ニワトリ角膜におけるコレステロールエステルとアポリポタンパク質A-I

誌名	日本家禽学会誌
ISSN	00290254
著者名	谷,優理 塚原,直樹 蕪山,由己人 二瓶,賢一 杉田,昭栄
発行元	日本万国家禽学会
巻/号	49巻1号
掲載ページ	p. 1-6
発行年月	2012年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

日本家禽学会誌，*49*：*J1-J6*，*2012*

ニワトリ角膜におけるコレステロールエステルとアポリポタンパク質 A-Ⅰ

谷　優理[1,2]・塚原直樹[2,3]・蕪山由己人[2]・二瓶賢一[2]・杉田昭栄[2,3]

[1]東京農工大学連合農学研究科，東京都府中市幸町 3-5-8 183-8509
[2]宇都宮大学農学部，栃木県宇都宮市峰町 350 321-8505
[3]宇都宮大学オプティクス教育研究センター，栃木県宇都宮市陽東 7-1-2 321-8585

本研究では，ニワトリの角膜において，薄層クロマトグラフィーを用いて脂質の構成を調べた。また二次元電気泳動と質量分析法を用いてアポリポタンパク質 A-Ⅰの検出を試みた。供試動物には，ニワトリの他，対照動物としてカラス，ラット，ウサギを用いた。その結果，コレステロール，リン脂質，中性脂質などは鳥類と哺乳類共に検出されたが，コレステロールエステルはニワトリとカラスの角膜にのみ検出された。また，質量分析の結果，二次元電気泳動ゲル上において，鳥類にのみ現れた 3 つのタンパク質のスポットがアポリポタンパク質 A-Ⅰであると同定された。3 つのスポットは，分子量が 25 kDa 付近に現れ，等電点は，それぞれ 4.8，5.0，5.7 であった。末梢組織において余剰となったコレステロールは，アポリポタンパク質 A-Ⅰと共にリポタンパク質を形成するが，この際コレステロールはエステル化し，コレステロールエステルとなる。また，コレステロールエステルはコレステロールの貯蔵型として知られている。このことから，ニワトリとカラスの角膜では多くのコレステロールエステルがアポリポタンパク質 A-Ⅰと共に何らかの生理的機能を有している可能性が示唆された。

キーワード：アポリポタンパク質 A-Ⅰ，角膜，コレステロールエステル，質量分析法，薄層クロマトグラフィー

緒　　言

家禽，特にニワトリは長い期間をかけて改良され，食肉用や産卵用のみならず，実験動物，ワクチン生産など医療現場への適応も多い。また，実験動物として広く利用されてきた。その中のひとつとして視覚研究が挙げられる。例えば，ニワトリの網膜における油滴の研究（López-López *et al.*, 2008）や，オプシンの最大吸収波長を調べる研究（Bowmaker *et al.*, 1997）などに用いられている。したがって，ニワトリを用いた角膜の解析は鳥類の視覚機構の研究にとって重要な情報を提供するものと考えられる。

著者らも，鳥類の視覚機構について研究を行っており，ニワトリを用いて，鳥類と哺乳類の角膜の組織的な差異（Tsukahara *et al.*, 2010）と，鳥類の角膜にアポリポタンパク質 A-Ⅰが存在することを報告している（Tsukahara *et al.*, 2011）。この先行研究で発見された鳥類の角膜におけるアポリポタンパク質 A-Ⅰの存在が，紫外線視など鳥類の視覚機構とどう関わるかが興味の持たれるところである。アポリポタンパク質は通常血液内において，脂質と共にリポタンパク質を形成し，脂質の運搬を担うタンパク質である（Schaefer *et al.*, 1978）。アポリポタンパク質 A-Ⅰが運搬する脂質としてトリアシルグリセロール，リン脂質，コレステロール，コレステロールエステルが挙げられる（Barter *et al.*, 1982）。つまり，鳥類の角膜においても，アポリポタンパク質 A-Ⅰが脂質の運搬の働きを持つならば，鳥類の角膜内においてもアポリポタンパク質 A-Ⅰと共に働く脂質が存在するはずである。そして，アポリポタンパク質 A-Ⅰが多量に存在する鳥類の角膜における脂質の構成は，アポリポタンパク質 A-Ⅰの存在しない哺乳類の角膜とは異なることが考えられる。

