

肝オレイン酸生合成におけるパルミトイルCoA
炭素鎖伸長反応酵素の役割

甲第30号

外山 智章

肝オレイン酸生合成におけるパルミトイルCoA
炭素鎖伸長反応酵素の役割

外山 智章

論文目録

本学位論文は下記の原著論文を基に作成され、城西大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

1. Kudo, N., Toyama, T., Mitsumoto, A., and Kawashima, Y. (2003) Regulation by carbohydrate and clofibric acid of palmitoyl-CoA chain elongation in the liver of rats. *Lipids* 38, 531-537
2. Toyama, T., Kudo, N., Mitsumoto, A., and Kawashima, Y. (2004) Effects of perfluorocarboxylic acids on the activities of acyl-CoA elongations in vivo and in vitro. *Chem Biol Interact* 150, 189-198
3. Toyama, T., Kudo, N., Mitsumoto, A., and Kawashima, Y. Regulation by clofibric acid of palmitoyl-CoA chain elongation in the liver of Zucker fa/fa rats. *Lipids* (submitted)

目次

略号	i
総論の部	
緒言	1
第1章 パルミトイル CoA 炭素鎖伸長酵素活性に変動を与える因子	
第1節 ペルフルオロ脂肪酸の影響	6
第2節 クロフィブリン酸の影響	8
第3節 グルコース負荷の影響	12
第4節 Zucker fa/fa ラット	14
第5節 小括および考察	14
第2章 パルミトイル CoA 炭素鎖伸長酵素のオレイン酸合成への寄与	
第1節 糖負荷とクロフィブリン酸のパルミトイル CoA 炭素鎖伸長酵素活性に対する影響	17
第2節 Zucker ラットのパルミトイル CoA 炭素鎖伸長酵素活性に対するクロフィブリン酸の影響	21
第3節 肝臓のオレイン酸の割合に対するパルミトイル CoA 炭素鎖伸長	

酵素とステアロイル CoA 不飽和化酵素の寄与率.....	24
第 4 節 小括および考察.....	28
第 3 章 Zucker fa/fa ラットにおける PCE の誘導機構	
第 1 節 Zucker ラットにおけるパルミトイル CoA 炭素鎖伸長酵素とステア ロイル CoA 不飽和化酵素活性に対するインスリンの影響	31
第 2 節 肝における糖の取り込みとパルミトイル CoA 炭素鎖伸長酵素なら びにステアロイル CoA 不飽和化酵素活性に対する影響	33
第 3 節 小括および考察	36
第 4 章 クロフィブリン酸のパルミトイル CoA 炭素鎖伸長酵素ならびにステアロ イル CoA 不飽和化酵素酵素タンパク質の合成と分解に対する影響	
第 1 節 転写レベルにおける調節	38
第 2 節 分解レベルにおける調節	39
第 3 節 小括および考察	42
総括	44
謝辞	46
実験の部	47

引用文献 60

本論文で使用した略語を以下に示す。

AUC; area under the curve

cDNA; complimentary deoxyribonucleic acid

clofibric acid; 2-(4-chlorophenoxy)-2-methylpropionic acid (クロフィブリン酸)

CoA; Coenzyme A

2-DG; 2-deoxyglucose (2-デオキシグルコース)

ELO; fatty acid elongase

HDL; high density lipoprotein

LDL; low density lipoprotein

mRNA; messenger ribonucleic acid

NADH; reduced nicotinamide adenine dinucleotide

NADPH; reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

PCE; palmitoyl-CoA chain elongase

PCR; polymerase chain reaction

pioglitazone; 5-[[4-[2-(5-ethyl-2-pyridinyl)ethoxy]phenyl]methyl]-2,4-thiazolidinedione

(ピオグリタゾン)

PPAR α ; peroxisome proliferator-activated receptor alpha

PPAR γ ; peroxisome proliferator-activated receptor gamma

PPRE; peroxisome proliferator response element

SCD; stearoyl-CoA desaturase

SREBP; sterol regulatory element binding protein

SSC; saline sodium citrate

VLDL; very low density lipoprotein

炭素数の異なる脂肪酸は、以下のように示した。16:0 等のコロン前の数字は脂肪酸の炭素数を表し、コロンの後の数字は不飽和結合数を表す。

16:0、 palmitic acid (パルミチン酸)

16:1(n-7)、 palmitoleic acid (パルミトオレイン酸)

18:0、 stearic acid (ステアリン酸)

18:1(n-9)、 oleic acid (オレイン酸)

18:2(n-6)、 linoleic acid (リノール酸)

18:3(n-3)、 α -linolenic acid (α リノレン酸)

20:3(n-6)、 dihomo- γ -linolenic acid (ジホモ γ リノレン酸)

20:4(n-6)、 arachidonic acid (アラキドン酸)

20:5(n-3)、 eicosapentaenoic acid (エイコサペンタエン酸)

22:6(n-3)、 docosahexaenoic acid (ドコサヘキサエン酸)

総論の部

総論の部

緒言

炭水化物および脂肪酸はともにエネルギー源として重要な働きを持っている。脂肪酸が単にエネルギー源としてのみ役割を果たすならばそれは炭水化物で代替できるはずである。事実、ほ乳類においては大部分の脂肪酸は糖、あるいはアミノ酸から体内で合成される。このため、脂肪酸の摂取は必ずしも必要ではなく、炭水化物で代替できるものと考えられていた。1929年に Burr らは油脂を含まない飼料でラットを飼育すると、成長停止や脱毛、尻尾の鱗屑化などの症状が出現することを報告している (Burr and Burr, 1929)。その後アラキドン酸を与えると前述した症状を予防もしくは治療できることが明らかにされた (Burr and Burr, 1930)。この頃から生体における脂肪酸の必須性や機能についての研究が数多く報告されるようになった。脂肪酸を大別すると飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸とに分けられ、さらに不飽和脂肪酸は2重結合の数から、モノ不飽和脂肪酸と高度不飽和脂肪酸に分類される。必須脂肪酸としては高度不飽和脂肪酸のリノール酸と α リノレン酸が知られており、動物はこれらの脂肪酸を生合成することが出来ない。必須脂肪酸は、摂取後アラキドン酸やエイコサペンタエン酸に代謝され、リン脂質に取り込まれた後に生理的刺激に応じてプロスタグランジン、トロンボキサンやロイコトリエンに変換されて強力な生理活性を発揮する (鹿山, 1995)。エイコサペンタエン酸は高脂血症および動脈硬化症治療薬として使用されている。また、 α リノレン酸を含むエサで飼育したラットは明暗識別能力が高いことも知られている

(Yamamoto et al., 1987)。このように高度不飽和脂肪酸については数多くの研究が行なわれ、様々な生理機能が明らかになった。ところが、不思議なことにモノ不飽和脂肪酸については系統的な研究がほとんど成されていないのが現状である。

オレイン酸はモノ不飽和脂肪酸の中でもほ乳類に最も高い割合で含まれ、ほ乳類が *de novo* 合成することのできる不飽和脂肪酸でもある (Cinti et al., 1992)。オレイン酸を必須脂肪酸欠乏ラットに与えても欠乏症状が改善されないこと (Burr and Burr, 1930) や自前で生合成可能なことから、オレイン酸は従来、エネルギーの蓄積や生体膜構成脂肪酸としての役割を果たしているだけであり、特別な生理活性を有するという考えはなかった。ところが近年になってオレイン酸の機能性についての報告がなされるようになった。地中海沿岸に住む人々は長寿であることから彼らの食生活が研究され、疫学調査の結果から、彼らの食事に多く含まれるオレイン酸が LDL コレステロールの減少 (Garg et al., 1988; Reaven et al., 1993)、LDL の酸化抑制 (Barter et al., 1990) などの作用により冠動脈疾患のリスクを低下させる働きを持つことが示された (de Lorgeril et al., 1999)。しかし、摂取したオレイン酸がどのようなメカニズムを介してこのような影響を与えるのかはまだ分っていない。

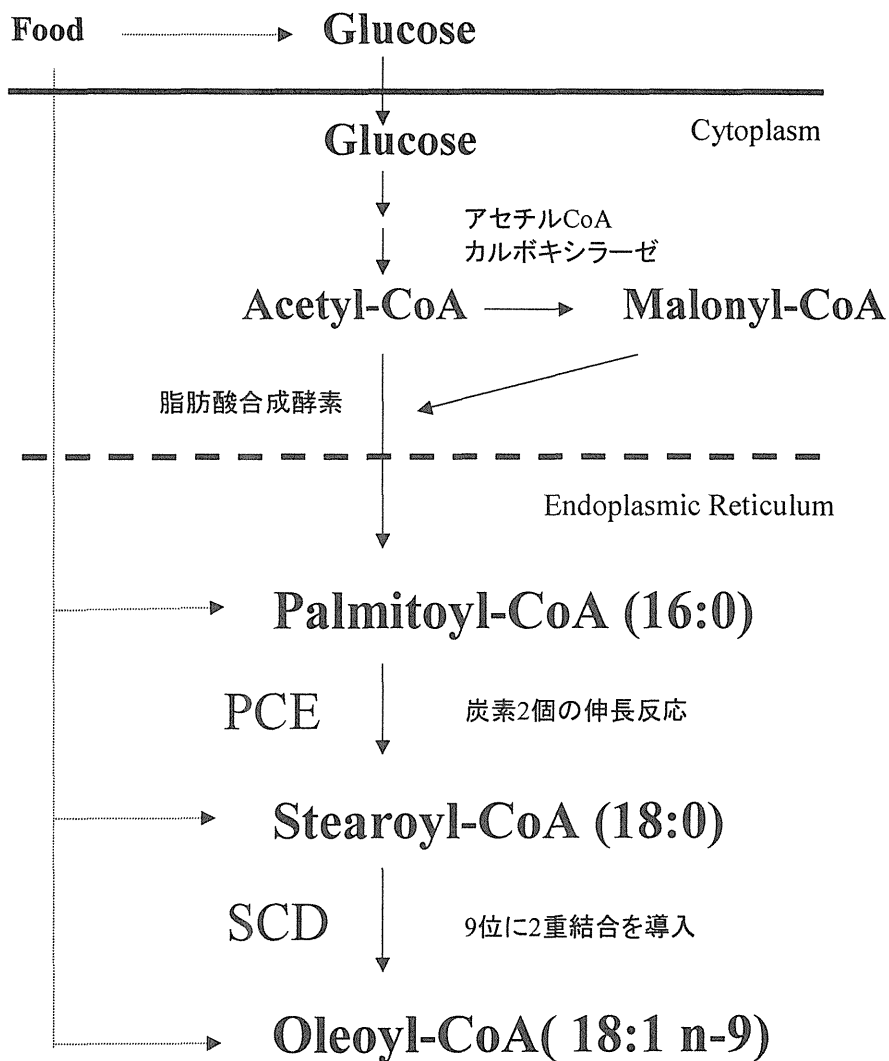
オレイン酸は食物から摂取するだけではなく生体内においても活発に合成されている。オレイン酸は、生体内において、食餌由来もしくは *de novo* 合成由来のパルミチン酸が脂肪酸炭素鎖伸長酵素である palmitoyl-CoA chain elongase (PCE) によって鎖伸長されてステアリン酸になり、次に脂肪酸不飽和化酵素である stearoyl-CoA desaturase (SCD) によって 9 位に 2 重結合を導入されて合成される (Scheme) (Cinti et al., 1992)。1999 年に自然発症性の SCD 欠損マウスが見つかったことによりオレイン酸生合成の重要性が明らかになった (Zheng et al., 1999)。すなわち、このマウスの肝臓や血清中のオレイン酸は減少しており、さらに皮脂腺の脱落や短毛、皮膚乾燥、鱗状皮膚、マイボーム腺の発達不全が見られた。また、このマウスでは、VLDL の分泌低下や肝

臓のトリグリセリドとコレステロールエステル量の低下も観察されている (Miyazaki et al., 2000)。このマウスに高オレイン酸食を 2 ヶ月間与えても、低下した肝臓のトリグリセリドやコレステロールエステル量は完全には回復しなかった (Miyazaki et al., 2000)。その後、SCD のノックアウトマウスが作成され、SCD 欠損マウスと同様に肝臓と血清中のトリグリセリドとコレステロールエステルの減少が観察されている (Miyazaki et al., 2001)。同ノックアウトほ乳類では、野生型と比べて、エネルギー代謝が亢進しており、高脂肪食による肥満に耐性を示した (Ntambi et al., 2003)。これらの報告から、オレイン酸合成は肥満、高脂血症、動脈硬化症に関わりが非常に深いことが明らかとなった。これらの知見は SCD に特化した研究から得られたものであるが、オレイン酸合成の生理的重要性を示すものである。

ラットの食餌中にはパルミチン酸が約 20%、ステアリン酸が約 8%含まれている (Kudo and Kawashima, 2001)。この餌を摂取したラットの肝臓には、パルミチン酸が約 23%、ステアリン酸が約 20%含まれている (Toyama et al., 2004)。この事実が示すのは、摂取したパルミチン酸が肝臓において積極的に脂肪酸炭素鎖伸長反応を受けてステアリン酸に変換されているということである。パルミチン酸は *de novo* 合成される脂肪酸であり、また、食餌から最も多く摂取される脂肪酸であるが、動脈硬化症を助長したりアポトーシスを誘導したりする働きがある (Ohtani et al., 1990; Mu et al., 2001)。Listenberg らは、SCD を遺伝子導入して過剰発現させた CHO 細胞では、培地に添加したパルミチン酸がオレイン酸となり、トリグリセリドに取り込まれることによって、パルミチン酸によるアポトーシスが抑制されることを示した (Listenberg et al., 2003)。これらのことから、生体内ではパルミチン酸を PCE の働きによって積極的にステアリン酸に変換し、さらに SCD によってオレイン酸まで変換されることによって、パルミチン酸の有害作用を防御している可能性がある。しかしながら、多くの研究において、SCD の重要性が強調されているが PCE の役割についてはまったく述べられていない。さらに、オレイン酸合成の律速酵素は SCD であると説明さ

れているが、実際にこのことを詳細に検討した例はない。Rhee らは安定同位体のステアリン酸とパルミチン酸をヒトに投与してその代謝を追った (Rhee et al., 1997)。各安定同位体を投与して144時間後の血液から、SCDが触媒するステアリン酸からオレイン酸への変換は14%だったのに対して、PCEが触媒するパルミチン酸からステアリン酸への変換は6%であった。また、安定同位体のパルミチン酸またはステアリン酸をHepG2細胞の培地に添加し、オレイン酸への変換率を調べたところ、ステアリン酸からオレイン酸への変換(SCD)よりもパルミチン酸からオレイン酸への変換(PCEとSCD)の方が顕著に低率であることが示された (Wong et al., 2004)。これらの事実は、オレイン酸生合成がPCE活性に大きく依存する可能性を示唆していると考えられる。

このようにオレイン酸は生体にとって非常に重要な働きをしており、特にこの脂肪酸の生合成の調節が生体機能に大きく関与することが分ってきた。現在はオレイン酸合成に関しては、SCDに研究者の興味が集中しており、PCEの重要性に着目した例がない。本研究は、PCEがオレイン酸生合成にどの程度どのようにして関与しているのかを明らかにすることを目的とした。

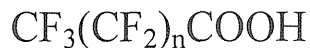


Scheme Pathway for the biosynthesis of oleic acid in mammals

第1章 PCE 活性に変動を与える因子

生体内においてオレイン酸組成は栄養状態や生理状態の変化に応答して変化することが知られている。オレイン酸はパルミチン酸から PCE によって鎖伸長されステアリン酸になり、SCD によって9位に2重結合が導入されて生合成される。オレイン酸組成の変化に PCE がどの程度関与するのかを解明することを目的とし、肝臓のオレイン酸が増加することが知られている種々の生理状態(ペルフルオロ脂肪酸の投与、クロフィブリン酸の投与、グルコースの負荷、高インスリン血症の Zucker fa/fa ラット)が PCE 活性にどのような影響を与えているか検討した。同時に、SCD についても検討を加えた。

