

メバロン酸ニリン酸脱炭酸酵素の諸性質、並びに正常血圧ラットと脳卒中易発症ラットとの比較

道原明宏

Comparison of Biochemical Properties and Protein Level of Mevalonate Pyrophosphate Decarboxylase between Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rats and Wistar-Kyoto Rats

Akihiro MICHIHARA

Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University,
Gakuencho, Fukuyama 729-0292, Japan

(Received June 16, 2004)

The spontaneously hypertensive rat (stroke-prone) (SHRSP) experiences severe hypertension and cerebral hemorrhage. The serum cholesterol level in this rat is lower than that in the normotensive Wistar-Kyoto rat. Epidemiologic studies have indicated a negative association between serum cholesterol level and the incidence of cerebral hemorrhage in humans. Therefore the low level of serum cholesterol in SHRSP may cause cerebral strokes. The following investigation demonstrated that the activity for the biosynthesis of cholesterol is decreased in SHRSP due to the reduced activity of mevalonate pyrophosphate decarboxylase (MPD). However, the mechanism underlying the reduced activity of this enzyme remains unclear. In this review, we indicate that the level of MPD in the brain and liver of SHRSP is reduced from the age of 2 weeks.

Key words—Mevalonate pyrophosphate decarboxylase, SHRSP, WKY, liver, brain

1. はじめに

脳卒中の発症因子として第一義的に重要なのは高血圧である。しかし、近年の疫学的調査の結果、コレステロール不足により脳卒中（中でも脳出血）を誘起することが明らかにされてきた。¹⁻³⁾ 脳卒中易発症ラット (SHRSP) は重篤な高血圧と脳卒中の発症を特徴とし、ヒトのこれらの疾患の研究に広く用いられている。^{4,5)} SHRSP の血清コレステロールは、正常血圧ラット (WKY) に比べ低下している。⁶⁾ また、コレステロールの少ない餌を与えた SHRSP のグループは、コレステロールをある程度与えたグループより脳卒中の 1 つの原因である血管壁の平滑筋細胞壊死に陥りやすいことから、血清コレステロール低下は脳卒中の 1 つの原因である可能性が示唆された。⁷⁾ これらの原因を解明するため

に、コレステロールの吸収、排泄、合成に関する研究が行われた。^{6,8-10)} その結果、肝におけるコレステロール合成能力低下に起因していることが示された。さらに、コレステロール合成に関与する酵素活性を WKY と SHRSP で比較した結果、メバロン酸ニリン酸脱炭酸酵素 (MPD) の活性減少が細胞質画分中で明らかにされた (Fig. 1)。¹¹⁾ 以上の結果より、血清コレステロール減少を引き起こす原因酵素として、MPD の重要性が強く示唆された。本稿では、いまだ不明な点の多い MPD の諸性質 (精製、細胞内分布、組織分布) 並びに SHRSP の MPD 活性減少機構について、これまでの筆者らの検討結果を中心に概説したい。

2. MPD の精製と抗体作製

MPD の精製方法を確立することにより、精製蛋白を用いた抗体作製並びに SHRSP との蛋白レベルでの性質の比較が検討できる。そこで MPD の精製を試みた。Tanaka らはコレステラミン (コレステロール吸収阻害剤) とメビノリン (脂溶性 HMG-CoA reductase 阻害剤) を含む餌を摂取させたラッ

福山大学薬学部免疫生物学研究室 (〒729-0292 福山市学園町 1 番地三蔵)

