



Title	新規ABC膜輸送体のノックアウトマウス作成と機能解析
Author(s)	久保, 義行
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44146">https://hdl.handle.net/11094/44146</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

新規 ABC 膜輸送体の  
ノックアウトマウス作成と機能解析

2003年

久保 義行

# 目次

目次	I
序論	3
略号・記号	10
本論	
第1章 材料と方法	11
第1節 実験材料	11
第2節 遺伝子工学的手法	14
第3節 生化学的手法	24
第4節 細胞生物学的手法	30
第2章 脳・神経系に発現する新規 ABC 膜輸送体の検索	33
はじめに	33
第1節 縮重プライマーの作成と RNA ソースの選定	35
第2節 RT-PCR による新規遺伝子スクリーニング	37
第3節 考察	39
第3章 新規 ABC 膜輸送体の完全長 cDNA クローニング	41
はじめに	41
第1節 新規 ABC 膜輸送体・完全長 cDNA クローニング	42
第2節 mABCA5 の臓器分布解析	48
第3節 培養細胞における mABCA5 の発現	50
第4節 考察	54
第4章 ABCA5 ノックアウトマウスの作成	56
はじめに	56
第1節 ターゲティングベクターの構築	58
第2節 相同組換え体のスクリーニング	61
第3節 キメラマウスの作成	65
第5節 考察	69
第5章 ABCA5 ノックアウトマウスの解析	70

はじめに	70
第1節 ABCA5 ノックアウトマウスの表現型	71
第2節 考察	81
総括	83
参考文献	86
謝辞	88
論文目録	89

# 序論

ヒトを含む高等生物では、生細胞から様々な物質が排出（放出）されている。その代表例としては、肝臓における代謝物の胆汁排泄が挙げられる。胆汁排泄とは、生体内に取り込まれた異物や薬物が肝臓において抱合を受け、グルタチオン酸抱合体やグルクロン抱合体となり胆汁中に放出されるというシステムである (1)。胆汁排泄の分子機構は、肝細胞の胆管側膜上に発現するトランスポーター・cMOAT (canalicular multi-specific organic anion transporter, ABCC2) の働きによって、グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体が肝細胞内から細胞外へ輸送されるというものである (2)。

細胞から放出される物質群には、抱合体などの他に生体情報伝達分子が挙げられる。現在、生体情報伝達分子の分泌機構として開口放出が知られている。グルタミン酸やカテコールアミン類などは、小胞体膜上に発現する VGLUT や VMAT によって小胞体内腔に輸送され、充填される。また、インスリンなどのペプチド分子はシグナルシーケンスの働きにより、分泌小胞内に封入される (3,4)。小胞内に蓄えられた生体情報伝達分子は、その後、開口放出によって細胞外に分泌される。

＜表 1；分泌機構が解明されていない生体情報分子の例＞

分類	名称
ステロイドホルモン	プロゲステロン コルチゾール エストロゲン
脂質メディエーター	ロイコトリエン類 プロスタグランジン類 スフィンゴシン-1-リン酸
ペプチド性情報分子	インターロイキン-1 bFGF CNTF Lectin L-14 リポコルチン パラチモシン $\alpha$ -プロチモシン factor XIIIa

しかしながら、エストロゲンなどのステロイドホルモン類、プロスタグラ

ンジン、スフィンゴシン-1-リン酸などの脂質メディエーター類、インターロイキン-1 などのシグナルシーケンスを有していないペプチド性分子などは開口放出によらずに分泌されるが、その分泌機構は知られていない。しかし、生体内において、これらの分泌は厳密に制御されており、これを担う膜輸送体が存在するはずである（表 1）。

本研究室では、生体情報伝達物質分泌装置の候補としてトランスポーターを取り上げ、そのトランスポーターの同定と機能を詳しく解析するプロジェクトが計画された。本プロジェクトにおいては 2 通りのストラテジーが考えられた。その 1 つは情報伝達分子を分泌していることが明らかな細胞・組織において、その分子実体の同定を行うことである。これに関しては、血小板におけるスフィンゴシン-1-リン酸の放出（5）が研究対象となった。また、もう 1 つは、情報伝達関連組織・細胞から新規遺伝子を検索し、その機能を明らかにすることである。私は、2 つ目のストラテジーを担当することとなり、ABC トランスポーターを検索のターゲットとした。

ABC トランスポーター(ATP Binding Cassette transporter)は ATP を加水分解し、そのエネルギーを利用して物質を輸送する膜輸送体である。形質膜に発現する分子種は、物質を細胞内から細胞外へ輸送する。また、小胞体などのオルガネラ膜状に発現する分子種は、物質を細胞質側からオルガネラ内腔に輸送する（図 1）。ABC トランスポーターは、一般的に 12 回膜貫通構造であり、ATP 結合領域である NBD (Nucleotide Binding Domain) が 2 箇所存在する（6,7,8）（図 2）。また、ヒトゲノムプロジェクトの成果として、現在、約 50 種類の ABC トランスポーターが知られるようになっている。アミノ酸レベルの相同性および予想される構造から、A、B、C、D、E、F、G という 7 つのサブファミリーに分類されている（9）（表 2）。

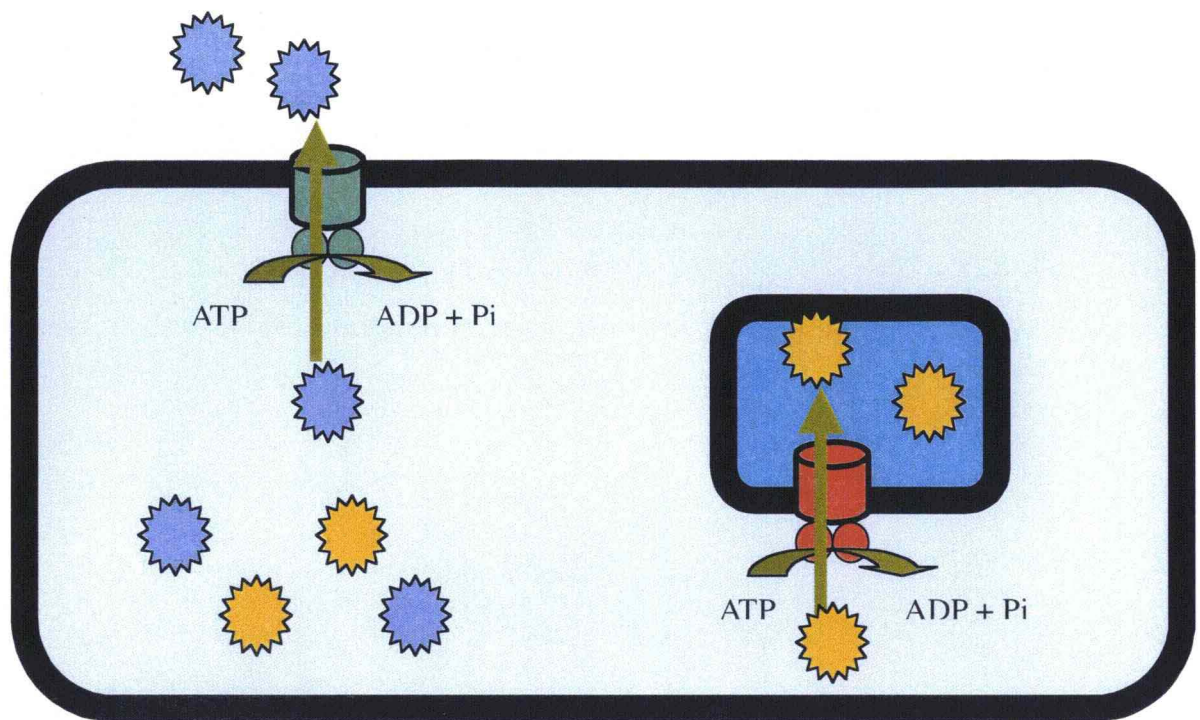
当初、ABC トランスポーターは癌細胞多剤耐性因子として見出された。代表例としては、MDR1(multi drug resistance 1, p-gp, ABCB1)、MRP1(multi drug resistance protein 1)が挙げられる。MDR1 は、癌細胞において構造や作用点の異なる多くの抗癌剤（ビンブラスチン、アドリアマイシン、VP-16、タキソール）を細胞内から細胞外へ排出するポンプとして機能している（10）。正常組織においては、MDR1 は脳や精巣の毛細血管内皮、腎近位尿細管などに発現

している。脳における例を取り上げると、mdr1 ノックアウトマウスにおいて、種々の薬剤の脳内蓄積量が増大する。このことから、MDR1 が血液-脳関門として機能していることが明らかとなっている（図 3）（11,12）。

また、小胞体に発現する TAP（Transporter associated with antigen presentation, ABCB2 および ABCB3）は免疫の抗原提示システムで重要な役割を果たしている。TAP は half-type トランスポーターと呼ばれるもので、TAP1 と TAP2 がヘテロダイマーを形成する。ウイルスなどが産生するタンパク質は細胞質で分解を受け、抗原ペプチドが生じる。TAP は抗原ペプチドを小胞体内腔に輸送する。抗原ペプチドは MHC クラス I と結合し、細胞表面において提示される（抗原提示）（13,14,15,16,17）。

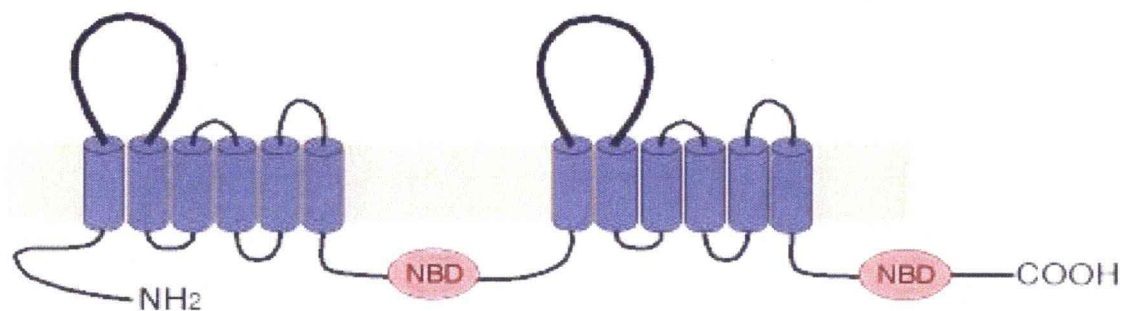
ABCR（ABCA4）は遺伝病・Stargardt 病の原因遺伝子である。Stargardt 病は萎縮性の斑状病変を伴う黄色斑眼底であり、失明に至る重篤な疾病である（18）。ABCR は網膜において特異的に発現している（19）。レチナール誘導体・N-レチニリデンホスファチジルエタノールアミン（N-RPE）の輸送体であり、網膜におけるレチナール再生に関与することが明らかにされている（20）。遺伝子疾患原因遺伝子となるものは、ABCR の他にも存在しており、ALDP（ABCD1）の欠損による副腎脳白質ジストロフィー、ABCA1 欠損による Tangier 病などが例として挙げられる。副腎脳白質ジストロフィーは、中枢神経の脱髄や副腎不全を呈するが、ABCD1 の欠損によってペルオキシソームにおける極長鎖脂肪酸輸送が行われなくなることが原因であると考えられている（21）。Tangier 病では、扁桃肥大などが生じ、さらに動脈硬化のリスクが増大する（22）。これは ABCA1 の変異により、肝臓へのコレステロール逆輸送が停止してしまう（23）ことが原因である（表 3）。

以上の知見から明らかなように、ABC トランスポーターは、特定の臓器・オルガネラに発現し、多様な生理的役割を担っている。本研究は「ABC トランスポーターは生体情報伝達物質分泌装置の候補である。」という仮説（図 4）をもとに、脳などの除法伝達関連組織・細胞に発現する新規 ABC トランスポーター遺伝子をクローニングし、その生理的役割を明らかにすることを目指したものである。



<図 1 ; ATP Binding Cassette transporter>

ABC トランスポーターは ATP を加水分解し、ペプチドや脂質、薬剤などの基質を細胞内から細胞外へ、あるいはオルガネラの内腔に輸送する膜輸送体である。



<図 2 ; ABC transporter の一般的構造>

ABC トランスポーターは一般的に 12 回膜貫通構造であり、細胞質側に 2 箇所の ATP 結合領域・NBD を有することが特徴である。NBD には保存性の高いモチーフが存在し、N 末端側から Walker A、Signature、Walker B という配置を取っている。ABC トランスポーターのなかには、ハーフタイプと呼ばれるものが存在するが、これらはホモあるいはヘテロダイマーを形成して機能している。



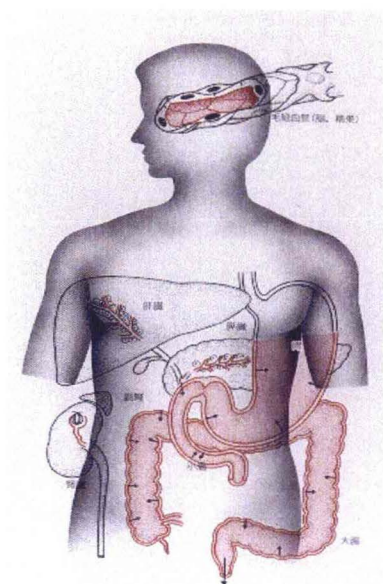
**Table 1. List of Human ABC Genes, Chromosomal Location, and Function**

Gene	Alias	Location	Subfamily	Expression	Function
ABCA1	ABC1	9q31.1	ABC1	Ubiquitous	Cholesterol efflux onto HDL
ABCA2	ABC2	9q34	ABC1	Brain	Drug resistance
ABCA3	ABC3, ABC3C	16p13.3	ABC1	Lung	
ABCA4	ABCR	1p22.1-p21	ABC1	Photoreceptors	N-retinylidene-PE efflux
ABCA5		17q24	ABC1	Muscle, heart, testes	
ABCA6		17q24	ABC1	Liver	
ABCA7		19p13.3	ABC1	Spleen, thymus	
ABCA8		17q24	ABC1	Ovary	
ABCA9		17q24	ABC1	Heart	
ABCA10		17q24	ABC1	Muscle, heart	
ABCA12		2q34	ABC1	Stomach	
ABCA13		7p11-q11	ABC1	Low in all tissues	
ABCB1	PGY1, MDR	7p21	MDR	Adrenal, kidney, brain	Multidrug resistance
ABCB2	TAP1	6p21	MDR	All cells	Peptide transport
ABCB3	TAP2	6p21	MDR	All cells	Peptide transport
ABCB4	PGY3	7q21.1	MDR	Liver	PC transport
ABCB5		7p14	MDR	Ubiquitous	
ABCB6	MTABC3	2q36	MDR	Mitochondria	Iron transport
ABCB7	ABC7	Xq12-q13	MDR	Mitochondria	Fe/S cluster transport
ABCB8	MABC1	7q36	MDR	Mitochondria	
ABCB9		12q24	MDR	Heart, brain	
ABCB10	MTABC2	1q42	MDR	Mitochondria	
ABCB11	SPGP	2q24	MDR	Liver	Bile salt transport
ABCC1	MRP1	16p13.1	CF/MRP	Lung, testes, PBMC	Drug resistance
ABCC2	MRP2	10q24	CF/MRP	Liver	Organic anion efflux
ABCC3	MRP3	17q21.3	CF/MRP	Lung, intestine, liver	Drug resistance
ABCC4	MRP4	13q32	CF/MRP	Prostate	Nucleoside transport
ABCC5	MRP5	3q27	CF/MRP	Ubiquitous	Nucleoside transport
ABCC6	MRP6	16p13.1	CF/MRP	Kidney, liver	
CFTR	ABCC7	7q31.2	CF/MRP	Exocrine tissue	Chloride ion channel
ABCC8	SUR	11p15.1	CF/MRP	Pancreas	Sulfonylurea receptor
ABCC9	SUR2	12p12.1	CF/MRP	Heart, muscle	
ABCC10	MRP7	6p21	CF/MRP	Low in all tissues	
ABCC11	MRP8	16q11-q12	CF/MRP	Low in all tissues	
ABCC12	MRP9	16q11-q12	CF/MRP	Low in all tissues	
ABCD1	ALD	Xq28	ALD	Peroxisomes	VLCFA transport regulation
ABCD2	ALDL1, ALDR	12q11-q12	ALD	Peroxisomes	
ABCD3	PXMP1, PMP70	1p22-p21	ALD	Peroxisomes	
ABCD4	PMP69, P70R	14q24.3	ALD	Peroxisomes	
ABCE1	OABP, RNS41	4q31	OABP	Ovary, testes, spleen	Oligoadenylate binding protein
ABCF1	ABC50	6p21.33	GCN20	Ubiquitous	
ABCF2		7q36	GCN20	Ubiquitous	
ABCF3		3q25	GCN20	Ubiquitous	
ABCG1	ABC8, White	21q22.3	White	Ubiquitous	Cholesterol transport?
ABCG2	ABCP, MXR, BCRP	4q22	White	Placenta, intestine	Toxin efflux, drug resistance
ABCG4	White2	11q23	White	Liver	
ABCG5	White3	2p21	White	Liver, intestine	Sterol transport
ABCG8		2p21	White	Liver, intestine	Sterol transport

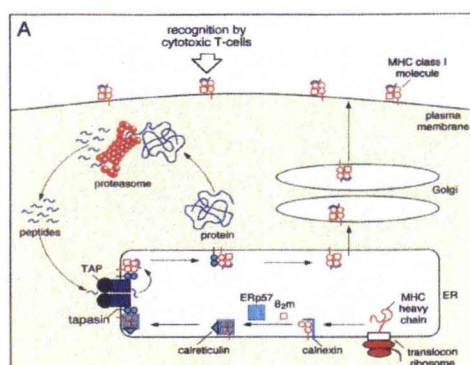
## <表 2；ゲノムプロジェクトの成果と分類>

ヒトゲノムプロジェクトによって、これまでに約 50 種類の ABC トランスポーターの存在が明らかにされている。構造・アミノ酸配列創造性から、7 つのサブファミリーに分類されている。

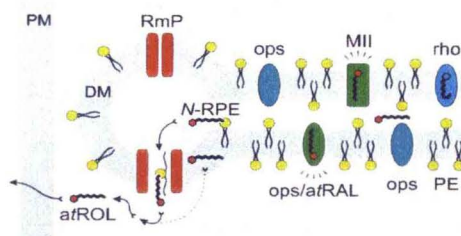
A



B

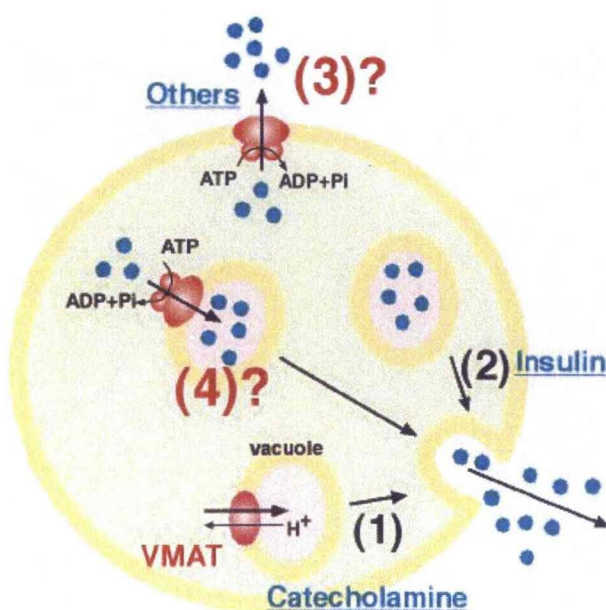


C



### ＜図 3；ABC トランスポーターの生理的役割＞

ABC トランスポーターは、抗癌剤多剤耐性因子として見出された。その研究は進み、生体防御機構、抗原提示、網膜におけるレチナール再生などに関わる分子種が見出された。



### ＜図 4；仮説～ABC トランスポーターは分泌装置か？＞

ステロイドホルモン、脂質メディエーターなどの分泌機構は同定されていない。図中の (3) や (4) の機構がその実体であろうか？

Subfamily	Gene	Disorder
A	ABCA1	タンジール病
A	ABCA4 (ABCR)	Stargardt病
B	ABCB2 (TAP1)	免疫不全
B	ABCB3 (TAP2)	免疫不全
B	ABCB4 (ABC21)	進行性胆汁鬱滞
B	ABCB7 (ABC7)	鉄利用不能性貧血
B	ABCB11 (SPGP)	進行性胆汁鬱滞
C	ABCC2 (cMOAT)	Dubin-Johnson症候群
C	ABCC6 (ABC34)	弾性繊維性仮性黄色腫
C	ABCC7 (CFTR)	嚢胞性繊維症
C	ABCC8 (SUR1)	高インスリン血性低血糖症
D	ABCD1 (ALDP)	副腎脳白質ジストロフィー
G	ABCG5	Sitosterolemia
G	ABCG8	Sitosterolemia