第1節 ペルフルオロ脂肪酸の影響 (Toyama et al., 2003)



n=6 : perfluorooctanoic acid

n=7 : perfluorononanoic acid

n=8 : perfluorodecanoic acid

Fig. 1-1 Chemical structure of perfluorocarboxylic acids

ペルフルオロ脂肪酸は脂肪酸の水素がすべてフッ素に置換された化合物である (Fig. 1-1)。ペルフルオロ脂肪酸は界面活性剤や乳化剤として、あるいは他のフルオロ化

化合物合成の原料として工業的に広く使用されている化合物であり (Guethner et al., 1962)、炭素鎖が長いほど生体内半減期が長いことが知られている (Ohmori et al., 2003)。また、ペルフルオロ脂肪酸をラットに投与した場合には肝臓のオレイン酸の割合が増加することが知られている (Yamamoto and Kawashima, 1997)。そこで、鎖長の異なるペルフルオロ脂肪酸 (ペルフルオロオクタン酸、ペルフルオロノナン酸、ペルフルオロデカン酸) をラットに、10 mg/ kg 体重、1 日 1 回で 5 日間、腹腔内投与し肝臓の脂肪酸組成を調べた (Table 1-1)。ペルフルオロ脂肪酸投与により最も大きく変動した脂肪酸はオレイン酸であり、ペルフルオロオクタン酸、ペルフルオロノナン酸、ペルフルオロデカン酸投与により肝臓のオレイン酸の割合はそれぞれ 1.5、2.6、2.5 倍増加した。また、同じラットから肝ミク

Table 1-1 Effects of perfluorocarboxylic acids on fatty acid composition of total lipids in the liver of rats

Fatty acid	Control	Perfluorooctanoic acid	Perfluorononanoic acid	Perfluorodecanoic acid
		mol %		
16:0	22.67 ± 0.71	24.69 ± 1.86	24.87 ± 0.94*	25.74 ± 0.73*
16:1 (n-7)	1.13 ± 0.10	2.24 ± 0.56*	2.79 ± 0.28*	2.56 ± 0.50*
18:0	19.23 ± 0.78	18.11 ± 1.04	14.81 ± 0.40*	14.79 ± 1.37*
18:1 (n-9)	7.30 ± 0.58	11.09 ± 2.59*	18.85 ± 1.52*	17.91 ± 1.52*
18:2 (n-6)	21.18 ± 0.90	14.72 ± 1.26*	15.62 ± 0.78*	16.04 ± 0.75*
18:3 (n-3)	0.50 ± 0.12	1.75 ± 2.98	0.21 ± 0.14*	0.37 ± 0.24
20:3 (n-6)	0.84 ± 0.17	2.47 ± 0.08*	2.53 ± 0.08*	2.50 ± 0.12*
20:4 (n-6)	16.20 ± 1.01	15.19 ± 1.59	12.02 ± 0.81*	11.86 ± 1.51*
20:5 (n-3)	1.14 ± 0.10	1.19 ± 0.12	1.08 ± 0.07	1.00 ± 0.06
22:5 (n-3)	1.84 ± 0.15	1.18 ± 0.28*	0.72 ± 0.05*	0.82 ± 0.01*
22:6 (n-3)	4.18 ± 0.61	3.61 ± 0.35	2.90 ± 0.60*	2.87 ± 0.11*

Rats were administered with perfluorooctanoic acid, perfluorononanoic acid or perfluorodecanoic acid at a dose of 10 mg/kg body weight once a day for 5 days. Values represent means ± SD for four rats. *, Significantly different from control ($P < 0.05$).

ロソームを調製し PCE と SCD 活性を測定した。Fig. 1-2 に示したようにペルフルオロオクタン酸、ペルフルオロノナン酸、ペルフルオロデカン酸の投与によって PCE 活性がそれぞれ 1.9、2.2、2.2 倍に上昇し、SCD 活性もそれぞれ 2.2、4.8、5.3 倍に誘導された。ペルフルオロオクタン酸投与時には SCD 活性が上昇傾向にあるものの有意な上昇ではなかった。

第2節 クロフィブリン酸の影響 (Kudo et al., 2003)

クロフィブリン酸は高脂血症治療薬として 1962 年に Thorp と Waring によって開発された薬物である (Fig. 1-3) (Thorp and Waring, 1962)。ラットにクロフィブリン酸を投与した際には、オレイン酸の割合の顕著な増加が報告されている (Kawashima and Kozuka, 1982)。さらに、PCE と SCD 活性がクロフィブリン酸投与によって上昇することが Kawashima らと Alegret らによって報告されている (Kawashima and Kozuka, 1983; Kawashima and Kozuka, 1985; Alegret et al., 1995)。しかしながら、クロフィブリン酸の肝のオレイン酸の割合と PCE 活性ならびに SCD 活性に対する影響を同時に比べた研究例はなかった。クロフィブリン酸のオレイン酸増加作用と PCE と SCD 活性誘導を再確認するために、100 mg/kg のクロフィブリン酸を 1 日 2 回で 4 日間皮下投与し、肝臓の脂肪酸組成と PCE ならびに SCD 活性を測定した。クロフィブリン酸を投与したラットの肝臓においてオレイン酸の割合は顕著に増加していた (Table 1-2)。また、SCD と PCE 活性はクロフィブリン酸の投与によってそれぞれ最大で 2.5、2.1 倍誘導された (Fig. 1-4)。

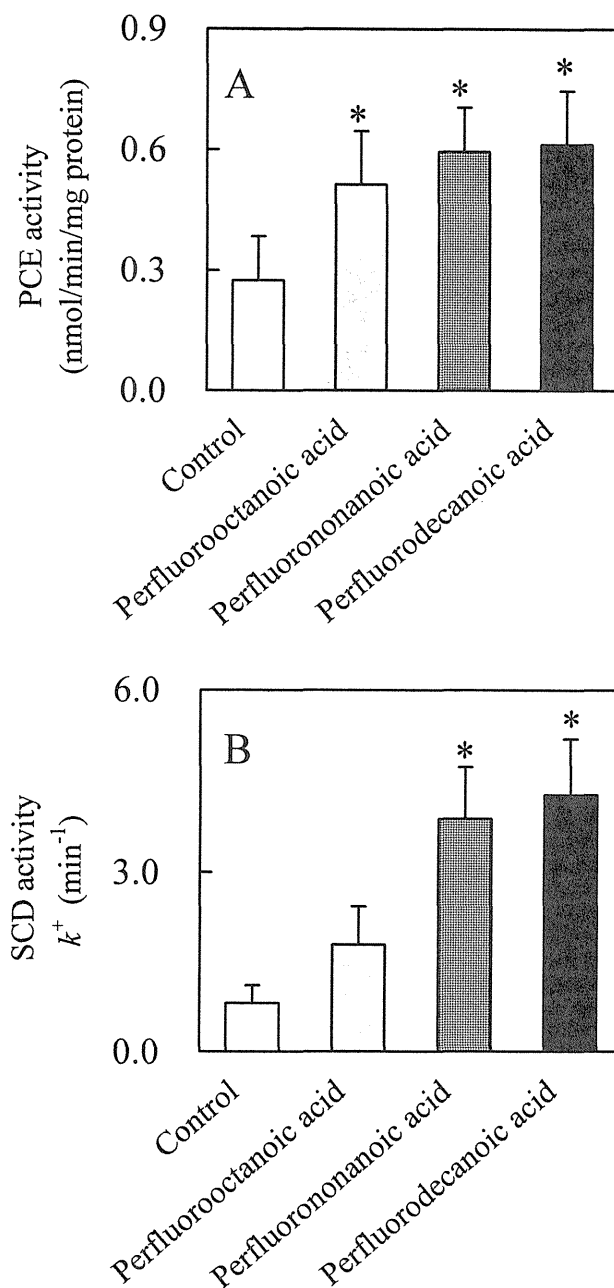


Fig. 1-2 Effects of PFCAs on the activities of PCE and SCD in hepatic microsomes of rats. Rats were administered with perfluorooctanoic acid, perfluorononanoic acid or perfluorodecanoic acid at a dose of 10 mg/kg body weight once a day for 5 days. A, PCE; B, SCD. Values represent means \pm SD for four rats. *, Significantly different from control ($P < 0.05$).

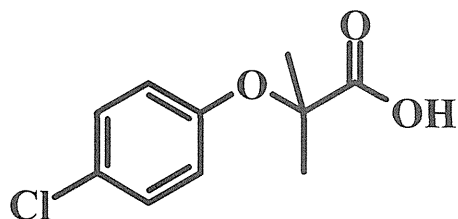


Fig. 1-3 Chemical structure of clofibric acid

Table 1-2 Effects of clofibric acid on fatty acid composition of total lipids in the liver of rats

Fatty acid	Control	Clofibric acid
	mol %	
16:0	25.39 ± 1.15	31.64 ± 1.2*
16:1 (n-7)	1.68 ± 0.37	1.85 ± 0.14
18:0	17.45 ± 0.63	23.80 ± 1.41*
18:1 (n-9)	7.22 ± 0.49	15.18 ± 1.58*
18:2 (n-6)	18.79 ± 1.54	18.00 ± 1.27
18:3 (n-3)	0.35 ± 0.06	0.21 ± 0.09*
20:3 (n-6)	0.07 ± 0.07	0.19 ± 0.05*
20:4 (n-6)	15.40 ± 0.57	10.20 ± 0.23*
20:5 (n-3)	1.15 ± 0.30	0.37 ± 0.09*
22:6 (n-3)	5.37 ± 0.31	3.02 ± 0.82*

Rats were subcutaneously administered with clofibric acid at a dose of 100 mg/kg body weight twice a day for 4 days. Values represent means ± SD for four rats. *, Significantly different from control ($P < 0.05$).

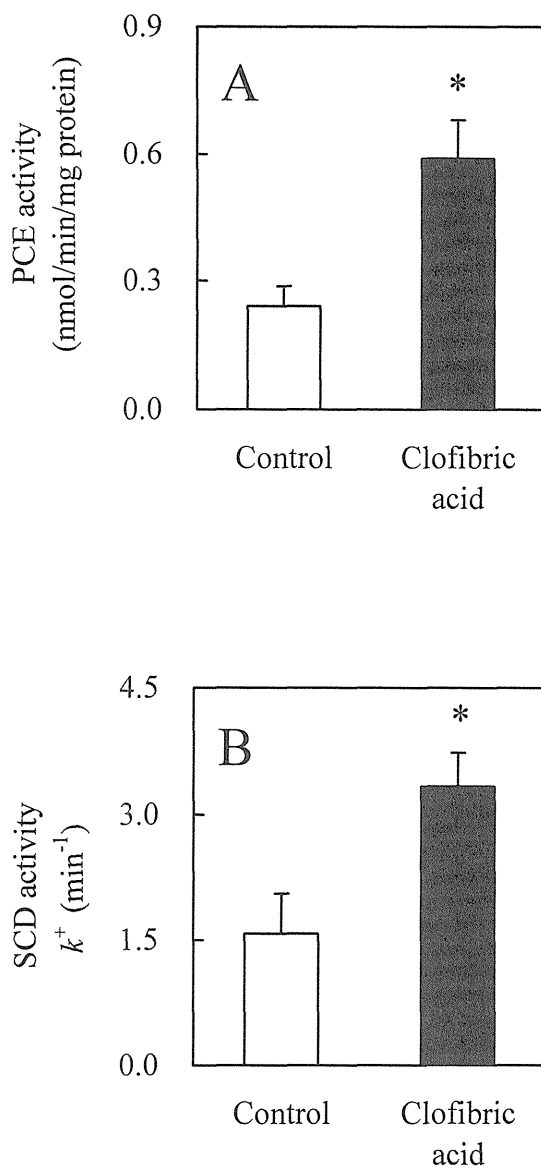


Fig. 1-4 Effects of clofibrac acid on the activities of PCE and SCD in hepatic microsomes of rats. Rats were subcutaneously administered with clofibrac acid at a dose of 100 mg/kg body weight twice a day for 4 days. A, PCE; B, SCD. Values represent means \pm SD for four rats. *, Significantly different from control ($P < 0.05$).

第3節 グルコース負荷の影響 (Kudo et al., 2003)

糖は生体内にとって最も重要なエネルギー源である。糖はさまざまな酵素を誘導することが知られており、脂質合成系の酵素も誘導する働きがある (Towle et al., 1997)。糖の摂取によって肝臓のオレイン酸の割合が上昇することが報告されてはいるものの (Brenner et al., 2003)、糖と PCE の活性の関係については全く情報がなかった。そこで、グルコースの摂取と PCE および SCD 活性の関係を調べた。食餌の組成を変えずに糖の影響を調べるために、2、4 および 7 日間 20% グルコース水溶液の給水によってラットにグルコースを与えた。その時オレイン酸の割合は増加していた (Table 1-3)。また、Fig. 1-5 に示したように SCD と PCE 活性はグルコース負荷によってそれぞれ最大で 2.9 および 4.2 倍誘導された。

Table 1-3 Effects of glucose on fatty acid composition of total lipids in the liver of rats

Fatty acid	Control		Glucose	
	mol %			
16:0	25.39	± 1.15	28.38	± 1.99*
16:1 (n-7)	1.68	± 0.37	5.88	± 1.15*
18:0	17.45	± 0.63	16.81	± 1.78
18:1 (n-9)	7.22	± 0.49	12.41	± 1.58*
18:2 (n-6)	18.79	± 1.54	11.57	± 0.92*
18:3 (n-3)	0.35	± 0.06	0.16	± 0.02*
20:3 (n-6)	0.07	± 0.07	0.28	± 0.17
20:4 (n-6)	15.40	± 0.57	11.00	± 1.42*
20:5 (n-3)	1.15	± 0.30	1.45	± 0.17
22:6 (n-3)	5.37	± 0.31	4.71	± 0.36*

Rats were given 20% (w/v) glucose solution for drinking during 4 days. Values represent means ± SD for four rats. *, Differences from the rats given water were statistically significant ($P < 0.05$).

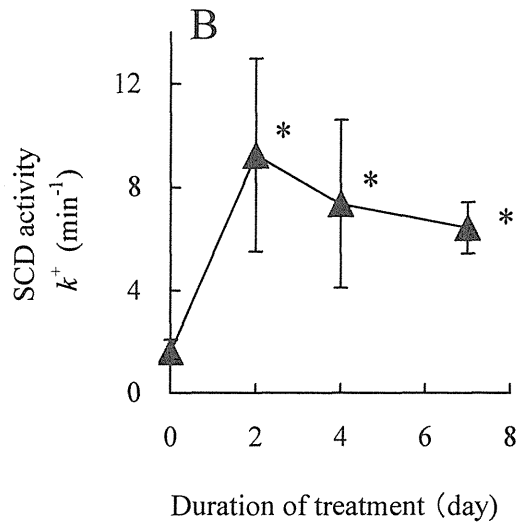
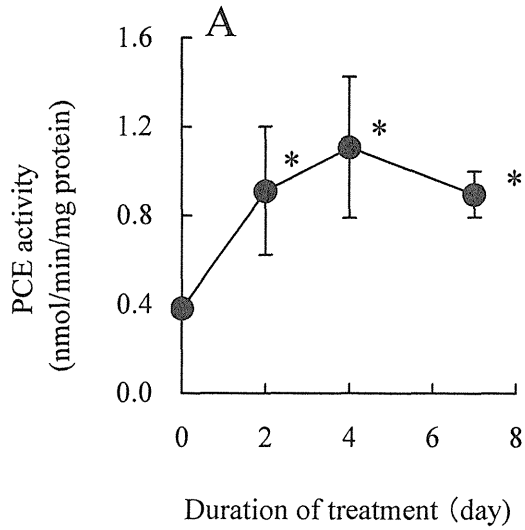


Fig. 1-5 Effects of glucose on the activities of PCE and SCD in hepatic microsomes in rats. Rats were given 20% (w/v) glucose solution for drinking during 2, 4 and 7 days. A, PCE; B, SCD. Values are means \pm SD for 4 or 6 rats. *, Differences from the rats given water were statistically significant ($P < 0.05$).