e-mail: mitihara@fupharm.fukuyama-u.ac.jp

本総説は、平成 15 年度日本薬学会中国四国支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

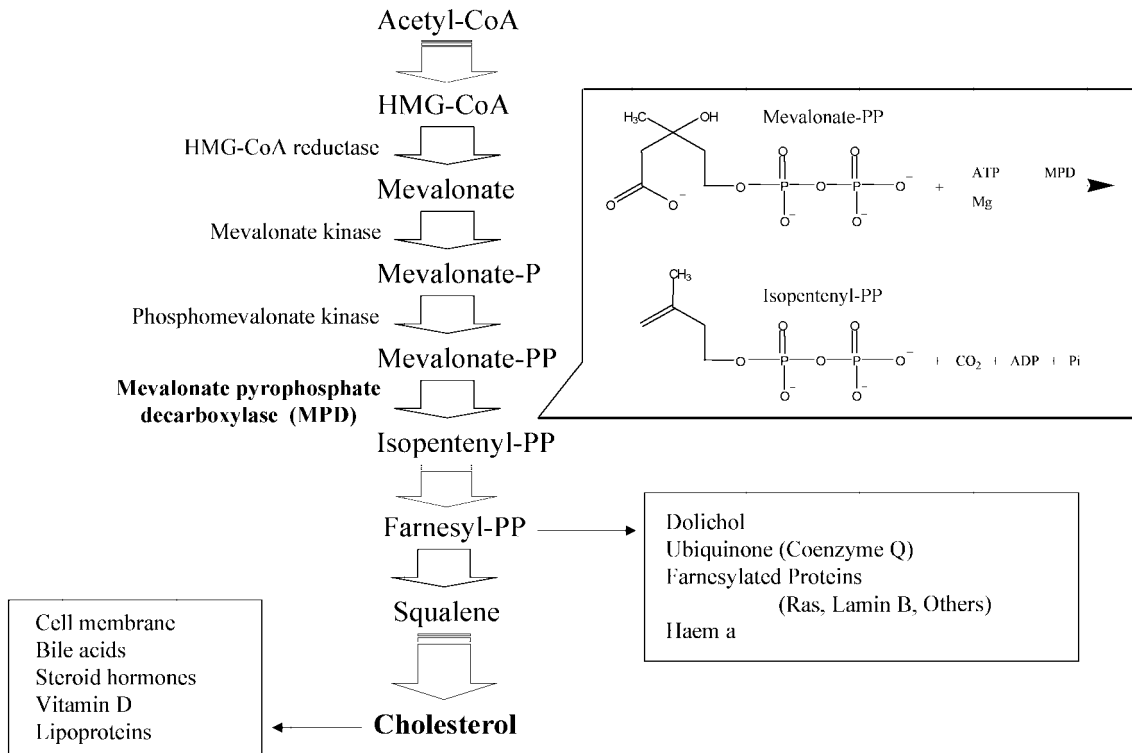


Fig. 1. The Pathway of Cholesterol Biosynthesis and the Reaction of MPD

ト肝のメバロン酸キナーゼ (MVK: コレステロール合成に関与する酵素) が著しく増加することを見出した。¹²⁾ この報告に従い MPD の活性を検討した結果, CP diet (5% コレスチラミン+0.1% プラバスタチン [水溶性 HMG-CoA reductase 阻害剤] を含む餌) を 12 日間摂取させたラット肝の MPD 活性は, 普通食を摂取させたラット肝と比較して 12 倍の最大活性を示した (Fig. 2).¹³⁾ そこで, CP diet を 12 日間摂取させた WKY 15 匹の肝から, 種々のカラムクロマトグラフィーを用いて MPD を精製した (Fig. 3).¹³⁾ その結果, 45 kDa と 37 kDa の 2 種類の MPD 活性を保持した蛋白質が精製された (Table 1). 次に, 精製した 45 kDa MPD に対する抗血清を作製後, 精製した 2 種類の MPD を用いてイムノブロット解析を行った結果, 45 kDa と 37 kDa の位置にバンドが検出された (Fig. 4; lane 1 and 2).¹³⁾ これらの結果より, この 2 種類の MPD は免疫学的に類似していることが明らかになった.

3. 45 kDa と 37 kDa MPD の関係

45 kDa と 37 kDa MPD の構造上の相違点を検討するために性質の比較を行った結果, とともに類似した値を示した (データ未掲載).¹³⁾ 次に, CP diet 処理, 未処理のラット肝抽出液 (20000 x g 上清) を

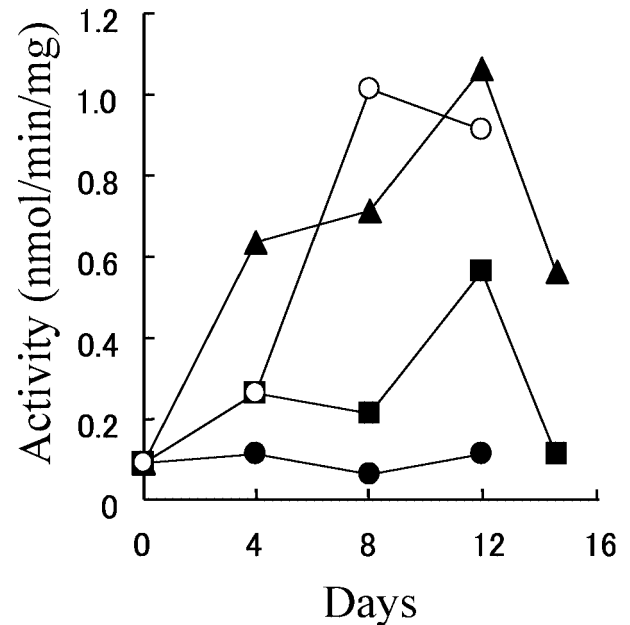


Fig. 2. Induction of MPD Activity in Rat Liver by Cholestyramine and Pravastatin

Rats were fed powdered chow without (●) or with 5% cholestyramine (■), or 5% cholestyramine and either 0.1% (▲) or 0.5% (○) pravastatin for the indicated periods.

用いてイムノブロット解析を行った (Fig. 4; lane 3 and 4). CP diet で処理したラット肝において 45 kDa と 37 kDa の位置にバンドが検出された. しか

Table 1. Purification of MPD from Rat Liver

Purification steps	Total protein (mg)	Total units (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
QAE	310	126	0.4		11.0
Blue sepharose	31.6	65	2.9	5.0	52
Hydroxyapatite A	1.13	9.0	8.0	20.0	7.1
Hydroxyapatite B	3.00	27.9	9.3	23.3	22.1
Hydroxyapatite C	5.46	25.1	4.6	11.5	19.9
Phenyl sepharose	0.81	9.89	12.4	31.0	7.8
2nd hydroxyapatite	0.17	1.26	7.4	18.5	1.0

MPD was purified from 15 livers (102 g) of rats fed on CP diet for 12 days.

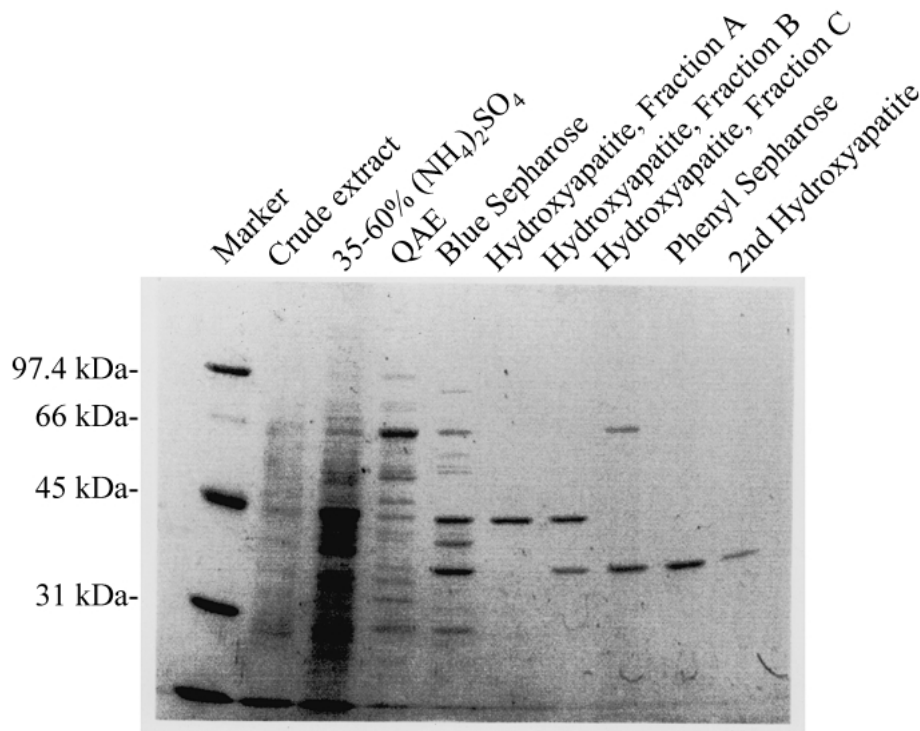


Fig. 3. Proteins at Each Purification Step Were Analyzed by SDS-PAGE

The active fractions at each step were subjected to SDS-PAGE, and then the proteins were visualized by Coomassie Blue staining. The relative positions of the molecular weight standards are shown in the left margin. Phenyl sepharose (fraction C obtained on hydroxyapatite was applied). 2nd hydroxyapatite (active peak obtained on phenyl sepharose was applied).

