影響されている¹⁾。

コレステロールから生成される1次胆汁酸にはコール酸とケノデオキシコール酸がある。コレステロール7 α -水酸化酵素は胆汁酸合成を行う第1段階の酵素であり、また胆汁酸生成量の調節を行う律速酵素でもある。12 α -水酸化酵素はコール酸とケノデオキシコール酸への合成の分岐点において、コール酸合成へ導く酵素である。7 α -水酸化酵素はラットやウサギにおいて、夜に酵素活性及び、そのmRNAレベルが高く、昼は低い日内リズムをもつことが知られている²⁾。このリズムは、ウサギにおいて食事時間を昼間に限定すると、昼間にmRNAの上昇がみられ、夜間には下降するリズムの逆転がみられることが枝松、正徳らによって報告されている³⁾。また、ウサギは12 α -水酸化酵素活性が高いといわれるが¹⁾、この酵素のmRNA量も摂食によって上昇することが立野によって報告されている⁴⁾。

胆汁酸合成には食事による影響のほかに、種々のホルモンの影響を受ける可能性があるといわれている。ラットでは胆汁酸合成の日内変動に対する副腎皮質ホルモンの影響や甲状腺ホルモンによる合成促進の可能性などが知られている⁵⁾。

本研究では、摂食によって7 α -水酸化酵素及び、12 α -水酸化酵素のmRNAレベルが上昇する現象が、摂食によって分泌の増加するホルモンの影響ではないかを検討するため、摂食時間を昼間に限定してリズムの逆転がみられるウサギに、食事のかわりにインスリンを投与し各時間ごとに肝臓を摘出してRNAを調製し、ノーザンハイブリダイゼーションによって、コレステロール7 α -水酸化酵素とコレステロール12 α -水酸化酵素のmRNAの合成量を調べた。そして、インスリンを投与せず摂食時間を昼間に限定し、これらの酵素の日内リズムが逆転しているウサギの各々の酵素mRNA合成量と比較検討した。

<実験方法>

1. 試薬

試薬は全て特級のものを使用した。

フェノール、8-ヒドロキシキノリン、トリスヒドロキシメチルアミノメタン、2-メルカプトエタノール（含硫蛋白質研究用特級試薬）、酢酸ナトリウム三水和物、酢酸、グアニジンチオシアン酸塩（生化学研究用特製試薬）、N-ラウロイルサルコシンナトリウム、イソプロパノール、エタノール、クロロホルム、イソアミルアルコール、DMSO〔ジメチルスルホキシド（生化学研究用特製試薬）〕、ラウリル硫酸ナトリウム〔SDS, Sodium Dodecyl Sulfate（難溶性蛋白質研究用特製試薬）〕、エチルエーテル 以上〔ナカライテスク〕、グルコースCⅡ-テストワコー（体外診断用医薬品）〔和光純薬工業〕、インスリン（HUMULIN®R）〔日本イーライリリー〕、卵白リゾチーム〔SIGMA CHEMICAL CO.〕、RIBONUCLEASE A〔SIGMA CHEMICAL CO.〕

DIG DNA Labeling AND Detection Kit [ベーリンガー・マンハイム]

2. ウサギの飼育

日本白色種の雄, 2ヶ月齢(体重: 1.5~2.0kg)のウサギ12匹を1週間の予備飼育後, 3週間の本飼育を行った。予備飼育は, ウサギが自由に摂食と摂水ができるようにした。本飼育は8時に400gの餌を与え14時に餌を抜き, 摂食時間を6時間に限定した。水は自由に摂れるようにした。飼料はCLER-CR 3(日本クレア)を使用した。体重は, 摂食前の8時前に測定した。

3. インスリン投与とウサギの解剖

本飼育開始後21日目は, 8時に餌を与えるかわりに, ヒトインスリン2単位(50 μ l)を10匹に皮下注射した。また, 2匹のウサギについてはコントロールとしてインスリンは投与せず, そのまま絶食状態を続けた。12匹のウサギは各々, 9時, 11時, 11時50分, 14時, 14時50分, 15時, 16時に解剖した。解剖は, エーテル麻酔し, 開腹, 心臓穿刺による採血後直ちに0.3gの肝臓を摘出し, RNA調製を行った。

4. RNAの調製

AGPC法(Acid Guanidium-thiocyanate-Phenol-Chloroform method)⁶⁾により, RNAの調製を行った。

SolutionD(4M グアニジンチオシアネート - 25mM クエン酸ナトリウム - 1.5%N-ラウリルサルコシナトリウム塩 - 0.1M - 2-メルカプトエタノール)を, 50mlファルコンチューブに10mlずつ分注しておき, 摘出した0.3gの肝臓を入れ超高速万能ホモジナイザー(日本医理科機器製作所)でホモジナイズした。1mlの2M-酢酸ナトリウム(pH4.0)を加え混和し, 10mlのTris-HClバッファー(pH8.0)飽和フェノールを加えて混和した。次に2mlのクロロホルム・イソアミルアルコール(49:1)を加えて20秒激しく振り混ぜて水中に15分間静置した後, 3,500rpm, 4℃で20分間遠心分離し, 上清を別のファルコンチューブに移した。上清と等量のイソプロパノールを加えて混和し, -20℃で1時間以上放置してRNAを沈殿させた。

このRNA懸濁溶液を4,000rpm, 4℃で15分間遠心し, 上清を捨て, SolutionDを2mlずつ加えてボルテックスし沈殿しているRNAを再溶解させ, 500 μ lずつ1.5mlエッペンドルフチューブに分注し, 等量のイソプロパノールを加えよく混和し-20℃で20時間以上静置し再沈殿させた。12,000rpm, 4℃で5分間遠心し, 上清を捨て70%エタノールを150 μ l加えてボルテックス(Scientific Industries)で攪拌して, 12,000rpm, 4℃で5分間遠心し洗浄した。この操作を2回行いRNA沈殿を洗浄した。遠心後, 上清をイエローチップでよく吸い取り, 吸引デシケーター(小島硝子工業株式会社)に入れアスピレーターで5分吸引し, 残っているエタノールを除いてRNAを減圧乾燥させた。ノーザンブロット用RNAを各チューブに20 μ gずつ含むようにするために, 以下の操作を行った。RNAを1%DEPC(ジエチルピロカルボネート)-H₂Oに各々溶解させた。溶解に用いた1%DEPC-H₂Oの量は, 沈殿の量を目測して, 300 μ lから800 μ lの間とした。