第4節 Zucker fa/fa ラット (Toyama et al., submitted)

Zucker fa/fa ラットは遺伝的に肥満、高脂血症、高インスリン血症を示すラットであり、また、肝臓のオレイン酸の割合が増大していることが報告されている (Bray, 1977; Olivier et al., 1988)。Zucker fa/fa ラットにおいて PCE 活性が上昇している可能性が考えられるので、Zucker fa/fa ラットと非肥満の lean ラットの PCE ならびに SCD 活性と肝臓の脂肪酸組成の関係を調べた。Table 1-4 に示したように、fa/fa ラットは顕著な体重増加と血清インスリンレベルの上昇が見られた。血糖値には有意な差は見られなかった。Zucker fa/fa ラットにおいて PCE 活性は lean ラットよりも 3.2 倍高かった (Fig. 1-6)。同様に、SCD 活性も 6.3 倍高かった。Zucker fa/fa ラット肝臓のオレイン酸の割合は lean ラットの 2.7 倍に増加していた (Table 1-5)。

Table 1-4 Body weight, liver weight, serum insulin and blood glucose in Zucker lean and fa/fa rats

Phenotype	Body weight (g)	Liver weight (g)	Insulin (ng/mL)	Glucose (mg/dL)
Lean	390 ± 15	14.4 ± 0.7	2.5 ± 2.0	147 ± 7
fa/fa	590 ± 9†	33.5 ± 2.4†	19.7 ± 4.0†	278 ± 133

Values are means ± SD for four rats. †, Differences between lean and fa/fa rats were statistically significant ($P < 0.05$).

第5節 小括および考察

ラットにペルフルオロ脂肪酸、クロフィブリン酸、グルコースを投与すると肝臓における

オレイン酸の割合の増加と PCE 活性の誘導が確認された。また、Zucker lean ラットに比べると fa/fa ラットにおいては肝臓のオレイン酸の割合が増加しており、同時に PCE 活性が上昇していることが認められた。本節での検討によって PCE 活性がこれらの条件で顕著に上昇することが初めて明らかにされ、また PCE 活性の上昇が肝臓のオレイン酸の割合に大きな影響を与えることが明らかとなった。本章で検討した条件下では PCE 活性の上昇とともに SCD 活性の上昇も確認された。これらのことから、オレイン酸合成には PCE と SCD の協調的な関与が必要であると考えられる。SCD と PCE 活性は、先に、絶食、絶食後の再摂食、インスリン投与、ペルオキシソーム増殖剤の投与によって変化することが知られているが (Cinti et al., 1992; Kawashima and Kozuka, 1985; Oshino and Sato, 1972; Eck et al., 1979)、これらの条件下での活性変動のメカニズムに関する研究は

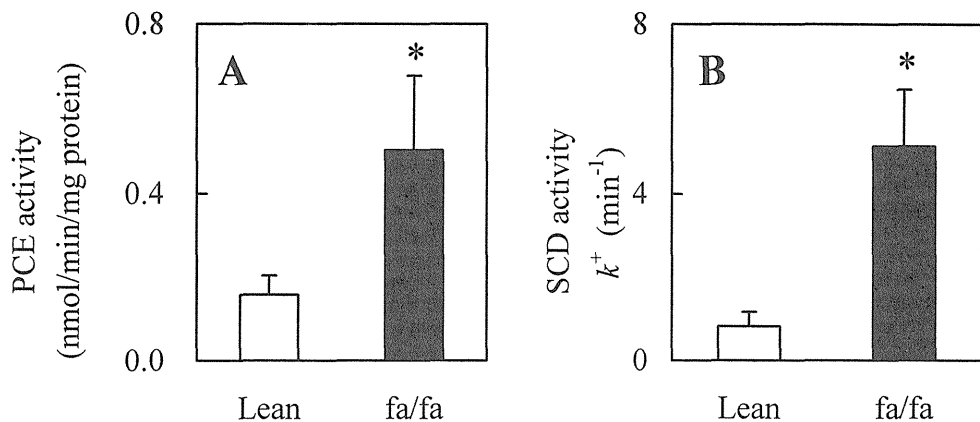


Fig. 1-6 The activities of PCE and SCD in Zucker lean and fa/fa rats. A, PCE; B, SCD. Values are means \pm SD for four rats. *, Differences between lean and fa/fa rat were statistically significant ($P < 0.05$).

それぞれが PCE と SCD いずれか一方の酵素に焦点を当てているだけか、もしくはオレイン酸の割合への影響を考慮せずにデザインされた研究であるかのどちらかであり、オレイン酸の割合の変化を PCE と SCD の双方の活性の変動と結びつけて総合的に評価した例は少ない。本章における検討から得られた結果は、種々の生理状態における PCE および SCD 活性とオレイン酸の割合の間に強い関連性のあることを示唆するものである。

Table 1-5 Fatty acid composition of total lipids in the liver of Zucker rats

Fatty acid	Lean	fa/fa
	mol %	
16:0	27.36 ± 2.85	33.54 ± 2.99
16:1 (n-7)	2.3 ± 0.71	11.46 ± 3.68*
18:0	13.6 ± 0.89	3.59 ± 0.76*
18:1 (n-9)	9.24 ± 1.42	24.56 ± 1.45*
18:2 (n-6)	20.91 ± 1.29	14.21 ± 4.63*
18:3 (n-3)	0.51 ± 0.09	0.82 ± 0.32
20:3 (n-6)	1.07 ± 0.3	0.82 ± 0.15
20:4 (n-6)	13.82 ± 5.3	1.56 ± 0.39*
20:5 (n-3)	1.09 ± 0.05	0.8 ± 0.22
22:6 (n-3)	4.37 ± 0.7	2.25 ± 0.75*

Values represent means ± SD for four rats. *, Differences between lean and fa/fa rats were statistically significant ($P < 0.05$).

第2章 PCE のオレイン酸合成への寄与

第1章においてオレイン酸の割合の増加時には、PCEとSCD活性が共に上昇していることが明らかとなった。もしもPCEとSCDがオレイン酸の割合を決定付ける因子であるならば、PCEとSCDの活性を変えることでオレイン酸の割合に変化を与えることが可能なのである。すなわち、第一章で示したような異なる刺激を組み合わせで与えた場合、PCEとSCD活性はさらに上昇し、オレイン酸の割合も増加するものと考えられる。そこでグルコース負荷、クロフィブリン酸投与とZucker fa/faラットを組み合わせさせた場合、オレイン酸の割合と、SCDとPCE活性に対してどのように影響するかを検討した。ただし、グルコース負荷と高インスリン血症を呈するZucker fa/faラットは糖/インスリンによる類似した刺激の生理状態におかれている可能性が考えられるので、組み合わせは(i)グルコース負荷とクロフィブリン酸投与、(ii)Zucker fa/faラットとクロフィブリン酸投与の2種類について検討した。

第1節 糖負荷とクロフィブリン酸のPCE活性に対する影響 (Kudo et al., 2003)

クロフィブリン酸の100 mg/kg 1日2回注射と20%グルコースの給水を組み合わせでWistarラットに4日間投与し、PCEとSCD活性に対する影響を調べた。Fig. 2-1に示したように、グルコースとクロフィブリン酸を組み合わせで投与した場合には、グルコース単独投与時と比べてPCE活性はさらに2倍上昇したが、SCD活性には変化が見られなかった。肝臓のオレイン酸の割合は、グルコースとクロフィブリン酸を組み合わせで投与した場合にはグルコース単独投与時と比べて2倍上昇した(Table 2-1)。クロフィブリン酸はペルオキシソームのアシルCoAオキシダーゼ(Lazarow and de Duve, 1976)とミクロソームのア

シル CoA 合成酵素活性 (Krisans et al., 1980) を誘導することが知られているので、クロフィブリン酸の作用の程度を見るためにアシル CoA オキシダーゼとアシル CoA 合成酵素活性を測定した。Table 2-2 に示したように、クロフィブリン酸投与時にアシル CoA オキシダーゼとアシル CoA 合成酵素活性が誘導され、グルコース負荷はクロフィブリン酸によるアシル CoA オキシダーゼとアシル CoA 合成酵素活性誘導に影響を与えなかった。血中インスリン濃度と血糖値にはすべての群において有意な変化が見られなかった (Table 2-3)。

Table 2-1 Effects of glucose and clofibric acid on fatty acid composition of total lipids in the liver of Wistar rats

Fatty acid	Control		Glucose	
	- clofibric acid	+ clofibric acid	- clofibric acid	+ clofibric acid
	mol %			
16:0	25.39 ± 1.15	31.64 ± 1.2*	28.38 ± 1.99#	28.35 ± 0.90*#
16:1 (n-7)	1.68 ± 0.37	1.85 ± 0.14	5.88 ± 1.15#	4.53 ± 0.90*#
18:0	17.45 ± 0.63	23.80 ± 1.41*	16.81 ± 1.78#	12.99 ± 1.11*#
18:1 (n-9)	7.22 ± 0.49	15.18 ± 1.58*	12.41 ± 1.58#	25.49 ± 2.99*#
18:2 (n-6)	18.79 ± 1.54	18.00 ± 1.27	11.57 ± 0.91#	7.46 ± 0.79*#
18:3 (n-3)	0.35 ± 0.06	0.21 ± 0.09	0.16 ± 0.02#	0.09 ± 0.02*#
20:3 (n-6)	0.07 ± 0.07	0.19 ± 0.05*	0.28 ± 0.17	1.52 ± 0.17*#
20:4 (n-6)	15.40 ± 0.57	10.20 ± 0.23*	11.00 ± 1.42#	9.60 ± 1.49
20:5 (n-3)	1.15 ± 0.30	0.37 ± 0.09*	1.45 ± 0.17	0.85 ± 0.08*#
22:6 (n-3)	5.37 ± 0.31	3.02 ± 0.82*	4.71 ± 0.36	2.74 ± 0.39*

Wistar rats were given 20% (w/v) glucose solution for drinking during 4 days. Some of rats were subcutaneously administered with clofibric acid at a dose of 100 mg/kg twice a day for 4 days. Values are means ± SD for four rats. *, Differences from clofibric acid-untreated rat were statistically significant ($P < 0.05$). #, Differences from glucose-untreated rat were statistically significant ($P < 0.05$).

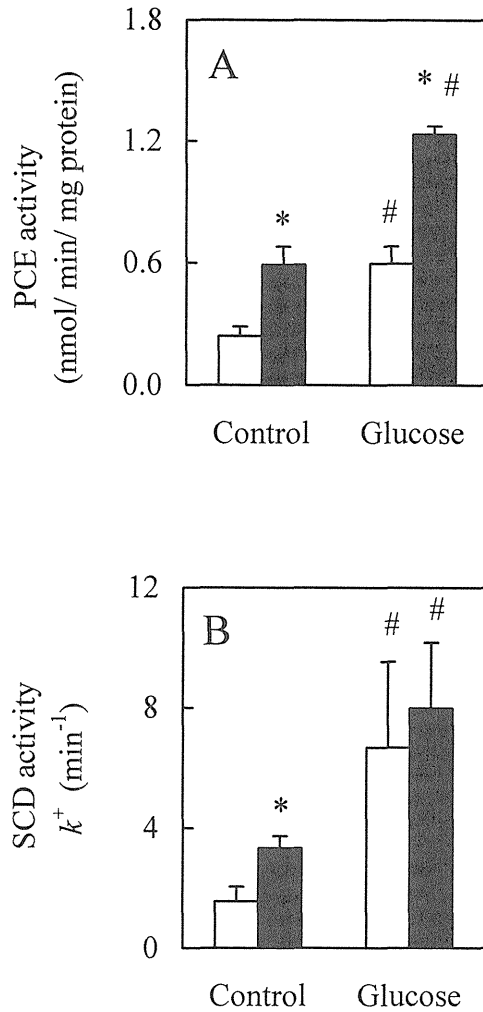


Fig. 2-1 Effects of glucose and clofibrac acid on the activities of PCE and SCD in the liver of Wistar rats. Wistar rats were given 20% (w/v) glucose solution for drinking during 4 days. Some of rats were subcutaneously administered with clofibrac acid at a dose of 100 mg/kg twice a day for 4 days. A, PCE; B, SCD. Values are means \pm SD for four rats. *, Differences from clofibrac acid-untreated rat were statistically significant ($P < 0.05$). #, Differences from glucose-untreated rat were statistically significant ($P < 0.05$).

Table 2-2 Effects of glucose and clofibrac acid on the activities of peroxisomal acyl-CoA oxidase and microsomal acyl-CoA synthetase in the liver of Wistar rats

	Clofibrac acid	Acyl-CoA oxidase (nmol/min/mg protein)	Acyl-CoA synthetase (nmol/min/mg protein)
Control	-	4.6 ± 0.3	73.9 ± 6.2
	+	31.8 ± 4.0*	143.8 ± 7.5*
Glucose	-	4.5 ± 0.7	87.5 ± 9.5
	+	31.1 ± 2.1*	147.5 ± 11.3*

Wistar rats were given 20% (w/v) glucose solution for drinking during 4 days. Some of rats were subcutaneously administered with clofibrac acid at a dose of 100 mg/kg twice a day for 4 days. Values are means ± SD for 4 rats. *, Differences from clofibrac acid-untreated rat were statistically significant ($P < 0.05$).

Table 2-3 Effects of glucose and clofibrac acid on serum levels of insulin and glucose of Wistar rats

	Clofibrac acid	Insulin ng/mL	Glucose mg/dL
Control	-	0.73 ± 0.30	153.2 ± 12.2
	+	0.84 ± 0.65	173.7 ± 13.5
Glucose	-	0.76 ± 0.15	146.4 ± 5.5
	+	0.80 ± 0.38	169.5 ± 6.8

Wistar rats were given 20% (w/v) glucose solution for drinking during 4 days. Some of rats were subcutaneously administered with clofibrac acid at a dose of 100 mg/kg twice a day for 4 days. Values are means ± SD for four rats.

第2節 Zucker ラットの PCE 活性に対するクロフィブリン酸の影響

(Toyama et al., submitted)

Zucker fa/fa と lean ラットに 100 mg/kg 体重のクロフィブリン酸を 1 日 2 回、7 日間皮下に投与し、肝臓の PCE と SCD 活性に対する影響を調べた。Lean ラットにクロフィブリン酸を投与した場合、PCE と SCD 活性は非投与 lean ラットに比べてそれぞれ 3.0 および 4.9 倍に上昇した (Fig. 2-2)。一方、fa/fa ラットにクロフィブリン酸を投与した場合には、PCE

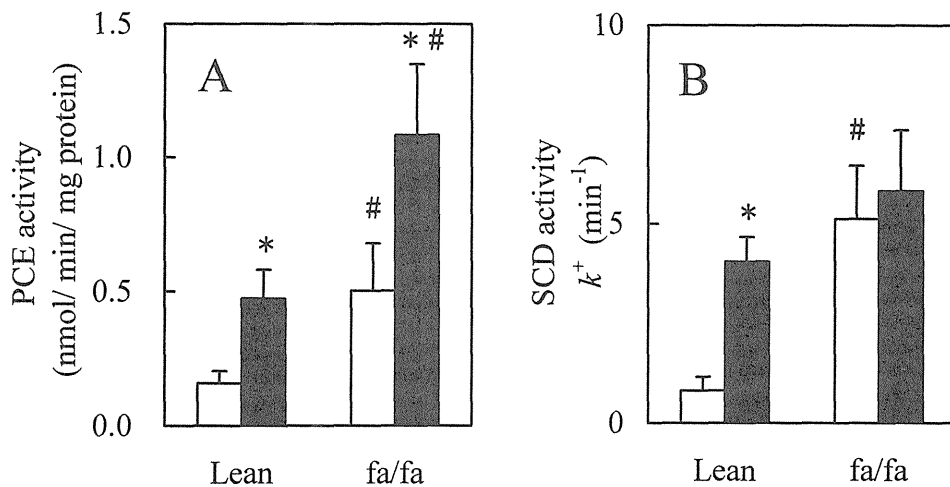


Fig. 2-2 Effects of clofibrilic acid administration on the activities of PCE and SCD in Zucker lean and fa/fa rats. Rats were given a subcutaneous injections of clofibrilic acid at a dose of 100 mg/kg twice a day for 7 days. A, PCE; B, SCD. Values are means \pm SD for four rats. *, Differences from clofibrilic acid-untreated rat were statistically significant ($P < 0.05$). #, Differences between lean and fa/fa rats were statistically significant ($P < 0.05$).

