

# アスコルビン酸の新しい生理機能

—アスコルビン酸欠乏による急性期タンパク質の  
変動とその機序—

池田彩子



①  
報告番号 甲第 4101 号

# アスコルビン酸の新しい生理機能

—アスコルビン酸欠乏による急性期タンパク質の  
変動とその機構—

名古屋大学大学院生命農学研究科  
農芸化学専攻(栄養化学)

池田彩子

# 目次

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 第1章 | 緒論   | 1  |
| 第2章 | アスコルビン酸欠乏により変動する遺伝子発現の探索                                   | 4  |
| 第1節 | アスコルビン酸合成不能の ODS ラットにおいてアスコルビン酸欠乏により濃度の変動するタンパク質の検索        | 4  |
|     | 目的   | 4  |
|     | 実験材料と実験方法  | 4  |
|     | 結果   | 5  |
|     | 考察   | 9  |
| 第2節 | アスコルビン酸欠乏によるアポリポタンパク質 A-I 遺伝子の発現変動                         | 11 |
|     | 目的   | 11 |
|     | 実験材料と実験方法  | 11 |
|     | 結果   | 13 |
|     | 考察   | 20 |
| 第3節 | アスコルビン酸欠乏による腎臓脂肪酸結合タンパク質濃度の低下とその機構                         | 22 |
|     | 目的   | 22 |
|     | 実験材料と実験方法  | 22 |
|     | 結果   | 24 |
|     | 考察   | 31 |
| 第4節 | アスコルビン酸欠乏による急性期タンパク質遺伝子の発現変動                               | 33 |
|     | 目的   | 33 |
|     | 実験材料と実験方法  | 34 |
|     | 結果   | 35 |
|     | 考察   | 44 |
| 第3章 | アスコルビン酸欠乏による急性期タンパク質遺伝子の発現制御機構                             | 46 |
| 第1節 | アスコルビン酸欠乏による副腎でのインターロイキン6遺伝子の発現亢進                          | 46 |
|     | 目的   | 46 |
|     | 実験材料と実験方法  | 46 |
|     | 結果   | 47 |
|     | 考察   | 51 |
| 第2節 | アスコルビン酸欠乏による肝臓の急性期タンパク質遺伝子の発現変動および血中 IL-6 濃度の上昇に対する副腎摘出の影響 | 53 |
|     | 目的   | 53 |
|     | 実験材料と実験方法  | 54 |
|     | 結果   | 54 |
|     | 考察   | 59 |
| 第4章 | エンドキシン投与時の急性期タンパク質遺伝子の発現誘導に対するアスコルビン酸摂取の影響                 | 61 |
|     | 目的   | 61 |
|     | 実験材料と実験方法  | 61 |

|               |    |
|---------------|----|
| 結果.....       | 62 |
| 考察.....       | 67 |
| 第5章 総合討論..... | 68 |
| 第6章 要約.....   | 71 |
| 引用文献.....     | 74 |
| 謝辞.....       | 82 |
| 報文目録.....     | 83 |
| 参考論文目録.....   | 84 |

## 図表目次

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Table 1  | Composition of the basal diet .....  | 5  |
| Table 2  | Ascorbic acid concentration in liver and jejunum of rats of control group and ascorbic acid-deficient group .....  | 15 |
| Table 3  | Serum cholesterol concentration and cholesterol concentration in serum lipoproteins of control and ascorbic acid-deficient group .....   | 15 |
| Table 4  | Body weights and renal and hepatic ascorbic acid concentrations on d 14 of control and ascorbic acid-deficient rats .....  | 26 |
| Table 5  | Serum concentrations of testosterone, corticosterone, creatinine and uric acid on d 14 of control and ascorbic acid-deficient rats .....   | 26 |
| Table 6  | Body weights and hepatic concentration of ascorbic acid of control and ascorbic acid-deficient rats on d 7, 10, 12 and 14 .....  | 37 |
| Table 7  | Serum concentrations of interleukin-6 and corticosterone of Wistar rats at 6 h after the intraperitoneal injection of saline or lipopolysaccharide .....   | 38 |
| Table 8  | Body weights, liver weight, adrenal ascorbic acid concentration and corticosterone concentrations in serum and adrenal gland on d 14 of control and ascorbic acid-deficient rats .....                                     | 49 |
| Table 9  | Body weights, hepatic ascorbic acid concentration and serum corticosterone concentration of sham-operated and adrenalectomized rats fed control and ascorbic acid-free diets on d 15 .....                                 | 56 |
| Table 10 | Body weights, liver weight, hepatic ascorbic acid concentration and serum corticosterone concentration of control and ascorbic acid-deficient rats at 6 h after the intraperitoneal injection of lipopolysaccharide .....  | 64 |
| Table 11 | Body weights, liver weight, hepatic ascorbic acid concentration and serum corticosterone concentration of control and ascorbic acid-deficient rats at 10 h after the intraperitoneal injection of lipopolysaccharide ..... | 65 |
| Figure 1 | Growth of ODS rats fed the basal diet (control group) and the ascorbic acid-free diet (ascorbic acid-deficient group) for 14 d .....   | 7  |
| Figure 2 | SDS-PAGE analysis on serum and the renal cytosolic fraction of control and ascorbic acid-deficient rats on d 14 .....  | 8  |
| Figure 3 | Effect of ascorbic acid deficiency on serum concentration of apolipoprotein A-I in control and ascorbic acid-deficient rats on d 3, 10 and 14 .....  | 16 |
| Figure 4 | Effect of ascorbic acid-deficiency on hepatic and jejunal level of apolipoprotein A-I mRNA in control and ascorbic acid-deficient rats on d 3, 10 and 14 .....   | 17 |
| Figure 5 | Transcriptional rates of apolipoprotein A-I, $\beta$ -actin and albumin genes in liver of control and ascorbic acid-deficient rats on d 14 .....   | 18 |
| Figure 6 | Restoration of hepatic concentration of ascorbic acid and hepatic level of apolipoprotein A-I mRNA by the administration of ascorbic acid .....  | 19 |
| Figure 7 | Ion-exchange HPLC separation of renal cytosolic proteins of a male rat .....   | 27 |
| Figure 8 | Amino-terminal amino acid sequence of the 17 kDa protein .....   | 27 |
| Figure 9 | Effect of ascorbic acid deficiency on renal level of kidney fatty acid-binding protein in control and ascorbic acid-deficient rats .....   | 28 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Figure 10 | Effect of ascorbic acid deficiency on serum level of $\alpha_2$ -globulin and amount of $\alpha_2$ -globulin excreted into urine. ....  | 29 |
| Figure 11 | Effect of ascorbic acid deficiency on hepatic level of $\alpha_2$ -globulin mRNA in control and ascorbic acid-deficient rats. ....  | 30 |
| Figure 12 | Effect of ascorbic acid deficiency on serum concentrations of haptoglobin, apolipoprotein A-I and albumin in control and ascorbic acid-deficient rats on d 7, 10, 12 and 14. ....   | 39 |
| Figure 13 | Effect of ascorbic acid deficiency on hepatic mRNA levels of haptoglobin, apolipoprotein A-I and albumin in control and ascorbic acid-deficient rats on d 7, 10, 12 and 14. ....  | 40 |
| Figure 14 | Effect of ascorbic acid deficiency on serum concentration of interleukin-6 in control and ascorbic acid-deficient rats. ....  | 41 |
| Figure 15 | Effect of ascorbic acid deficiency on serum concentration of corticosterone in control and ascorbic acid-deficient rats. ....   | 42 |
| Figure 16 | Hepatic mRNA levels of haptoglobin, $\alpha_1$ -acid glycoprotein, apolipoprotein A-I and albumin of Wistar rats at 6 h or 48 h after the injection of saline or lipopolysaccharide. ....   | 43 |
| Figure 17 | RT-PCR analysis of interleukin-6 mRNA from control and ascorbic acid-deficient rats. ....   | 50 |
| Figure 18 | Effect of adrenalectomy on hepatic mRNA levels of haptoglobin, $\alpha_1$ -acid glycoprotein, apolipoprotein A-I and albumin in control and ascorbic acid-deficient rats. ....  | 57 |
| Figure 19 | Effect of adrenalectomy on serum concentration of interleukin-6 in control and ascorbic acid-deficient rats. ....   | 58 |
| Figure 20 | Hepatic mRNA levels of haptoglobin, $\alpha_1$ -acid glycoprotein, $\alpha_2$ -macroglobulin, heme oxygenase-1 and interleukin-6 of control and ascorbic acid-deficient rats at 6 h or 10 h after the intraperitoneal injection of saline or lipopolysaccharide. .... | 66 |

## 略語

|           |  |
|-----------|--|
| Adex:     | adrenalectomized 副腎摘出(群)   |
| ACTH      | adrenocorticotrophic hormone 副腎皮質刺激ホルモン  |
| AGP:      | $\alpha_1$ -acid glycoprotein $\alpha_1$ 酸性糖タンパク質                                |
| ANOVA:    | analysis of variance 分散分析  |
| ApoA-I:   | apolipoprotein A-I アポリポタンパク質 A-I   |
| ApoE:     | apolipoprotein E アポリポタンパク質 E   |
| CBB:      | coomassie brilliant blue クマシーブリリアントブルー   |
| cDNA:     | complementary DNA 相補的 DNA  |
| d:        | day(s)   |
| EDTA:     | ethylenediaminetetraacetic acid エチレンジアミン四酢酸                                      |
| FABP:     | fatty acid-binding protein 脂肪酸結合タンパク質  |
| h:        | hour(s)  |
| HDL:      | high density lipoprotein 高密度リポタンパク質  |
| HO-1:     | heme oxygenase-1 ヘムオキシゲナーゼ1  |
| HPLC:     | high-performance liquid chromatography 高性能液体クロマトグラフィー                            |
| IL-1:     | interleukin-1 $\beta$ インターロイキン1  |
| IL-6:     | interleukin-6 インターロイキン6  |
| LDL:      | low density lipoprotein 低密度リポタンパク質   |
| LPS:      | lipopolysaccharide リポポリサッカライド  |
| M-MLV:    | mouse mammary leukemia virus マウス乳腺白血病ウイルス  |
| MOPS:     | 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid 3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸                        |
| PCR:      | polymerase chain reaction ポリメラーゼ連鎖反応   |
| PVDF:     | polyvinylidene difluoride ポリビニリデン ジフルオライド  |
| RNase:    | ribonuclease リボヌクレアーゼ  |
| RT-PCR:   | reverse transcription PCR 逆転写 PCR  |
| SDS:      | sodium dodecyl sulfate ドデシル硫酸ナトリウム   |
| SDS-PAGE: | sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis<br>SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 |
| SEM:      | standard error of means 標準誤差   |
| Sham:     | sham-operated 偽手術(群)   |
| TNF:      | tumor necrosis factor 腫瘍壊死因子   |
| Tris:     | tris-hydroxymethylaminomethane トリス-ヒドロキシアミノメタン                                   |
| VLDL:     | very low density lipoprotein 超低密度リポタンパク質   |
| wk:       | week(s)  |
| wt:       | weight(s)  |

## 第1章 緒論

アスコルビン酸(ビタミン C)は、分子量 176.13(C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>)の水溶性ビタミンで、ラクトン環を持つ一種の糖誘導体である。アスコルビン酸は、ラットやマウスなどでは肝臓においてグルコースから合成される。しかし、ヒト、サル、モルモットなどの一部の動物では、アスコルビン酸合成の最終段階の L-グルノ-γ-ラクトンオキシダーゼ(EC 1.1.3.8)が欠損しているため、アスコルビン酸を必須栄養素として食品から摂取しなければならない。

アスコルビン酸は、その構造にエンジオール基を持つために非常に強い還元性を示し、酸化されてモノデヒドロアスコルビン酸およびデヒドロアスコルビン酸となる。この反応は可逆的であり、適当な還元剤の作用により酸化型から還元型に容易に再還元される。したがって、生体内における生理作用として第一にあげられるのは、アスコルビン酸、モノデヒドロアスコルビン酸、およびデヒドロアスコルビン酸からなる可逆的な酸化還元反応を介した抗酸化性物質としての作用である。近年、生体の酸化傷害や酸化ストレスに対する防御機構が明らかになりつつある。生理的な濃度のアスコルビン酸が低密度リポタンパク質(LDL)の酸化を抑制することが *in vitro* の系において示されている(Jialal ら、1990、Jialal と Grundy、1991)。また、高濃度のアスコルビン酸を含む組織ではスーパーオキシドやヒドロキシルラジカルなどの消去にアスコルビン酸が寄与していると考えられている(Frei ら、1989、Jacob ら、1996)。

アスコルビン酸の生理作用として次にあげられるのは、コラーゲンの生成、カテコールアミンの合成、コレステロールの異化、脂肪酸代謝などにおける水酸化反応への関与である。具体的には、プロリルヒドロキシラーゼおよびリジルヒドロキシラーゼ(コラーゲンの三次構造形成)、チロシン 3-ヒドロキシラーゼおよびドーパミンβ-ヒドロキシラーゼ(カテコールアミン合成)、γ-ブチロベタインヒドロキシラーゼおよびトリメチルリジンヒドロキシラーゼ(カルニチン合成)などの酵素が触媒する水酸化反応において、アスコルビン酸はコファクターとして要求される(Padh 1990 と 1991)。しかし、ビタミン B<sub>1</sub>、ビタミン B<sub>2</sub>、ビタミン B<sub>6</sub>、ビタミン B<sub>12</sub>、ナイアシンなどの補酵素としての作用に比べると、アスコルビン酸の水酸化反応における作用の詳細は明らかにされていない。

一方、分子生物学の発展にともなって、栄養素による遺伝子発現の調節が明らかにされてきた。実際に、ビタミン A やビタミン D は、その核内レセプターの発見以来それまで想像されていた生理作用を遙かに越える様々な生命現象に関わっていることが示されてきている。アスコルビン酸は水



溶性ビタミンであることから、脂溶性のビタミン A やビタミン D とは異なり、それ自体が核内レセプターとともに転写因子として働く可能性は低いと思われるが、近年、アスコルビン酸がある種の遺伝子発現を制御しているという例が示されつつある。培養細胞系においては、ヒト皮膚線維芽細胞における I 型コラーゲン (Kurata ら、1993)、ニワトリ軟骨細胞における X 型コラーゲン (Sullivan ら、1994)、ラット筋肉細胞におけるアセチルコリン受容体 (Liu ら、1993)、マウス骨芽細胞におけるアルカリホスファターゼとオステオカルシン (Torii ら、1994 と 1996) などの遺伝子発現が、アスコルビン酸により正に制御されていることが報告されている。一方、個体レベルでの解析については、Peterkofsky らがモルモットを用いて数例報告しているのみである (Gosiewska ら、1994, Mahmoodian ら、1996)。

この理由の一つに適当な実験動物がなかったことがあげられる。通常のラットやマウスではアスコルビン酸を生合成でき、その組織濃度も高い。アスコルビン酸は水溶性であり、大量に摂取した場合には尿中に排泄され、組織に蓄積される量はそれほど多くない。抗壞血病因子として研究が進められた経緯もあって、個体レベルにおけるアスコルビン酸の生理機能の研究にはアスコルビン酸を生合成できないモルモットがモデル動物として用いられてきた。実際に、モルモットにおいてアスコルビン酸欠乏により骨組織の I 型コラーゲン $\alpha 1$  鎖、アルカリホスファターゼおよびオステオカルシンの mRNA レベルが低下し、オステオポンチン mRNA レベルが上昇することと、この時に肝臓においてインスリン様成長因子結合タンパク質-1 および-2 の mRNA レベルが上昇することが報告されている (Gosiewska ら、1994, Mahmoodian ら、1996)。しかし、実験動物としての汎用性はマウスやラットが優れており、様々な遺伝子構造の解析はマウスやラットを中心に進んだことから、遺伝子発現の解析を行う上でモルモットは必ずしもよい実験動物とは言えない。

これに対し、1984 年に、遺伝的にアスコルビン酸を生合成できない ODS ラットが開発された (Mizushima ら、1984)。ODS ラットは、Wistar ラットの遺伝的背景を持ち、ヒトやモルモットと同様にアスコルビン酸合成の最終段階の L-グルノ- $\gamma$ -ラクトンオキシダーゼ (EC 1.1.3.8) の活性を持たない (Konishi ら、1990)。これは、この酵素の cDNA の 182 番目のグアニンがアデニンに点変異した結果、61 番目のシステインがチロシンに変異したことが原因である (Kawai ら、1992)。ODS ラットの成長は、アスコルビン酸摂取量に依存する (Horio ら、1985)。Matsushita ら (1993) と Suzuki ら (1993) は、PCB を摂取させた ODS ラットにおいて、アスコルビン酸欠乏により肝臓でのチトクローム P450 の mRNA レベルが低下することを報告した。

本研究では、今までに知られていないアスコルビン酸による遺伝子発現の調節の存在を、個体レベルで検討するために、ODS ラットを用いてアスコルビン酸欠乏時の遺伝子発現の変化を解析した。そして、アスコルビン酸が生体内で特定の遺伝子発現を調節することによってその機能を発揮している可能性を探究することを目的とした。

まず、第2章において、アスコルビン酸欠乏によるタンパク質濃度の変化を血清および様々な組織について調べた。その結果、数種類の血清タンパク質濃度と1種類の腎臓タンパク質濃度がアスコルビン酸欠乏によって変動することを見いだした。血清においては、アスコルビン酸欠乏によりハプトグロビン濃度が上昇し、アポリポタンパク質 A-I (ApoA-I) およびアルブミン濃度が低下していた。腎臓においては、腎臓脂肪酸タンパク質 (FABP) 濃度がアスコルビン酸欠乏により低下していた。また、これらすべてのタンパク質は肝臓で生合成されて血中に分泌されるタンパク質であるので、肝臓における mRNA レベルを調べ、アスコルビン酸欠乏がこれらの遺伝子発現に影響を及ぼしているか否かを調べた。

第3章では、第2章で見いだした肝臓での遺伝子発現の変動に対して、炎症性サイトカインであるインターロイキン6 (IL-6)、インターロイキン1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) および腫瘍壊死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) が関与している可能性を想定し、主要な細胞や組織中の IL-6、IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  の遺伝子発現のアスコルビン酸欠乏による変動について調べた。

第2章において解析したアスコルビン酸欠乏時の肝臓の遺伝子の発現変動は、エンドトキシンであるリポポリサッカライド (LPS) をラットに投与することにより、体内で一種の炎症反応を引き起こした場合にも同様に観察された。第4章ではアスコルビン酸の摂取が LPS 投与による肝臓の遺伝子発現の変動を抑制しうるか否かを検討した。

第5章では、以上の結果に基づきアスコルビン酸欠乏による肝臓の遺伝子発現の制御について総合的に考察した。

## 第2章 アスコルビン酸欠乏により変動する遺伝子発現の探索

---

### 第1節 アスコルビン酸合成不能の ODS ラットにおいてアスコルビン酸欠乏により濃度の変動するタンパク質の検索

#### 目的

遺伝的にアスコルビン酸を合成できない ODS ラットを用いて、アスコルビン酸摂取によりその量が制御されるタンパク質を探索し、その制御の機構を解析することによって、現在までに知られていないアスコルビン酸の生理機能を明らかにすることを本章の目的とした。

そのために、まず第2章第1節では、ODS ラットにアスコルビン酸添加食とアスコルビン酸欠乏食を与えて飼育し、血清および主要な組織に含まれるタンパク質濃度を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) により解析することにより、アスコルビン酸欠乏によって増加あるいは減少するタンパク質の存在を探索した。

#### 実験材料と実験方法

##### 実験動物と飼育方法

アスコルビン酸を合成できない6週齢の雄 ODS ラットを、日本クレア(株)から購入した。ラットは一匹ずつステンレス製ケージに入れ、12 時間照明下(明期 8:00am~8:00pm)の恒温室(22℃)で飼育した。水と表1に示した基本食は自由摂取とし、実験開始前の7日間は予備飼育期間として基本食を与えた。ラットは、10:00am から 11:00am の間に断頭により屠殺した。

Table 1 Composition of the basal diet

| Component                     | Amount<br>g/kg diet |
|-------------------------------|---------------------|
| Casein                        | 250.0               |
| Mineral mixture <sup>1</sup>  | 35.0                |
| Vitamin mixture <sup>2</sup>  | 10.0                |
| Choline chloride              | 2.0                 |
| Corn oil                      | 50.0                |
| Cellulose powder <sup>3</sup> | 40.0                |
| Sucrose                       | 204.2               |
| Cornstarch <sup>4</sup>       | 408.5               |
| Ascorbic acid                 | 0.3                 |

<sup>1</sup> AIN93-MX (AIN 1993)

<sup>2</sup> AIN93-VX (AIN 1993)

<sup>3</sup> AVICEL type FD-101, Asahi Chemical Industry, Osaka, Japan.

<sup>4</sup> Amylalpha-CL, Chuoshokuryo, Aichi, Japan.

### 実験方法

ODS ラット(体重 140g)は、アスコルビン酸を含まない飼料(基本食のアスコルビン酸を炭水化物で置き換えたもの)を与えた欠乏群と、基本食(アスコルビン酸 300mg/kg 添加、表 1)を与えた対照群の2群に分け、14 日間飼育した。欠乏群の飼料摂取量は実験開始後 12 日目からわずかに減少し始めるので、12 日目以降には欠乏群の摂取量を対照群に与えることにより両群の摂取量を同じにした。

ラットを屠殺後、血液を 1,500×g、10 分間遠心分離することにより血清を採取した。肝臓、腎臓、副腎、脾臓および脳の各組織は、PBSでホモジナイズした後、4℃で 12,000×g、15 分間遠心し、沈殿(12,000×g 沈殿画分)と上清(12,000×g 上清画分)を得た。腎臓については、12,000×g 上清画分をさらに 4℃で 100,000×g、60 分間遠心することによって、その上清(細胞質画分)と沈殿(ミクロソーム画分)を得た。

血清と、各組織の 12,000×g 沈殿画分および 12,000×g 上清画分について SDS-PAGE を行った。腎臓については、細胞質画分とミクロソーム画分についても SDS-PAGE を行った。

### タンパク質濃度の測定

血清は、1μl を SDS-PAGE の試料とした。肝臓、腎臓、副腎、脾臓および脳の各組織は、それぞれの画分(タンパク量 20μg)を用いて SDS-PAGE を行った。泳動後のバンドの検出にはクマシーブリリアントブルー R250 を用いた。

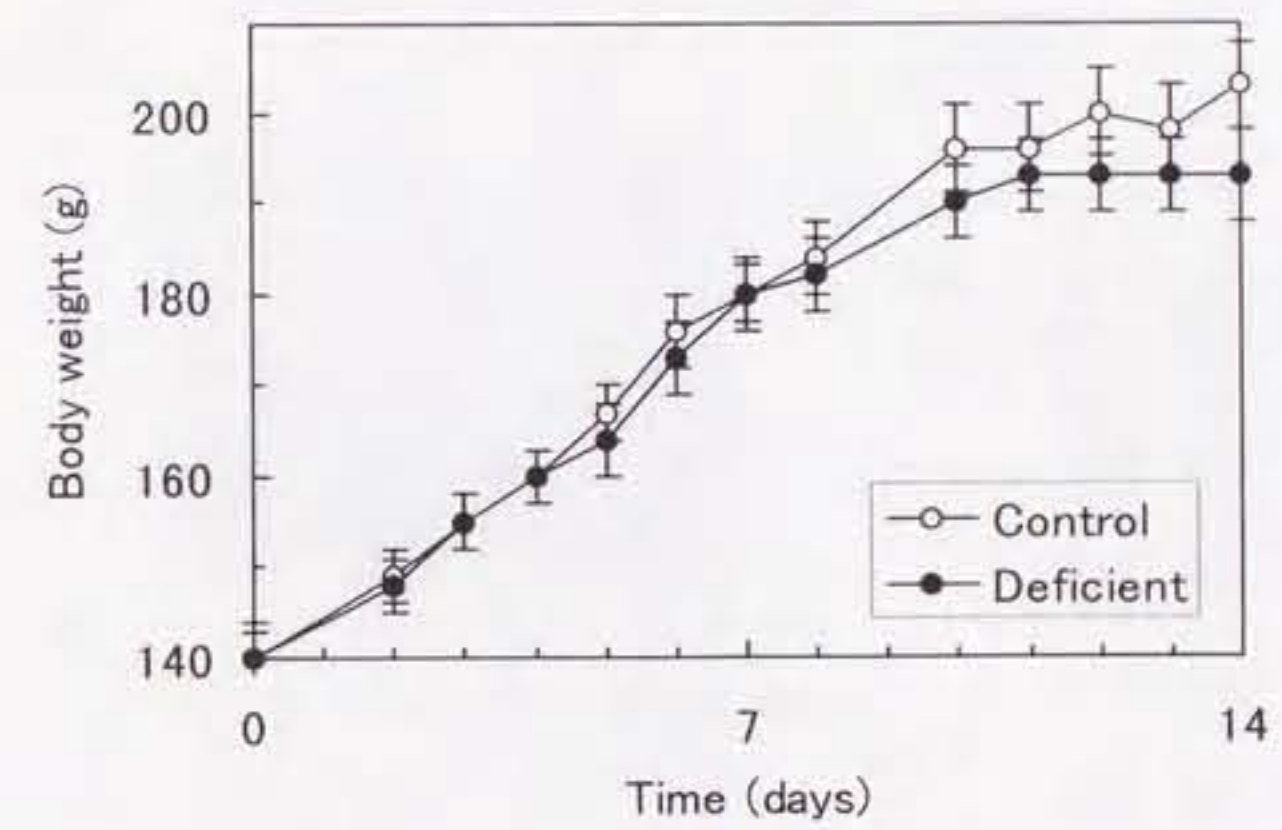
## 結果

### 対照群とアスコルビン酸欠乏群の体重変化

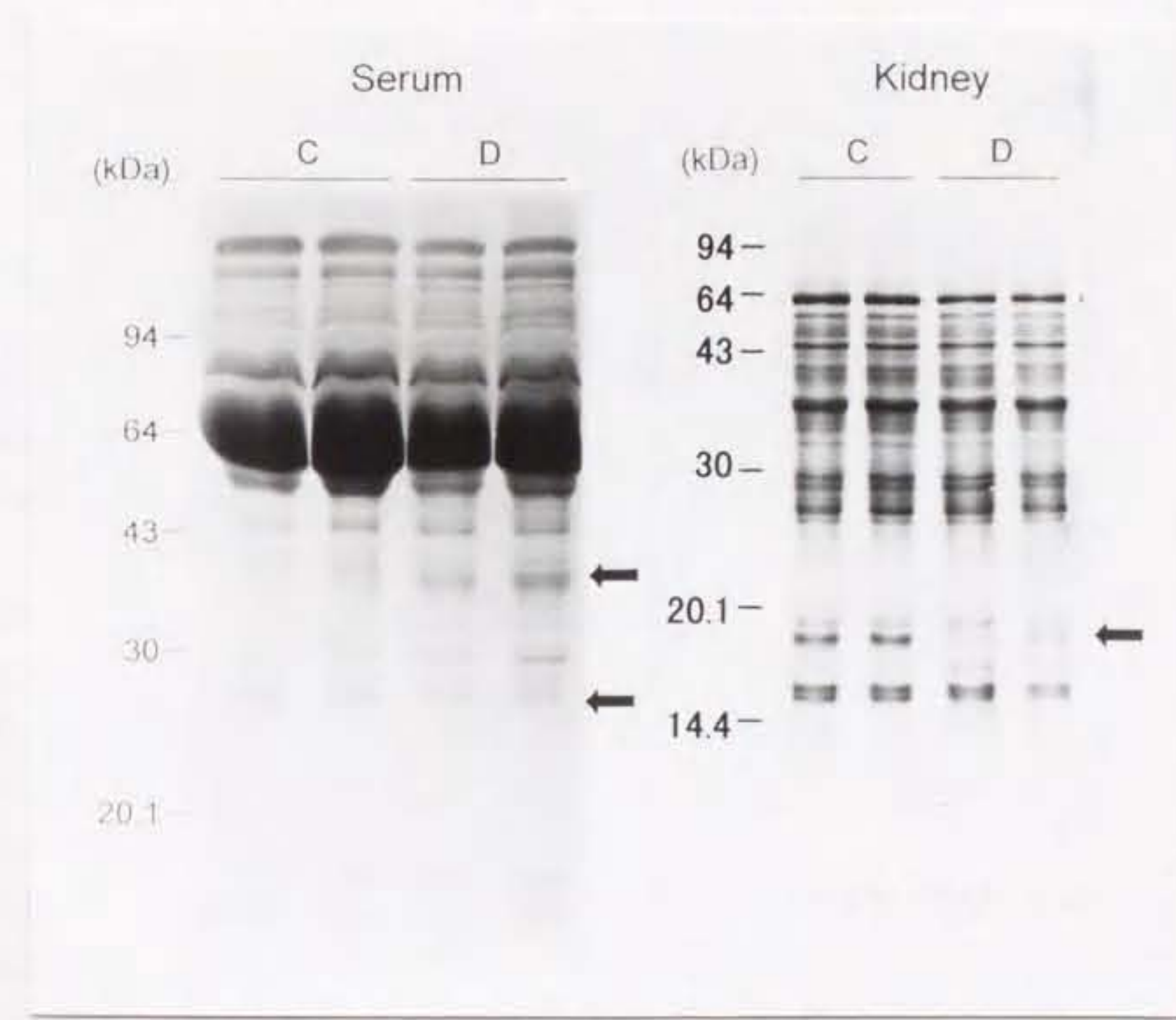
対照群とアスコルビン酸欠乏群の 14 日間の体重を図1に示した。両群の体重に差はなく、アスコルビン酸欠乏群において出血などの外見上の欠乏症状は観察されなかった。

#### 血清および腎臓中のタンパク質濃度に及ぼすアスコルビン酸欠乏の影響

SDS-PAGE により解析した結果、欠乏群において血清の 27kDa タンパク質濃度が低下し、36kDa タンパク質濃度が上昇した。また、腎臓中の細胞質画分に存在する 17kDa タンパク質濃度が低下することを見いだした(図 2)。肝臓、副腎、脾臓および脳においては、両画分において、両群の間でその濃度が明らかに変化するタンパク質は観察されなかった。



**Figure 1** Growth of ODS rats fed the basal diet (control group) and the ascorbic acid-free diet (ascorbic acid-deficient group) for 14 d. From d 12 to 14, rats in the control group were fed the same amounts of the basal diet as rats fed the ascorbic acid-free diet in the ascorbic acid-deficient group. Points indicate means, and the vertical line on each point indicates  $\pm$ SEM (n = 4).



**Figure 2** SDS-PAGE analysis on serum and the renal cytosolic fractions of control (C) and ascorbic acid-deficient (D) rats on d 14. Serum (1  $\mu$ L) and the renal cytosolic fractions (20  $\mu$ g of protein) of the control and the ascorbic acid-deficient rats were subjected to SDS-PAGE, and proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue.