<表 3 ; 遺伝子疾患原因遺伝子>

## 略号・記号

AGE	agarose gel electrophoresis
AGPC	acid guanidinium-phenol-chloroform
Amp	ampicillin
BAP	bacterial alkaline phosphatase
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, disodium salt
bp	base pair
BSA	bovine serum albumin
CIAA	chloroform-isoamyl alcohol
CTAB	hexadecyltrimethylammonium bromide
DIG	digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DW	distilled water
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ES	embryonic stem
EtOH	ethanol
FBS	fetal bovine serum
HCTC	heat inactivated tetracycline
kb	kilo base pair
kDa	kilo Dalton
KM	kanamycin
Kpi buffer	potassium-phosphate buffer
LIF	leukemia inhibitory factor
MCS	multi cloning site
MW	molecular weight
mABCA5	mouse ABCA5
NBD	nucleotide binding domain
NBT	nitro blue tetrazolium
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylene glycol
PIPES	piperazine-1,4-bis(2-ethanesulphonic acid)
RIPA	radioimmuno precipitation
rpm	round per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
TBS	Tris buffered saline
TE buffer	Tris-EDTA buffer
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
r.t.	room temperature
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
Triton X-100	polyethylene glycol mono-p-isooctylphenyl ether

# 本論

## 第 1 章 材料と方法

### 第 1 節 実験材料

#### 動物、細胞、菌株、プラスミド

動物は清水実験材料より購入した。動物組織からの Total RNA 等の抽出は BALB/c マウスあるいは ICR マウスを解体して得られる臓器および組織を用いた。実験に用いた動物細胞は、COS-7、CHO、P19 (EC 細胞)、TT2 (ES 細胞) である。また、TT2 のフィーダー細胞として、マウス胎児 (E14~16) の繊維芽細胞を用いた。プラスミドの調製、及びライゲーション後のトランスフォーメーションには大腸菌 DH5  $\alpha$  あるいは XL10-Gold を使用した。サブクローニング用のベクターは、pBluescript SK(+/-) (STRATAGENE) あるいは pGEM-T vector™ (Promega) を使用した。

#### 培地

##### 1) LB 培地

Bacto tryptone (Difco)	10 g
Bacto yeast extract (Difco)	5 g
塩化ナトリウム	5 g/l

##### 2) LB 寒天培地

Bacto tryptone (Difco)	10 g
Bacto yeast extract (Difco)	5 g
塩化ナトリウム	5 g
寒天	15 g/l

### 3) SOC 培地

Bacto tryptone (Difco)	20 g
Bacto yeast extract (Difco)	5 g
1 M 塩化ナトリウム	10 ml
1 M 塩化カリウム	2.5 ml(pH 7.4)/l

以上をオートクレーブし、冷却後、別殺菌した以下を添加する。

1 M 硫酸マグネシウム	10 ml
1 M 塩化マグネシウム	10 ml
2 M グルコース	10 ml/l

### 4) SOB 培地

Bacto tryptone (Difco)	6 g
Bacto yeast extract (Difco)	1.5 g
塩化ナトリウム	0.15 g
塩化カリウム	0.057 g
2N 水酸化ナトリウム	0.15 ml/300 ml

以上をオートクレーブし、冷却後、別殺菌した以下を添加する。

1 M 硫酸マグネシウム	3 ml/300 ml
1 M 塩化マグネシウム	3 ml/300 ml

### 5) ダルベッコ変法イーグル培地「ニッスイ」 (DMEM)

本品 9.5 g をミリQ水に溶解し、全量を 900 ml とした後、121℃、20 分間高圧蒸気滅菌を行った。その後、以下のものを無菌的に加えた。

FBS	50m l /500m l
L-グルタミン (200 mM)	500 $\mu$ l/500m l
7.5% (w/v) NaHCO <sub>3</sub>	約 10m l /500m l

ペニシリン/カナマイシン (30 mg/ml) 1 ml/500 ml

ペニシリン/カナマイシンは、特に必要でない場合は加えていない。

### 6) ES 細胞およびフィーダー細胞用 High glucose DMEM (500 ml)

以下のものを、ミリQ水 430 ml に溶解し、高圧蒸気滅菌を行う。

ダルベッコ変法イーグル培地「ニッスイ」	4.75 g/430 ml
グルコース	1.75 g/430 ml

その後、以下のものを、無菌的に加える。

L-グルタミン (5.8 g/200 ml)	10 ml/500 ml
7.5% (w/v) NaHCO <sub>3</sub>	約 10 ml/500 ml

その後、フィーダー細胞用は FBS[f.c.10% (v/v)]を加えて使用。また、ES 培養用は、LIF（白血病阻止因子/本研究では、LIF 一過性発現株の培地上清を使用）を 1000 倍希釈になるように加え、それをストック液として、以下のものを無菌的に加えて使用した。

ストック液 (high glucose DMEM + LIF)	34 ml
Knockout Serum Replacement (Gibco)	6 ml
β-メルカプトエタノール (7 μl/10 ml)	0.4 ml

### 抗生物質、遺伝子工学研究用酵素類、その他の試薬

アンピシリンはナカライテスクより、カナマイシンは和光純薬より購入した。DNA Ligation Kit Ver.2(6022)は宝酒造より購入した。遺伝子工学に用いた制限酵素、修飾酵素は宝酒造、東洋紡、New England BioLabs より購入した。その他の試薬は全て試薬特級のものを使用した。

### 抗血清、抗体

Alkaline phosphatase 標識ヤギ抗 DIG 抗体は Roche Diagnostics より購入した。また、一部のポリクローナル抗体は医学生物学研究所 (MBL) への委託により作製した。抗ウサギ IgG などの 2 次抗体は VECTOR 社より購入した。

## 第 2 節 遺伝子工学的手法

### DNA 調製法

#### (1) プラスミド DNA の調製～Alkaline lysis 法

##### 【試薬】

solution 1 : 25 mM Tris-HCl(pH8.0), 10mM EDTA2Na, 50 mM gulcose, 2  
mg/ml lysozyme

solution 2 : 0.2N NaOH, 1% (w/v) SDS

solution 3 : 3M K<sup>+</sup>-5M acetate solution

TE buffer : 10 mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA2Na

TE saturated phenol : 核酸抽出用フェノールに TE buffer を飽和させて、  
4℃で一晩静置したもの

CIAA : chloroform : isoamyl alcohol = 24 : 1(vol. : vol.)

1mg/ml RNase : ribonuclease(RNase)A (Sigma) を TE buffer に溶解し、100℃  
で 15 分間加熱処理したもの

PEG-NaCl : 20%(w/v) polyethyleneglycol 8000(Sigma), 2.5M NaCl

##### 【方法】

1. 目的のプラスミドを保持する大腸菌を適当な薬剤を含む 2×YT 培地で培養し、その培養菌液約 3ml を 1.5ml チューブに取り、室温で 15000Xg、1 分間遠心分離して集菌した。
2. 上清を取り除き、solution1 120 μl を加えてサスペンドし、室温で 5 分間放置した。
3. solution2 240 μl を加えて転倒混和し、室温で 5 分間放置後、氷中で 5 分間放置した。
4. solution3 180 μl を加えて転倒混和し、氷中で 30 分間放置した。
5. 15000Xg 4℃で 10 分間遠心分離し、上清を別のチューブに分取した。これに等量の TE saturated phenol を加えて 3 分間転倒混和した（フェノール処理）。
6. 15000Xg、室温で 3 分間遠心分離し、上清を 1.5 ml チューブに分取し、これに等量の CIAA を加えて 3 分間転倒混和した。（CIAA 処理）
7. 15000Xg、室温で 3 分間遠心分離し、上清を 1.5 ml チューブに分取し、これ



- に 99.5%エタノール（室温保存）1 ml 加えて転倒混和し、室温で 10 分間放置して DNA の沈殿を形成させた。
8. 15000Xg、室温で 10 分間遠心分離し、上清を完全に除去し、沈殿を 70%(v/v) エタノール（-20℃保存）でリンスし、減圧下で 3 分間乾燥させた。
  9. マルチコピープラスミドの場合は TE buffer を 50  $\mu$ l、ローコピープラスミドの場合は 20  $\mu$ l 加えて沈殿を溶解した。1 mg/ml RNase を 1  $\mu$ l 加え、37℃で 30 分間 RNA を消化後、-20℃で保存した。  
通常はこの DNA 溶液を用い、DNA Sequencing の鋳型として用いる場合には、更に以下の操作を行った。
  10. 蛍光ラベルを用いる場合には、1~2 本分に、3/5 容量の PEG-NaCl を加えて混和し、氷中で 2 時間放置した。
  11. 15000Xg、4℃で 10 分間遠心分離し、上清を完全に除去し、沈殿を 70%(v/v) エタノール（-20℃保存）でリンスし、減圧下で 3 分間乾燥させた。
  12. 沈殿を TE buffer を 5~15  $\mu$ l に溶解した。

### ファージ DNA 調製法 (Plate lysate 法)

#### 【試薬・装置】

##### 10 x SM

NaCl	5.83 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.465 g
1M Tris-HCl (pH 7.5)	35 ml
H <sub>2</sub> O	15 ml

↓ Autoclave

Store at 4℃

##### 1x SM (with gelatin)

10 x SM	5 ml
2%(w/v) Gelatin	0.25 ml
H <sub>2</sub> O	45 ml

↓ Autoclave

Store at 4℃

#### LB/MgSO<sub>4</sub>

LB broth	1 L
<u>1M MgSO<sub>4</sub></u>	<u>10 ml</u>

↓ Autoclave

Store at r.t.

#### LB/MgSO<sub>4</sub> agar

LB broth	1 L
1M MgSO <sub>4</sub>	10 ml
<u>agar</u>	<u>15 g</u>

↓ Autoclave

Store at r.t.

#### LB/MgSO<sub>4</sub>/Maltose broth

LB/MgSO <sub>4</sub> broth	100 ml
<u>20%(w/v) Maltose</u>	<u>1 ml (濾過滅菌済みのもの)</u>

↓ Autoclave

Store at r.t.

#### LB/MgSO<sub>4</sub> top agar

LB broth	1 L
1M MgSO <sub>4</sub>	10 ml
<u>agarose</u>	<u>7 g</u>

↓ Autoclave

Store at r.t.

#### 【方法】

ファージストック液を 1x SM で希釈し、総量 1000  $\mu$ l とする。

1. このファージ液に宿主大腸菌液 (K802) 1000  $\mu$ l を加え、インキュベートする(37°C, 15 min)。
2. トップアガーを各チューブに 7~11 ml 分注し、45°C で保温しておく。
3. これとインキュベート後のファージ-宿主混合液を 200  $\mu$ l/1 チューブの割合で

- 混合し、手早く、角シャーレ（滅菌 2 号）の LB/MgSO<sub>4</sub> agar 上にまく。
4. シャーレをラップで包み、37°C でインキュベートする。
  5. プラークがコンフルエントに形成されていることを確認し、1x SM (with gelatin) を 5 ml/1 シャーレごと加える。また、この際、クロロホルムを数滴（200μl ほど）垂らしておく。この状態で、4°C、O/N あるいは振盪、室温を 6 時間行う。
  6. プレートライゼートを採取し、遠心（15K, 30 min. 4°C）により菌体を除去する。
  7. 上清に DNase (f.c. 1 μg/ml) および RNase (f.c. 1 μg/ml) を加えインキュベート（37°C, 30 min）する。
  8. 上清をガラス製ビーカーに移し、NaCl (5.844 g/100 ml) を加えてスターラーバーで溶解させる。この後、氷上でインキュベート（0°C, 30 min）。
  9. 遠心（15K, 30 min. 4°C）により上清を採取。
  10. 上清をガラス製ビーカーに移し、PEG 6000 (M.W.=7300~9000) を 10 g/100 ml の割合で加えてスターラーバーで溶解させる。速やかに、遠心（15K, 10 min. 4°C）し、上清を捨てる。チューブ内をキムワイプで拭き取り、沈殿物（ファージ粒子）を採取。
  11. 沈殿物（ファージ粒子）を 1x SM (with gelatin) 470 μl/チューブの割合で溶解（ピペッティング&vortex）し、1.5 ml チューブに移す。
  12. 遠心（15K, 10 min. 4°C）し、上清を採取。
  13. 上清に等量のクロロホルムを加え、vortex (30 sec)。
  14. 遠心（15K, 10 min. 4°C）し、水層を採取。
  16. 下記の反応液を作製し、50°C で一晩インキュベートする。

ファージ液	400 μl
0.5M EDTA2Na	17.1 μl (f.c. 20 mM)
20%(w/v) SDS	9.8 μl (f.c. 0.5%)
<u>20mg/ml Proteinase K</u>	<u>1 μl (f.c. 50 μg/ml)</u>
  17. 反応液と等量のフェノールを加え、緩やかに混和する。
  18. 遠心（15K, 10 min. 4°C）し、水層を採取。
  19. 等量のクロロホルムを加え、緩やかに混和する。
  20. 遠心（15K, 10 min. 4°C）し、水層を採取。

- 21.水層の 1/10 量の 3M NaOAc を加え、次に 2～2.5 倍量の 100%EtOH を加える。
- 22.遠心 (15K, 10 min, 4°C) し、上清を捨てる。
- 23.70%(v/v)EtOH でリンスし、沈殿 (ファージ DNA) を Dry up する。
- 24.適当量の TE を加え、ファージ DNA を溶解する。
- 25.一部をアガロース電気泳動し、ファージ DNA の量・純度を確認する。純度が低い場合は、CTAB (ナカライ) でポリサッカライドの除去が可能である。

以上が、一般的なファージ DNA の抽出法だが、Lambda Midi Kit (キアゲン社) を用いると、大量かつ高純度のファージ DNA が簡便に調製できる。

### **Total RNA 調製法**

動物組織・細胞からの total RNA の抽出は、AGPC 法で行った。この際、フェノール製剤である Sepasol (ナカライ) を用いると、簡便かつ良質のサンプルを得ることができる。臓器の破碎には、ポリトロンホモジナイザーPT3100 (KINEMATICA) を用いた。

### **逆転写反応 (一本鎖 cDNA 合成)**

RNA から cDNA を合成する逆転写反応は、ReverTra Ace (TOYOBO 社)を用いた。ReverTra Ace および RNase Inhibitor 以外を含む反応液を作製してインキュベート (72°C, 2 min) し、速やかに氷上で冷却する (熱変性)。その後、ReverTra Ace および RNase Inhibitor を加え、インキュベート (42°C, 30 min～2 hr ; 合成反応) する。

poly (A)+RNA	0.4 µg
oligo(dT)	25 pmol
5x Buffer	4 µl
10mM dNTPs	2 µl
ReverTra Ace	100 U
<u>RNase Inhibitor</u>	<u>20 U</u>
Total Volume	20 µl

## **PCR (Polymerase Chain Reaction)**

### **【試薬・装置】**

泳動・解析装置：GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)

実験に使用した主要な酵素は、*rTaq* (TOYOBO)、*Ex Taq*(TaKaRa)、*LA Taq*(TaKaRa)、KOD DNA polymerase (TOYOBO)、*PyroBest* DNA polymerase である。新規遺伝子検索・PCR スクリーニングには *rTaq* (TOYOBO)、*Ex Taq*(TaKaRa)、*LA Taq*(TaKaRa)、cDNA クローニングや発現系の構築には KOD DNA polymerase (TOYOBO)、*PyroBest* DNA polymerase を用いた。

## **Sequencing**

Dye Terminator 法を用いて行った。

### **【試薬・装置】**

泳動・解析装置：ABI PRISM™310 sequencer

試薬                   : BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)  
未標識プライマー

### **【方法】**

1. 未標識プライマー0.8 pmol、鋳型 DNA 50~125 ng、プレミックス 2  $\mu$ l を PCR 用チューブ入れ、滅菌ミリ Q 水を加えて総量を 5  $\mu$ l にする。
2. GeneAmp PCR System 9700 により、所定の条件で PCR を行う。
3. G-50 (Amersham Pharmacia Biotech) を充填したスピニングカラムに、PCR 反応液を加え、450XG、2 分間遠心する。
4. 精製後の PCR 反応液を Dry up し、ペレットを TSR 10  $\mu$ l に溶解させる。
5. 95℃、2 分間加熱し、氷上で急冷する。
6. シーケンサーにセットする。

## **制限酵素反応**

制限酵素反応は、各メーカー（宝酒造、東洋紡、New England BioLabs）が指示した条件に従い、各制限酵素添付の basal buffer または universal buffer を用いて行った。反応は通常プラスミド DNA 1  $\mu$ g あたり 2 U の制限酵素反応を用いて 2 時間以上行い、完全消化した。反応は stop dye を反応溶液の 1/4 量以上加えて停止させた。

### 【試薬】

stop dye : 10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA2Na, 0.5%(w/v) SDS, 30% (v/v) glycerol, 0.1%(w/v) bromophenol blue, 0.1% (w/v) xylene cyanol

### DNA の電気泳動

通常、0.5 kb 以上の DNA 断片、及び断片化していない DNA の確認にはアガロース電気泳動を、1 kb 以下の DNA 断片の確認、及び DNA 断片の精製にはポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。

#### (1) アガロース電気泳動

### 【試薬・装置】

アガロース : Agarose S (ニッポンジーン、Code:312-01193)

DNA 分子量マーカー :  $\lambda$  DNA *Eco*R I -*Hind*III double digest

電気泳動装置 : Mupid-2(コスモ・バイオ)

#### 50 x TAE buffer

Tris 242 g

NaOAc 20.6 g

EDTA2Na 18.6 g

add DW up to 1 L

### 【方法】

1. TAE buffer を用いて 0.8%(w/v)アガロースゲルを作製した。確認したい DNA 断片の長さに応じてアガロースゲルの濃度を適当に変化させた。
2. DNA 溶液に 1/4 量以上の Stop dye を加えたものをウェルにアプライした。
3. TAE buffer を泳動 buffer として、100V(定電圧)で泳動を行った。
4. ゲルを 1  $\mu$ g/ml の ethidium bromide 水溶液で 15 分間染色し、transilluminator(フナコシ、TDS-20)によりゲルの下面から 254nm の紫外線を照射し、DNA のバンドをポラロイドカメラ(フナコシ、DS-300)で写真撮影した。フィルムは T667 ISO 3000(Polaloid)を使用した。

## (2) アガロースゲルからの DNA 断片の精製

DNA 断片の精製は、Prep-A-Gene DNA Purification Systems (BIO-RAD 社)を用いた。

## (3) ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

### 【装置】

電気泳動装置：垂直型スラブ電気泳動泳動装置(ATTO)

### 【方法】

1. 以下のように試薬を混和し、5%ポリアクリルアミドゲルを作製した。（ゲルサイズ：200×200×2mm）

DW	28.7 ml
30%(w/v) acrylamide:bis(29:1)	7.0 ml
2% (w/v) ammonium persulfate	4.2 ml
10×TBE buffer	2.1 ml
TEMED	19.5 $\mu$ l

2. 0.5×TBE buffer を泳動バッファーとして、200V（定電圧）で1時間予備泳動した。
3. DNA 溶液に 1/4 量以上の stop dye を加えたものをウェルにアプライし、300V（定電圧）で本泳動を行った。
4. アガロース電気泳動と同様の方法でゲルを染色し,DNA のバンドを写真撮影した。

## (4) ポリアクリルアミドゲルからの DNA 断片の精製

### 【材料・装置】

透析チューブ：Seamless Cellulose Tubing 8/32(VISKASE SALES CORP)

電気溶出装置：サブマリン型電気泳動槽 AH-13（和科盛）

### 【方法】

1. ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、1  $\mu$ g/ml の ethidium bromide 水溶液で染色したゲルを transilluminator 上で 365 nm の紫外線を照射しながら、目的のバンドをエタノールで滅菌した剃刀で切り出した。
2. 切り出したゲルを、0.2×TBE buffer を満たした透析チューブに入れ、0.2×TBE

buffer を泳動バッファーとして電気泳動槽にセットし、200V（定電圧）で1時間泳動してゲルから DNA 断片を電気溶出させた。

3. 電圧を1分間反転させて泳動し、透析チューブに吸着した DNA 断片を溶出させた。
4. 透析チューブより溶出液を回収し、エタノール沈殿を行った。DNA 断片の沈殿は、通常 TE buffer 10  $\mu$ l に溶解し、-20℃で保存した。

### ベクターDNA断片の5'末端リン酸基の脱リン酸化（BAP 処理）

DNA 断片溶液 10  $\mu$ l に対し、1M Tris-HCl(pH8.0)を 10  $\mu$ l、*E. coli* alkaline phosphatase 2U、滅菌蒸留水を加えて反応溶液 200  $\mu$ l として 56℃で1時間反応させた。