活性は非投与 fa/fa ラットに比べて 2.0 倍上昇したが、SCD 活性には変化が見られなかった (Fig. 2-2)。Table 2-4 に示したように、fa/fa ラットにクロフィブリン酸を投与するとオレイン酸の割合は 2.0 倍上昇した。クロフィブリン酸投与に伴うアシル CoA オキシダーゼ活性の誘導は、lean と fa/fa ラットにおいて同レベルであった (Table 2-5)。血中インスリン濃度は lean ラットよりも fa/fa ラットの方が高く、クロフィブリン酸は血清インスリン濃度を変えなかった (Table 2-6)。

Table 2-4 Effects of clofibrinic acid on fatty acid composition of total lipids in the liver of Zucker rats

Fatty acid	Lean		fa/fa	
	- clofibrinic acid	+ clofibrinic acid	- clofibrinic acid	+ clofibrinic acid
	mol %			
16:0	27.36 ± 2.85	28.61 ± 0.93	33.54 ± 2.99†	34.04 ± 0.62†
16:1 (n-7)	2.3 ± 0.71	2.55 ± 0.19	11.46 ± 3.68†	8.44 ± 0.48†
18:0	13.6 ± 0.89	12.15 ± 0.48*	3.59 ± 0.76†	4.47 ± 0.95†
18:1 (n-9)	9.24 ± 1.42	18.79 ± 0.83*	24.56 ± 1.45†	34.69 ± 2.66*†
18:2 (n-6)	20.91 ± 1.29	16.35 ± 1.16*	14.21 ± 4.63†	8.41 ± 0.59*†
18:3 (n-3)	0.51 ± 0.09	0.18 ± 0.03*	0.82 ± 0.32	0.22 ± 0.06*
20:3 (n-6)	1.07 ± 0.3	2.75 ± 0.12*	0.82 ± 0.15	1.34 ± 0.22*†
20:4 (n-6)	13.82 ± 5.3	12.76 ± 0.75	1.56 ± 0.39†	2.1 ± 0.93†
20:5 (n-3)	1.09 ± 0.05	0.43 ± 0.04*	0.8 ± 0.22†	0.5 ± 0.07*
22:6 (n-3)	4.37 ± 0.7	2.55 ± 0.22*	2.25 ± 0.75†	1.53 ± 0.3†

Rats were administered with clofibrinic acid at the dose of 100 mg/kg body weight twice a day for 7 days. *, Differences from clofibrinic acid-untreated rat were statistically significant ($P < 0.05$). †, Differences between lean and obese rats were statistically significant ($P < 0.05$).

Table 2-5 Effects of clofibrac acid on body weight, liver weight and liver peroxisomal acyl-CoA oxidase in Zucker lean and fa/fa rats

Fenotype	Clofibrac acid	Body weight (g)	Liver weight (g)	Acyl-CoA oxidase (nmol/min/mg)
Lean	-	390 ± 15	14.4 ± 0.7	3.7 ± 0.1
	+	370 ± 6	18.1 ± 0.5	32.8 ± 2.0*
fa/fa	-	590 ± 9†	33.5 ± 2.4†	4.9 ± 0.6
	+	601 ± 12†	39.5 ± 5.2†	33.7 ± 2.8*

Rats were given a subcutaneous injection of clofibrac acid at a dose of 100 mg/kg body weight twice a day for 7 days. Values are means ± SD for four rats. *, Differences from clofibrac acid-untreated rats were statistically significant ($P < 0.05$). †, Differences between lean and fa/fa rats were statistically significant ($P < 0.05$).

Table 2-6 Effects of clofibrac acid on serum insulin and glucose concentrations in Zucker rats.

Fenotype	Clofibrac acid	Insulin (ng/mL)	Glucose (mg/dL)
Lean	-	2.5 ± 2.0	147 ± 6
	+	2.0 ± 1.0	150 ± 9
fa/fa	-	19.7 ± 4.0†	278 ± 133
	+	23.6 ± 12.0†	262 ± 34†

Rats were given a subcutaneous injection of clofibrac acid for 7 days twice a day at a dose of 100mg/kg body weight. Values are means ± SD for four to eight rats. †, Differences between lean and fa/fa rat were statistically significant ($P < 0.05$).

第3節 肝臓のオレイン酸の割合に対する PCE と SCD の寄与率

オレイン酸の割合と SCD もしくは PCE 活性との関係を見るために、グルコース負荷とクロフィブリン酸投与を組み合わせた場合について、第1節の Fig.2-1 と Table 2-1 の実験値を用いて、相関分析を行なった。Fig. 2-4 に示したように PCE とオレイン酸の割合との間に有意な相関があった。また、SCD 活性と肝オレイン酸の割合との間にも有意な相関関係が見られた。第2節で示した、Zucker ラットとクロフィブリン酸の Fig. 2-2 と Table 2-4 の実験値を用いて同様の相関分析を行なった。Fig. 2-5 に示したように、PCE とオレイン酸の割合との間に有意な相関が認められ、また、SCD 活性と肝臓のオレイン酸の割合との間にも有意な相関関係が見られた。さらに、第1節と第2節の実験結果をすべて統合した際にも、PCE もしくは SCD とオレイン酸の割合の間に有意な相関が見られた (Fig. 2-6)。次に、PCE と SCD が全体としてどのようにオレイン酸の割合に影響を与えているのかを知るために、オレイン酸の割合を目的変数、PCE と SCD 活性を説明変数とし、重回帰分析を行なった (Table 2-7)。グルコースとクロフィブリン酸を組み合わせ投与した場合には、PCE の標準偏回帰係数の方が SCD の標準偏回帰係数よりも大きかった。Zucker ラットにクロフィブリン酸を投与した場合も同様であった。すべてのデータを統合した場合も、SCD よりも PCE の標準偏回帰係数の方が大きかった。

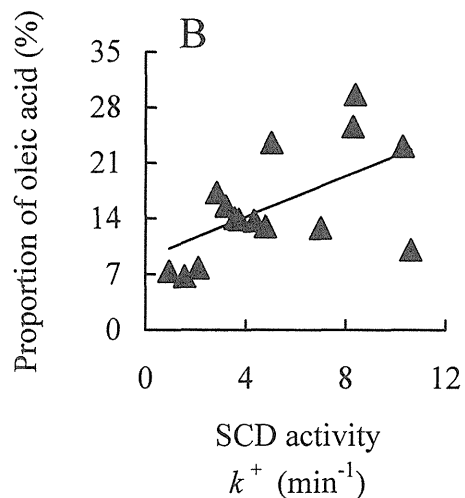
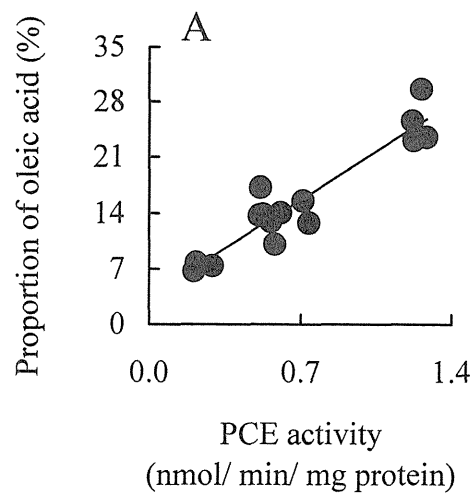


Fig. 2-4 Correlation between the activity of PCE or SCD and proportion of oleic acid in the liver of glucose and/or clofibrac acid-treated Wistar rats. Regression analyses were performed on the sixteen data from Fig. 2-1 and Table 2-1. A, PCE activity *versus* oleic acid proportion in the liver, $Y = 17.4X + 3.4$, $r^2 = 0.882$, $P < 0.001$; B, SCD activity *versus* oleic acid proportion in the liver, $Y = 9.01X + 1.3$, $r^2 = 0.328$, $P < 0.05$.

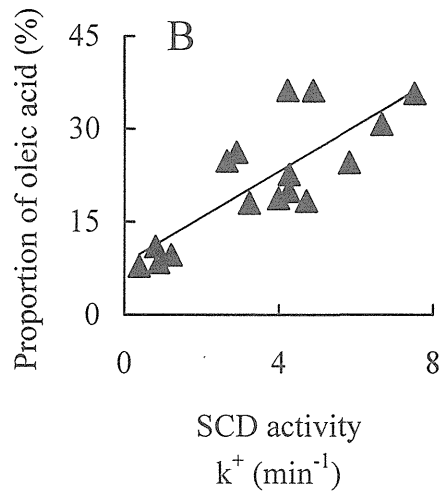
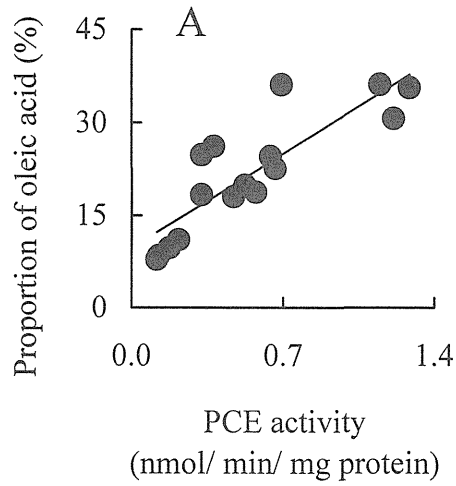


Fig. 2-5 Correlation between the activity of PCE or SCD and proportion of oleic acid in the liver of Zucker lean and *fa/fa* rats. Regression analyses were performed on the sixteen data from Fig. 2-2 and Table 2-4. A, PCE activity *versus* oleic acid proportion in the liver, $Y = 21.8X + 9.7$, $r^2 = 0.728$, $P < 0.001$; B, SCD activity *versus* oleic acid proportion in the liver, $Y = 36.8X + 8.4$, $r^2 = 0.647$, $P < 0.001$.

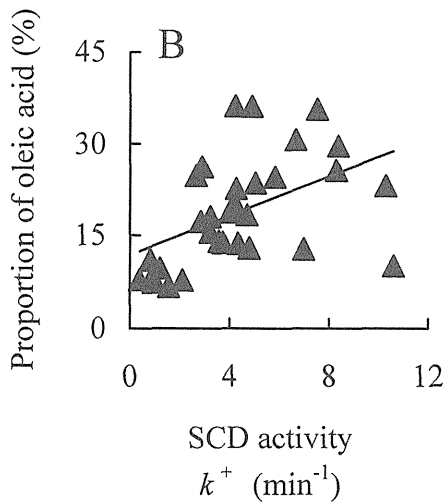
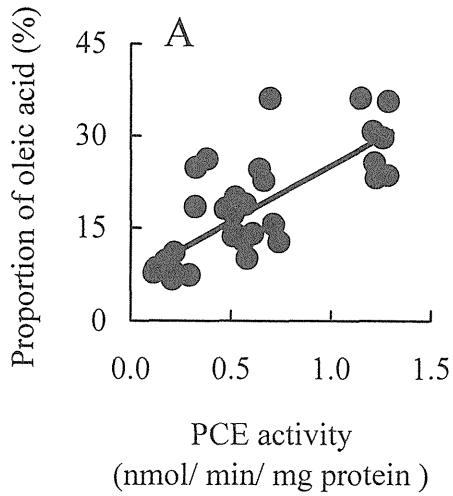


Fig. 2-6 Correlation between the activity of PCE or SCD and proportion of oleic acid in the liver of Wistar and Zucker rats. Regression analyses was performed on the 32 data from Fig. 2-1 and 2-2 and Table 2-1 and 2-4, A, PCE activity *versus* oleic acid proportion in the liver, $Y = 11.4X + 10.0$, $r^2 = 0.300$, $P < 0.001$; B, SCD activity *versus* oleic acid proportion in the liver, $Y = 0.98X + 13.1$, $r^2 = 0.121$, $P < 0.05$.

Table 2-7 Multiple regression analysis for the relationship between oleic acid proportion, PCE activity and SCD activity

Experiments	Data from	n	PCE		SCD		R ²
			β_1	P	β_2	P	
1. Wistar rat	Fig. 2-1 Table 2-1	16	1.06	< 0.001	-0.168	0.22	0.897
2. Zucker rat	Fig. 2-2 Table 2-4	16	0.604	0.04	0.289	0.30	0.747
3. Expt. 1 + Expt. 2	Fig. 2-1 Fig. 2-2 Table 2-1 Table 2-4	32	0.877	< 0.001	-0.185	0.35	0.557

The dependent variable was oleic acid proportion. β ; standardized partial correlation coefficient, R²; coefficient of determination.

第4節 小括および考察

オレイン酸の割合が増加している生理状態にクロフィブリン酸を投与すると、さらにオレイン酸が増え、この時PCE活性が上昇し、一方、SCD活性は変化しないことが、2種類の異なる実験において観察された。重回帰分析の結果から、オレイン酸の割合の決定にはSCDよりもPCEの方が大きく寄与することが分った。従来は、SCDが主にオレイン酸合成の鍵酵素だと考えられていたが、この結論を導き出す際に詳細な検討がされてはいなかった。本章での検討の結果から、PCEのオレイン酸の割合の調節に対する重要性が明らかとなった。オレイン酸には神経の発達 (Taberner et al., 2001)、VLDLの分泌

(Miyazaki et al., 2000)、肥満 (Ntambi et al., 2003) などに関連した生理機能があると考えられている。したがって、PCE 活性がそれらを決定付ける可能性があり、究極的には PCE がさまざまな病態に関与する因子である可能性が考えられる。

本章における検討から、クロフィブリン酸投与時には PCE と SCD 活性調節機構には異なる部分があることが明らかとなった。SCD よりも PCE の方がインスリンに対してより敏感に応答するという予備的な知見(データは示さなかった)から、クロフィブリン酸が血清インスリンや血糖値を変化させ、PCE 活性に影響を与える可能性が考えられた。しかし、クロフィブリン酸は血清インスリンや血糖値には影響を与えなかった。次に、クロフィブリン酸が十分に作用していないために、PCE と SCD の誘導に相違が起こる可能性が考えられた。グルコース負荷ラットと非負荷ラットにクロフィブリン酸を投与した場合にはアシル CoA オキシダーゼ活性の誘導には差異は見られなかった。また、Zucker lean と fa/fa ラットにクロフィブリン酸を投与した場合にもアシル CoA オキシダーゼ活性の誘導に差異は見られなかった。したがって、十分な量のクロフィブリン酸が細胞に取り込まれ、作用を十分に発揮していることが明らかとなった。SCD と PCE のクロフィブリン酸に対する応答の違いはどのようにして起きているのであろうか。

クロフィブリン酸、糖、インスリンは転写因子を介して遺伝子発現を調節することが知られている。1990年に Issemann と Green らによってペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (peroxisome proliferator activated receptor, PPAR) がクローニングされた (Issemann and Green, 1990)。クロフィブリン酸は PPAR α のリガンドとなることが示されている。PPAR のターゲット遺伝子はその遺伝子上流にペルオキシソーム増殖剤応答エレメント (peroxisome proliferator response element, PPRE) を持つ (Desvergne and Wahli, 1999)。アシル CoA オキシダーゼと SCD 遺伝子上流には PPRE があることが示されている (Desvergne and Wahli, 1999)。PCE についてはプロモーター領域の解析はまだ進んでおらず、PPRE が存在するかどうかは分っていない。ペルオキシソーム増殖剤を投与した