RNA溶液の濃度を知るために, 蒸留水980 μ lにRNA溶液20 μ l加え, 50倍希釈液を作り, ラムダII型紫外可視分光光度計(パーキンエルマージャパン)で260nm及び280nmにおける吸光度を測定した。260nmにおける吸光度が1の時, RNA濃度が40 μ g/mlなので, 比例計算し

てRNA溶液1 μ l中に含まれるRNAの μ g数を求め、RNAを20 μ gずつ含むようにRNA溶液を0.5mlのPCR用チューブに分注し、各々のRNA溶液の1/10容量の3M-酢酸ナトリウムを加えて混和後、2.5倍量のエタノールを加え混和し、 -20°C に保存した。

5. 7 α -水酸化酵素 c DNAよりプローブDNAの調製

1. 形質転換

Rabbit-7 α -水酸化酵素のプローブは甲斐ら⁷⁾により恵与された7 α -水酸化酵素遺伝子を含むプラスミドDNAを用いた。

形質転換はMondelら⁸⁾の方法に従って行った。XLI-blueコンピテントcell (東洋紡) 50 μ lを、氷冷してある15mlのファルコンチューブに入れ、p Bluescript II - SK⁺ファージミド (2.6Kb) (東洋紡, STRATAGENE) にRabbit-7 α -水酸化酵素の遺伝子を組み込んだプラスミドDNAを2 μ l (20ng) 入れ、氷中に20分間置いた。 42°C に2分間つけヒートショックを行った。LB液体培地〔1%Bacto-tryptone 0.5%Yeast-Extract (DIFCO LABORATORIES) 0.5%NaCl〕を1ml入れて、 37°C で60分間振盪培養し、原液、10倍、100倍の各々の希釈液をアンピシリン50 μ g/ml入りのLB寒天培地に200 μ lずつスプレッドし、 37°C で2夜培養した。

2. プラスミドDNAの分離

p Bluescript II - SK⁺にRabbit-7 α -水酸化酵素の遺伝子を組み込んだプラスミドDNAの分離はアルカリ溶解法⁹⁾に従って行った。50 μ g/mlのアンピシリン入りLB培地のコロニーを、アンピシリン入りLB液体培地が2ml入った滅菌試験管に植え付け、 37°C で1夜振盪培養した。翌朝、100 μ lとり、50mlのLB液体培地 (アンピシリン50 μ g/ml) に植えつけて、 37°C で7時間振盪培養した。培養液を氷冷し、ファルコンチューブに40ml移して4,000rpm、 4°C で10分間遠心し大腸菌を沈殿させ、上清を捨てた。氷中に5分置いた後、ボルテックスして固まりがない均一な懸濁液にした。

滅菌ピペットで3mlのSolution I〔50mM Glucose-25mM Tris-10mM EDTA (pH8.0) に卵白リゾチーム5mg/mlを含む溶菌液〕を加えて、ボルテックスして菌を懸濁し、室温で3分間放置した。6mlのSolution II (1% SDS - 0.2N NaOH) を加え、パラフィルムをして素早く静かに混和し菌の細胞壁を溶解させた。氷中に10分放置した後4.5mlのSolution III (0.2M酢酸ナトリウム, pH5.2) を加え、ふたをして激しく上下にふり混和させた。氷中に10分放置し、4,000rpmで20分遠心して上清を別のファルコンチューブに移した。6/10容量のイソプロパノール (8.1ml) を加えふたをしてよく混和し、室温で20分以上置き、プラスミドDNAを沈殿させた。3,500rpmで15分遠心して、上清を捨て沈殿物に3mlの70%エタノールを入れてボルテックスし洗浄した。3,500rpmで10分間遠心し、上清を完全に除いた後、10分間アスピレーターで吸引減圧乾燥させた。沈殿に2mlのTEバッファー (10mM Tris-1mM EDTA, pH8.0) を加えて完全に溶解させ、RNase (SIGMA RIBONUCLEASE A, SIGMA CHEMICAL CO.) を4 μ l加え最終濃度が20 μ g/mlになるようにして室温に20分置き、混在するRNAを分解した。

次にTris-HClバッファー (pH8.0) 飽和フェノールを等量加えてよく混和し、4,000rpmで20分間遠心し、上清を別のファルコンチューブに移した。等量のクロロホルムを加え、混

在するフェノールをクロロホルム層へ移行させ、再び4,000rpmで15分間遠心し上清を別のファルコンチューブに移した。次にエーテルを等量加え、混在するクロロホルムをエーテル層に移行させて同じ条件で遠心し、パスツールピペットで上清のエーテルを取り除いた。下層のDNAを含む水溶液は、エーテルを完全に除くため、37℃ の恒温槽につけ時々振り、エーテル臭がなくなったら、3 M酢酸ナトリウム (pH5.6) を容量の1/10量入れて混和し、容量の2.5倍量のエタノールを加えて-20℃ に置きDNAを沈殿させた。

3. 制限酵素Sma I によるDNAの分解

沈殿させたDNAを3,500rpmで15分間遠心して上清を捨て、沈殿に70%エタノールを3 ml 加えてボルテックス洗浄し同じ条件で遠心した。上清を捨てアスピレーターで10分間吸引して減圧乾燥させ、TEバッファーを200 μ l加えプラスミドDNAを調製した。7 α -水酸化酵素のコーディング領域を含むDNA断片を得るために、プラスミドDNA溶液150 μ lを1.5mlエッペンドルフチューブに移し、10 μ lの制限酵素Sma I (20U/ μ l, NEW ENGLAND BioLabs Inc.), 20 μ lのバッファー T (330mM - Tris acetate - 0.1M - Mg acetate - 5mM - Dithiothreitol - 0.6M - K acetate), 2 μ lのBSA (10mg/ml) を加えて、最終濃度が200 μ lになるように18 μ lの滅菌水を加えた。30℃ で1夜インキュベートした。