## 考察

遺伝的にアスコルビン酸を生合成できない ODS ラットを用い、アスコルビン酸摂取によりその濃度が変動するタンパク質の存在を明らかにすることを目的として、血清および主要な組織に含まれるタンパク質濃度を SDS-PAGE により調べた。

SDS-PAGE は、簡便で精度の高いタンパク質の検出法として広く用いられている。試料に含まれるほとんどのタンパク質を一度で検出でき、群間での比較がしやすい上に目的のタンパク質の分子量が推定しやすいので、本実験に用いた。これ以外に、等電点電気泳動と SDS-PAGE を組み合わせた二次元電気泳動法による検討も行ったが、定量性において SDS-PAGE が勝っていた。また、泳動後のタンパク質の検出には、クマシーブリリアントブルーによる染色を用いた。染色法には、もっと感度のよいアミドブラックによる染色や銀染色もあるが、本実験ではその後の解析を考慮して、量的に多いタンパク質を検出する目的で、あえてクマシーブリリアントブルーによる染色を用いた。

本研究では、アスコルビン酸欠乏状態として、14 日間のアスコルビン酸無添加食の摂取を採用した。図1に示したように、6週齢の ODS ラットでは、アスコルビン酸欠乏群において 12 日目頃からわずかに飼料摂取量が減少し始め、14 日目頃に体重の増加が止まる。その後、ODS ラットの体重は低下して衰弱し、それとともに壊血病の特徴的な症状である鼻や目の周囲からの出血が見られ、体内においても足の付け根などに出血が観察されるようになる。そして、一ヶ月程度でアスコルビン酸欠乏死に至る。

今回、アスコルビン酸欠乏により濃度の変動するタンパク質を検索するにあたって、14 日目以降の時期では、飼料摂取量の減少が体内でのタンパク質の生合成に影響を与えると考えた。そこで、本研究では実験期間として、体重が減少する以前の 14 日間を設定した。

SDS-PAGE による解析により、血清と、腎臓の細胞質画分においてアスコルビン酸欠乏により濃度が変動するタンパク質が検出された。しかし、他の組織では観察されなかった。また、結果については述べなかったが、300 mg/kg のアスコルビン酸添加食を与えた対照群に対し、100 倍量の 30,000 mg/kg のアスコルビン酸添加食を与えたアスコルビン酸過剰摂取群についても同様の解析を行ったが、欠乏の場合とは異なり、過剰摂取によって変動するタンパク質は調べた限りにおいては観察されなかった。タンパク質の検出感度の問題もあるが、水溶性ビタミンであるアスコルビン酸は、過剰に摂取した場合には体内に保持されず、尿中に排泄されることが知られており、現在のところ過剰症についても特に報告されていない。そこで、以降の節ではアスコルビン酸欠乏に焦点を絞り、本節で変化の認められた 27 kDa および 36 kDa の血清タンパク質と、17 kDa の腎臓タ



ンパク質が同定し、それらの遺伝子の発現に対するアスコルビン酸欠乏の影響と、その機構について解析することを目的とした。

## 第2節 アスコルビン酸欠乏によるアポリポタンパク質 A-I 遺伝子の発現変動

### 目的

第1節において、アスコルビン酸欠乏時には血清の 27kDa タンパク質濃度が低下し、36kDa タンパク質濃度が上昇し、また腎臓細胞質中の 17kDa タンパク質濃度が低下することを見いだした。これらのタンパク質のうちで、血中の 27kDa タンパク質は、その分子サイズと濃度から、高密度リポタンパク質 (HDL) の主要構成アポリポタンパク質である ApoA-I ではないかと推定した。

ApoA-I は、レシチン:コレステロールアシルトランスフェラーゼ (EC 2.3.1.43) を活性化させる作用を持つ (Fielding ら、1972)。ヒトについての多くの疫学調査の結果、血中 ApoA-I 濃度の低下が、動脈硬化発症の危険性を増すことが知られている (Maciejko ら、1983)。また、最近、ヒト ApoA-I のトランスジェニックマウスの研究から、血中の ApoA-I 濃度の上昇が高脂肪食摂取による動脈硬化巣の進展を抑えるという直接的な証明がなされた (Rubin ら、1993, Schultz ら、1993)。このように、ApoA-I は生体のコレステロール代謝において重要な役割を持つタンパク質であり、ApoA-I の発現に対するアスコルビン酸欠乏の影響について調べることは栄養学的に重要であると考えた。そこで、ラット ApoA-I に対する抗血清を作製し、アスコルビン酸欠乏による血中 ApoA-I 濃度の変化を明らかにし、ApoA-I mRNA レベルの変動を解析することを目的とした。

### 実験材料と実験方法

#### 実験方法

ODS ラット (体重 140g) は、アスコルビン酸を含まない飼料 (基本食のアスコルビン酸を炭水化物で置き換えたもの) を与えた欠乏群と、基本食 (アスコルビン酸 300mg/kg 添加、表 1) を与えた対照群の 2 群に分け、14 日間飼育した。欠乏群の飼料摂取量は実験開始後 12 日目から減少し始めるので、12 日目以降には欠乏群の摂取量を対照群に与えることにより両群の摂取量を同じにした。

アスコルビン酸投与による回復実験は、上記のように 14 日間飼育した欠乏群のラットにアスコルビン酸を 60mg/kg 体重になるように腹腔内投与し、その後アスコルビン酸を含む基本食で 7 日間飼育した。

屠殺後、血液を 1,500 × g、10 分間遠心分離することにより血清を採取した。肝臓と小腸は、採取後すぐに液体窒素で凍結させ -80°C で保存し、アスコルビン酸濃度の測定および RNA 抽出に用いた。

### 組織のアスコルビン酸濃度の測定

肝臓および小腸は、氷冷の5%メタリン酸でホモジナイズした後、1,600×gで10分間遠心分離した。上清のアスコルビン酸濃度はヒドラジン法(Roe and Kuether 1943)により測定した。

### 血清およびリポタンパク質画分中のコレステロール濃度の測定

コレステロール濃度の測定には、モノテストコレステロール(ペーリンガーマンハイム山之内、東京)を用いた。

### 血清リポタンパク質の分離

Hatch と Lees の方法により(1968)血清リポタンパク質を超低密度リポタンパク質(VLDL;  $d < 1.006$  g/ml)、LDL ( $d = 1.006 - 1.045$  g/ml)、HDL<sub>1</sub> ( $d = 1.045 - 1.080$  g/ml)および HDL<sub>2</sub> ( $d = 1.080 - 1.210$  g/ml)に分離した。各リポタンパク質画分から Mindham と Mayes の方法(1992)によりアポリポタンパク質を得た。各アポリポタンパク質は SDS-PAGE により分離し、クマシーブリリアントブルーで染色した。

### 抗血清の作製

HDL<sub>1</sub> および HDL<sub>2</sub> 画分の各アポリポタンパク質を SDS-PAGE により分離し、Apo A-I を含むゲルを切り出した。約 0.5mg の Apo A-I を 0.75ml の PBS に懸濁し、フロイント完全アジュバント(和光純薬、大阪)と混合して 1.5ml とした。混合溶液を雌ニュージールランド白ウサギ(日本クレア(株)、東京)の皮下に注射し(一次免疫)、3週間後に二次免疫をした。二次免疫から一週間後にウサギから血液を採取し、血清を ApoA-I に対する抗血清として実験に用いた。

### イムノプロット解析

ODS ラットの血清 0.1 $\mu$ l を用いて SDS-PAGE を行ったあと、Semi-dry electrophoretic transfer cell (日本バイオラッド、東京)によりゲル中に含まれるタンパク質を PVDF 膜(Immobilon™ transfer membrane, 日本ミリポア、東京)に移した。膜は3%のスキムミルクを含む PBS で 1.5 時間ブロッキングした後、抗ラット ApoA-I 抗血清を 500 倍希釈した溶液に 2 時間浸した。その後、膜を 0.5 g/L Tween-20 を含む PBS で2回洗浄し、<sup>125</sup>I 標識抗ウサギ免疫グロブリン(アマシャム、東京)を 1000 倍希釈したものに 1.5 時間浸し、2回洗浄した。洗浄後の膜は、オートラジオグラフィによりバンドの検出を行い、放射活性の定量には Bioimage Analyzer System (BAS 2000II、富士写真フィルム、神奈川県)を用いた。

### ノーザンプロット解析

ラット組織からの RNA 抽出は Chomczynski と Sacchi の方法(1987)に従った。RNA 20 $\mu$ g を 50%ホルムアミド、6.6%ホルムアルデヒド存在下で 55°C、15 分間処理した後、6.6%ホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルによる電気泳動に供した。電気泳動には 40mM MOPS 緩衝液(pH7.0)、10mM 酢酸ナトリウム、1mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA)からなる電気泳動緩衝液を用いた。泳動後、10×SSC (1×SSC; 0.15mM 塩化ナトリウム、0.015mM クエン酸ナトリウム)を用いて RNA をニトロセルロース膜(Hybond N<sup>+</sup>, アマシャム、東京)に移し、UV クロスリンカーで処理した。

cDNA プロローブは、Labeling system kit (Megaprime DNA labelling system, Amersham)を用いて [<sup>32</sup>P] dCTP で標識した。RNA とプロローブ(0.9 kBq/ml)とのハイブリダイゼーションは、50%ホルムアミド、5×SSC、5×Denhardt's 溶液、1%SDS、50mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)、0.5g/L 変性 salmon sperm DNA からなるハイブリダイゼーション緩衝液を用いて、42°C一晩行った。膜は、1%SDS を含む 2×SSC で洗った後、1%SDS を含む 0.1×SSC で 55°C 15 分2回洗った。洗浄後の膜は、オートラジオグラフィでバンドの検出を行った。RNA 量の定量には、Bioimage Analyzer System (BAS 2000II、富士写真フィルム、神奈川県)を用いた。

### 核 run-off アッセイ

Lamers らの方法(1982)に従って肝臓 1g から核を採取し、500g/L グリセロール、5 mmol/L  $MgCl_2$ 、0.1 mmol/L EDTA および 50 mmol/L HEPES (pH7.5)からなる溶液 120  $\mu$ L に懸濁した。懸濁溶液に含まれる核数は、血球計側板で計測した。懸濁溶液は液体窒素で素早く凍結させ、測定まで -80°C で保存した。

転写の反応溶液の組成は、核  $10^8/L$ 、250 g/L グリセロール、2.5 mmol/L  $MgCl_2$ 、0.05 mmol/L EDTA、75 mmol/L HEPFS (pH7.5)、0.1 mol/L KCl、4 mmol/L ジチオスレイトール、0.5 mmol/L CTP、0.5 mmol/L GTP、1 mmol/L ATP、クレアチンキナーゼ(0.04 g/L)、8.8 mol/L クレアチンリン酸、 $[\alpha\text{-}^{32}P]UTP$  1.85 MBq とし、この反応溶液 100  $\mu$ L を 22°C で 1 時間インキュベーションした。その後、1 mol/L  $CaCl_2$  1  $\mu$ L、リボスクレアーゼ(RNase)-free DNase I ( $2.7 \times 10^7$  単位/L) 1  $\mu$ L、プロテイナーゼ K(10 g/L) 1  $\mu$ L を加え、37°C で 10 分間インキュベーションすることによって転写反応を停止させた。さらに、20 g/L SDS と 0.1 mol/L EDTA を含む溶液 98  $\mu$ L を加え、37°C 20 分間インキュベーションした。その後、クロロホルム、フェノールで処理し、エタノールにより RNA を沈殿させ回収した。

Hybond N<sup>+</sup>膜に結合させた ApoA-I、 $\beta$ -アクチン、アルブミンおよび pUC119 の cDNA 10  $\mu$ g と  $^{32}P$ RNA (6.72 kBq) を、上記ノーザンプロット法と同様にハイブリダイズさせ、洗った。その後、Bioimage Analyzer System (BAS 2000II、富士写真フィルム、神奈川)を用いて転写産物を定量した。

### cDNA クローン

ラット Apo A-I cDNA (Haddad ら 1986)は、東京農業大学の加藤茂明先生に供与していただいた。マウス $\beta$ -アクチン cDNA (Tokunaga ら、1986)は名古屋大学の人見清隆先生、ラットアルブミン cDNA (Iwatsuki ら、1987)は名古屋大学の中村研三先生から供与していただいた。

### 統計処理

値はすべて平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。対照群と欠乏群の平均値の比較には、Student の *t* 検定を用いた。欠乏群にアスコルビン酸を与えた場合の Apo A-I mRNA レベルの回復を調べた実験については、Duncan の多重検定(Duncan 1957)を用いた。有意差の判定は、*P*値が 0.05 以下とした。

## 結果

### 肝臓および小腸のアスコルビン酸濃度

両群の肝臓および小腸のアスコルビン酸濃度を、表 2 に示した。アスコルビン酸欠乏群の肝臓のアスコルビン酸濃度は、3 日目ですでに対照群の 27% に低下しており、10 日目以降では 10% 以下に低下していた。アスコルビン酸欠乏群の小腸でのアスコルビン酸濃度も、14 日目で対照群の 14% に低下していた。

### アスコルビン酸欠乏による血清コレステロール濃度の上昇

14 日目の両群の血清コレステロール濃度を表 3 に示した。アスコルビン酸欠乏群の総コレステロール濃度は、対照群の 1.1 倍に上昇していた。この時、アスコルビン酸欠乏により、VLDL コレス

テロール濃度が低下し、LDLコレステロール濃度は上昇した。HDL<sub>1</sub>コレステロールおよびHDL<sub>2</sub>コレステロールについては両群に有意差は見られなかった。

#### アスコルビン酸欠乏による血清アポリポタンパク質 A-I 濃度の低下

抗ラット ApoA-I 抗血清を用いて、3日目、10日目および14日目の対照群とアスコルビン酸欠乏群の血清の ApoA-I をイムノブロットで検出した結果を図 3A に示し、その定量結果を図 3B に示した。3日目および10日目の血中 ApoA-I 濃度は、両群で差はみられなかったが、14日目において、欠乏群の ApoA-I 濃度は対照群の53%に低下していた。

#### アスコルビン酸欠乏による肝臓および小腸のアポリポタンパク質 A-I mRNA レベルの変化

3日、10日および14日目の両群の肝臓と、14日目の両群の小腸から RNA を抽出し、ApoA-I mRNA レベルの変化をノーザンブロット法により調べた(図 4)。肝臓において、3日目および10日目の ApoA-I mRNA レベルは、両群で差はみられなかったが、14日目では、アスコルビン酸欠乏群の ApoA-I mRNA レベルは、対照群の約40%に低下していた。一方、この時の小腸での ApoA-I mRNA レベルは、両群で差はみられなかった。

#### アスコルビン酸欠乏と肝臓におけるアポリポタンパク質 A-I 遺伝子の転写速度

14日目の両群の肝臓における、ApoA-I、 $\beta$ -アクチンおよびアルブミン遺伝子の転写速度の測定結果を図 5 に示した。ApoA-I 遺伝子の転写速度も、 $\beta$ -アクチンおよびアルブミン遺伝子の転写速度も、アスコルビン酸欠乏により変化しなかった。

#### アスコルビン酸欠乏群にアスコルビン酸投与後の肝臓の ApoA-I mRNA レベルの回復

14日目のアスコルビン酸欠乏群にアスコルビン酸を投与して、投与後1, 3, 7日目の肝臓のアスコルビン酸濃度と ApoA-I mRNA レベルの変化を図 6 に示した。アスコルビン酸投与前の欠乏群の肝臓アスコルビン酸濃度は、対照群の11%であったが、アスコルビン酸投与後1日目では68%まで回復し、7日目には対照群と同じレベルまで回復した。対照群の ApoA-I mRNA レベルは、0日目から7日目まで変化しなかった。アスコルビン酸投与前の欠乏群の ApoA-I mRNA レベルは、対照群の60%に低下しており、アスコルビン酸投与後1日目ではほとんど上昇しなかったが、投与後3日目には対照群のレベルにまで回復した。

**Table 2** Ascorbic acid concentration in liver and jejunum of rats of control group and ascorbic acid-deficient group<sup>1</sup>

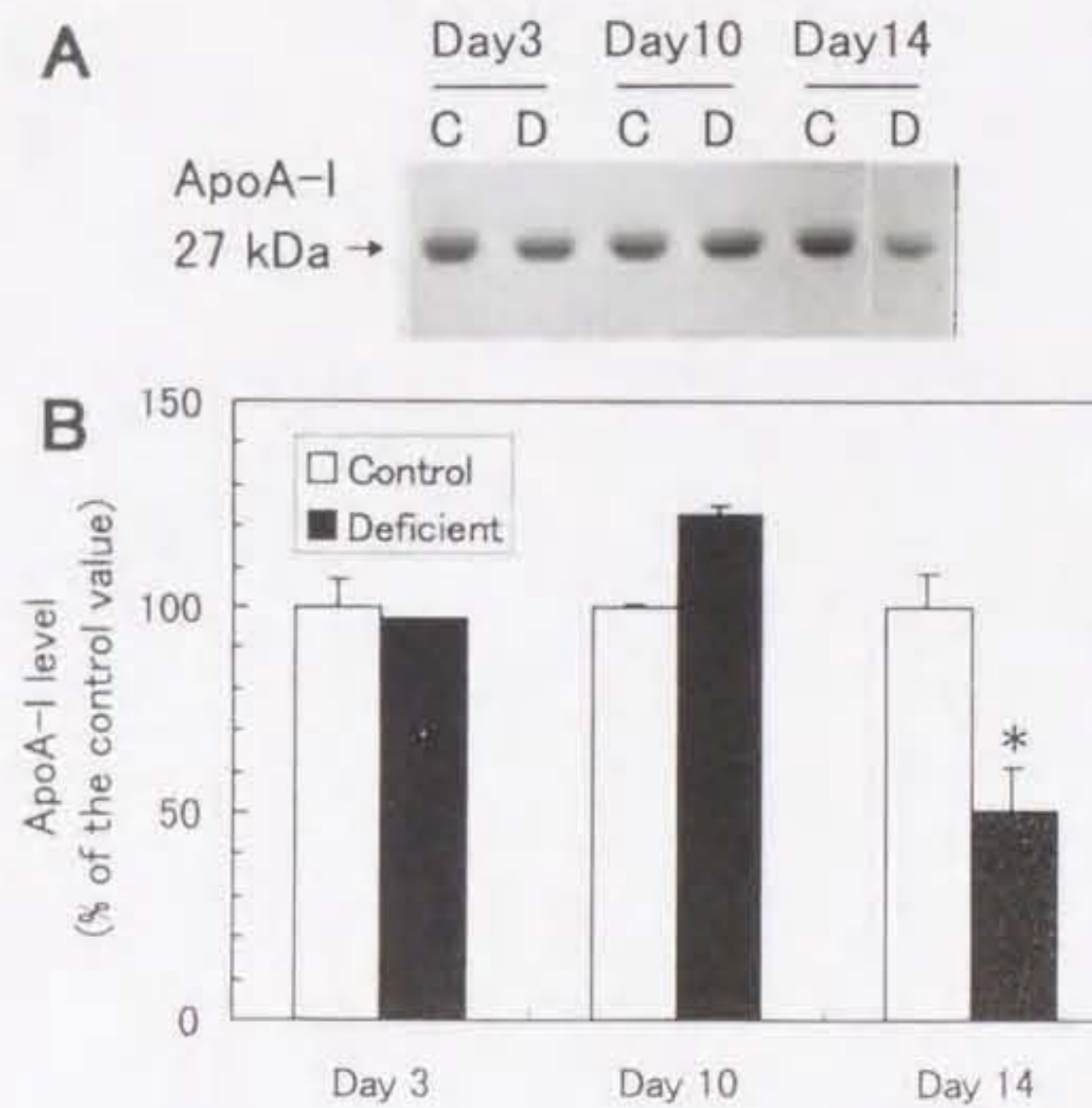
|        | Liver                |           | Jejunum   |           |
|--------|----------------------|-----------|-----------|-----------|
|        | Control              | Deficient | Control   | Deficient |
|        | <i>nmol/g tissue</i> |           |           |           |
| Day 3  | 812 ± 68             | 216 ± 23* | N. D.     | N. D.     |
| Day 10 | 784 ± 62             | 57 ± 11*  | N. D.     | N. D.     |
| Day 14 | 784 ± 57             | 74 ± 6*   | 954 ± 119 | 136 ± 28* |

<sup>1</sup>Value are means ± SEM for 3 rats (day 3 and day 10) or 4 rats (day 14). \*Significantly different ( $P < 0.05$ ) from the control group. N. D.; not determined.

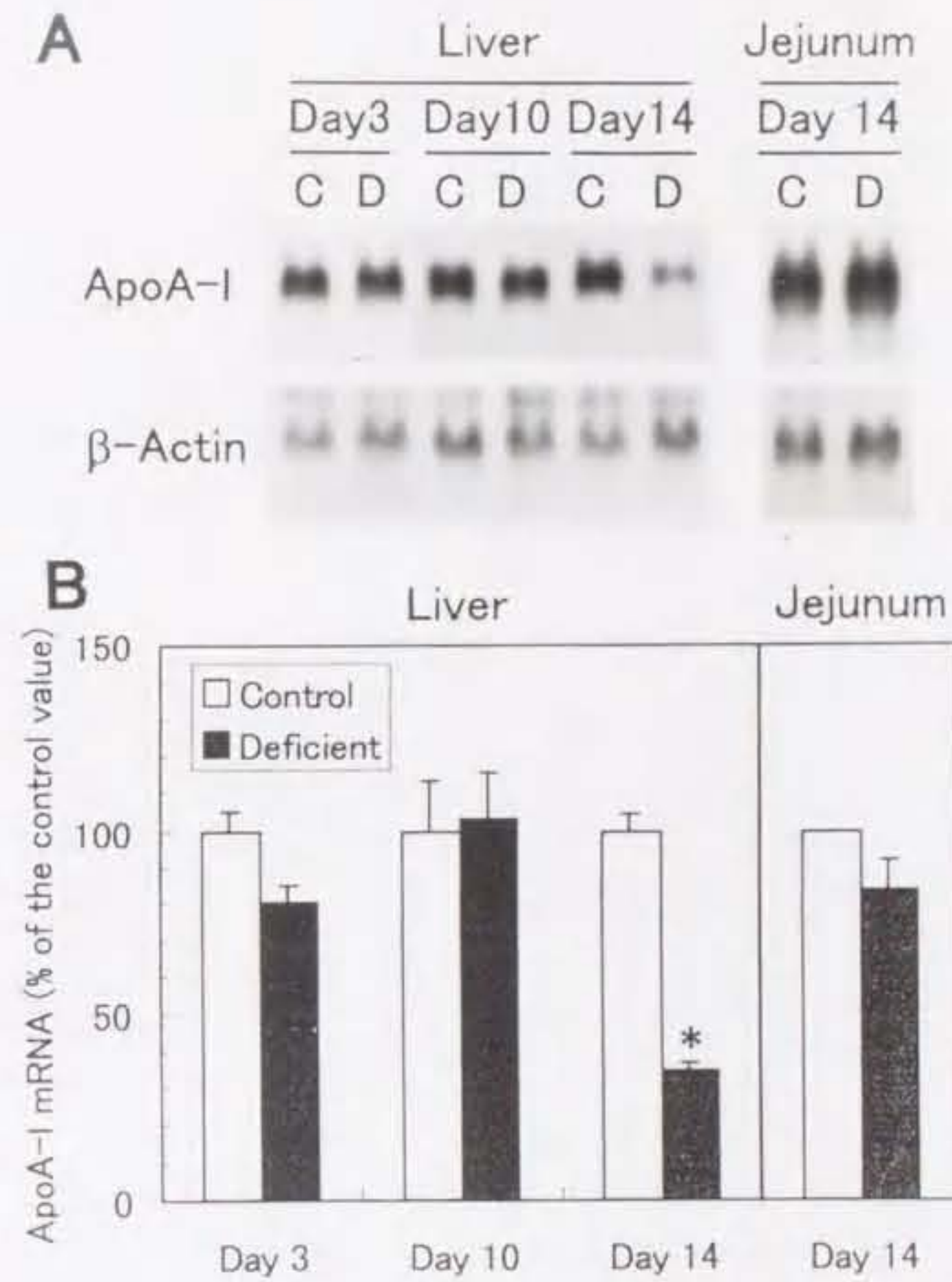
**Table 3** Serum cholesterol concentration and cholesterol concentration in serum lipoproteins of control and ascorbic acid-deficient group<sup>1</sup>

|                              | Control    | Deficient           |
|------------------------------|------------|---------------------|
|                              |            | <i>mmol/L serum</i> |
| Total cholesterol            | 21.9 ± 0.9 | 25.5 ± 0.3*         |
| VLDL cholesterol             | 1.2 ± 0.03 | 0.4 ± 0.1***        |
| LDL cholesterol              | 1.8 ± 0.1  | 3.2 ± 0.1***        |
| HDL <sub>1</sub> cholesterol | 5.6 ± 0.6  | 7.5 ± 0.5           |
| HDL <sub>2</sub> cholesterol | 6.5 ± 0.3  | 7.1 ± 0.9           |

<sup>1</sup>Value are means ± SEM for six rats. Means that are significantly different from controls are denoted: \*  $P < 0.05$ , *t*-test; \*\*\*  $P < 0.001$ , *t*-test.

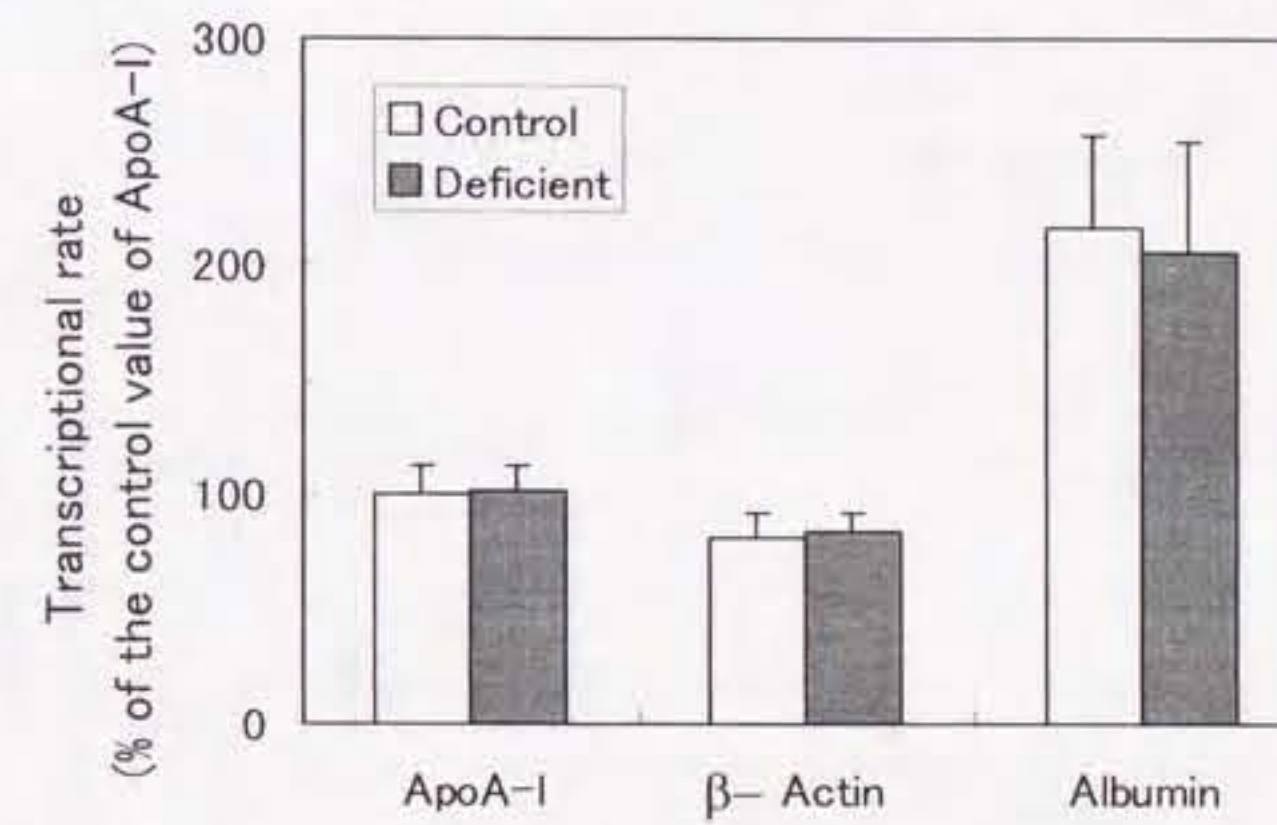


**Figure 3** Effect of ascorbic acid deficiency on the serum concentration of apolipoprotein A-I (ApoA-I) in control and ascorbic acid-deficient rats on d 3, 10 and 14. **A:** Immunoblot analysis of serum from rats of the control (C) and ascorbic acid-deficient (D) groups. Serum (0.1  $\mu$ L) from each rat was loaded and the immunoblot analysis was performed using anti-rat ApoA-I antiserum. **B:** Serum concentrations of ApoA-I calculated from the results of the immunoblot analysis. Bars indicate means, and the vertical line on the top of the bar indicates SEM ( $n = 3$  for d 3 and 10,  $n = 4$  for d 14). Values are presented as a percentage of the mean of each control value. \* Significantly different ( $P < 0.05$ ) from the control value.

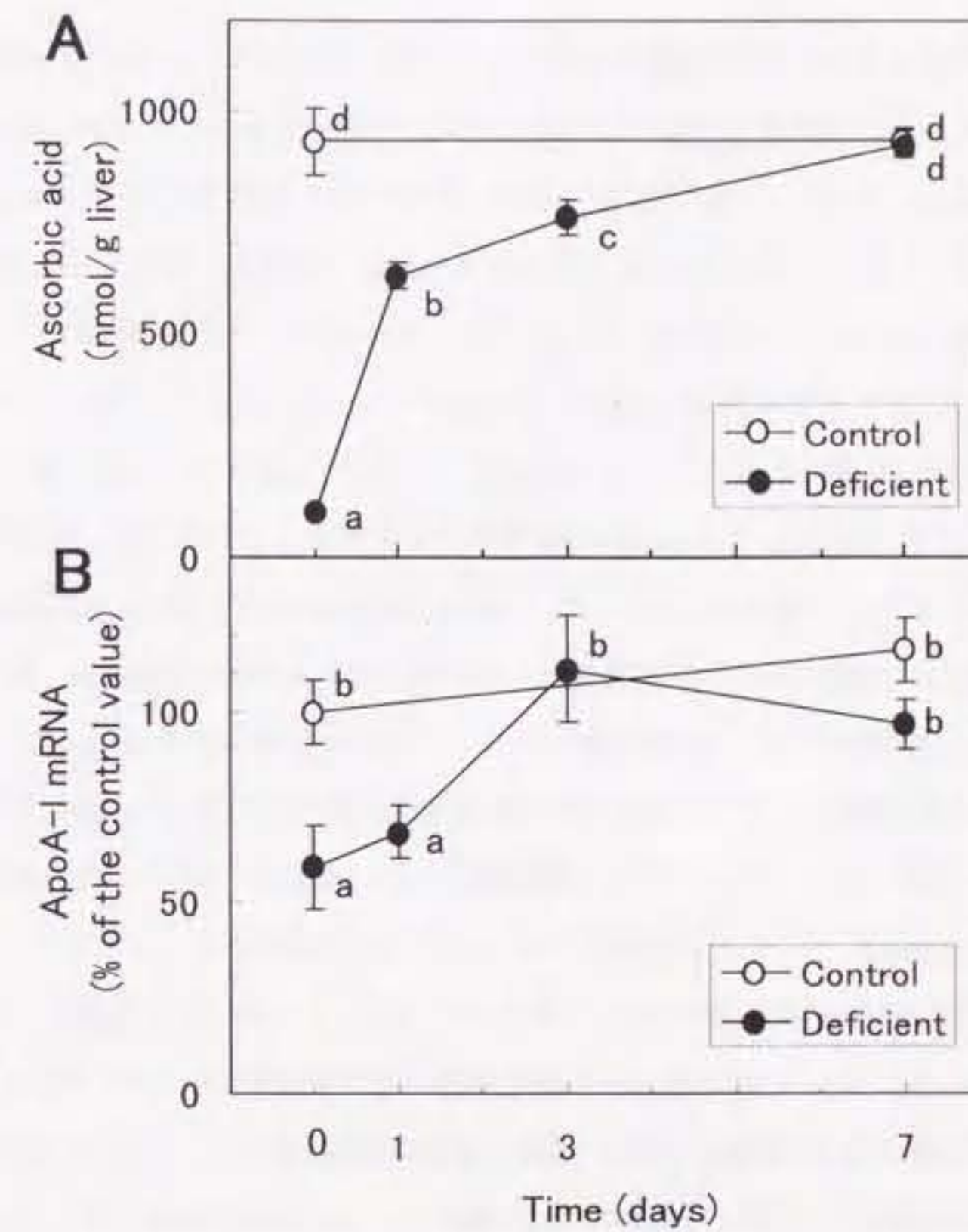


**Figure 4** Effect of ascorbic acid deficiency on the hepatic and jejunal levels of apolipoprotein A-I (ApoA-I) mRNA in control and ascorbic acid-deficient rats on d 3, 10 and 14. **A:** Northern blot analysis of total RNA from liver or jejunum of rats in the control (C) and ascorbic acid-deficient (D) groups. Total RNA (20  $\mu$ g) was isolated from liver and jejunum and separated on a 10 g/L agarose gel containing 66 g/L formaldehyde. RNA in the gel was transferred to a Hybond *N*<sup>+</sup> membrane and hybridized with <sup>32</sup>P-labeled ApoA-I cDNA or <sup>32</sup>P-labeled  $\beta$ -actin cDNA. **B:** The hepatic and jejunal level of ApoA-I mRNA relative to  $\beta$ -actin mRNA calculated from the results of the Northern blot analysis. Bars indicate means, and the vertical line on the top of the bar indicates  $\pm$ SEM (n = 3 for d 3 and 10, n = 4 for d 14). Values are presented as a percentage of the mean of each control value. \* Significantly different ( $P < 0.05$ ) from the control value.