場合には PCE が誘導されることが多数報告されていることから、PCE の誘導は PPAR α を介するものと考えられている (Cinti et al., 1992; Kawashima and Kozuka, 1985)。

1993 年にステロール応答エレメント結合蛋白 (sterol regulatory element binding protein, SREBP) が単離された (Yokoyama et al., 1993)。SREBP はインスリンや糖の刺激によって活性化し、その支配下の遺伝子の発現を調節する (Foufelle and Ferre, 2002)。さらに、SREBP-1 の応答領域が SCD の遺伝子上流に存在することが確認されている (Tabor et al., 1999)。マウスに発現している PCE は SREBP-1c のトランスジェニックマウスにおいて最も高発現している遺伝子としてクローニングされている (Mitsuzaka et al., 2002)。これらのことから、グルコースによる刺激は SREBP-1 を活性化し SCD と PCE を誘導することが考えられていた。事実、最近になって、糖負荷は SREBP-1 を活性化し SCD を調節することが報告された (Miyazaki et al., 2004)。PCE は SREBP-1 支配を強く受けるので、グルコースは SREBP-1 を活性化して PCE を誘導するものと類推される。

高インスリン血症である Zucker fa/fa ラットの PCE と SCD 活性は lean ラットよりも高かった。これは SREBP-1 の活性化によるものと考えられているが詳細な検討はまだ行なわれていなかった。Zucker fa/fa ラットで PCE と SCD 活性が高く保たれる機構については次章にて検討を加えた。

このように、PCE と SCD は PPAR α や SREBP-1 によって調節されるが、これらの因子だけではクロフィブリン酸の応答の違いを説明することはできない。PCE と SCD の両者が PPAR α のターゲット遺伝子であるならばクロフィブリン酸の応答に相違は無いはずである。すなわち、本章において PCE と SCD のクロフィブリン酸に対する応答に関与する因子は PPAR α と SREBP 以外にも存在する可能性が強く示唆された。

第3章 Zucker fa/fa ラットにおける PCE の誘導機構

第1章における検討によって、PCE 活性と SCD 活性は、グルコース負荷によって顕著に上昇すること、高インスリン血症を呈する Zucker fa/fa ラットにおいて高レベルであることが明らかとなった。PCE と SCD はインスリン投与によって誘導されることが知られているが、Zucker fa/fa ラットにおいて PCE と SCD 活性が高く保たれているメカニズムについては解明されていない。そこで Zucker ラットにおける PCE と SCD の活性に血清インスリンと肝への糖取り込みがどのように影響しているかを調べた。

第1節 Zucker ラットにおける PCE 活性と SCD 活性に対するインスリンの影響

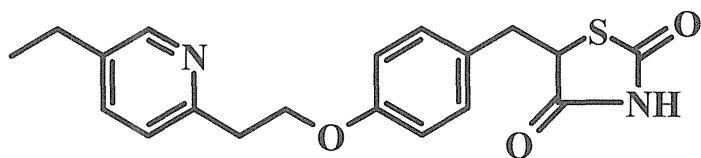


Fig. 3-1 Chemical structure of pioglitazone

血清インスリンが高レベル状態にあることが PCE と SCD 活性にどのように影響しているかを調べるために、ピオグリタゾン (Fig. 3-1) の投与により Zucker fa/fa ラットの血清インスリンレベルを下げた。ピオグリタゾンは主に脂肪細胞に発現している PPAR γ のアゴニストである (Kadowaki, 2001)。この薬物は、脂肪組織内で PPAR γ が活性化されることにより

前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化促進または成熟脂肪細胞のアポトーシスを促し、最終的には脂肪細胞から分泌されるアディポカインの制御によりインスリン抵抗性を改善する (Kadowaki, 2001)。PPAR γ のアゴニストを正常マウスに投与した場合には肝臓の SCD と PCE の発現には影響がないことがすでに知られている (Chao et al., 2000; Mitsuzaka et al., 2002)。塩酸ピオグリタゾン を 30 mg/kg、1 日 1 回、14 日間経口投与し、肝臓の PCE と SCD 活性を調べた。Fig. 3-2 に示すように、ピオグリタゾンの投与によって Zucker fa/fa ラットの血清インスリンは lean ラットレベルにまで低下した。

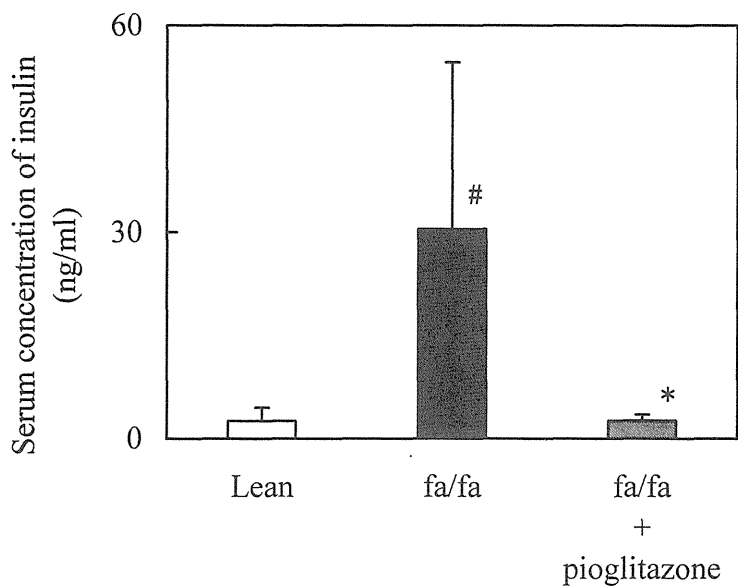


Fig. 3-2 Effects of pioglitazone on serum concentration of insulin in Zucker fa/fa rats. Rats were given an oral administration of pioglitazone at a dose of 30 mg/kg body weight once a day for 14 days. Values are means \pm SD for four rats. #, Differences between lean and fa/fa rats were statistically significant ($P < 0.05$). *, Differences between fa/fa and pioglitazone-treated fa/fa rats were statistically significant ($P < 0.05$).

その時 PCE と SCD 活性には fa/fa ラットの無処置群と比べて有意な低下は見られなかった (Fig. 3-3)。また、肝臓のオレイン酸の割合にピオグリタゾンに影響しなかった (Fig. 3-3)。Zucker ラットの肝臓から総 RNA を抽出し、SREBP-1 とそのターゲット遺伝子である アセチル CoA カルボキシラーゼの発現をリアルタイム PCR 法にて調べた。fa/fa ラットにおいて SREBP-1 の遺伝子発現は lean ラットの約 2 倍であり、同様にアセチル CoA カルボキシラーゼの発現も 2 倍に増加していた (Fig. 3-4)。ピオグリタゾンを投与すると fa/fa ラットの SREBP 発現は lean ラットのレベルにまで回復した (Fig. 3-4)。アセチル CoA カルボキシラーゼの発現も lean ラットと同じレベルとなった。

第2節 肝における糖の取り込みと PCE ならびに SCD 活性に対する影響

前節において Zucker ラットにおいては血清のインスリン濃度が PCE と SCD の誘導に直接関与しないことを明らかにした。Wistar ラットでは糖負荷の刺激によって PCE と SCD 活性が誘導されたことから、Zucker ラットの PCE と SCD 活性には糖の取り込みが関与している可能性が考えられる。肝臓への糖の取り込み速度は 2-[¹⁴C]デオキシグルコース (DG) をラットの静脈内に投与し、投与後 40 分の肝臓における放射活性を AUC で除することによって求めた。Table 3-1 に示すように、fa/fa ラットにおいて糖取り込み速度を lean ラットと比べて約 2 倍に上昇していた。fa/fa ラットにピオグリタゾンを投与すると、糖の取り込みは lean ラットのレベルにまで回復した。データとしては示さなかったが、投与した 2-DG の血中濃度はどの群の間にも有意な差が見られなかった。

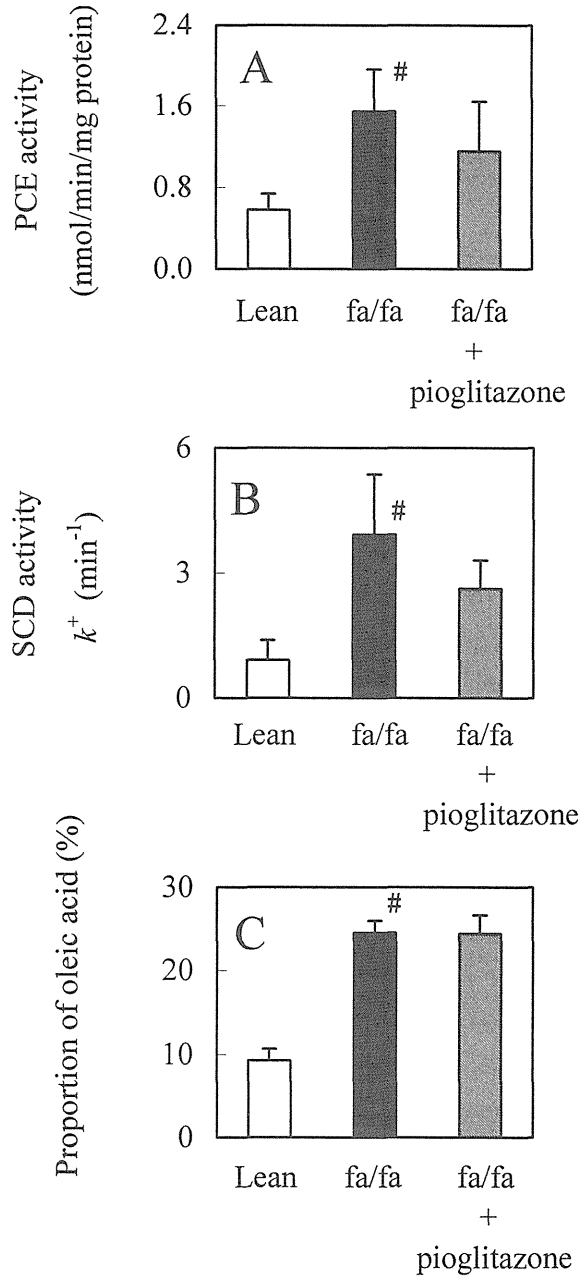


Fig. 3-3 Effects of pioglitazone on PCE activity, SCD activity, and oleic acid proportion in the liver of Zucker fa/fa rats. Rats were given an oral administration of pioglitazone once a day for 14 days at a dose of 30 mg/kg body weight. A, PCE; B, SCD; C, oleic acid proportion. Values are means \pm SD for four rats. #, Differences between lean and fa/fa rats were statistically significant ($P < 0.05$).

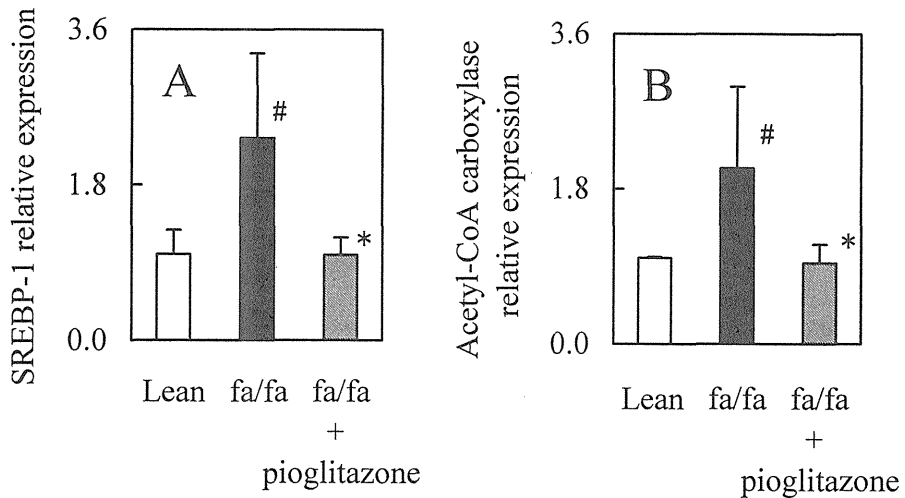


Fig. 3-4 Effects of pioglitazone on expression of mRNA of SREBP-1 and acetyl-CoA carboxylase in the liver of Zucker fa/fa rats. Rats were given an oral administration of pioglitazone once a day for 14 days at a dose of 30 mg/kg body weight. Total RNA were prepared from the liver of rats and mRNA expression of SREBP-1(A) and acetyl-CoA carboxylase (B) were determined by real-time PCR. Values are means \pm SD for four to eight rats. #, Differences between lean and fa/fa rats were statistically significant ($P < 0.05$). *, Differences between fa/fa and pioglitazone-treated fa/fa rats were statistically significant ($P < 0.05$).

Table 3-1 Effects of clofibric acid on hepatic 2-deoxyglucose uptake and extracellular spaces in the liver of Zucker rats

Treatments		Hepatic glucose uptake (nmol/min/mg protein)	Extracellular spaces (μ l/mg protein)
Wistar	control	0.247 \pm 0.13	2.4 \pm 0.4
	clofibric acid	0.236 \pm 0.01	1.8 \pm 0.2
Lean	control	0.238 \pm 0.01	1.8 \pm 0.1
	clofibric acid	0.208 \pm 0.03	2.1 \pm 0.7
fa/fa	control	0.432 \pm 0.09*	2.0 \pm 0.5
	clofibric acid	0.390 \pm 0.09	1.5 \pm 0.1
	pioglitazone	0.244 \pm 0.02†	2.2 \pm 0.4

Some of rats were given a subcutaneous injection of clofibric acid twice a day for 7 days at a dose of 100 mg/kg body weight. Some of rats were given an oral administration of pioglitazone once a day for 14 days at a dose of 30 mg/kg body weight. Values are means \pm SD for four to five rats. *, Differences between lean and fa/fa rats were statistically significant ($P < 0.05$). †, Differences between fa/fa and pioglitazone-treated fa/fa rats were statistically significant ($P < 0.05$).