4. 低融点アガロース電気泳動によるプローブDNAの分離

0.01% - エチジウムブロマイド入りの0.7% - low melting agarose (SEA PLAQUE AGAROSE, FMC) 150mlをミニゲル作製装置 (TAKARA) に流し込みゲルを作製した。

Sma I - 反応液150 μ lにDye (0.25% - bromo phenol blue - 0.25% - xylene cyanol FF - 30% - glycerol) 30 μ lを入れ混和したものをミニゲルの1つのウェルに10 μ lずつ入れ、TAE バッファー [0.04M - Tris - Acetate - 1mM - EDTA (pH8.0)] 中で50V, 90分間氷冷しながら電気泳動した。DNA断片の長さを知るためにDNA分子量マーカーとして、 λ sty I (マーカーVI, TAKARA) も別のウェルに入れて泳動した。紫外線下 (トランスイルミネーター, フナコシ) で、Sma I 断片0.8kbの部分をもで切り取り、細切して1.5mlエッペンドルフチューブに0.3gずつ入れた。

ゲルの入ったエッペンドルフチューブを70℃ のヒートブロック (M&S INSTRUMENTS INC) に入れ、加熱して完全に溶かした。レジン懸濁液 (Wizard PCR Preps DNA Purification System, Promega) を1 ml加え、20秒間混和した。ミニカラムを3 mlの注射筒に装着して、この中にゲルとレジンの混液を入れ、上からピストンで押して濾過した後、80%イソプロパノール 2 mlを注射筒に通してミニカラムを洗浄した。注射筒をはずしたミニカラムを、ふたを切り取った1.5mlエッペンドルフチューブにのせて、ミニカラムにオートクレーブ滅菌した蒸留水50 μ lを加え1分置いた後、10,000rpm, 20秒間遠心してプローブDNAを回収した。

5. プローブDNAの濃度検定

0.01% - エチジウムブロマイド入り0.8%アガロース (SEA KEM GTG AGAROSE, FMC) 150mlをミニゲル作製装置で作製した。プローブDNA溶液1 μ l, Dye1 μ l, TAEバッファー 5 μ lを混和したものをウェルに入れ、TAEバッファー中で電気泳動した。

泳動後、トランスイルミネーター (フナコシ) で撮影して、濃度既知のDNAとエチジウ

ムブロマイドの発色の強さを比較してプローブDNAの濃度を決定した。

6. プローブDNAのラベリング

プローブDNAのラベリングは、DIG DNAラベリングキット（ベーリンガー・マンハイム）を使用して、ベーリンガー・マンハイム社のマニュアルに従って行った¹⁰⁾。

20 μ lのプローブDNA溶液 (100ng/ μ l) を0.5mlのPCRチューブに入れ、沸騰水中に10分間置いた後、水中で5分急冷してDNAを1本鎖にした。10 μ lのヘキサスクレオチドミックス及び、dTTPのかわりに10 μ lのジゴキシゲニン-dUTPを含むdNTP, 55 μ lの滅菌水、5 μ lのDNAポリメラーゼ (Klenow fragment) を加え、各々を添加毎によく混和し、全体量を100 μ lにして37℃ で20時間インキュベートした。1/10容量の0.2M EDTA (pH8.0) 10 μ lを加えて、反応を停止させ、11 μ lの4M塩化リチウム (全量の1/10容量) と-20℃ 冷却の330 μ lのエタノール (全量の3倍量) を加えて、-20℃ に1夜おいてDNAを沈殿させた。13,000rpm, 4℃ で15分間遠心して上清をイエローチップで吸い取り、沈殿に-20℃ に冷却した70%エタノール100 μ lを加えボルテックスして洗浄し、同じ条件で遠心した。この洗浄を2回行い、イエローチップで上清をよく吸い取って、デシケーターに入れ5分間アスピレーターで吸引減圧乾燥させた後、100 μ lのTEバッファーを加えてDNAを溶解させた。

7. ラベルされたDNAの収量検定

ジゴキシゲニン-dUTPでラベルされたプローブDNA溶液2 μ lを38 μ lのDNA希釈バッファー (TEバッファー中にニシン精子DNA50 μ g/mlの濃度に溶解したもの) に入れ20倍の希釈液を作った。これを10倍ずつ希釈していき 20×10^4 倍まで希釈した。キット中のラベル量既知のコントロールDNAも同様に希釈した。これをナイロンメンブレン (HybondN, Amersham LIFE SCIENCE) に1 μ lずつスポットし、120mJの紫外線 (UV Strata linker 1800, フナコシ) にあてDNAを固定した。メンブレンを小さいバットに入れ、30mlのバッファー 1 (0.15M-NaCl-0.1M-マレイン酸) で5分間振盪した。バッファー 1 を捨て、30mlのバッファー 2 (バッファー 1 に1%のブロッキング試薬を含む) で30分間振盪した。バッファー 2 を捨て、4 μ lの0.35mM-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20mlのバッファー 2 で5,000倍に希釈したものをメンブレンにかけて、30分間ジゴキシゲニン-dUTPと反応させた。抗体溶液を捨て、30mlのバッファー 1 で15分間振盪しメンブレンを洗浄した。この操作を2回繰り返した。バッファー 1 を捨て、30mlのバッファー 3 (0.1M-Tris-HCl-0.1M-NaCl, pH9.5) 中で2分間振盪し、メンブレンをアルカリ性にした。10mlのバッファー 3 に200 μ 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・フォスフェイト) を加えた発色基質を遮光下で静かにメンブレンにかけ、1夜置いた。翌日、50mlのTEバッファーで5分間インキュベートし反応を停止させた。発色の終わったメンブレンは、TEバッファー中に保存した。

12 α -水酸化酵素のプローブDNAは、立野⁴⁾ によって調製されたコーディング領域を含むSac I 断片 (1.1Kb) を用いた。インターナルコントロールとして α -tubulinのプローブcDNA (CLONTECH Laboratories) (1.59Kb) を15 μ l (50ng/ μ l) 用いた。また、ラベリングとラベルされたDNAの収量検定は7 α -水酸化酵素と同様に行った。

