

**Fig. 23 Oligosaccharide profiling of gel separated proteins
(A) Erythropoietin, (B) t-PA**

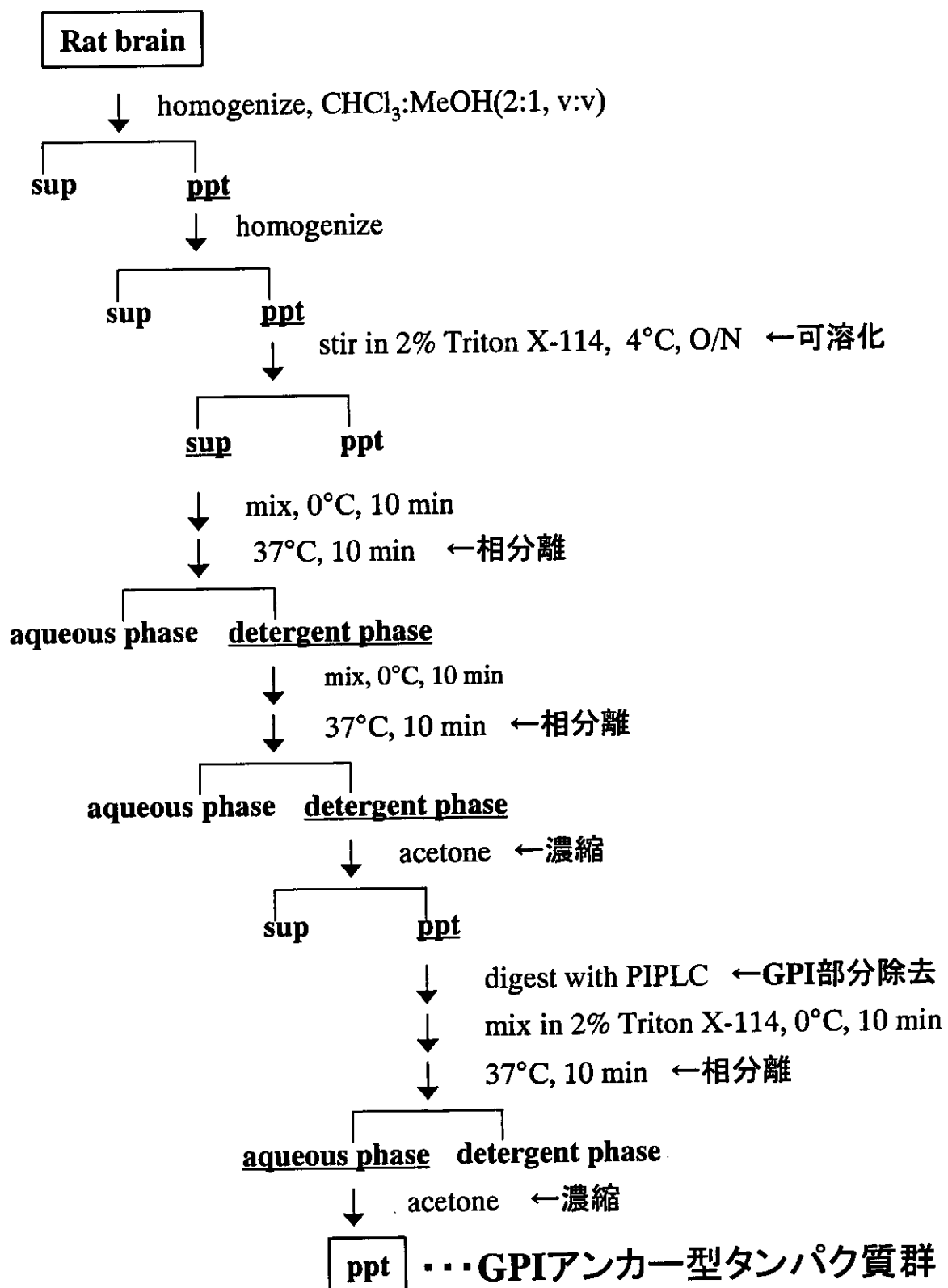


Fig. 24 Preparation of lipid-free GPI-anchored proteins from rat brain

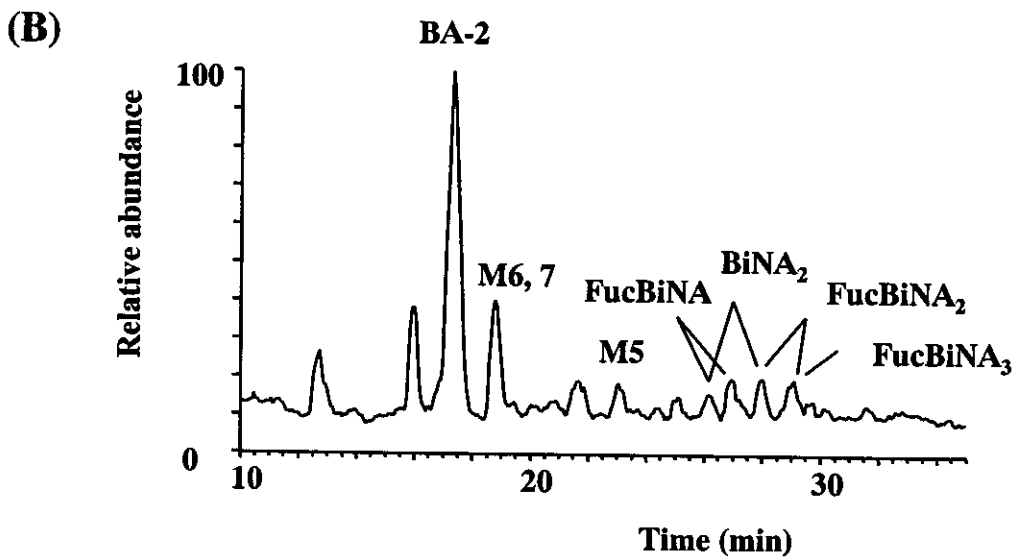
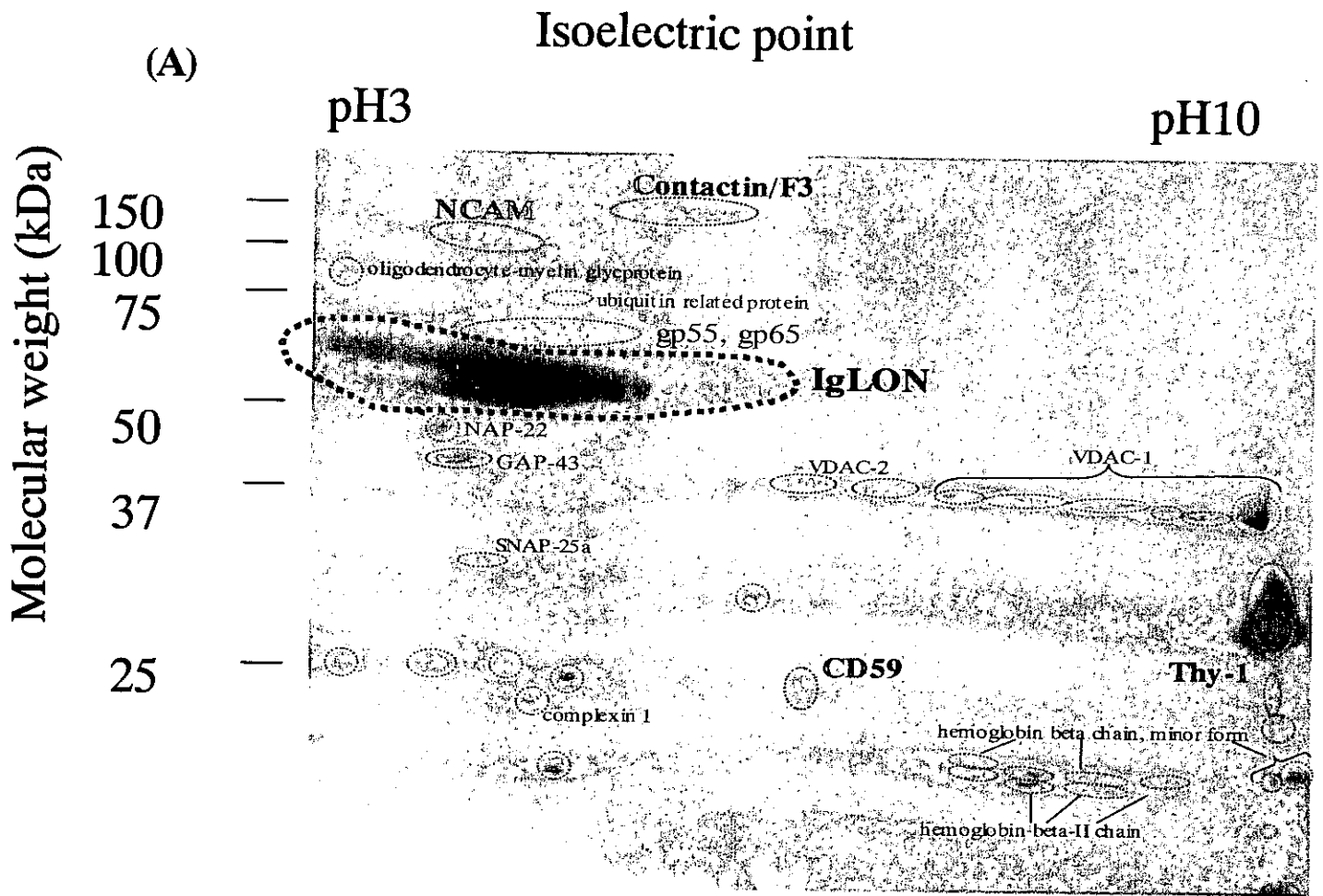