2. 0.5M EDTA2Na (pH8.0)を 5  $\mu$ l 加えて反応を停止し、フェノール処理を3回くり返した後、CIAA 処理を行った。
3. エタノール沈殿を行い、DNA 断片の沈殿を TE buffer 10  $\mu$ l に溶解した。

### ライゲーション

#### 【試薬】

DNA Ligation Kit Version 2 (宝酒造)

#### 【方法】

調製したベクターDNA断片 1  $\mu$ l とインサート DNA 断片 2  $\mu$ l を混合し、I 液を 3  $\mu$ l 加え、16℃で2時間から一晩反応させた。全反応液をトランスフォーメーションに用いた。



## トランスフォーメーション

MnCl<sub>2</sub> 法を用いて行った。

### 【試薬】

Transformation Buffer

### 【方法】

Transformation Buffer の作製

PIPES	1.5 g
CaCl <sub>2</sub> 水和	1.1 g
KCl	9.3 g
ミリQ水	475 ml

KOH で pH6.7 に調製し、MnCl<sub>2</sub> 4 水和 5.45 g 加える。

その後、濾過滅菌を行う。

コンピテントセルの調製

1. LB 培地で前培養した菌液 1 ml を 3 L マイヤーフラスコ中の SOB 培地 300 ml に植菌し、610 nm の O.D.が 0.4~0.8 になるまで 18℃で振盪培養した。
2. 培養後、マイヤーフラスコを氷上で 10 分間静置し、その後、650Xg、4℃で 10 分間遠心分離して集菌し、上清を除去し、菌体を 4℃の Transformation Buffer 60 ml (総量)に穏やかにサスペンドし、氷中で 10 分間放置した。
3. 650Xg、4℃で 10 分間遠心分離して集菌し、上清を除去し、菌体を 4℃の Transformation Buffer 10ml (総量)に穏やかにサスペンドし、DMSO 0.75 ml を加え、氷中で 10 分間放置した。その後、100 μl ずつ分注してトランスフォーメーションに用いた。すぐに使用しない場合は-80℃で保存した。

### 第 3 節 生化学的手法

#### 超音波破碎膜調製法（細菌）

##### 【試薬】

1 mg/ml HCTC : chlortetracycline を蒸留水で溶解し、121℃で 20 分間オートクレーブ処理し、抗菌力を減弱化したもの。

##### 【方法】

1. 目的のプラスミドを保持する大腸菌株 single colony の 2×YT 培地培養菌液 1 ml を、2×YT 100 ml に植菌し、610 nm が 0.5 になるまで 37℃で培養した。終濃度 0.25 μg/ml の HCTC を加え、更に 2 時間培養して *tetA* 遺伝子の発現を誘導した。
2. 4500Xg、4℃で 10 分間遠心分離して集菌後、50 mM KPi buffer(pH7.0)で 1 度菌体を洗浄し、同 buffer 3 ml にサスペンドした。
3. 菌体懸濁液を 1.5 ml チューブに分注し、氷冷しながら、超音波破碎機 (BRANSON SONIFIER) で 30 秒間×3 回、15 秒間隔で超音波処理することにより、菌体を破碎した。
4. 15000Xg、4℃で 10 分間遠心分離して未破碎菌を除去し、上清を分取した。
5. 上清を 200000Xg、4℃で 30 分間遠心分離し、上清を完全に除去し、沈殿を 50 mM Kpi buffer(pH7.0) 50 μl にサスペンドした。

#### Cell lysate の調製（動物細胞）

##### 【試薬】

RIPA バッファー ; 10 mM Tris-HCl, pH7.4, 1 mM EDTA2Na, 150 mM NaCl, 1%(w/v) Triton X-100, 0.5% (w/v)sodium deoxycholate, 0.1% (w/v)SDS, 0.1 unit/ml aprotinin

PBS ; 137 mM, NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

##### 【方法】

細胞を PBS で 2 回洗浄し、RIPA バッファーで細胞をスクレイプする。チップ型ソニケーター (Microson<sup>TM</sup> ultrasonic disruptor、和研薬) を用いて、細胞懸濁液を超音波処理し、細胞を破碎した。未破碎細胞を遠心で分離除去し、上清を回収した。

## タンパク定量法

Lowry らの方法に従い、BSA を標準タンパク質として行った。

## SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

Laemmli の方法に従って行った。

### 【試薬・装置】

2× sample buffer : 0.125 M Tris-HCl(pH6.8), 4%(w/v)SDS, 10% β-mercaptoethanol, 20%(v/v) glycerol, 0.04%(w/v) bromophenol blue

running buffer : 25 mM Tris-192 mM glycine(pH8.4), 0.1% (w/v)SDS

泳動装置 : 垂直型スラブ電気泳動泳動装置(ATTO)

電気泳動装置 : 垂直型スラブ電気泳動泳動装置(ATTO)

### 【方法】

1. 以下のように試薬を混和し、SDS-polyacrylamide gel を作製した。

stacking gel (5% polyacrylamide, 0.125 M Tris-HCl(pH6.8), 0.1% SDS)

DW	2.7 ml
30.8% (w/v)acrylamide:bis(30:0.8)	0.8 ml
0.5 M Tris-HCl(pH6.8)	1.2 ml
10%(w/v) SDS	48μl
10% (w/v)ammonium persulfate	48 μl
TEMED	2.5 μl

separating gel (12% polyacrylamide, 0.5M Tris-HCl(pH8.8), 0.1% (w/v)SDS)

DW	4.2 ml
30.8%(w/v) acrylamide:bis(30:0.8)	5.0 ml
1.5 M Tris-HCl(pH8.8)	3.1 ml
10% (w/v)SDS	125 μl
10% (w/v)ammonium persulfate	63 μl
TEMED	4.2 μl

2. stacking gel では 15 mA、25 mA (定電流) で泳動後、Western blotting を行った。

## **Western Blot Analysis**

### **【試薬・装置】**

Alkaline phosphatase anti-rabbit IgG(H+L), goat, affinity purified (VECTOR, AP-100)

BCIP(和光純薬, 028-08663)

NBT(和光純薬, 144-0993)

blotting buffer : 25 mM Tris-192 mM glycine(pH8.3), 20% methanol

TBS(Tris-buffered saline) : 10 mM Tris-HCl(pH7.4), 0.15 M NaCl

carbonate buffer : 100 mM NaHCO<sub>3</sub>(pH9.8), 1 mM MgCl<sub>2</sub>

転写装置 : 湿式ゲルメンブラン転写装置 (MARYSOL)

### **【方法】**

1. SDS-polyacrylamide gel 電気泳動後、ゲルを nitrocellulose filter (0.22  $\mu$ m, TYPE GS: MILLIPORE) に密着させ、濾紙 (Whatman 3MM Chr) に挟み、転写装置にセットし、blotting buffer を用いて 60 V (定電圧) で、4 時間泳動し、タンパク質を nitrocellulose filter に転写させた。
2. filter は 3%(w/v) スkimミルクを含む TBS (スキムミルク-TBS) 中に室温で 30 分以上放置し、filter を blocking した。
3. 2 の操作に並行して、50 ml チューブ中で抗血清 30  $\mu$ l と宿主大腸菌株から調製した膜画分 30  $\mu$ l をスキムミルク-TBS 5 ml に混合し、室温で 30 分間放置し、非特異的な抗体を吸収させた。
4. 3 を 2 の filter 上に注ぎ、気泡を除いた後、室温で 30 分間放置して 1 次抗体反応を行った。
5. filter を 0.05% (w/v)Tween 20 を含む TBS(Tween-TBS)で 2 回すすぎ、同溶液で 10 分間 2 回洗浄し、更に TBS で 5 分間洗浄した。
6. 50 ml チューブ中で Alkaline phosphatase 標識抗ウサギ抗体 5  $\mu$ l をスキムミルク-TBS 5 ml に混合し、5 の filter 上に上に注ぎ、気泡を除いた後、室温で 30 分間放置して 2 次抗体反応を行った。
7. 5 と同様にして filter を洗浄した。
8. 50 mg/ml NBT 200  $\mu$ l, 25mg/ml BCIP 200  $\mu$ l, carbonate buffer 20 ml の混合液に filter を浸し、発色させた。発色後、filter を蒸留水で洗浄し、乾燥させた (遮光)。

## 核酸の検出 (Southern, Northern, Plaque hybridization)

### 【試薬・装置】

#### ゲル処理液 1 (0.25M HCl)

HCl	4	ml
DW	196	ml
total	200	ml

#### ゲル処理液 2 (1.5 M NaOH/0.5 M NaCl)

NaOH	12 g
NaCl	6 g
DW	200 ml
total	200 ml

#### Blotting buffer (0.4 M NaOH)

NaOH	8 g
DW	500 ml
total	500 ml

#### 20 x SSC

NaCl	175.3 g
クエン酸 3 ナトリウム 2 水和物	88.2 g
total	1 L

#### Hybridization buffer

1 M リン酸 buffer (pH 7.2)	25 ml
20%(w/v) SDS	2.5 ml
0.5 M EDTA2Na	100 $\mu$ l
DW	22.4 ml
total	50 ml

#### メンブレン (Hybond-N+, アマシャムファルマシア)

## 【方法】

ここでは、DIG-system を示す。

- 1.電気泳動終了後、ゲルをゲル処理液 1 に浸し、20 分間振盪する。
- 2.ゲル処理液 1 を捨て、ゲルを DW でリンスし、ゲル処理液 2 に浸し、20 分間振盪する。
3. ゲル処理液 2 を捨て、ゲルを DW でリンスし、組み立てたブロッティング装置にゲルの上面を下にして置く（よく空気を追い出す）。
- 4.ゲルの上にメンブレンを乗せ、さらにその上に濾紙を 2 枚乗せる。
- 5.通常、この状態で一晩置き、Blotting を行う。
- 6.メンブレンを 5 x SSC で数回洗う。
- 7.メンブレンを乾燥させ、その後、プレハイブリダイゼーション（65°C, 1hr）を行う。
- 8.プローブ添加のバッファーでハイブリダイゼーション（65°C, O/N）を行う。
- 9.3 段階でメンブレンを洗う。

I	0.1%(w/v)SDS/2×SSC, r.t., 15 min×2 回
II	0.1%(w/v)SDS/0.1×SSC, r.t., 5 min
III	0.1%(w/v)SDS/0.1×SSC, 68°C, 30 min×2 回
- 10.Blocking reagent (Roche)でブロッキングを行う(r.t., 3 hr)。
11. AP 標識 anti-DIG 抗体で抗体反応（r.t., O/N）
- 12.メンブレンを洗う。

0.1%(w/v)Tween/TBS（250 ml, r.t., 30 in×4 回）
---
- 13.NBT/BCIP 液で発色。

プラスミド DNA を解析する場合には、検出方法として、DIG-High Prime（Roche）および AP 標識抗ジゴキシゲニン抗体 Fab フラグメント（Roche）を用いた。

Genomic Southern の際には、Blotting buffer として 20xSSC を使用し、その後、50 mM NaOH（20 分間振盪）で核酸をメンブレンに固定した。検出方法は <sup>32</sup>P を用いた。機器は BAS-1000（FUJIFILM）を使用した。probe 作製には、MegaprimeDNA labelling systems (Amersham)を用いた。

また、Northern Blot は、既製メンブレンである Mouse Adult Tissue Blot（Seegene Inc.）を用いて行い、検出方法は <sup>32</sup>P を用いた。

また、Plaque Hybridization は DIG-High Prime (Roche) で行い、検出を化学発光で行った。化学発光検出のために、LAS-1000 (Fuji Film) および試薬として CDP-Star (Amersham)を用いた。

## 第 4 節 細胞生物学的手法

### マウス ES 細胞の培養

ES 細胞は極めてデリケートな細胞であり、培養条件が悪いと分化が生じる。このため、ES 細胞の培養に際しては、COS-7 などの細胞を扱う以上に、注意を払わなければならない。凍結保存から培養を始める際・継代・培地交換の作業は、丁寧に行う。培地交換は 24 時間に 1 回のペースで行う。

### 細胞への形質導入

トランスフェクションは、CHO、COS-7 に関しては、リポソーム法で行った。試薬としては Lipofectoamine2000 (Invitrogen) を用い、操作は添付のマニュアルに従って行った。また、ES 細胞への遺伝子導入はエレクトロポレーション法を用いた。条件に関しては、第 4 章で詳述する。

### 免疫染色法

ディッシュの底に 0.1%(w/v)ゼラチンでコーティングしたカバーガラス (MATSUNAMI、18 x 18 mm、Thickness 0.12~0.17mm) をおいた状態で、トランスフェクションを行った。24~48 時間後、カバーガラスを取り出し、PBS で 2 回洗浄した後、4%(w/v)パラホルムアルデヒド (pH7.4) に浸し、20 分間室温放置した。PBS で 2 回洗浄した後、0.1%(w/v)TritonX-100 に浸し、20 分間室温放置した。PBS で 2 回洗浄した後、0.1% (w/v) BSA/PBS でブロッキングを行った (30 分間、室温振とう)。以下は、基本的に、第 3 節の western blotting の方法に従っておこなった。1 次抗体は mABCA5 ポリクローナル抗体 (ウサギ)、2 次応対はテキサスレッド標識抗ウサギ IgG 抗体 (ロバ) を用いた。顕微鏡観察時には、蛍光の退色抑制に PharmaFluor™Aqueous Mounting Medium (日本ターナー) を用いた。

### 動物実験

わが国においては、「動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和 48 年法律第 105 号)」、「動物の保護及び管理に関する法律 (昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号)」、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準 (昭和 55 年 3 月 27



日総理府告示第6号)が制定されている。大阪大学では「大阪大学動物実験指針 (Osaka University Guidelines for Animal Experimentation)」が定められている。これは、動物実験を立案し、実施する場合に遵守すべき事項を示し、科学的にはもとより、動物福祉の観点からも適正な実験の実施を促すことを目的としたものである。本研究において行われた動物実験は、この指針に従って行った。

#### <大阪大学動物実験指針>

大阪大学動物実験指針を次のように定める。

大阪大学総長 熊谷 信昭

#### 第 1 目的

この指針は、生命科学の教育・研究における動物実験の重要性とその特質に鑑み、「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和48年10月1日法律第105号)及び「実験動物の飼養及び保管に関する基準」(昭和55年3月27日総理府告示第6号)等に基づき、大阪大学において動物実験を立案し、実施する場合に遵守すべき事項を示し、科学的にはもとより、動物福祉の観点からも適正な実験の実施を促すことを目的とする。

#### 第 2 適用範囲

- 1 この指針は、本学において行われるほ乳類を用いる実験に適用する。
- 2 ほ乳類以外の動物を実験に用いる場合においても、この指針に準拠するものとする。
- 3 霊長類を用いる実験については、この指針に加え、サル類を用いる実験を遂行のための基本原則(昭和61年6月14日日本霊長類学会)及び関連する指針等に準拠して行うものとする。

#### 第 3 実験計画の立案

1 実験者は、動物福祉の観点から、動物実験の範囲を研究目的に必要な最小限度にとどめるため、適正な供試動物種・系統の選択、実験方法の吟味と同時に、動物実験施設の管理者、実験動物管理者及び飼養者(以下「管理者等」という。)と協力し、責任の分担を明確にして、適正な動物実験に必要な飼育環境等の条件を確保しなければならない。このため、実験者は、実験計画の立案に当たって、管理者等と協議を行うとともに、必要に応じて大阪大学動物実験委員会に助言等を求め、有効、適切な実験が行えるようにしなければならない。

2 実験者は、供試動物の選択に当たって、実験目的に適用した動物種・系統の選定、実験成績の精度や再現性を左右する供試動物の数、遺伝学的、微生物学的品質、飼育条件等を考慮しなければならない。特に微生物学的品質に関しては、その吟味の欠如が実験成績の乱れを来すばかりか、周辺動物への感染の拡大、実験者等に感染病じゃっ起する場合があるので管理者等の指示を特に守らなければならない。

#### 第 4 動物の検収と検疫

1 実験者は、動物の飼育・実験環境への導入に際して、動物の発注条件との適合、異常、死亡の有無等を確認するものとする。また、実験に先立ち、一定の観察期間を置き動物の健康状態を確認しなければならない。

2 管理者は、購入動物の選定、検収、検疫について、実験者に助言等を与え、また、必要に応じてこれらの実務を行うものとする。

#### 第 5 実験動物の飼育管理

1 実験者及び管理者等は、協力し、責任の分担を明確にして適正な施設、設備の維持・管理に努め、給餌、給水、環境条件の保全等について、適切な飼育管理を行わなければならない。

2 実験者及び管理者等は、協力し、導入時から実験中、終了時にいたるすべての期間にわたって動物の状態を子細に観察・記録し、必要に応じて適切な処置を施さなければならない。

#### 第 6 実験操作

実験者は、目的に合致した的確な実験操作を行い、麻酔等の手段によって、動物に無用の苦痛を与えないよう配慮しなければならない。このため、実験者は、必要な場合には、管理者等あるいは大阪大学動物実験委員会に指示、判断を求めるものとする。

#### 第 7 実験終了後の処置

1 実験者は、実験を終了した動物に対して、適正な安楽死の処置を行うものとする。

2 管理者等は、動物の死体及び廃棄物を、焼却等の最終処理にいたるまでの間、環境汚染の原因とならないよう隔離し保管しなければならない。

#### 第 8 安全管理等に注意を払う必要のある実験

1 物理的、科学的に危険な物質、あるいは病原体等を扱う動物実験においては、当該物質等の使用に関する規制等安全確保のための法律、基準等を遵守しなければならない。

2 実験者は、飼育・実験環境及び設備の機能を把握し、的確な飼育及び実験操作を行うことによって、有害物質あるいは病原体等の拡散を防止し、人の安全を確保するとともに動物に障害を与えないよう十分配慮しなければならない。

3 実験者及び管理者等は、責任の分担を明確にし、実験施設及び周辺の環境の汚染防止について、施設、設備の状況を踏まえつつ、その整備と管理、運用に特段の注意を払わなければならない。

#### 第 9 施設、設備、組織の整備

動物実験実施部局等の長は、動物実験が適正かつ円滑に実施されるよう、現有の動物実験の場及び飼育施設並びにその管理、運営に必要な組織体制を整備し、さらに、教育・研究上の要請等に即応して必要な施設、設備の補完に留意しなければならない。

#### 第 10 大阪大学動物実験委員会

1 この指針の適正な運用を図り、実験の立案、実施等に関して指導、助言等を行うため、本学に動物実験委員会を置く。

2 大阪大学動物実験委員会に関して必要な事項は、総長が別に定める。

#### 第 11 雑則

この指針のほか、動物実験の適正な実施に関して、部局等が必要と認める事項については、当核部局の長が定める。

#### 附則

この指針は、昭和 63 年 4 月 20 日から施行する。

## 第2章 脳・神経系に発現する

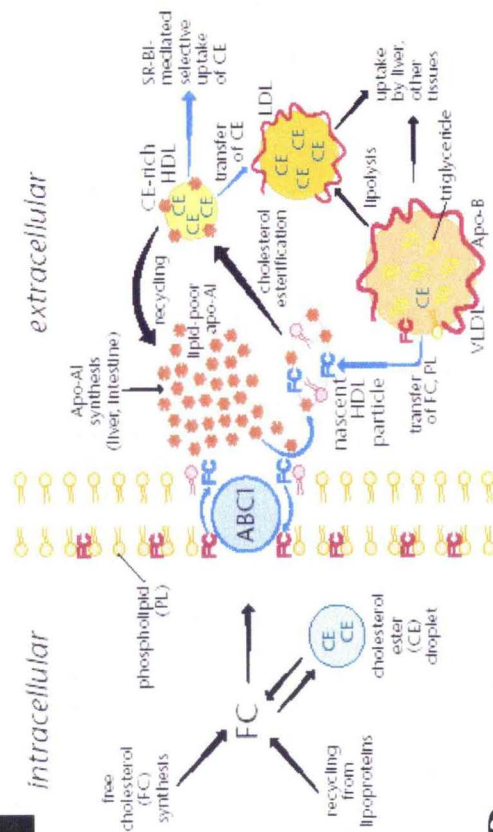
### 新規 ABC 膜輸送体の検索

#### はじめに

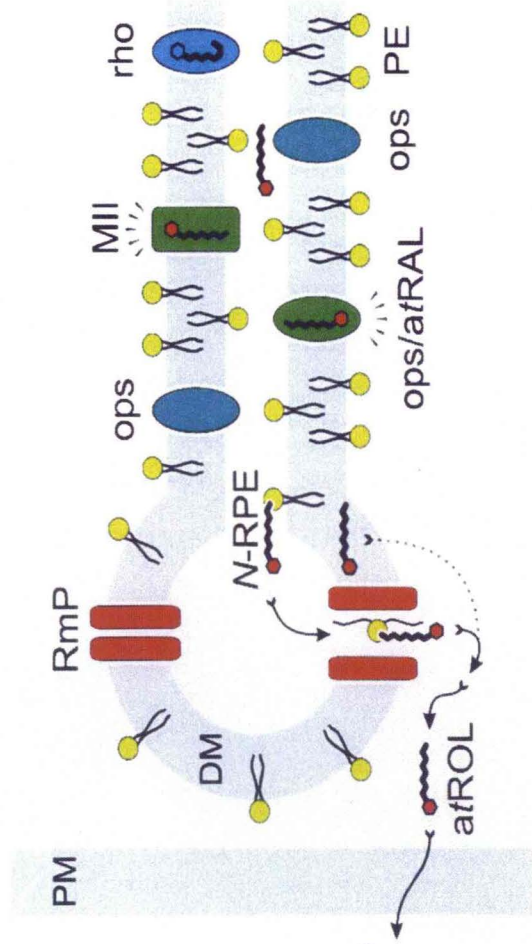
本研究は「ABC トランスポーターは生体情報伝達物質分泌装置の候補である」という仮説をもとに、脳などの情報伝達関連組織・細胞に発現する新規 ABC トランスポーター遺伝子をクローニングし、その生理的役割を明らかにすることを旨とする。