**Figure 5** Transcriptional rates of apolipoprotein A-I (ApoA-I),  $\beta$ -actin and albumin genes in liver of control and ascorbic acid-deficient rats on d 14. Bars indicate means, and the vertical line on the top of the bar indicates  $\pm$ SEM (n = 5). Values are presented as a percentage of the mean of each control value of ApoA-I gene. Results for the ascorbic acid-deficient rats did not significantly differ from the corresponding values for the control rats (Student's *t* test).



**Figure 6** Restoration of the hepatic concentration of ascorbic acid and the hepatic level of apolipoprotein A-I (ApoA-I) mRNA by the administration of ascorbic acid. Shown are time courses of the restoration of ascorbic acid concentration (**A**) and ApoA-I mRNA level relative to  $\beta$ -actin mRNA level (**B**) after injection of ascorbic acid into the ascorbic acid-deficient rats. Rats in the ascorbic acid-deficient group were injected with ascorbic acid (60 mg/kg body wt) intraperitoneally and fed the basal diet for the subsequent 7 d. Points indicate means, and the vertical line on each point indicates  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Points not sharing a common letter are significantly different ( $P < 0.05$ , Duncan's multiple range test).

## 考察

ODSラットにおいてアスコルビン酸欠乏により血中濃度が低下する27kDaタンパク質がApoA-Iではないかと考え、アスコルビン酸欠乏時のApoA-Iの血中濃度について調べたところ、欠乏群の血中ApoA-I濃度は対照群に比べて14日目まで有意に低下していた。ApoA-Iは肝臓と小腸で合成されるが、欠乏群の肝臓のApoA-I mRNAレベルは有意に低下しており、小腸のApoA-I mRNAレベルは変化していなかった。このことから、アスコルビン酸欠乏時には肝臓でのApoA-I mRNAレベルが低下することによって血中のApoA-I濃度が低下することが示唆された。また、アスコルビン酸欠乏による肝臓のApoA-I mRNAレベルの低下は転写速度の低下を伴っていなかった。すなわち、アスコルビン酸欠乏による肝臓のApoA-I mRNAレベルの低下は転写以降の段階で調節されていることが示された。さらに、14日目の欠乏群にアスコルビン酸を投与すると、低下していたApoA-I mRNAはアスコルビン酸濃度の上昇に遅れて回復したことから、肝臓のApoA-I mRNAレベルの回復にはアスコルビン酸濃度の上昇が必要であると考えられた。

血中のリポタンパク質は、肝臓と末梢組織間のコレステロール輸送をしており、動脈硬化症の発症と進展に関わっている。LDLは、末梢組織へとコレステロールを運び、HDLは末梢組織から肝臓へとコレステロールを運ぶコレステロールの逆輸送をしている(FieldingとFielding 1995, Fisherら、1989)。したがって、LDLコレステロールの増加は動脈硬化症の危険因子であり、逆にHDLコレステロールの増加はその危険を低下させるものの一つに数えられる。酸化修飾されたLDLがマクロファージによる貪食の対象になり、ひいては動脈硬化の発症につながるということが明らかになっている(Fogelmanら、1980)。アスコルビン酸はその抗酸化能によって血中でのLDLの酸化修飾を抑えることが期待されており、実際に*in vitro*では生理的な濃度のアスコルビン酸がLDLの酸化を抑制することが報告されている(Jialalら、1990, JialalとGrundy、1991)。しかし、個体レベルにおけるアスコルビン酸摂取とコレステロール代謝との関係はまだ不明な点が多い。

本研究では、ODSラットを用いて14日目の対照群とアスコルビン酸欠乏群の血清を超遠心分離法により各リポタンパク質画分を分画し、各画分中のコレステロール濃度を測定した。その結果、14日間のアスコルビン酸欠乏によってLDLコレステロール濃度の上昇が観察された。この結果は、ODSラットを用いたUchidaら(1990)やHorioら(1987および1991)の報告に一致していた。ヒトにおいても血中のアスコルビン酸濃度がLDLコレステロール濃度と負の相関があり、HDLコレステロール濃度と正の相関があることが報告されている(Hallfrischら、1994, Toohyら、1996)。LDLコレステロール濃度の上昇は動脈硬化発症の危険因子であることから、アスコルビン

酸欠乏は動脈硬化の危険因子の一つと考えられる。また、本研究において、HDL<sub>1</sub> および HDL<sub>2</sub> 中 ApoA-I 濃度を測定したところ、アスコルビン酸欠乏群で低下傾向が見られた。しかし、両画分のコレステロール濃度は変化していなかったことから、アスコルビン酸欠乏時には ApoA-I 含量の低い HDL 粒子ができていている可能性が考えられる。

さらに今回、アスコルビン酸欠乏によって抗動脈硬化作用をもつ ApoA-I mRNA レベルが低下することを見だし、アスコルビン酸が遺伝子の発現を制御することによってコレステロール代謝を変動させる可能性を示した。アスコルビン酸がどのような機構で肝臓の ApoA-I の発現を制御しているのかについては現在明らかではないが、アスコルビン酸の作用は ApoA-I 遺伝子の転写以降にあると考えられる。アスコルビン酸欠乏群の肝臓のアスコルビン酸濃度は、3 日目には有意に低下していたが、肝臓の ApoA-I mRNA レベルが低下したのは 14 日目であり、その間にはかなりの時間的な開きがある。このことから、肝臓の ApoA-I mRNA レベルがアスコルビン酸の濃度に直接制御される可能性と、というよりは、何らかの仲介因子が存在している可能性との両方が存在すると考えられる。

### 第3節 アスコルビン酸欠乏による腎臓脂肪酸結合タンパク質濃度の低下とその機構

#### 目的

第1節において、ODS ラットのアスコルビン酸欠乏時には、血清の 27kDa タンパク質濃度が低下し、36kDa タンパク質濃度が上昇し、また腎臓細胞質の 17kDa タンパク質濃度が低下することを見いだした。そして、第2節では、アスコルビン酸欠乏時に血清の 27kDa タンパク質である ApoA-I の血中濃度が低下し、それは肝臓における ApoA-I mRNA レベルの低下によるものであることが示唆された。

本節では、腎臓の 17kDa タンパク質に着目し、その精製と同定を試みた。その結果、この 17kDa タンパク質は腎臓 FABP と推測され、その抗血清を用いた解析により腎臓中の濃度がアスコルビン酸欠乏により低下することを確認した。そして、その前駆体である  $\alpha_{2u}$ -グロブリンの遺伝子発現に及ぼすアスコルビン酸欠乏の影響を調べた。

#### 実験材料と実験方法

##### 実験動物と飼育方法

Wistar ラットは、水と固形飼料(ノーサンラボ MR ストック、日本農産工)を自由摂取させた。ODS ラットおよび Wistar ラットは、10:00am から 11:00am の間に断頭により屠殺した。

##### 実験方法

雄 ODS ラット(体重 130g)は、アスコルビン酸を含まない飼料(基本食のアスコルビン酸を炭水化物で置き換えたもの)を与えた欠乏群と、基本食(アスコルビン酸 300mg/kg 添加、表 1)を与えた対照群の2群に分け、14 日間飼育した。欠乏群の飼料摂取量は実験開始後 12 日目からわずかに減少し始めるので、12 日目以降は欠乏群の摂取量を対照群に与えることにより両群の摂取量を同じにした。

ODS ラットおよび Wistar ラットを屠殺後、血液を 4℃で 1,500×g、10 分間遠心分離することにより血清を採取した。腎臓は PBS でホモジナイズ後 4℃で 12,000×g、15 分間遠心し、その上清をさらに 4℃で 100,000×g、60 分間遠心することによって細胞質画分をえた。ODS ラットから採取した肝臓、腎臓、副腎、小腸、脾臓、精巣、心臓、肺、脳の各組織は、採取後すぐに液体窒素で凍結させ -80℃で保存し、アスコルビン酸濃度の測定および RNA 抽出に用いた。尿は 13 日目から 14 日目にかけ、24 時間尿を採取した。

### 17kDa タンパク質の精製とアミノ末端アミノ酸配列の決定

腎臓の細胞質画分を、0.02 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)溶液で透析後、HPLC イオン交換カラム (TSK gel DEAE-5PW, 7.5 mm×7.5 cm, 東ソー、東京)で分画した。ゼロから0.5 mol/Lの塩化ナトリウムの濃度勾配を設定し、溶出速度 1.0 mL/min, 30 分間でタンパク質を溶出した。溶出液の 280 nm の吸光度を経時的に測定した。17 kDa タンパク質を含むフラクションの SDS-PAGE を行い、Semi-dry electrophoretic transfer cell (日本バイオラッド、東京)を用いて PVDF 膜 (Immobilon™ transfer membrane, 日本ミリポア、東京)に電氣的にタンパク質を転写した。PVDF 膜上の 17kDa タンパク質のアミノ末端のアミノ酸配列の決定には、気相エドマン分析装置 (470/120/900, アブライト バイオシステムズ、パーキンエルマー株式会社、千葉)を用いた。

### 抗 $\alpha_{2u}$ -グロブリン抗血清の作製

雄ラットの尿(約 60 ml)を 0.02 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)溶液で透析後、尿中のタンパク質を上記と同様に HPLC イオン交換カラム (TSK gel DEAE-5PW, 7.5 mm×7.5 cm, 東ソー、東京)で分画した。さらに、 $\alpha_{2u}$ -グロブリンが含まれるフラクションを Sephadex G-75 (ファルマシアバイオテック、東京)を用いてゲル濾過し、 $\alpha_{2u}$ -グロブリンを単一バンドとして含むフラクションを凍結乾燥して、抗血清作製のための抗原とした。

$\alpha_{2u}$ -グロブリン(約 0.5 mg)を PBS 0.75 mL に溶解し、等量のフロイント完全アジュバント (和光純薬、大阪)を加えてエマルジョンにした。エマルジョンは雌ニュージーランド白ウサギ (日本クレア (株)、東京)に皮下注射し、その三週間後に同様の追加免疫を行った。追加免疫の一週間後にウサギの耳から採血し、得た抗血清を腎臓 FABP と  $\alpha_{2u}$ -グロブリンのレベルの測定に用いた。

### イムノプロット解析

腎臓の細胞質画分(腎臓 6.25  $\mu$ g に相当)、血清 (1  $\mu$ L) および尿の SDS-PAGE を行い、Semi-dry electrophoretic transfer cell (日本バイオラッド、東京)によりゲル中に含まれるタンパク質を PVDF 膜 (Immobilon™ transfer membrane, 日本ミリポア、東京)に転写した。膜は3%のスキムミルクを含む PBS で 1.5 時間ブロッキングした後、抗ラット  $\alpha_{2u}$ -グロブリン抗血清を 500 倍希釈した溶液に 2 時間浸した。その後、膜を 0.5 g/L Tween-20 を含む PBS で 2 回洗浄し、 $^{125}$ I 標識抗ウサギ免疫グロブリン (アマシャム、東京)を 1000 倍希釈したものに 1.5 時間浸し、2 回洗浄した。洗浄後の膜は、オートラジオグラフィによりバンドの検出を行い、放射活性の定量には Bioimage Analyzer System (BAS 2000II、富士写真フイルム、神奈川)を用いた。なお、尿中の  $\alpha_{2u}$ -グロブリン量は 100 g 体重あたりの一日排泄量として表した。

### cDNA クローン

ラット  $\alpha_{2u}$ -グロブリン cDNA (Unterman ら、1981)は、逆転写 PCR (RT-PCR) 法により合成した。 $\alpha_{2u}$ -グロブリン合成のための上流と下流のプライマーとして、それぞれ 5' - CCGGATCCATGGAAGAAG - 3' (ヌクレオチド -11 から 7)と 5' - ATGCTCGAGTCCTGGTGA - 3' (ヌクレオチド 527 から 544 に相補的な配列)を用いた。雄のラットの肝臓から採取した poly (A)<sup>+</sup> RNA 1  $\mu$ g を、下流プライマー 0.25  $\mu$ g、20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、200 U M-MLV reverse transcriptase (*SUPERSCRIPT™II*, GIBCO BRL, LIFE TECHNOLOGIES, 東京)、0.5 mmol/L dNTP、0.01 mmol/L dithiothreitol を含む 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.3) で、反応容量 20  $\mu$ L、42°C、2 時間インキュベーションした。合成した cDNA を、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) のための 2 種類のプライマー (各 0.1  $\mu$ mol)とともに PCR 反応溶液に加え、反応容量 100  $\mu$ L で PCR を行った。反応生成物 (555bp) の DNA 配列は、ダイデオキシ法 (Sanger ら、1977)によりシーケンス解析を行い、その配列がラット  $\alpha_{2u}$ -グロブリン cDNA であることを確認した。

ラットのアポリポタンパク質 E (ApoE) cDNA (McLean ら、1983)は、Gladstone Foundation Laboratories (サンフランシスコ)の J. M. Taylor 氏からいただいた。

#### 血清のテストステロン濃度の測定

血清のテストステロン濃度は、放射性免疫検定法キット(テストステロン栄研、栄研科学、東京)により測定した。

#### 血清のコルチコステロン濃度の測定

血清のコルチコステロン濃度は、蛍光法により測定した(Gibbs 1970, Silber ら、1958)。

#### 統計処理

値はすべて平均値±標準誤差で表した。群間で分散が等しい場合には、対照群と欠乏群の平均値の比較に、Student's *t*-test を用いた。群間で分散が等しくない場合には、平均値の比較にウェルチの検定(Aspin 1949, Trickett ら、1956)を用いた。有意差の判定は、*P*値が 0.05 以下とした。

## 結果

#### 対照群とアスコルビン酸欠乏群の体重と組織のアスコルビン酸濃度

対照群とアスコルビン酸欠乏群の初体重および最終体重と、14 日目の腎臓および肝臓中のアスコルビン酸濃度を表 4 に示した。最終体重は両群の間で差はなかった。14 日目の腎臓および肝臓のアスコルビン酸濃度は、対照群に比べて欠乏群で有意に低下していた。

#### 17kDa タンパク質の腎臓脂肪酸結合タンパク質としての同定

アスコルビン酸欠乏により減少する腎臓細胞質画分の 17kDa タンパク質を同定するために、HPLC イオン交換カラムを用いてこのタンパク質の精製を試みた。このときの 280nm の吸光度の溶出パターンと、17kDa タンパク質を含む画分 14-16 番の SDS-PAGE の結果を図 7A と図 7B に示した。

画分 14 の 17kDa タンパク質のバンドを SDS-PAGE の後、PVDF 膜に移し、このタンパク質のアミノ末端からのアミノ酸配列を気相エドマン分析装置で解析した。その結果、アミノ末端から 16 アミノ酸残基の配列を決定した(図 8)。この 16 アミノ酸の配列をデータベースで検索したところ、この配列はラットの腎臓 FABP のアミノ末端の 16 アミノ酸と一致することが明らかになった。

#### アスコルビン酸欠乏による腎臓脂肪酸結合タンパク質レベルの低下

腎臓 FABP は、腎臓で生合成されるのではなく、前駆体タンパク質である $\alpha_{2u}$ -グロブリンとして成熟雄ラットの肝臓で合成される。しかし、幼若ラットや雌のラットではほとんど合成されないと報告されている(Ekstrom et al. 1984, Roy et al. 1983, Vandoren et al. 1983)。抗 $\alpha_{2u}$ -グロブリン抗血清を用いて、雄および雌の Wistar ラットの腎臓中の腎臓 FABP、尿中および血清中の $\alpha_{2u}$ -グロブリンをイムノブロットで検出した結果を図 9A に示した。既報のとおり、雌のラットの腎臓、尿および

血清において、腎臓 FABP と $\alpha_{2u}$ -グロブリンとは検出されなかった。一方、雄のラットでは、腎臓において腎臓 FABP (17kDa)と微量の $\alpha_{2u}$ -グロブリン (19kDa)が検出され、尿および血清では $\alpha_{2u}$ -グロブリン (19kDa)のみが検出された。

対照群とアスコルビン酸欠乏群の腎臓における腎臓 FABP レベルを、イムノブロット法で調べ (図 9B)、その定量結果を図 9Cに示した。アスコルビン酸欠乏群の腎臓 FABP レベルは、対照群に比べて53%に低下していた。

#### $\alpha_{2u}$ -グロブリンの血中および尿中レベルに対するアスコルビン酸欠乏の影響

対照群とアスコルビン酸欠乏群の $\alpha_{2u}$ -グロブリンの血中および尿中レベルを、イムノブロット法で調べた (図 10)。 $\alpha_{2u}$ -グロブリンの血中レベルは、3日目および10日目において両群の間に差は見られなかったが、14日目において対照群に比べてアスコルビン酸欠乏群で52%に低下していた。一方、13日目から14日目の尿中の $\alpha_{2u}$ -グロブリンレベルは、アスコルビン酸欠乏により変化しなかった。

#### アスコルビン酸欠乏による肝臓中の $\alpha_{2u}$ -グロブリン mRNA レベルの低下

雄 Wistar ラットの肝臓、腎臓、副腎、小腸、脾臓、精巣、心臓、肺、脳について、 $\alpha_{2u}$ -グロブリン mRNA の発現の組織特異性を調べた (図 11A)。その結果、 $\alpha_{2u}$ -グロブリン mRNA は肝臓のみに発現していた。対照群とアスコルビン酸欠乏群の肝臓での $\alpha_{2u}$ -グロブリン mRNA レベルを、ノーザンブロット法により調べた結果を、図 11Bに示した。3日目および10日目では、両群の $\alpha_{2u}$ -グロブリン mRNA レベルに差は見られなかったが、14日目において対照群に比べてアスコルビン酸欠乏群の $\alpha_{2u}$ -グロブリン mRNA レベルは70%に低下していた。一方、ApoE mRNA レベルは、アスコルビン酸欠乏により変化しなかった (図 11C)。

#### 対照群とアスコルビン酸欠乏群のテストステロン、コルチコステロン、クレアチニンおよび尿酸の血中濃度

14日目の対照群とアスコルビン酸欠乏群のテストステロン、コルチコステロン、クレアチニンおよび尿酸の血中濃度を、表 5 に示した。テストステロン濃度は、両群の間に変化がみられなかった。コルチコステロン濃度は、対照群に比べてアスコルビン酸欠乏群で4.6倍に上昇していた。クレアチニン濃度および尿酸濃度は、アスコルビン酸欠乏により変化しなかった。



**Table 4** *Body weights and renal and hepatic ascorbic acid concentrations on d 14 of control and ascorbic acid-deficient rats<sup>1</sup>*

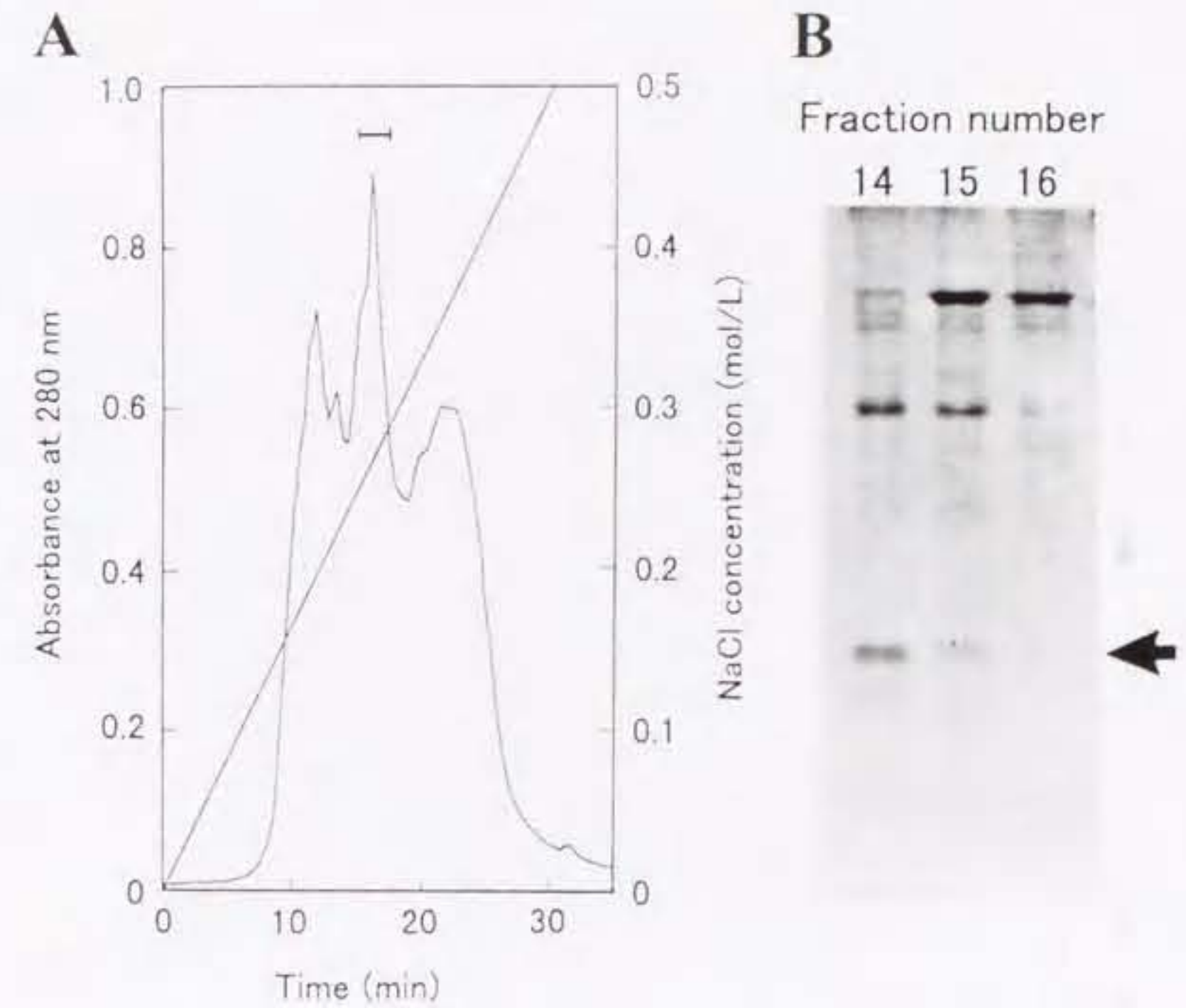
|                                     | Control  | Deficient            |
|-------------------------------------|----------|----------------------|
|                                     |          | <i>g</i>             |
| Initial body weight                 | 130 ± 5  | 125 ± 11             |
| Final body weight                   | 199 ± 7  | 183 ± 17             |
|                                     |          | <i>nmol/g tissue</i> |
| Ascorbic acid concentration on d 14 |          |                      |
| Kidney                              | 204 ± 23 | 9 ± 3 <sup>#</sup>   |
| Liver                               | 840 ± 51 | 102 ± 6 <sup>#</sup> |

<sup>1</sup> Values are mean ± SEM, n = 4. From d 12 to 14, the control rats were pair-fed the amount consumed by the ascorbic acid-deficient rats. <sup>#</sup> Significantly different (*P* < 0.05) from the control group by Welch's test.

**Table 5** *Serum concentrations of testosterone, corticosterone, creatinine and uric acid on d 14 of control and ascorbic acid-deficient rats<sup>1</sup>*

|                | Control     | Deficient           |
|----------------|-------------|---------------------|
|                |             | <i>pmol/L serum</i> |
| Testosterone   | 37.4 ± 6.9  | 50.9 ± 8.0          |
|                |             | <i>μmol/L serum</i> |
| Corticosterone | 0.16 ± 0.03 | 0.74 ± 0.04*        |
|                |             | <i>μmol/L serum</i> |
| Creatinine     | 28.6 ± 1.0  | 29.5 ± 0.5          |
| Uric acid      | 69.4 ± 2.7  | 84.3 ± 7.6          |

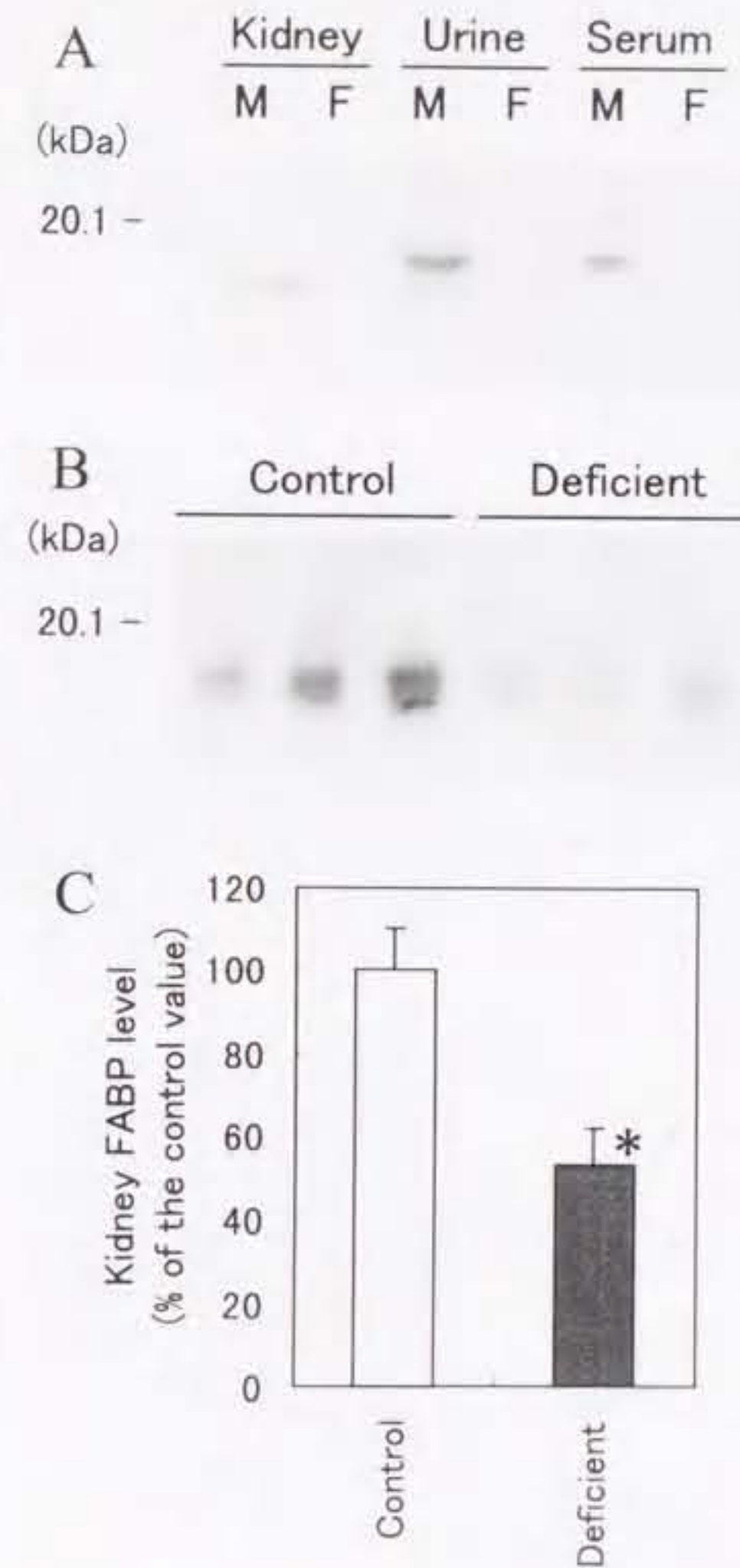
<sup>1</sup> Values are mean ± SEM, n = 4. From d 12 to 14, the control rats were pair-fed the amount consumed by the ascorbic acid-deficient rats. \* Significantly different (*P* < 0.05) from the control group by *t*-test.