し、未処理のラット肝において 37 kDa の位置にバンドは検出されなかった。Stamellos らは細胞質とペルオキシソームにそれぞれ分子量の異なる MVK を報告している。¹⁴⁾ また、ペルオキシソームに存在する MVK はメビノリン処理により、細胞質へ漏れ出てくることを報告している。20000 x g の上清画分は細胞質を含む画分であり、ペルオキシソームは 20000 x g の沈殿画分に含まれる。ゆえに、45 kDa と 37 kDa MPD の関係について 5 つの可能性が示唆された。1) CP diet によりペルオキシソーム中

の MPD が細胞質中へ出現する、2) 前駆体と成熟体の関係、3) 糖鎖付加の差、4) プロテアーゼによる切断、5) CP diet による誘導、これらの可能性を確かめるために、CP diet 未処理のラット肝抽出液 20000 x g の沈殿画分を用いたイムノブロット解析、ラット肝実質細胞を用いたパルスチーチェイスによるプロセッシングの解析、N-グリカナーゼによる糖鎖解析、そして種々のプロテアーゼインヒビター存在下、非存在下抽出液を用いたイムノブロット解析を行った結果、37 kDa の位置にバンドは検

出されなかった (データ未掲載).¹³⁾ 以上の結果より通常 45 kDa MPD が細胞内に存在し, 37 kDa MPD は CP diet により誘導されることが示唆された.

4. MPD の細胞内分布

MPD の局在場所解明は, SHRSP との蛋白レベルでの比較における抽出液調製に対して重要なデータを与える. そこで MPD の細胞内分布解明を試み

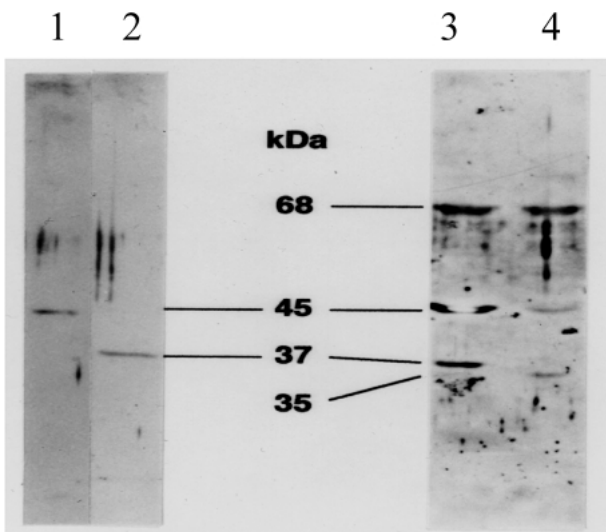


Fig. 4. Immunoblot Analysis of the MPDs

Immunoblot analysis of the purified 45 kDa (lane 1) and 37 kDa (lane 2) enzymes, the CP diet-treated crude extract (lane 3), and the non-treated crude extract (lane 4).

た. MPD の多くは細胞質に存在することが一般的に受け入れられてきた. しかし近年の研究の結果, MPD を含むコレステロール合成酵素の多くはペルオキシソームに局在していることが報告されている.¹⁴⁻²³⁾ そこでラット肝を用いたスクロース密度勾配遠心法による細胞分画, ラット肝実質細胞を用いたジギトニンの実験並びに二重染色蛍光抗体法により MPD の細胞内分布を調査した. 細胞分画によりラット肝を細胞質とペルオキシソームに分離し, イムノブロット解析を行った結果, MPD は細胞質に多く存在しペルオキシソーム画分には検出されなかった (データ未掲載).²⁴⁾ 培養細胞にジギトニンを加えると膜の透過性が増大し, 細胞内小器官は無傷な状態で細胞質蛋白質のみメディウム中に漏れ出してくることが報告されている. この方法に従いジギトニン存在下, 非存在下におけるメディウムと細胞を用いてイムノブロット解析を行った結果, MPD の 90%がメディウム中 (細胞質) に存在していることが明らかになった (Fig. 5).²⁴⁾ さらに, 細胞質のマーカ蛋白であるヘキソキナーゼと MPD による二重染色蛍光抗体法を行った結果, MPD の染色パターンはヘキソキナーゼによる典型的な細胞質蛋白質の染色パターンと類似していた (Fig. 6).²⁴⁾ 以上の結果より通常 45 kDa MPD は細胞質に多く存在していることが明らかになった. 次に抗 MPD