そこで，本研究では，ニワトリを用いて鳥類の角膜における脂質の構成を調べることとした。また，鳥類の中でも家禽と野生動物とで相違がある可能性を考え，ニワトリとカラスを併せて比較検討することとした。さらに，対照動物としてラット，ウサギも用いた。また，それに加えて本研究では，著者らの以前の報告（Tsukahara *et al.*, 2011）において用いたタンパク質検出法より感度の高い銀染色による検出法を用いて，哺乳類の角膜におけるアポリポタンパク質 A-Ⅰの存在について，確認を行った。

材 料 と 方 法

1.　供試動物および角膜の採材方法

本研究で用いた動物の取り扱い等については「宇都宮大学動物実験指針」に従った。供試動物としてニワトリ（ロードアイランドレッド），（雌雄不問，成鳥，1.5-2 kg），ハシブトガラス（雌雄不問，成鳥，550-750 g），ウサギ（日本白色種），（雌雄不問，成体，1.2-3 kg）を各々 6 羽，ラット（ウィスター系），（雌雄不問，成体，250-300 g）を 24 頭用いた。ニワトリは栃木県畜産試験場より，ウサギ及びラットは株式会社埼玉実験動物供給所より購入した。カラスは宇都宮大学付属農場のトラップにより捕獲した個体を使

2011 年 8 月 10 日受付，2011 年 10 月 18 日受理
連絡者：杉田昭栄
〒321-8505 栃木県宇都宮市峰町 350
Tel：028-649-5436
Fax：028-649-5436
E-mail：sugita@cc.utsunomiya-u.ac.jp

用した。野鳥であるカラスの捕獲は，鳥獣の保護及び狩猟の適正化に関する法律第9条第2項の規定による，鳥獣の捕獲等及び鳥類の卵の採取等の許可を栃木県（宇林第0010号）より受けた。

各供試動物をペントバルビタールナトリウム（シェリング・プラウ アニマルヘルス社）を用いて麻酔過剰投与（20-30 mg/kg）により安楽死させた後，直ちに眼球を取り出し，角膜，レンズ，網膜を採材した。

2. 薄層クロマトグラフィーによる脂質の分析

鳥類と哺乳類間における角膜の構成脂質を比較するため，薄層クロマトグラフィー（TLC）を行った。TLCには，ニワトリ，カラス，ウサギを各々3羽，ラットを12頭用いた。各供試動物から角膜を20 mgずつ採材した。また，ラットの角膜については4頭分から20 mgを得て，ひとつのサンプルとした。また，ニワトリ角膜に見られた脂質の構成が，ニワトリのどの器官においても共通する構成ではなく，角膜のみに現れる構成であることを証明するため，ニワトリにおいては，レンズと網膜を20 mgずつ採材した。

採材した組織を細かく切り，クロロホルム-メタノール混合溶液（クロロホルム（関東化学株式会社）：メタノール（和光純薬工業株式会社）＝2：1）を入れたホモジナイザー（株式会社三商）内で磨砕した。しばらく静置した後，メタノールと蒸留水を加えて遠心分離し，有機溶媒層を回収した。その後，遠心エバポレーター（CVE-1000，東京理化器械株式会社，Tokyo, Japan）によって有機溶媒を除き，クロロホルム-メタノール混合溶液（クロロホルム：メタノール＝1：1）を加え，残った脂質を溶解させた。再びエバポレーターを用いて有機溶媒を除き，クロロホルム-メタノール混合溶液（クロロホルム：メタノール＝1：3）を加え，脂質抽出液とした。その後，抽出液をシリカゲルプレート（和光純薬工業株式会社）に20 μlずつ滴下し，2種類の脂質展開溶媒（ヘキサン：ジエチルエーテル：酢酸＝80：20：1，クロロホルム：メタノール：水＝65：25：4）により脂質を展開させた。展開後は50%硫酸を用いて脂質のバンドを発色させた。脂質の比較は相対移動距離により各動物の角膜間，及びニワトリの角膜，レンズ，網膜間において行った。