6. ノーザンハイブリダイゼーション

ノーザンプロテイングは、常法⁹⁾に従って行った。

1. RNAの電気泳動

オートクレーブした10mM - Na₂HPO₄ - NaH₂PO₄バッファー (pH7.0) 170mlに1.7gのアガロース (SEA KEM GTG AGAROSE, FMC) を加え電子レンジで加熱溶解して、1%ゲル溶液を作り、20mlをミニゲル2枚に、150mlをプロッティング用の大きなゲル (12 コーム) 1枚を作成するのに用いた。

ノーザンプロッティングに用いる20 μ gのtotal RNAを含む懸濁液を12,000rpm, 4℃で15分間遠心し上清を捨て、100 μ lの-20℃冷却70%エタノールで洗浄し、再び同じ条件で遠心した。この上清を丁寧に吸い取り、デシケーターに入れ、5~10分アスピレーターで吸引減圧乾燥させた。5.6 μ lの1% DEPC-H₂Oを加えてRNAを溶解し、5.4 μ lのグリオキザル、16.0 μ lのDMSO、3.0 μ lの0.1M - Na₂HPO₄ - NaH₂PO₄バッファー (pH7.0) を加えてよく混和し50℃に60分置いた後、水中で急冷しRNAを変性させた。直ちに4 μ lのRNAトラッキングDye (50%-glycerol - 0.25% - xylene cyanol FF - 0.25% - bromo phenol blue - 1 mM EDTA, pH8.0) を加えよく混和し、5 μ lをミニゲルに、25 μ lを大きなゲルにアプライして、10mM - Na₂HPO₄-NaH₂PO₄バッファー (pH7.0) 中で電気泳動した。

ミニゲルは、10分おきに両極のバッファーをピペッティングして混和し、50Vで30分間電気泳動した。ゲルをステンレスバットに入れ、200mlの50mM-NaOH中で30分振盪した後、5 mg/mlエチジウムブロマイド20 μ l入りの0.2M酢酸ナトリウム (pH5.5) 200ml中で30分振盪し、エチジウムブロマイドによる染色を行った。ミニゲルをトランスイルミネーター (フナコシ) で紫外線を当てて撮影し、RNAの分解の有無とノーザンプロテイング用のRNAの量が正確であるか確認した。プロッティング用の大きなゲルはサブマリン泳動装置 (TAKARA HE-13型, TAKARA)で定電圧装置 (Pharmacia LKB・GPS200/400, Pharmacia) を用いて、60Vで90分間10mM - Na₂HPO₄ - NaH₂PO₄バッファー (pH7.0) 中でバッファーを循環させながら泳動を行った。バッファーの循環はPerista pump (アトー) を用いた。

2. RNAのプロッティング

深いステンレスバットに、20×SSC (3 M NaCl-0.3Mクエン酸ナトリウム, pH7.0) を500ml入れた。ステンレスバットの上にガラス板を置き、Whatman 3 MMクロマトグラフィーペーパー (Whatman International Ltd.) を2枚重ねて20×SSCに浸し、ガラス板にのせ、ピペットをろ紙上でころがし気泡を抜いた。この上に、電気泳動した大きなゲルをのせて同様に気泡を抜いた。ゲルの周りをラップで覆い、ゲル上に20×SSCを5 mlくらいのせてウェルの気泡を除き、ゲルと同じ大きさに切ったナイロンメンブレンを2×SSCで浸しゲル上に置き気泡を取り除いた。メンブレンの上にゲルと同じ大きさに切った3 MMペーパーを2枚置き、その上にキムタオルの束を15cmぐらいの高さにのせて、500gぐらいの本で重しをし、1夜プロッティングをした。プロッティング後、メンブレンのウェルの位置にボールペンで印をつけて、2×SSCで洗浄した。2×SSCで浸した3 MMペーパーにメンブレンをRNAがプロットされた方を上にして置いてUV Strata linker 1800 (フナコシ) で120mJの紫外線を照射してRNAを固定した。

3. プレハイブリダイゼーション

RNAを固定したメンブレンを1500mlの0.1×SSC沸騰中で20分間加熱し、グリオキザルを分解した。ナイロンバックにメンブレンを移し、25mlのDIG Easy Hybridization液（ベアリンガー・マンハイム）を入れて、気泡をよく除いて密封した。37℃で16時間置き、プレハイブリダイゼーションを行った。

4. ハイブリダイゼーション

ラベルされた7 α -水酸化酵素のプロープDNA 100 μ l (0.52 ng/ μ lラベルされたDNAを含む)を沸騰水中で10分間加熱した後、水中で急冷してDNA鎖を1本にした。10mlのDIG Easy Hybridization液を15mlのファルコンチューブに入れ、この中に1本鎖になったプロープDNAを加えて混和した。新しいナイロンバックにメンブレンを移し、この中にHybridization液を入れて気泡を抜いて、密封した。37℃で1夜ハイブリダイゼーションした。

5. ハイブリダイズしたmRNAの免疫学的検出

ハイブリダイゼーション終了後、ラベルされたプロープDNAの入ったHybridization液は再度利用できるため、ファルコンチューブに移し-20℃に保存した。

ハイブリダイズしたメンブレンは、100mlの2×SSC-0.1%SDSの入ったステンレスバット中で5分間振盪して2回洗浄した。次にふたつきのバットにメンブレンを移し、50℃に温めておいた200mlの0.1×SSC-0.1%SDSを入れ、50℃で15分間、振盪して2回洗浄した。次に室温でバッファー1 (0.15M-NaCl-0.1M-マレイン酸) 150mlで5分振盪して洗浄した。120mlのバッファー2 (バッファー1に1%のブロッキング試薬を含む)を入れ、メンブレンを30分振盪した。0.35mM-アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体7.2 μ lを36mlのバッファー2に加え、メンブレン上に注ぎ30分間振盪した。抗体入りバッファー2を捨てて、200mlのバッファー1で15分間2回メンブレンを振盪して洗浄した。150mlのバッファー3 (0.1M-Tris-HCl-0.1M-NaCl, pH9.5)で2分間振盪してメンブレンをアルカリ性にし、1,200 μ lのNBT/BCIP (ニトロブルーテトラゾリウム塩/5-ブロモ-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に混和して、遮光下でメンブレン全体にかかるように注ぎ、1夜発色反応させた。発色の終了したメンブレンを50mlのTEバッファーで5分間洗浄し、新しいTEバッファー中に保存した。