ABC トランスポーターが生体情報伝達分子の分泌装置であるならば、物質を特異的に輸送する性質が必要と考えられる。A～G の 7 種のサブファミリーのうち、A サブファミリーは脂質（あるいはその誘導体）を特異的に輸送する可能性が考えられる（24）。ABCA1 は細胞の形質膜に発現し、細胞内のコレステロールを輸送し、ApoA-I に受け渡すと考えられている（25,26,27,28）。また、ABCA4 は、N-レチニリデンホスファチジルエタノールアミン輸送体である（図 2-1）（20）。このような理由から、私は A サブファミリーを「生体情報伝達分子の分泌装置」の候補として考え、脳・神経系において新規 A サブファミリー遺伝子の検索を行うことにした。新規遺伝子の検索方法としては、RT-PCR 法を採用した。

A



B



# <図 2-1; A サブファミリーについて>

A サブファミリーを標的とした。その理由は、A; ABCA1 がコレステロール輸送体、B; ABCA4 が N-レチニリデンホスファチジルエタノールアミン (N-RPE) の輸送体であると報告されていたからである。

## **第 1 節 縮重プライマーの作成と RNA ソースの選定**

新規 A サブファミリー遺伝子検索のため、既知の ABCA 遺伝子の NBD 1 配列をもとに縮重プライマーを作成した。フォワード・プライマーは Walker A、リバーズ・プライマーは Walker B のさらに下流に相当する（図 2-2）。

本研究の目的は、生体内情報伝達分子の分泌装置を見出すことである。そのための RNA ソースとしては生体情報伝達関連組織が適当である。本スクリーニングでは、マウス新生仔脳と神経細胞（P19）を用いた（29,30,31）。マウス新生仔脳は、高純度の神経細胞によって構成されており、また、神経細胞はマウス胚性腫瘍細胞 P19 をレチノイン酸によって分化誘導して得た。これら RNA 源から total RNA を抽出し、逆転写酵素およびオリゴ dT を用いて逆転写反応を行い cDNA mixture を得た。

## A

ABCrD-F ;gg(tc)cacaa(tc)gg(ag)gc(gatc)gg(gc)aa ; 20mer  
ABCrD-R ;tc(gatc)gc(tc)tc(ag)tccatgtg(ag)tg ; 20mer

## B

mABCA2 48 SLNLYENQVVSFLGHNAGAGKTTTMSILTGLFPPTSGSATIYGHDIRTEMDEIRKNLGMCP 107  
hABCA3 553 NLNLYEGQITVLLGHNAGAGKTTTLSMLTGLFPPTSGRAYISGYEISQDMVQIRKSLGLCP 612  
mABCA4 950 NITFYENQITAFGLGHNAGAGKTTTLSILTGLLPPTSGTVLIGGKDIEETNLDVVRQSLGMCP 1009  
mABCA1 860 ALNFYEGQITSFLGHNAGAGKTTTMSILTGLFPPTSGTAYILGKDIRSEMSSIRQNLGVCP 919  
.. \*\* \*.. .\*\*\*\*\* \*..\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*. \* \* \* . \* \* \* \*\*

mABCA2 108 QHNVLFDRLTVEEHLWFYSRLKSMQAQEEIRKETDKMIEDLELSNKR-HSLVQVTLSGGMKR 166  
hABCA3 613 QHDILFDNLTVAEHLFYFAQLKGLSRQCPPEEVKQMLHIIGLEDKW-NSRSRFLSGGMRR 671  
mABCA4 1010 QHNILFHLTVAEHLFYAQLKGRSWEAQLEAMEAMLEDTGLHHR-NEEAQDLSGGMQR 1068  
mABCA1 920 QHNVLFDMLTVEEHLWFYARLKLSEKHVKAEMEOMALDVGLPPSKLKSQTSQLSGGMQR 979  
\*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \* \* \* . \* \* \* . \* \* \* . \* \* \* \*

mABCA2 167 KLSVAIAFVGGSRAIILDEPTAGVDPYARRAIWDLILKYKPGRTILLSTHHMDEADLLGD 226  
hABCA3 672 KLSIGIALIAGSKVLILDEPTSGMDAISRRAIWDLLOKQKSDRTIVLTTHFMDEADLLGD 731  
mABCA4 1069 KLSVAIAFVGDSKVVVLDEPTSGVDPYRRRSIWDLILKYRSGRTIIMSTHHMDEADLLGD 1128  
mABCA1 980 KLSVALAFVGSKVVLDEPTAGVDPYRRGIWELLLKYRQRTIILSTHHMDEADILGD 1039  
\*\*\*\*\*.....\*\*\*\*\* \*.....\* \* \* \* \* . \* \* \* . \* \* \* . \* \* \*

### <図 2-2 ; RT-PCR 用縮重プライマーの設計>

新規遺伝子を検索するため、当時、配列が明らかであったマウス ABCA1、2、3、4 の NBD1 領域を基に縮重プライマーを作成した。フォワードプライマー (ABCrD-F) は Walker A、リバーズプライマー (ABCrD-R) は Walker B 領域のさらに下流に設定した。このプライマーセットを用いて得られる PCR 産物のサイズは約 500bp である。A では実際の核酸配列、B では、プライマー設定領域のアミノ酸配列を示す。

## **第 2 節 RT-PCR による新規遺伝子スクリーニング**

マウス新生仔において RT-PCR を行った。このスクリーニングにおいて 4 種類の新規 ABC 遺伝子断片を見出した。これらは、新生仔マウス脳から見出された新規 ABC 遺伝子 (Novel ABC transporter in Newborn Brain) ということで、AB1、2、3、4 と呼ぶことにした (図 2-3)。マウス新生仔脳においては、これら新規遺伝子とともに ABCA1、ABCA2、ABCA3 が見出された。

神経細胞 (P19) において、同様に RT-PCR を行った結果、新規遺伝子としては AB1 および AB3 の 2 種類のみが見出された。結局、マウス新生仔脳および神経細胞両方に共通に発現する新規遺伝子は、AB1 と AB3 であった。



[illegible]

＜2-3 新規 ABC トランスポーター遺伝子・AB1～4＞

RT-PCRの結果、マウス新生仔脳より4種の新規遺伝子を見出した。これをNovel ABC transporter in newborn Brain ということと、AB1~4と呼ぶことにした。神経細胞では、AB1とAB3が見出された。



### 第3節 考察

私は、1999 年 12 月～2000 年 1 月の期間に、新生仔マウス脳において 4 種の新規 ABC トランスポーター遺伝子を見出した。スクリーニングの結果、神経細胞に発現する新規遺伝子は AB1 と AB3 であった。私は、AB1 に注目して、その後の研究を進めてゆくことにした。AB3 に関してはノックアウトマウスの作成・解析が計画されたが、詳細は佐々木真理氏の修士論文（2003 年）を参照されたい。

以後、AB1 に注目して、研究を進めてゆく。AB1 の機能・基質を明らかにするための次のステップは、完全長 cDNA クローニングおよびノックアウトマウスの作成である。特にノックアウトマウス作成・解析は大変時間を要する手法であり、今回得られた遺伝子断片からプローブを作成して、ターゲティングベクターのもととなるゲノム断片のクローニングを行うことにした。また、完全長 cDNA をクローニングし、細胞における発現系を構築し、これを用いて、基質検索を行うことにした。完全長 cDNA クローニングを行うもう 1 つの理由としては、ヒト・オルトログの特定がある。PCR で得られた cDNA は 500bp 程度であり、また、極めて保存性の高い NBD に相当する。このため、AB1 が既知の遺伝子と異なることは明らかであるが、EST クローンやヒト・ゲノム配列との比較によって AB1 に対応するヒトの遺伝子を特定することは困難である。やはり、この点を明らかにした上でノックアウトマウス解析が行われるべきであろう。

2002 年 11 月に行った BLAST サーチ (32) の結果、AB2、AB3、AB4 はそれ

ぞれ、ヒト ABCA9、ABCA8b、ABCA8a のオルトログであることが明らかとなった。ABCA9、ABCA8b、ABCA8a はヒト 17q24.3 あるいはマウス 11 E1 に存在する。ヒト 17q24.3 には、ABCA9、ABCA8、ABCA10、ABCA6、ABCA5 が存在し、'ABC gene cluster'を形成している。マウス 11E1 においても同様のクラスターは確認されている。この'ABC gene cluster'がどのような生理的意義を有するかは興味深い。2002 年には、ABCA9、ABCA6 に関しては、プロモーター領域の解析からコレステロールに対する応答性が予測され (33,34)、また、ABCA8 に関しては、その薬剤輸送能が報告されている (35)。ABCA9 の発現臓器は心臓、脳、胎児、マクロファージ、ABCA6 は肝臓、肺、心臓、脳、ABCA8 は心臓、骨格筋、肝臓である。しかしながら、現在の所、これらの機能・生理的役割に関しては解明されていないままである。

## 第 3 章 新規 ABC 膜輸送体の

### 完全長 cDNA クローニング

#### はじめに

情報伝達関連組織から新規 ABC トランスポーター遺伝子・ABI を見出した。しかし、最初に得られた断片は約 500bp 程度の長さであり、ABI の生化学的性質・構造に関する知見、ABI の臓器分布解析、基質検索を含めた細胞生物学的解析の実施のためには完全長 cDNA が必要となる。ABI の全核酸およびアミノ酸配列が明らかになれば、ABI がどのヒト遺伝子に対応しているかを明らかにすることも可能であろう。この点は、本研究において計画されている細胞生物学的解析やノックアウトマウス作成・解析の成果を有用なものとするためには必須である。

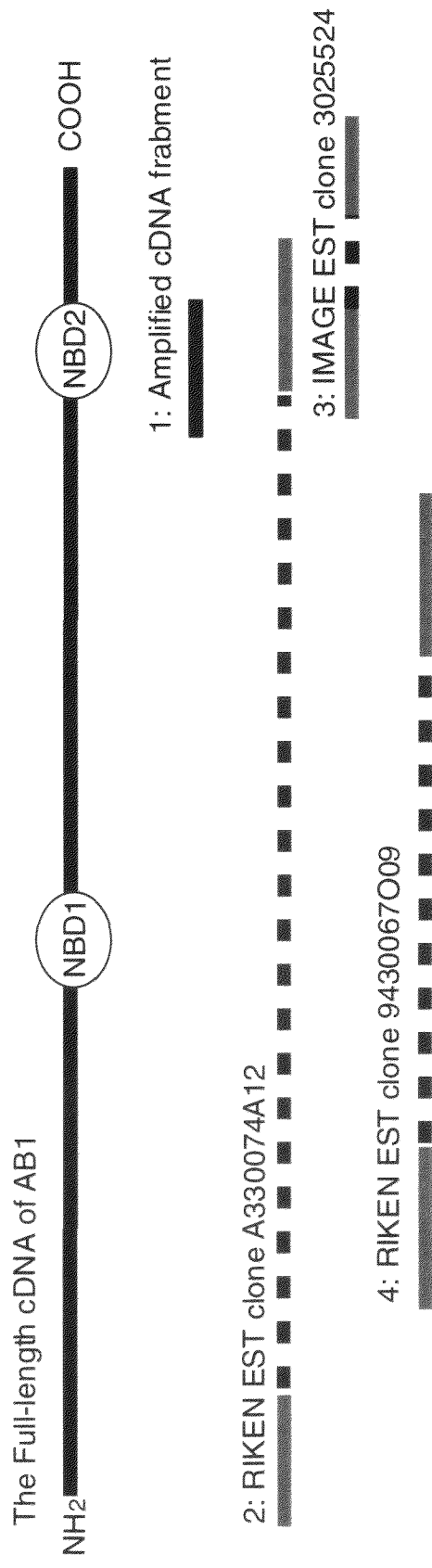
本章では、ABI の完全長 cDNA クローニングを EST データベース (36) の利用によって行い、ABI 全核酸・アミノ酸配列を明らかにする。この情報をもとに、構造予測およびヒト・オルトログ検索を行う。また、臓器分布解析も行う。ABI の主要な発現臓器を明らかにしておくことは、ノックアウトマウスの解析を行う上で大変参考になるはずである。

## 第 1 節 新規 ABC 膜輸送体・完全長 cDNA クローニング

### 1・BLAST サーチ

AB1 遺伝子断片を Query として BLAST サーチ (32) を行った結果、AB1 遺伝子に該当するマウスゲノム DNA 断片が明らかとなった。これは Mus musculus chromosome 11 clone RP23-328K9 map 11, WORKING DRAFT SEQUENCE, 27 unordered pieces (**GenBank accession number, AC024966**) であり、マウス 11 番染色体に由来するものであった。次に、このゲノム配列を Query として BLAST サーチを行った結果、AB1 遺伝子に該当する 3 種類の EST クローンが存在することが、明らかとなった。これらは、それぞれ ur27a07.x1 Soares\_mouse\_NMBP Mus musculus cDNA clone IMAGE:3025524 3' similar to TR:O94911 O94911 KIAA0822 PROTEIN. (**GenBank accession number, AW743672**)、BB627185 RIKEN full-length enriched, 12 days embryo, embryonic body between diaphragm region and neck Mus musculus cDNA clone 9430067O09 5' (**GenBank accession number, BB627185**)、BB633706 RIKEN full-length enriched, adult male spinal cord Mus musculus cDNA clone A330074A12 5' (**GenBank accession number, BB633706**) であった。これらに関して、配列解析を行った結果、**AW743672** と **BB633706** の 2 つを連結することで、AB1 の完全長 cDNA を得ることができると明らかとなった (図 3-1)。

遺伝子組換えによって、哺乳類発現用ベクターである pEGFP-C1、pEGFP-N1、pcDNA3 に組込んだ。



43

### <図 3-1 ; BLAST サーチ>

BLAST サーチによって AB1cDNA に相当する EST クローンが 3 種類見出された。図中、1 は新規遺伝子スクリーニングによって得られた配列、2 は **BB633706** (RIKEN clone A330074A12)、3 は **AW743672** (IMAGE:3025524)、4 は **BB627185** (RIKEN clone 9430067O09) である。ABI 完全長 cDNA は 2 と 3 の連結によって可能である。

## 2・アミノ酸配列

完全長 cDNA クローニングにより、AB1 は 1642 アミノ酸からなり、疎水性アミノ酸の占める割合は 52%であった。また、推定される分子量は 185kDa であった。これらは配列解析用ソフトウェア・GENETYX-MAC 9.0 (Software Development Co., LTD) によって計算した (図 3-2)。

2002 年 11 月、完全長 cDNA 配列をもとに明らかとされたアミノ酸配列を Query として、BLAST サーチを行った結果、AB1 はヒト ABCA5 とアミノ酸レベルで 90.1%の相同性を示した。ヒト ABCA5 はゲノムプロジェクトの成果として、存在が明らかにされた ABC トランスポーターであり、その機能や臓器分布は明らかとされていない。このことから、AB1 はヒト ABCA5 のマウス・オルログであり、以降は AB1 ではなく、マウス ABCA5 (mABCA5) と呼ぶことにする (図 3-3)。

## 3・構造

構造予測プログラム・SOSUI (37) を用いて、mABCA5 の構造を予測した結果、17 回膜貫通構造が示唆された。ABC トランスポーターの中には、MRP1 に代表される C サブファミリーのように 17 回膜貫通構造と考えられているものが存在する。しかし、A サブファミリーのメンバーである ABCA1 や ABCA4 は 12 回膜貫通構造と考えられており、このことから、mABCA5 の構造は 12 回の膜貫通領域と細胞質側に NBD を 2 箇所所有する構造と予想される (図 3-2 および図 3-4)。また、ループ 1-2 およびループ 7-8 はそれぞれ 212 アミノ酸、174 アミノ酸から成り、大変大きなループ領域を形成している。ちなみに、膜貫通

領域と予想された残りの 5 領域は、このループ領域に含まれている。このように巨大なループ領域は ABCA1 および ABCA4 においても予測されている。特に ABCA1 においてはこれらループ領域が ApoA-I との結合に重要であることが示唆されており (25,26,27,28)、mABCA5 においてもループ 1-2 およびループ 7-8 が他分子との相互作用に関与する可能性が考えられる。

1 MATATRDVGWRQTRTLLKNYL IKCRTKKSSVOEILLEPLLEFLFWLILVSMHPNKKYEEVSDIELSPMDKFSLSNVILGYTPVTNITSSIMQRVSTDHL 100

101 PKVITVEEYANEKELVAASLSKSSNFVGVVFKDTMSYELRFFPEMIPVSSITYMNSREGCSKTCAAQYWSLGFTVLQASIDAAIIQLKTNVSVWSELEST 200

201 KAVIMGEAAVEIDTFPRGVILYLVIAFSPFGYFLATHIVAEKEKKLKEFLKIMGLHDTAFWLSWVLLYASLIFLMSLLMAVTATASSLPQSSSIVIF 300

301 LLEFLYGLSSVFFALMLTPLFKKSKHVGVVEFFVTVFGVGLLIVLIESFPRSLVWLFSPLCOCACFLIGIAQVMHLEDFNEGALFSNLTEGYPPLIITI 400

401 IMLALDSVEVYLLAVYLDQVIPGEFGLRRSSLYFLKPSYWSKNRNYKELSEGNINGNISLNEIVEPVSEFIFGKEAIRSIGIYSYRKKTENVEALRNL 500

501 SFDIYEGQITALLGHSIGIGKSTLMNITL CGLCPPSDGFASYGHRVSEIDEMFEARKMIGICPQSDINFVDL TVEENLSTLASIKGIPANNIIQEYQKVL 600

601 DLDMAQIKDNQAKL SGGQKRKL SVGI AVLGNPKLILLDEPTAGMDPCSRHIVWNLLKYRKANRVTVFSTHFMDADILADRKAVISQGMKLCVGSSIFL 700

701 KSKWIGIGYRLSMYIDRYCATESLSSLVRQHIPAAALLQONDQQLVYSLPFKDMDKFSGLFSALDIHSNLGVISYGVSMITLEDVFLKLEVEAEIDQADYS 800

801 VFTQPREETDSKSFDEMEQSLLILSETKASSVSTMSLWKQVSTIAKFHFLSLKRESKSVRAVLLLLIFFAVOIFEMFFLHHSFKNAVVDIKLVDPDLY 900

901 FLKPGDKPHKYKTSLLQNSTDSDINGLIEFFAHQNIWAMFNDSYVSAAPHSAAALNVVRSEKDYVFSAVFNSTMVYCLPVMNMNIISNYLYHLNVTEA 1000

1001 IQTWSTPTIQEITDIVFKIELYFQAALLGIIVTAMPPYFAMENAEHNKIKAYTQLKSLGLPSAYWVGAVVDIPLFFVVVLIILMLGSLFAFHHLGYFYPA 1100

1101 KFLAVVFCLIAVYPSVILFTYIASFTFKILNTKEFWFSIYSVTALACVAITETITFFLOYAVTAVFHYTFCIAIPIYPLLGCILSFIKGSWKNMMPKNENT 1200

1201 YNPWDRLLVAVIMPYLOCILWIFLLQHYEKIHGGRSIRKDPFFRALSQAKNKKFPEPPINDEDEDVKAERLKVKELMGCCCEEKPAIMVCNLHKEYD 1300

1301 DKKDFLHSRKTTKVATKYISFCVKKGEIILGLGPNAGKSTVINTLVGDVEPTSGKIFLDYGSHSSEDESICKMGYCPQTNPLWPDLTIQEHFEIYGA 1400

1401 VKGMSPGDMKEVTSRITKALDLKEHLQKTVKKLPAGIKRKLCFALSMLGNPQVTLTDEPSIGMDPRAKQHMWRAIRTAFKNKKRAALLTTHYMEAEAEVC 1500

1501 DRVATMWSGQLRCIGTVQHLKSKFGKGYFILEIKLDWIENLEIDRLQREIQYIIFPNASRQESFSSILAFKIPKEDVQSLSQSFAKLEAKRTFAIEEYSF 1600

1601 SQATLEQVFVELTKEQEEEDNSCGTLASTLWERTQEDRWVF 1642

### <図 3-2 ; AB1 の全アミノ酸配列>

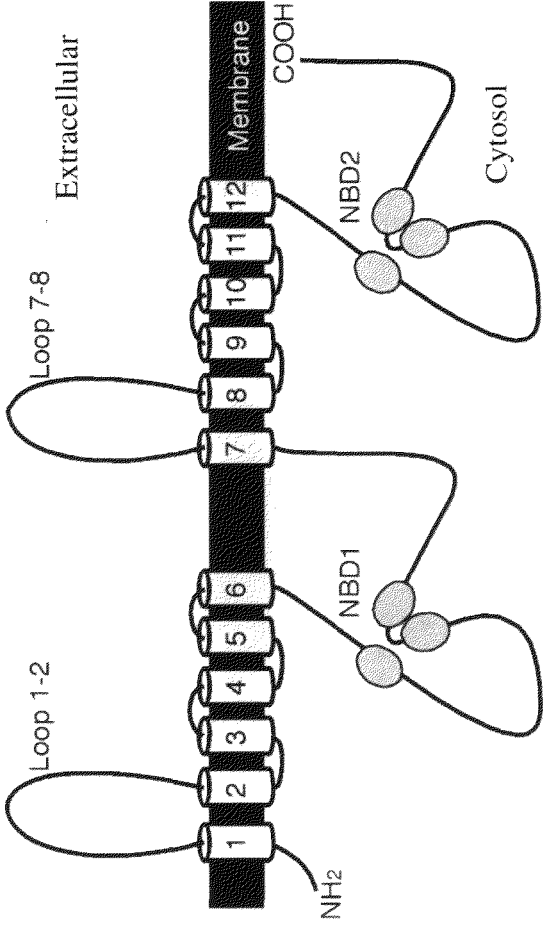
AB1 は 1642 アミノ酸から成る。疎水性アミノ酸は全体の 52%。推定分子量は 185kDa である。