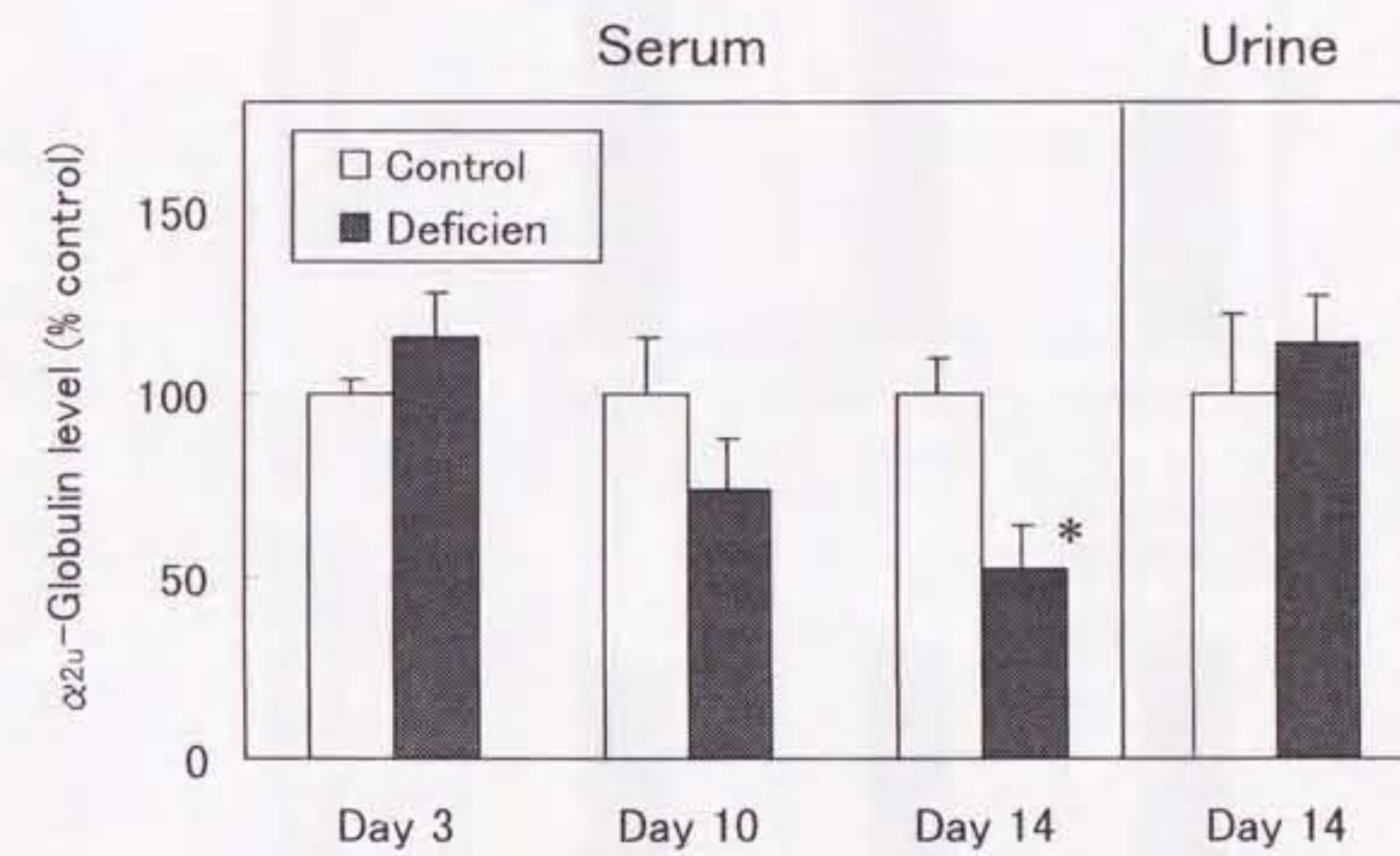
**Figure 7** Ion-exchange HPLC separation of renal cytosolic proteins of a male rat. A: The elution profile of the renal cytosolic proteins monitored by the absorbance at 280 nm. The renal cytosolic fraction was dialyzed against 0.02 mol/L Tris-HCl (pH 8.0). The dialysate containing approximately 4.5 mg of protein was applied to an HPLC ion-exchange column. A linear line indicates the concentration of NaCl in eluent. The eluted solution was collected by 1 mL aliquots, and the fractions 14 to 16 were used for SDS-PAGE analyses. The horizontal bar in the graph indicates the fractions 14 to 16. B: Results of SDS-PAGE analysis of fractions 14 to 16. The arrow indicates the 17 kDa protein.

|                         |                                  |    |    |
|-------------------------|----------------------------------|----|----|
| 17 kDa protein          | 1                                | 10 |    |
|                         | LDVAKLNGDWFSIVVA                 |    |    |
| Kidney FABP             | 1                                | 10 |    |
|                         | LDVAKLNGDWFSIVVASNKR...          |    |    |
| $\alpha_{2u}$ -Globulin | 1                                | 10 | 20 |
|                         | EEASSTEGNLDVAKLNGDWFSIVVASNKR... |    |    |

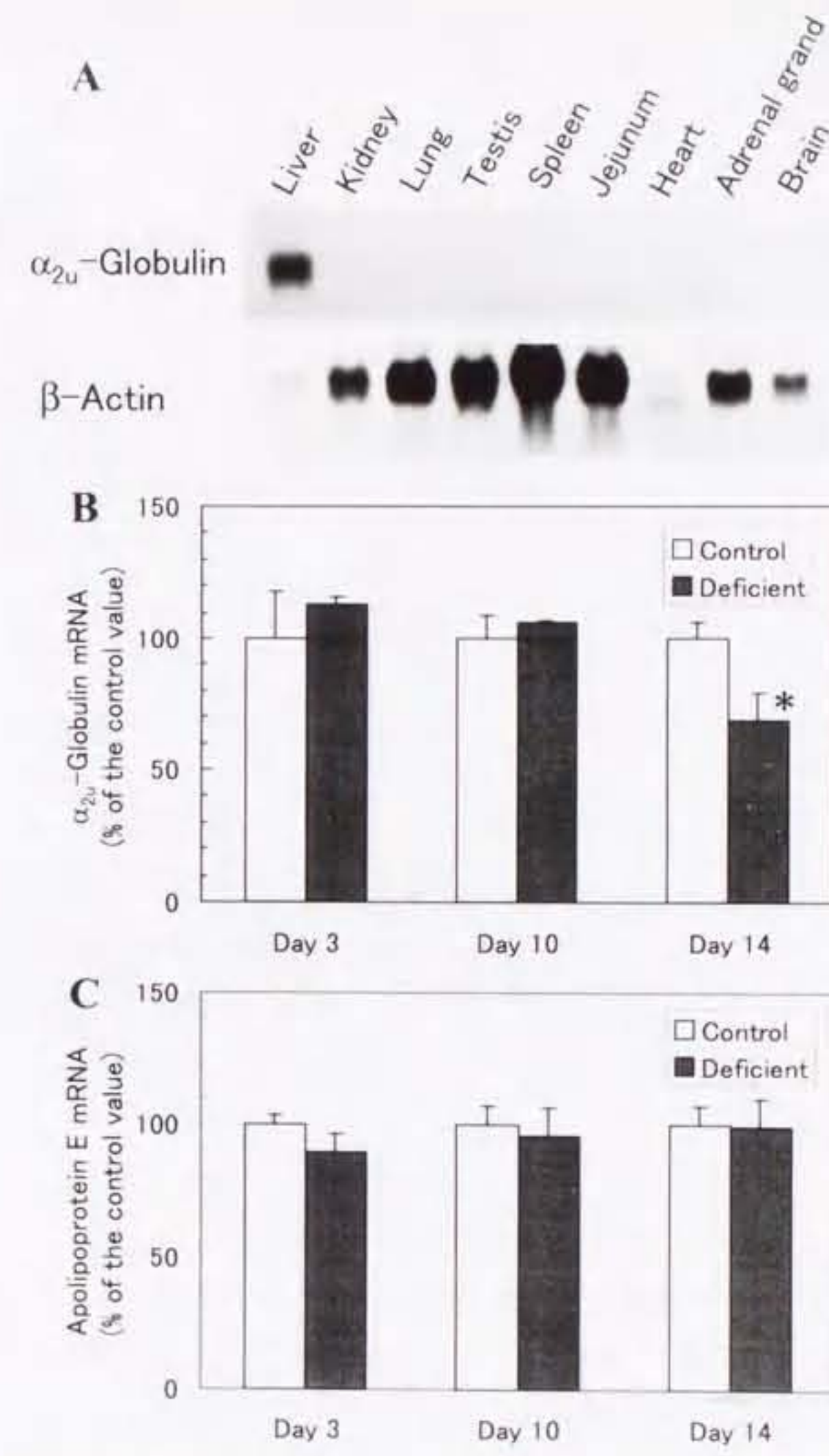
**Figure 8** Amino-terminal amino acid sequence of the 17 kDa protein. The sequences of kidney fatty acid-binding protein (FABP) and  $\alpha_{2u}$ -globulin proposed by Kimura et al. (1989) are presented for reference.



**Figure 9** Effect of ascorbic acid deficiency on the renal level of kidney fatty acid-binding protein (FABP) in the control and the ascorbic acid-deficient rats. **A:** Immunoblot analysis of renal cytosol, urine and serum of a male (M) and a female (F) Wistar rat. Urine was collected for 24 h. **B:** Immunoblot analysis of renal cytosol of three rats in the control group and the ascorbic acid-deficient group. Immunoblot analysis was performed using a rabbit anti-rat  $\alpha_2$ -globulin antiserum. **C:** The renal level of kidney FABP calculated from the results of immunoblot analysis. Bars indicate means, and the vertical line on the top of the bar indicates SEM ( $n = 3$ ). Values are presented as a percentage of the mean of each control value. \* Significantly different ( $P < 0.05$ ) from the value of the control group by Student's  $t$  test.



**Figure 10** Effect of ascorbic acid deficiency on the serum level of  $\alpha_{2u}$ -globulin and the amount of  $\alpha_{2u}$ -globulin excreted into urine. Urine was collected from d 13 to 14 from four rats of each group. Bars indicate means, and the vertical line on the top of the bar indicates SEM ( $n = 3$  for d 3 and 10,  $n = 4$  for d 14). Values are presented as a percentage of the mean of each control value.  
 \* Significantly different ( $P < 0.05$ ) from the value of the control group by Student's  $t$  test.



**Figure 11** Effect of ascorbic acid deficiency on the hepatic level of  $\alpha_{2u}$ -globulin mRNA in the control and the ascorbic acid-deficient rats. **A:** Northern-blot analysis of total RNA from liver and other tissues of a male rat. Total RNA (20  $\mu$ g) isolated from various tissues were separated on 10 g/L agarose gel containing 66 g/L formaldehyde. RNA in the gel was transferred to a Hybond N<sup>+</sup> membrane and hybridized with <sup>32</sup>P-labeled  $\alpha_{2u}$ -globulin cDNA or <sup>32</sup>P-labeled  $\beta$ -actin cDNA. **B:** The hepatic level of  $\alpha_{2u}$ -globulin mRNA in the control group and the ascorbic acid-deficient group. For quantifying the level, slot blot analyses were performed using 5  $\mu$ g of total RNA. Bars indicate means, and the vertical line on the top of the bar indicates SEM (n = 3 for d 3 and 10, n = 4 for d 14). Values are presented as a percentage of the mean of each control value. \* Significantly different ( $P < 0.05$ ) from the control group by Student's *t* test. **C:** The hepatic level of apolipoprotein E mRNA in the control and the ascorbic acid-deficient groups. For quantifying the level, slot blot analyses were performed using 5  $\mu$ g of total RNA. Bars indicate means, and the vertical line on the top of the bar indicates SEM (n = 3 for d 3 and 10, n = 4 for d 14). Values are presented as a percentage of the mean of each control value.

## 考察

$\alpha_{2u}$ -グロブリンは、疎水性のリガンドの輸送担体と想定される分子量約2万のタンパク質からなる  $\alpha_{2u}$ -グロブリンスーパーファミリーの一員である (Pevsner ら、1988)。 $\alpha_{2u}$ -グロブリンスーパーファミリーには、血清レチノール結合タンパク質やアポリポタンパク質 D などが含まれるが、これらのタンパク質とは異なり、 $\alpha_{2u}$ -グロブリンのリガンドは現在までに見つかっていない。

$\alpha_{2u}$ -グロブリンは、主に成熟雄ラットの肝臓で合成され、血中に分泌される。その後、急速に尿中に排泄されるが、その際、一部が腎臓の近位尿細管から再吸収されて、N 末端から 9 アミノ酸がとれて腎臓 FABP となって腎臓に存在する (Kimura ら、1991, Neuhaus 1986 と 1992)。FABP は、細胞内での脂肪酸の輸送に重要な役割をしていると考えられている (Veerkamp ら、1991 と 1992)。FABP には、liver type、intestine type、heart type、adipocyte type、myelin type の5種類のサブタイプが存在する。しかし、腎臓 FABP は、オレイン酸への結合能を有することから FABP と命名されたが、これら5種類からなる FABP ファミリーとは構造的に異なるタイプの FABP である (Lam ら、1988)。

本研究の結果、14 日間のアスコルビン酸欠乏により、血中の  $\alpha_{2u}$ -グロブリン濃度と腎臓における腎臓 FABP レベルがともに低下したが、13 日目から 14 日目にかけての  $\alpha_{2u}$ -グロブリンの尿中排泄量はアスコルビン酸欠乏により変化しなかった (図 9C と 10)。この時の肝臓での  $\alpha_{2u}$ -グロブリン mRNA レベルは、アスコルビン酸欠乏により低下していた (図 11B)。

アスコルビン酸欠乏によって肝臓での  $\alpha_{2u}$ -グロブリンの生合成が減少することが示唆されたが、 $\alpha_{2u}$ -グロブリンの尿中排泄量が減少していなかったことから、アスコルビン酸欠乏が、腎臓での  $\alpha_{2u}$ -グロブリンの再吸収を抑制している可能性、あるいはその後の N 末端部分の 9 アミノ酸が切断されるのを抑制している可能性も考えられる。しかし、この時、血中のクレアチニン濃度および尿酸濃度がアスコルビン酸欠乏により変化しておらず、結果は示さなかったが、組織学的にもアスコルビン酸欠乏による腎臓の異常も観察されなかった。少なくとも、アスコルビン酸欠乏により腎機能が低下したために腎臓 FABP の再吸収以降の過程に異常が起きているとは考えにくい。また、ラットに腎臓の発癌物質である ferric nitrilotriacetate を腹腔内投与すると、腎臓中での  $\alpha_{2u}$ -グロブリンから腎臓 FABP への変換が正常に行われず  $\alpha_{2u}$ -グロブリンの腎臓中への蓄積が起こることが報告されている (Uchida ら、1995)。しかし、今回の腎臓 FABP のイムノブロット解析の結果を図 9B に示したが、アスコルビン酸欠乏時に 19kDa の  $\alpha_{2u}$ -グロブリンタンパク質レベルの上昇は観察されな

かった。このことから、腎臓での $\alpha_{2u}$ -グロブリンから腎臓 FABP の変換が、アスコルビン酸欠乏によって損なわれている可能性も少ないものと思われる。

以上の結果から、アスコルビン酸欠乏によって肝臓での $\alpha_{2u}$ -グロブリンの生合成量が減少したことが、腎臓における腎臓 FABP レベルの低下の主要な原因であると考えられる。

現在までに、様々なホルモンによる $\alpha_{2u}$ -グロブリン遺伝子の発現調節機構が調べられてきている。 $\alpha_{2u}$ -グロブリンの生合成は、アンドロゲン (Kurtz ら、1976, Song ら、1991)、グルココルチコイド (Addison と Kurtz 1989, Chan ら、1991)、成長ホルモン (Lynch ら、1982) などにより誘導され、エストロゲン (Kurtz ら、1976, Van Dijck と Verhoeven 1992) により抑制される。そこで、アスコルビン酸欠乏時の血中テストステロン濃度およびコルチコステロン濃度を測定したところ、血中テストステロン濃度はアスコルビン酸欠乏により変化せず、血中コルチコステロン濃度は逆にアスコルビン酸欠乏により上昇した (表 5)。この結果から、アスコルビン酸欠乏時に起こる肝臓での $\alpha_{2u}$ -グロブリン mRNA レベルの低下がこれらのホルモンの濃度変化によって起こっている可能性は少ないものと思われる。

## 第4節 アスコルビン酸欠乏による急性期タンパク質遺伝子の発現変動

### 目的

第2節において、アスコルビン酸欠乏により血中の ApoA-I 濃度が低下することを見だし、その時に小腸ではなく肝臓の ApoA-I mRNA レベルの低下が起こっていることを明らかにした。第3節では、アスコルビン酸欠乏により腎臓中の腎臓 FABP レベルが低下することを見だし、その前駆体タンパク質である $\alpha_{2u}$ -グロブリンの肝臓での mRNA レベルが低下することを示した。アスコルビン酸欠乏時に、どのようにして肝臓の ApoA-I と $\alpha_{2u}$ -グロブリンの mRNA レベルが低下するのかについては不明である。しかし、どちらのタンパク質も肝臓で生合成されて、血中へと放出される分泌タンパク質であり、アスコルビン酸欠乏は、肝臓の特定の遺伝子の発現を変化させる可能性が示された。

肝臓で合成される分泌タンパク質の中には、炎症時にその生合成が誘導または抑制され、その結果、それらの血中濃度が上昇または低下するタンパク質群があり、急性期タンパク質と総称される。実験的に急性期応答を起こさせる薬剤として LPS や turpentine が用いられるが、Lowell ら(1986)は、マウスに LPS を投与することにより肝臓の ApoA-I mRNA レベルが低下することを示した。また、Schreiber ら(1986)は、ラットに turpentine を投与することにより肝臓の $\alpha_{2u}$ -グロブリン mRNA レベルが低下することを示した。

そこで、アスコルビン酸欠乏時と急性期応答との間で肝臓の遺伝子発現の変化に類似点があるのではないかと考え、本節では、ラットの代表的な急性期タンパク質であるハプトグロビン、 $\alpha_1$  酸性糖タンパク質 (AGP)、ApoA-I およびアルブミンの mRNA レベルに対するアスコルビン酸欠乏の影響を経時的に調べた。第2章第1節で見いだしたアスコルビン酸欠乏によって濃度が上昇する 36 kDa の血清タンパク質の分子サイズがハプトグロビンのそれと一致することも、この作業仮説に至った理由の一つである。また、併せて急性期応答を引き起こす主要なメディエーターである IL-6 に着目し、その血中濃度についても調べた。



## 実験材料と実験方法

### 実験方法

雄 ODS ラット(体重 140g)は、アスコルビン酸を含まない精製飼料(基本食のアスコルビン酸を炭水化物で置き換えたもの)を与えた欠乏群と、基本食(アスコルビン酸 300mg/kg 添加、表 1)を与えた対照群の2群に分け、7、10、12、14 日間飼育した。欠乏群の飼料摂取量は実験開始後 12 日目からわずかに減少し始めるので、12 日目以降には欠乏群の摂取量を対照群に与えることにより両群の摂取量を同じにした。

雄 Wistar ラット(体重 200g)は、LPS 投与群と対照群の2群に分けた。午前 10 時に LPS 投与群には LPS (E. coli.; Sigma, 東京)を 1mg/kg 体重になるように腹腔内注射し、対照群には生理食塩水を腹腔内注射して、6 時間後および 48 時間後に屠殺した。

ODS ラットおよび Wistar ラットを屠殺後、血液を 4°C で 1,500 × g、10 分間遠心分離することにより血清を採取した。肝臓は、採取後すぐに液体窒素で凍結し、-80°C で保存してアスコルビン酸濃度の測定および RNA 抽出に用いた。

### 血清インターロイキン6濃度の測定

IL-6 依存性細胞株である B9 細胞(Aarden et al. 1987)は、北里大学の熊沢義雄先生に供与していただいた。血清 IL-6 濃度は、B9 細胞の増殖活性により測定した(Sharma ら、1992)。B9 細胞 2000 個を、 $5 \times 10^4$  units/L ペニシリン、50 mg/L ストレプトマイシン、 $5 \times 10^{-5}$  mol/L 2-メルカプトエタノール、10% 牛胎児血清を含む RPMI1640 培地で、希釈したラットの血清とともに培養した。72 時間培養後、生存細胞数を Cell Counting Kit (和光純薬、大阪)により測定した。標準試薬として用いたリコンビナントのヒト IL-6 (Yasueda ら、1990)は、味の素中央研究所の秋山由紀雄氏から供与していただいた。

### イムノブロット解析

ハプトグロビンおよび ApoA-I の検出には、血清 (0.1  $\mu$ L) を 10% ゲルを用いて SDS-PAGE を行い、Semi-dry electrophoretic transfer cell (日本バイオラッド、東京)によりゲル中のタンパク質を PVDF 膜 (Immobilon<sup>TM</sup> transfer membrane, 日本ミリポア、東京)に転写した。膜は3%のススキムミルクを含む PBS で 1.5 時間ブロッキングした後、抗ヒトハプトグロビン抗血清 (Cappel<sup>TM</sup> Product, Organon Teknika, Durham, NC)、あるいはウサギ抗ラット ApoA-I 抗血清 (第2章第2節)を 500 倍希釈した溶液に 2 時間浸した。その後、膜を 0.5 g/L Tween-20 を含む PBS で 2 回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗ヤギ免疫グロブリン G 抗体、あるいはペルオキシダーゼ標識抗ウサギ免疫グロブリン G 抗体を 1000 倍希釈したものに 1.5 時間浸し、2 回洗浄した。

アルブミンの検出には、血清 (0.01  $\mu$ L) を 10% ゲルを用いて SDS-PAGE を行い、PVDF 膜 (Immobilon<sup>TM</sup> transfer membrane, 日本ミリポア、東京)に転写した。膜は3%のススキムミルクを含む PBS で 1.5 時間ブロッキングした後、ペルオキシダーゼ標識抗ラットアルブミン抗体 (The Binding Site, Birmingham, UK) を 1000 倍希釈した溶液に 2 時間浸し、2 回洗浄した。

### cDNA クローン

ラット AGP cDNA (Ricca and Taylor 1981) は、RT-PCR 法により合成した。AGP cDNA 合成のための上流と下流のプライマーとして、それぞれ 5' - CCGAATTCGGCATGGCGCTGCACATGG - 3' (ヌクレオチド 26 から 52) と 5' - CCTAAGGATCCTTCTTGGTCTCC - 3' (ヌクレオチド 633 から 655 に相補的な配列)を用いた。雄のラットの肝臓から採取した RNA 10  $\mu$ g を、下流プライマー 0.25  $\mu$ g、20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、200 U M-MLV reverse transcriptase (SUPERSCRIPT<sup>TM</sup> II, GIBCO BRL, LIFE TECHNOLOGIES, 東京)、0.5 mmol/L dNTP、0.01 mmol/L dithiothreitol を含む 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.3) で、反応容量 20  $\mu$ L、42°C、2 時間インキュベーションした。合成した cDNA

を、PCRのための2種類のプライマー(各 0.1  $\mu\text{mol}$ )とともに PCR 反応溶液に加え、反応容量 100  $\mu\text{L}$  で PCR を行った。反応生成物(630bp)の DNA 配列は、ダイデオキシ法(Sanger ら、1977)によりシーケンス解析を行い、その配列がラット AGP cDNA であることを確認した。

#### 統計処理

値はすべて平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。群間で分散が等しい場合には、対照群と欠乏群の平均値の比較に、Student's *t*-test を用いた。群間で分散が等しくない場合には、平均値の比較にウェルチの検定(Aspin 1949, Trickett ら、1956)を用いた。有意差の判定は、*P* 値が 0.05 以下とした。

## 結果

### 体重、肝重量と肝臓のアスコルビン酸濃度

対照群とアスコルビン酸欠乏群の初体重および最終体重と、14 日目の肝重量および肝臓中のアスコルビン酸濃度を表 6 に示した。7 日目から 14 日目まで、両群の体重および肝重量に差はなかった。14 日目の肝臓のアスコルビン酸濃度は、対照群に比べて欠乏群で有意に低下していた。

### アスコルビン酸欠乏によるハプトグロビン、アポリポタンパク質 A-I およびアルブミンの血中レベルの変化

対照群およびアスコルビン酸欠乏群の、血清のハプトグロビン、ApoA-I およびアルブミンのレベルをイムノブロット解析により測定した(図 12)。血中のハプトグロビンレベルは、7 日目から 12 日目まで両群に差は見られなかったが、14 日目ではアスコルビン酸欠乏により上昇していた。血中の ApoA-I レベルは、7 日目から 12 日目まで両群に差は見られなかったが、14 日目ではアスコルビン酸欠乏により低下していた。血中のアルブミンレベルについても、ApoA-I レベルと同様に 14 日目においてアスコルビン酸欠乏により低下していた。

### アスコルビン酸欠乏によるハプトグロビン、 $\alpha_2$ -酸性糖タンパク質、アポリポタンパク質 A-I およびアルブミンの肝臓 mRNA レベルの変動

対照群とアスコルビン酸欠乏群の肝臓から RNA を抽出し、ハプトグロビン、AGP、ApoA-I およびアルブミンの肝臓での mRNA レベルをノーザンブロット解析により測定した(図 13)。図 13A に示したように、ApoE mRNA レベルは、実験期間中を通してアスコルビン酸欠乏により変化しなかったため、図 13B で mRNA レベルを定量化する際の内部標準に用いた。アスコルビン酸欠乏群のハプトグロビンおよび AGP の mRNA レベルは、ともに 12 日目から上昇し始め、14 日目にはそ

それぞれ対照群の 2.6 倍と 3.6 倍に上昇していた(図 13B)。また、14日目において、アスコルビン酸欠乏群の ApoA-I とアルブミンの mRNA レベルは、対照群の 68% と 71% に低下していた。

#### アスコルビン酸欠乏による血清インターロイキン6濃度の上昇

対照群とアスコルビン酸欠乏群の血中 IL-6 濃度を図 14 に示した。対照群の IL-6 濃度は7日目から14日目までほとんど変化していなかったが、アスコルビン酸欠乏群の IL-6 濃度は12日目から上昇し始め、14日目には対照群の4倍に上昇していた。

#### アスコルビン酸欠乏による血清コルチコステロン濃度の上昇

ラットの主要なグルココルチコイドであるコルチコステロンの血中濃度を測定した(図 15)。実験期間中、対照群の血中コルチコステロン濃度はほとんど変化していなかった。一方、アスコルビン酸欠乏群のコルチコステロン濃度は12日目から上昇し始め、14日目には対照群の 4.6 倍に上昇していた。

#### LPS 投与によるハプトグロビン、 $\alpha_1$ 酸性糖タンパク質、アポリポタンパク質 A-I およびアルブミンの肝臓 mRNA レベルの変動と、インターロイキン 6 およびコルチコステロンの血中濃度の上昇

LPS 投与後の Wistar ラットの肝臓から RNA を抽出し、ハプトグロビン、AGP、ApoA-I およびアルブミンの肝臓での mRNA レベルをノーザンブロット解析により測定した(図 16)。投与6時間後では、LPS 投与群で、ハプトグロビンおよび AGP の mRNA レベルがそれぞれ対照群の 3.9 倍と 7.2 倍に上昇し、ApoA-I mRNA レベルは両群で変化が見られず、アルブミンは LPS 投与群で対照群の 65% に低下していた。投与 48 時間後には、LPS 投与群の ApoA-I およびアルブミンの mRNA レベルはそれぞれ対照群の 69% と 59% に低下していた。

LPS 投与6時間後の血中の IL-6 濃度およびコルチコステロン濃度を表 7 に示した。対照群の IL-6 濃度はほとんど検出されなかったのに対し、LPS 投与群では顕著に上昇していた。また、血中コルチコステロン濃度は、対照群に比べて LPS 投与群で 6.2 倍に上昇していた。

Table 6 Body weights and hepatic concentration of ascorbic acid of control and ascorbic acid-deficient rats on d 7, 10, 12 and 14<sup>1</sup>

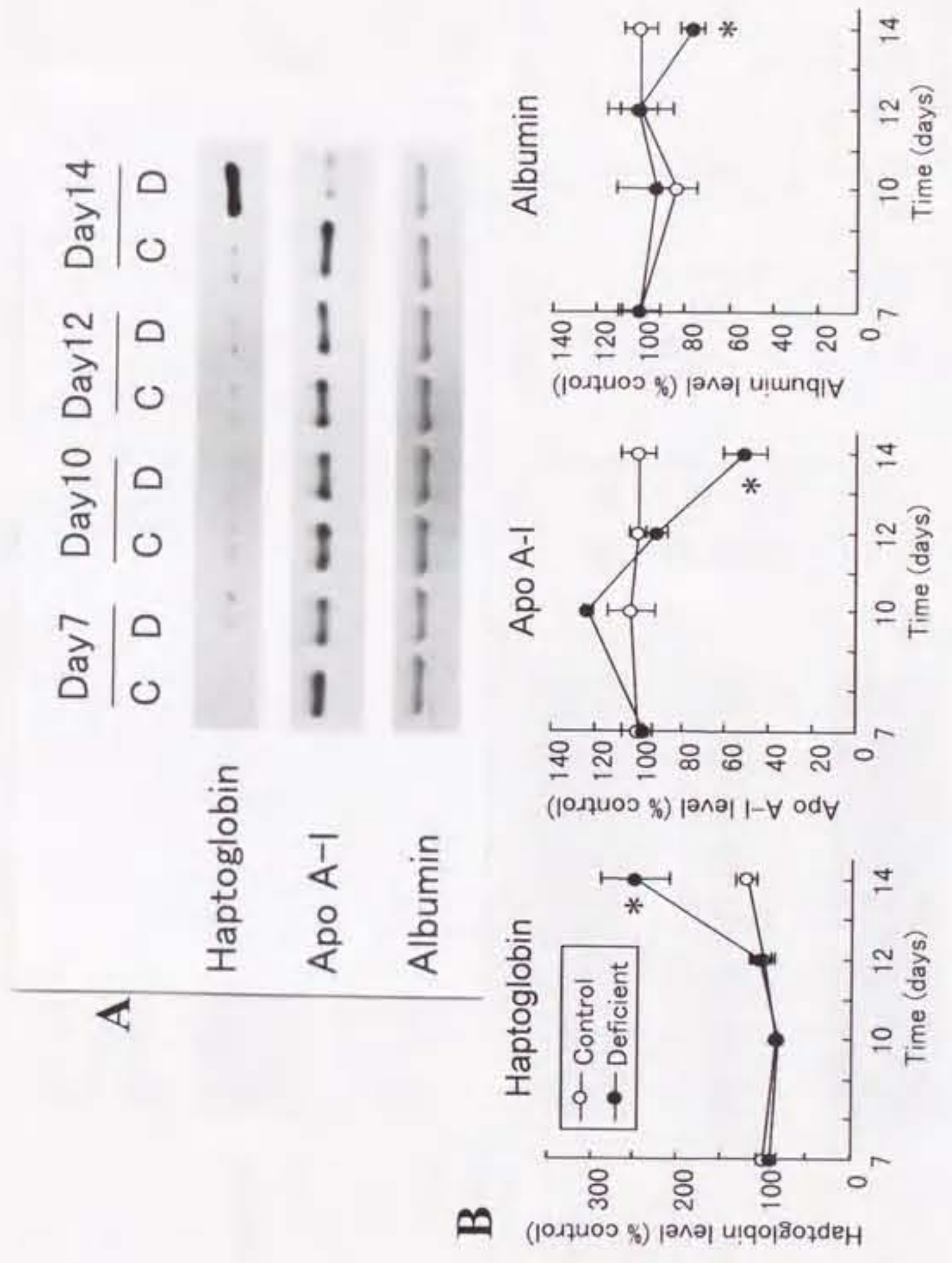
|                                 | Day 7      |             | Day 10     |             | Day 12     |            | Day 14     |            |
|---------------------------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
|                                 | Control    | Deficient   | Control    | Deficient   | Control    | Deficient  | Control    | Deficient  |
| Initial body wt, g              | 142 ± 6    | 142 ± 5     | 143 ± 3    | 142 ± 3     | 142 ± 3    | 142 ± 3    | 142 ± 2    | 143 ± 2    |
| Final body wt, g                | 189 ± 6    | 189 ± 5     | 209 ± 1    | 208 ± 4     | 215 ± 5    | 210 ± 3    | 216 ± 3    | 211 ± 2    |
| Relative liver wt, g/kg body wt | 55.9 ± 1.0 | 53.5 ± 1.8  | 51.9 ± 0.9 | 50.9 ± 1.5  | 52.0 ± 2.0 | 47.8 ± 1.0 | 41.2 ± 3.8 | 43.5 ± 0.8 |
| Hepatic ascorbic acid, nmol/g   | 909 ± 17   | 176 ± 17*** | 926 ± 45   | 136 ± 11### | 949 ± 57   | 119 ± 6### | 841 ± 51   | 102 ± 6### |

<sup>1</sup> Values are means ± SEM, n=4. From d12 to d14, the control group was pair-fed the amount consumed by the ascorbic acid-deficient group. Means that are significantly different from controls are denoted: \*\*\*  $P < 0.001$ , *t*-test; ###  $P < 0.001$ , Welch's test.