7. ウサギの採血

ウサギの採血は、食事前、食事開始から30分後、1時間後、3時間後、食事終了3時間後、5時間後の血液を耳の血管を注射針で刺して、出血した血液を1.5mlのエッペンドルフチューブに採取した。また、インスリン投与日については、投与してから10分後、30分後、60分後、解剖時に採血した。解剖時の採血は、心臓穿刺で行った。エッペンドルフチューブに採取した血液を5,000rpmで7分間遠心し、上清の血清のみを別の1.5mlのエッペンドルフチューブに移した。

8. 血糖値の測定

血糖値の測定は、グルコースCII-テストワコー (和光純薬工業) ムタロターゼ・GOD法によって行った。キット中の150mlのフェノール5.3mM/l-60mM-リン酸バッファー

(pH7.1) に各酵素の最終濃度がムタローゼ-0.13単位/ml, グルコースオキシダーゼ-9.0 単位/ml, ペルオキシダーゼ-0.65単位/ml, 4-アミノアンチピリン-0.5mM/l, アスコルビン酸オキシダーゼ-2.7単位/mlになるように溶解し発色試薬を調製した。10 μ lの血清を小試験管に入れて, 3 mlの発色試薬を加えてボルテックスした後, 37℃ の恒温槽で5分間反応させ, 反応液を1分間以上室温に置いて安定させた後, 分光光度計(パーキンエルマー・ジャパン)で505nmの吸光度を測定した。同様にして, グルコース標準液(300mg/dl)の吸光度と比較して, 計算によって各々の血清の血糖値を求めた。これらの実験は, 全て1つの試料につき2本の小試験管で行い, それらの吸光度を平均した値を用いた。

9. インスリン値の測定

ウサギの血清インスリン値の測定には, 各々血糖値測定に用いたものと同じ血清を使用した。インスリンの測定は, IMx アナライザー(ダイナボット)によってサンドイッチ法を利用したEIA法により行ったが, この測定は, ダイナボット株式会社に依頼した。

<結果及び考察>

1. ウサギの体重変化

飼育中のウサギは, 図1に示すようにゆっくりと体重が増加し, 全て健康であった。

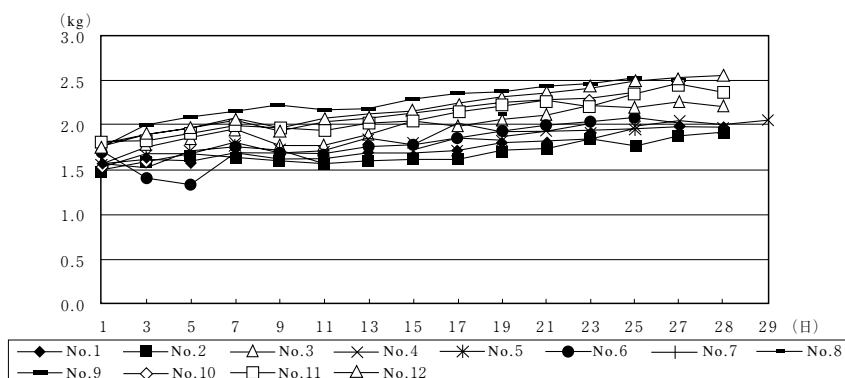


図1 ウサギの体重変化

ウサギは1週間の自由摂食後, 摂食時間を8時から14時の6時間に限定した本飼育を3週間行った。

2. ラベルされたDNAの収量検定

DNAのラベル量が未知のプロープDNA溶液とコントロールDNAをメンブレンにスポットし, 発色させた結果を図2に示す。DNAのラベル量が既知のコントロールDNAは, ランダム・プライム法でジギキシゲニン-dUTPによってラベルした直鎖型pBR328DNAで, 1 μ gの鋳型DNAと約260ngのラベル済みDNAを50 μ l中に含んでいる。すなわちコントロールDNA中のラベルされたDNA濃度は, 5.2ng/ μ lである。

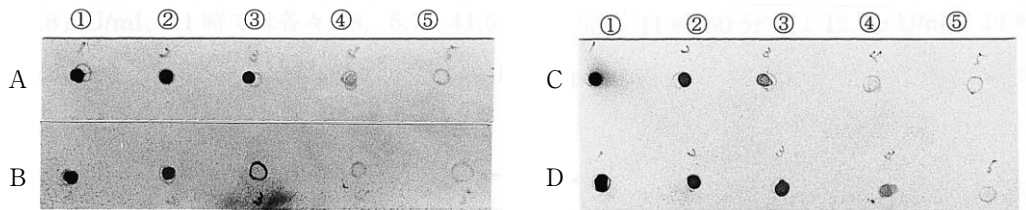


図2 プローブDNAのラベル量の検定

A: コントロールDNA, B: 7 α -水酸化酵素プローブDNA

C: コントロールDNA, D: 12 α -水酸化酵素プローブDNA

ナイロンメンブレンに鉛筆で○印をつけ、1 μ lずつ各DNAの希釈液をスポットし、DIGシステムのマニュアルに従って発色させた。

希釈系列はどちらも ① 20, ② 20×10 , ③ 20×10^2 , ④ 20×10^3 , ⑤ 20×10^4

7 α -水酸化酵素のプローブDNAは、 20×10^2 倍希釈液まで発色しており、コントロールDNAは 20×10^3 倍希釈まで発色していることから、プローブDNA溶液では0.52ng/ μ lのラベルされたDNAが得られたことがわかった。プローブDNAは100 μ lのTEバッファに溶かしてあるので、全量では52ngのラベルされたDNAが得られた。

12 α -水酸化酵素プローブDNAは、 20×10^3 倍希釈まで発色しており、この濃さは、コントロールDNAの 20×10^2 倍希釈と 20×10^3 倍希釈の中間の濃さであった。コントロールDNAの 20×10^2 倍と 20×10^3 倍希釈の中間の濃度は、0.00143ng/ μ lなのでラベルしたDNAは2.86ng/ μ l、すなわちプローブDNA溶液100 μ l中には、286ngのラベルされたDNAが含まれていることがわかった。