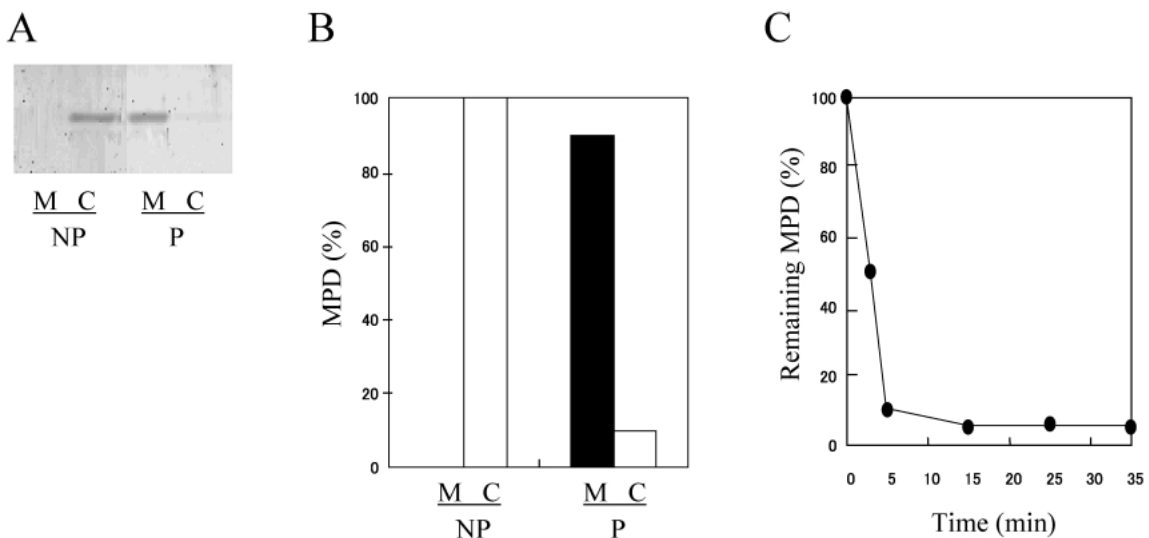


Fig. 5. Immunoblot Analysis of MPD in Nonpermeabilized and Permeabilized Rat Hepatocytes

A: Rat hepatocytes were incubated in the presence (P) or absence (NP) of digitonin (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 5 min at 4°C, and the cells (C) and medium (M) were analyzed by immunoblotting. B: Signals of the band were quantified using a Gel-Pro analyzer. C: Rat hepatocytes were incubated in the presence of digitonin for various times at 4°C, and the cells were analyzed by immunoblotting. Signals of the band were quantified using a Gel-Pro analyzer. The amount of MPD retained in the nonpermeabilized cells was taken as 100%. Data are the means of three identical experiments and each varies within 5%.

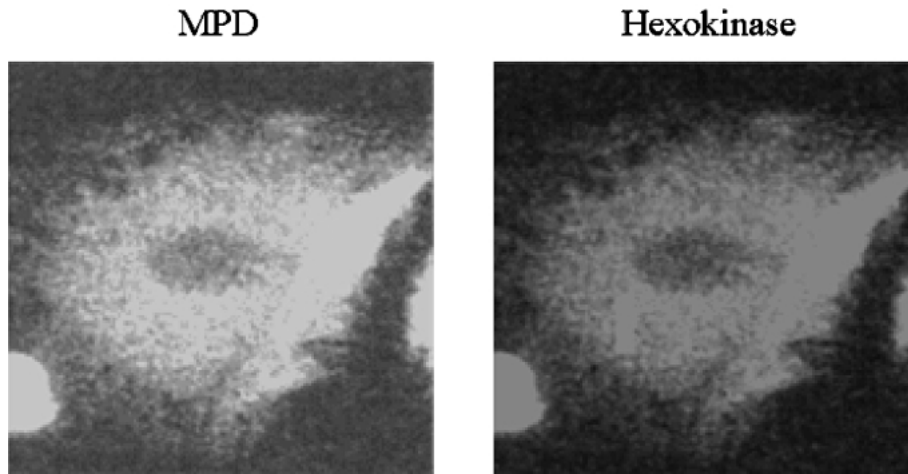


Fig. 6. Localization of MPD and Hexokinase in Rat Hepatocytes

The primary antibodies used were rabbit anti-rat MPD antibody and mouse anti-hexokinase.

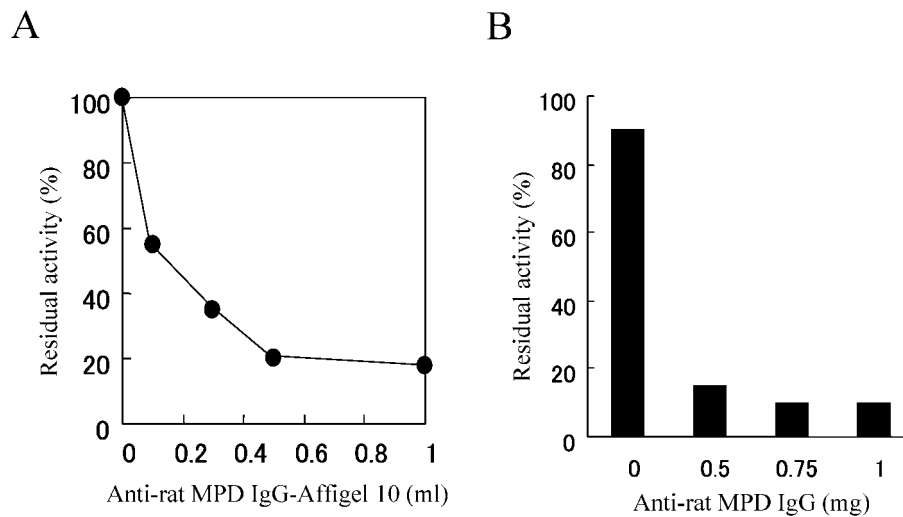


Fig. 7. Immunoprecipitation of MPD

Crude extracts (10 nmol/min MPD activity) of rat liver dissolved in homogenate buffer were (A) added to increasing amounts of anti-rat MPD antibody-Affigel 10 (0.1, 0.3, 0.5, or 1 ml of 0.5 mg of antibody/1 ml of packed gel) equilibrated with homogenate buffer or (B) added to increasing amounts of anti-rat MPD antibody-Protein A (0.2 ml of 0, 0.5, 0.75, or 1 mg of antibody/0.2 ml of Protein A) equilibrated with homogenate buffer and rotated at 4°C for 2 h prior to centrifugation at 3000 x g for 5 min. MPD activity in the supernatant was measured.