第3節 小括および考察

Zucker fa/fa ラットにおいて、血清インスリン濃度の上昇と肝の糖取り込みの上昇が確認された。それにともなって SCD と PCE 活性が誘導されているようにみえたが、ピオグリタゾン投与したラットにおいては血清インスリン濃度や糖の取り込み速度が低下しているにもかかわらず、SCD と PCE 活性は高いままであった。これらの結果は血清インスリン

レベルの上昇と肝への糖の取り込みが SCD と PCE 活性の調節に直接的には関与してはいないことを示唆している。SREBP-1 はインスリン刺激によってその下流の遺伝子の発現を上昇させる (Foufelle and Ferre, 2002)。実際に Zucker においてインスリン濃度が高く、SREBP-1 は高発現しており、ピオグリタゾンによってインスリン濃度が下がると SREBP-1 の発現は lean レベルにまで戻った。SREBP-1 のターゲット遺伝子であるアセチル CoA カルボキシラーゼも同様の動きをした。このことは Zucker ラットにおいては SCD と PCE はインスリン-SREBP 経路以外の因子によって調節されている可能性があることを強く示唆している。Zucker ラットにおいて PCE と SCD を高発現させている因子として考えられるものに脂肪細胞から分泌されるレプチンがあげられる。Zucker fa/fa ラットはレプチン受容体変異ラットである (Iida et al., 1996)。実際に、レプチン遺伝子の欠損マウスである ob/ob マウスでは SCD 活性が上昇し、レプチンを投与すると元に戻る (Cohen et al., 2002)。つまり、肝臓に発現するレプチン受容体からのレプチンシグナルの伝達がストップし、その影響でこれらの酵素活性の誘導が起きていると考えられる。しかしながら、詳細は明らかにされていない。

第4章 クロフィブリン酸のPCEならびにSCD酵素タンパク質の 合成と分解に対する影響

第2章において、クロフィブリン酸を投与すると、これに応答してPCEとSCDには異なる調節が働くことを見出した。近年、転写の調節が非常によく研究されているが、PCEとSCDの転写後調節についてはほとんど調べられていない。PPAR α を介した転写活性化以外にもクロフィブリン酸に応答する調節があるのではないだろうか。DNAからタンパク質に至る経路にはいくつもの段階があり、どの段階にも調節がかかる可能性がある。SCDは半減期が2~4時間の短寿命のタンパク質であること(Oshino and Sato, 1972; Kawashima et al., 1989; Ozols, 1997)を考えると、SCD酵素タンパクの分解に対してクロフィブリン酸が影響を与える可能性がある。そこでPCEとSCDのクロフィブリン酸による誘導をこれらの酵素の合成と分解の両視点から検討した。

第1節 転写レベルにおける調節

クロフィブリン酸を投与したラットの肝臓における定常状態 mRNA をリアルタイム PCRにて測定した。SCD遺伝子にはこれまでに4つのアイソフォームがクローニングされている(Thiede et al., 1986; Kaestner et al., 1989; Zheng et al., 2001; Miyazaki et al., 2003)。SCD1は肝臓に発現しており、栄養状態の変化やペルオキシソーム増殖剤の投与に応答して変動する(Miyazaki and Ntambi, 2003)。肝臓のSCD活性は主にSCD1によるものであると考えられている(Miyazaki and Ntambi, 2003)。SCD2は主に脳や脂肪組織に、また微量ながら肝臓に発現しているタイプでありその役割の詳細については分っていない。SCD3とSCD4はそれぞれ皮膚と心臓に発現しており、肝臓での発現はノーザンブロー

ッティング法では確認されていない(Zheng et al., 2001;Miyazaki et al., 2003)。脂肪酸炭素鎖伸長酵素(fatty acid elongase, ELO)に関しては、ラットにおいて ELO1 と ELO の 2 タイプがクローニングされている(Inagaki et al., 2002)。PCE 活性の主体は ELO2 産物であると考えられている(Inagaki et al., 2002)。肝臓に発現している SCD1 および SCD2 と ELO1 および ELO2 について検討した。Table 4-1 に示したように、SCD1 と ELO2 の mRNA はクロフィブリン酸の投与によってそれぞれ 4.8 および 11.3 倍に増加した。一方、SCD2 と ELO1 の mRNA は変化しなかった。次に、mRNA の転写活性を nuclear run-on assay 法を用いて調べた。Fig. 4-1 に示したように、クロフィブリン酸投与によって SCD1 の転写活性が上昇した。これに対して SCD2、ELO1、ELO2 の転写活性には変化がなかった。

Table 4-1 Effects of clofibric acid on steady state levels of mRNAs of SCDs and ELOs in the liver of rats

	SCD1	SCD2	ELO1	ELO2
Control	1.0 ± 0.6	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.6
Clofibric acid	4.8 ± 1.1*	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.0	11.3 ± 9.1*

Rats were subcutaneously administered with clofibric acid at a dose of 100 mg/ kg body weight twice a day for 7 days. Total RNA was extracted and mRNA levels were determined by real-time PCR. Values represent means ± SD for four rats. *, Significantly different from control ($P < 0.05$).

第2節 分解レベルにおける調節

SCD と PCE 活性の半減期をシクロヘキシミドのタンパク合成阻害作用を利用して測定した。ラットにシクロヘキシミド 2.0 mg/kg を腹腔内投与し、投与後 0、2、4、6 時間後に肝ミ

クロソームを調製し、PCEとSCD活性を測定した (Fig. 4-2)。半減期の計算は投与0時間の活性が半分になる時間を最小二乗法により求めることにより行なった。SCDの半減期はこれまでに報告された値とほぼ一致して、約2時間であった (Oshino and Sato, 1972; Kawashima et al., 1989; Ozols, 1997)。PCEの半減期はSCDよりもかなり長く、約40時間であった。シクロヘキシミドを利用するこの実験においては、長時間の半減期を求めることは不可能であり、PCEの正確な半減期は求められなかった。クロフィブリン酸を投与するとSCDの半減期は2倍になった。それに対してクロフィブリン酸投与時もPCE活性の半減期には大きな変化はみられなかった。

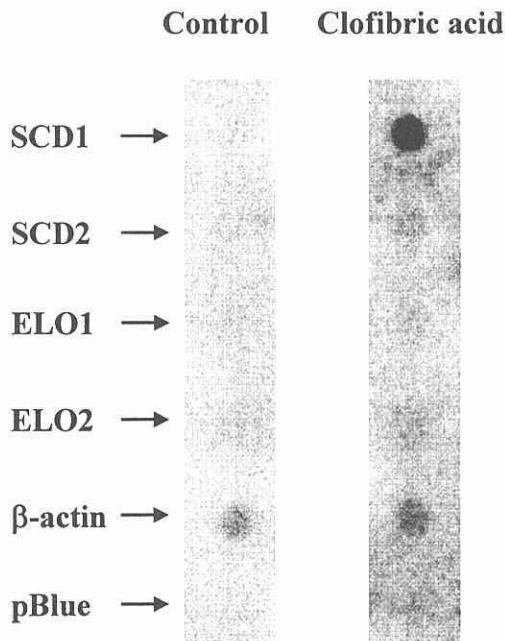


Fig 4-1 Effect of clofibrilic acid on the transcription of SCDs and ELOs in the liver of rats

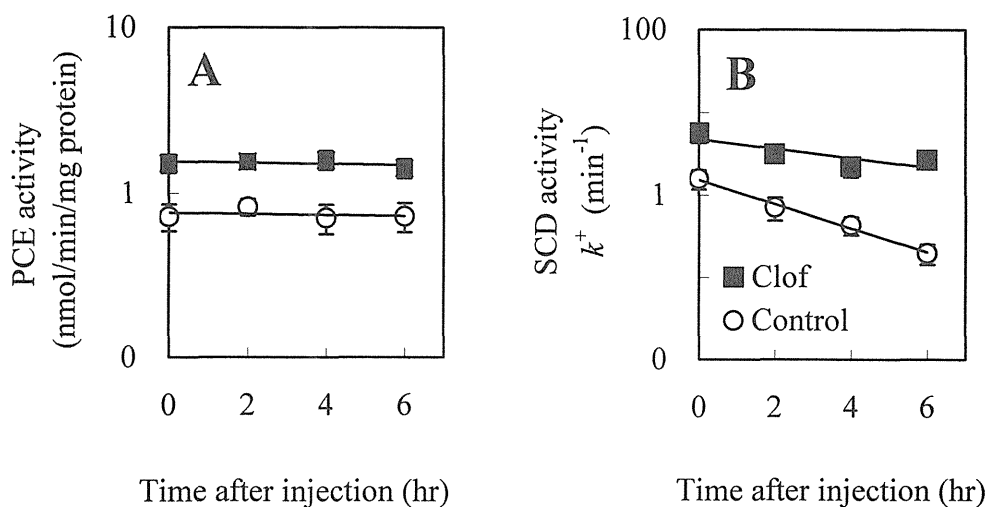


Fig. 4-2 Effects of clofibric acid on the decay of liver microsomal PCE and SCD. Rats were subcutaneously administered with clofibric acid at a dose of 100 mg/ kg body weight twice a day for 7 days. Cycloheximide was intraperitoneally injected at a dose of 0.2 mg/ kg. 2, 4, 6 h after the injection, rats were killed and microsomes were prepared. A, PCE; B, SCD. ○, control rats; ■, clofibric acid-treated rats. Values are means \pm SD for 3 or 5 rats.

第3節 小括・および考察

本章における検討から SCD と PCE の活性調節機構には大きな違いがあることが明らかとなった。本章で明らかとなった PCE と SCD の活性調節機構の概要を Table 4-2 に示した。ELO2 の定常状態 mRNA が増加したのに対し、転写活性は変化していなかった。このことから、クロフィブリン酸による PCE 活性の誘導には、mRNA の安定性が関与しているものと考えられる。また、PCE 活性の半減期はクロフィブリン酸によって変化しなかった。これらのことからクロフィブリン酸による PCE 活性の誘導は主に mRNA の安定性の調節によって起きていると考えられる。SCD はクロフィブリン酸投与によって mRNA の定常状態発現量と転写活性が増加した。SCD の分解速度はクロフィブリン酸投与によって遅延した。これらのことから、クロフィブリン酸による SCD 活性の上昇には転写の亢進とタンパクの分解遅延の2段階で調節されていることが明らかとなった。SCD が短寿命であるのに対して、PCE の半減期が日のオーダーであることが初めて明らかとなった。なぜ PCE と

Table 4-2 Changes by clofibric acid of transcription, mRNA stability and protein degradation of PCE and SCD in the liver of rats

	PCE	SCD
Transcription	→	↑
mRNA stability	↑	→
Protein degradation	→	↓

SCD の調節機構にこのような大きな違いがあるのかは未だ明らかではない。PCE の mRNA を安定化させる因子や分解を促進する因子についてはこれまでに報告されていない。SCD の分解酵素は Heinemann らによって単離されており、肝臓のミクロソーム中に存在するプラスミノーゲン様タンパク質が SCD を特異的に分解すると報告されている (Heinemann et al., 2003)。しかし、この分解酵素に対するクロフィブリン酸の影響については検討されておらず、クロフィブリン酸によって SCD 分解酵素が誘導されている可能性があるが、憶測の域を出ない。以上のことを総合して考えるとクロフィブリン酸は各酵素に次のような影響を与える。1) PCE は SCD の基質であるステアロイル CoA を供給するために mRNA 安定性を延長する方法で PCE 活性を上昇させ、2) SCD は半減期が短いので活性を急激に上昇させるために合成促進と分解抑制の 2 段階で活性を上昇させるものと考えられる。

総 括

本研究は PCE がオレイン酸の生合成にどの程度関与しているかを検討するべく開始された。種々の生理状態におけるオレイン酸の割合と PCE 活性の関連性を、現在オレイン酸生合成の律速酵素と考えられている SCD と比較する形で、検討した。さらに、オレイン酸の割合を変化させる状態では、どのような調節機構が作動しているのかを調べた。

本研究によって以下の諸点が明らかとなった。

1. ペルフルオロ脂肪酸、クロフィブリン酸、グルコース負荷時もしくは Zucker fa/fa ラットのように肝臓のオレイン酸割合が増加しているラットでは、PCE 活性が上昇していることが明らかとなった。また、SCD 活性も同時に上昇していることが明らかとなった。
2. グルコース負荷ラットと Zucker fa/fa ラットにクロフィブリン酸を投与すると、さらに PCE 活性が上昇し、オレイン酸の割合が増加するものの、SCD 活性は変化しないことが 2 種類の異なる実験において観察された。これによって PCE と SCD の調節機構に相違点があることが初めて明らかとなった。
3. 重回帰分析によってオレイン酸の割合の決定には SCD よりも PCE の方が大きな寄与があることが分り、PCE のオレイン酸合成に対する生理的重要性が明確となった。
4. Zucker ラットにおいては、血清インスリンの作用が直接 PCE と SCD 活性に影響を与えるものではないことが明らかとなった。PCE と SCD においては SREBP-1 非依存的な調節が存在する可能性が示唆された。
5. 肝臓における糖の取り込みは PCE と SCD 活性に直接的な影響を与えないこと

が明らかとなった。

6. PCE と SCD の分解速度は大きく異なっていることが示された。
7. クロフィブリン酸投与による PCE 活性の誘導は mRNA の安定化による定常状態の mRNA 量の増加に起因している可能性が示めされた。
8. クロフィブリン酸による SCD 活性の誘導には転写の活性化とタンパク分解の抑制の 2 段階の調節が関与していることが示唆された。

本研究では、肝臓におけるオレイン酸合成には PCE が大きく関与しており、PCE と SCD は異なる調節を受けて肝オレイン酸量を調節していることを明らかにし、オレイン酸の生合成には PCE が SCD よりも大きな影響を与えていることを明確にした。

オレイン酸には高度不飽和脂肪酸では代替できない機能があり、生体内の生理的 요구に応じてその量を調節するような機構が働いているものと考えられる。しかしながらオレイン酸の生合成の活性化が生理的にどのような意味を持つのかはまだ不明な点が多い。今後さらに PCE の調節機構を遺伝子のノックアウトによって検討するなどして、明らかにする必要がある。本研究によって得られた知見が基礎データとしてこれらの研究に利用され、さらにはヒトにおける疾病等の解明・治療に役立つことを期待している。

謝 辞

本研究に際し、研究テーマの設定から結論に至るまで終始ご懇篤なるご指導並びにご鞭撻を賜りました城西大学大学院薬学研究科 川嶋 洋一 教授に衷心より感謝致します。

本研究に際し、終始ご懇篤なるご指導並びにご鞭撻を賜りました城西大学薬学部衛生化学講座 工藤 なをみ 講師に深謝の意を表します。

本学位論文の作成にあたり、ご閲覧とご教示を賜りました城西大学薬学部衛生化学講座 白幡 晶 教授に謹んで感謝申し上げます。

また、本学位論文の作成にあたり、ご閲覧やご教示を賜り、そして、本研究に際しご指導並びにご助言を賜りました城西大学薬学部免疫生化学講座 日比野 康英 教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究に際し、終始ご指導並びにご助言を賜りました城西国際大学薬学部 光本 篤史 教授と城西大学薬学部医療栄養学科 片倉 賢紀 助手に感謝の意を表します。

実験遂行に際してご助言並びにご協力をいただきました城西大学薬学部衛生化学講座の皆様感謝致します。

実験の部

実験の部

第1章 試薬

[2-¹⁴C]マロニル CoA (55 Ci/ mol)は Moraveck Biochemicals Inc. (米国)製を、2-デオキシ-[1-¹⁴C]グルコース は American Radiolabeled Chemicals, Inc. (米国)製を、D-[2-³H]マンニトール (20 Ci/mmol) は MP Biochemicals Inc. (米国)製を使用した。ステアロイル CoA、パルミトイル CoA、オレオイル CoA、マロニル CoA、脂肪酸を除去した牛血清アルブミンは Sigma chemical 社(米国)から購入した。ヘプタデカノインは Nu-Chek Prep. 社(米国)から購入した。NADH および NADPH はオリエンタル酵母社製を使用した。ペルフルオロオクタン酸およびペルフルオロデカン酸は、Aldrich Chemical Company、Inc. (米国) から入手した。ペルフルオロノナン酸は Lancaster Synthesis (英国)から入手した。塩酸ピオグリタゾン は武田薬品工業から購入した。その他の試薬は和光純薬の特級を使用した。

第2章 実験動物と飼料

日本エスエルシー社より購入した 5 週令のウィスター系ラット、または日本チャールズリバー社より購入した 11 週齢の Zucker fa/fa ラットおよびその同腹の lean ラットを使用した。ラットには固形飼料(CE-2、日本クレア社)および水を自由に摂取させた。馴化飼育後、正常な個体を使用した。

第3章 動物の処理

第1節 ペルフルオロ脂肪酸の投与

ペルフルオロオクタン酸、ペルフルオロノナン酸またはペルフルオロデカン酸をプロピレングリコール:水(1:1、v/v)に溶解し、1日1回5日間腹腔内に投与した。投与液は各10 mg/mLとし、体重1 kgあたり1 mLとした。