図には示していないが、同様にして α -tubulinのラベルされたプローブDNAの収量検定を行った結果は、 20×10^4 倍希釈まで発色しており、その濃さはコントロールDNAの 20×10^3 倍希釈と 20×10^4 倍希釈の中間の濃さであった。よってラベルされた α -tubulinのプローブDNAは28.6 ng/ μ l、すなわちプローブDNA溶液中には2.86 μ gのラベルされたDNAが含まれていることがわかった。

3. ウサギの血糖値

本飼育中の摂食ウサギの血糖値の変化を図3に示し、インスリン投与ウサギの血糖値の変化を図4に示した。摂食させたものは、摂食開始30分後には全てのウサギの血糖値は上昇している。そのピークは個体によって異なるが、だいたい摂食開始30分から1時間である。14時に食事を抜き、その後5時間の間には絶食時の血糖値に戻ることがわかった。

インスリン投与ウサギについての血糖値は、No. 9, 11を除いて10分後には下がり始め、30分後にはほとんどのウサギが50mg/dl以下の低血糖になった。表には示していないが、インスリンを投与してから血糖値が正常値120mg/dlに戻るのには個体差があった。また、No. 9, 11のウサギの血糖値が300mg/dl以上という、異常な数値になったが、今回行った実験ではその原因が何であるか知ることはできなかった。

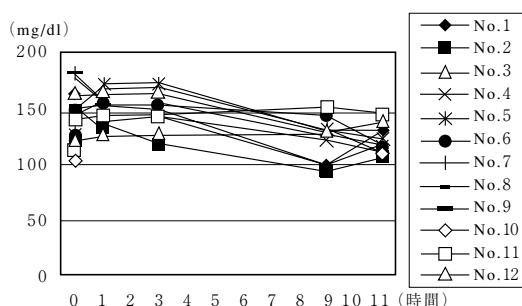


図3 摂食後の血糖値の変化

8時から14時に摂食時間を制限し3週間の本飼育を行ったウサギの血糖値を示した。摂食開始時間は表中の0時間、絶食開始時間は6時間である。No.はウサギの番号を示す。

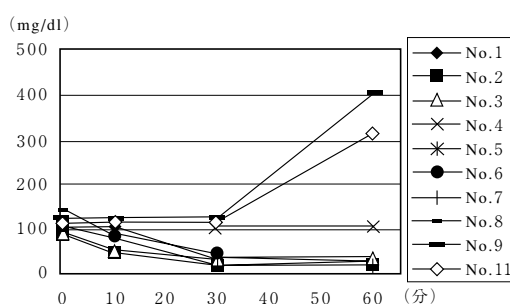


図4 インスリン投与後の血糖値の変化

本飼育を3週間行い、3週間目の8時に食事のかわりにインスリンを投与したウサギの血糖値を示した。No.はウサギの番号を示す。

4. ウサギのインスリン値

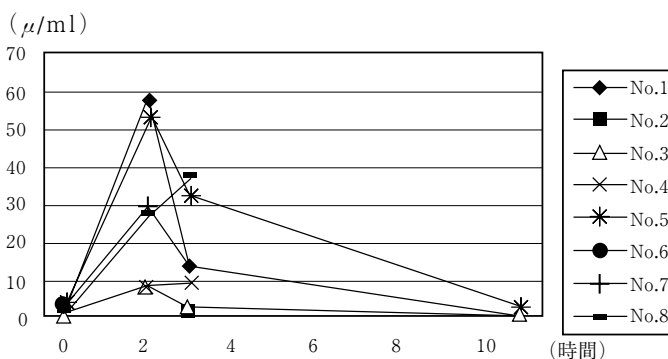


図5 摂食後のインスリン値の変化

摂食時間を8時から14時までに制限したウサギのインスリン値を示す。摂食開始時は表中の0時間、絶食開始時は6時間である。No.はウサギの番号を示す。

摂食時間を8時から14時に制限したウサギの血清インスリン値の測定結果を図5に示した。摂食開始直前は、全てのウサギにおいて血清インスリン値は5.0 μ U/ml以下であった。摂食開始2時間後には個体差はあるものの全てのウサギの値は30~60 μ U/mlに上昇しており、3時間後には10~30 μ U/mlに低下した。餌を抜き取った5時間後には、5 μ U/ml以下に戻っていることがわかった。摂食のかわりにインスリン投与したウサギの血清インスリン値を図6に示す。インスリン投与後10分で20~100 μ U/mlに上昇し、30分後は40~120 μ U/mlと最も高い値を示したが、60分後にはほとんどのウサギの値が40 μ U/ml以下になった。図には示していないが、解剖時のインスリン値は、9時では各々4.1, 4.8 μ U/ml, 11時では各々

2.8, 5.7, 41.5 μ U/ml, 11時50分では12.6 μ U/ml, 14時は3.0 μ U/ml, 14時50分は2.3 μ U/ml, 15時は0.3 μ U/ml, 16時は2.3 μ U/mlであった。