抗体カラムを作製後、肝抽出液を用いて免疫沈降を行った結果、80%以上のMPD活性が消失した (Fig. 7).²⁵⁾ これらの結果より、45 kDa MPD はラット肝におけるMPD活性を保持した主要な蛋白質であることが明らかになった。

5. MPDの組織分布

MPDの定量的測定法の確立は、SHRSPとの蛋白質量の比較において必要不可欠である。そこでMPDの定量的組織分布の解析を試みた。各組織抽出液の45 kDa MPD量を定量的に測定するため

に、精製した45 kDa MPDを段階的に希釈し、各組織抽出液と平行してイムノブロット解析を行った。用いた精製蛋白質の量に依存してシグナルは増加し、これをクロマトスキャナーで定量した結果、シグナルは5—110 ngの間で直線性を示した (Fig. 8).²⁵⁾ この結果を基に細胞内分布を解析した結果、MPD含量の最も多い組織は肝臓であり、最も低い組織は心臓であることが明らかになった (Fig. 9, Table 2).²⁵⁾

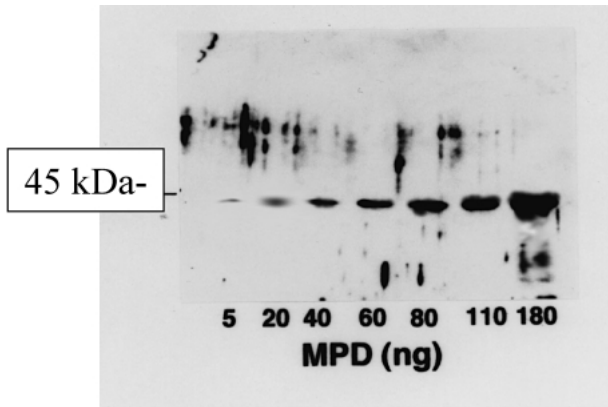


Fig. 8. Dose-response Curve of Immunoblot Analysis for MPD

Five to 180 ng of purified MPD from rat was subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting. Signals of the band were quantified using a Gel-Pro analyzer.

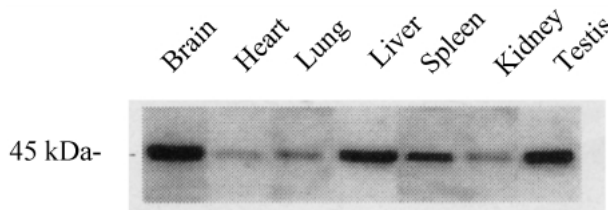


Fig. 9. Immunoblot Analysis of Crude Extract in Rat Tissues with Anti-Rat MPD Antibody

Slices of various rat tissues were homogenized in 3 volumes of homogenate buffer and then centrifuged at $106000 \times g$ for 1 h. The resultant supernatant was used as crude extract of various tissues. Crude extracts in various tissues were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblot analysis.

Table 2. Amount of MPD in Various Rat Tissues

Tissue	MPD in tissues (ng/mg)
Brain	23 ± 3.6
Heart	3 ± 0.4
Lung	5 ± 0.8
Liver	84 ± 6
Spleen	34 ± 8
Kidney	9 ± 1.2
Testis	42 ± 8

Data are the means of four identical experiments.

6. SHRSP と WKY における MPD の性質の比較

SHRSP 肝の MPD 活性減少の原因として、1) アミノ酸配列の変化、2) 蛋白量の減少、3) 阻害物質の増加が考えられる。アミノ酸配列の変化は、

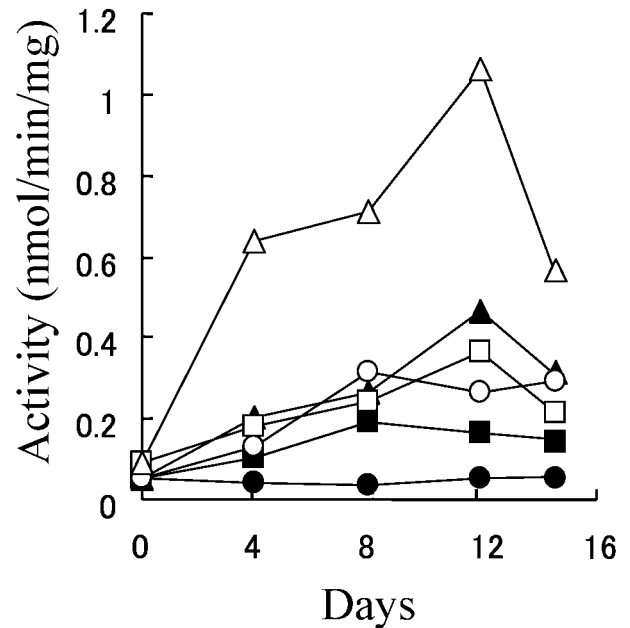


Fig. 10. Induction of MPD Activity in Rat Liver of SHRSP by Cholestyramine and Pravastatin

Rats were fed powdered chow without (●) or with 5% cholestyramine (■), or 5% cholestyramine and either 0.1% (▲) or 0.5% (○) pravastatin, 10% cholestyramine and 0.5% pravastatin (□) for the indicated periods. The data of WKY fed a CP diet (△).

MPD の性質に大きな違いをもたらす可能性がある。そこで WKY と同様な方法により SHRSP から MPD を精製し (Figs. 10, 11), 精製蛋白を用いた性質の比較を試みた。WKY と同様な SHRSP においても通常 45 kDa MPD が細胞内に存在し、37 kDa MPD は CP diet により誘導されることが示唆された。²⁶⁾ 以後は、通常存在する 45 kDa MPD を中心に SHRSP と WKY の性質の比較を述べる。基質であるメバロン酸二リン酸並びに ATP に対する K_m 値、至適 pH, Native 分子量は WKY, SHRSP とともに類似した値を示した (Table 3)。しかし、SHRSP のマグネシウムに対する親和性は WKY に比べ高い値を示した。また、SHRSP の等電点は WKY に比べ幾分減少していた。さらに、カチオン、ヌクレオチドの影響について検討した結果、WKY と SHRSP の間で若干の違いが示された (データ未掲載)。これらの結果は本酵素のカチオン結合領域の構造変化を示唆している。以上の結果より WKY と SHRSP の間で性質の比較を行ったが、カチオン依存性の違いを除けば非常に類似した性質を示していることが明らかになった。したがって WKY と SHRSP の肝において MPD 活性の差を蛋白構造の

差に帰することはできない. 次に蛋白量の比較を行った.