第2節 クロフィブリン酸の投与

クロフィブリン酸100 mgを生理食塩水に溶解し、ラットに体重1 kgあたり1 mLの割合で、1日2回4-7日間皮下に投与した。

第3節 塩酸ピオグリタゾンの投与

塩酸ピオグリタゾン30 mgを5%アラビアゴムに懸濁し、ラットに体重1 kgあたり5 mLの割合で、1日1回14日間経口投与した。

第4節 グルコースの投与

20%グルコース溶液を吸水瓶に入れ、4日間自由に摂取させた。クロフィブリン酸と組み合わせて投与する場合はグルコースとクロフィブリン酸の投与を同時に行なった。

第5節 臓器の摘出と酵素源の調製

エーテル麻酔下、ラットの下大静脈から血液を採取し、速やかに肝臓を摘出した。血液

は4°C、900×gで15分間遠心分離して血清を得た。肝臓は冷生理食塩水で還流することによって脱血した後、すぐに小片(0.2 g)を切り分け液体窒素下凍結させ、RNAを抽出するまでの間-80°Cで保存した。残りの肝臓には重量に対して4倍量の10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4)、1 mM EDTA を含む0.25 M ショ糖溶液を加え、テフロンホモジナイザーを用いてホモジネートを調製した。ホモジネートの一部はアシル CoA オキシダーゼと脂肪酸組成の分析用にそれぞれ-80°Cと-30°Cで保存した。残りのホモジネートを4°C、18000×gで20分間遠心し、得られた上清を再び同様の条件で遠心した。この上清を0°C、105000×gで1時間遠心した(Hitachi、SCP70H、ローター:RP50T、39000rpm)。得られた沈殿を10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4)、0.1 mM EDTA を含む0.25 M ショ糖溶液に再懸濁し、再び同様の条件下遠心した。得られた沈殿をマイクロソーム画分とし、10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4)、0.1 mM EDTA を含む0.25 M ショ糖溶液に懸濁し(約40 mg protein/ mL)、-80 °Cで保存した。マイクロソーム中のタンパク質量はLowryら(Lowry et al., 1951)の方法に従い測定した。標準物質として牛血清アルブミンを用いた。

第4章 酵素活性の測定

第1節 PCE 活性

KawashimaとKozukaの方法に従って測定した(Kawashima and Kozuka, 1985)。反応液は最終濃度で200 μM [2-¹⁴C]マロニル CoA(40 nCi/mL)、30 μM パルミトイル CoA、2 mM NADH、2 mM NADPH、0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.4)、1 mM KCN、マイクロソームタンパク質200 μgを含み、最終容量0.5 mLとした。反応液を37°Cで4分間インキュベートしたのち、10% KOH/90% メタノール溶液1 mLの添加により反応を停止させ、80°Cで30分加温した。反応液を室温に戻し、6 M HClを2 mL加えて液性を酸性とし、水1 mL

加えた。さらに、ヘキサン 2 mL を加え、3 分間振とう後、遠心し、上層を取り除いた。この操作を 4 回行った。水 4 mL を加えて 3 分間振とう後、遠心し、上層を分取した。脂質溶液の溶媒を留去し、トルエンシンチレーター (0.4 % DPO、0.01 % POPOP) 10 mL を加え、液体シンチレーションカウンターを用いて放射活性を測定した。

第 2 節 SCD 活性

Oshino らの方法に従って測定した (Oshino et al., 1971)。SCD 活性は NADH により還元されたミクロソーム中のシトクロム b_5 のステアロイル CoA 存在下での再酸化速度を測定することにより求めた。シトクロム b_5 の酸化速度は 424 nm と 409 nm の差の吸光度変化を記録することにより求めた。反応系は酵素源としてミクロソームタンパク質 1200 μg および 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) をセルに加え、最終容量 3 mL とし、30°C 2 分間プレインキュベートしたのち、NADH 2 nmol を加え記録を開始した。ミクロソームに含まれるシトクロム b_5 の還元反応が完全に終了したのち、20 nmol のステアロイル CoA を加え、2 nmol NADH を添加して再びシトクロム b_5 の吸光度変化を記録した。NADH 還元シトクロム b_5 の酸化反応の速度定数をステアロイル CoA 存在下 (k) と非存在下 (k^-) においてそれぞれ求め、SCD の反応速度定数 (k^+) は $k^+ = k - k^-$ により算出した。

第 3 節 アシル CoA 合成酵素活性

Tanaka らの方法によって測定した (Tanaka et al., 1979)。反応液は最終濃度で 1 μM [$1-^{14}\text{C}$] パルミチン酸カリウム (40 nCi)、1.2 mM トリトン X-100、10 mM アデノシン三リン酸、1 μM CoA、5 mM ジチオトレイトール、150 mM 塩化カリウム、15 mM 塩化マグネシウム、0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4)、ミクロソームタンパク質 5 μg を含み、最終容量 0.2

mL とした。35°C で 2 分間インキュベートした後、Dole's 試薬 (イソプロピルアルコール:n-ヘプタン:1 M 硫酸=40:10:2, v/v) 1.5 mL を加えて 3 分間振とう後遠心し、上清を取り除いた。キャリアとしてパルミチン酸を約 60 μmol 含む n-ヘプタン 2 mL で同様に抽出を 3 回行い、未反応のパルミチン酸を抽出した。さらに、n-ヘプタン 2 mL で 3 回洗浄し、残った下層に水を加えて 4 mL とし、その中から 1 mL を液体シンチレーション用バイヤルに移し、トルエントリトン X-100 (2:1, v/v) シンチレーター 10 mL を加えて、液体シンチレーションカウンターを用いて放射活性を測定した。

第 4 節 アシル CoA オキシダーゼ活性

Small らの方法によって測定した (Small et al., 1985)。パルミトイル CoA を基質として、反応により生じた過酸化水素を定量した。過酸化水素を還元型の 2', 7'-ジクロロフルオレセインと共にカタラーゼ処理し、その際に生じる酸化型の 2', 7'-ジクロロフルオレセインを 502 nm で測定した。反応液は最終濃度で 50 μM の 2', 7'-ジクロロフルオレセイン、40 U/mL ペルオキシダーゼ、4 mM 3-アミノ-1H-1, 2, 4-アミノトリアゾール、0.2 mg/mL 牛血清アルブミン、0.02% トリトン X-100、0.05 mM パルミトイル CoA、20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) および肝臓のホモジネート約 35 μg タンパク質を酵素源と含み最終容量を 1.0 mL とした。

第 5 章 脂質の分析

第 1 節 肝ホモジネート脂質の抽出

凍結保存した肝ホモジネートから Bligh-Dyer 法 (Bligh and Dyer, 1959) で総脂質を抽

出した。解凍した肝ホモジネート0.8 mLに水を加えて1.6 mLとし、抗酸化剤として0.02 % ブチルヒドロキシトルエン/エタノール溶液を50 μ L 加え、内部標準物質としてトリヘプタデカノインを加え、次にメタノール4 mL、クロロホルム2 mLを加えてよく振とうした。その後、0.1 M 塩酸とクロロホルムを各2 mL ずつ加えて2層に分離させ、600 \times gで5分間遠心後クロロホルム層を分取した。水層を4 mLのクロロホルムで再抽出してこれを先のクロロホルム層に合わせた。得られたクロロホルム層にクロロホルム:メタノール:0.1 M 塩酸(3:48:47, v/v)を3.2 mL加えて3分間振とう後、遠心し、上層を取り除いた。下層に窒素気流を吹き付けて一旦溶媒を留去し、クロロホルム:メタノール(1:1, v/v)1 mLに溶かして総脂質とし、-30 $^{\circ}$ Cで保存した。

第2節 総脂質のけん化

脂質溶液の溶媒を留去し、残滓10% KOH/90% メタノール溶液1 mLを加えて100 $^{\circ}$ Cで1時間加温した。反応液を室温に戻し、水4 mLを加えた。さらに、ヘキサン4 mLを加え、3分間振とう後、遠心し、上層を取り除いた。この操作を3回行った。水層に6 M HCl 1 mLを加えて液性を酸性にし、ヘキサン4 mLを加え、3分間振とう後、遠心し、上層を分取した。

第3節 総脂質中脂肪酸のメチル化

脂質溶液の溶媒を留去し、15% (w/v) 三フッ化ホウ素メタノール錯体メタノール溶液1 mLを加えて、100 $^{\circ}$ Cで15分間反応させた。反応液を室温に戻し、水3 mLを加えた。生じた脂肪酸メチルエステルをヘキサンで抽出し、濃縮後、ガスクロマトグラフィーによって分析に供した。

第4節 ガスクロマトグラフィーによる脂肪酸の分析

ガスクロマトグラフは GC-14A (島津製作所) を用いた。分離にはキャピラリーカラム SUPELLOWAX10 (SUPELCO、米国; ID 0.53 mm×30 m、膜厚 1.99 μm) を、検出器には水素炎イオン化検出器を使用した。キャリアーガスとしてヘリウムを用いた。試料注入部と検出器の温度は 255°C、カラム温度は 222°C とした。標準物質の保持時間との比較によって各ピークを同定した。内部標準物質であるヘプタデカノインと試料中の脂肪酸のピーク面積比から各脂肪酸を定量した。

第6章 mRNA の定量

凍結保存してあったラット肝の小片から Rneasy Midi kit (Qiagen 社, ドイツ) を用い総 RNA を抽出した。総 RNA の定量は、抽出液の吸光度を波長 260 nm で測定することにより行なった。逆転写反応は RNA PCR kit (AMV) ver. 2.1 (タカラバイオ株式会社) を用いた。逆転写反応系には最終濃度で 5 mM MgCl₂、1×RNA PCR buffer、1 mM dNTP mix、2 U/μL Rnase inhibitor、2.5 ng/μL random hexamer、0.05 U/μL AMV 逆転写酵素および 0.5 μg の総 RNA を入れ、最終容量が 10 μL になるように Rnase-free 水を加えた。30°C で 10 分、42°C で 30 分、99°C で 5 分、6°C で 5 分間反応させた。生成した complementary DNA (cDNA) は使用するまで -30°C で保存した。mRNA の定量にはリアルタイム PCR 法を用いた。反応には QuantiTect SYBER Green PCR master mix (Qiagen 社, ドイツ) を用い、各プライマーセット (Table) の最終濃度が 300 nM になるように調製した。PCR と融解曲線の作成は iCycler IQ real-time detection system (Bio-Rad 社, 米国) を用いて行なった。反応は 95°C、15 分で変性させた後、1 サイクルが

94°Cで 30 秒、57°Cで 30 秒、72°Cで 30 秒を 40 サイクル反応させた。Table に示したすべてのプライマーセットについて cDNA 0.1 ng から 1 μg までの増殖効率を求め、標準遺伝子であるβ-アクチンとの増殖効率比がほぼ 1 であることを確認した。増殖後は融解曲線を作成し単一の生成物であることを確認した。各遺伝子の発現量は comparative Ct 法を用いて解析した (PE Applied Biosystems、1997)。

第 7 章 2-デオキシグルコースの取り込み

2-DG の肝への取り込みは Rajkumar らの方法に基づいて測定した (Rajkumar et al., 1996)。12 時間絶食させたラットにペントバルビタール (50 mg/kg) を腹腔内投与し、頸静脈にカニューレを挿入した。2-[¹⁴C]DG (9 μCi/ラット) と D-[2-³H]マンニトール (90 μCi/ラット) をカニューレから投与した。マンニトールは細胞外スペースを求めるために使用した。血中の 2-DG の減衰を測定するためにカニューレから投与後 3、5、10、20、30 と 40 分に血液を採取した後、血液中の血糖値と放射活性を測定した。最後の採血が終わったら、肝臓をおよそ 200 mg 切り取り、液体窒素で凍結させ分析するまで -80°C にて保存した。肝臓小片は 1 M NaOH 0.5 mL を添加後、70°C で 30 分間加熱して溶解させた。その後 0.5 mL の 1 M HCl を添加し、その溶液 200 μL に対して 1 mL の 6 % HClO₄ を添加した。遠心後に上清 950 μL を分取し、その放射活性を測定した。タンパク定量は BCA protein assay (Pierce 社、米国) を使用して行なった。2-DG の取り込みは以下の式を用いて計算した。

$$2\text{-DG uptake} = \frac{[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{DG}]_t}{\int_0^{40} \text{SA} dt}$$

このとき 2-[¹⁴C] DG は投与後 40 分における肝臓の放射活性 (dpm/mg タンパク質)、

SA は血中 2-DG の比放射活性 (specific activity) を dpm/nmol plasma glucose で示している。細胞外スペースは以下の式を用いて計算した (Cieslar et al., 1998)。

$$\text{Extracllular spaces} = [D\text{-}[2\text{-}^3\text{H}]\text{マンニトール}]_{\text{liver}} / [D\text{-}[2\text{-}^3\text{H}]\text{マンニトール}]_{\text{plasma}}$$

このとき $[D\text{-}[2\text{-}^3\text{H}]\text{マンニトール}]_{\text{liver}}$ と $[D\text{-}[2\text{-}^3\text{H}]\text{マンニトール}]_{\text{plasma}}$ は肝臓と血漿のマンニトール濃度を示している。

第 8 章 シクロヘキシミド投与によるタンパク質分解速度の測定

PCE と SCD 活性の半減期はシクロヘキシミドのタンパク質合成阻害作用を利用して求めた。シクロヘキシミドを生理食塩水に溶解し、ラットの腹腔内に投与した。投与液は 2.0 mg/mL とし、1 kg 体重あたり 1 mL とした (Oshino and Sato, 1972)。投与後 0、2、4、6 時間にラットから肝臓を摘出し、第 4 節に示した方法でマイクロソームを調製した。PCE と SCD 活性は 5-1 と 5-2 に示した方法で測定した。

第 9 章 Nuclear run-on assay

第 1 節 プローブの作成

第 6 章に示す方法でラットの肝臓から cDNA を調製した。プローブの配列をクローニングするために、cDNA、クローニング用プライマー (Table) と pyrobest DNA ポリメラーゼを使用して PCR を行い、各遺伝子を増幅した。PCR 産物を GENCLEAN III kit を使用して精製した。精製した DNA 末端を T4 ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化した後、DNA リガーゼ (LigaFast DNA Ligation kit, Promega 社、米国) を使用してプラスミドベクターに組み込んだ。プラスミドベクター (pBluescript KS II(+), Stratagene 社、米国) は *Sma*I で切

断後、アルカリフォスファターゼ(タカラバイオ社)で脱リン酸化したものを使用した。作成したプラスミドベクターを大腸菌(DH_{5α}コンピテントセル)にエレクトロポレーション法で導入した。カラーセレクションとミニプレップを行ないプラスミドベクターが導入された菌体を得た。

第2節 フィルターの作成

菌体からプラスミド(100 μg)を回収し、制限酵素(*Hind* III)を用いて直線状にした。制限酵素処理をしたプラスミドをエタノール沈殿で生成した後、1 M NaOH を用いて変性させた、6×saline sodium citrate (SSC)を加えた。マイクロフィルトレーションブロッティング装置(Bio-Rad、米国)を用い、20 μgのDNAをニトロセルロース膜にスポットして吸引した後、6×SSCで洗浄、風乾し、UVクロスリンキングを行なった。

第3節 核の調製

核の調製は Gorski らの方法に従って行なった(Gorski et al., 1986)。ラットの肝臓を細かく刻み 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.6)、25 mM KCl、0.15 mM スペルミン、0.5 mM スペルミジン、10 % グリセロール、1 mM EDTA を含む 2 M ショ糖溶液からなるホモジネーション緩衝液を加え、テフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。10 mLのホモジネーション緩衝液のクッションにホモジネートを重層し、68000×g、-2°Cで 30 分遠心した。得られた沈殿をホモジネーション緩衝液-グリセロール(9:1)溶液に懸濁し、10 mLのホモジネーション緩衝液のクッションに重層し、68000×g、-2°Cで 30 分遠心した。得られた沈殿を 1.0×10⁹ 個/mL になるようにホモジネーション緩衝液に懸濁し-80°Cで保存した。