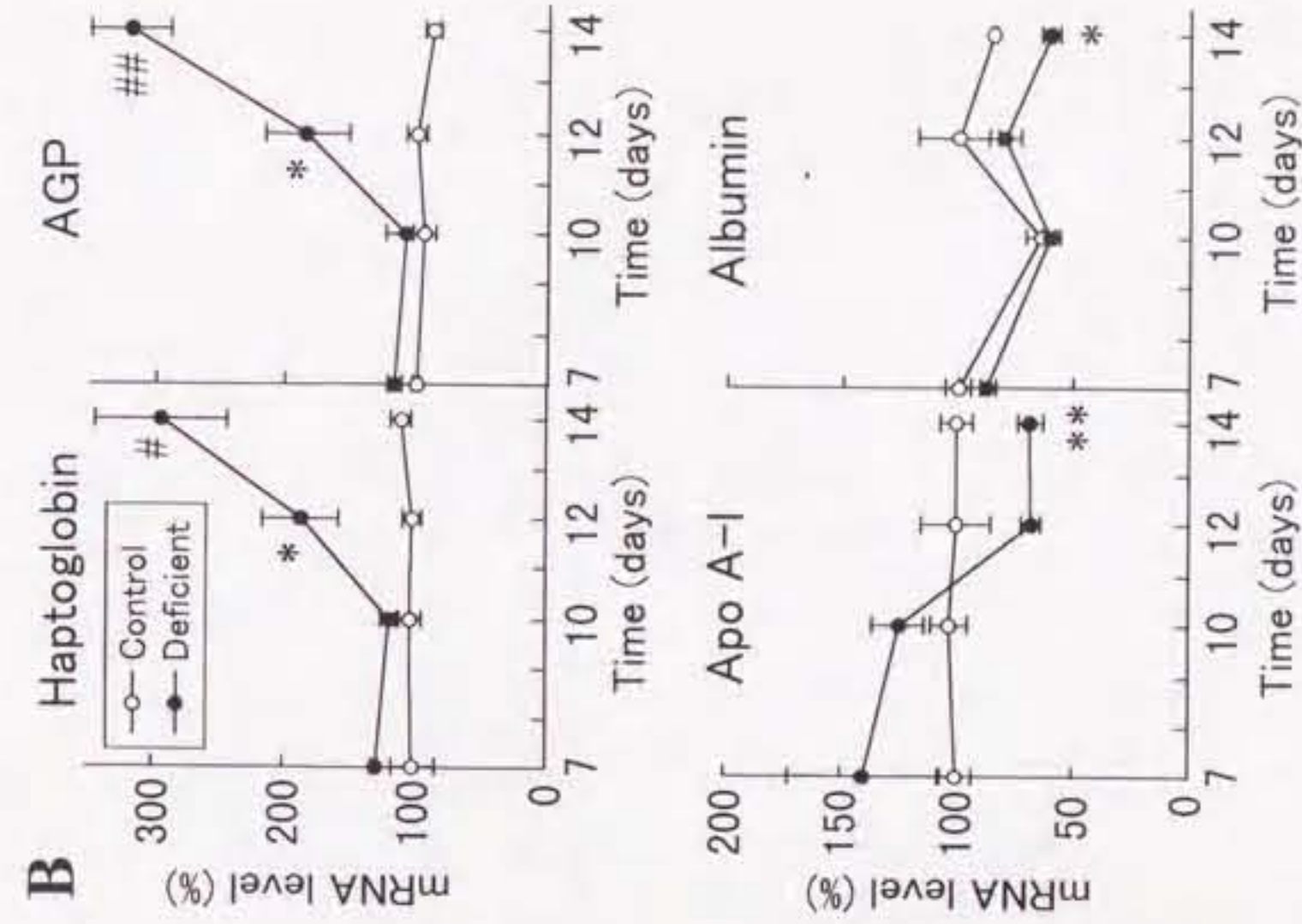
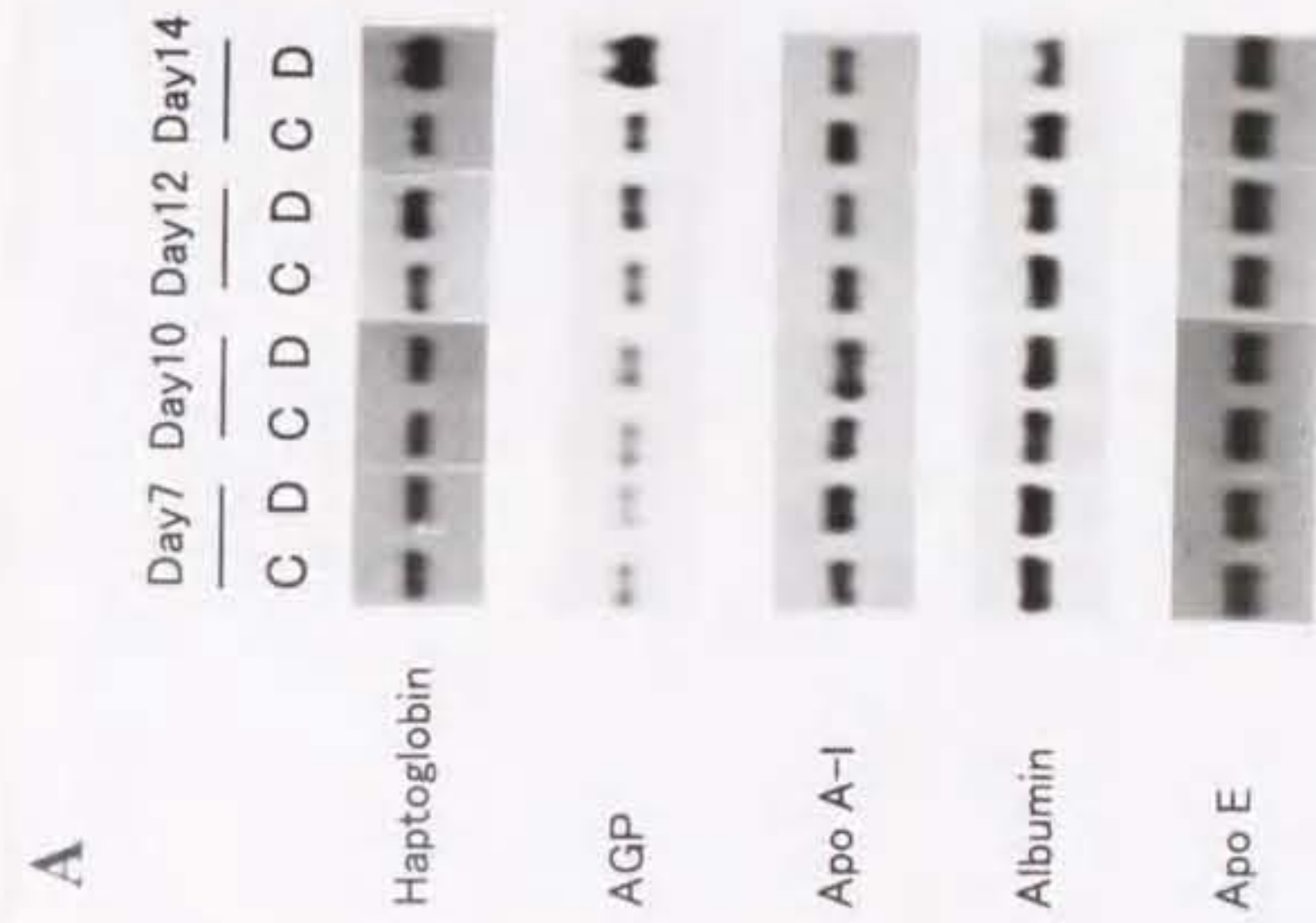
*Table 7 Serum concentrations of interleukin-6 (IL-6) and corticosterone of Wistar rats at 6 h after the intraperitoneal injection of saline or lipopolysaccharide (LPS).*

|                | Saline      | LPS                      |
|----------------|-------------|--------------------------|
| IL-6           | N.D.        | 2.97 ± 1.74              |
| Corticosterone | 0.24 ± 0.06 | 1.50 ± 0.31 <sup>#</sup> |

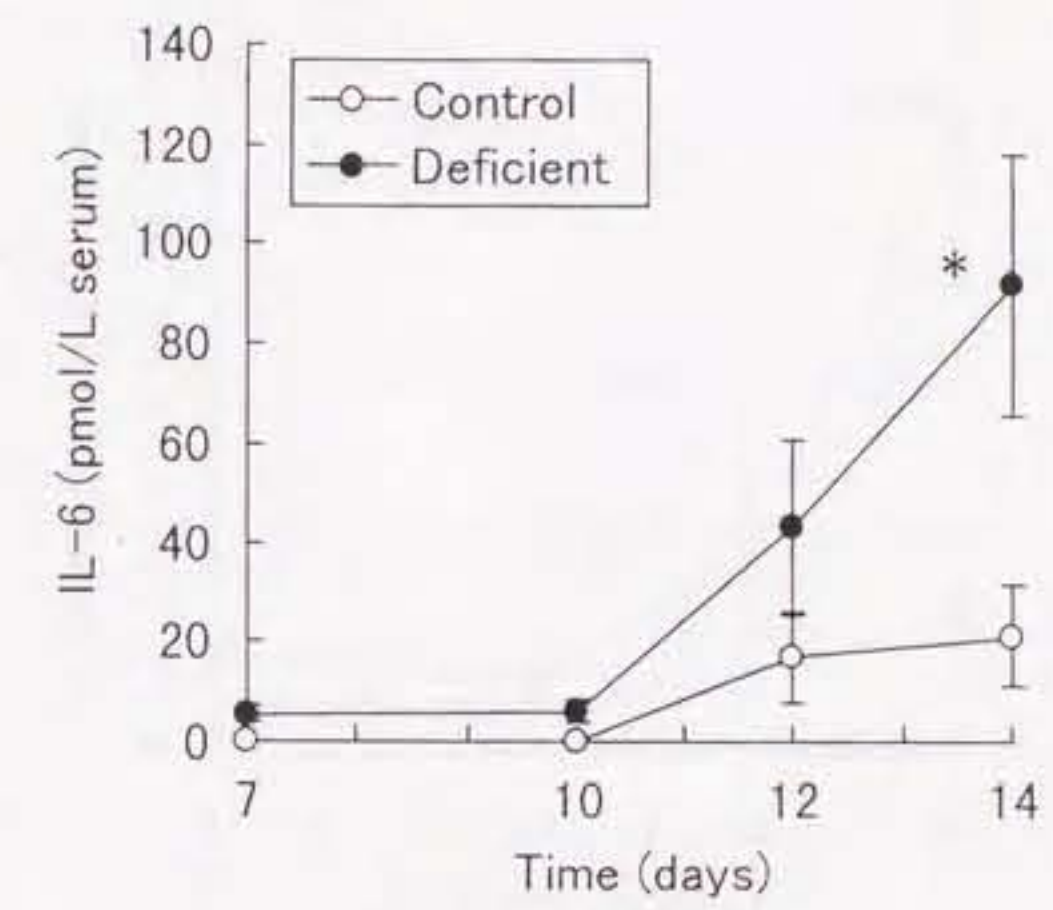
<sup>1</sup> Values are mean ± SEM, n = 3. <sup>#</sup> Significantly different ( $P < 0.05$ ) from the mean value of rats injected saline by Welch's test.



**Figure 12** Effect of ascorbic acid deficiency on serum concentrations of haptoglobin, apolipoprotein A-I (Apo A-I) and albumin in control and ascorbic acid-deficient rats on d 7, 10, 12 and 14. **A:** Immunoblot analyses of sera from rats in the control (C) and ascorbic acid-deficient (D) groups were performed as described in Materials and Methods. **B:** The serum concentrations of haptoglobin, Apo A-I and albumin of the control and the ascorbic acid-deficient groups. Points indicate means and the vertical line on each point indicates  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ), and values are presented as a percentage of the mean of each control group on d 7. \* Significantly different ( $P < 0.05$ ) from the control group by Student's *t* test.

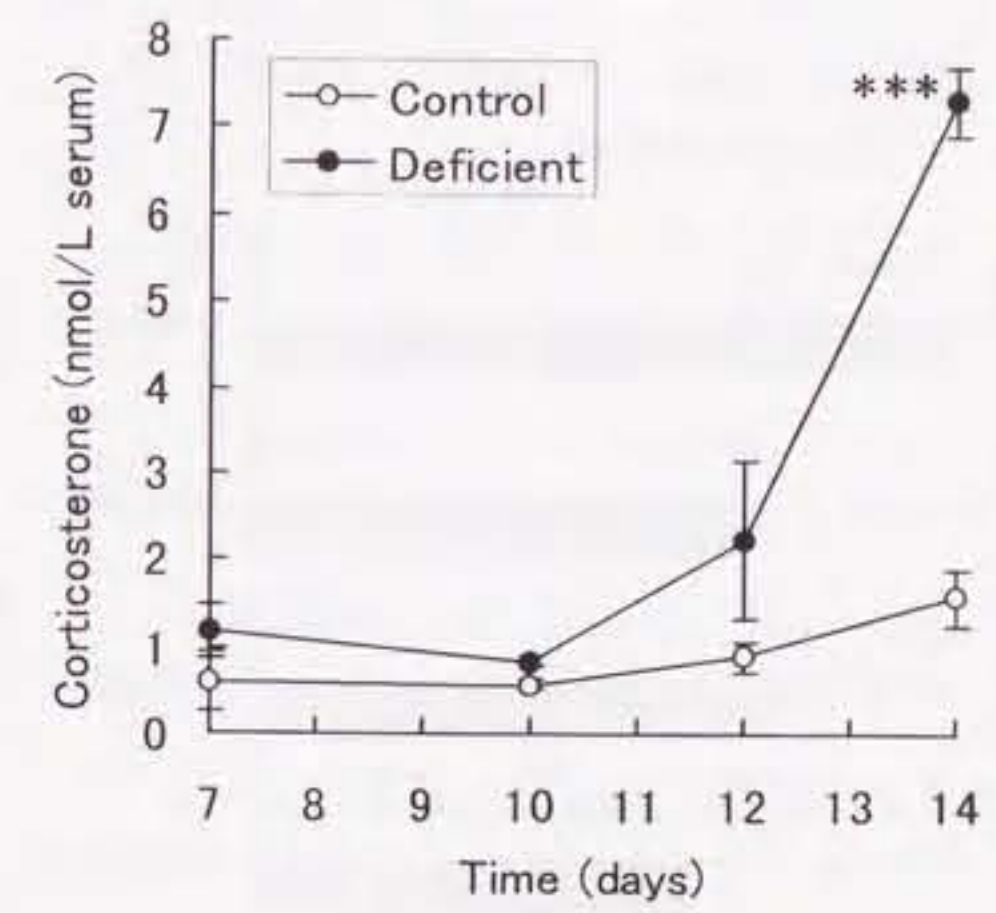


**Figure 13** Effect of ascorbic acid deficiency on hepatic mRNA levels of haptoglobin,  $\alpha_1$ -acid glycoprotein (AGP), apolipoprotein A-I (Apo A-I) and albumin in control and ascorbic acid-deficient rats on d 7, 10, 12 and 14. **A**: Northern-blot analyses of total RNA from liver of rats in the control (C) and the ascorbic acid-deficient (D) groups. Total RNA (20  $\mu$ g) isolated from liver was separated on a 10 g/L agarose gel containing 66 g/L formaldehyde. RNA in the gel was transferred to a *Hybond N<sup>+</sup>* membrane and hybridized with  $^{32}$ P-labeled cDNA of haptoglobin, AGP, Apo A-I, albumin or apolipoprotein E (Apo E). **B**: The hepatic mRNA levels of haptoglobin, AGP, Apo A-I and albumin of the control and the ascorbic acid-deficient groups. These four mRNA levels were normalized to the Apo E mRNA level. Points indicate means and the vertical line on each point indicates  $\pm$ SEM ( $n = 4$ ), and values are presented as a percentage of the mean of each control group on d 7. Means that are significantly different from the value of each control rat are denoted: \*  $P < 0.05$ , *t*-test; \*\*  $P < 0.01$ , *t*-test; #  $P < 0.05$ , Welch's test; ##  $P < 0.01$ , Welch's test.

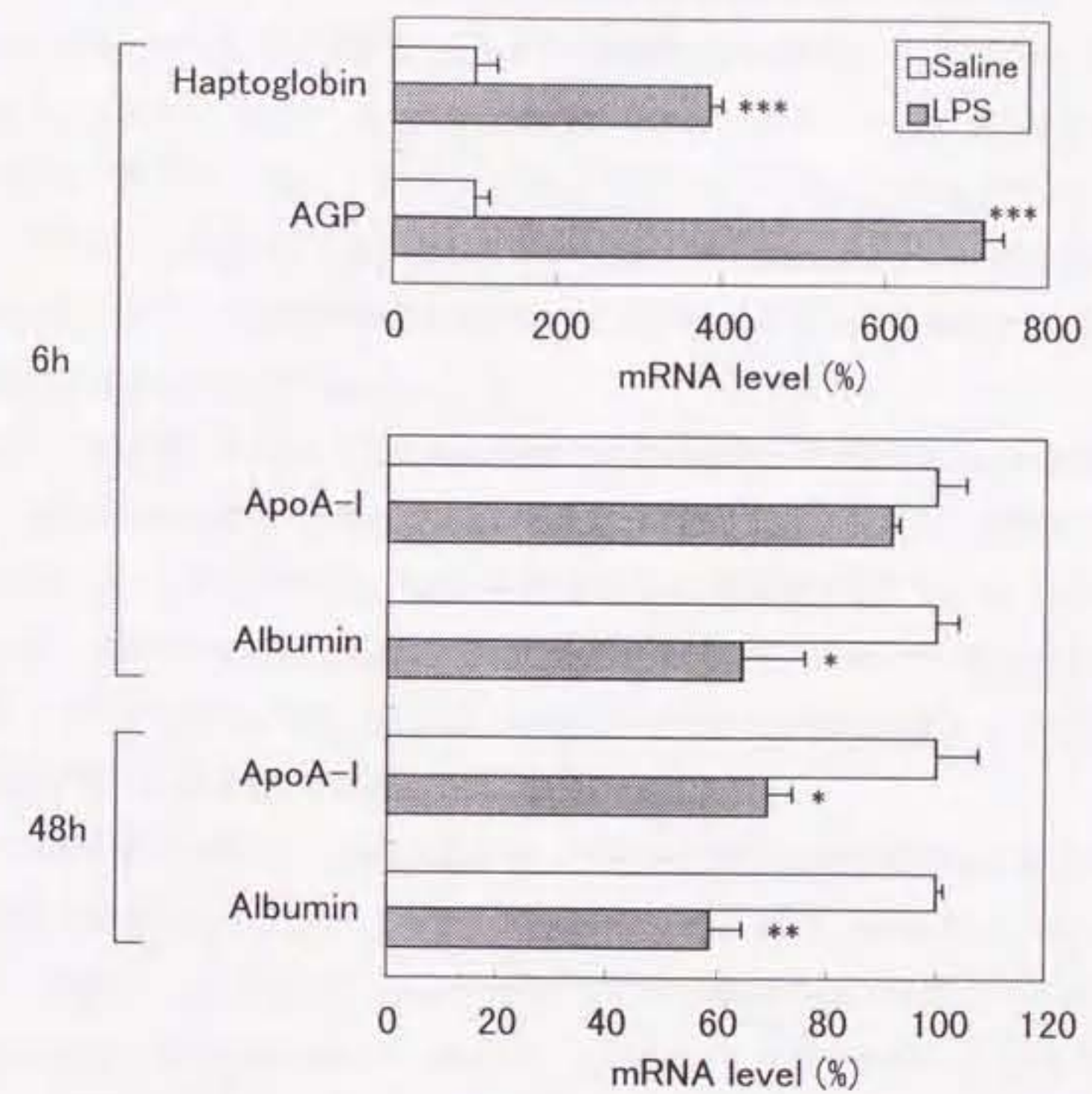


**Figure 14** Effect of ascorbic acid deficiency on serum concentration of interleukin-6 (IL-6) in control and ascorbic acid-deficient rats. The serum level of IL-6 was quantified by measuring its activity to proliferate B9. Points indicate means, and the vertical line on each point indicates  $\pm$ SEM ( $n = 4$ ). \* Significantly different ( $P < 0.05$ ) from the value of the control group at each time point by Student's  $t$  test.





**Figure 15** Effect of ascorbic acid deficiency on serum concentration of corticosterone in control and ascorbic acid-deficient rats. Points indicate means, and the vertical line on each point indicates  $\pm$ SEM (n = 4). \*\*\* Significantly different ( $P < 0.001$ ) from the value of the control group at each time point by Student's *t* test.



**Figure 16** The hepatic mRNA levels of haptoglobin,  $\alpha_1$ -acid glycoprotein (AGP), apolipoprotein A-I (ApoA-I) and albumin of Wistar rats at 6 h or 48 h after the injection of saline or lipopolysaccharide (LPS). These four mRNA levels were normalized by the apolipoprotein E mRNA level. Bar indicates means, and the horizontal line with the bar indicates SEM (n = 3). Values are presented as a percentage of the mean of each level of rats injected saline. Means that are significantly different from the value of the rats injected saline are denoted: \*  $P < 0.05$ , *t*-test; \*\*  $P < 0.01$ , *t*-test; \*\*\*  $P < 0.001$ , *t*-test.

## 考察

ハプトグロビンはヒトやラットにおける代表的な誘導型の急性期タンパク質であり(Kushner ら、1982)、一方、ApoA-I とアルブミンはその発現が抑制されるタイプの急性期タンパク質である(Morrone ら、1989)。第2節では、ApoA-I の肝臓での mRNA レベルが 14 日間のアスコルビン酸欠乏により低下し、血中の ApoA-I 濃度も低下することを見いだした。さらに本章では、ハプトグロビンの血中濃度が上昇し、アルブミンの血中濃度が低下することを見いだした。これらの急性期タンパク質の血中濃度の変化は、それぞれの肝臓における mRNA レベルの変動に起因しており、アスコルビン酸欠乏が肝臓での急性期タンパク質の遺伝子発現を変動させることにより、これらの血中濃度を変化させると考えられた。

AGP もヒトやラットにおける代表的な誘導型の急性期タンパク質である。本研究では、その血中濃度の変化を明らかにすることはできなかったが、肝臓での mRNA レベルがアスコルビン酸欠乏により上昇することを見いだした。なお、本研究では 6 週齢の ODS ラットを 14 日間のアスコルビン酸欠乏にさせているが、25 週齢の ODS ラットを 42 日間アスコルビン酸欠乏にさせた場合においても、ハプトグロビン、AGP、ApoA-I およびアルブミンの肝臓の mRNA レベルが 6 週齢の場合と全く同様に変動することを確認している(未発表)。

グラム陰性菌の外膜成分である LPS は、リポ A と呼ばれる脂質部分が宿主のマクロファージ系の細胞を活性化させることによって炎症性サイトカイン(TNF、IL-1、IL-6、インターロイキン-8、インターロイキン-10、インターフェロン- $\gamma$ など)や活性酸素の産生を増大させる(Rietschel ら、1994)。Lowell ら(1986)、および Sharma ら(1992)は、マウスやラットに LPS を投与すると、肝臓での AGP mRNA レベルが上昇し、ApoA-I およびアルブミンの mRNA レベルが低下することを報告している。また、Schreiber ら(1986)は、同じく炎症を引き起こす薬剤である turpentine をラットに投与することにより、肝臓でのハプトグロビンおよび AGP の mRNA レベルが上昇し、アルブミンの mRNA レベルが低下することを報告している。そこで、Wistar ラットに LPS を腹腔内投与したところ、肝臓でのハプトグロビンおよび AGP の mRNA レベルが明らかに上昇し、ApoA-I およびアルブミンの mRNA レベルが低下することを確認した。これらの結果を考え合わせると、急性期タンパク質の肝臓での発現という点から見ると、アスコルビン酸欠乏状態はある種の炎症と同じような変化が起きていると考えられる。

肝臓中のアスコルビン酸濃度は 7 日目ですでに著しく低下していたのに対して、ハプトグロビンおよび AGP の mRNA レベルの上昇と ApoA-I およびアルブミンの mRNA レベルの低下は、12 日目以前には観察されなかった。この時間的なずれは、アスコルビン酸欠乏が直接これらの遺伝

子発現を制御しているというよりは、何らかの仲介因子を介して制御している可能性が考えられる。炎症時には、IL-6, IL-1 および TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカイン遺伝子の発現が様々な組織で誘導されて急性期応答を引き起こす(Kushner ら、1982)が、急性期タンパク質遺伝子の発現誘導において中心的な役割を持つのは IL-6 である(Van Snick 1990)。また、炎症性サイトカインの放出に続いて、炎症性サイトカインの発現を抑制する抗炎症性のホルモンであるグルココルチコイドが副腎から血中に放出される。ハプトグロビン遺伝子の上流には2種類の IL-6 応答配列と、グルココルチコイド応答領域が存在し、培養系においてハプトグロビン遺伝子の発現は IL-1、IL-6 およびグルココルチコイドによって誘導されることが知られている(Marinkovic と Baumann 1990, Baumann 1990)。AGP 遺伝子もその上流に2種類の IL-6 応答配列、IL-1 応答領域およびグルココルチコイド応答配列を持ち、IL-1、IL-6 およびグルココルチコイドによりその発現が誘導されることが知られている(Won と Baumann 1990)。今回、Wistar ラットに LPS を腹腔内投与したところ、確かに血中の IL-6 濃度およびコルチコステロン濃度が上昇した。一方、ODS ラットにおいて、アスコルビン酸欠乏により血中のグルココルチコイド濃度が上昇することが知られており(Horio ら、1985)、実際に本章第3節において確認もしている。そこで、アスコルビン酸欠乏によるハプトグロビンおよび AGP の mRNA レベルの上昇に、グルココルチコイドや IL-6 が介在している可能性について検討するために、血中の IL-6 およびラットの主要なグルココルチコイドであるコルチコステロンの濃度を測定した。その結果、両者ともに 12 日目から上昇し始め、14 日目には対照群に対して欠乏群で有意に上昇していた。この事実から、アスコルビン酸欠乏時には IL-6 などの炎症性サイトカインやグルココルチコイドの産生誘導によって、肝臓での急性期タンパク質の発現が制御されている可能性が示唆された。このことも、アスコルビン酸欠乏が炎症状態に類似した状態を引き起こしていることを示している。

本章の結果から、アスコルビン酸欠乏時には血中の IL-6 濃度およびグルココルチコイド濃度が上昇し、肝臓での急性期タンパク質の発現が変動する可能性が示された。この研究を行っている間に、Winklhofer-Roob ら(1997)がヒトにおける興味ある報告をした。彼らは、肺の炎症性疾患である嚢胞性繊維症(cystic fibrosis)の患者において、血中のアスコルビン酸濃度と、IL-6 および AGP の血中濃度との相関を調べた。その結果、アスコルビン酸濃度と IL-6 および AGP の濃度には、有意な逆相関が存在することを示した。この事実は、本論文の研究が、ODS ラットやヒトというアスコルビン酸合成不能動物に共通したアスコルビン酸の生理機能を探究するための基礎的研究となることが示された。

## 第3章 アスコルビン酸欠乏による急性期タンパク質遺伝子の発現制御機構

---

### 第1節 アスコルビン酸欠乏による副腎でのインターロイキン6遺伝子の発現亢進

#### 目的

第2章第4節において、アスコルビン酸欠乏時には肝臓での急性期タンパク質の遺伝子発現が変動し、この時、グルココルチコイドと IL-6 の血中濃度が上昇することを示した。そこで本節では、アスコルビン酸欠乏時の IL-6 の血中濃度の上昇を引き起こしている臓器について解析することを目的とした。IL-6 は、単球およびマクロファージ、線維芽細胞、ケラチノサイト、内皮細胞、メサンギウム細胞、グリア細胞、軟骨細胞、T 細胞および B 細胞などの様々な細胞種で発現が見られる (Akira ら, 1990, Hirano ら, 1990, Van Snick 1990)。アスコルビン酸欠乏時に IL-6 の遺伝子発現を誘導する臓器あるいは細胞を特定するために、アスコルビン酸欠乏時の主要な組織における IL-6 mRNA レベルを調べた。また、IL-6 と並んで炎症時に誘導され、培養系において IL-6 の遺伝子発現を誘導する IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  の mRNA レベルについても調べた。

#### 実験材料と実験方法

##### 実験方法

雄 ODS ラット(体重 140g)は、アスコルビン酸を含まない精製飼料(基本食のアスコルビン酸を炭水化物で置き換えたもの)を与えた欠乏群と、基本食(アスコルビン酸 300 mg/kg 添加, 表 1)を与えた対照群の2群に分け、14 日間飼育した。欠乏群の飼料摂取量は実験開始後 12 日目からわずかに減少

し始めるので、12日目以降には欠乏群の摂取量を対照群に与えることにより両群の摂取量を同じにした。

断頭による屠殺後、血漿に等量の 30 g/L デキストランを含む 9 g/L 食塩水を加え、30 分間静置後上層を採り、それを 500×g、10 分間遠心分離することにより白血球を採取した。断頭後の腹腔内を氷冷の RPMI1640 培地 20mL で 2 回洗い、この洗浄液を 500×g、10 分間遠心分離して腹腔滲出細胞 (マクロファージを含む) を採取した。肝臓、腎臓、副腎、脾臓、肺、胸腺、心臓および小腸は、採取後すぐに液体窒素で凍結し、-80℃ で保存して RNA 抽出に用いた。

#### RT-PCR 法

白血球、腹腔内マクロファージおよび各組織からの RNA 抽出は、第 2 章第 2 節と同様に行った。ラットの白血球、腹腔内マクロファージおよび各組織から採取した RNA 1 μg を、oligo (dT)<sub>12-18</sub> (GIBCO BRL, LIFE TECHNOLOGIES, 東京) 0.5 μg、20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、200 U M-MLV reverse transcriptase (GIBCO BRL, LIFE TECHNOLOGIES, 東京)、0.5 mmol/L dNTP (GIBCO BRL, LIFE TECHNOLOGIES, 東京)、40 U RNase inhibitor (東洋紡、東京)、0.01 mmol/L dithiothreitol を含む 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.3) で、反応容量 21 μL、37℃、1 時間反応した。合成した cDNA を、PCR のための上流と下流のプライマー (各 0.1 μmol) とともに、PCR 反応溶液に加え、反応容量 50 μL で PCR を行った。

ラット IL-6 cDNA (Northemann ら、1989) 増幅のための上流と下流のプライマーとして、それぞれ 5' - CAAGAGACTTCCAGCCAGTTGC - 3' (ヌクレオチド 81 から 102) と 5' - TTGCCGAGTAGACCTCATAGTGACC - 3' (ヌクレオチド 670 から 694 に相補的な配列) を用いた。ラット IL-1β cDNA 増幅のための上流と下流のプライマーとして、それぞれ 5' - TGATGTTCCATTAGACAGC - 3' (ヌクレオチド 148 から 169) と 5' - GAGGTGCTGATGTACCAGTT - 3' (ヌクレオチド 400 から 420 に相補的な配列) を用いた。ラット TNF-α cDNA (Shirai ら、1989) 増幅のための上流と下流のプライマーとして、それぞれ 5' - TACTGAACCTCGGGGTGATTGGTCC - 3' (ヌクレオチド 955 から 979) と 5' - CAGCCTTGTCCTTGAAGAGAACC - 3' (ヌクレオチド 2157 から 2180 に相補的な配列) を用いた。ラット GAPDH cDNA (Tso ら、1985) 増幅のための上流と下流のプライマーとして、それぞれ 5' - GTATGTCGTGGAGTCTACTGGCG - 3' (ヌクレオチド 273 から 295) と 5' - GATACATTGGGGGTAGGAACACG - 3' (ヌクレオチド 694 から 716 に相補的な配列) を用いた。なお、それぞれの反応生成物について、複数の制限酵素による切断パターンを確認した。

## 結果

### 体重、組織重量、副腎中のアスコルビン酸濃度、血清および副腎中のコルチコステロン濃度

対照群とアスコルビン酸欠乏群の初体重、最終体重、組織重量、副腎のアスコルビン酸濃度、血清および副腎のコルチコステロン濃度を表 8 に示した。両群の体重および 14 日目の肝重量に差はなかった。

14 日目の副腎のアスコルビン酸濃度は、対照群に比べて欠乏群で有意に低下していた。一方、血清および副腎のコルチコステロン濃度は、どちらの場合も対照群に比べて欠乏群で明らかに上昇していた。

#### アスコルビン酸欠乏による副腎でのインターロイキン6発現の亢進

両群においてIL-6 mRNAは、白血球、腹腔内細胞および腎臓、副腎、脾臓、肺、胸腺、心臓、小腸の各組織で検出された。白血球、腹腔内細胞および腎臓、脾臓、肺、胸腺、心臓、小腸においては、両群のIL-6 mRNAレベルに差は見られなかったが、副腎のIL-6mRNAレベルは対照群に比べてアスコルビン酸欠乏群で明らかに上昇していた(図 17)。