Fig. 25 (A) 2D-GE of lipid-free GPI-anchored proteins from 3-week old rat brain, (B) Oligosaccharide profiling of gel separated Kilon

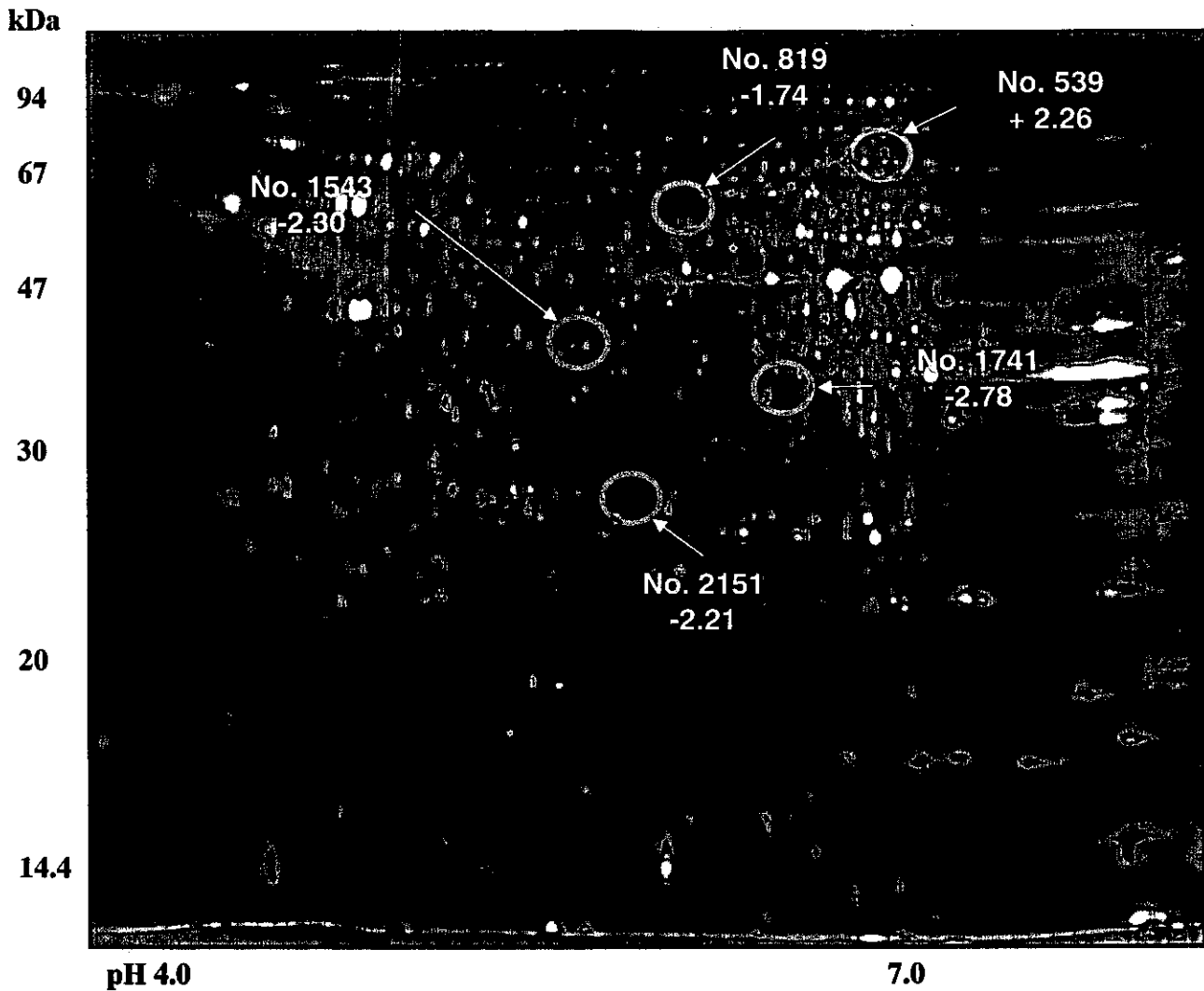


Fig.5 2D-DIGE images of Cy3 labeled HepG2 (A) and Cy5 labeled HepG2III (B) membrane fraction.

Fig. 26 2D-DIGE images of Cy3 labeled HepG2 and Cy5 labeled HepG2III membrane fraction

Table 4 Glycosylation analysis of alpha-fetoprotein

Retention time (min)	m/z	Charge	M.W.	Peptide Sequences	M.W.	Oligosaccharide Structures	M.W.
23	1013.43	+3	3037.3	K/vnftelqk/I	977.5	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]1[Fuc]1	2077.8
23	1519.67	+2	3037.3	K/vnftelqk/I	977.5	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]1[Fuc]1	2077.8
23	1081.29	+3	3240.9	K/vnftelqk/I	977.5	[HexNAc]5[Hex]5[Neu5Ac]1[Fuc]1	2281.4
23	1621.44	+2	3240.9	K/vnftelqk/I	977.5	[HexNAc]5[Hex]5[Neu5Ac]1[Fuc]1	2281.4
23	1446.62	+2	2891.2	K/vnftelqk/I	977.5	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]1	1931.8
23	1118.67	+2	2235.3	K/vnftelqk/I	977.5	[HexNAc]3[Hex]4	1275.9
23	1264.05	2	2526.1	K/vnftelqk/I	977.5	[HexNAc]3[Hex]4[Neu5Ac]1	1566.6
	1110.48	3	2526.1	K/vnftelqk/I	977.5	[HexNAc]3[Hex]4[Neu5Ac]1	1566.6
24	1665.44	+2	3328.9	K/vnftelqk/I	977.5	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2369.4
24	1178.33	+3	3532.0	K/vnftelqk/I	977.5	[HexNAc]5[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2572.5
24	1061.78	3	3182.3	K/vnftelqk/I	977.5	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.9
25	1592.17	2	3182.3	K/vnftelqk/I	977.5	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.9
27	1236.04	+3	3705.1	K/ttkvnftelqk/I	1353.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2369.4
27	1853.29	+2	3704.6	K/ttkvnftelqk/I	1353.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2369.4
27	1187.17	+3	3558.5	K/ttkvnftelqk/I	1353.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.8
28	1780.23	+2	3558.5	K/ttkvnftelqk/I	1353.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.8
28	1303.56	+3	3907.7	K/ttkvnftelqk/I	1353.7	[HexNAc]5[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2572.0
28	1138.84	+3	3413.5	K/ttkvnftelqk/I	1353.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]1[Fuc]1	2077.8
28	1206.52	+3	3616.6	K/ttkvnftelqk/I	1353.7	[HexNAc]5[Hex]5[Neu5Ac]1[Fuc]1	2280.9
28	1090.14	+3	3267.4	K/ttkvnftelqk/I	1353.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]1	1931.7
28	1322.75	+3	3965.3	K/ttkvnftelqk/I	1353.7	[HexNAc]6[Hex]5[Neu5Ac]2	2629.6