3. 質量分析法によるタンパク質の同定

タンパク質の同定には，ニワトリ，カラス，ウサギを各々3羽，ラットを12頭用いた。各供試動物から角膜を20 mgずつ採材した。また，ラットの角膜については4頭分から20 mgを得て，ひとつのサンプルとした。その後，二次元電気泳動用キット（AE-1435 EzApply 2D kit，アトー株式会社）の水溶性タンパク質抽出用の抽出液を用いて，角膜のタンパク質溶液を得た。

以下の手順に従い，二次元電気泳動を行い，角膜の構成タンパク質を分離した。まず，一次元目の等電点電気泳動（IEF）にて3-8の等電点で分離した。IEFにはミニ・コンパクトディスク電気泳動槽（AE-6540，アトー株式会社）を用いた。二次元目の電気泳動としてドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）を行った。SDS-PAGEにはラピダス・ミニスラブ電気泳動槽（AE-6530，アトー株式会社）を用いた。なお，電気泳動に用いた試料については予めLowry法（Lowry *et al.*, 1951）を用いてタンパク質濃度を定量し，総タンパク質量が25 μgになるように泳動した。泳動後のゲルはShevchenkoらの方法（Shevchenko *et al.*, 1996）による銀染色を行い，ゲル上のタンパク質を視覚化した。

銀染色後の二次元電気泳動ゲルから，アポリポタンパク質A-Iと近い分子量（20-30 kDa）のスポットを切り出し，トリプシンによるゲル内消化を行った。ゲル内消化により得たペプチドは，Zip Tip C_{18} pipet tips（Millipore）により脱塩及び濃縮を行った後，マトリクス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析（MALDI-TOF/MS）を行った。質量分析には飛行時間型質量分析装置（autoflex Ⅱ-UT Ⅰ TOF/TOF，ブルカー・ダルトニクス株式会社，Billerica, USA）を用いた。また，ペプチドのイオン化の際に，マトリックスとしてα-cyano-4-hydroxycinnamic acid（Sigma-Aldrich）を用いた。この結果得られたペプチドマスリストについて，データベース検索プログラムMascot（マトリックスサイエンス株式会社）内の予測ペプチドマスリストと照合し，タンパク質の同定を試みた。

結　　果

1. TLCによる脂質の分析

TLCの結果，対象とした全ての動物種の角膜においてコレステロール，リン脂質，中性脂質，ホスファチジルエタノールアミン，ホスファチジルグリセロール，ホスファチジルコリンの存在が認められた（図1a，b）。そのうち，中性脂質については鳥類の角膜において多くみられた（図1b）。一方，コレステロールエステルについては，ニワトリとカラスの角膜においてのみ存在が認められた（図1a，c）。ニワトリとカラス間においてバンドの大きさに差異は認められなかった。よって，鳥類角膜にのみ特異的にコレステロールエステルが存在することがわかった。

2. 質量分析法によるタンパク質の同定

ニワトリ角膜の二次元電気泳動の結果，25 kDa付近においてスポットが3つ現れ，それぞれ4.8と5.0，5.7の等電点を示した（図2a）。ニワトリのタンパク質スポットを質量分析した結果，得られたペプチドのピークは967.6, 985.6, 998.7, 1035.7, 1048.7, 1070.6, 1074.7, 1089.7, 1108.7, 1115.8, 1120.7, 1177.7, 1191.8, 1205.8, 1209.7, 1215.8, 1236.8, 1253.8, 1285.8, 1322.0, 1334.0, 1347.0, 1373.0, 1378.0, 1392.0, 1406.0, 1434.0, 1532.1, 1581.1, 1666.2, 2217.6の質量電荷比（m/z）であった（図3）。これらのペプチドマスリストをデータベースの予測ペプチドマスリストと照合した結果，スコア211でアポリポタンパク質A-Iであると同定された。また，カラスにおいてもニワトリと同じ位置に3つのスポットが現れ（図2b），アポリポタンパク質A-Iとして同定された。このことにより，ニワトリと野生種であるカラスは同様のタンパク質を有することがわかった。