### <図 3-3；ヒト ABCA5>

AB1 は ABCA5 と 90.1% の相同性を有する。ABCA5 はヒト染色体 17q24.3 に位置する ABC トランスポーターであるが、その機能・分布は明らかではない。

AB1 vs. humanABCA5				
	AB1 ← 90.1% → ABCA5			
Number of amino acid	1642	1642	1642	1642
Locus	MMU 11		HSA 17	
Function	unknown		unknown	
Distribution	unknown		unknown	
Substrate	unknown		unknown	



### <図 3-4；mABCA5 およびヒト ABCA5 に関して予想される構造>

構造予測プログラム SOSUI では 17 回膜貫通領域と予測されたが、ABCA1 や ABCA4 の構造、細胞質側に NBD が 2 箇所存在することを考慮すると、12 回膜貫通構造と考えられる。その結果、細胞質側に巨大なループ構造・ループ 1-2 およびループ 7-8 が存在することが予測された。

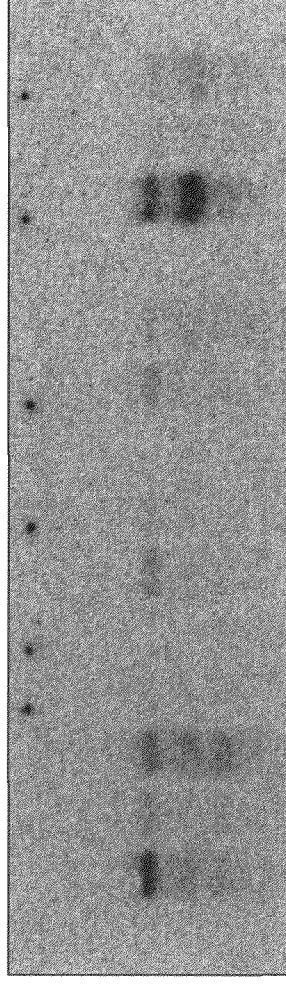
## **第 2 節 mABCA5 の臓器分布解析**

mABCA5 の臓器分布を明らかとするためにノーザンブロット解析を行った。実験に用いたメンブレンは Mouse Adult Tissue Blot (Product Number 1006-1-1268, Seegene, Inc.)である。ハイブリダイゼーションを high-stringency 条件下で行った結果、mABCA5 遺伝子転写産物は、精巣、脳、肺に最も多く発現しており、心臓、腎臓に中程度、骨格筋、皮膚、肝臓に微弱に発現していることが明らかとなった (図 3-5A)。

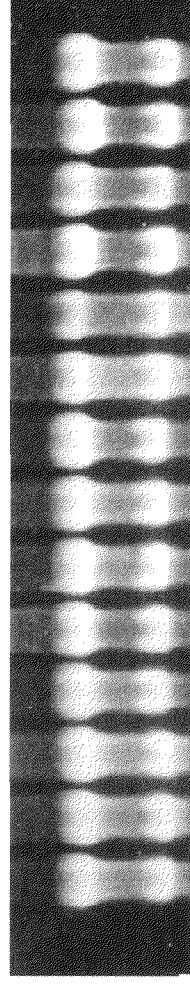
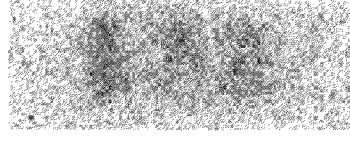
また、サイズの異なる 3 種類バンドが確認でき、mABCA5 にスプライシングバリエーションの存在が示唆された (図 3-5B)。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

**A**



6kb  
5kb  
4kb



### <図 3-5；臓器分布解析>

ノーザンブロット解析を行い、mABCA5 の臓器分布を調べた。メンブレンは Mouse Adult Tissue Blot (product number 1006-1-1268, Seegene, Inc.) を用いた。**A**；図中、1；脳、2；心臓、3；肺、4；肝臓、5；脾臓、6；腎臓、7；小腸、8；胃、9；骨格筋、10；皮膚、11；胸腺、12；精巣、13；子宮、14；胎盤である。**B**；スプライシングバリエアント。

## 第3節 培養細胞における mABCA5 の発現

### 1・ウェスタンブロッティング

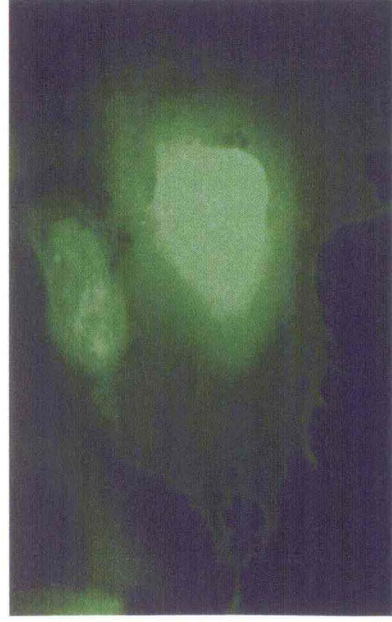
mABCA5 完全長 cDNA を哺乳類発現用ベクター・pEGFP-C1、pEGFP-N1、pcDNA3 に組み込んだ。これらのプラスミドのうち、pEGFP-C1/mABCA5 を COS-7 にトランスフェクションし、一過性に発現させた。トランスフェクションの 24 時間あるいは 48 時間後に細胞をスクレイプし、膜画分を調製した。膜画分 100  $\mu$ g を SDS-PAGE し、mABCA5-C 末端抗体を用いて、ウェスタンブロッティングを行った結果、約 210kDa の位置に GFP-mABCA5 のバンドが確認された。GFP の分子量が 27kDa であることから、mABCA5 の分子量は約 180kDa であると推測される。これはアミノ酸配列から推定された分子量とほぼ一致していた (図 3-6B)。

### 2・顕微鏡観察

pEGFP-C1/mABCA5 を COS-7 にトランスフェクションし、一過性に発現させた。これを蛍光顕微鏡で観察したところ、GFP (pEGFP-C1) では核を含めた細胞質において蛍光が観察される一方、GFP-mABCA5 (pEGFP-C1/mABCA5) では核には蛍光は観察されず、核周辺の内膜系および形質膜に蛍光が観察された (図 3-6A)。また、mABCA5-C 末端抗体を用いて細胞の免疫染色を行い、共焦点蛍光レーザー顕微鏡で観察をしたところ細胞の形が鮮明に観察された (図 3-6C)。通常は、一過性発現系において細胞内局在の詳細を議論することは困難であるが、今回の結果では mABCA5 が膜に発現していることが強く示唆され

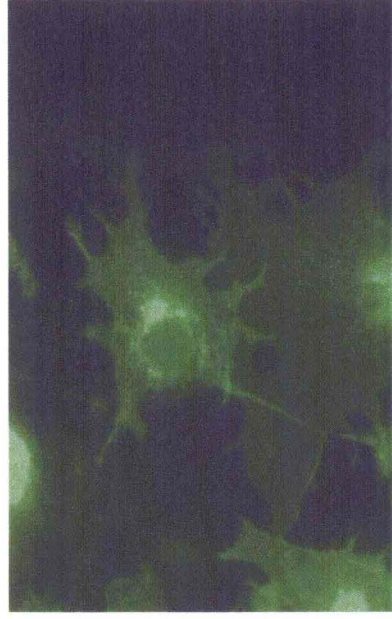
た。

**A**



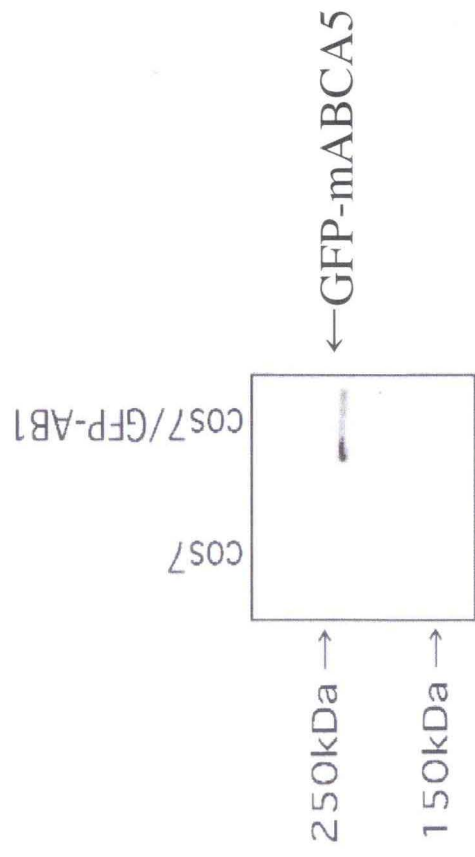
52

**GFP**

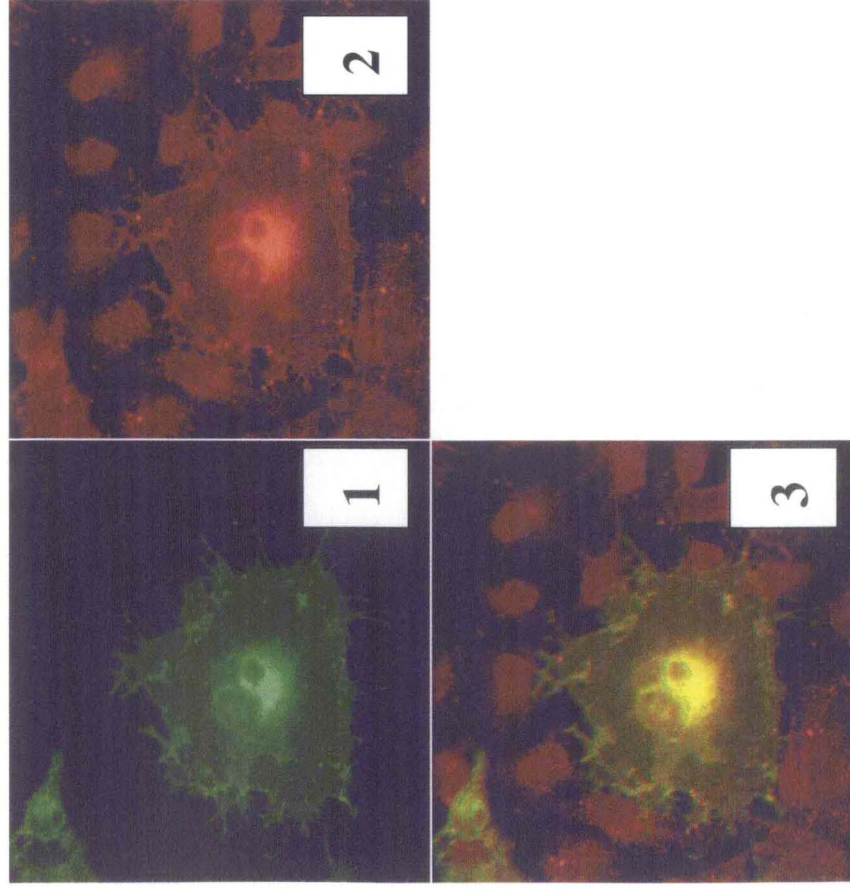


**GFP-mABCA5**

**B**



C



<図 3-6 ; COS-7 における GFP-mABCA5 一過性発現>

A ; GFP (pEGFP-C1)、GFP-mABCA5 (pEGFP-C1/mABCA5)。B ; ウェエスタンブロットティング。1 次抗体は mABCA5-C 末端抗体を使用。C ; コンフォーカル顕微鏡。図中、1 ; GFP 蛍光を観察、2 ; 1 次抗体は mABCA5-C 末端抗体、2 次抗体としてテキサスレッド標識抗体を使用。3 ; 1 および 2 のマージ。

## 第 5 節 考察

完全長 cDNA クローニングの結果、前章で脳・神経系で見出された新規遺伝子・AB1 はヒト ABCA5 のマウス・オルトログ (mABCA5) であることが明らかとなった。前章で AB2、AB3、AB4 はそれぞれ、ヒト ABCA9、ABCA8b、ABCA8a のオルトログであることを述べたが、これらと同様に ABCA5 はヒト 17q24.3 に存在する。ヒト 17q24.3 (マウス 11E1) において、ABCA9、ABCA8、ABCA10、ABCA6、ABCA5 (mABCA9、mABCA8a、mABCA8b、mABCA6、mABCA5) はクラスターを形成しているが、そのうちの 3 種類がマウス新生仔脳、2 種類が神経細胞で見出されたことになる。

ヒト ABCA5 は、ヒトゲノムプロジェクトにおいて見出された新規 ABC トランスポーターであり、その機能、構造、分布は明らかではない。これらのうち、本章では ABCA5 の分子構造と臓器分布および細胞内局在性を明らかにした。

mABCA5 は 1642 アミノ酸からなる。発現細胞の顕微鏡観察から mABCA5 が膜蛋白質であることが確認された。ウエスタンブロッティングの結果から、分子量は約 185kDa である。予測される構造は ABC トランスポーターに関して明らかにされているものと基本的には同じである。興味深い点としては、巨大なループ構造の存在が挙げられる。ループ 1-2 とループ 7-8 は、SOSUI によって膜貫通領域と予測された領域をそれぞれ 3 および 2 つ含んでおり、このことから、この 2 つのループが高次構造を有していると予想される。ABCA4 においては、この 2 つのループが S-S 架橋を形成していることが既に報告されている。巨大なループ 1-2 とループ 7-8 は A サブファミリーにのみ存在することから、



その機能に重要な領域であると考えられ、mABCA5 の詳細な分子機構を検討する際には有力なターゲットとなるだろう。

ノーザンブロット解析によって、mABCA5 が精巣、脳、肺に最も多く発現していたが、心臓、腎臓、骨格筋、皮膚、肝臓にもわずかながら遺伝子転写産物が確認された。

mABCA5 発現細胞 (COS-7) を用いて、共焦点顕微鏡観察を行い、mABCA5 が細胞質膜に発現していることを明らかにした。

本章において触れなかったが、mABCA5 発現細胞を用いた基質の検索に関してはスフィンゴシン-1-リン酸の輸送活性測定系 (5) を土台にして、実施中である。これまでの解析の結果、グルタチオン抱合体、ホスファチジルコリン、スフィンゴシン、スフィンゴシン-1-リン酸、セラミド、スフィンゴミエリンに関しては mABCA5 の基質とならないことが明らかになっている。基質検索の検索は細胞内局在の検討と併せて、今後の課題である。

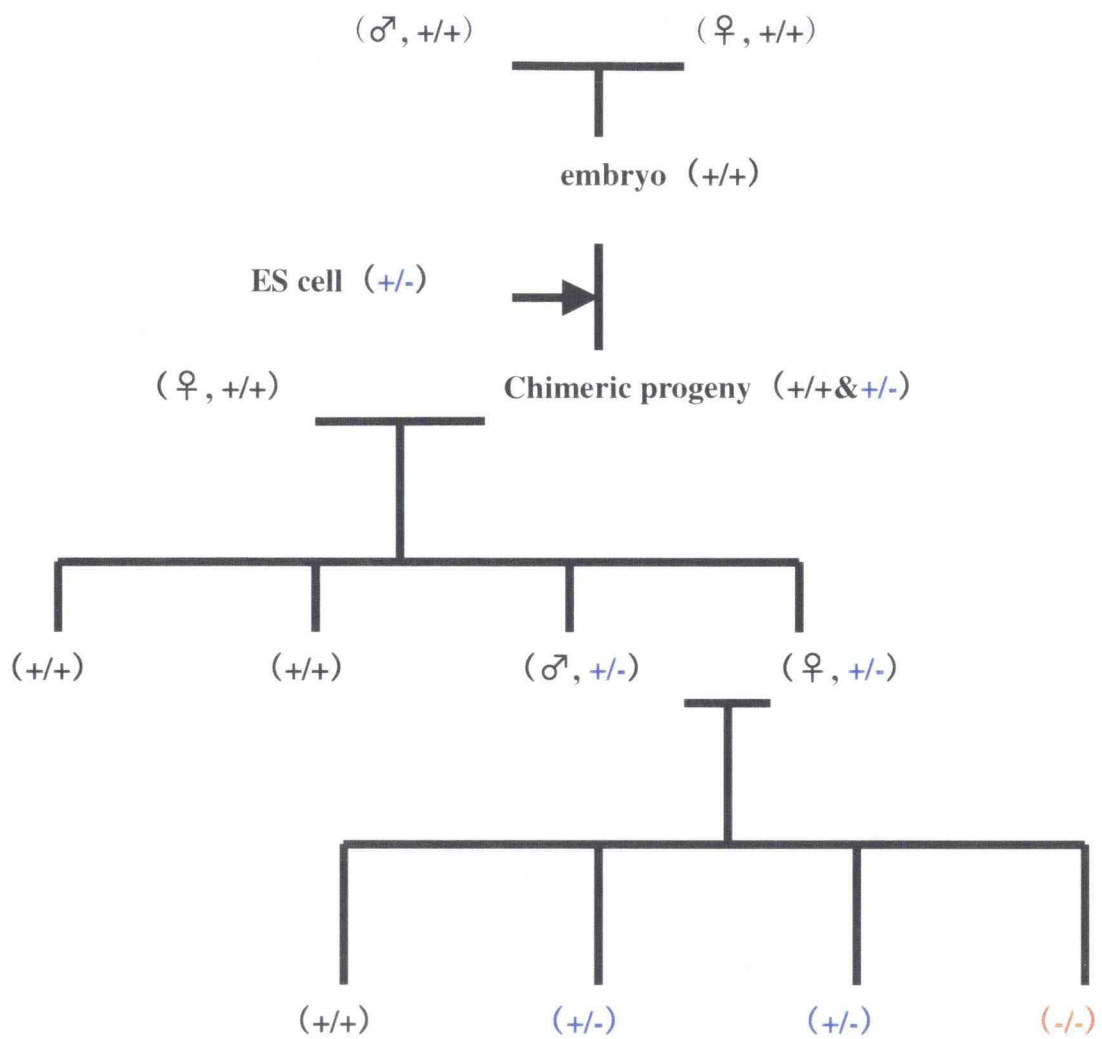
## 第 4 章 ABCA5 ノックアウトマウスの作成

### はじめに

トランスポーターは酵素類とは異なり、アミノ酸相同性に基づいて基質を推測することが極めて難しい。これまでに輸送基質が解明されたトランスポーターは、抗癌剤耐性因子や遺伝子疾患原因遺伝子として同定されたものがほとんどである。A サブファミリーにおいては、ABCA2 (38,39) や ABCA3 (40,41) などがクローニングされ、その臓器分布も明らかにされているが、やはり基質および役割は明らかにされていない。

mABCA5 は生体情報分子分泌装置の候補として、新生仔脳および神経細胞から見出されたものである。第 3 章において、mABCA5 の臓器分布や細胞内局在性は明らかにされたが、その機能や生体内における役割は ABCA2 や ABCA3 と同様に不明である。mABCA5 に関して、これらの点を明らかにするためには、mABCA5 発現細胞を用いた基質検索を行う一方で、ABCA5 ノックアウトマウスを作成し、そのフェノタイプを解析することが重要であると考えられる (図 4-1)。