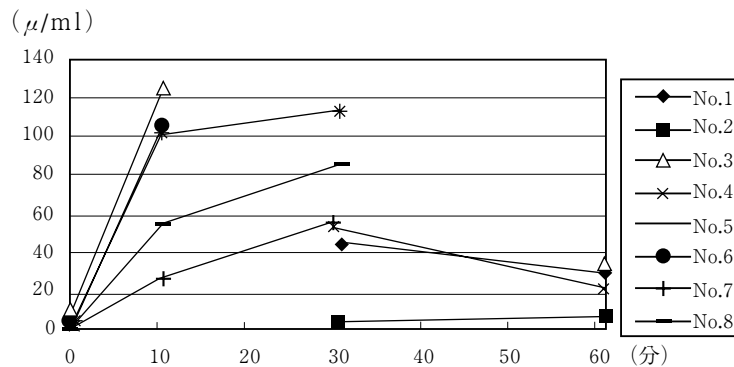


図6 インスリン投与後のインスリン値の変化

本飼育を3週間行い、3週間目の8時に食事のかわりにインスリンを投与したウサギの血清インスリン値を示す。No.はウサギの番号を示す。

5. ノーザンハイブリダイゼーション

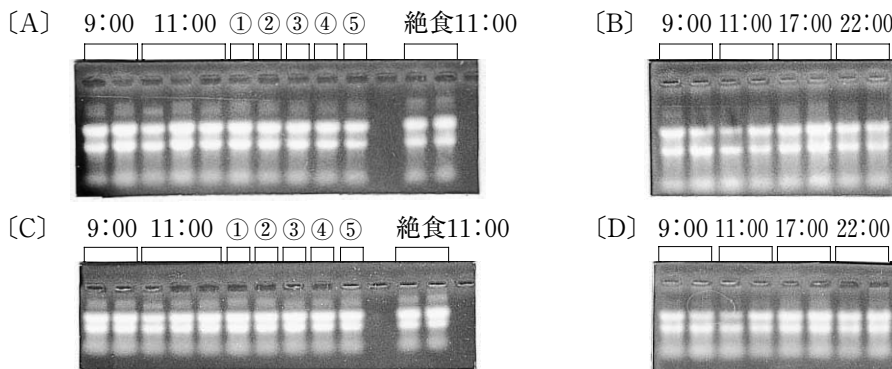


図7 RNAのミニゲルによる電気泳動

RNAのグリオキザルによる変性後、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。

[A] [C]: インスリン投与ウサギRNA

[B] [D]: 摂食ウサギRNA [A] [B] は7 α -水酸化酵素のmRNAの検出(図8)に用いたRNA

[C] [D] は12 α -水酸化酵素のmRNAの検出(図9)に用いたRNA

①11:50 ②14:00 ③14:50 ④15:00 ⑤16:00

ノーザンハイブリダイゼーションに用いたRNAの分解の有無を確認するために、ミニゲルの電気泳動によりRNAを染色した結果を図7に示した。28S, 18S, 5.8SのリボソームRNAが分解せずに同じ量みられることから、ノーザンハイブリダイゼーションに用いた全てのRNAは分解もなく、かつ量も一定量、ゲルにアプライされていることが判った。

(1) 7 α -水酸化酵素のmRNAの検出

7 α -水酸化酵素のプロープを用いたハイブリダイゼーションの結果を図8に示す。イン

スリン投与ウサギの 7 α -水酸化酵素の mRNA レベルは、9 時 (インスリン投与 1 時間後) にやや高く、さらに 11:00 (インスリン投与 3 時間後) が最も高くなっており、その後は時間の経過とともに低くなっていた。14 時においてはさらに低く、16 時においては確認できなかった。インスリン値は投与 30 分後に最も高く、血糖値も投与 30 分後が最も低いのに対して、mRNA レベルはそれよりも遅い 3 時間後に最も高くなっていた。14 時以降に解剖したウサギのインスリン値は 5.0 μ U/ml に戻っており、7 α -水酸化酵素の mRNA 量も減っていた。一方、摂食ウサギの mRNA 量は、摂食開始 1 時間後の 9 時にはほとんどシグナルは見られず、11 時になるとインスリン投与ウサギと同じ程度の濃さのシグナルが見られた。7 α -水酸化酵素の mRNA 量の上昇は、インスリン値の上昇よりやや遅れて始まっていることが観察された。

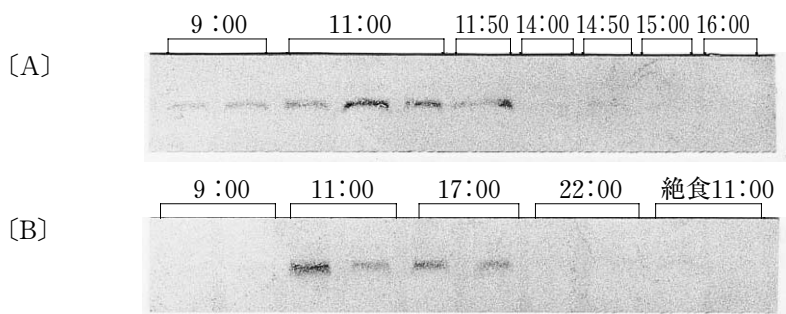


図 8 7 α -水酸化酵素の mRNA レベルのインスリン投与及び摂食による影響

7 α -水酸化酵素の cDNA プローブによってノーザンハイブリダイゼーションを行った mRNA の検出

〔A〕：インスリン投与ウサギ mRNA 〔B〕：摂食ウサギ mRNA

本飼育によって形成された日内リズムが残っていて、8 時に食事を与えなくても 11 時に mRNA レベルが上昇するにではないかと考えられたので、絶食状態でインスリンも投与せず 11 時に解剖したウサギの mRNA レベルを調べた。図 8〔B〕絶食 11:00 に示すように 8 時に摂食させないと mRNA は検出されていことから、7 α -水酸化酵素の mRNA においては、本飼育によって形成された日内リズムは考慮しなくてもよいと考えられる。これらの結果より、8 時にインスリン投与したウサギの 11 時におけるコレステロール 7 α -水酸化酵素の mRNA レベルの上昇はインスリンの影響によるものであることがわかった。

Wang らは、インスリンは HepG 2 培養細胞において、7 α -水酸化酵素の遺伝子のプロモーター活性を強く抑えると報告¹¹⁾ しているが、本実験ではインスリン投与したウサギにおいて、逆に肝臓の 7 α -水酸化酵素 mRNA のレベルは上昇していることが観察された。

(2) 12 α -水酸化酵素の mRNA の検出

12 α -水酸化酵素のプロローブを用いたノーザンハイブリダイゼーションの結果を図 9 に示した。インスリン投与ウサギの 12 α -水酸化酵素 mRNA レベルは、7 α -水酸化酵素 mRNA ほど顕著な変化は見られなかった。しかし、インスリン投与 1 時間後の 9 時の mRNA のレベルは、摂食ウサギの同じ時間のレベルよりやや高く、また、摂食ウサギの 17 時に比べ、インスリン投与ウサギの 14 時は低くなっている。インスリン投与 8 時間後の 16 時ではイン

スリン投与1時間後の9時よりもmRNAレベルが低いことから、12 α -水酸化酵素のmRNAは、インスリンの影響を受けているのではないかと考えられる。

Ishidaら¹²⁾は、ストレプトゾトシン糖尿病ラットの12 α -水酸化酵素のmRNAレベルは正常なラットより高い値を示すが、インスリン投与で3時間以内に下がると報告している。今回の実験では、正常なウサギの12 α -水酸化酵素のmRNAはインスリン投与でやや上昇することが観察された。