Table 5 Glycosylation analysis of ceruloplasmin

Retention time (min)	m/z	Charge	M.W.	Peptide Sequences	M.W.	Oligosaccharide Structures	M.W.
24	1025.17	+4	4096.7	EHEGAIYDPDNTTDFQR	1891.8	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.9
24	1366.54	+3	4096.6	EHEGAIYDPDNTTDFQR	1891.8	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2+Na	2244.9
24	1373.88	+3	4118.6	EHEGAIYDPDNTTDFQR	1891.8	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2368.9
24	1061.67	+4	4242.7	EHEGAIYDPDNTTDFQR	1891.8	[HexNAc]5[Hex]5[Neu5Ac]3[Fuc]2	3171.2
25	1415.23	+3	5045.0	EHEGAIYDPDNTTDFQR	1891.8	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2879.1
25	1262.24	+4	5045.0	EHEGAIYDPDNTTDFQR	1891.8	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3[Fuc]1	3025.1
25	1682.65	+3	5045.0	EHEGAIYDPDNTTDFQR	1891.8	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3[Fuc]1	3025.1
25	1189.21	+4	4752.8	EHEGAIYDPDNTTDFQR	1891.8	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2879.1
25	1585.27	+3	4752.8	EHEGAIYDPDNTTDFQR	1891.8	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3[Fuc]1	3025.1
25	1225.72	+4	4898.9	EHEGAIYDPDNTTDFQR	1891.8	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3[Fuc]1	3025.1
25	1633.96	+3	4898.9	EHEGAIYDPDNTTDFQR	1891.8	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3[Fuc]1	3025.1
27	1093.95	+4	4371.8	ELHHLQEQNVSNAPLDK	2021.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2368.8
27	1458.27	+3	4371.8	ELHHLQEQNVSNAPLDK	2021.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2368.8
27	1057.43	+4	4225.7	ELHHLQEQNVSNAPLDK	2021.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.7
27	1409.57	+3	4225.7	ELHHLQEQNVSNAPLDK	2021.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3[Fuc]1	3025.0
28	1257.99	+4	5028.0	ELHHLQEQNVSNAPLDK	2021.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2878.9
28	1677.01	+3	5028.0	ELHHLQEQNVSNAPLDK	2021.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2878.9
28	1221.48	+4	4881.9	ELHHLQEQNVSNAPLDK	2021.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2878.9
28	1628.30	+3	4881.9	ELHHLQEQNVSNAPLDK	2021.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2878.9
33	1347.54	+3	4039.6	ENLTAPGSDSAVFFEQGTTR	2126.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]1	1931.6
34	1450.24	+3	4347.7	ENLTAPGSDSAVFFEQGTTR	2126.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2+NH3	2239.7
34	1083.68	+4	4330.7	ENLTAPGSDSAVFFEQGTTR	2126.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.7
34	1444.56	+3	4330.7	ENLTAPGSDSAVFFEQGTTR	2126.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2368.8
34	1493.28	+3	4476.8	ENLTAPGSDSAVFFEQGTTR	2126.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2+Na	2244.7
34	1089.17	+4	4352.7	ENLTAPGSDSAVFFEQGTTR	2126.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3+NH3	2895.9
35	1668.97	+3	5003.9	ENLTAPGSDSAVFFEQGTTR	2126.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2878.9
35	1663.29	+3	4986.9	ENLTAPGSDSAVFFEQGTTR	2126.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2878.9
35	1247.72	+4	4986.9	ENLTAPGSDSAVFFEQGTTR	2126.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2878.9
37	1282.48	+3	3844.4	AGLQAFFQVQECNK	1639.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.7
37	1923.24	+2	3844.5	AGLQAFFQVQECNK	1639.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2368.8
38	1331.17	+3	3990.5	AGLQAFFQVQECNK	1639.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2+Na	2244.7
38	1289.81	+3	3866.4	AGLQAFFQVQECNK	1639.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.7

Table 6 Ad vectors used in this study

Ad vector	Foreign gene					
	E1 deletion region		E3 deletion region		Region between E4 and 3'ITR	
	Promoter	GOI	Promoter	GOI	Promoter	GOI
AdOn-L4	TRE/CMV	Luciferase	CMV	rtTA	—	—
AdBI-rtTA-L	TRE/CMV	Luciferase+rtTA	—	—	—	—
Ad-rtTA-IRES-tTS-L	TRE/CMV	Luciferase	CMV	rtTA+tTS	—	—
Ad-tTS-BI-rtTA-L	TRE/CMV	Luciferase+rtTA	—	—	EF-1 α	tTS
Ad-rtTA-tTS-L	TRE/CMV	Luciferase	CMV	rtTA	EF-1 α	tTS
Ad-L2	CMV	Luciferase	—	—	—	—
AdOn-SEAP4	TRE/CMV	SEAP	CMV	rtTA	—	—
Ad-M2-SEAP4	TRE/CMV	SEAP	CMV	rtTA ^S -M2	—	—
Ad-S2-SEAP4	TRE/CMV	SEAP	CMV	rtTA ^S -S2	—	—
Ad-rtTA-tTS-SEAP	TRE/CMV	SEAP	CMV	rtTA	EF-1 α	tTS
Ad-M2-tTS-SEAP	TRE/CMV	SEAP	CMV	rtTA ^S -M2	EF-1 α	tTS
Ad-S2-tTS-SEAP	TRE/CMV	SEAP	CMV	rtTA ^S -S2	EF-1 α	tTS
Ad-SEAP2	CMV	SEAP	—	—	—	—

CMV = CMV intermediate-early promoter / enhancer

TRE/CMV = tet-responsive promoter containing minimal CMV promoter

EF-1 α = human elongation factor-1 α promoter

Ad-rtTA-IRES-tTS-L contains CMV promoter / Intron A / rtTA / IRES / tTS / P(A) cassette in the E3 deletion region.

AdBI-rtTA-L and Ad-tTS-BI-rtTA-L express luciferase and rtTA from one bidirectional tet-responsive promoter cloned in the E1 deletion region.

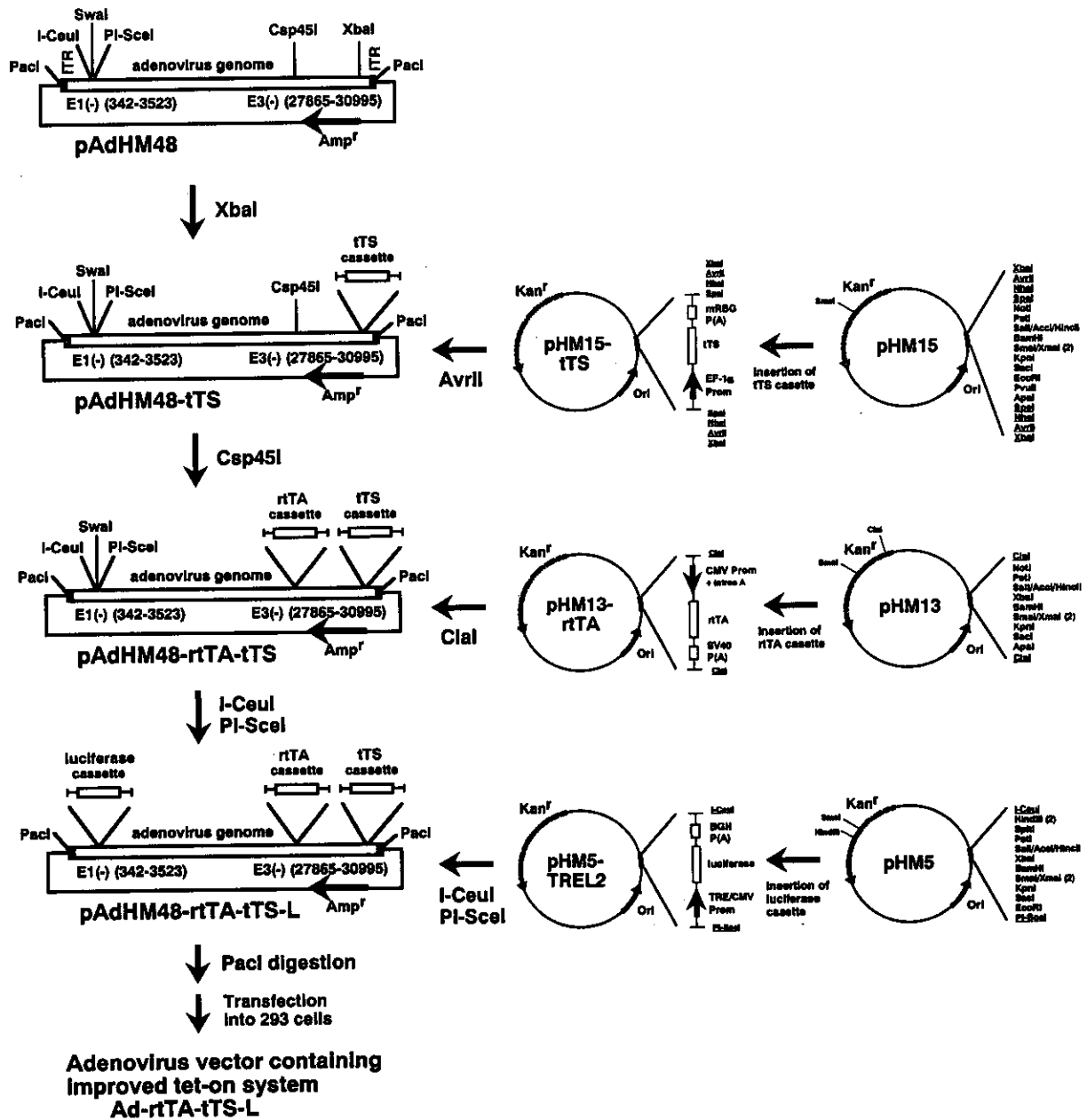


Fig.27 The construction strategy of Ad vectors containing the triple gene expression system.