本章では、まず、ABCA5 ノックアウトマウス作成の過程およびノックアウトマウス誕生初期について詳述したい。



<図 4-1；交配によるノックアウトマウスの作成>

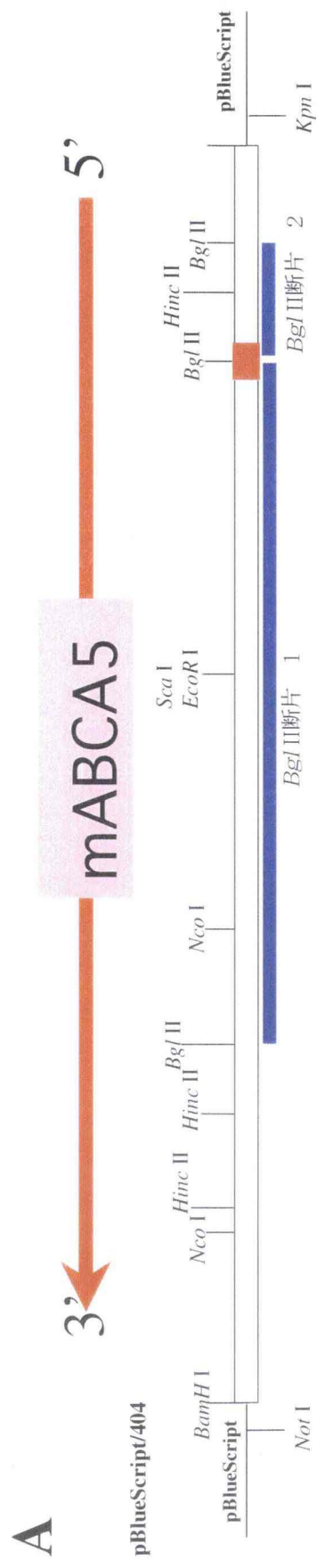
野生型の 8 細胞期胚に ES 細胞 ( $+/-$ ) を導入し、キメラマウスを作成する。キメラマウスが ES 細胞由来の生殖細胞を有する場合、ES 細胞における遺伝子の変異は子孫のマウスに受け継がれる。数回の近親交配によって、ノックアウトマス ( $-/-$ ) を得ることができる。

## 第 1 節 ターゲティングベクターの構築

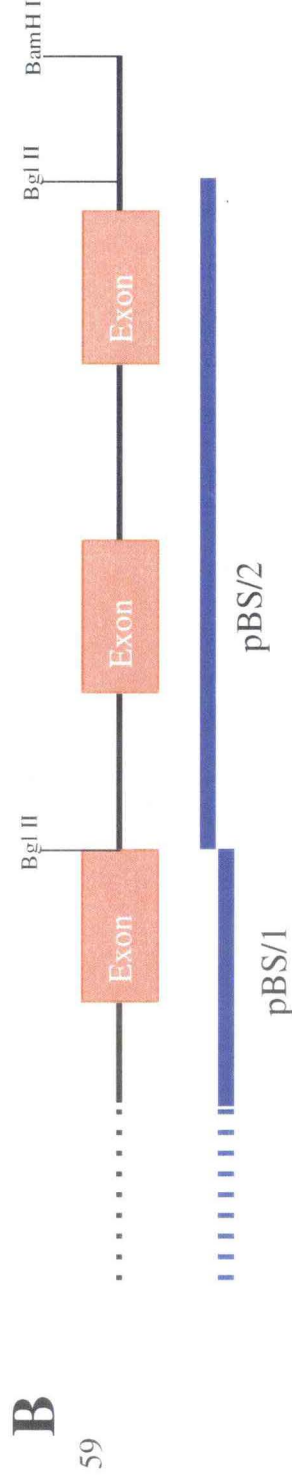
### 1・制限酵素マップ

ABCA5 ノックアウトマウスの作成のため、ターゲティングベクターの構築を行った。その第 1 段階として、プラークハイブリダイゼーション法により、マウス・ゲノムライブラリー (adult C57BL/6N male liver, EMBL3 SP6/T7, CLONTECH) から mABCA5 遺伝子断片を含むファージ (clone 404) をクローニングした。この際、用いたプローブは RT-PCR スクリーニングの際に得られた NBD2 遺伝子断片である。このクローンから、ファージ DNA を調製し、制限酵素 *BamH* I でインサート (mABCA5) を切り出し、pBlueScript にサブクローニングした (pBS/404)。また、pBS/404 を *Bgl* II で切断して得られる 2 種類の断片を pBlueScript にサブクローニングした (pBS/1 および pBS/2)。

pBS/404 に関して、サザンハイブリダイゼーションを行い、mABCA5 遺伝子断片に関して、制限酵素マップを作成した (図 4-2A)。マップ作成に用いた制限酵素は、*BamH* I、*Bgl* II、*Cla* I、*Dra* I、*EcoO109* I、*EcoR* I、*EcoR* V、*Hind* III、*Hinc* II、*Kpn* I、*Mlu* I、*Nco* I、*Nhe* I、*Pst* I、*Sca* I、*Sac* I、*Sac* II、*Sph* I、*Xba* I、*Xho* I である。また、pBS/1 および pBS/2 に関してシーケンシングをおこなった。サザンハイブリダイゼーションおよびシーケンシングの結果から、pBS/404 は機能ドメインである NBD2 のエキソンを少なくとも 3 個含んでいることが明らかとなった (図 4-2B)。



No Cut; *BamH I*, *Cla I*, *EcoR V*, *Mlu I*, *Nhe I*, *Not I*, *Sac I*, *Sac II*, *Xba I*, *Xho I*



＜図 4-2；mABCA5 ゲノム DNA 断片の制限酵素マップ＞

A；pBS にサブクローニングしたゲノム DNA 断片に関して制限酵素マップを作成した。また、図中に Bgl II 断片を示す。これらを pBS にサブクローニングし、pBS/1 および pBS/2 とした。pBS/1 および pBS/2 に関しては、シーケンスを行い、また、実際のターゲティングベクター構築にも利用した。**B**；機能ドメイン NBD2 のエキソン。遺伝子破壊は pBS/2 に相当する領域をネオマイシン耐性遺伝子に置き換えて、達成した。

## 2・ターゲティング・ストラテジー

制限酵素マップに基づいて、ターゲティングベクターの構築を行った（図 4-2）。エキソン領域をネオマイシン耐性遺伝子（Neo）に置換し、ABCA5 遺伝子の破壊を達成する。また、相同組換え体のスクリーニングを効率化する目的でジフテリア毒素 A サブユニット（DT）遺伝子をネガティブセレクションマーカー（42）として連結した（pA1-DTpA2）。ターゲティングベクターの構築においては、通常、5'側相同領域を長めに（5kb 以上）して、3'側相同領域を短め（0.6kb 程度）にする（43）。しかし、pBS/404 では NBD2 に相当するエキソンが 3'側に偏っているため、今回は 3'側相同領域を長め（5kb 以上）にして、5'側相同領域を短め（0.6kb 程度）にすることにした。このため、ターゲティングベクターの構築には pMC1DTpA を用いた（44）。

## 第 2 節 相同組換え体のスクリーニング

ターゲティングベクター・pA1-DTpA2 を制限酵素 *Not* I によって直鎖化し、エレクトロポレーションによって、ES 細胞・TT2 に導入した (45)。プロトコールを以下に示す。エレクトロポレーション後、細胞はキュベットからネオマイシン・フリーの培地中（フィーダーあり）に移す。今回は、エレクトロポレーション 1 回分を 100mm ディッシュ 5 枚に分けた。CO<sub>2</sub> インキュベーター、37℃ で 1 晩培養した後、G418 (f.c. 200µg/ml) で約 10 日間培養した。

### <ES 細胞・TT2 へのターゲティングベクター導入>

Ethanol precipitation pellets of linearized vector (100 µg/electroporation) should be dissolved in 50 µl of dH<sub>2</sub>O and keep at 4C for overnight. Then add 350 µl of PBS.

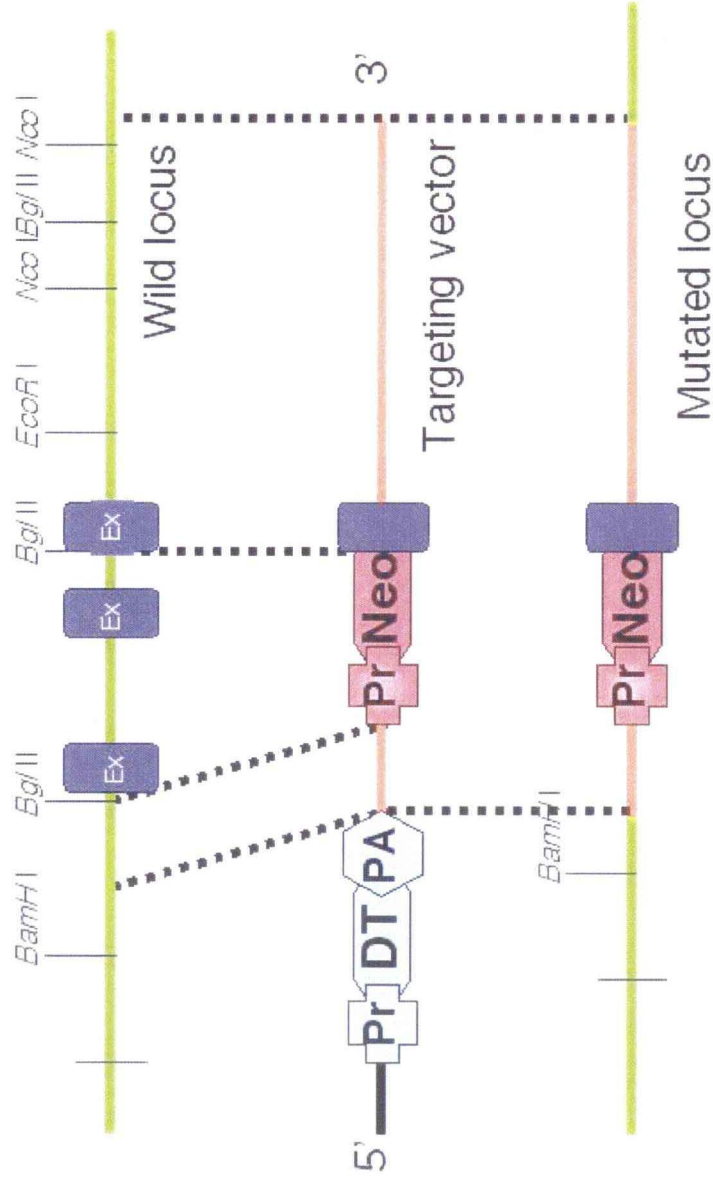
1. Harvest 2-4x10<sup>7</sup> cells for 1 electroporation.
2. Wash cells with PBS twice.
3. Count the cell number and suspend them in 400 µl of PBS.
4. Add DNA solution to the cell suspension.
5. Keep 10-20 min. on ice.
6. Transfer suspension to the electroporation cubette (0.4cm distance).
7. Give pulse with Bio-Rad Gene Pulser set at 0.8kV/3mF. The resulting time-constance is usually 0.1 or 0.2.
8. Transfer pulsed cells to the tube containing ES medium and suspend it well.
9. Seed 2x10<sup>6</sup> cells / 90mm plate with 10 ml of ES medium.
10. Next day, change the medium to fresh one with appropriate drugs for selection.

300 (with promoter) or -30 (promoterless) colonies / plate were obtained 7-10 days after electroporation.

約 10 日後、ES 細胞のコロニーを顕微鏡下でピックアップし、一部継代した後、ゲノム DNA を調製した。このゲノム DNA をテンプレートとして PCR スクリーニングを行い、相同組換え体をクローン化した (図 4-4)。1 回のスクリーニング毎に約 200 クローンをピックアップした。PCR の条件は、以下に示す。

### <PCR の条件>

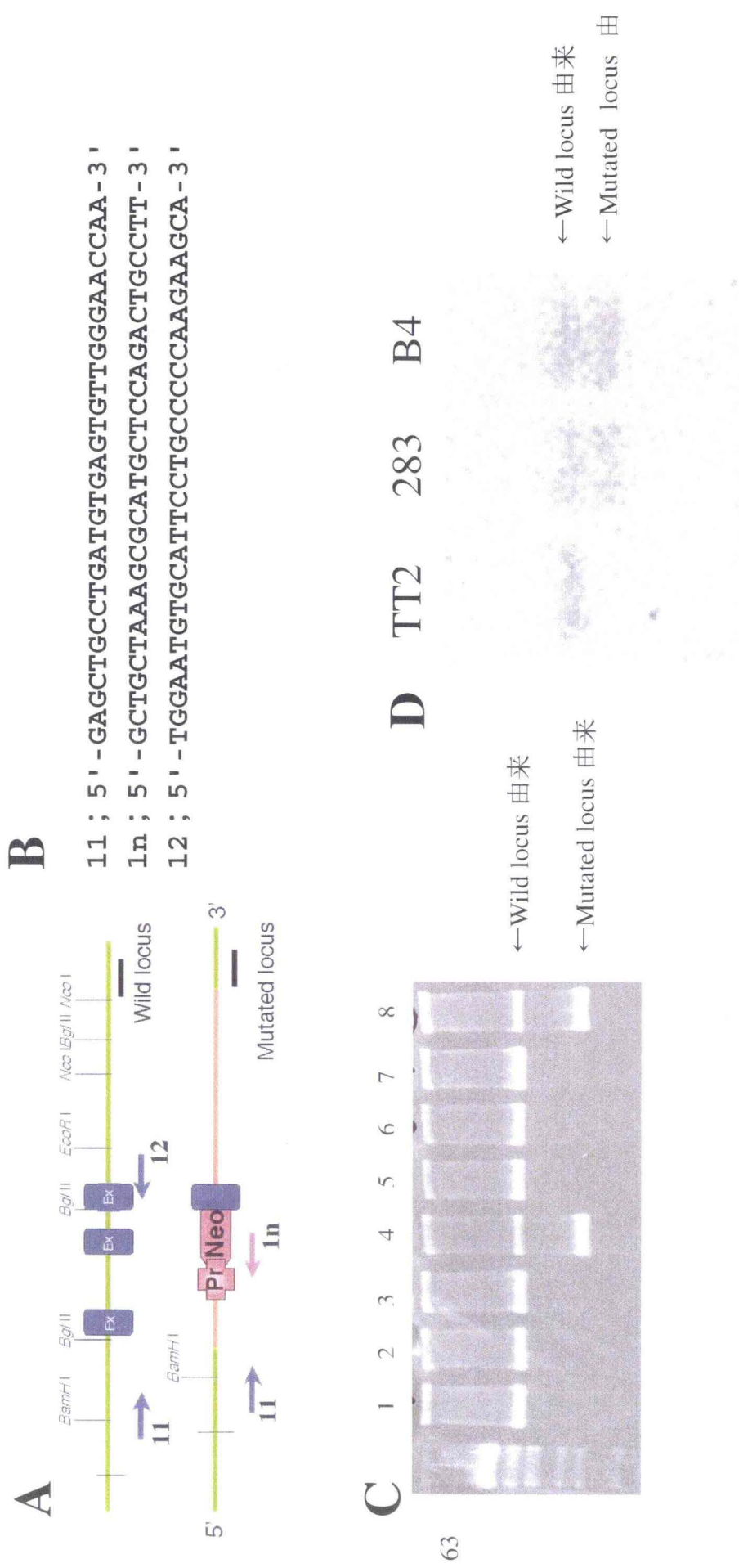
96℃, 5min → [96℃, 20min → 72℃, 3min] X 30cycles → 72℃, 5min → 4℃



＜図 4-3；ターゲティングベクター・pA1-DTpA2 と相同組換えの概略＞

Pr；プロモーター、DT；ジフテリア毒素 A サブユニット遺伝子、PA；ポリ A 付加シグナル、Neo；ネオマイシン耐性遺伝子。ES 細胞に導入された直鎖化ターゲティングベクターと Wild locus の間に相同組換えが起き、Mutated locus となる。





＜図 4-4；相同組換え体のスクリーニング＞

A；スクリーニングのストラテジー。ちなみに、黒線で示した領域は、genomic southern にもちいたプローブ（Nco I-Not I 断片）。B；スクリーニングに用いたプライマー。C；PCR 産物を PAGE した EtBr 染色。レーン 4 および 8 が相同組換え体。D；genomic southern。

今回、約 1000 クローンについて PCR スクリーニングを行った。その結果、5 クローンの相同組換え体・clone 283、clone B4、clone B8、cloneB10、clonB14 が得られた。

### 第3節 胚操作およびキメラマウスの作成

第2節で得られた相同組換え体を用いて、キメラマウスを作成した。プロトコルを以下に示す。インジェクションに用いる胚および偽妊娠マウスは ICR（アルビノ）であるが、ES 細胞 TT2 は C57BL/6（黒）由来の細胞である。このため、キメラマウスの目は黒色となり、誕生した時点でキメラマウスか否かの判定が可能である。インジェクションに用いるホールディングピペット、カッティングニードル、インジェクションピペットはピペットプラー（Narishige）およびマイクロフォージ（Leica）を用いて作成した（図 4-5）。

#### <キメラマウスの作成 1～スケジュール>

第1日目	16:00	ICR(♀, 3wks)に PMS (セロトロピン) 10U を腹腔内注射
第3日目	16:00	ICR(♀, 3wks)に hCG (ゴナドトロピン) 10U を腹腔内注射
	18:00	ICR(♂)と交配
第4日目	10:00	プラグ確認
	18:00	ICR(♀)と ICR(♂,パイプカット)交配
第5日目	10:00	偽妊娠マウスのプラグ確認
第6日目		インジェクション
第7日目		blastocystを偽妊娠マウスの子宮に移植
約25日目		キメラマウスの誕生

#### <キメラマウスの作成 2～インジェクション>

1. プラグが確認された ICR(♀, 3wks)から輸卵管を摘出し、27Gニードルでかん流を行い、受精卵を採取する。
2. 8細胞期胚を選び、透明帯をカットする。
3. ES細胞（8～20個）を8細胞期胚に導入
4. CO<sub>2</sub> インキュベーター、37℃で1晩培養し、次日、blastocystを偽妊娠マウスの子宮に移植する（一腹に20個）。

インジェクションの結果、相同組換え体 clone 283 より、キメラマウスを得ることに成功した。germ line transmission の確認は、キメラマウス（♂, 6wks 以上）を ICR（♀）と交配させ、出産される仔マウスの目の色で行った。目の色が黒であったので成功である（図 4-5E）。

## **第 4 節    ノックアウトマウスの誕生**

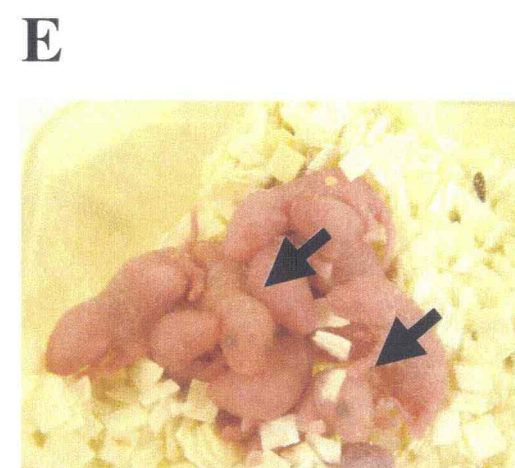
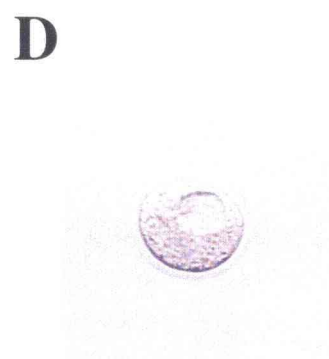
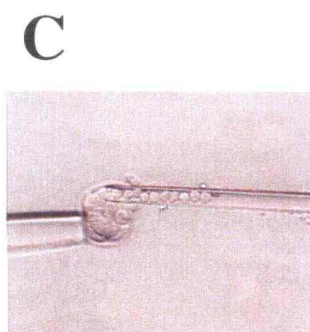
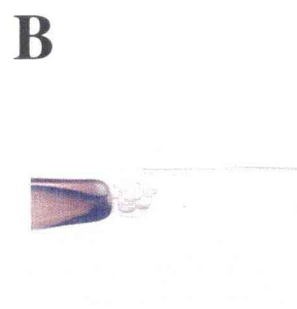
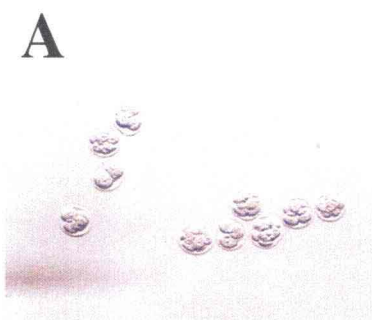
germ line transmission を確認した後（図 4-6A）、キメラマウスを野生型のメスと交配させた。出産された仔マウスに関して、genotyping を行い、ヘテロマウス (+/-) を分離した。genotyping はマウス尾ゲノム DNA を調製し、PCR 法で行った（図 4-6C）。ES 細胞のスクリーニングとは、プライマーが異なるので、条件を以下に示す。