なお，哺乳類の角膜においては，20-30 kDaにラットが9個，ウサギが10個のタンパク質のスポットが確認された（図2c，d）。その内，ラットの4個，ウサギの7個のスポットはアポリポタンパク質A-Iとは異なるタンパク質であると同定され，残りのラット5個，ウサギ3個はタンパク質量が少なすぎて，明瞭なペプチドマスピークが得られなかった。

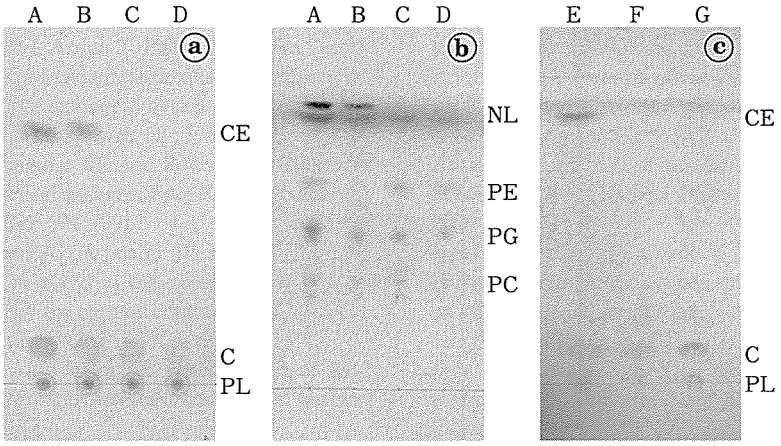

図 1.　薄層クロマトグラフィー像
a および c には脂質展開溶媒（ヘキサン：ジエチルエーテル：酢酸＝80：20：1）を，b には脂質展開溶媒（クロロホルム：メタノール：水＝65：25：4）を使用した。a および b はニワトリ（A），カラス（B），ラット（C），ウサギ（D）の角膜の構成脂質を比較したもの，c はニワトリの角膜（E），レンズ（F），網膜（G）の構成脂質を比較したものを示す。CE はコレステロールエステル，C はコレステロール，PL はリン脂質，NL は中性脂質，PE はホスファチジルエタノールアミン，PG はホスファチジルグリセロール，PC はホスファチジルコリンである。

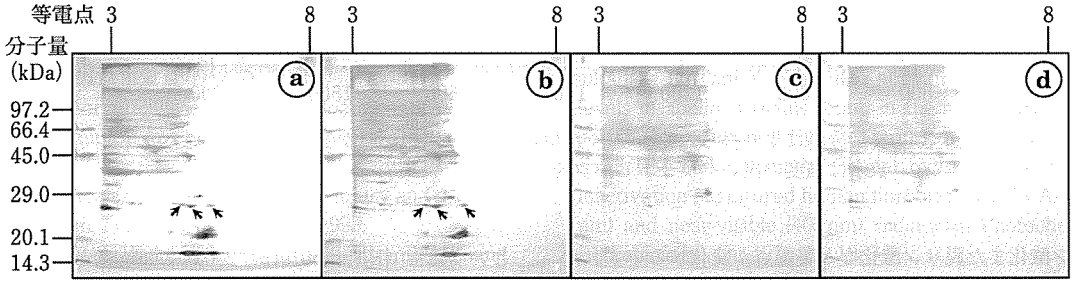

図 2.　各種動物における角膜の二次元電気泳動像
a はニワトリ，b はカラス，c はラット，d はウサギを示す。
矢印のスポットはアポリポタンパク質 A-Ⅰと同定された。

考　　察

本研究の結果，ニワトリとカラスの角膜においてのみコレステロールエステルとアポリポタンパク質 A-Ⅰが検出された。本研究において用いた銀染色法によっても哺乳類の角膜においてアポリポタンパク質 A-Ⅰは検出されなかった。このことから，コレステロールエステルとアポリポタンパク質 A-Ⅰは，哺乳類にはない鳥類に特有の視覚機能との関連が示唆される。