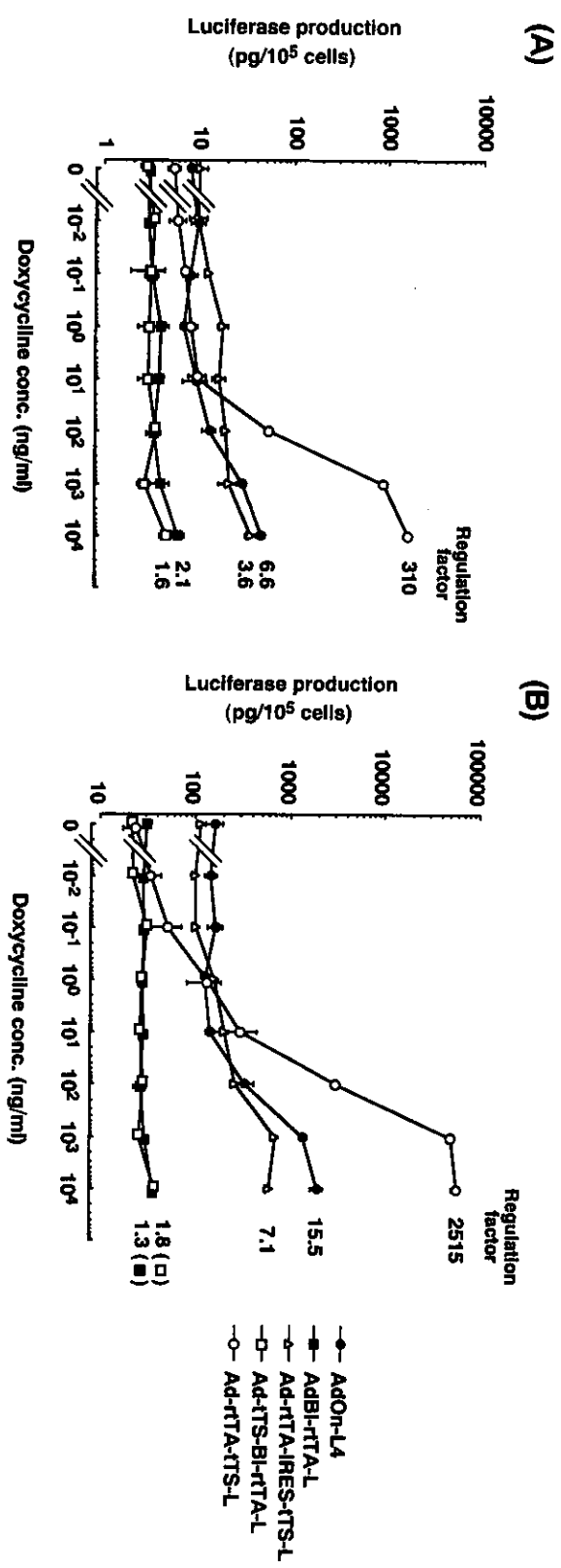


Fig.28 Regulated luciferase expression in SK HEP-1 cells transduced with various Ad-mediated tet-on systems.

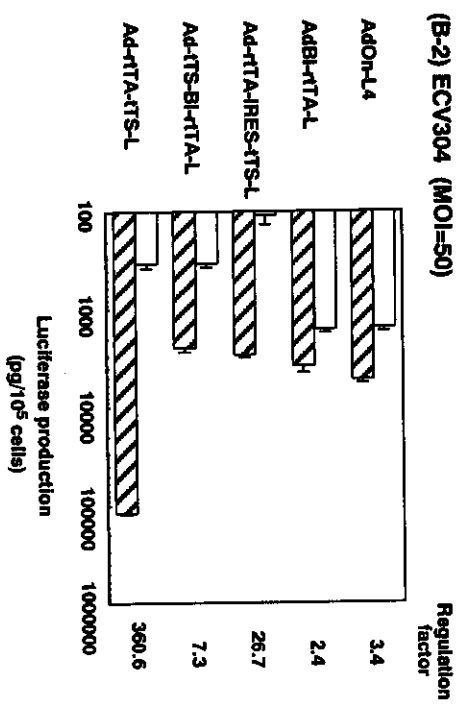
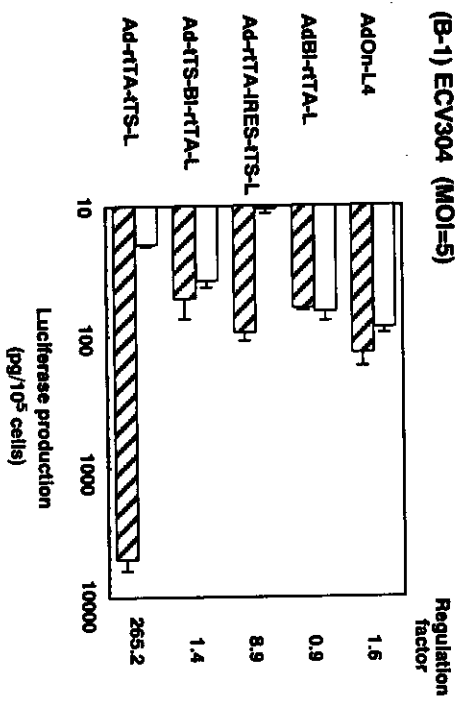
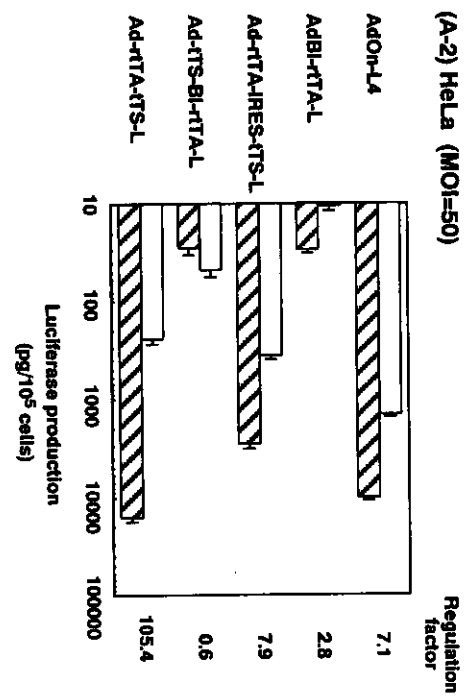
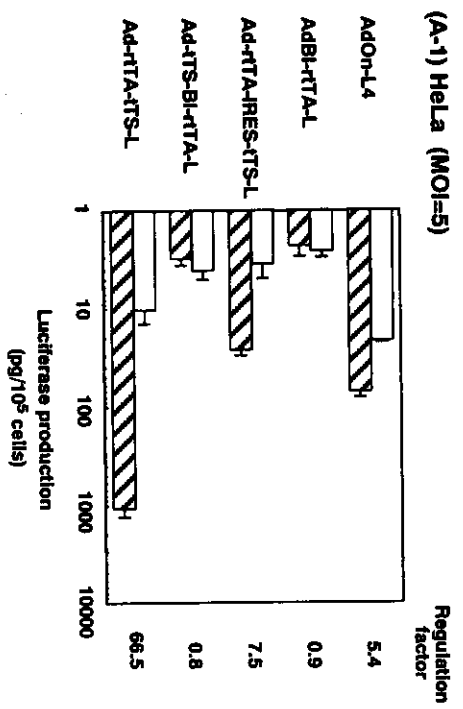
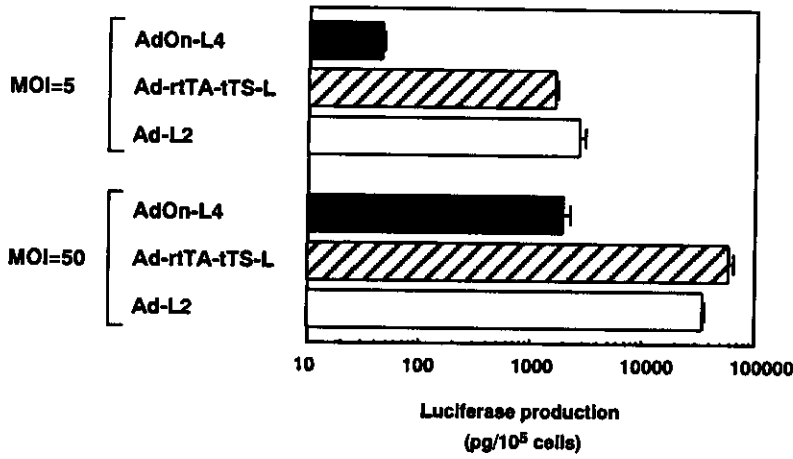
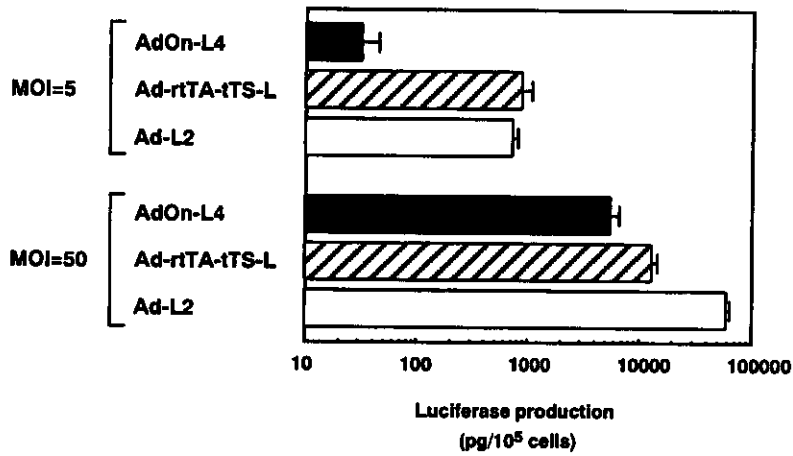