### **<PCR の条件>**

96℃, 5min → [96℃, 30min → 60℃, 30sec → 72℃, 3min] X 40cycles → 72℃, 5min → 4℃

次にヘテロマウス同士（♂は 6 週齢以上、メスは 3 週齢以上）を交配させ、出産された仔マウスに関して、同様に genotyping を行い、ABCA5 ノックアウトマウス (-/-) を分離した（図 4-6C,D）。

ABCA5 ノックアウトマウスは胎性致死にはならず、外見上、野生型と同様に正常に分娩される。



#### ＜図 4-5；インジェクション＞

**A**；胚の採取。**B**；スクリーニングに用いたプライマー。透明帯カット **C**；ES 細胞の注入。  
**D**；一晚培養後。写真はblastocystの前段階。**E, F, G**；誕生したキメラマウス（黒い目）。

生後1日目、1週齢、6週齢。

**A**



**B**



**E**



**C**

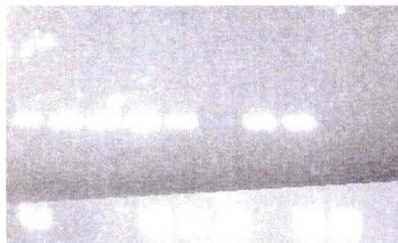
111 ; 5' -CATATTTTGTCTCAAATGGTAGATTACCAA-3'

1n ; 5' -GCTGCTAAAGCGCATGCTCCAGACTGCCTT-3'

22 ; 5' -TGACCAAAGACCTTAGTCTCATAAATCCAT-3'

**D**

1 2 3 4 5 6 7 8 9



←Wild locus 由来

←Mutated locus 由来

#### <図 4-6 ; ノックアウトマウス>

**A** ; Germ line transmission の確認。アルビノ種の母親から黒い目の仔が生まれる。キメラマウスにおいて、C57BL/6 由来の ES 細胞が生殖細胞として分化したことの証拠である。これら仔の中にヘテロマウスが含まれている。**B** ; ヘテロマウス同士を交配させ、出産。これら仔の中にノックアウトマウスが含まれる。**C** ; マウスジェノタイピング用プライマー。**D** ; マウスジェノタイピング。野生型 (レーン 2,3,7)、ヘテロ (レーン 1,4,5,8)、ノックアウト (レーン 6,9) **E** ; ABCA5 ノックアウトマウス (3 週齢)。

## 第5節 考察

ABCA5 欠損は、胎性致死を引き起こさない。ABCA5 ノックアウトマウスは、野生型と同様に正常に分娩され、生育する。このことから、ABCA5 が生死に直接関わるものでないことが明らかとなった。精巣は mABCA5 を最も多く発現する臓器であり、この点からキメラマウスやヘテロマウスの生殖・交配に不都合が生じるという予測も存在した。しかし、その点に関する問題は生じず、ノックアウトマウスを得ることに成功した。ノックアウトマウスはオス、メスともに fertility（繁殖性）を保持しており、ノックアウトマウス同士の交配によって仔マウスは正常に分娩・生育する。このことから、mABCA5 の欠損は生殖に決定的な影響を及ぼすものではない。

ABCA1 はタンジール病の原因遺伝子である。若年期において、ABCA1 欠損は健康上の不都合を引き起こさないが、加齢に従い、扁桃肥大などを生じ、動脈硬化症による死亡リスクを増大する。よって、ABCA5 ノックアウトマウスに関しても、授乳期、離乳期、成熟期を通して観察を続けていく必要がある。

## 第 5 章 ABCA5 ノックアウトマウスの解析

### はじめに

前章で述べたように、ABCA5 の欠損は胎性致死を引き起こすものではない。しかしながら、生育に従い、ABCA5 欠損がマウスにどのような影響を及ぼすかは観察する必要がある。これまでに ABC トランスポーターに関して作成されたノックアウトマウスにおいては、加齢に伴って、SPGP (ABCB11) のように胆石や胆汁のうっ滞が観察されるものから (46)、MDR1 (ABCB1) や MRPI (ABCC1) のように毒物・異物の脳内蓄積 (11) や炎症反応性の低下 (47,48) など、外的要因がなければ、顕著な形質が観察されないものが知られている (表 5-1)。ABCA5 ノックアウトマウスに関しても、人為的に外的要因を付加する必要性が存在するかもしれないが、ノックアウトマス作成初期においては、この点は保留し、これまでと同じ環境で飼育・観察することにした。

<表 5-1 ; ABC トランスポーターノックアウトマス>

ノックアウトマウス	フェノタイプ
MDR1 (ABCB1)	脳内における薬物の蓄積
MDR2 (ABCB2)	リン脂質の胆汁中排泄の低下・胆管炎
SPGP (ABCB11)	胆汁鬱滞
MRPI(ABCC1)	薬剤耐性および炎症反応性の低下
ABCA1	Tangier 病モデル・発生における死細胞除去障害
ABCA4	Stargardt病モデル
ALDP(ABCD1)	副腎脳白質ジストロフィーモデル
CFTR(ABCC7)	嚢胞性繊維症モデル



## 第1節 ABCA5 ノックアウトマウスの表現型

6 週齢において体重を測定した。メスは野生型とほぼ同等、オスはやや低い値を示す結果となったが、ノックアウトマウスは正常に成獣した（表 5-2）。

その後、約 10 週齢においてノックアウトマウスにおいて顕著な異常が観察されるようになった。具体的には、活動性が低下し、1 つの場所に留まり続けるというものである。また、体を大きく揺すりながら呼吸を行っていた。その後（2～3 週間後）には、外見上、腹部膨大（異常体型）、眼球突出が観察されるようになり（図 5-1）、しばらく後（約 1 週間後）に死亡する。このことは雄雌の別なく観察される。このような症状は野生型においては観察されない。その一方で、ABCA5 ノックアウトマウスにおける発症頻度は極めて高率である（表 5-3）。

＜表 5-2；ABCA5 ノックアウトマウス 6 週齢における体重＞

	-/-	+/+
オス	20.62±0.43	24.295±3.0
メス	19.24±0.66	19.515±1.1

＜表 5-3；ABCA5 ノックアウトマウスの発症頻度（2000.5.16～9.17）＞

誕生（-/-）	17匹
発症	11匹
生存	3匹
Sampleとして屠殺	3匹

死亡したノックアウトマウスに関して、検死解剖を行った（図 5-2）。

### **・ 検死解剖～皮下・心臓**

皮下には液体が滞留していた（皮下浮腫）（図 5-2A）。この液体を採取し、SDS-PAGE した結果、その成分は血清とほとんど同じであった。皮下における液体の滞留が、マウスの異常体型の原因である。また、この液体が清澄であることから、浮腫は炎症性でなく、内分泌性・末梢臓器障害の結果であると考えられる。

胸部を調べたところ、心臓が野生型に比べ、肥大あるいは拡張していることが分かった（図 5-2B）。ピンセットで触検したところ、ノックアウトマスの心臓では、筋肉の弾力性が低下しており、心拡張が確認された。

### **・ 検死解剖～腹腔**

腹腔内を調べたところ、ノックアウトマウスでは、腸をはじめとする各臓器に鬱血が確認された。また、野生型に比して、腹水の量も多い（図 5-2C）。小腸周辺には血液凝固物が見出され、マウスの死因が小腸からの出血による心不全であると推測される。

肝臓の異常は最も目立つものであった（図 5-2D,E）。赤色斑点が点在し、組織は硬化しており、脆い。肝臓特有の表面の滑らかさも低下していた。

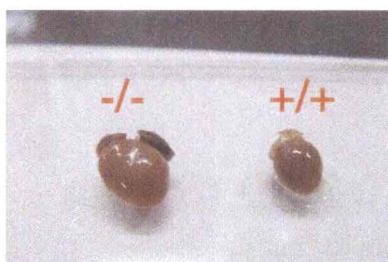
### **・ 組織切片**

異常が観察された臓器を中心に病理切片の解析を行った。脳、腎臓、脾臓、膀胱、腸、眼球に異常は見出されなかった（表5-4）。

**A****B**

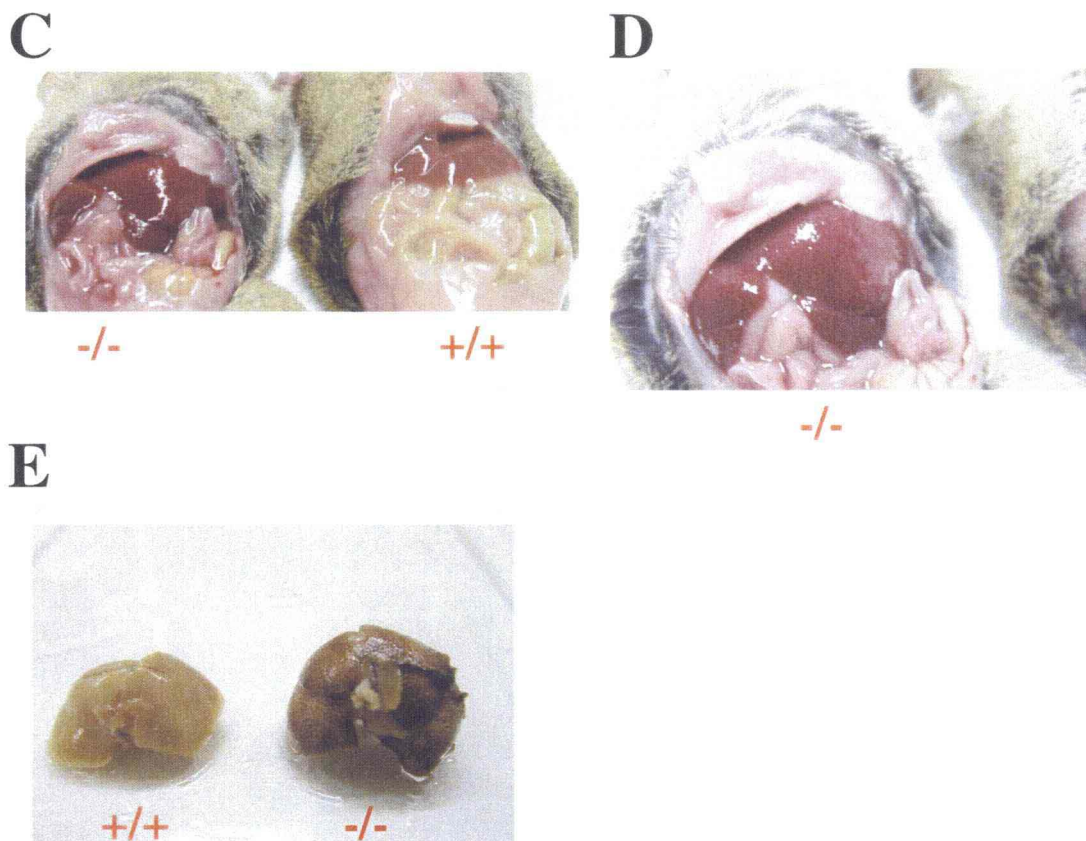
＜図 5-1；ABCA5 ノックアウトマウスで観察される外見的異常＞

A；腹部の膨大。B；眼球の突出。

**A****B**

＜図 5-2；ABCA5 ノックアウトマウスの検死解剖＞

A；皮下浮腫。B；心拡張。



<図 5-2 ; ABCA5 ノックアウトマウスの検死解剖>

C ; 小腸などに鬱血。腹水も多い。D ; 肝臓。赤色の斑点が点在。E ; 固定後の肝臓。

心臓では、左心室の壁の厚みが減少しており、心室の拡張が確認された。また、大・肺動脈にも拡張がみられた。また、心筋繊維は著しく解離している（図 5-3A,B、図5-4）。

肝臓では、巨核細胞が多数出現しており、肝細胞内および核内に空胞が見られた。また、各所に充出血が確認される（図5-3C）。

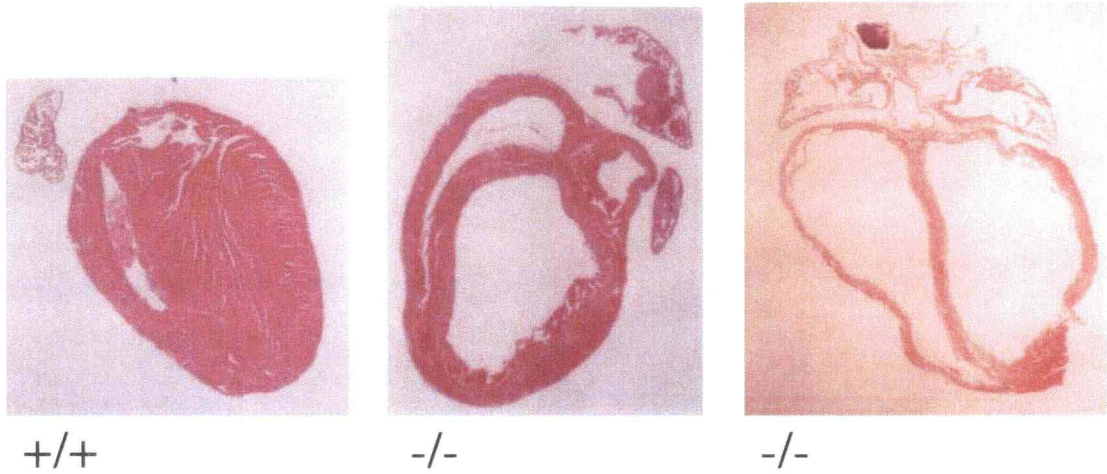
肺では、異常な拡張が見られ、一部、気管支周囲にリンパ球が集まっているのが観察された（図 5-3D）。

＜表 5-4；ABCA5 ノックアウトマウス病理切片＞

臓器	所見
脳	異常なし。
腎臓	異常なし。 副腎に多少空胞が見られる。
脾臓	異常なし。
膀胱	完全に収縮。異常なし。
腸	異常なし。
眼球	角膜、水晶体、網膜等に異常はない。

さらに、心臓に関して、さらに詳しく調べたところ（図 5-4C,D）、心筋細胞内に空胞が観察された。このことから、ABCA5 欠損マウスでは細胞内に沈着物が蓄積しているようである。この点にをさらに明らかにするためには、この空胞に関して電子顕微鏡観察を行う必要がある。

A



B

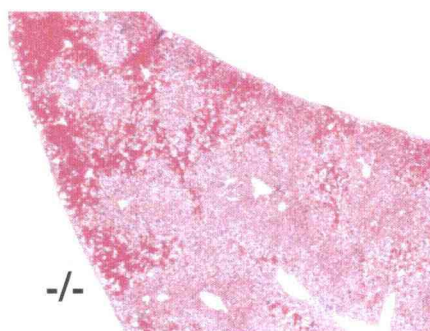
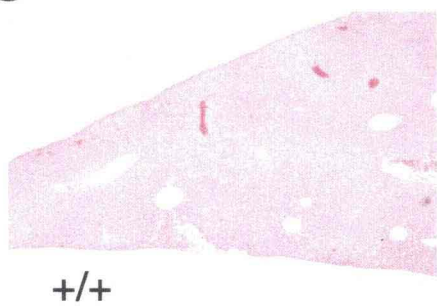


<図 5-3 ; ABCA5 ノックアウトマウスの組織切片>

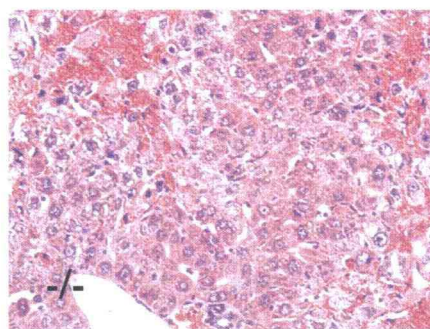
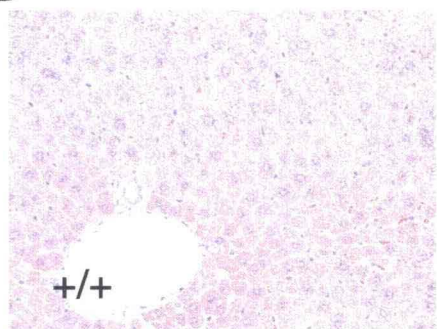
A ; 心臓 (全体像)。左から、野生型、ノックアウトマウス、ノックアウトマウス。ノックアウトマウスでは、心室拡張が観察される。B ; ノックアウトマウスの心臓 (拡大像)。



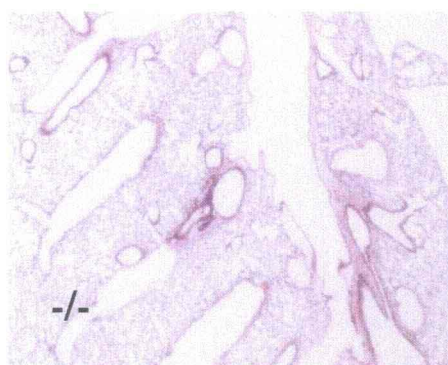
**C**



**D**



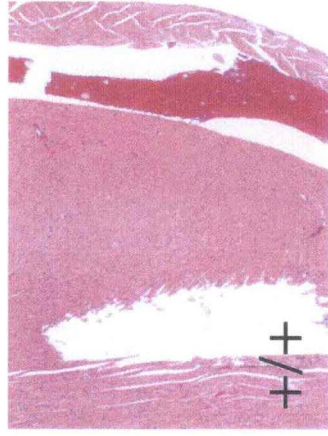
**E**



**<図 5-3 ; ABCA5 ノックアウトマウスの組織切片>**

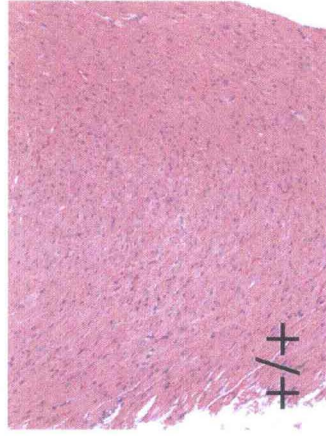
**C** ; 肝臓。野生型 (左) ノックアウトマウス (右)。ノックアウトマウスでは、充出血が確認される。**D** ; 拡大像。野生型 (左) ノックアウトマウス (右)。**E** ; 肺。左右ともにノックアウトマス。右図 (拡大像)

A

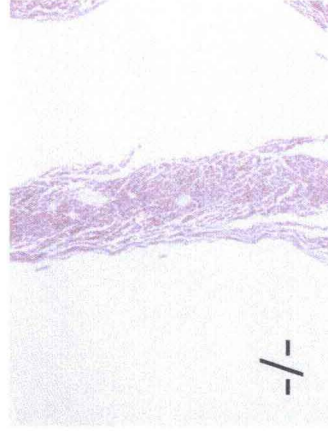


+/+

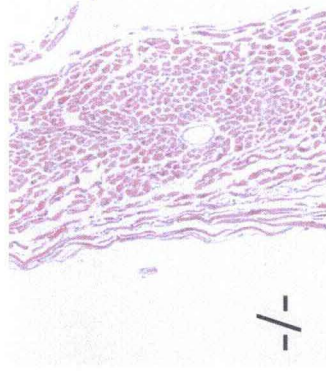
B



+/+



-/-



-/-

C

D

＜図 5-4＞ 野生型、ノックアウトマウスの心臓切片。中隔を撮影した。A；野生型（左）、ノックアウトマウス（右）B；拡大像。野生型（左）、ノックアウトマウス（右）。野生型と比較して、ノックアウトマウスでは細胞の密度が落ちているように見える。C；ノックアウトマウスの心臓切片。細胞内の空胞化。D；拡大像。空胞（矢印）。



## ・血液・尿検査

マウスで観察される病態に関してより多くの情報を得るため、血液と尿を採取し、検査を行った（表5-5）。

検査に用いたマウスは4匹で、マウス1は野生型、マウス2、3、4はノックアウトマウスである。マウス4では心拡張が確認されたが、いずれも外見上、肝異常は観察されない段階のマウスを用いた。

検査を行った全てのマウスにおいてトータルコレステロール、トータルプロテイン、アルブミン、アルブミン-グロブリン比率は大差ない。このことからマウスの栄養状態に問題はがないことが確認された。マウス 3 およびマウス 4 では、ALP が上昇していた一方で、AST、ALT は野生型と同じレベルであった。AST、ALT のレベルが野生型と同程度であることから、傷害性肝不全の可能性は低い。ALP には 6 のアイソフォームが存在し、種々の病態において値が上昇する（表 5-6）。いずれの ALP アイソフォームが上昇しているかを同定することが、次回、血液検査の課題である。