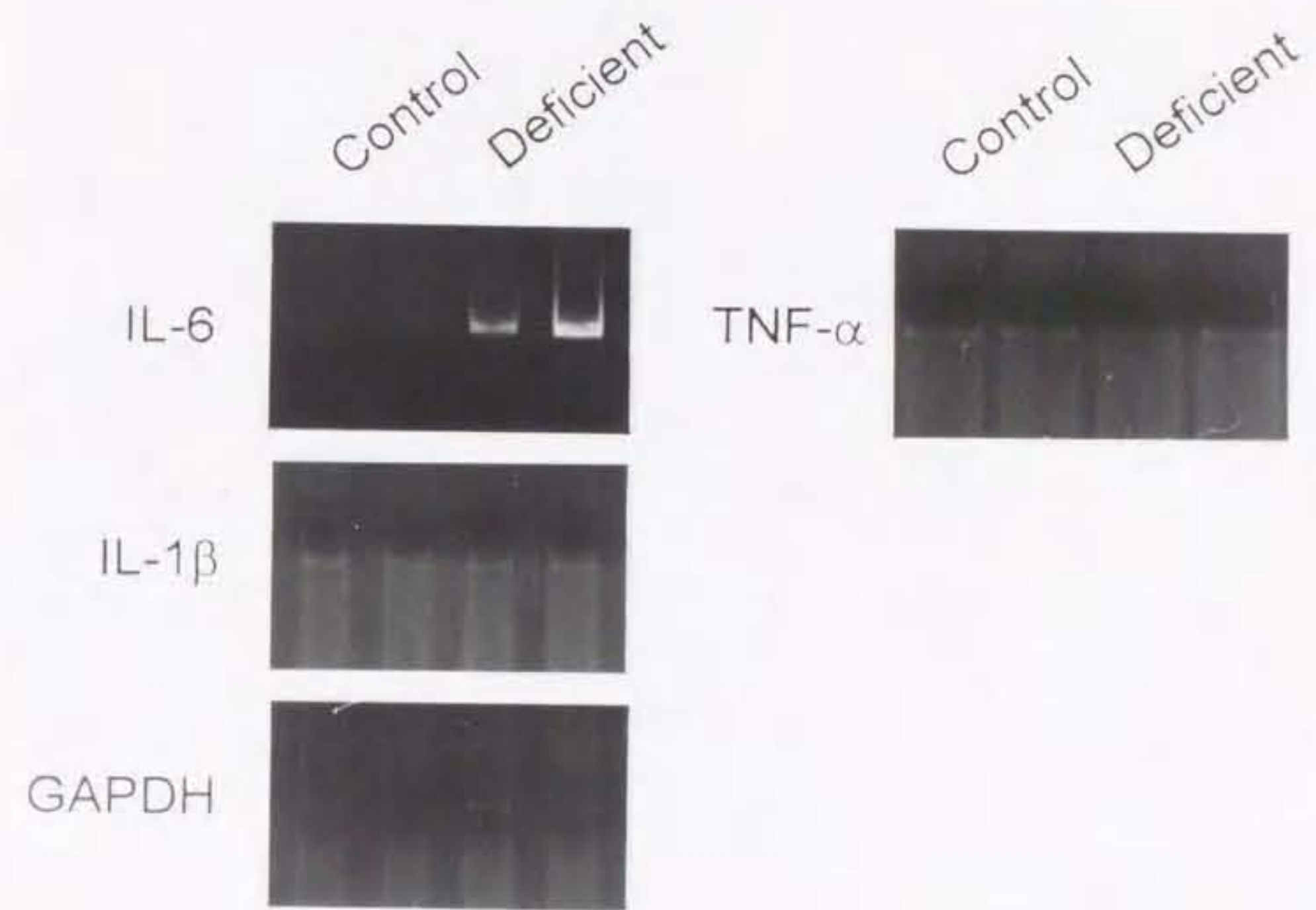
IL-1 $\beta$ およびTNF- $\alpha$ の mRNA は、測定したすべての細胞および組織で検出され、脾臓と胸腺において特に発現量が多かったが、両群間でそれらのレベルに大きな差は観察されなかった。

*Table 8 Body weights, liver weight, adrenal ascorbic acid concentration and corticosterone concentrations in serum and adrenal gland on d 14 of control and ascorbic acid-deficient rats<sup>1</sup>*

|                                   | Control       | Deficient                  |
|-----------------------------------|---------------|----------------------------|
| Initial body wt, g                | 138 ± 3       | 139 ± 3                    |
| Final body wt, g                  | 219 ± 3       | 214 ± 4                    |
| Relative liver wt, g/kg body wt   | 46.7 ± 0.7    | 45.7 ± 1.0                 |
| Relative adrenal wt, g/kg body wt | 0.183 ± 0.010 | 0.214 ± 0.002 <sup>#</sup> |
| Adrenal ascorbic acid, μmol/g     | 26.9 ± 2.2    | 1.7 ± 0.01 <sup>##</sup>   |
| Adrenal corticosterone, nmol/g    | 54.4 ± 2.9    | 152.6 ± 25.8               |
| Serum corticosterone, nmol/L      | 1.1 ± 0.3     | 9.8 ± 3.1                  |

<sup>1</sup> Values are mean ± SEM, n = 3. From d 12 to 14, the control rats were pair-fed the amount consumed by the ascorbic acid-deficient rats. Means that are significantly different from the value of each control rats are denoted: <sup>#</sup> P < 0.05, Welch's test; <sup>##</sup> P < 0.01, Welch's test.





**Figure 17** RT-PCR analysis of interleukin-6 (IL-6) mRNA from control and ascorbic acid-deficient rats. RNA was isolated from adrenal gland, and the resulting cDNA was used in PCR with IL-6, interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) or glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)-specific primers. The amplification products were analyzed by 5% polyacrylamide gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide.

## 考察

IL-6 は、代表的な炎症性サイトカインの一つであり、その発現量は正常時には非常に低く保たれている。実際に、定量性に優れたノーザンブロット法により IL-6 mRNA の検出を試みると、ラットに LPS を投与した場合には肝臓や腹腔滲出細胞においてその mRNA は検出可能であるが、正常時には全く検出できなかった。そこで、本節では、IL-6、IL-1 $\beta$ および TNF- $\alpha$  の mRNA の検出に RT-PCR 法を用いた。RT-PCR 法は、定量性の厳密さにおいてノーザンブロット法より劣るが、高感度に mRNA を検出することができる。

肝臓では、非実質細胞の一つであるクッパー細胞が IL-6 を産生するマクロファージ系の細胞であるので、アスコルビン酸欠乏時にはこの肝非実質細胞で IL-6 の発現が亢進し、その結果 IL-6 レセプターを発現している肝実質細胞で急性期タンパク質の発現変動が起きるのではないかと予想した。しかしながら、両群の IL-6 mRNA は、調べた中では肝臓においてのみ全く検出されなかった。これに対して、ラットに LPS を投与した場合には、前述のように肝臓においてノーザンブロット法で十分検出されるレベルの IL-6 mRNA が存在することから、肝臓では正常時およびアスコルビン酸欠乏時の IL-6 発現量が他の組織に比べて著しく低いものと思われる。そこで、アスコルビン酸欠乏時の IL-6 の血中濃度の上昇が、どの細胞あるいは組織に由来したものであるかを特定するために、白血球、腹腔滲出細胞および腎臓、副腎、脾臓、肺、胸腺、心臓、小腸の各組織について、IL-6 mRNA レベルを測定した。その結果、副腎のみにおいて明らかな mRNA レベルの上昇が観察された。なお、本研究では 6 週齢の ODS ラットを 14 日間のアスコルビン酸欠乏にしているが、25 週齢の ODS ラットを 42 日間のアスコルビン酸欠乏にした場合に本節の結果と同様に副腎の IL-6 mRNA レベルが上昇することも確認している(未発表)。この結果から、アスコルビン酸欠乏時の血中 IL-6 濃度の上昇に、少なくとも副腎におけるその発現量の増大が寄与している可能性が示された。ただし、今回調べた細胞および組織以外の部位でのアスコルビン酸欠乏による IL-6 遺伝子の発現の亢進が存在する可能性も考えられる。

副腎は、生体内で、アスコルビン酸が最も高濃度に存在する臓器であり、その濃度は血中濃度に比べて約 1000 倍高い。副腎髄質のクロム親和性細胞は、アスコルビン酸の能動的取り込み能がある細胞として知られている(Dilibert, Jr.ら、1983)。また、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)の投与や内因性 ACTH の血中濃度が高くなるようなストレス負荷時には、副腎中のアスコルビン酸濃度が 50-60%に低下し(Sayer ら、1948)、副腎皮質細胞や線維芽細胞へのアスコルビン酸の取り込み速度が低下することも知られている(Aleo と Padh 1985、Finn ら、1980)。さらに、その髄質においてチロシンからドーパを経由してドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリンが生成される

が、ドーパミン-β-ヒドロキシラーゼによるドーパミンの水酸化反応において、アスコルビン酸がコファクターとして作用することが知られている (Padh 1990 と 1991)。このようにアスコルビン酸が要求される組織において、IL-6 発現量の変化が見られたことは興味深い。

ラットやヒトにおいて、副腎皮質のステロイドホルモン産生部位で IL-6 遺伝子と IL-6 受容体遺伝子の発現が観察されることから、副腎皮質におけるグルココルチコイドの産生を、ACTH だけでなく IL-6 がオートクリンの機構で誘導する可能性が示されている (Gonzalez-Hernandez ら、1994, Páth ら、1997)。本節の結果、アスコルビン酸欠乏時には、副腎中のコルチコステロン濃度も上昇していた。したがって、第2章第3節および第4節で認められたアスコルビン酸欠乏による血中コルチコステロン濃度の上昇は、副腎において IL-6 の産生が誘導された結果、コルチコステロンの生合成が促進されて起こるのかもしれない。

IL-6 遺伝子の上流には *c-fos* serum responsive element や NF-κB の結合部位が存在し、IL-6 と同様に炎症性サイトカインである IL-1β および TNF-α によってその発現が誘導される (Hirano ら、1990, Akira ら、1990)。そこで、白血球、腹腔渗出細胞および肝臓、腎臓、副腎、脾臓、肺、胸腺、心臓、小腸の各組織について IL-1β および TNF-α の mRNA レベルを調べたところ、測定したすべての細胞および組織で検出された。また、これらのサイトカインは、他の組織に比べて、免疫に関わる組織である脾臓と胸腺で多く発現していた。しかしながら、どの組織あるいは細胞においても、IL-1β および TNF-α の mRNA レベルは、アスコルビン酸欠乏により変化しなかった。この結果から、アスコルビン酸欠乏時の副腎における IL-6 発現の亢進に、IL-1β および TNF-α の関与はないものと現在では考えている。

## 第2節 アスコルビン酸欠乏による肝臓の急性期タンパク質遺伝子の発現変動および血中 IL-6 濃度の上昇に対する副腎摘出の影響

### 目的

アスコルビン酸欠乏時には、肝臓のハプトグロビンおよび AGP の mRNA レベルの上昇と同じ時期に血中のコルチコステロン濃度が上昇することを示し、それは副腎においてコルチコステロンの産生が誘導されて起こる可能性を示した。前述したように、ハプトグロビン遺伝子や AGP 遺伝子の上流にはグルココルチコイド応答領域が存在し、HepG2 などの肝がん細胞の培養系において、グルココルチコイド(デキサメサゾン)の添加はハプトグロビンおよび AGP の遺伝子発現を誘導することが知られている(Baumann 1990, Marinkovic と Baumann 1990, Won と Baumann 1990)。Reinke と Feigelson(1985)は、ラットにデキサメサゾンを投与することによって、肝臓の AGP mRNA レベルが上昇することも報告している。したがって、アスコルビン酸欠乏時の副腎におけるコルチコステロンの生合成の上昇と、それに伴って起こる血中コルチコステロン濃度の上昇が、肝臓における急性期タンパク質の発現変動を引き起こす可能性が考えられた。

また、本章第1節では、副腎の IL-6 mRNA レベルがアスコルビン酸欠乏により上昇することを示した。アスコルビン酸欠乏時には少なくとも副腎において IL-6 遺伝子の発現が誘導され、このことが血中 IL-6 濃度の上昇に寄与している可能性が示された。この血中 IL-6 濃度の上昇が、肝臓の急性期タンパク質(ハプトグロビンおよび AGP)の遺伝子発現の誘導を引き起こしていることが考えられる。

肝臓における急性期タンパク質の発現変動におけるアスコルビン酸欠乏の作用点を解析する上で、グルココルチコイドの産生臓器であるという点と、調べた限りでは IL-6 遺伝子発現のアスコルビン酸欠乏による亢進が見られた唯一の臓器であるという点から、副腎の存在の重要性に着目した。

本節では、副腎摘出を行った ODS ラットを用いて、アスコルビン酸欠乏時の副腎の役割について解析した。すなわち、ODS ラットをあらかじめ副腎を摘出した群と偽手術群の2群に分け、それぞれをさらに対照群とアスコルビン酸欠乏群の2群に分けた。そして、第2章第4節で見られたようなアスコルビン酸欠乏による急性期タンパク質遺伝子の発現変動および血中 IL-6 濃度の上昇が、

副腎摘出群でも観察されるかどうかを調べ、アスコルビン酸欠乏時にみられるこれらの現象において副腎におけるグルコルチコイドの生合成の促進および IL-6 発現の亢進が関与しているかどうかを検討した。

## 実験材料と実験方法

### 実験方法

雄 ODS ラット 8 匹(体重 130g)に副腎摘出手術を行い、残る 8 匹には偽手術を行った。その後、すべてのラットに基本食と、飲水として塩化ナトリウム 9g/L、グルコース 30g/L を含んだ水を与え、7日間予備飼育した。予備飼育後、それぞれのラットをアスコルビン酸を含まない飼料(基本食のアスコルビン酸を炭水化物で置き換えたもの)を与えた欠乏群と、基本食(アスコルビン酸 300mg/kg 添加、表 1)を与えた対照群の 2 群に分け(計 4 群)、15 日間飼育した。欠乏群の飼料摂取量は実験開始後 12 日目からわずかに減少し始めるので、12 日目以降には欠乏群の摂取量を対照群に与えることにより両群の摂取量を同じにした。

屠殺後、血液を 1,500×g、10 分間遠心分離することにより血清を採取した。肝臓は、採取後すぐに液体窒素で凍結させ-80℃で保存し、アスコルビン酸濃度の測定および RNA 抽出に用いた。

### 統計処理

値はすべて平均値±標準誤差で表し、分散分析(ANOVA)によって解析した。アスコルビン酸欠乏の効果の  $F$  値に有意差が認められた場合には、対照群とアスコルビン酸欠乏群の平均値の比較を行った。群間で分散が等しい場合には、対照群と欠乏群の平均値の比較に Student's  $t$ -test を用いた。群間で分散が等しくない場合には、平均値の比較にウェルチの検定(Aspin 1949, Trickett ら、1956)を用いた。有意差の判定は、 $P$  値が 0.05 以下とした。

## 結果

### 体重、肝重量、肝臓のアスコルビン酸濃度と血清コルチコステロン濃度

対照群とアスコルビン酸欠乏群の初体重および最終体重と、15 日目の肝重量、肝臓のアスコルビン酸濃度および血清コルチコステロン濃度を表 9 に示した。副腎除去手術群の初体重は、偽手術群に比べて低かったが、最終体重について有意差はみられなかった。

14 日目の肝臓のアスコルビン酸濃度は、副腎摘出群と偽手術群ともに、対照群に比べてアスコルビン酸欠乏群で有意に低下していた。

偽手術群の血清コルチコステロン濃度は、対照群に比べてアスコルビン酸欠乏群で約 3 倍に上昇していた。しかし、副腎摘出群では、対照群とアスコルビン酸欠乏群の両群とも血清コルチコステロン濃度は非常に低く、このことは副腎摘出手術が適切に行われたことを示していた。

#### アスコルビン酸欠乏による肝臓のハプトグロビン、 $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質、アポリポタンパク質 A-I およびアルブミンの mRNA レベルの変動に対する副腎摘出の影響

対照群とアスコルビン酸欠乏群の肝臓から RNA を抽出し、ハプトグロビン、AGP、ApoA-I およびアルブミンの肝臓での mRNA レベルをノーザンプロット法により調べた(図 18)。

ハプトグロビン mRNA レベルは、偽手術群および副腎摘出群の両群ともにアスコルビン酸欠乏により有意に上昇していた。AGP mRNA レベルは副腎除去により低下し、それぞれの対照群に比べてアスコルビン酸欠乏群では上昇していた。ApoA-I mRNA レベルは、副腎除去により上昇し、偽手術群ではアスコルビン酸欠乏により低下したのに対して、副腎除去群では有意ではないが欠乏群で低下する傾向がみられた。アルブミン mRNA レベルは副腎除去により変化せず、分散分析ではアスコルビン酸欠乏によりその mRNA レベルは低下していたが、それぞれの手術群の二群間では有意な差は見られなかった。

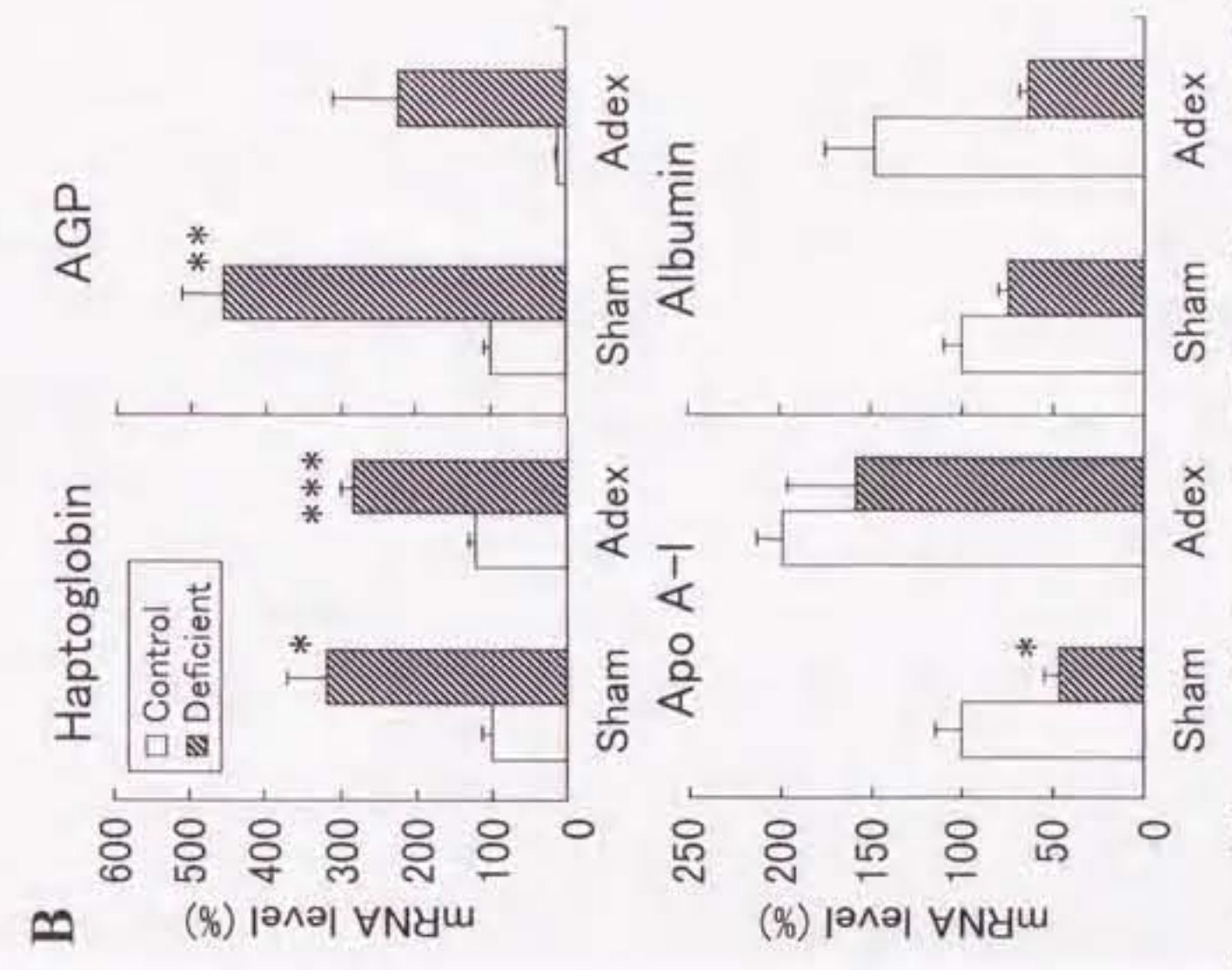
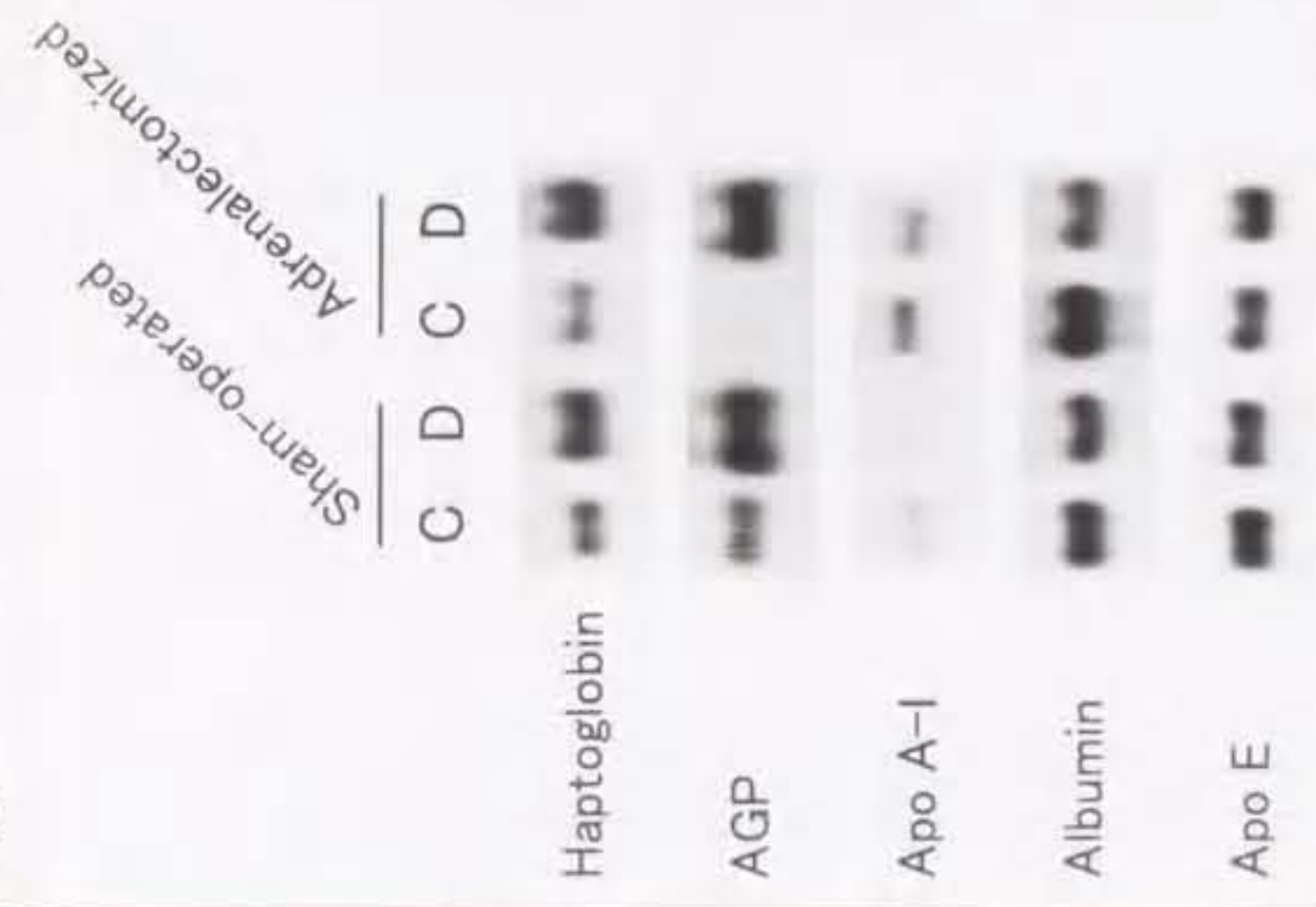
#### アスコルビン酸欠乏による血中 IL-6 濃度の上昇に及ぼす副腎摘出の影響

血中の IL-6 濃度は個体によるばらつきが非常に大きかったが、偽手術群と副腎摘出群の両群ともアスコルビン酸欠乏により上昇していた(図 19)。また、対照群とアスコルビン酸欠乏群ともに副腎を摘出することにより IL-6 濃度が低下する傾向が見られた。

Table 9 Body weights, hepatic ascorbic acid concentration and serum corticosterone concentration of sham-operated and adrenalectomized rats fed control and ascorbic acid-free diets on d 15<sup>1</sup>

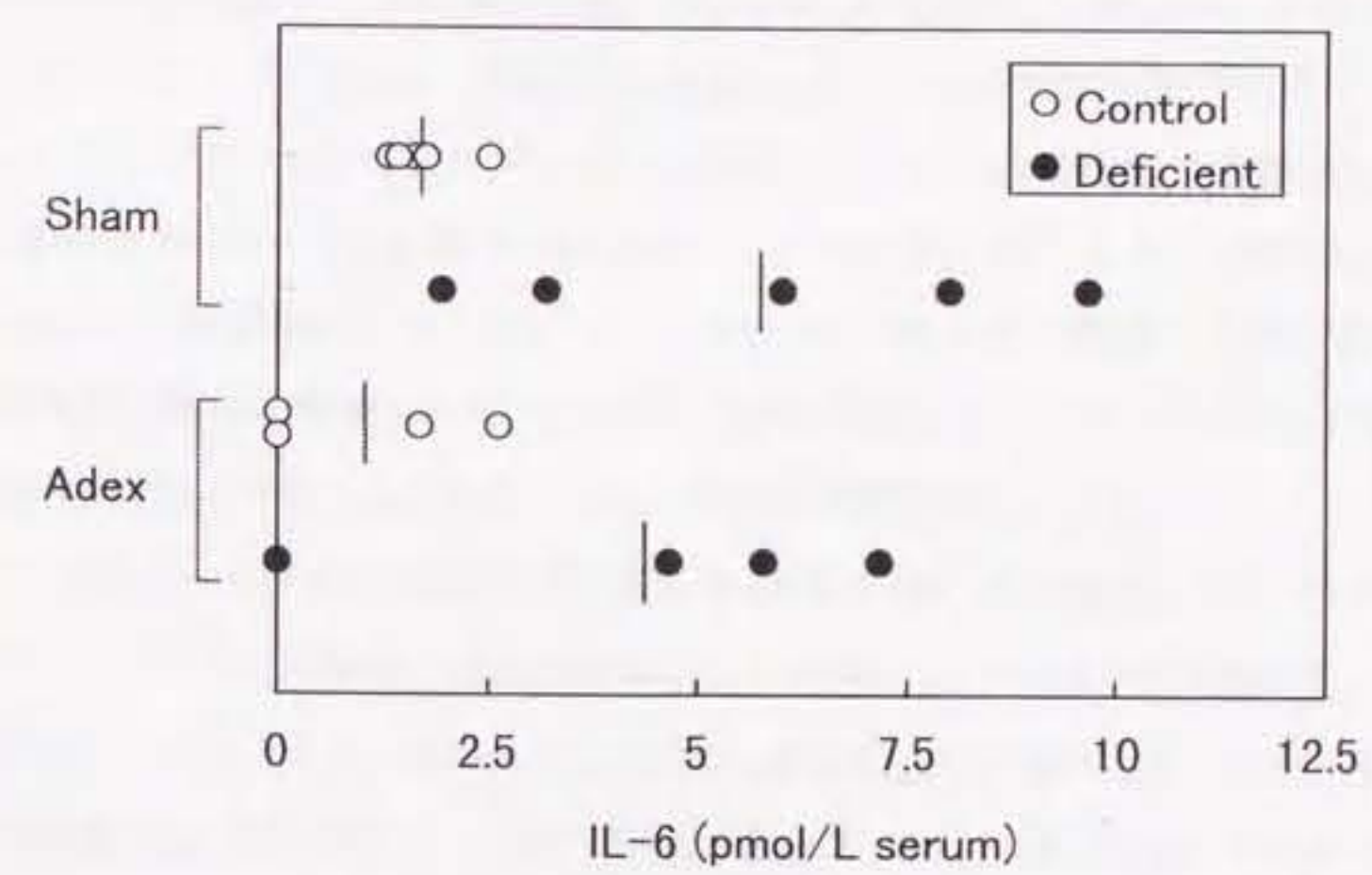
|                                 | Sham-operated |                     | Adrenalectomized |                      | Significance of <i>F</i> value |                      |   |
|---------------------------------|---------------|---------------------|------------------|----------------------|--------------------------------|----------------------|---|
|                                 | Control       | Deficient           | Control          | Deficient            | Ascorbic acid effect           | Adrenalectomy effect | Ascorbic acid × adrenalectomy interaction |
| Initial body wt, g              | 164 ± 5       | 165 ± 3             | 152 ± 4          | 148 ± 1 <sup>5</sup> | NS                             | <i>P</i> < 0.01      | NS  |
| Final body wt, g                | 239 ± 4       | 228 ± 4             | 211 ± 4          | 194 ± 17             | NS                             | NS                   | NS  |
| Relative liver wt, g/kg body wt | 41.8 ± 1.3    | 38.2 ± 1.6          | 36.8 ± 2.3       | 34.6 ± 2.4           | NS                             | NS                   | NS  |
| Hepatic ascorbic acid, nmol/g   | 801 ± 45      | 70 ± 5 <sup>#</sup> | 813 ± 39         | 90 ± 8 <sup>#</sup>  | <i>P</i> < 0.01                | NS                   | NS  |
| Serum corticosterone, nmol/L    | 2.5 ± 1.0     | 7.8 ± 2.9           | 1.2 ± 0.4        | 1.5 ± 0.5            | NS                             | <i>P</i> < 0.05      | NS  |

<sup>1</sup> Values are means ± SEM, n = 3. From d 12 to d 15, the control group was pair-fed the amount consumed by each ascorbic acid-deficient group. Data were analyzed by a two-way ANOVA. The significance of *F* values for ascorbic acid effect and adrenalectomy effect as well as interactive effect of the two components (ascorbic acid × adrenalectomy) is shown. When the *F* value was significant (*P* < 0.05), the mean value of each group was compared using Student's *t* test or Welch's test. <sup>5</sup> Significantly different (*P* < 0.05) from the respective sham-operated rats by Student's *t* test. <sup>#</sup> Significantly different (*P* < 0.01) from the respective control group by Welch's test. NS = not significant, *P* ≥ 0.05.



**Figure 18** Effect of adrenalectomy on hepatic mRNA levels of haptoglobin,  $\alpha_1$ -acid glycoprotein (AGP), apolipoprotein A-I (Apo A-I) and albumin in control and ascorbic acid-deficient rats. **A:** Northern-blot analyses of total RNA from liver of rats in the control (C) and the ascorbic acid-deficient (D) groups in both sham-operated and adrenalectomized rats. Total RNA (20  $\mu$ g) isolated from liver was separated on a 10 g/L agarose gel containing 66 g/L formaldehyde. RNA in the gel was transferred to a *Hybond N*<sup>+</sup> membrane and hybridized with <sup>32</sup>P-labeled cDNA of haptoglobin, AGP, Apo A-I, albumin or apolipoprotein E (Apo E). **B:** The hepatic mRNA levels of haptoglobin, AGP, Apo A-I and albumin in the control and the ascorbic acid-deficient groups in both sham-operated (Sham) and adrenalectomized (Adex) rats. These four mRNA levels were normalized by the Apo E mRNA level. Bars indicate means, and the vertical line on the top of the bar indicates  $\pm$ SEM (n = 3). Values are presented as a percentage of the mean of each control group in the sham-operated rats. Data were analyzed by two-way ANOVA. Haptoglobin mRNA: ascorbic acid effect,  $P < 0.01$ ; adrenalectomy effect,  $P \cong 0.05$ ; ascorbic acid deficiency  $\times$  adrenalectomy interaction,  $P \cong 0.05$ . AGP mRNA: ascorbic acid effect,  $P < 0.01$ ; adrenalectomy effect,  $P < 0.01$ ; ascorbic acid deficiency  $\times$  adrenalectomy interaction,  $P \cong 0.05$ . Apo A-I mRNA: ascorbic acid effect,  $P < 0.05$ ; adrenalectomy effect,  $P < 0.01$ ; ascorbic acid deficiency  $\times$  adrenalectomy interaction,  $P \cong 0.05$ . Albumin mRNA: ascorbic acid effect,  $P < 0.01$ ; adrenalectomy effect,  $P \cong 0.05$ ; ascorbic acid deficiency  $\times$  adrenalectomy interaction,  $P \cong 0.05$ . Means that are significantly different from the value of each control rats are denoted: \*  $P < 0.05$ , *t*-test; \*\*  $P < 0.01$ , *t*-test; \*\*\*  $P < 0.001$ , *t*-test.