7. SHRSP と WKY における MPD の蛋白量の比較

SHRSP と WKY における各組織抽出液中に含ま

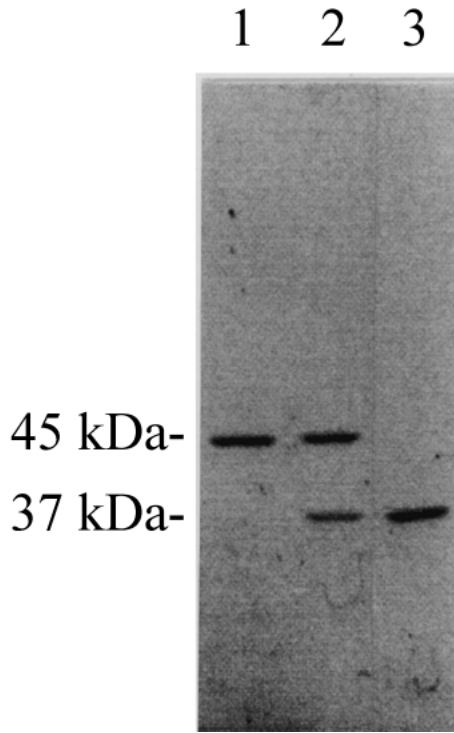


Fig. 11. SDS-PAGE of the Purified MPDs from SHRSP
MPD obtained from the second hydroxyapatite fraction A (lane 1: 45 kDa MPD), C (lane 3: 37 kDa MPD), or the purified 45 and 37 kDa from WKY (lane 2) were analyzed by SDS-PAGE.

れる MPD 量を比較した結果, 脳と肝以外の他の組織では著しい差は認められなかった (Fig. 12). 脳は全身のコレステロールの約 1/4 を含み, それをすべて脳自身で合成していることが一般的に受け入れられている. 一方, 肝は各組織へ供給されるコレステロールの主たる合成臓器である. したがって SHRSP の脳, 肝の MPD 量減少は全身のコレステロール減少を引き起こすとともに, このラットの脳の機能に重要な影響を及ぼす可能性が示唆された. 次に脳, 肝, 精巣の抽出液を用いて MPD の酵素活性並びに蛋白量を定量的に測定した. その結果 SHRSP の脳と肝において活性同様蛋白量も減少していることが明らかになった (Fig. 13).²⁶⁾ これら

Table 3. Comparison of Characteristics of MPD in WKY and SHRSP

	WKY	SHRSP
MVAPP (Km ; μ M)	22.7 \pm 2.2	22.7 \pm 2.5
MVAPP (V_{max} ; μ mol/min/mg)	7.4 \pm 0.2	6.3 \pm 0.5
ATP (Km ; mM)	0.71 \pm 0.05	0.81 \pm 0.02
ATP (V_{max} ; μ mol/min/mg)	5.5 \pm 0.2	4.0 \pm 0.8
Affinity for Mg ²⁺ (Km ; mM) [*]	1.5 \pm 0.1 ^{a)}	0.52 \pm 0.1 ^{a)}
Optimum pH	7.0	7.0
pI	5.6	5.0
Native M.W. (kDa)	90	90

^{*} The concentration at which half maximum activity was observed.
^{a)} Significantly different : $p < 0.0005$ ($n = 3$).

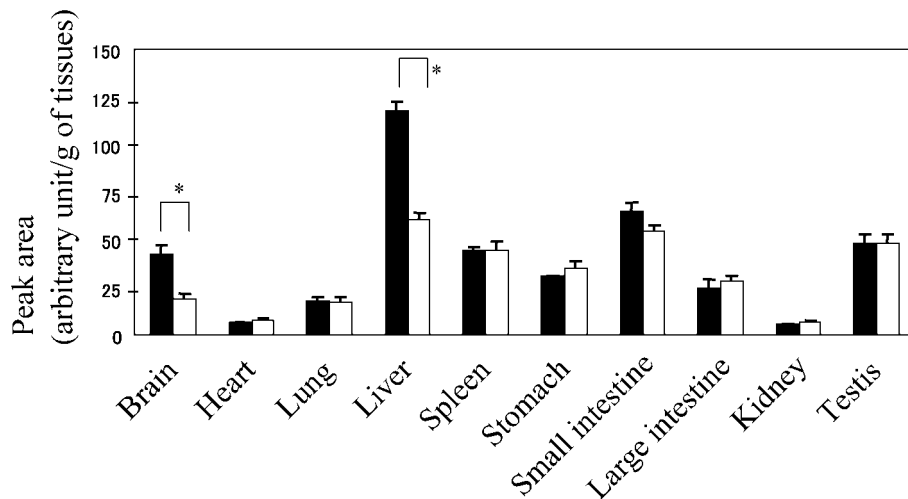
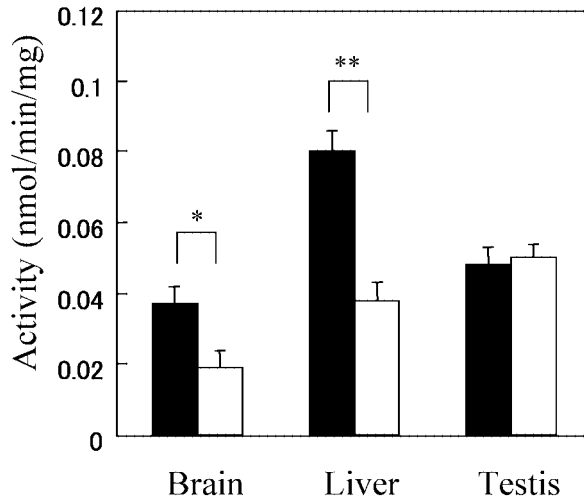


Fig. 12. Comparison of Tissue Distribution of MPD between WKY and SHRSP
Slices of various tissues in WKY and SHRSP fed on normal chow were homogenized. The homogenates were centrifuged at 20000 x g for 30 min. The supernatants were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot analysis. Signals of the bands were measured by chromatoscanner. Each value represents the standard deviation of triplicate determinations. MPD in 1 g of tissues. WKY (■) and SHRSP (□). Significantly different, $p < 0.05$ (*).