＜表 5-5；血液検査。1-野生型、2,3,4-ノックアウトマス。4 は心拡張が確認された。＞

Mouse No.	1	2	3	4
genotype	+/+	-/-	-/-	-/-
AST(GOT) (U/L)	91	129	93	109
ALT(GPT) (U/L)	28	32	45	32
ALP (U/L)	288	281	498	504
T-Chol. (mg/dL)	65	77	68	72
T.Protein (g/dL)	5.19	5.52	4.99	5.06
Albumin(g/dL)	3.02	2.99	3.04	3.04
アルブミン/グロブリン比	1.39	1.18	1.56	1.50

<表 5-6；ALP のアイソフォームと関連病態>

アイソフォーム	病態
ALP1	胆道が機械的に閉塞される肝外性胆道閉塞や転移性肝癌の場合に出現する。肝内胆汁鬱滞との鑑別
ALP2	正常成人の血中 ALP の大部分を占める。肝胆道疾患で上昇
ALP3	骨由来の ALP で osteoblast の活動性を反映。甲状腺機能亢進症、癌骨転移で上昇
ALP4	胎盤由来の ALP。妊娠末期に出現
ALP5	小腸由来の ALP。B 型ないし O 型の分泌型で上昇。肝硬変、慢性腎不全、糖尿病で上昇
ALP6	肝性 ALP と IgG が結合したもので、潰瘍性大腸炎の極期に出現

尿検査の結果、ノックアウトマウスの尿中に野生型に比して 2 倍量以上の Na と Cl が排泄されていることが明らかになった。病理切片解析では、腎臓に構造的異常は確認されていないこともあり、大変興味深い。マウスにおける血液・尿検査は今後も継続される必要性が認められる。

<表 5-7；尿検査>

Mouse No.	1	2	3	4
genotype	+/+	-/-	-/-	-/-
Na (mEq/L)	72	103	111	157
K (mEq/L)	149.3	235.7	286.2	263.3
Cl(mEq/L)	72.8	150.2	113.4	195.2

## 第 2 節 考察

成獣後の ABCA5 ノックアウトマウスにおいて顕著な異常が観察された。今回、解析対象にしたノックアウトマウスは F1 である。ゆえに今後、戻し交配によって遺伝的背景の影響を少なくした上で、表現型の確定を行う必要性が存在する。

ABCA5 ノックアウトマウスに関してこれまでに得られた知見は、大変重要であり、興味深い内容である。外見的には腹部の膨大、眼球の突出、行動的には、活動性の低下、臓器は、心拡張、肝臓の異常、鬱血などであり、主要発現臓器である精巣・脳に特に異常は確認されなかった。このことは病理切片の解析においても、同様であった。

腹部の膨大に関しては、皮下浮腫がその実体である。肝臓異常が確認できることから浮腫・腹水の原因は、肝機能低下に伴うアルブミン合成低下によって、血漿膠質液浸透圧が減少したためであると考えられる。

病態発症機構としては肺が mABCA5 の主要発現臓器の 1 つであることから、「肺異常→肺性心（右心不全）→鬱血性肝不全」の図式が考えられる。これは、肺や胸郭の 1 次的原因（気管支炎、肺気腫、胸郭運動障害など）による肺循環障害のため右心に負荷がかかって生じる心疾患であり、右心室の肥大拡張を生じる。しかしながら、心臓の病理切片を見るとノックアウトマウスでは心室は左右ともに拡張していることから、この可能性は低い。むしろ、心筋症の症状に近いとも考えられる。従って、心臓の異常は心臓そのものに原因があるという可能性を排除することはできない。肝臓の異常についても心臓とは無関係に

生じた可能性も考えられる。無論、これら臓器の異常の上流に mABCA5 の主要発現臓器である脳（メスでも発症するので精巣の可能性は低い）が存在することは十分想定できる。

# 総括

トランスポーターは、細胞膜に発現し、有用な物質（グルコースなど）を取り込む一方で（49）、細胞外に多種多様な物質を放出している。本研究では、「トランスポーターがホルモンなどの生体情報分子の分泌装置として機能しているのではないか」という仮説をもとに、神経細胞に発現する ABI（mABCA5）を見出し、その完全長 cDNA クローニングを行い、全アミノ酸配列を明らかにした。この情報に関しては、GenBank に登録され、間もなく公開予定である（GenBank accession number, AB097675）。また、その生理的役割を解明するため、ABCA5 ノックアウトマウスを作成・解析を行った。ABCA5 ノックアウトマウスでは、生体内における ABCA5 の重要性を示唆する表現型が観察されたが、今後はさらに、遺伝的背景の影響を少なくした上で、表現型の確定を行う必要がある。

A サブファミリーにおいては、これまでに 8 種類のメンバーのクローニングが報告されているが、機能が明らかなものは、ABCA1 と ABCA4 の 2 つのみである。しかし、ABCA1 に関しては輸送体かあるいは制御因子か？という疑問点も存在し、分子機構解明には時間がかかりそうである。mABCA5 の全アミノ酸配列から予測される構造は ABC トランスポーター、特に A サブファミリーに特徴的なものであり、mABCA5 がコレステロールや脂質の誘導体であるステロイドホルモンや脂質メディエーターの輸送体である可能性は十分に考えられる。

臓器分布解析の結果から、mABCA5 は主要発現臓器として精巣、脳、肺が明

らかとなったが、その他の臓器においても微弱ながら発現が確認された。心臓や肝臓など、mABCA5 ノックアウトマウスにおいて異常が顕著であった臓器の多くは mABCA5 低発現臓器であった。このことから、2 通りのことが考えられる。1 つは、低発現ながら、mABCA5 が心臓や肝臓にとって極めて重要な役割を担うものである可能性、2 つ目は、mABCA5 欠損によって主要発現臓器である脳において問題が生じ、心臓や肝臓にとって重要な因子がカットされた可能性である。いずれにしても、この疑問に回答を得るためには、ノックアウトマウスの病態発症機構をさらに詳しく解き明かさなければならない。

現在のところ、発現細胞を用いた基質検索やノックアウトマウスの解析によっても、mABCA5 の基質および生理的役割の解明は達成されていない。しかしながら、ABCA5 ノックアウトマウスに関して得られた知見は大変重要であり、少なくともノックアウトマウスの解析からは、mABCA5 が生理的に極めて重要な ABC トランスポーターであることが明らかとなった。また、ABCA5 ノックアウトマウスにおいて観察される形質は、これまでに作成された ABC トランスポーターノックアウトマウスでは類を見ないものであると同時に、解析の方向性を示唆するものであった。第 4、5 章で述べたとおり、mABCA5 欠損は胎性致死を引き起こさないが、成熟期（6 週齢以降）に種々の異常が観察されるようになり、その主なものは心臓の拡張と肝臓の異常である。心臓は左心室壁の厚みが減少しており、心室は拡張している。これは心筋症の際に見られる所見に近い。心筋症については、その発症機構に不明な点が多く、もし、mABCA5 が心筋症原因遺伝子の 1 つであるならば、ABCA5 ノックアウトマウスの解析は、心臓疾患の究明と治療に貢献することになるだろう。いずれにしても、

mABCA5 の生理的役割の解明のためには、mABCA5 ノックアウトマウスの心臓においてどのような異変が起きているかを明確にしなければならない。本研究は mABCA5 が生体にとって非常に重要な ABC トランスポーターであることを示している。

# 参考文献

1. Ishikawa, T. (1992) *Trends Biochem Sci* **17**(11), 463-8.
2. Ito, K., Suzuki, H., Hirohashi, T., Kume, K., Shimizu, T., and Sugiyama, Y. (1998) *J Biol Chem* **273**(3), 1684-8.
3. Fujiyama, F., Furuta, T., and Kaneko, T. (2001) *J Comp Neurol* **435**(3), 379-87.
4. Herzog, E., Bellenchi, G. C., Gras, C., Bernard, V., Ravassard, P., Bedet, C., Gasnier, B., Giros, B., and El Mestikawy, S. (2001) *J Neurosci* **21**(22), RC181.
5. Yatomi, Y., Ohmori, T., Rile, G., Kazama, F., Okamoto, H., Sano, T., Satoh, K., Kume, S., Tigyi, G., Igarashi, Y., and Ozaki, Y. (2000) *Blood* **96**(10), 3431-8.
6. Higgins, C. F. (1992) *Annu Rev Cell Biol* **8**, 67-113.
7. Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., and Gay, N. J. (1982) *EMBO J* **8**, 945-951.
8. Anderson, M. P., and Welsh, M. J. (1992) *Science* **257**(5077), 1701-4.
9. ABC Nomenclature Committee. (1999)  
<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/abc.html>
10. Chen, C. J., Chin, J. E., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M. M., and Roninson, I. B. (1986) *Cell* **47**(3), 381-9.
11. Schinkel, A. H., Smit, J. J., van Tellingen, O., Beijnen, J. H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C. A., van der Valk, M. A., Robanus-Maandag, E. C., te Riele, H. P., and et al. (1994) *Cell* **77**(4), 491-502.
12. Gottesman, M. M., and Pastan, I. (1993) *Annu Rev Biochem* **62**, 385-427.
13. Kleijmeer, M. J., Kelly, A., Geuze, H. J., Slot, J. W., Townsend, A., and Trowsdale, J. (1992) *Nature* **357**(6376), 342-4.
14. Spies, T., and DeMars, R. (1991) *Nature* **351**(6324), 323-4.
15. Attaya, M., Jameson, S., Martinez, C. K., Hermel, E., Aldrich, C., Forman, J., Lindahl, K. F., Bevan, M. J., and Monaco, J. J. (1992) *Nature* **355**(6361), 647-9.
16. Neefjes, J. J., Momburg, F., and Hammerling, G. J. (1993) *Science* **261**(5122), 769-71.
17. Shepherd, J. C., Schumacher, T. N., Ashton-Rickardt, P. G., Imaeda, S., Ploegh, H. L., Janeway, C. A., Jr., and Tonegawa, S. (1993) *Cell* **74**(3), 577-84.
18. Allikmets, R., Singh, N., Sun, H., Shroyer, N. F., Hutchinson, A., Chidambaram, A., Gerrard, B., Baird, L., Stauffer, D., Peiffer, A., Rattner, A., Smallwood, P., Li, Y., Anderson, K. L., Lewis, R. A., Nathans, J., Leppert, M., Dean, M., and Lupski, J. R. (1997) *Nat Genet* **15**(3), 236-46.
19. Illing, M., Molday, L. L., and Molday, R. S. (1997) *J Biol Chem* **272**(15), 10303-10.
20. Weng, J., Mata, N. L., Azarian, S. M., Tzekov, R. T., Birch, D. G., and Travis, G. H. (1999) *Cell* **98**(1), 13-23.
21. Mosser, J., Lutz, Y., Stoeckel, M. E., Sarde, C. O., Kretz, C., Douar, A. M., Lopez, J., Aubourg, P., and Mandel, J. L. (1994) *Hum Mol Genet* **3**(2), 265-71.
22. Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z., Piette, J. C., Deleuze, J. F., Brewer, H. B., Duverger, N., Deneffe, P., and Assmann, G. (1999) *Nat Genet* **22**(4), 352-5.
23. Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S. M., Zhang, L. H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J. A., Molhuizen, H. O., Loubser, O., Ouelette, B. F., Fichter, K., Ashbourne-Excoffon, K. J., Sensen, C. W., Scherer, S., Mott, S., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J. J., Hayden, M. R., and et al. (1999) *Nat Genet* **22**(4), 336-45.
24. Broccardo, C., Luciani, M., and Chimini, G. (1999) *Biochim Biophys Acta* **1461**(2), 395-404.
25. Wang, N., Silver, D. L., Costet, P., and Tall, A. R. (2000) *J Biol Chem* **275**(42), 33053-8.
26. Wang, N., Silver, D. L., Thiele, C., and Tall, A. R. (2001) *J Biol Chem* **276**(26), 23742-7.
27. Sakr, S. W., Williams, D. L., Stoudt, G. W., Phillips, M. C., and Rothblat, G. H. (1999) *Biochim Biophys Acta* **1438**(1), 85-98.
28. Fitzgerald, M. L., Mendez, A. J., Moore, K. J., Andersson, L. P., Panjeton, H. A., and Freeman, M. W. (2001) *J Biol Chem* **276**(18), 15137-45.
29. Jones-Villeneuve, E. M., McBurney, M. W., Rogers, K. A., and Kalnins, V. I. (1982) *J Cell Biol* **94**(2), 253-62.



30. Brewer, G. J., Torricelli, J. R., Evege, E. K., and Price, P. J. (1993) *J Neurosci Res* **35**(5), 567-76.
31. Brewer, G. J. (1997) *J Neurosci Methods* **71**(2), 143-55.
32. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997) *Nucleic Acids Res* **25**(17), 3389-402.
33. Piehler, A., Kaminski, W. E., Wenzel, J. J., Langmann, T., and Schmitz, G. (2002) *Biochem Biophys Res Commun* **295**(2), 408-16.
34. Kaminski, W. E., Wenzel, J. J., Piehler, A., Langmann, T., and Schmitz, G. (2001) *Biochem Biophys Res Commun* **285**(5), 1295-301.
35. Tsuruoka, S., Ishibashi, K., Yamamoto, H., Wakaumi, M., Suzuki, M., Schwartz, G. J., Imai, M., and Fujimura, A. (2002) *Biochem Biophys Res Commun* **298**(1), 41-5.
36. Kawai, J., Shinagawa, A., Shibata, K., Yoshino, M., Itoh, M., Ishii, Y., Arakawa, T., Hara, A., Fukunishi, Y., Konno, H., Adachi, J., Fukuda, S., Aizawa, K., Izawa, M., Nishi, K., Kiyosawa, H., Kondo, S., Yamanaka, I., Saito, T., Okazaki, Y., Gojobori, T., Bono, H., Kasukawa, T., Saito, R., Kadota, K., Matsuda, H., Ashburner, M., Batalov, S., Casavant, T., Fleischmann, W., Gaasterland, T., Gissi, C., King, B., Kochiwa, H., Kuehl, P., Lewis, S., Matsuo, Y., Nikaido, I., Pesole, G., Quackenbush, J., Schriml, L. M., Staubli, F., Suzuki, R., Tomita, M., Wagner, L., Washio, T., Sakai, K., Okido, T., Furuno, M., Aono, H., Baldarelli, R., Barsh, G., Blake, J., Boffelli, D., Bojunga, N., Carninci, P., de Bonaldo, M. F., Brownstein, M. J., Bult, C., Fletcher, C., Fujita, M., Gariboldi, M., Gustincich, S., Hill, D., Hofmann, M., Hume, D. A., Kamiya, M., Lee, N. H., Lyons, P., Marchionni, L., Mashima, J., Mazzarelli, J., Mombaerts, P., Nordone, P., Ring, B., Ringwald, M., Rodriguez, I., Sakamoto, N., Sasaki, H., Sato, K., Schonbach, C., Seya, T., Shibata, Y., Storch, K. F., Suzuki, H., Toyo-oka, K., Wang, K. H., Weitz, C., Whittaker, C., Wilming, L., Wynshaw-Boris, A., Yoshida, K., Hasegawa, Y., Kawaji, H., Kohtsuki, S., and Hayashizaki, Y. (2001) *Nature* **409**(6821), 685-90.
37. Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., and Mitaku, S. (1998) *Bioinformatics* **14**(4), 378-9.
38. Zhou, C., Zhao, L., Inagaki, N., Guan, J., Nakajo, S., Hirabayashi, T., Kikuyama, S., and Shioda, S. (2001) *J Neurosci* **21**(3), 849-57.
39. Zhao, L. X., Zhou, C. J., Tanaka, A., Nakata, M., Hirabayashi, T., Amachi, T., Shioda, S., Ueda, K., and Inagaki, N. (2000) *Biochem J* **350**(Pt 3), 865-72.
40. Yamano, G., Funahashi, H., Kawanami, O., Zhao, L. X., Ban, N., Uchida, Y., Morohoshi, T., Ogawa, J., Shioda, S., and Inagaki, N. (2001) *FEBS Lett* **508**(2), 221-5.
41. Mulugeta, S., Gray, J. M., Notarfrancesco, K. L., Gonzales, L. W., Koval, M., Feinstein, S. I., Ballard, P. L., Fisher, A. B., and Shuman, H. (2002) *J Biol Chem* **277**(25), 22147-55.
42. Yagi, T., Nada, S., Watanabe, N., Tamemoto, H., Kohmura, N., Ikawa, Y., and Aizawa, S. (1993) *Anal Biochem* **214**(1), 77-86.
43. Nada, S., Yagi, T., Takeda, H., Tokunaga, T., Nakagawa, H., Ikawa, Y., Okada, M., and Aizawa, S. (1993) *Cell* **73**(6), 1125-35.
44. Yanagawa, Y., Kobayashi, T., Ohnishi, M., Kobayashi, T., Tamura, S., Tsuzuki, T., Sanbo, M., Yagi, T., Tashiro, F., and Miyazaki, J. (1999) *Transgenic Res* **8**(3), 215-21.
45. Yagi, T., Tokunaga, T., Furuta, Y., Nada, S., Yoshida, M., Tsukada, T., Saga, Y., Takeda, N., Ikawa, Y., and Aizawa, S. (1993) *Anal Biochem* **214**(1), 70-6.
46. Wang, R., Salem, M., Yousef, I. M., Tuchweber, B., Lam, P., Childs, S. J., Helgason, C. D., Ackerley, C., Phillips, M. J., and Ling, V. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4), 2011-6.
47. Robbiani, D. F., Finch, R. A., Jager, D., Muller, W. A., Sartorelli, A. C., and Randolph, G. J. (2000) *Cell* **103**(5), 757-68.
48. Wijnholds, J., Evers, R., van Leusden, M. R., Mol, C. A., Zaman, G. J., Mayer, U., Beijnen, J. H., van der Valk, M., Krimpenfort, P., and Borst, P. (1997) *Nat Med* **3**(11), 1275-9.
49. Kasahara, T., and Kasahara, M. (1998) *J Biol Chem* **273**(44), 29113-7.

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始御指導と御助言を賜りました大阪大学 産業科学研究所 山口明人 教授に心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、幾多の御指導と御助言を賜りました大阪大学 微生物病研究所 名田茂之 助教授に心より感謝申し上げます。

数々の御助言、御協力を頂きました大阪大学 産業科学研究所 村上聡 助手、平田隆弘 助手、日本学術振興会特別研究員 中島良介 博士に深く感謝致します。

病理学的解析に関してご助言を賜りました国立循環器病センター 由谷親夫 部長、重川宗一 部長、大阪大学大学院医学研究科 北村幸彦 教授に深く感謝致します。

本研究の一部は、関谷明香 氏、薩摩祐樹 氏、斉藤恵亮 氏、佐々木真理 氏、柳承希 博士（現 武田薬品工業株式会社）、河辺哲寛 博士（現 山之内製薬株式会社）との共同で行われました。諸氏に深く感謝致します。また、本研究をサポートして頂きました日本学術振興会に深く感謝致します。

## 主論文

- 1: Kubo Y., Sekiya S., Nada S., Yamaguchi A., **Insights into the physiological role of novel ABC transporter, ABCA5, from the phenotype in knockout mice.**  
in preparation
- 2: Kubo Y., Sekiya S., Nada S. and Yamaguchi A., **ABCA5, a novel member of ABC transporter subfamily A, identified in newborn mouse brain, is preferentially expressed in brain and testis.**  
in preparation

## 参考論文

- 1: Kubo Y., Konishi S., Kawabe T., Nada S., Yamaguchi A., **Proximity of periplasmic loops in the metal-Tetracycline/H(+) antiporter of Escherichia coli observed on site-directed chemical cross-linking.**  
*J Biol Chem.* **2000** Feb 25;275(8):5270-4.
- 2: Kimura-Someya T., Iwaki S., Konishi S., Tamura N., Kubo Y., Yamaguchi A., **Cysteine-scanning mutagenesis around transmembrane segments 1 and 11 and their flanking loop regions of Tn10-encoded metal-Tetracycline/H+ antiporter.**  
*J Biol Chem.* **2000** Jun 23;275(25):18692-7.
- 3: Nada S., Murakami S., Okamoto S., Kubo Y., Yamaguchi A., **Monoclonal antibody that binds to the central loop of the Tn10-encoded metal tetracycline/H+ antiporter of Escherichia coli.**  
*J Biochem (Tokyo).* **2001** Jan;129(1):87-91.
- 4: Sasaki M., Kubo Y., Nada S., Yamaguchi A., **Identification of a novel rat ATP-binding cassette transporter (rABCAP) preferentially expressed in platelet.**  
in preparation