そこで，コレステロールエステルとアポリポタンパク質 A-Ⅰの角膜における機能を考察するため，以下に脂質とアポリポタンパク質の関係について論ずる。コレステロールは，肝臓からアポリポタンパク質 B と結合した低密度リポタンパク質の状態で血液を介して末梢細胞まで運搬され（Brown and Goldstein, 1986），生体膜の材料に使われる。使用されなかった余剰のコレステロールはアポリポタンパク質 A-Ⅰと共に高密度リポタンパク質（HDL）となって血液を介して肝臓まで輸送される。この HDL となる際，コレステロールはエステル化してコレステロールエステルとなる。また，末梢組織において貯蔵される際にもコレステロールはエステル化し，コレステロールエステルとなる（Hashimoto *et al.*, 1973）。

つまり，コレステロールエステルとアポリポタンパク質 A-Ⅰは，密接に相互作用して機能していることがわかる。本研究で認められたニワトリとカラスの角膜におけるアポリポタンパク質 A-Ⅰもコレステロールエステルと共に存在していたことから，鳥類角膜のアポリポタンパク質 A-Ⅰの役割は他の組織においてと同様に脂質の運搬であると考えられる。

角膜内に存在するタンパク質の中には，生理的機能を持たず，単に構造成分として存在する構造タンパク質も存在する（Jester, 2008）。そのため，アポリポタンパク質 A-Ⅰは構造タンパク質であることも考えられる。しかし，今回の銀染色による実験で，先行研究である Tsukahara ら（2011）の実験においてアポリポタンパク質 A-Ⅰと同定されたスポットが 2 つであったのに加え，二次元電気泳動の結果，等電点の異なるスポットが 3 つ存在することから，アポリポタンパク質 A-Ⅰが角膜内において酸化や還元，