Activity



Amount

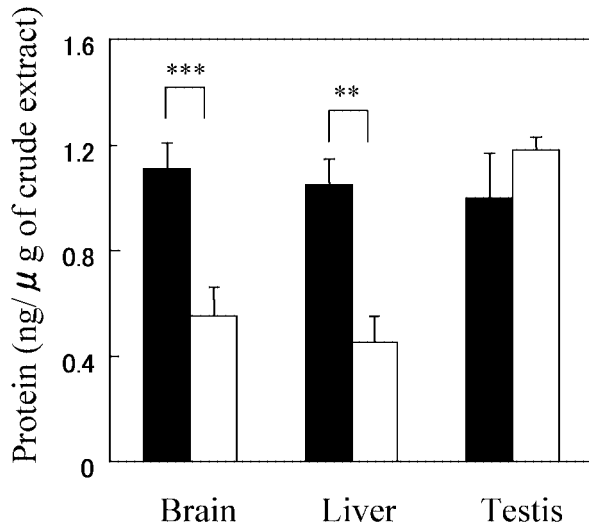


Fig. 13. Quantification of the Activity and the Amount of MPD in the Crude Extract

Crude extract was incubated with [^3H] mevalonate pyrophosphate for 15 min. Isopentenyl pyrophosphate formed was measured according to the method of Sawamura.¹¹⁾ Crude extracts of brain, liver or testis were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot analysis. Signals of the bands were measured by chromatoscanner. WKY (■) and SHRSP (□). Significantly different, $p < 0.05$ (*); $p < 0.001$ (**); $p < 0.01$ (***). $n = 3$.

の結果を基にして、脳、肝、精巣の抽出液の MPD 活性と蛋白量から酵素 1 mg 当たりの MPD 比活性を算出し、WKY と SHRSP の間で比較した結果、有意な違いは認められなかった (Table 4)。これらの結果は WKY と SHRSP の間で酵素自身の触媒能力に差がないことを示している。以上の結果より、肝抽出液の MPD 活性減少の主要な原因は蛋白量の

Table 4. Comparison of the Ratio of the Activity to the Amount of MPD in Various Tissues between WKY and SHRSP

	WKY		
	Activity/tissue (nmol/min/g)	Amount/tissue ($\mu\text{g/g}$)	Activity/amount (nmol/min/mg)
Brain	0.43 ± 0.03	15.6 ± 3.60	28.0 ± 4.30 ^{d)}
Liver	3.74 ± 0.36	54.2 ± 5.70	69.1 ± 4.90 ^{a,b)}
Testis	1.62 ± 0.02	38.5 ± 1.90	43.0 ± 1.50 ^{b)}
	SHRSP		
	Activity/tissue (nmol/min/g)	Amount/tissue ($\mu\text{g/g}$)	Activity/amount (nmol/min/mg)
Brain	0.27 ± 0.05	8.1 ± 1.57	33.4 ± 0.09 ^{c)}
Liver	1.78 ± 0.27	24.2 ± 1.95	73.9 ± 5.30 ^{c,d)}
Testis	1.53 ± 0.08	37.5 ± 1.50	43.1 ± 1.35 ^{d)}

Significantly different : $p < 0.001$ (a, c) ; $p < 0.05$ (b, d) . $n = 3$.

減少であることが示唆された。一方、同一ラットにおける各組織の MPD 比活性を比較した結果、肝で最も高く、脳で最も低い値を示したことから、これらの組織に未知の MPD 活性調節因子が含まれている可能性が示唆された。本酵素の翻訳後活性調節機構については明らかにされていないが、HMG-CoA reductase の活性はリン酸化、非リン酸化により調節されていることが知られている。²⁷⁾ もしこのような因子が存在したとしても、これで WKY と SHRSP の活性の差を説明することはできない。このほかに MPD 活性減少の原因として阻害物質の存在が考えられる。WKY と SHRSP において、蛋白量、性質ともに類似した値を示し、SHRSP の MPD 活性減少のみ認められるのであれば、阻害物質の存在が活性減少の主要な原因として考えられる。しかし、このような結果は得られなかった。ゆえに、MPD 活性減少の主要な原因は蛋白量の減少であることが結論付けられた。

8. SHRSP と WKY における MPD の週齢の比較

SHRSP の脳において MPD 量が減少していることは、このラットの髄鞘形成に何らかの影響を及ぼす可能性がある (髄鞘の主成分はコレステロール)。髄鞘形成は生後 1 週間が最も盛んであることが知られているため、幼年期における MPD 量について検討した。脳の MPD 量は WKY, SHRSP ともに 1 週齢で高い値を示し、その後 3 週齢まで次第に減少し、以後 9 週齢まではほぼ一定であった (Fig. 14)。²⁶⁾ WKY と SHRSP を比較すると 1 週齢においては有

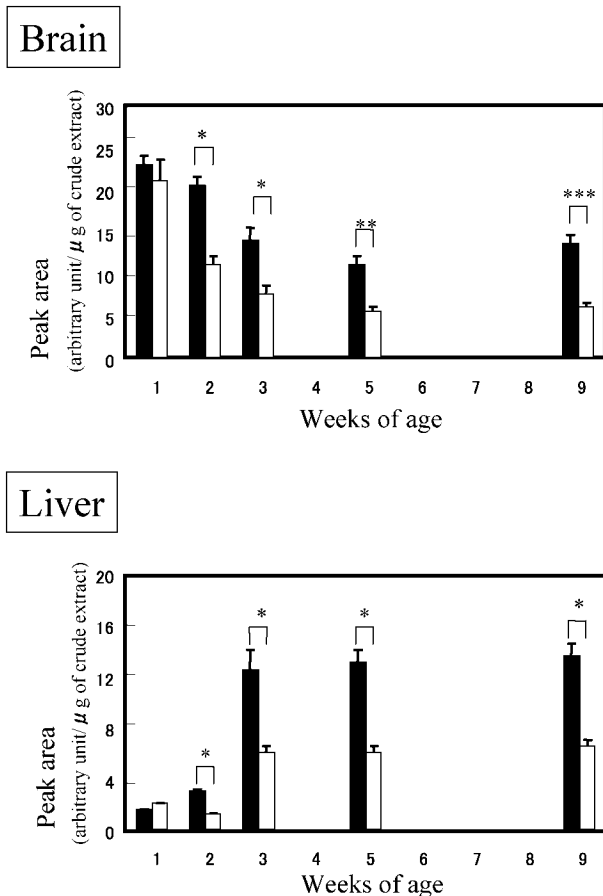


Fig. 14. Age-dependent Change in the Amount of MPD in the Brain and Liver

Slices of brain or liver in WKY and SHRSP fed on normal chow were homogenized. The homogenates were centrifuged at 20000 x g for 30 min. Crude extracts of brain or liver were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot analysis. Signals of the bands were measured by chromatoscanner. WKY (■) and SHRSP (□). Significantly different, $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***) . $n = 4$.