Fig.29 Regulated luciferase expression in HeLa and ECV304 cells transduced with various Ad-mediated tet-on systems.

(A) SK HEP-1



(B) HeLa



(C) ECV304

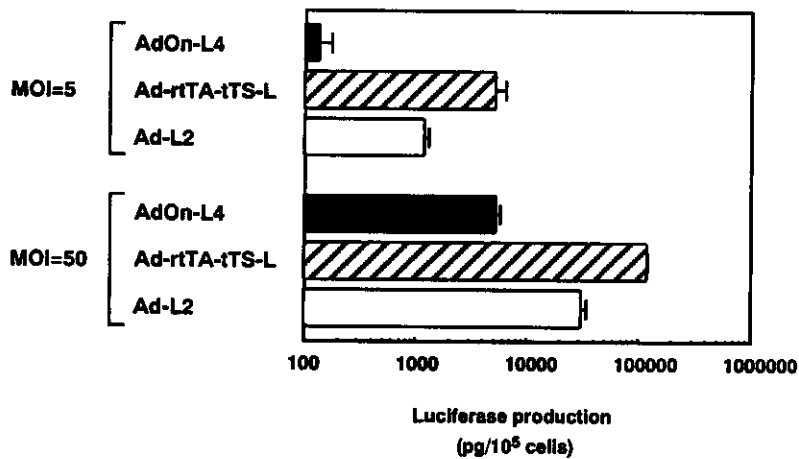


Fig.30 Comparison of induced (maximum) luciferase production in cells transduced with AdOn-L4, Ad-rtTA-tTS-L, or Ad-L2.

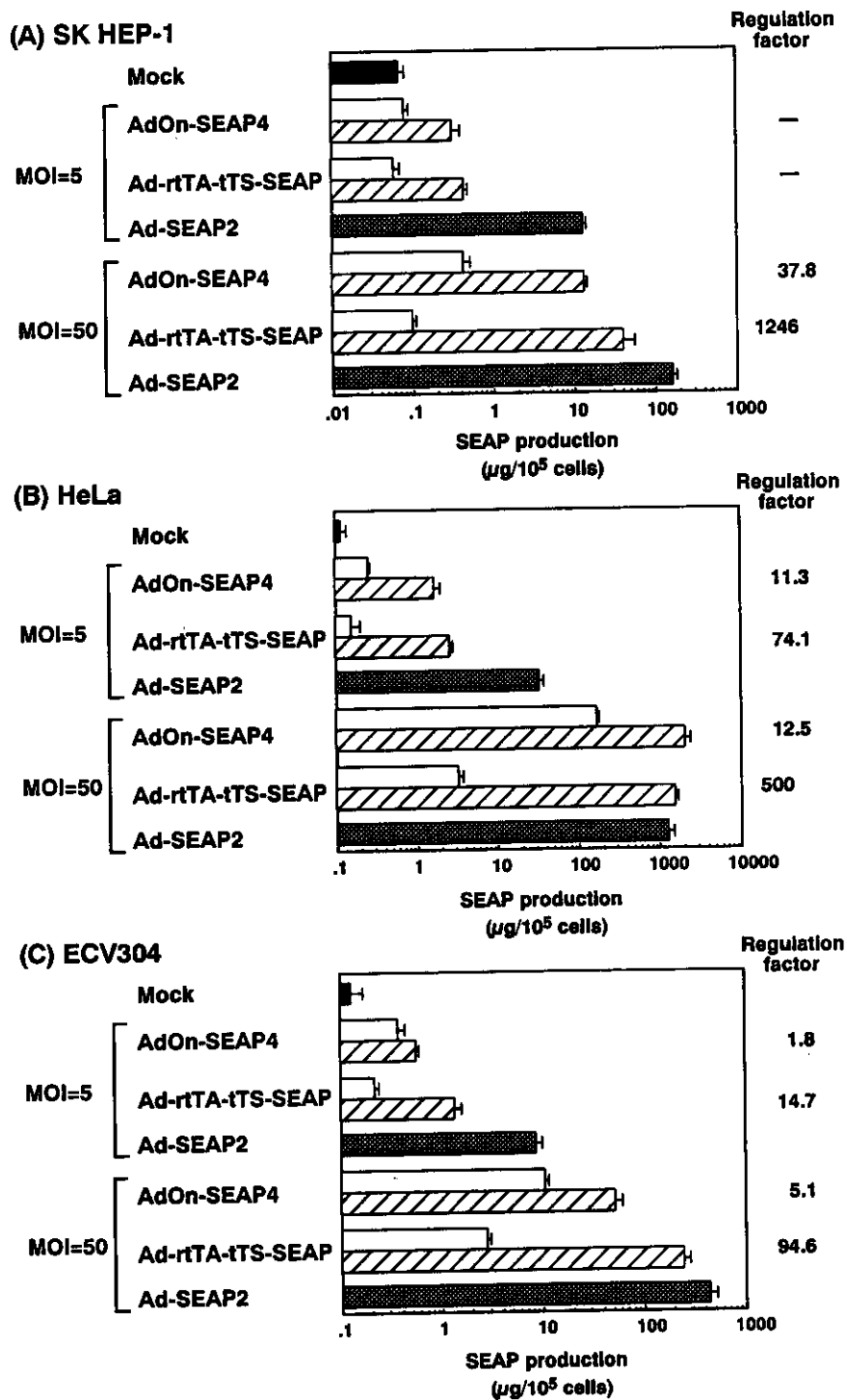


Fig.31 Regulated SEAP expression in SK HEP-1, HeLa, and ECV304 cells transduced with AdOn-SEAP4 or Ad-rTA-tTS-SEAP.