**Figure 19** Effect of adrenalectomy on serum concentration of interleukin-6 (IL-6) in control and ascorbic acid-deficient rats. The serum concentration of IL-6 was quantified by measuring its activity to proliferate B9 cells. Point indicates the value of each rat, and the vertical line indicates mean of each group. Sham, sham-operated rats; Adex, adrenalectomized rats.

## 考察

アスコルビン酸欠乏による急性期タンパク質遺伝子の発現変動および血中 IL-6 濃度の上昇が、副腎摘出群でも観察されるかどうかを調べ、アスコルビン酸欠乏時にみられるこれらの現象において、副腎でのグルココルチコイドの生合成の促進あるいは IL-6 遺伝子の発現亢進が関与しているかどうかを検討した。第2章第4節で見られたアスコルビン酸欠乏によるハプトグロビン、AGP、ApoA-I およびアルブミンの肝臓の mRNA レベルの変動は、偽手術群において再現されていた。ハプトグロビンおよびアルブミンの mRNA レベルは副腎摘出の影響がほとんど見られなかった。副腎摘出によって、AGP の mRNA レベルは低下し Apo A-I の mRNA レベルは上昇した。しかしながら、副腎摘出ラットにおいても、アスコルビン酸欠乏は肝臓の上記4種の mRNA レベルを偽手術群と同様に変動させた。すなわち、副腎の存在がなくても、アスコルビン酸欠乏による肝臓の急性期タンパク質の mRNA レベルの変動は影響されなかった。

副腎は、グルココルチコイドを産生する唯一の臓器であり、副腎摘出したアスコルビン酸欠乏群の血中コルチコステロン濃度も非常に低かった。したがって、アスコルビン酸欠乏によるこれら4種の発現変動に、少なくとも血中のコルチコステロン濃度の上昇は関与していないと考えられた。

培養細胞系では、急性期タンパク質の発現誘導を IL-1 $\beta$ 、IL-6 とともにグルココルチコイドが増強することが示されてきた (Baumann ら、1989)。しかし、Baumann ら (1983) は、副腎摘出したラットに turpentine を投与した場合にも血中の急性期タンパク質濃度が変動することを報告している。また、Kopf ら (1994) は、turpentine や LPS の投与によるハプトグロビンおよび AGP の発現誘導が IL-6 欠損マウスでは観察されないことを報告した。これらの結果から、生体では炎症時のハプトグロビン遺伝子と AGP 遺伝子の発現誘導が、グルココルチコイドではなく主に IL-6 により引き起こされていることが示された。Schobitz ら (1993) は、ラットに LPS を投与した場合に、副腎摘出群の血中の IL-6 濃度が偽手術群に比べて高いことから、グルココルチコイドは IL-6 の発現誘導を抑制すると報告している。これらの結果から、IL-1 $\beta$ 、IL-6 およびグルココルチコイドのうち、炎症時に急性期タンパク質の発現を制御しているのは主に IL-6 であり、グルココルチコイドは生体においてはむしろ IL-6 遺伝子の発現を抑制することによって急性期応答を鎮める働きをしていると想像される。

本実験では、血中の IL-6 濃度は副腎摘出によって低下する傾向が見られたが、副腎摘出群においてもアスコルビン酸欠乏による血中 IL-6 濃度の上昇が観察された。この時、肝臓の急性期タンパク質遺伝子の mRNA レベルの変動は偽手術群と同様に観察されたことから、副腎摘出ラット

においても血中 IL-6 濃度の上昇が肝臓の急性期タンパク質遺伝子の発現を誘導していることが示唆された。

前節で見いだしたアスコルビン酸欠乏時に副腎で観察される IL-6 mRNA レベルの上昇は、血中の IL-6 濃度が副腎摘出によって低下する傾向が見られたことから、血中 IL-6 濃度の上昇に部分的に寄与していると思われる。しかし、副腎摘出ラットでもアスコルビン酸欠乏により血中 IL-6 濃度が上昇するという事実から、アスコルビン酸欠乏時の血中 IL-6 濃度の上昇は、副腎の貢献のみでは説明できない。今回調べた副腎を含む細胞および組織以外のどこかで IL-6 の発現量の増大が起こっていることが考えられる。

## 第4章 エンドトキシン投与時の急性期 タンパク質遺伝子の発現誘導に対す るアスコルビン酸摂取の影響

---

### 目的

アスコルビン酸欠乏時には、主要な炎症性サイトカインである IL-6 の血中濃度および抗炎症ホルモンであるグルココルチコイド濃度が上昇し、肝臓での急性期タンパク質の発現が変動することを示してきた。そして、これらの現象は、Wistar ラットに LPS を投与した場合にも同様に見られることを示した。この点から、アスコルビン酸欠乏状態というのはある種の炎症時と同じような変化が生体内で起きている可能性が考えられる。

そこで本章では、炎症時に起こる急性期タンパク質の発現の誘導を、生体内で起こる炎症反応の一つの指標と考えて、アスコルビン酸の摂取がこの反応を抑制する可能性について検討することを目的とした。急性期タンパク質としては、ハプトグロビン、AGP、 $\alpha_2$ -マクログロブリンおよびヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) を取り上げた。アスコルビン酸欠乏による急性期タンパク質の変動は、アスコルビン酸無添加飼料を与えはじめて 12 日目以降で観察される。したがって、それ以前のアスコルビン酸欠乏群と対照群に対して、炎症誘発剤である LPS を投与して、アスコルビン酸の摂取が肝臓の急性期タンパク質の発現変動を抑制しうるかについて検討した。

### 実験材料と実験方法

#### 実験方法

雄 ODS ラット(体重 140g)は、アスコルビン酸を含まない飼料(基本食のアスコルビン酸を炭水化物で置き換えたもの)を与えた欠乏群と、基本食(アスコルビン酸 300 mg/kg 添加、表 1)を与えた対照群

の2群に分け、10日間飼育した。10日目の午前10時に、2.5 µg/kg 体重になるようにLPSをラットに腹腔内投与し、6時間後と10時間後に断頭により屠殺した。

屠殺後、血液を1,500×g、10分間遠心分離することにより血清を採取した。肝臓は、採取後すぐに液体窒素で凍結させ、-80℃で保存してアスコルビン酸濃度の測定およびRNA抽出に用いた。

#### 統計処理

値はすべて平均値±標準誤差で表し、ANOVAによって解析した。アスコルビン酸欠乏の効果のF値に有意差が認められた場合には、対照群とアスコルビン酸欠乏群の平均値の比較を行った。群間で分散が等しい場合には、対照群と欠乏群の平均値の比較に、スチューデントのt検定を用いた。群間で分散が等しくない場合には、平均値の比較にウェルチの検定(Aspin 1949, Trickettら, 1956)を用いた。有意差の判定は、P値が0.05以下とした。

## 結果

### 体重、肝重量と肝臓のアスコルビン酸濃度

対照群とアスコルビン酸欠乏群の初体重、最終体重、肝臓重量および肝臓のアスコルビン酸濃度を表10と表11に示した。どちらの場合においても10日間の飼育期間中、両群の体重および肝重量に差はなかった。

肝臓中のアスコルビン酸濃度は、対照群に比べて欠乏群で有意に低下していた。

### エンドトキシン投与による急性期タンパク質遺伝子の発現誘導に対するアスコルビン酸摂取の影響

10日間飼育した対照群とアスコルビン酸欠乏群のODSラットにLPSを投与して、6時間後および10時間後に肝臓で誘導される急性期タンパク質のmRNAレベルを調べた(図20)。ラットの急性期タンパク質であるハプトグロビン、AGP、 $\alpha_2$ -マクログロブリンおよびHO-1のmRNAレベルは、欠乏群において投与6時間後および10時間後でLPSの投与により明らかに上昇した。両群を通じて、ハプトグロビンおよびAGPのmRNAレベルはLPS投与後10時間まで上昇し続いていたが、 $\alpha_2$ -マクログロブリンおよびHO-1のmRNAレベルは、6時間後に比べて10時間後ではその上昇の程度は低下していた。

しかし、6時間および10時間後の両方において、LPS投与による4種のmRNAレベルの上昇に対してアスコルビン酸摂取の影響は観察されなかった。

さらに、肝臓におけるIL-6 mRNAレベルを測定した。対照群と欠乏群ともに、IL-6 mRNAはSaline投与時には6時間後も10時間後も検出されなかった。これに対して、LPS投与時には6

時間後において明らかに IL-6 mRNA が検出された。しかし、アスコルビン酸欠乏時のレベルがアスコルビン酸の摂取によって変化することはなかった。

Table 10 Body weights, liver weight, hepatic ascorbic acid concentration and serum corticosterone concentration of control and ascorbic acid-deficient rats at 6 h after the intraperitoneal injection of lipopolysaccharide<sup>1</sup>

|                                 | Saline     |                        | LPS        |                        | Significance of <i>F</i> value |            |                                 |
|---------------------------------|------------|------------------------|------------|------------------------|--------------------------------|------------|---------------------------------|
|                                 | Control    | Deficient              | Control    | Deficient              | Ascorbic acid effect           | LPS effect | Ascorbic acid × LPS interaction |
| Initial body wt, g              | 134 ± 4    | 133 ± 2                | 133 ± 2    | 133 ± 2                | NS                             | NS         | NS                              |
| Final body wt, g                | 194 ± 2    | 204 ± 4                | 200 ± 2    | 197 ± 4                | NS                             | NS         | NS                              |
| Relative liver wt, g/kg body wt | 48.7 ± 2.9 | 44.0 ± 1.1             | 43.5 ± 1.3 | 42.2 ± 0.3             | NS                             | NS         | NS                              |
| Hepatic ascorbic acid, nmol/g   | 1267 ± 125 | 170 ± 11 <sup>##</sup> | 1102 ± 28  | 153 ± 17 <sup>##</sup> | <i>P</i> < 0.01                | NS         | NS                              |

<sup>1</sup> Values are means ± SEM, n = 4. Data were analyzed by a two-way ANOVA. The significance of *F* values for ascorbic acid effect and lipopolysaccharide (LPS) effect as well as interactive effect of the two components (ascorbic acid × LPS) is shown. When the *F* value for the ascorbic acid effect was significant (*P* < 0.05), the mean values of the control and the ascorbic acid-deficient groups were compared using Welch's test.<sup>##</sup> Significantly different (*P* < 0.01) from the control group by Welch's test. NS = not significant, *P* ≥ 0.05.

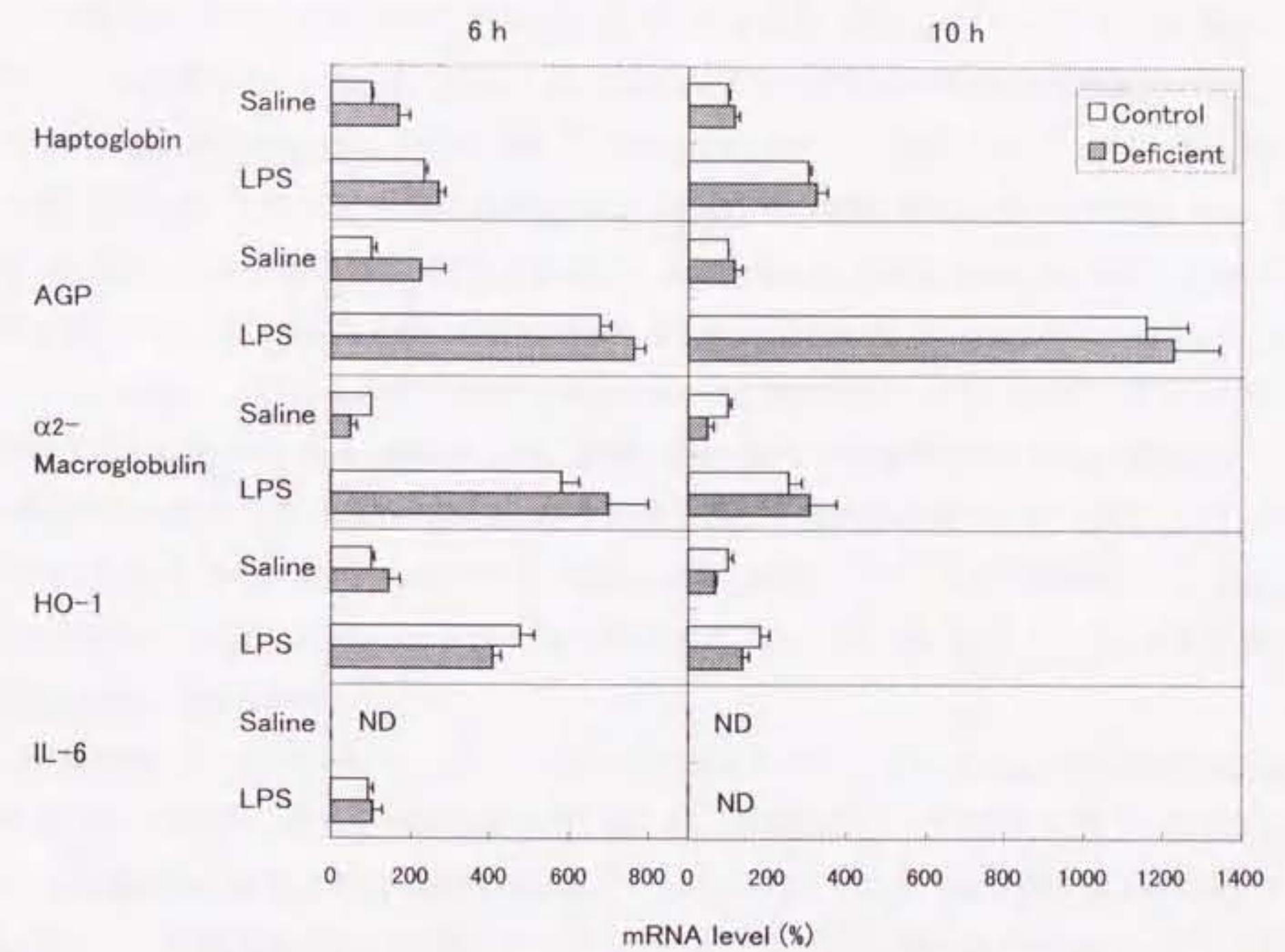
**Table 11** Body weights, liver weight, hepatic ascorbic acid concentration and serum corticosterone concentration of control and ascorbic acid-deficient rats at 10 h after the intraperitoneal injection of lipopolysaccharide<sup>1</sup>

|                                 | Saline     |     |                      |     | LPS        |     |                     |     | Significance of <i>F</i> value |            |                                 |
|---------------------------------|------------|-----|----------------------|-----|------------|-----|---------------------|-----|--------------------------------|------------|---------------------------------|
|                                 | Control    |     | Deficient            |     | Control    |     | Deficient           |     | Ascorbic acid effect           | LPS effect | Ascorbic acid × LPS interaction |
|                                 | Mean       | SEM | Mean                 | SEM | Mean       | SEM | Mean                | SEM |                                |            |                                 |
| Initial body wt, g              | 134 ± 1    |     | 134 ± 2              |     | 134 ± 2    |     | 134 ± 2             |     | NS                             | NS         | NS                              |
| Final body wt, g                | 200 ± 3    |     | 199 ± 4              |     | 201 ± 4    |     | 198 ± 5             |     | NS                             | NS         | NS                              |
| Relative liver wt, g/kg body wt | 42.6 ± 1.5 |     | 40.0 ± 1.6           |     | 41.0 ± 1.2 |     | 38.9 ± 0.5          |     | NS                             | NS         | NS                              |
| Hepatic ascorbic acid, nmol/g   | 706 ± 6    |     | 72 ± 36 <sup>#</sup> |     | 681 ± 30   |     | 71 ± 4 <sup>#</sup> |     | <i>P</i> < 0.01                | NS         | NS                              |

<sup>1</sup> Values are means ± SEM, *n* = 3. Data were analyzed by a two-way ANOVA. The significance of *F* values for ascorbic acid effect and lipopolysaccharide (LPS) effect as well as interactive effect of the two components (ascorbic acid × LPS) is shown. When the *F* value for the ascorbic acid effect was significant (*P* < 0.05), the mean values of the control and the ascorbic acid-deficient groups were compared using Welch's test.

<sup>#</sup> Significantly different (*P* < 0.01) from the control group by Welch's test. NS = not significant, *P* ≥ 0.05.





**Figure 20** The hepatic mRNA levels of haptoglobin,  $\alpha_1$ -acid glycoprotein (AGP),  $\alpha_2$ -macroglobulin, heme oxygenase-1 (HO-1) and interleukin-6 (IL-6) of control and ascorbic acid-deficient ODS rats at 6 h or 10 h after the intraperitoneal injection of saline or lipopolysaccharide (LPS). These mRNA levels were normalized by the apolipoprotein E mRNA level. Bar indicates means, and the horizontal line on the right of the bar indicates SEM,  $n = 4$  (6 h) or  $n = 3$  (10 h). Values are presented as a percentage of the mean of rats injected with saline. ND, not detected.

## 考察

ラットに IL-6 を投与すると、肝臓におけるハプトグロビン、AGP、 $\alpha_2$ -マクログロブリンおよび HO-1 の mRNA レベルが上昇することが知られている (Geiger ら、1988)。また、ハプトグロビン遺伝子および AGP 遺伝子の 5' 上流には Type I IL-6 応答配列および Type II IL-6 応答配列が存在し (Marinkovic と Baumann、1990、Won と Baumann、1990)、また  $\alpha_2$ -マクログロブリン遺伝子の 5' 上流には Type II IL-6 応答配列が存在する (Fujitani ら、1994、Wegenka ら、1993)。Type I IL-6 応答配列には C/EBP $\beta$  / NF-IL6 が結合し (Ratajczak ら、1992、Alam ら、1993)、Type II IL-6 応答配列には STAT3 / APF が結合する (Fujitani ら、1994、Wegenka ら、1993) ことにより、その遺伝子の転写を活性化することが分子レベルで解明されている。今までに、アスコルビン酸欠乏時には血中の IL-6 濃度が上昇し、肝臓の急性期タンパク質の発現レベルが変動することを観察してきた。そこで、本実験では、IL-6 によりその遺伝子発現が誘導されることが知られているハプトグロビン、AGP、 $\alpha_2$ -マクログロブリン (Geiger ら、1988) および HO-1 (Mitani ら、1992、Rizzardini ら、1993) について、アスコルビン酸摂取がこれら 4 種の LPS 投与による発現誘導を抑制しうるかどうかを検討した。

結果は示していないが、LPS の投与量は、示した結果を含めて 2.5、5、10、100、1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重について検討し、投与後の時間は 6、10、24、34、48 時間について検討したが、いずれもアスコルビン酸摂取の有無による影響は観察されなかった。この時の IL-6 の血中濃度の上昇に関して、アスコルビン酸摂取によって抑制することはなかった。アスコルビン酸の摂取が IL-6 を介した急性期タンパク質遺伝子の発現誘導を抑制する可能性を想定して実験を行ったが、本実験においてはそのようなアスコルビン酸の作用は観察されなかった。

アスコルビン酸欠乏時には肝臓を含む主な組織で IL-6 の mRNA レベルは変化せず、副腎のみで上昇することを示した。一方で、ラットに LPS を投与した場合には少なくとも肝臓、副腎、腹腔滲出細胞で IL-6 mRNA レベルが上昇することを確認している。アスコルビン酸欠乏と LPS 投与では、IL-6 産生の誘導の臓器特異性が異なることも考えられ、LPS 投与はよいモデル系ではなかったかも知れない。本実験では、LPS のみを使用した系で行っており、炎症応答を引き起こす別の系での検討も必要であろう。

## 第5章 総合討論

本研究では、遺伝的にアスコルビン酸を合成できない ODS ラットを用いて、アスコルビン酸により制御される遺伝子発現を解析することにより、現在までに知られていないアスコルビン酸の生理機能を明らかにすることを目的とした。

本研究において、ODS ラットを用いて、アスコルビン酸欠乏により肝臓におけるハプトグロビンおよび AGP の mRNA レベルが上昇し、ApoA-I、アルブミンおよび $\alpha_{2u}$ -グロブリンの mRNA レベルが低下することを見いだした(第2章)。ハプトグロビンは、ヘモグロビンのグロビタンパク質との結合能を有し、ハプトグロビン結合タンパク質が肝臓に存在することから、炎症時に赤血球の溶血が起こった場合に血液中に放出されたヘモグロビンを肝臓に運搬する働きが推定されている(Higaら、1981、Kinoら、1980)。AGP は、血清タンパク質の中で糖含量が最も多いという特徴があるが、体内における生理作用は不明である。ApoA-I は、HDL の主要構成アポリポタンパク質であり、抗動脈硬化作用を有し、コレステロール代謝に重要な役割を持つタンパク質である。アルブミンは血清タンパク質の中で最も多いタンパク質であり、様々な低分子の脂溶性物質と結合して運搬する働きがある。 $\alpha_{2u}$ -グロブリンは、成熟雄ラットの尿中に多量に存在するタンパク質として知られ、腎障害への関与が調べられているが、ヒトにはこれに相当するタンパク質はない(Swenberg 1993)。 $\alpha_{2u}$ -グロブリンは、腎臓でアミノ末端から9アミノ酸が切断されて腎臓 FABP になって腎臓に存在する。腎臓 FABP は、*in vitro* でオレイン酸と結合することからこの名が付けられた(Lamら、1988)が、他の FABP ファミリーとは異なり、実際に腎臓で FABP として機能しているかどうかは、現在のところ不明である。

これらのタンパク質は、いずれも体内で炎症反応を引き起こす薬剤である LPS や turpentine をラットに投与することによって、その肝臓の mRNA レベルが変動する急性期タンパク質であった(Lowellら、1986、Schreiberら、1986)。そして、アスコルビン酸欠乏時の肝臓のこれらの mRNA レベルの変動は、急性期と同様のものであった。急性期タンパク質とは、広義には急性の炎症反応が起きた時に遺伝子発現が大きく誘導あるいは抑制された結果、その血中濃度が変動する一群のタンパク質の総称であり、狭義には遺伝子発現が誘導されて血中濃度が上昇するタンパク質のみを指す場合もある。しかし、これらの急性期タンパク質濃度が炎症時に上昇あるいは低下する生理的な意義は明確にはわかっていない。そこで、急性期に誘導され、急性期タンパク質の発現を誘

導する IL-6 の血中濃度を測定したところ、アスコルビン酸欠乏により IL-6 濃度は上昇し(第2章第4節)、副腎における IL-6 mRNA レベルも上昇していた(第3章第1節)。以上の結果から、アスコルビン酸欠乏状態は、急性期タンパク質遺伝子の誘導という点において、炎症時の生体応答に類似していると思われた。

リウマチ(Lunec と Blake, 1985, Oberitter ら, 1986)や気管支喘息(Olusi ら, 1979)などの炎症性疾患の患者は、健康な人に比べて血中のアスコルビン酸濃度が低下していることが以前から知られていた。また、ラットにおいても、LPS(Yamaguchi ら, 1995)やアレルギー反応の誘引物質であるヒスタミン(Nakano と Suzuki 1984)を投与すると、肝臓、脾臓、副腎などのアスコルビン酸濃度が低下することが報告されている。Benito と Bosch(1997)は、モルモットに LPS を投与すると肺のアスコルビン酸濃度が低下することを報告した。これらの結果は、生体内で炎症反応が起こる場合にアスコルビン酸が消費されることを示しており、アスコルビン酸は炎症時に何らかの役割を担っていることを示唆している。また、肺の炎症性疾患である嚢胞性繊維症(cystic fibrosis)の患者では、血中のアスコルビン酸濃度と IL-6 および AGP の濃度には、有意な逆相関が存在することが最近報告された(Winklhofer-Roob ら, 1997)。ヒトの血中アスコルビン酸濃度はその摂取量に伴って上昇することから、この結果は体内の炎症反応の指標である IL-6 および AGP の血中濃度をアスコルビン酸の摂取が低下させる可能性を示唆しているとともに、ODS ラットを用いた本研究の結果とも合致するものである。

最近、培養系において、サイトカインとアスコルビン酸との関連について報告され始めてきている。Tebbe ら(1997)は、ヒトのケラチノサイトを用いた培養系において、紫外線照射により誘導された IL-1 $\alpha$  および IL-6 の細胞からの放出が、アスコルビン酸添加により阻害されることを示した。Muñoz ら(1997)は、ヒトの T 細胞由来の細胞株である Jurkat 細胞を用いて、TNF- $\alpha$  による NF- $\kappa$ B の活性化をアスコルビン酸が増強することを示した。しかし、これらはいずれも培養系の結果であり、本研究で得られた結果と関連して考察するには、さらなる検討が必要であろう。

本研究の結果、ODS ラットにおいてアスコルビン酸欠乏により肝臓の急性期タンパク質遺伝子の発現が変動することが明らかになった(第2章)。この時、血中 IL-6 濃度の上昇(第2章第4節)が観察されたことから、アスコルビン酸欠乏時には、血中 IL-6 濃度が上昇することによって肝臓の急性期タンパク質の遺伝子発現が変動する可能性が想定された。一方、LPS 投与によって起こる炎症時には、LPS のリポ A が様々な種類のマクロファージ系の細胞を活性化させた結果、マクロファージから炎症性サイトカインや活性酸素といった炎症のメディエーターが放出される(Rietschel ら, 1994)。この時放出される炎症性サイトカインは、IL-6 や、IL-6 の産生を誘導する IL-1 や TNF であり、その結果、主に IL-6 の作用によって肝臓の急性期タンパク質遺伝子の発現が変動する(Van Snick 1990)。

アスコルビン酸欠乏時の血中 IL-6 濃度の上昇の機構を検討するために、主要な細胞や臓器の IL-6, IL-1 $\beta$ および TNF- $\alpha$ の mRNA レベルを測定した。その結果、様々な細胞や臓器での IL-6 遺伝子発現の亢進がみられる LPS 投与時とは異なり、アスコルビン酸欠乏により IL-6 遺伝子発現の亢進が見られたのは副腎においてのみであった(第3章第1節)。さらに、IL-1 $\beta$ および TNF- $\alpha$ の mRNA レベルは、LPS 投与時には IL-6 と同様に様々な臓器で上昇するが、アスコルビン酸欠乏時には、副腎を含む測定したすべての細胞および臓器で変化しなかった。以上の結果から、アスコルビン酸欠乏は、肝臓の急性期タンパク質遺伝子の発現変動や血中 IL-6 濃度の上昇という点で LPS 投与と類似しているが、この現象に至る過程は両者で異なっているのかも知れない。

IL-6 はこれまで内毒素による感染症や組織損傷、炎症時などの急性期応答についての機能が詳しく調べられてきたが、近年、物理的ストレスや心理的ストレスの IL-6 遺伝子発現に対する影響が注目されている。Zhou ら(1993)は、ラットの足に電気ショックを与えると、コルチコステロンおよび IL-6 の血中濃度が上昇することと、副腎摘出を行った場合には血中 IL-6 濃度の上昇が偽手術群の 18%に低下することを報告した。このことから、ストレス負荷時には副腎の IL-6 遺伝子発現の亢進が起こった結果、血中 IL-6 濃度が上昇するとともに、副腎でのコルチコステロンの産生誘導も起こって血中コルチコステロン濃度の上昇が起こると思われる。ストレス負荷時の IL-6 の機能やその誘導機構についてはまだ不明な点が多いが、IL-6 が神経系と内分泌系を結びつける重要な役割を持つらしいことは、大変興味深い。本研究で、副腎においてアスコルビン酸欠乏による IL-6 遺伝子発現の亢進が見られた機構の解明には、今後このような炎症反応とは別の方向からの研究が必要であろう。

本研究の結果では、アスコルビン酸を合成できない ODS ラットにおいて、アスコルビン酸欠乏により肝臓のハプトグロビンおよび AGP の mRNA レベルが上昇し、ApoA-I、アルブミンおよび $\alpha_2$ -グロブリンの mRNA レベルが低下することを見だし、副腎の IL-6 mRNA レベルが上昇することも見いだした。これらの遺伝子発現に対するアスコルビン酸の作用点を明らかにするには至らなかったが、アスコルビン酸欠乏時には副腎を含む組織において IL-6 遺伝子の発現が誘導され、その結果、血中の IL-6 濃度が上昇し、このことが肝臓の急性期タンパク質の発現を変動させている可能性が示された。そして、本研究で発現変動が認められた遺伝子はいずれも炎症に関与するものであったことから、アスコルビン酸欠乏状態はある種の炎症反応に類似した状態であることが示唆された。

## 第6章 要約

遺伝的にアスコルビン酸を生合成できない ODS ラットを用いて、アスコルビン酸により制御される遺伝子発現を個体レベルで解析することにより、現在までに明らかに知られていないアスコルビン酸の生理機能を見いだすことを目的とした。

1. 6週齢の ODS ラット(140g)をアスコルビン酸無添加飼料群(欠乏群)と添加(300 mg/kg)飼料群(対照群)の2群に分け、それぞれを 14 日間飼育した。主要な臓器である肝臓、腎臓、副腎、脾臓、脳および血清のタンパク質濃度の変動を調べたところ、アスコルビン酸欠乏により腎臓細胞質画分に存在する約 17kDa のタンパク質濃度が低下し、血清中の約 36kDa タンパク質濃度が上昇し、約 27kDa タンパク質濃度とアルブミン濃度が低下することを見いだした。

血清中の 27kDa タンパク質は、その分子サイズから HDL の主要構成アポリポタンパク質である ApoA-I ではないかと考え、両群の ApoA-I の血中濃度を測定した。その結果、欠乏群の血中 ApoA-I 濃度は対照群の 53%に低下していた。そこで、肝臓の ApoA-I mRNA レベルを測定したところ、対照群に比べて欠乏群で 40%に低下していた。このときの ApoA-I 遺伝子の転写速度は、両群に差が見られなかった。以上の結果から、アスコルビン酸欠乏時には肝臓の ApoA-I mRNA レベルが低下することによって血中の ApoA-I 濃度が低下することが示唆され、アスコルビン酸の摂取が肝臓の ApoA-I mRNA レベルの維持に転写以降の段階で寄与していることが示された。

腎臓細胞質画分に存在する 17kDa タンパク質のアミノ末端からの 16 アミノ酸の配列は、腎臓 FABP のそれと一致していた。そこで、腎臓中の腎臓 FABP 濃度を測定したところ、対照群に比べて欠乏群で 53%に低下していた。腎臓 FABP は、その前駆体である $\alpha_{2u}$ -グロブリンとして成熟雄ラットの肝臓で生合成され、血中に放出された後、尿中に排泄されるが、その一部が腎臓尿細管から再吸収されて腎臓細胞質に存在するタンパク質である。そこで、血清の $\alpha_{2u}$ -グロブリン濃度を調べたところ、対照群に比べて欠乏群で 52%に低下していた。この時の肝臓の $\alpha_{2u}$ -グロブリン mRNA レベルは、欠乏群において対照群の 70%に低下していた。以上の結果から、アスコルビン酸欠乏によって肝臓における $\alpha_{2u}$ -グロブリンの mRNA レベルが低下し、このことが腎臓における腎臓 FABP 濃度の低下を引き起こしていることが示唆された。