第4節 run-on assay

Run-on assay は de Costa らの方法に従って行なった (de Costa et al., 2000)。反応溶液 (核懸濁溶液 (5×10^7 個)、10 %グリセロール、50 mM トリス塩酸 (pH 8.0)、5 mM MgCl_2 、1 mM MnCl_2 、150 mM KCl 、2.5 mM DTT、1 mM ATP、1 mM GTP、1 mM CTP、200 μCi [α - ^{32}P]UTP (410 Ci/mmol)) を全量が 100 μL になるように調製し、30°C で 30 分間反応させた。DNaseI を 100 U/mL になるように添加し 30°C 10 分間反応させる。100 μL の反応停止液 (20 mM Tris-HCl、2% ドデシル硫酸ナトリウム、10 mM EDTA、200 $\mu\text{g/mL}$ プロティナーゼ K) を加え、42°C で 30 分間処理した。フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1, v/v) を加え除タンパク操作を行なった後、50 μg の酵母 tRNA および 5% トリクロロ酢酸/60 mM ピロリン酸ナトリウム溶液を加えた。沈殿物を 0.45 μm のミリポア HA フィルターに通した。フィルターは 5% トリクロロ酢酸/30 mM ピロリン酸ナトリウム溶液で 3 回洗浄した。フィルターは DNaseI 処理後、65°C で 10 分間インキュベートして RNA を膜から剥がした。その溶液を回収しプロティナーゼ K 処理を施した後エタノール沈殿を行ない、50 μL の 1 mM EDTA 含有 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に溶解した。その 1 μL の放射活性を測定しハイブリダイゼーションに用いた。

第5節 ハイブリダイゼーション

第 2 節で作成したフィルターをハイブリダイゼーション緩衝液 (50%ホルムアミド、5×SSC、50 mM リン酸ナトリウム pH 6.5、1×デンハルト液、250 $\mu\text{g/mL}$ サケ精子 DNA) で 42°C、6 時間処理した。10.4 で得られた RNA 溶液 (1.0×10^7 cpm) を加え、42°C で 48 時間処理した。フィルターを 100 mL の 2×SSC、0.1% ドデシル硫酸ナトリウムに浸し室温

で5分間洗浄した。この洗浄処理を3回繰り返した。緩衝液を0.2×SSC、0.1% ドデシル硫酸ナトリウムに替え、65°C15分間の処理を2回繰り返した。フィルターをイメージングプレートに露光し、FLA-3000G(富士フィルム)を用いて放射活性を検出した。

第10章 その他の分析方法

血清のインスリン濃度は Rat Insulin ELASA kit (MercoDia 社、スウェーデン)を用いて行なった。血糖値はグルコーステストワコー(和光純薬社)を用いて測定した。

第11章 統計処理

2群間の比較は Student's t-test を用いて行なった。重回帰分析はマイクロソフト社の EXCEL 2000 を用いて行なった。

Table Sequence of primers used for the experiments

Gene	Size (bp)	GenBank ID	Purpose		Primers (5'-3')
SCD1	123	J02585	Real-Time PCR	Sense	TGTTTCGTCAGCACCTTCTTG
				Antisense	GGATGTTCTCCCGAGATTGA
	600		Cloning	Sense	AAAGTTTCTAAGGCCGCTG
				Antisense	GTCTGAGCCAGCAATCTCAA
SCD2	94	AB032243	Real-Time PCR	Sense	TGCACCCCCAGACACTTGTA
				Antisense	GGATGCATGGAAACGCCATA
	611		Cloning	Sense	TCACCACGTTCTTCATCGAC
				Antisense	TTACCCACTTCGCAAGCTCT
ELO1	117	AB071985	Real-Time PCR	Sense	GCTTCATCCACGTCCTCATGT
				Antisense	TCAGCACAAACTGGACCAGCT
	381		Cloning	Sense	CGAGACACACGAGTCAAAGG
				Antisense	ACGTGCAGGACTGTGATCTG
ELO2	381	AB071986	Real-TimePCR / cloning	Sense	AGAACACGTAGCGACTCCGAA
β -actin	220	V01217	Real-TimePCR / cloning	Sense	TGCAGAAGGAGATTACTGCC
				Antisense	CGCAGCTCAGTAACAGTCC

引用文献

- Alegret M, Cerqueda E, Ferrando R, Vazquez M, Sanchez RM, Adzet T, Merlos M & Laguna JC (1995). Selective modification of rat hepatic microsomal fatty acid chain elongation and desaturation by fibrates: relationship with peroxisome proliferation. *Br J Pharmacol* **114**, 1351-1358.
- Bligh EG & Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Med Sci* **37**, 911-917.
- Bray GA (1977). The Zucker-fatty rat: a review. *Fed Proc* **36**, 148-153.
- Brenner RR, Rimoldi OJ, Lombardo YB, Gonzalez MS, Bernasconi AM, Chicco A & Basabe JC (2003). Desaturase activities in rat model of insulin resistance induced by a sucrose-rich diet. *Lipids* **38**, 733-742.
- Burr G & Burr M (1929). A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *J Biol Chem* **82**, 345-367.
- Burr G & Burr M (1930). On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition. *J Biol Chem* **86**, 587-621.
- Chao L, Marcus-Samuels B, Mason MM, Moitra J, Vinson C, Arioglu E, Gavrilova O & Reitman ML (2000). Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J Clin Invest* **106**, 1221-1228.
- Cieslar J, Huang MT & Dobson GP (1998). Tissue spaces in rat heart, liver, and skeletal muscle in vivo. *Am J Physiol* **275**, R1530-1536.

- Cinti DL, Cook L, Nagi MN & Suneja SK (1992). The fatty acid chain elongation system of mammalian endoplasmic reticulum. *Prog Lipid Res* **31**, 1-51.
- Cohen P, Miyazaki M, Socci ND, Hagge-Greenberg A, Liedtke W, Soukas AA, Sharma R, Hudgins LC, Ntambi JM & Friedman JM (2002). Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science* **297**, 240-243.
- de Costa M, Rothenberg SP, Sadasivan E, Regec A & Qian L (2000). Folate deficiency reduces the GPI-anchored folate-binding protein in rat renal tubules. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C812-821.
- de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J & Mamelle N (1999). Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* **99**, 779-785.
- Desvergne B & Wahli W (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* **20**, 649-688.
- Eck MG, Wynn JO, Carter WJ & Faas FH (1979). Fatty acid desaturation in experimental diabetes mellitus. *Diabetes* **28**, 479-485.
- Garg A, Bonanome A, Grundy SM, Zhang ZJ & Unger RH (1988). Comparison of a high-carbohydrate diet with a high-monounsaturated-fat diet in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* **319**, 829-834.
- Guethner RA & Vietor ML (1962). Surface active materials from perfluorocarboxylic acid. *Ind Eng Chem Prod Res Dev*, **1**, 165-167.
- Heinemann FS, Korza G & Ozols J (2003). A plasminogen-like protein selectively

degrades stearoyl-CoA desaturase in liver microsomes. *J Biol Chem* **278**, 42966-42975.

- Iida M, Murakami T, Ishida K, Mizuno A, Kuwajima M & Shima K (1996). Phenotype-linked amino acid alteration in leptin receptor cDNA from Zucker fatty (fa/fa) rat. *Biochem Biophys Res Commun* **222**, 19-26.
- Inagaki K, Aki T, Fukuda Y, Kawamoto S, Shigeta S, Ono K & Suzuki O (2002). Identification and expression of a rat fatty acid elongase involved in the biosynthesis of C18 fatty acids. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**, 613-621.
- Issemann I & Green S (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* **347**, 645-650.
- Kadowaki T (2001). PPAR gamma agonist and antagonist. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **118**, 321-326.
- Kaestner KH, Ntambi JM, Kelly TJ, Jr. & Lane MD (1989). Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. A second differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem* **264**, 14755-14761.
- Kawashima Y, Hanioka N, Matsumura M & Kozuka H (1983). Induction of microsomal stearoyl-CoA desaturation by the administration of various peroxisome proliferators. *Biochim Biophys Acta* **752**, 259-264.
- Kawashima Y, Horii S, Matsunaga T, Hirose A, Adachi T & Kozuka H (1989). Co-induction by peroxisome proliferators of microsomal 1-acylglycerophosphocholine acyltransferase with peroxisomal beta-oxidation in rat liver. *Biochim Biophys Acta* **1005**, 123-129.

- Kawashima Y & Kozuka H (1982). Increased activity of stearoyl-CoA desaturation in liver from rat fed clofibric acid. *Biochim Biophys Acta* **713**, 622-628.
- Kawashima Y & Kozuka H (1985). Regulation of palmitoyl-CoA chain elongation and linoleoyl-CoA chain elongation in rat liver microsomes and the differential effects of peroxisome proliferators, insulin and thyroid hormone. *Biochim Biophys Acta* **834**, 118-123.
- Krisans SK, Mortensen RM & Lazarow PB (1980). Acyl-CoA synthetase in rat liver peroxisomes. Computer-assisted analysis of cell fractionation experiments. *J Biol Chem* **255**, 9599-9607.
- Kudo N & Kawashima Y (2001). Effects of perfluorooctanoic acid on the synthesis of phospholipids. *J Health Sci* **47**, 168-174.
- Kudo N, Toyama T, Mitsumoto A & Kawashima Y (2003). Regulation by carbohydrate and clofibric acid of palmitoyl-CoA chain elongation in the liver of rats. *Lipids* **38**, 531-537.
- Lazarow PB & De Duve C (1976). A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**, 2043-2046.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Yoshikawa T, Amemiya-Kudo M, Hasty AH, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Takahashi A, Yato S, Sone H, Ishibashi S & Yamada N (2002). Cloning and characterization of a mammalian fatty acyl-CoA elongase as a lipogenic enzyme regulated by SREBPs. *J Lipid Res*

43, 911-920.

- Miyazaki M, Jacobson MJ, Man WC, Cohen P, Asilmaz E, Friedman JM & Ntambi JM (2003). Identification and characterization of murine SCD4, a novel heart-specific stearoyl-CoA desaturase isoform regulated by leptin and dietary factors. *J Biol Chem* **278**, 33904-33911.
- Miyazaki M, Kim HJ, Man WC & Ntambi JM (2001). Oleoyl-CoA is the major de novo product of stearoyl-CoA desaturase 1 gene isoform and substrate for the biosynthesis of the Harderian gland 1-alkyl-2,3-diacylglycerol. *J Biol Chem* **276**, 39455-39461.
- Miyazaki M, Kim YC, Gray-Keller MP, Attie AD & Ntambi JM (2000). The biosynthesis of hepatic cholesterol esters and triglycerides is impaired in mice with a disruption of the gene for stearoyl-CoA desaturase 1. *J Biol Chem* **275**, 30132-30138.
- Miyazaki M & Ntambi JM (2003). Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **68**, 113-121.
- Mu YM, Yanase T, Nishi Y, Tanaka A, Saito M, Jin CH, Mukasa C, Okabe T, Nomura M, Goto K & Nawata H (2001). Saturated FFAs, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis in human granulosa cells. *Endocrinology* **142**, 3590-3597.
- Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendziorski CM, Yandell BS, Song Y, Cohen P, Friedman JM & Attie AD (2002). Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 11482-11486.
- Ohmori K, Kudo N, Katayama K & Kawashima Y (2003). Comparison of the toxicokinetics between perfluorocarboxylic acids with different carbon chain length. *Toxicology* **184**, 135-140.

- Ohtani H, Hayashi K, Hirata Y, Dojo S, Nakashima K, Nishio E, Kurushima H, Saeki M & Kajiyama G (1990). Effects of dietary cholesterol and fatty acids on plasma cholesterol level and hepatic lipoprotein metabolism. *J Lipid Res* **31**, 1413-1422.
- Olivier P, Plancke MO, Theret N, Marzin D, Clavey V & Fruchart JC (1988). Effects of fenofibrate on lipoprotein metabolism and fatty acid distribution in Zucker rats. *Atherosclerosis* **74**, 15-21.
- Oshino N, Imai Y & Sato R (1971). A function of cytochrome b5 in fatty acid desaturation by rat liver microsomes. *J Biochem (Tokyo)* **69**, 155-167.
- Oshino N & Sato R (1972). The dietary control of the microsomal stearyl CoA desaturation enzyme system in rat liver. *Arch Biochem Biophys* **149**, 369-377.
- Ozols J (1997). Degradation of hepatic stearyl CoA delta 9-desaturase. *Mol Biol Cell* **8**, 2281-2290.
- PE Applied Biosystems (1997). Relative Quantitation of Gene Expression. *User bulletin 2*, 1-36.
- Rajkumar K, Krsek M, Dheen ST & Murphy LJ (1996). Impaired glucose homeostasis in insulin-like growth factor binding protein-1 transgenic mice. *J Clin Invest* **98**, 1818-1825.
- Reaven P, Parthasarathy S, Grasse BJ, Miller E, Steinberg D & Witztum JL (1993). Effects of oleate-rich and linoleate-rich diets on the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in mildly hypercholesterolemic subjects. *J Clin Invest* **91**, 668-676.

- Rhee SK, Kayani AJ, Ciszek A & Brenna JT (1997). Desaturation and interconversion of dietary stearic and palmitic acids in human plasma and lipoproteins. *Am J Clin Nutr* **65**, 451-458.
- Small GM, Burdett K & Connock MJ (1985). A sensitive spectrophotometric assay for peroxisomal acyl-CoA oxidase. *Biochem J* **227**, 205-210.
- Taberero A, Lavado EM, Granda B, Velasco A & Medina JM (2001). Neuronal differentiation is triggered by oleic acid synthesized and released by astrocytes. *J Neurochem* **79**, 606-616.
- Tabor DE, Kim JB, Spiegelman BM & Edwards PA (1999). Identification of conserved cis-elements and transcription factors required for sterol-regulated transcription of stearoyl-CoA desaturase 1 and 2. *J Biol Chem* **274**, 20603-20610.
- Tanaka T, Hosaka K, Hoshimaru M & Numa S (1979). Purification and properties of long-chain acyl-coenzyme-A synthetase from rat liver. *Eur J Biochem* **98**, 165-172.
- Thiede MA, Ozols J & Strittmatter P (1986). Construction and sequence of cDNA for rat liver stearyl coenzyme A desaturase. *J Biol Chem* **261**, 13230-13235.
- Thorp JM & Waring WS (1962). Modification of metabolism and distribution of lipids by ethyl chlorophenoxyisobutyrate. *Nature* **194**, 948-949.
- Towle HC, Kaytor EN & Shih HM (1997). Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate. *Annu Rev Nutr* **17**, 405-433.
- Toyama T, Kudo N, Mitsumoto A & Kawashima Y (2004). Effects of perfluorocarboxylic acids on the activities of acyl-CoA elongations in vivo and in vitro. *Chem Biol*

Interact **150**, 189-198.

Toyama T, Kudo N, Mitsumoto A & Kawashima Y (2004). Palmitoyl-CoA chain elongase is regulated by a mechanism distinct from that for stearoyl-CoA desaturase in the liver of Zucker rats. *Biochim Biophys Acta* (submitted).

Wong DA, Bassilian S, Lim S & Paul Lee WN (2004). Coordination of peroxisomal beta-oxidation and fatty acid elongation in HepG2 cells. *J Biol Chem* **279**, 41302-41309.

Yamamoto A & Kawashima Y (1997). Perfluorodecanoic acid enhances the formation of oleic acid in rat liver. *Biochem J* **325**, 429-434.

Yamamoto N, Saitoh M, Moriuchi A, Nomura M & Okuyama H (1987). Effect of dietary alpha-linolenate/linoleate balance on brain lipid compositions and learning ability of rats. *J Lipid Res* **28**, 144-151.

Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, Goldstein JL & Brown MS (1993). SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* **75**, 187-197.

Zheng Y, Eilertsen KJ, Ge L, Zhang L, Sundberg JP, Prouty SM, Stenn KS & Parimoo S (1999). Scd1 is expressed in sebaceous glands and is disrupted in the asebia mouse. *Nat Genet* **23**, 268-270.

Zheng Y, Prouty SM, Harmon A, Sundberg JP, Stenn KS & Parimoo S (2001). Scd3--a novel gene of the stearoyl-CoA desaturase family with restricted expression in skin. *Genomics* **71**, 182-191.

鹿山 光 (1995). *AA, EPA, DHA - 高度不飽和脂肪酸*, p44-81, 恒星社厚生閣.