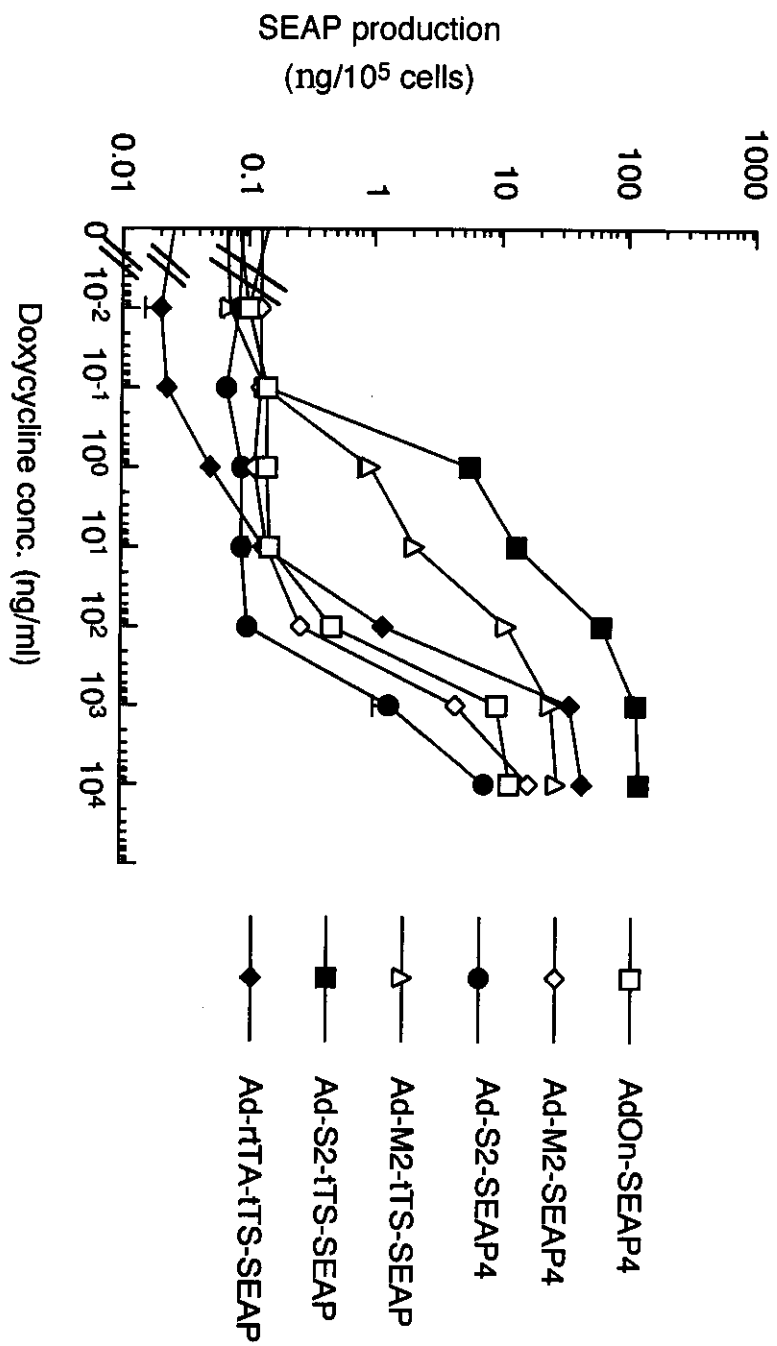


Fig.32 Regulated SEAP expression in SK HEP-1 cells transduced with various Ad-mediated tet-on systems.

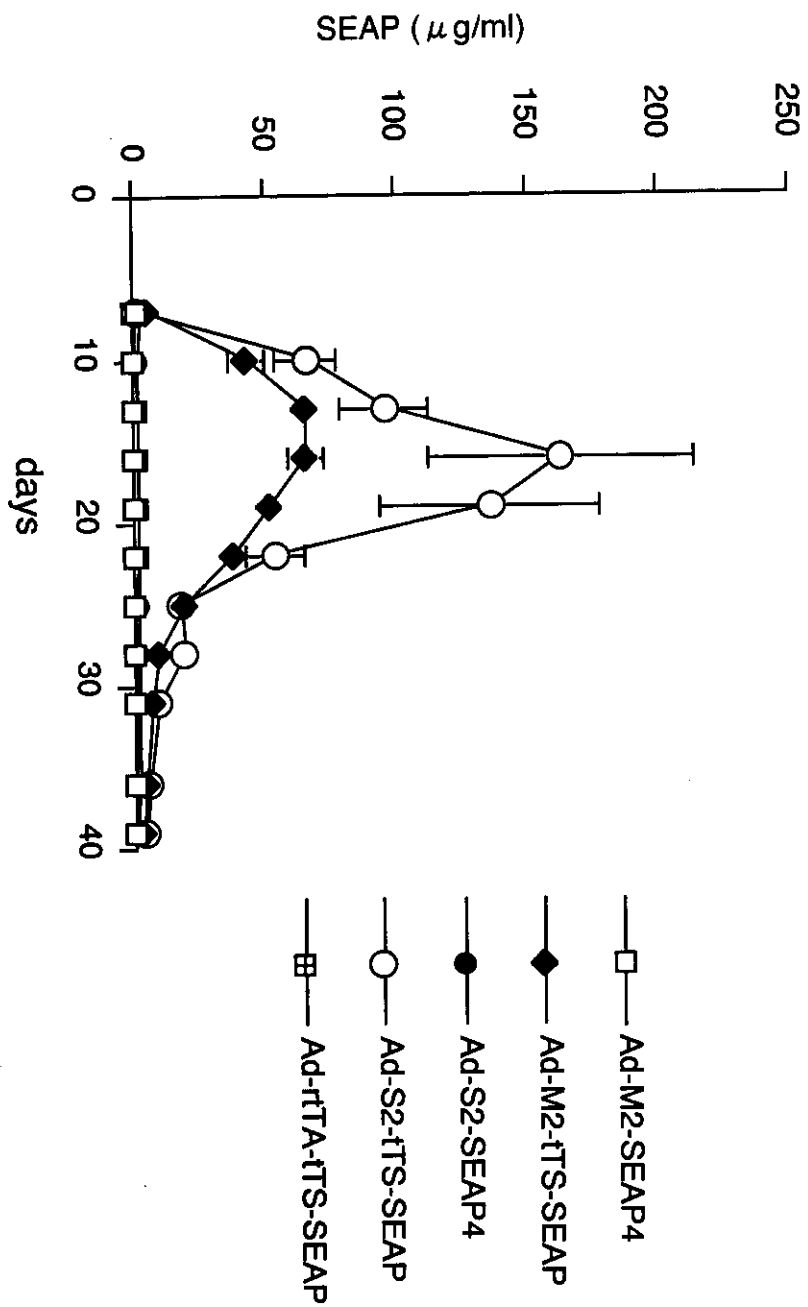


Fig. 33 Regulated SEAP expression in Balb/c nude mice.

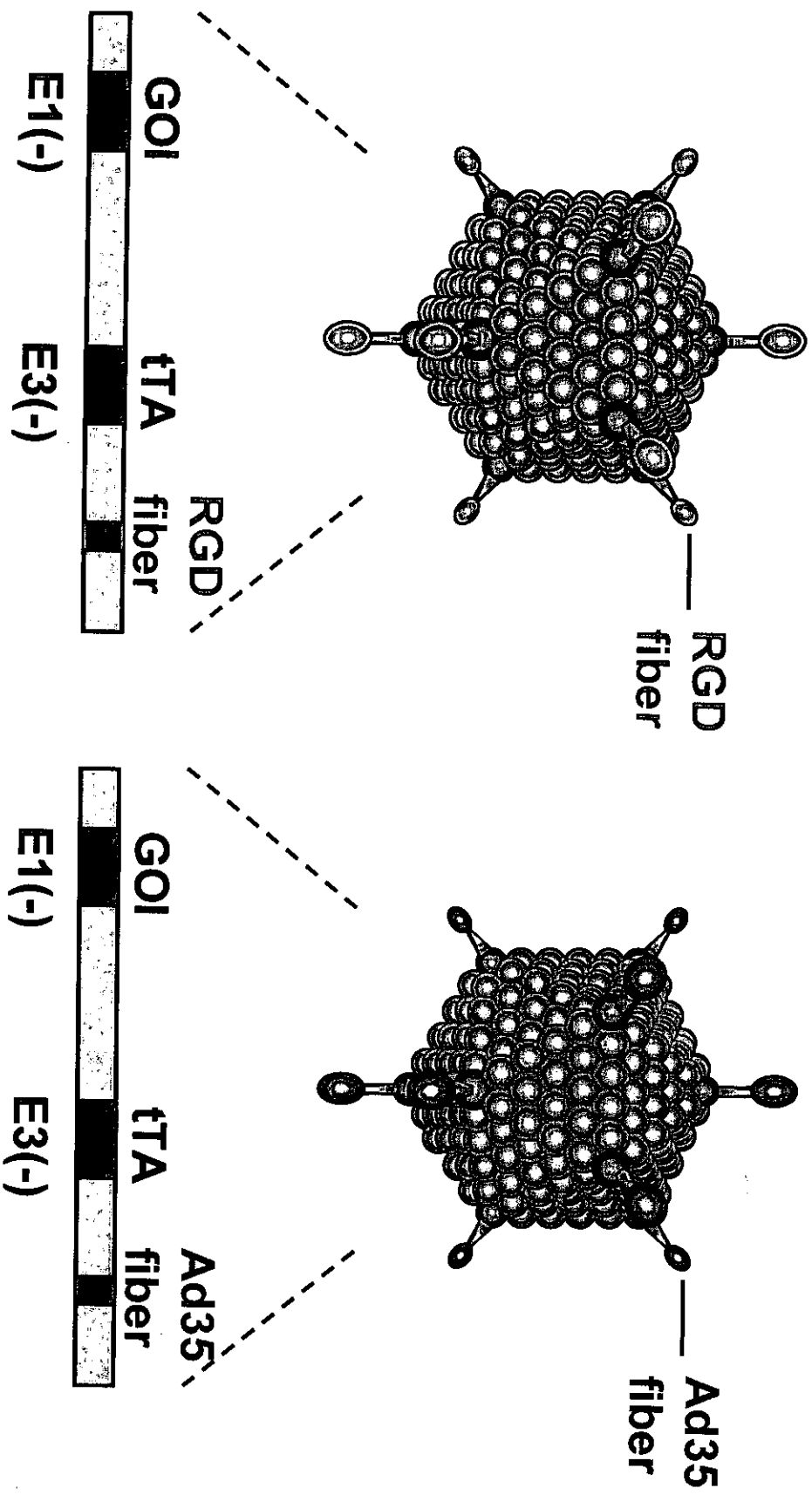
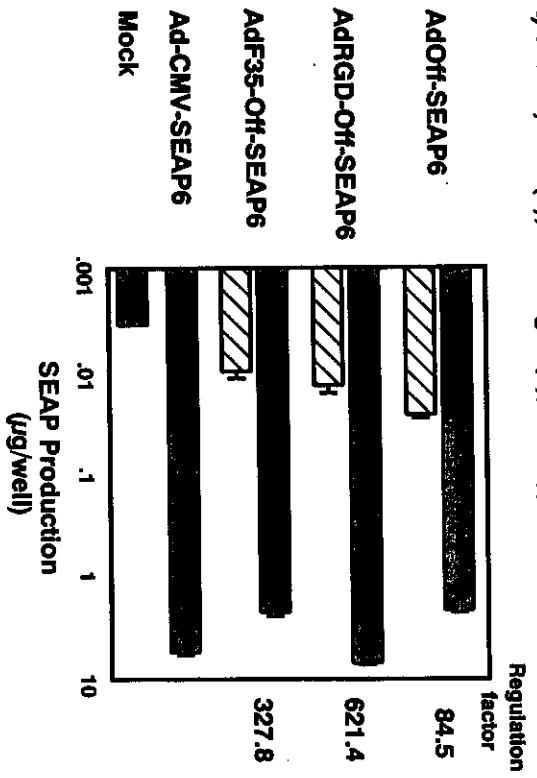
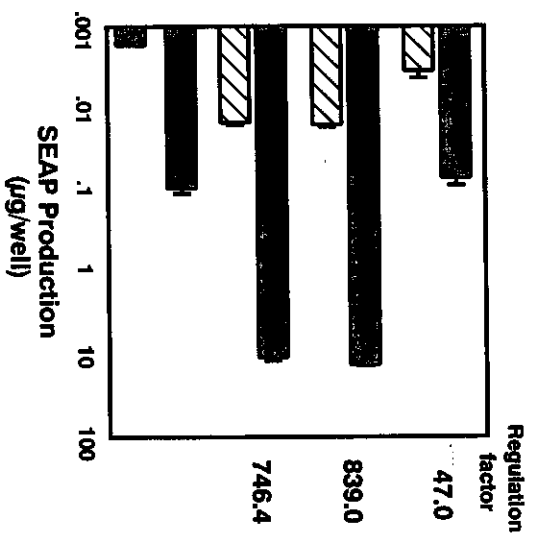