ApoA-I、 $\alpha_{2u}$ -グロブリンおよびアルブミンは、いずれも肝臓で合成され血中へと放出される分泌タンパク質であり、実験的に急性期応答を起こさせる薬剤である LPS や turpentine の投与によりその血中濃度が低下する急性期タンパク質である。そこで、ラットの代表的な急性期タンパク質であり、急性期に発現誘導されるハプトグロビンおよび AGP の肝臓での mRNA レベルに対するアスコルビン酸欠乏の影響を調べた。欠乏群のハプトグロビンおよび AGP の mRNA レベルはともに12日目に上昇し始め、14日目にはハプトグロビンが対照群の 2.6 倍に、AGP が 3.6 倍に達していた。このとき、14 日目の欠乏群においてハプトグロビンの血中濃度が上昇することを見だし、前述のアスコルビン酸欠乏により増加する 36kDa の血清タンパク質はハプトグロビンであると推測した。また、炎症性サイトカインである IL-6 の血中濃度は欠乏群で12日目以降に上昇し始め、14日目で対照群の 4.3 倍に上昇していた。さらに、抗炎症性ホルモンであるグルココルチコイドの血中濃度も 14 日目に欠乏群で対照群の 4.6 倍に上昇していた。これらのことから、アスコルビン酸の欠乏状態は、ある種の炎症時の生体内の変化と類似しているのではないかと推察した。

2. 白血球、腹腔内細胞、および主要な体内組織である肝臓、腎臓、副腎、脾臓、肺、胸腺、心臓、小腸における IL-6 mRNA レベルを測定したところ、副腎においてのみ、アスコルビン酸欠乏により IL-6 mRNA レベルが上昇していた。この時、欠乏群の副腎中のコルチコステロン濃度も上昇していた。そこで、ラットの副腎を摘出した場合について解析した。その結果、副腎摘出ラットにおいても、肝臓におけるハプトグロビン、AGP、Apo A-I およびアルブミンの mRNA レベルのアスコルビン酸欠乏による変動が正常ラットと同様に観察された。この時、副腎摘出ラットにおいてもアスコルビン酸欠乏による IL-6 濃度の上昇が観察された。以上の結果から、アスコルビン酸欠乏時には副腎において IL-6 遺伝子の発現が誘導されることが示されたが、アスコルビン酸欠乏時の血中 IL-6 濃度の上昇に対しては、副腎での IL-6 遺伝子の発現上昇だけでは説明ができなかった。また、アスコルビン酸欠乏による肝臓のハプトグロビンや AGP の mRNA レベルの変動に関しては、推測の域を出ないが、アスコルビン酸欠乏が IL-6 の産生を増加させることにより、これらの発現を上昇させているのだろうと考えている。

以上の結果から、アスコルビン酸欠乏時には肝臓のハプトグロビン、AGP、ApoA-I、アルブミン、 $\alpha_{2u}$ -グロブリンおよび副腎の IL-6 の遺伝子発現が変動することを明らかにした。これらの遺伝子発現に対するアスコルビン酸の作用点は不明であるが、個体レベルでアスコルビン酸が肝臓や副腎の遺伝子発現を変動させることを示すことができた。また、アスコルビン酸欠乏時には血中の IL-6 濃度が上昇し、このことが肝臓の急性期タンパク質の発現を変動させている可能性を認めた。そし

て、本研究で発現変動が認められた遺伝子はいずれも炎症に関与するものであったことから、アスコルビン酸欠乏状態はある種の炎症反応に類似した状態であることが示唆された。



## 引用文献

- Aarden, L. A., De Groot, E. R., Schaap, O. L. & Lansdorp, P. M. (1987) Production of hybridoma growth factor by human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 17: 1411-1416.
- Addison, W. R. & Kurtz, D. T. (1989) Identification of nuclear proteins that bind to the glucocorticoid regulatory region of a rat  $\alpha_{2u}$ -globulin gene. *J. Biol. Chem.* 264: 21891-21895.
- Akira, S., Hirano, T., Taga, T. & Kishimoto, T. (1990) Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J.* 4: 2860-2867.
- Alam, T., An, M. R., Mifflin, R. C., Hsieh, C.-C., Ge, X. & Papaconstantinou, J. (1993) *trans*-Activation of the  $\alpha_1$ -acid glycoprotein gene acute phase responsive element by multiple isoforms of C/EBP and glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 268: 15681-15688.
- Aleo, J. J. & Padh, H. (1985) Inhibition of ascorbic acid uptake by endotoxin: evidence of mediation by serum factor(s). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 179: 128-131.
- American Institute of Nutrition (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN76A rodent diet. *J. Nutr.* 123: 1939-1951.
- Aspin, A. A. (1949) Tables for use in comparisons whose accuracy involves two variances, separately estimated. *Biometrika* 36: 290-296.
- Baumann, H., Firestone, G. L., Burgess, T. L., Gross, K. W., Yamamoto, K. R. & Held, W. A. (1983) Dexamethasone regulation of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein and other acute phase reactants in rat liver and hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* 258: 563-570.
- Baumann, H., Morella, K. K., Jahreis, G. P. & Marinkovic, S. (1990) Distinct regulation of the interleukin-1 and interleukin-6 response elements of the rat haptoglobin gene in rat and human hepatoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 10: 5967-5976.
- Baumann, H., Prowse, K. R., Marinkovic, S., Won, K.-A. & Jahreis, G. P. (1989) Stimulation of hepatic acute phase response by cytokines and glucocorticoids. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 557: 280-295.
- Benito, E. & Bosch, M. A. (1997) Impaired phosphatidylcholine biosynthesis and ascorbic acid depletion in lung during lipopolysaccharide-induced endotoxaemia in guinea pigs. *Mol. Cell Biochem.* 175: 117-123.
- Chan, G. C.-K., Hess, P., Meenakshi, T., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.-A. & Payvar, F. (1991) Delayed secondary glucocorticoid response elements: unusual nucleotide motifs specify glucocorticoid receptor binding to transcribed regions of  $\alpha_{2u}$ -globulin DNA. *J. Biol. Chem.* 266: 22634-22644.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Diliberto, Jr., E. J., Heckman, G. D. & Daniels, A. J. (1983) Characterization of ascorbic acid transport by adrenomedullary chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 258: 12886-12894.
- Duncan, D. B. (1957) Multiple range test for correlated and heteroscedastic means. *Biometrics* 13: 164-176.

- Ekstrom, R. C. & Hoekstra, W. G. (1984) Investigation of putative androgen-like activity of  $\alpha_{2u}$ -globulin in castrated and estrogen-treated male rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 175: 491-496.
- Fielding, C. J. & Fielding, P. E. (1995) Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.* 36: 211-228.
- Fielding, C. J., Shore, V. G. & Fielding, P. D. (1972) A protein cofactor of lecithin: acyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46: 1943-1949.
- Finn, F. M. & Johns, P. A. (1980) Ascorbic acid transport by isolated bovine adrenal cortical cells. *Endocrinology* 106: 811-817.
- Fisher, E. A., Coates, P. M. & Coatner, J. A. (1989) Gene polymorphisms and variability of human apolipoproteins. *Annu. Rev. Nutr.* 9: 139-160.
- Fogelman, A. M., Schechter, J. S., Hokom, M., Child, J. S. & Edwards, P. A. (1980) Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2214-2218.
- Frei, B., England, L. & Ames, B. N. (1989) Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6377-6381.
- Fujitani, Y., Nakajima, K., Kojima, H., Nakase, K., Takeda, T. & Hirano, T. (1994) Transcriptional activation of the IL-6 response element in the junB promoter is mediated by multiple STAT family proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202: 1181-1187.
- Geiger, T., Andus, T., Klapproth, J., Hirano, T., Kishimoto, T. & Heinrich, P. (1988) Induction of rat acute-phase proteins by interleukin-6 in vivo. *Eur. J. Immunol.* 18: 717-721.
- Gibbs, F. P. (1970) Circadian variation of ether-induced corticosterone secretion in the rat. *Am. J. Physiol.* 219: 288-292.
- Gonzalez-Hernandez, J. A., Bornstein, S. R., Ehrhart-Bornstein, M., Späth-Schwalbe, E., Jirikowski, G. & Scherbaum, W. A. (1997) Interleukin-6 messenger ribonucleic acid expression in human adrenal gland in vivo. new clue to a paracrine or autocrine regulation of adrenal function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79: 1492-1497.
- Gosiewska, A., Wilson, S., Kwon, D. & Peterkofsky, B. (1994) Evidence for an in vivo role of insulin-like growth factor-binding protein-1 and -2 as inhibitors of collagen gene expression in vitamin C-deficient and fasted guinea pigs. *Endocrinology* 134: 1329-1339.
- Haddad, I. A., Ordovas, J. M., Fitzpatrick, T. & Karathanasis, S. K. (1986) Linkage, evolution, and expression of the rat apolipoprotein A-I, C-III, and A-IV genes. *J. Biol. Chem.* 261: 13268-13277.
- Hallfrisch, J., Singh, V. N., Muller, D. C., Baldwin, H., Bannon, M. E. & Andres, R. (1994) High plasma vitamin C associated with high plasma HDL- and HDL<sub>2</sub> cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.* 60: 100-105.
- Hatch, F. T. & Lee, R. S. (1968) Practical methods for plasma lipoprotein analysis. *Adv. Lipid Res.* 6: 1-68.
- Higa, Y., Oshiro, S., Kino, K., Tsunoo, H. & Nakajima, H. (1981) Catabolism of globin-haptoglobin in liver cells after intravenous administration of hemoglobin-haptoglobin to rats. *J. Biol. Chem.* 256: 12322-12328.

- Hirano, T., Akira, S., Taga, T. & Kishimoto, T. (1990) Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol. Today* 11: 443-449.
- Horio, F., Ozaki, K., Oda, H., Makino, S., Hayashi, Y. & Yoshida, A. (1987) Effect of dietary ascorbic acid, cholesterol and PCB on cholesterol concentrations in serum and liver in a rat mutant unable to synthesize ascorbic acid. *J. Nutr.* 117: 1036-1044.
- Horio, F., Ozaki, K., Yoshida, A., Makino, S. & Hayashi, Y. (1985) Requirement for ascorbic acid in a rat mutant unable to synthesize ascorbic acid. *J. Nutr.* 115: 1630-1640.
- Horio, F., Takahashi, N., Makino, S., Hayashi, Y. & Yoshida, A. (1991) Ascorbic acid deficiency elevates serum level of LDL-cholesterol in a rat mutant unable to synthesize ascorbic acid. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 37: 63-71.
- Iwatsuki, N., Hattori, T., Iwasaki, Y., Nakano, M. & Nakamura, K. (1987) A complete rat serum albumin cDNA clone directly identified by immunological screening of cDNA expression library. *Agric. Biol. Chem.* 51: 379-384.
- Jacob, R. A. & Burri, B. J. (1996) Oxidative damage and defense. *Am. J. Clin. Nutr.* 63: 985S-990S.
- Jialal, I. & Grundy, S. M. (1991) Preservation of the endogenous antioxidants in low density lipoprotein by ascorbate but not probucol during oxidative modification. *J. Clin. Invest.* 87: 597-601.
- Jialal, I., Vega, G. L. & Grundy, S. M. (1990) Physiological levels of ascorbate inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 82: 185-191.
- Kawai, T., Nishikimi, M., Ozawa, T. & Yagi, K. (1992) A missense mutation of L-gulonolactone oxidase causes the inability of scurvy-prone osteogenic disorder rats to synthesize L-ascorbic acid. *J. Biol. Chem.* 267: 21973-21976.
- Kimura, H., Odani, S., Nishi, S., Sato, H., Arakawa, M. & Ono, T. (1991) Primary structure and cellular distribution of two fatty acid-binding proteins in adult rat kidneys. *J. Biol. Chem.* 266:5963-5969.
- Kimura, H., Odani, S., Suzuki, J., Arakawa, M. & Ono, T. (1989) Kidney fatty acid-binding protein: identification as  $\alpha_{2u}$ -globulin. *FEBS Lett.* 246: 101-104.
- Kino, K., Tsunoo, H., Higa, Y., Takami, M., Hamaguchi H. & Nakajima, H. (1980) Hemoglobin-haptoglobin receptor in rat liver plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 255: 9616-9620.
- Konishi, T., Makino, S., Mizushima, Y., Harauchi, T., Hasegawa, Y., Yoshizaki, T., Kishimoto, Y. & Oohara, T. (1990) What is the ODS rat? Historical description of the characterization studies. In: *Vitamin C and the scurvy-prone ODS rat* (Fujita, T., Fukase, M. & Konishi, T., ed.), pp.3-21. Elsevier Science Publishers Biomedical Division, Amsterdam, The Netherlands
- Kopf, M., Baumann, H., Freer, G., Freudenberg, M., Lamers, M., Kishimoto, T., Zinkernagel, R., Bluethmann, H. & Kohler, G. (1994) Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368: 339-342.
- Kurata, S., Senoo, H & Hata, R. (1993) Transcriptional activation of type I collagen genes by ascorbic acid 2-phosphate in human skin fibroblasts and its failure in cells from a patient with  $\alpha_2(I)$ -chain-defective ehlers-danlos syndrome. *Exp. Cell Res.* 206: 63-71.
- Kurtz, D. T., Sippel, A. E., Ansah-Yiadom, R. & Feigelson, P. (1976) Effects of sex hormones on the level of the messenger RNA for the rat hepatic protein  $\alpha_{2u}$ -globulin. *J. Biol. Chem.* 251: 3594-3598.

- Kushner, I. (1982) The phenomenon of the acute phase response. *Ann. NY Acad. Sci.* 389: 39-48.
- Lamers, W. H., Hanson, R. W. & Meisner, H. M. (1982) cAMP stimulates transcription of the gene for cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5132-5141.
- Lam, K. T., Borkan, S., Claffey, K. P., Schwartz, J. H., Chobanian, A. V. & Brecher, P. (1988) Properties and differential regulation of two fatty acid binding proteins in the rat kidney. *J. Biol. Chem.* 263: 15762-15768.
- Liu, E., Minor, R. R., Horovitz, O., Wootton, J. A. M., Podleski, T. R. & Salpeter, M. M. (1993) Secreted collagen induced by ascorbic acid in L5 clone muscle cultures does not affect acetylcholine receptor expression. *Exp. Cell. Res.* 209: 76-81.
- Lowell, C. A., Stearman, R. S. & Morrow, J. F. (1986) Transcriptional regulation of serum amyloid A gene expression. *J. Biol. Chem.* 261: 8453-8461.
- Lunec, J. & Blake, D. R. (1985) The determination of dehydroascorbic acid and ascorbic acid in the serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Free Radical Res. Commun.* 1: 31-39.
- Lynch, K. R., Dolan, K. P., Nakhasi, H. L., Unterman, R. & Feigelson, P. (1982) The role of growth hormone in  $\alpha_2$ -globulin synthesis: a reexamination. *Cell* 28: 185-189.
- Maciejko, J. J., Holmes, D. R., Kottke, B. A., Zinsmeister, A. R., Dinh, D. M. & Mao, S. J. T. (1983) Apolipoprotein A-I as a marker of angiographically assessed coronary-artery disease. *N. Engl. J. Med.* 309: 385-389.
- Mahmoodian, F., Gosiewska, A. & Peterkofsky, B. (1996) Regulation and properties of bone alkaline phosphatase during vitamin C deficiency in guinea pigs. *Arch. Biochem. Biophys.* 336: 86-96.
- Marinkovic, S. & Baumann, H. (1990) Structure, hormonal regulation, and identification of the interleukin-6- and dexamethasone-responsive element of the rat haptoglobin gene. *Mol. Cell. Biol.* 10: 1573-1583.
- Matsushita, N., Kobayashi, T., Oda, H., Horio, F. & Yoshida, A. (1993) Ascorbic acid deficiency reduces the level of mRNA for cytochrome P-450 on the induction by polychlorinated biphenyls. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 39: 289-302.
- McLean, J. W., Fukazawa, C. & Taylor, J. M. (1983) Rat apolipoprotein E mRNA. Cloning and sequencing of double-stranded cDNA. *J. Biol. Chem.* 258: 8993-9000.
- Mindham, M. A. & Mayes, P. A. (1992) A simple and rapid method for the preparation of apolipoproteins for electrophoresis. *J. Lipid Res.* 33: 1084-1088.
- Mitani, K., Fujita, H., Kappas, A. & Sassa, S. (1992) Heme oxygenase is a positive acute-phase reactant in human Hep3B hepatoma cells. *Blood* 79: 1255-1259.
- Mizushima, Y., Harauchi, T., Yoshizaki, T. & Makino, S. (1984) A rat mutant unable to synthesize vitamin C. *Experimentia* 40: 359-361.
- Morrone, G., Cortese, R. & Sorrentino, V. (1989) Post-transcriptional control of negative acute phase genes by transforming growth factor beta. *EMBO J.* 8: 3767-3771.
- Muñoz, E., Blázquez, M. V., Ortiz, C., Gomez-Díaz, C. & Navas, P. (1997) Role of ascorbate in the activation of NF- $\kappa$ B by tumor necrosis factor- $\alpha$  in T-cells. *Biochem. J.* 325: 23-28.

- Nakano, K. & Suzuki, S. (1984) Stress-induced change in tissue levels of ascorbic acid and histamine in rats. *J. Nutr.* 114: 1602-1608.
- Neuhaus, O. W. (1986) Renal reabsorption of low molecular weight proteins in adult male rats:  $\alpha_2\mu$ -globulin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 182: 531-539.
- Neuhaus, O. W. (1992) Renal reabsorptive capacity for  $\alpha_2\mu$ -globulin in the adult male rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 200: 85-89.
- Northemann, W., Braciak, T. A., Hattori, H., Lee, F. & Fey, G. (1989) Structure of the rat interleukin-6 gene and its expression in macrophage-derived cells. *J. Biol. Chem.* 264: 16072-16082.
- Oberritter, H., Glatthaar, B., Moser, U. & Schmidt, K. H. (1986) Effect of functional stimulation on ascorbate content in phagocytes under physiological and pathological conditions. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 81: 46-50.
- Olusi, S. O., Ojutiku, O. O., Jessop, W. J. & Iboko, M. I. (1979) Plasma and white blood cell ascorbic acid concentrations in patients with bronchial asthma. *Clin. Chim. Acta* 92: 161-166.
- Padh, H. (1990) Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem. Cell Biol.* 68: 1166-1173.
- Padh, H. (1991) Vitamin C: newer insights into its biochemical functions. *Nutr. Rev.* 49: 65-70.
- Päth, G., Bornstein, S. R., Ehrhart-Bornstein, M. & Scherbaum, W. A. (1997) Interleukin-6 and the interleukin-6 receptor in the human adrenal gland: expression and effects on steroidogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 2343-2349.
- Pevsner, J., Reed, R. R., Feinstein, P. G. & Snyder, S. H. (1988) Molecular cloning of odorant-binding protein: member of a ligand carrier family. *Science* 241: 336-339.
- Ratajczak, T., Williams, P. M., DiLorenzo, D. & Ringold, G. M. (1992) Multiple elements within the glucocorticoid regulatory unit of the rat  $\alpha_1$ -acid glycoprotein gene are recognition sites for C/EBP. *J. Biol. Chem.* 267: 11111-11119.
- Reinke, R. & Feigelson, P. (1985) Rat  $\alpha_1$ -acid glycoprotein. Gene sequences and regulation by glucocorticoids in transfected L-cells. *J. Biol. Chem.* 260: 4397-4403.
- Ricca, G. A. & Taylor, J. M. (1981) Nucleotide sequence of rat  $\alpha_1$ -acid glycoprotein messenger RNA. *J. Biol. Chem.* 256: 11199-11202.
- Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A. J., Zahringer, U., Seydel, U., Padova, F. D., Schreier, M. & Brade, H. (1994) Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 8: 217-225.
- Rizzardini, M., Terao, M., Falciani, F. & Cantoni, L. (1993) Cytokine induction of heme oxygenase mRNA in mouse liver. *Biochem. J.* 290: 343-347.
- Roe, J. H. & Kuether, C. A. (1943) The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. *J. Biol. Chem.* 147: 399-407.
- Roy, A. K., Nath, T. S., Motwani, N. M. & Chatterjee, B. (1983) Age-dependent regulation of the polymorphic forms of  $\alpha_2\mu$ -globulin. *J. Biol. Chem.* 258: 10123-10127.
- Rubin, E. M., Krauss, R. M., Spangler, E. A., Verstuyft, J. G. & Clift, S. M. (1993) Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature* 353: 265-267.

- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 5463-5467.
- Sayers, M. A., Sayers, G. & Woodbury, L. A. (1948) The assay of adrenocorticotrophic hormone by ascorbic acid-depletion method. *Endocrinology* 42: 379.
- Schobitz, B., Van den Dobbelsteen, M., Holsboer, F., Sutanto, W. & Ron de Kloet, E. (1993) Regulation of interleukin 6 gene expression in rat. *Endocrinology* 132: 1569-1576.
- Schreiber, G., Aldred, A. R., Thomas, T., Birch, H. E., Dickson, P. W., Guo-Fen, T., Heinrich, P. C., Northemann, W., Howlett, G. J., De Jong, F. A. & Mitchell, A. (1986) Levels of messenger ribonucleic acid for plasma proteins in rat liver during acute experimental inflammation. *Inflammation* 10: 59-66.
- Schultz, J. R., Verstuyft, J. G., Gong, E. L., Nichols, A. V. & Rubin, E. M. (1993) Protein composition determines the anti-atherogenic properties of HDL in transgenic mice. *Nature* 365: 762-764.
- Sharma, R. J., Macallan, D. C., Sedgwick, P., Remick, D. G. & Griffin, G. E. (1992) Kinetics of endotoxin-induced acute-phase protein gene expression and its modulation by TNF- $\alpha$  monoclonal antibody. *Am. J. Physiol.* 262: R786-R793.
- Shirai, T., Shimizu, N., Horiguchi, S. & Ito, H. (1989) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for rat tumor necrosis factor. *Agric. Biol. Chem.* 53: 1733-1736.
- Silber, R. H., Busch, R. D. & Oslapas, R. (1958) Practical procedure for estimation of corticosterone or hydrocortisone. *Clin. Chem.* 4: 278-285.
- Song, C. S., Rao, T. R., Demyan, W. F., Mancini, M. A., Chatterjee, B. & Roy, A. K. (1991) Androgen receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) in the rat liver: changes in mRNA levels during maturation, aging, and calorie restriction. *Endocrinology* 128: 349-356.
- Sullivan, T. A., Uschmann, B., Hough, R. & Leboy, P. S. (1994) Ascorbate modulation of chondrocyte gene expression is independent of its role in collagen secretion. *J. Biol. Chem.* 269: 22500-22506.
- Suzuki, H., Torii, Y., Hitomi, K. & Tsukagoshi, N. (1993) Ascorbate-dependent elevation of mRNA levels for cytochrome P450s induced by polychlorinated biphenyls. *Biochem. Pharmacol.* 46: 186-189.
- Swenberg, J. A. (1993)  $\alpha_2$ -Globulin nephropathy: review of the cellular and molecular mechanisms involved and their implications for human risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 101 (Suppl 6): 39-44.
- Tebbe, B., Wu, S., Geilen, C. C., Eberle, J., Kodelja, V. & Orfanos, C. E. (1997) L-Ascorbic acid inhibits UVA-induced lipid peroxidation and secretion of IL-1 $\alpha$  and IL-6 in culture human keratinocytes *in vitro*. *J. Invest. Dermatol.* 108: 302-306.
- Tokunaga, K., Taniguchi, H., Yoda, K., Shimizu, M. & Sakiyama, S. (1986) Nucleotide sequence of a full-length cDNA for mouse cytoskeletal  $\beta$ -actin mRNA. *Nucleic Acids Res.* 14: 2829.
- Toohey, L., Harris, M. A., Allen, K. G. D. & Melby, C. L. (1996) Plasma ascorbic acid concentration are related to cardiovascular risk factors in African-Americans. *J. Nutr.* 126: 121-128.
- Torii, Y., Hitomi, K. & Tsukagoshi, N. (1994) L-Ascorbic acid 2-phosphate promotes osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 mediated by accumulation of type I collagen. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 40: 229-238.

- Torii, Y., Hitomi, K. & Tsukagoshi, N. (1996) Synergistic effect of BMP-2 and ascorbate on the phenotypic expression of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 165: 25-29.
- Trickett, W. H., Welch, B. L. & James, G. S. (1956) Further critical values for the two-means problem. *Biometrika* 43: 203-207.
- Tso, J. Y., Sun, X. -H., Kao, T. -H., Reece, K. S., & Wu, R. (1985) Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNA: Genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acid Res.* 13: 2485-2502.
- Uchida, K., Fukuda, A., Kawakishi, S., Toyokuni, S., Hiai, H., Ikeda, S. & Horio, F. (1995) Acute nephrotoxicity of a carcinogenic iron chelate. Selective inhibition of a proteolytic conversion of  $\alpha_{2u}$ -globulin to the kidney fatty acid-binding protein. *FEBS Lett.* 357: 165-167.
- Uchida, K., Nomura, Y., Takase, H., Tasaki, T., Seo, S., Hayashi, Y. & Takeuchi, N. (1990) Effect of vitamin C depletion on serum cholesterol and lipoprotein levels in ODS (*od/od*) rats unable to synthesize ascorbic acid. *J. Nutr.* 120: 1140-1147.
- Unterman, R. D., Lynch, K. R., Nakhasi, H. L., Dolan, K. P., Hamilton, J. W., Cohn, D. V. & Feigelson, P. (1981) Cloning and sequence of several  $\alpha_{2u}$ -globulin cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 3478-3482.
- Van Dijck, P. & Verhoeven, G. (1992) Interaction of estrogen receptor complexes with the promoter region of genes that are negatively regulated by estrogens: the  $\alpha_{2u}$ -globulins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182: 174-181.
- Vandoren, G., Mertens, B., Heyns, W., Van Baelen, H., Rombauts, W. & Verhoeven, G. (1983) Different forms of  $\alpha_{2u}$ -globulin in male and female rat urine. *Eur. J. Biochem.* 134: 175-181.
- Van Snick, J. (1990) Interleukin-6: an overview. *Annu. Rev. Immunol.* 8: 253-278.
- Veerkamp, J. H., Maatman, R. G. H. & Prinsen, C. F. M. (1992) Fatty acid-binding proteins: structural and functional diversity. *Biochem. Soc. Trans.* 20: 801-805.
- Veerkamp, J. H., Peeters, R. A. & Maatman, R. G. H. J. (1991) Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1081: 1-24.
- Wegenka, U. M., Buschmann, J., Luticken, C., Heinrich, P. C. & Horn, F. (1993) Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol. Cell. Biol.* 13: 276-288.
- Winkhofer-Roob, B. M., Ellemunter, H., Fruhwirth, M., Schlegel-Haueter, S. E., Khoschorur, G., van't Hof, M. A. & Shmerling, D. H. (1997) Plasma vitamin C concentrations in patients with cystic fibrosis: evidence of associations with lung inflammation. *Am. J. Clin. Nutr.* 65: 1858-1866.
- Won, K.-A. & Baumann, H. (1990) The cytokine response element of the rat  $\alpha_1$ -acid glycoprotein gene is a complex of several interacting regulatory sequences. *Mol. Cell. Biol.* 10: 3965-3978.
- Yamaguchi, T., Horio, F., Hashizume, T., Tanaka, M., Ikeda, S., Kakinuma, A. & Nakajima, H. (1995) Bilirubin is oxidized in rats treated with endotoxin and acts as a physiological antioxidant synergistically with ascorbic acid in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214: 11-19.
- Yasueda, H., Nagase, K., Hosoda, A., Akiyama, Y. & Yamada, K. (1990) High-level direct expression of semi-synthetic human interleukin-6 in *Escherichia Coli* and production of N-terminus Met-free product. *Bio/Technology* 8: 1036-1040.

Zhou, D., Kusnecov, A. W., Shurin, M. R., DePaoli, M. & Rabin, B. S. (1993) Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma interleukin 6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* 133: 2523-2530.



## 謝辞

本研究を遂行するに当たり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました垣沼淳司教授に厚く御礼申し上げます。垣沼教授には、大学院研究生在籍中からの研究課題を続けたいという私の意志を温かくご理解いただき、幅広い視野からご指導をいただきました。また、本論文作成にあたり、並々ならぬご配慮をいただきましたことを心から感謝申し上げます。

終始懇切丁寧なご指導を賜りました堀尾文彦助教授に深謝申し上げます。堀尾助教授には、大学院研究生在籍中から7年間にわたり、実験や学会発表、論文作成についてご指導をいただきました。

本研究を行うに際し様々な角度から有益なご助言をくださり、本論文の内容に関し適切なアドバイスをくださいました小田裕昭助教授に心から御礼申し上げます。

大学院後期課程入学時からご指導、ご助言くださいました本生命農学研究科の塚越規弘教授に深く感謝いたします。

タンパク質の精製ならびにアミノ酸配列決定の際には、本生命農学研究科の松田 幹教授にご指導いただきました。御礼申し上げます。

また、本研究を遂行するために貴重な実験材料を快く提供してくださいました秋山由紀雄博士(味の素中央研究所)、加藤茂明博士(東京農業大学)、熊沢義雄博士(北里大学)、中村研三教授(名古屋大学)、人見清隆助教授(名古屋大学)、W. Northeman 博士(elias Entwicklungslabor für Immunoassays)、J. M. Taylor 博士(Gladstone Foundation Laboratories)に感謝の意を表します。

大学院研究生在籍中から7年の間、多大な協力と励ましのお言葉をいただきました栄養生化学講座の学生の皆様に心から感謝いたします。また、研究を快適に行うための環境づくりに常に配慮してくださいました河本祐子事務官に御礼申し上げます。

最後になりましたが、名古屋大学名誉教授 吉田 昭先生は、大学院研究生として快く受け入れてくださり、研究の場を与えてくださいました。厚く御礼申し上げます。

平成十年三月

池田 彩子

## 報文目録

---

1. Ikeda, S., Horio, F., Yoshida, A. & Kakinuma, A. (1996) Ascorbic acid deficiency reduces hepatic apolipoprotein A-I mRNA in scurvy-prone ODS rats. *J. Nutr.* 126: 2505-2511.
2. Ikeda, S., Takasu, M., Matsuda, T., Kakinuma, A. & Horio, F. (1997) Ascorbic acid deficiency decreases the renal level of kidney fatty acid-binding protein by lowering the  $\alpha_2$ -globulin gene expression in liver in scurvy-prone ODS rats. *J. Nutr.* 127: 2173-2178.
3. Ikeda, S., Horio, F. & Kakinuma, A. (1998) Ascorbic acid deficiency changes hepatic gene expression of acute phase proteins in scurvy-prone ODS rats. *J. Nutr.* 128: *in press*.

## 参考論文目録

---

1. Uchida, K., Fukuda, A., Kawakishi, S., Toyokuni, S., Hiai, H., Ikeda, S. & Horio, F. (1995) Acute nephrotoxicity of a carcinogenic iron chelate. Selective inhibition of a proteolytic conversion of  $\alpha_{2U}$ -globulin to the kidney fatty acid-binding protein. *FEBS Lett.* 357: 165-167.
2. Yamaguchi, T., Horio, F., Hashizume, T., Tanaka, M., Ikeda, S., Kakinuma, A. & Nakajima, H. (1995) Bilirubin is oxidized in rats treated with endotoxin and acts as a physiological antioxidant synergistically with ascorbic acid in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214: 11-19.
3. 池田彩子、堀尾文彦 (1997) リポタンパク質の代謝調節を介した抗動脈硬化因子としてのアスコルビン酸の機能 *ビタミン* 71 巻 100-102