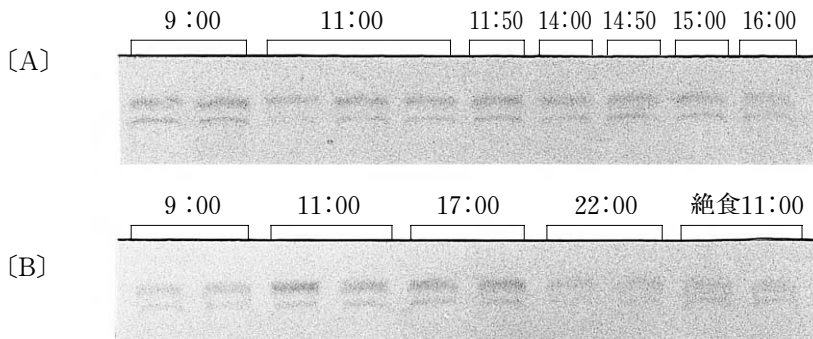


図9 12 α -水酸化酵素のmRNAレベルのインスリン投与及び摂食による影響

12 α -水酸化酵素のcDNAプローブによってハイブリダイゼーションを行ったmRNAの検出

[A]: インスリン投与ウサギmRNA [B]: 摂食ウサギmRNA

(3) α -tubulinのmRNAの検出

インターナルコントロールとして、 α -tubulinのmRNAのハイブリダイゼーションを行った。図10に示すようにインスリン投与ウサギのmRNAと摂食ウサギmRNAのどの時間においても量は少ないが、一定の量のmRNAがつくられていることが確認できるので、7 α -水酸化酵素も12 α -水酸化酵素も各々の時間における比較が可能であるといえる。

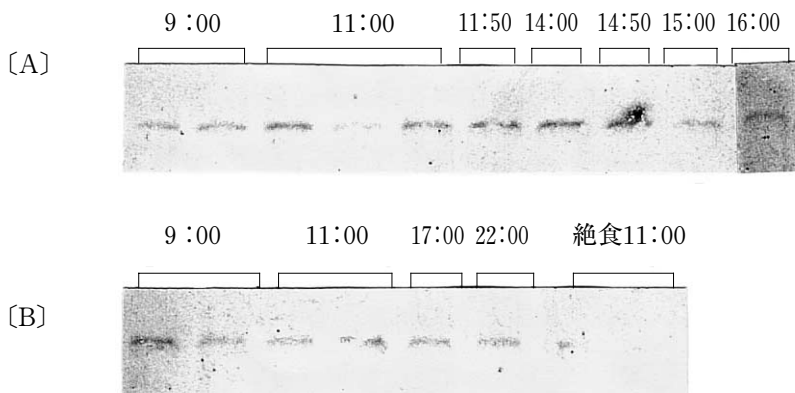


図10 α -tubulin mRNA量

α -tubulinのcDNAプローブによってハイブリダイゼーションを行ったmRNAの検出

[A]: インスリン投与ウサギmRNA [B]: 摂食ウサギmRNA

<要約>

胆汁酸合成の律速酵素である 7 α -水酸化酵素と、コール酸とケノデオキシコール酸合成への分岐点の酵素である 12 α -水酸化酵素について、これらの酵素の mRNA 合成量がインスリン投与によってどのような影響を受けるかについて調べた。

日本白色種で 2 ヶ月齢の雄のウサギを、8 時から 14 時の 6 時間に摂食時間を限定した本飼育を 3 週間行った後、食事のかわりにヒトインスリン 2 単位を投与して各々の時間に解剖した。0.3g の肝臓を摘出し RNA を調製し、RNA 20 μ g 中に含まれる 7 α -水酸化酵素と 12 α -水酸化酵素の mRNA 量をノーザンブロットハイブリダイゼーションにより検出して比較検討した。

7 α -水酸化酵素においてはインスリン投与後 3 時間が最も高いレベルを示し、その後は低くなっていくことがわかった。12 α -水酸化酵素においては 7 α -水酸化酵素ほど顕著な差はないが、インスリン投与後 3 時間が最も高いことがわかった。7 α -水酸化酵素 mRNA 合成はインスリンの影響を強く受け、12 α -水酸化酵素 mRNA 合成は、インスリンの弱い影響を受けることがわかった。

<文献>

- 1) 菅野道廣, 今泉勝己. 1986. コレステロール. 三共出版: 122 - 133
- 2) 奥野九一郎. 1987. 胆汁酸の生合成, 抱合, 排泄. 代謝 **24**: 676
- 3) 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 α -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
- 4) 準備中
- 5) Ness, G. C., L. C. Pendleton, Y. C. Li., and J. Y. L. Chiang. 1890. Effect of thyroid hormone on hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase, LDL receptor, HMG-CoA reductase, farnesyl pyrophosphate synthetase and apolipoprotein A-I mRNA levels in hypophysectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**:1150-1156
- 6) 辻孝, 中村敏一. 1991. 早くて確実な RNA 分離法 (AGPC 法). 実験医学, **9**: 99 - 101
- 7) Kai, M-H., Eto, T-A., Kondo, K-H., Setoguchi, Y., Maeda, S., and Setoguchi, T. 1995. Synchronous circadian rhythms of mRNA levels and activities of cholesterol 7 α -hydroxylase in the rabbit and rat. *J. Lipid Res.* **36**: 367 - 374
- 8) Mondel, M. and A. Higa. 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 159.
- 9) Maniatis, T., Fritsh, E. F., and Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., : 1.25 - 7.50
- 10) 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・マンハイム社著作権所有: 24 - 49
- 11) Dan-ping Wang, Diana Stroup, Maria Marrapodi, Maurizio Crestani, Giovanni Galli and Jhon Y.L. Chiang. 1996. Transcriptional regulation of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CY 7 A) in HepG 2 cells. *J. Lipid Res.* **37**: 1831 - 1841
- 12) Ishida H., Kuruta Y., Gotoh O., Yamashita C., Yoshida Y., Noshiro M. 1999. Structure, evolution, and liver-specific expression of sterol 12 α -hydroxylase P450 (CYP 8 B). *J. Biochem. (Tokyo)* **126**: 19 - 25