Fig.34 Capsid-modified single adenovirus vectors containing tet-off system

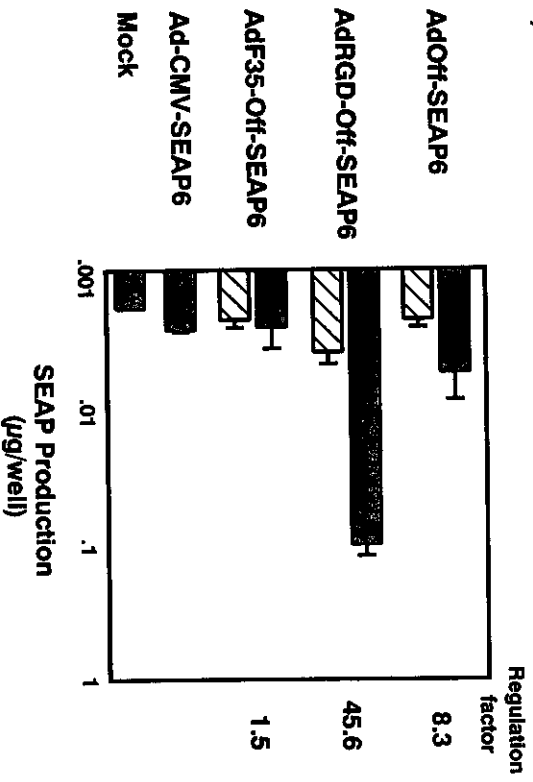
(A) HeLa; CAR(+), α v Integrin(+), CD46(-)



(B) LN2308; CAR(-), α v Integrin(+), CD46(+)



(C) NIH3T3; CAR(-), α v Integrin(+), CD46(-)



■ Dox (-)
▨ Dox (+)

Fig. 35 Capsid-modified single adenovirus vectors containing tet-off system

厚生労働科学研究費補助金（疾患関連たんぱく質解析研究事業）
分担研究報告書

高血圧、心循環器系疾患に関連する微量たんぱく質解析技術の確立
（高中性脂肪ウサギのプロテオーム解析）

分担研究者 友池仁暢（国立循環器病センター病院長）

研究要旨

高中性脂肪血症は、動脈硬化性疾患のリスクファクターである脂質代謝異常として、重要な位置をしめ、さらに最近ではメタボリックシンドロームの所見の1つとして注目されている。しかしながら、動脈硬化の発生や進展への関わりやその遺伝的背景は不明な点が多い。我々は、高中性脂肪血症の病因と病態生理を解明するため、WHHL ウサギより、高度の高中性脂肪血症を呈するライン(TGH)と軽度の高中性脂肪血症を呈するライン(TGL)の分離に成功した。このTGHとTGLを用い、肝臓における発現蛋白質を、プロテオームの技術を用いて網羅的に解析した。

二次元電気泳動の結果、約220のスポットを得た。スポットの大きさで表わされる発現量に極端な差異のある蛋白質を、さらに質量分析計を用いて解析を行った。蛋白質の同定のために、MS-MSにてアミノ酸シーケンスの解析を行った。TGHにほとんど発現を認めず、TGLに多量の発現を認めるスポットはCarboxylesteraseであり、TGLにほとんど発現を認めず、TGHに多量の発現を認めたスポットはAcyl CoA dehydrogenaseであると同定された。さらに多くのスポットが認められているので、これらのプロテオーム解析により、病因と病態の解明に大きな手がかりが得られると考えられる。

A. 研究目的

高中性脂肪血症が動脈硬化の発生、進展にどのように関わっているか、古くから関心が集まっているが、現在まで明らかとなっていない。高中性脂肪血症の原因遺伝子についても、リポ蛋白質リパーゼ(LPL)欠損症、アポリポ蛋白質C-II欠損症という、非常に稀な遺伝病以外は明らかではない。我々は、高中性脂肪血症の遺伝的背景、病態、および動脈硬化発生、進展への関わりなどを探るため、著明な高中性脂肪血症を呈する新しい動物モデルを作製した。WHHL

Lウサギでは、空腹時および食後の血清中性脂肪値高値であることは報告されている(空腹時Control; 108.0 ± 43.5 , WHHL; 308.7 ± 128.8 mg/dl、食後Control; 213.3 ± 27.4 , WHHL; 435.0 ± 94.7 mg/dl) (Arteriosclerosis 2;467-474)。これはLDL受容体がレムナントリポ蛋白の処理にも関わっていることを示す。我々は、高中性脂肪血症を呈するWHHLウサギを選択的に交配することにより、高度の高中性脂肪血症を呈するライン(TGH)と軽度の高中性脂肪血症を呈するライン(TGL)の分離に成功した。

表1 JW, TGL, TGHの特性

	JW	TGL	TGH
体重 (kg)	2.53±0.58 (n=19)	2.29±0.07 (n=11)	2.08±0.07 (n=12)
コレステロール (mg/dl)	59±5 (n=10)	1081±59 (n=11)	1465±167 (n=12)
中性脂肪 (mg/dl)	63±8 (n=10)	191±12 (n=11)	2764±413 (n=12)
空腹時血糖 (mg/dl)	160±16 (n=10)	149±4 (n=11)	149±8 (n=12)

TGLは、通常の本日本白色ウサギに比し、血清中性脂肪値は高値であった。一方、TGHは空腹時においても著明な高中性脂肪血症を呈していた。マウスやラットなどは個体のサイズが小さいため、飼育が容易であること、扱いが簡単であること、遺伝情報が豊富であることなどの理由で、実験によく用いられる。しかしながら、これらの動物はcholesterylester transfer protein (CETP)を欠損しており、血中LDL値が低く、コレステロールの担送は、おもにHDLが担っている。マウスやラットで動脈硬化が比較的起こりにくいのもこのためである。一方、ウサギはCETPを有し、コレステロールの輸送をLDLが担うなど、リポ蛋白代謝が基本的にヒトと同じであり、ヒトの疾患モデルとして適当であると言える。TGLとTGHは中性脂肪代謝を除く他の遺伝的バックグラウンドが均一であることから、高中性脂肪血症の影響や原因遺伝子群の探索に適している。また、WHHLウサギのホモ接合体をバックグラウンドとしているので、著明な高LDLコレステロール血症を呈し、動脈硬化発症、進展のモデル動物としても適当であると考えられる。