意な差は認められなかったが、2週齢以後 SHRSP では半減していた。これに対し、肝において WKY, SHRSP ともに1, 2週齢では低い値を示したが離乳期にあたる3週齢で上昇し、9週齢まで一定の高い値を示した (Fig. 14).²⁸⁾ この場合も SHRSP の有意な減少は2週齢から認められた。SHRSP の髄鞘形成についての報告は筆者の知る限りないが、この結果は少なくとも1週齢においてはMPD量の減少は認められず、髄鞘形成に悪影響を及ぼしているとは考えられない。2週齢からMPD量の減少が認められることについては、この時期にその発現を調節する機構に何らかの異常があると考えられるが詳細は不明である。

9. おわりに

脳はコレステロールを多く含んだ組織であり、ま

た、それは脳自身により合成されていることが一般的に受け入れられている。しかし、近年ではコレステロールの一部を脳外から取り込んでいる報告もある。それゆえにSHRSPの脳卒中発症の1つのメカニズムとして、脳におけるMPD量減少による脳内コレステロール合成低下、並びに肝におけるMPD量減少による血清コレステロール低下の2つの減少機構により、脳内でのコレステロール低下が引き起こされ脳卒中を発症するのかもしれない。今後さらに詳細なMPD量減少の原因を探るとともに、ノックアウトマウスなどを用いて、MPD活性減少と脳卒中の間の因果関係を直接検討する必要がある。

謝辞 本総説で紹介した研究の成果は、京都大学大学院人間・環境学研究科家森幸男教授、澤村誠博士、及び福山大学薬学部辻宏教授、赤崎健司助教授のご指導のもとに行われたものであり、先生方の御懇篤な御指導と御助言に厚く感謝致します。

REFERENCES

- 1) Neaton J. D., Blackburn H., Jacobs D., Kullern L., Lee D. J., Sherwin R., Shih J., Wentworth D., *Arch. Int. Med.*, **157**, 1490–1500 (1992).
- 2) Tanaka H., Ueda Y., Hayashi M., Date C., Baba T., Yamashita H., Shoji H., Tanaka Y., Owada K., Datels R., *Stroke*, **13**, 62–73 (1982).
- 3) Kagan A., Popper J. S., Rhoads G. G., Yano K., *Stroke*, **16**, 390–396 (1985).
- 4) Okamoto K., Yamori Y., Nagaoka A., *Circ. Res.*, **34/35**, Suppl. 1, 143–153 (1974).
- 5) Yamori Y., Hypertensive strains of rat, University of Tokyo Press, Tokyo, 1977, pp. 141–154.
- 6) Iritani N., Fukuda E., Nara Y., Yamori Y., *Atherosclerosis*, **28**, 217–222 (1977).
- 7) Takayama Y., *J. Jpn. Coll. Angiol.*, **15**, 455–465 (1975) (in Japanese).
- 8) Yamori Y., Iritani N., Nara Y., Fukuda E., Mitani F., *Jpn. Heart J.*, **19**, 665–666 (1978).
- 9) Iritani N., Nara Y., Yamori Y., *Jpn. Circ. J.*, **46**, 151–155 (1982).
- 10) Yamori Y., Kitamura Y., Nara Y., Iritani N., *Jpn. Circ. J.*, **45**, 1068–1073 (1981).
- 11) Sawamura M., Nara Y., Yamori Y., *J. Biol.*

- Chem.*, **25**, 6051–6055 (1992).
- 12) Tanaka R. D., Schafer B. L., Lee L. Y., Freudenberger J. S., Mosley S. T., *J. Biol. Chem.*, **265**, 2391–2398 (1990).
 - 13) Michihara A., Sawamura M., Nara Y., Ikeda K., Yamori Y., *J. Biochem. (Tokyo)*, **122**, 647–654 (1997).
 - 14) Stamellos K. D., Shackelford J. E., Tanaka R. D., Krisans S. K., *J. Biol. Chem.*, **267**, 5560–5568 (1992).
 - 15) Thompson S. L., Krisans S. K., *J. Biol. Chem.*, **265**, 5731–5735 (1990).
 - 16) Hovik R., Brodal B., Bartlett K., Osmundsen H., *J. Lipid Res.*, **32**, 993–999 (1991).
 - 17) Olivier L. M., Krisans S. K., *Biochem. Biophys. Acta*, **1529**, 89–102 (2000).
 - 18) Keller G. A., Barton M. C., Shapiro D. J., Singer S. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 770–774 (1985).
 - 19) Keller G. A., Pazirandeh M., Krisans S. K., *J. Cell Biol.*, **103**, 875–886 (1986).
 - 20) Biardi L., Sreedhar A., Zokaei A., Bozeat R. L., Vartak N. B., Shackelford J. E., Keller G. A., Krisans S. K., *J. Biol. Chem.*, **269**, 1197–1205 (1994).
 - 21) Biardi L., Krisans S. K., *J. Biol. Chem.*, **271**, 1784–1788 (1996).
 - 22) Paton V. G., Shackelford J. E., Krisans S. K., *J. Biol. Chem.*, **272**, 18945–18950 (1997).
 - 23) Krisans S. K., Ericsson J., Edwards P. A., Keller G. A., *J. Biol. Chem.*, **269**, 14165–14169 (1994).
 - 24) Michihara A., Sawamura M., Yamori Y., Akasaki K., Tsuji H., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 1235–1240 (2001).
 - 25) Michihara A., Akasaki K., Yamori Y., Tsuji H., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 1231–1234 (2001).
 - 26) Michihara A., Sawamura M., Nara Y., Ikeda K., Yamori Y., *J. Biochem. (Tokyo)*, **124**(1), 40–44 (1998).
 - 27) Beg Z. H., Stonik J. A., Brewer Jr. H. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 3678–3682 (1978).
 - 28) Michihara A., Sawamura M., Yamori Y., Akasaki K., Tsuji H., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 1417–1419 (2001).