本研究では、高中性脂肪血症の病因、病態を知ることを目的として、TGLおよびTGHの肝臓組織に発現している蛋白質を、プロテオームの技術を用いて網羅的に解析した。

B. 研究方法

1. TGLおよびTGHの特性解析

TGL、TGH、日本白色ウサギ(JW)の体重、血清総コレステロール値、中性脂肪値、空腹時血糖値を表1に示す。日本白色ウサギに比し、TGLおよびTGHともに低体重であった。TGL、TGHは、ともにWHHLホモ接合体をバックグラウンドにしているため、コレステロール値は高値であった。TGLおよびTGHの皮膚には黄色腫の多発を認めたが、JWでは認めなかった。

2. 二次元電気泳動

TGLおよびTGHを麻酔し、肝臓組織を切り出し、細切後、液体窒素中で凍結、-70℃に保存した。サンプル調製時には、ポリトロンを用いてホモゲナイズした。一次元電気泳動は、Immobiline® (Amersham) pH 3-10を用い、12時間の膨潤の後、50 V 1時間、100 V 1時間、800 V 8時間、等電点電気泳動を行った。ストリップをDTT 10 mg/ml 含有平衡化バッファー中に浸して平衡化し、ヨードアセトアミド 25 mg/ml 含有平衡化バッファーに浸して平衡化した。平衡化したストリップをDALT 12.5ゲルにセットし、6Wで18時間、二次元目の電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルを10%酢酸、40%エタノール中で固定、クマシーブリリアントブルー染色を行い、スキャナーを用いて画像ファイルとした。

3. 質量分析計による分析

ゲルから目的のスポットを切り出し、脱色し、アセトニトリルで脱水後、プロテアーゼ溶液を加え、37℃で18時間反応させた。Zip Tipを用いて脱塩後、質量分析計用サンプルプレートにスポットした。マトリックス支援レーザー脱

離イオン化/飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS) による分析および MS-MS による分析を行った。

C. 研究結果、考察

それぞれのウサギから肝臓組織を採取し、二次元電気泳動を行ったところ、それぞれ約 220 個のスポットを認めた。このスポットを ImageMaster Lab Scan を用いて解析し、濃さに大きな違いのあるスポットをピックアップした。TGL ではスポットとして認識されないが、TGH では濃いスポットが認められたスポットを含む数個のスポットの部分のゲルを切り出した。その後、脱色し、トリプシンによるゲル内消化を行い、脱塩の操作の後、質量分析計用サンプルプレートにスポットした。MALDI-TOF-MS を用いてトリプシンによる切断されたペプチドフラグメントの解析を行った。データベース検索をしたところ、このペプチドフラグメントのパターンは、既知の蛋白質のものではないことがわかった。ウサギの蛋白質のデータベースが、ヒトやマウスのもとは異なり、充実していないためであると考えられた。また、MALDI-TOF-MS 法で得られるデータは、トリプシン消化により切断されたペプチドフラグメントの長さであるので、切断されるアルギニンおよびリシンの位置が種差によって、異なるため、ヒトのデータに合致しない可能性も考えられた。次に、MS-MS を用いて同じサンプルを解析した。MS-MS は、シークエンスの情報も得られることから、MALDI-TOF-MS より多くの情報が得られると考えられた。MS-MS により、GITSFLVDR、ASSTCPLTFENVK の 2 つのペプチドが、ヒトの Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain precursor とマッチし、Probability Based Mowse Score が 52 (38 以上で同定と判断出来る) であった。また TGL に多量に発現し、TGH

にほとんど発現を認めない蛋白質は、MS-MS により、7 つのペプチドがウサギ Carboxylesterase と一致し、Probability Based Mowse Score は 102 であり、発現量に差異のある蛋白質 2 つが同定された。

現在、ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスなど、遺伝子を操作して疾患モデル動物を作製できる。しかしながら、マウスは cholesterol ester transfer protein (CETP) を欠損しているため、ヒトの動脈硬化進展モデルにはなりにくい。ウサギは CETP を有し、そのリポ蛋白代謝がヒトに似通っているため、動脈硬化のモデルとして適当と考えられる。我々は、WHHL ウサギから、高中性脂肪血症を呈するライン (TGH) を得た。TGH は、著明な高コレステロール血症に加え、高中性脂肪血症も呈している。我々は、最近、TGH が TGL および日本白色ウサギに比し、アセチルコリンに対する内皮依存性弛緩反応が低下していることを報告した (Life Sciences, 74, 1487-1501, 2004)。これは、高コレステロール血症をベースにした高中性脂肪血症の、血管内皮機能への作用が明らかになったもので、このモデル動物の有用性を示すものであると考えられる。

本研究で、TGL に多量に発現し、TGH に発現を認めない蛋白質が Carboxylesterase であると同定された。Carboxylesterase は、種々の組織に存在するセリン依存性エステラーゼであり、Acyl coenzyme A cholesterol acyl transferase (ACAT) 活性を持つことが知られている。ACAT は、細胞内で oleoyl CoA とコレステロールを基質として、コレステリルエステルを生じ、細胞内にコレステロールを貯蔵する働きを持つ。細胞内コレステロールが増加すると、LDL 受容体発現が抑制され、コレステロール合成が低下し、ACAT 活性が誘導され、フリーのコレステロールはエステル化され、細胞内に貯蔵され

る。細胞内コレステロールが減少すると、LDL 受容体発現が誘導され、コレステロール合成が低下する。TGL と TGH はいずれも LDL 受容体を欠損しているから、LDL 受容体を介して細胞内へのリポ蛋白の取り込みは行われない。従って、肝細胞内ではコレステロール合成は常に上昇している。de novo 合成されたコレステロールはエステル化されにくい、受容体を介して取り込まれたコレステロールは、エステル化されやすいことは、すでに報告されている。著明な高中性脂肪血症症状を呈する TGH では、TGL に比しはるかに多量のリポ蛋白が LDL 受容体以外の受容体（アポ E 受容体、レムナント受容体など）を介して取り込まれていると考えられ、ACAT は TGH の方が当然発現を誘導されていると考えられる。ところが、実際は TGH では ACAT の蛋白質としての発現量は非常に少ない。TGH では、一次的あるいは二次的な原因で肝細胞の ACAT 自体の発現が低い可能性が考えられる。二次的な原因としては、LDL 受容体以外のリポ蛋白の受容体発現が抑制されている可能性も考えられる。

一方、TGH に多量に発現し、TGL にほとんど発現を認めない蛋白質として Acyl coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain precursor (SCAD) が同定された。SCAD は脂肪酸オキシダーゼの 1 種でアシル CoA をアセチル CoA まで酸化する反応を触媒する。SCAD は、C の数が 6 および 4 という分子量の小さな脂肪酸のみに働く。SCAD の欠損症は、出生直後から低血糖、嘔吐をくり返し数日で死に至るものから、40~50 才代になって初めて筋力低下などの症状が現われるものまで非常にバリエーションが大きい。TGL に比し、SCAD が TGH に多量に発現しているのは、脂肪酸酸化の量を反映している可能性がある。

我々は、本研究で高中性脂肪血症の病因を知

り、動脈硬化発症、進展のメカニズムを探るため、組織抽出液のプロテオーム解析の系を整え、肝臓で発現している蛋白質のプロテオーム解析を行った。TGL と TGH で発現に著明な差のある蛋白質の同定に成功した。肝臓での発現蛋白質を解析することにより、さらに病態の把握に重要な蛋白質を知ることができる。また、動脈硬化巣での蛋白質の発現を解析することにより、動脈硬化の発症のメカニズムにまでせまることができるのではないかと考えられる。

D. 結論

高脂血症ウサギの肝臓のプロテオーム解析を行い、興味ある知見を得た。

E. 健康危険情報

本研究では健康に危険を及ぼす可能性はない。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shishido T, Tasaki K, Takeishi Y, Takasaki S, Miyamoto T, Itoh M, Takahashi H, Kubota I, Ito T, Katano Y, Wakabayashi I, Tomoike H. Chronic hypertriglyceridemia in young watanabe heritable hyperlipidemic rabbits impairs endothelial and medial smooth muscle function. *Life Sci.* 2004;74:1487-1501.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 友池仁暢、大和田一雄、伊藤恒賢、遺伝性食後高中性脂肪血症家兎、特許第 3 3 4 5 6 4 3 号
1. Hitonobu Tomoike, Kazuo Owada, Tsunetaka Ito. Hereditary post prandial hypertriglyceridemic rabbit model. US Patent No. 6, 515, 196 B2