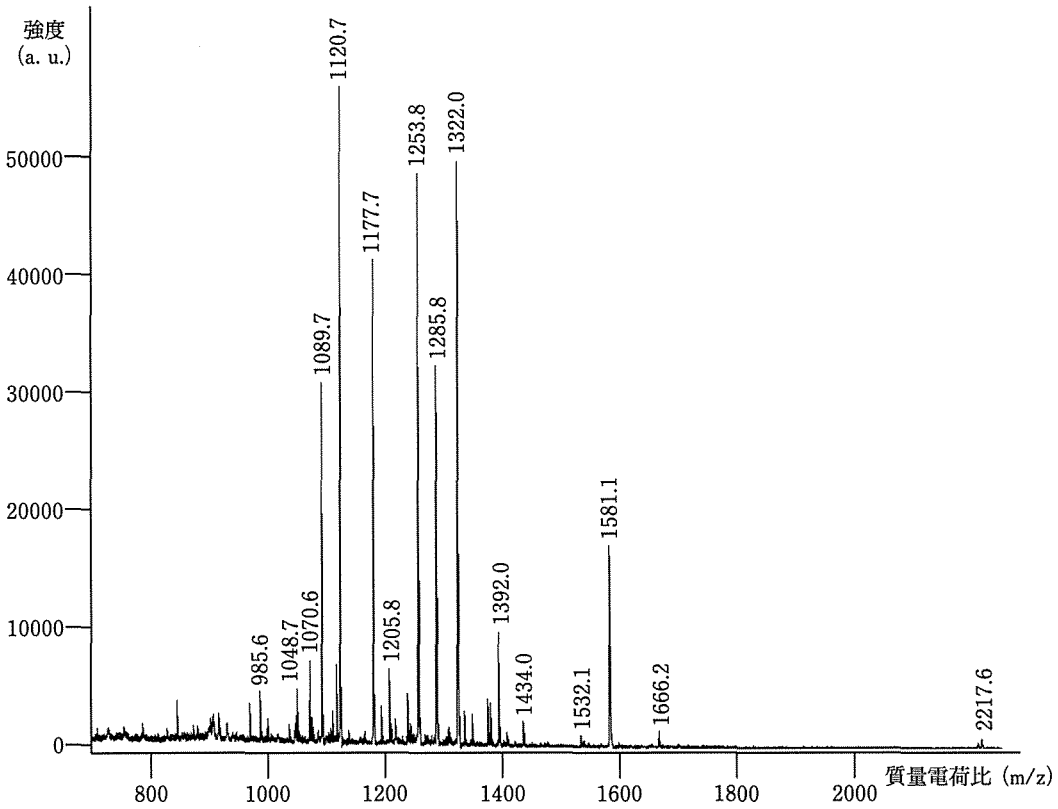

図 3. 質量分析により得られたニワトリ角膜のアポリポタンパク質 A-I のマススペクトル
数字は強度の高いペプチドピークを示す。

もしくはリン酸化また脱リン酸化など等電点が変化するいずれかの反応が起こっていることが考えられる。なお，アポリポタンパク質 A-I が含まれる HDL は酸化しやすいことが知られており，またアポリポタンパク質 A-I 自身の修飾についての報告もある (Hoeg *et al.*, 1986 ; Beg *et al.*, 1989)。つまり，アポリポタンパク質 A-I は単なる構造タンパク質としての役割ではなく，何らかの生理的機能を有している可能性が示唆される。また，角膜は紫外線にさらされているが，紫外線が持つエネルギーは生体内に存在する酸素を活性酸素へと変化させる (Tyrrell and Pidoux, 1989)。活性酸素は非常に酸化力が強く，細胞内の脂質やタンパク質，DNA などと反応することで細胞を損傷する (Chace *et al.*, 1991 ; Kehrer, 1993 ; Mehlhase and Grune, 2002)。そこで，通常生物の眼は抗酸化物質によって酸化力の高い活性酸素から細胞を守っている (Cejková *et al.*, 2004)。抗酸化物質にはアスコルビン酸やグルタチオン，カタラーゼなど様々な種類が存在する。これらは直接活性酸素を除去したり，活性酸素が脂質を酸化するのを妨害したりする働きを持つ。

哺乳類の角膜においては，アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) が主に紫外線による酸化に対する防御の役割を担っている (Estey *et al.*, 2007 ; Lassen *et al.*, 2006) が，鳥類の角膜においては ALDH の存在は少ない (Jester *et al.*, 2005)。そのため，鳥類の角膜には哺乳類と異なる抗酸化機構が存在することが考えられる。脂質が自身の酸化によって DNA の酸化障害を減少させるという報告 (Hiramoto *et al.*, 2003 ; Kikugawa *et al.*, 2003) があることから，鳥類の角膜に存在するコレステロールエステルは紫外線による酸化を防ぐ抗酸化機構の役割を担っている可能性が示唆される。さらに，鳥類の角膜におけるアポリポタンパク質 A-I は酸化脂質を角膜外へ運搬するために存在しているという可能性も考えられる。

謝　　辞

本研究は科学研究費助成金 (基盤研究 (A) (2)) 19208029 と宇都宮大学オプティクス教育研究センター教育研究支援経費の助成により行われた。

引 用 文 献

Barter PJ, Hopkins GJ and Calvert GD. Transfers and exchanges of esterified cholesterol between plasma lipoproteins. Biochemical Journal, 208 : 1-7. 1982.

Beg ZH, Stonik JA, Hoeg JM, Demosky SJ Jr, Fairwell T and Brewer HB Jr. Human apolipoprotein A-I. Post-translational modification by covalent phosphorylation. Journal of Biological Chemistry, 264 : 6913-6921. 1989.

Bowmaker JK, Heath LA, Wilkie SE and Hunt DM. Visual pigments and oil droplets from six classes of photoreceptor in the retinas of birds. Vision Research, 37 : 2183-2194. 1997.

Brown MS and Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for

cholesterol homeostasis. Science, 232 : 34–47. 1986.

Cejková J, Stípek S, Crkovská J, Ardan T, Pláteník J, Cejka C and Midelfart A. UV rays, the prooxidant/antioxidant imbalance in the cornea and oxidative eye damage. Physiological Research/ Academia Scientiarum Bohemoslovaca, 53 : 1–10. 2004.

Chace KV, Carubelli R, Nordquist RE and Rowsey JJ. Effect of oxygen free radicals on corneal collagen. Free Radical Research Communications, 12–13 : 591–594. 1991.

Estey T, Cantore M, Weston PA, Carpenter JF, Petrash JM and Vasiliou V. Mechanisms involved in the protection of UV-induced protein inactivation by the corneal crystalline ALDH3A1. Journal of Biological Chemistry, 282 : 4382–4392. 2007.

Hashimoto S, Dayton S and Alfin-Slater RB, Esterification of cholesterol by homogenates of atherosclerotic and normal aortas. Life Sciences, 12 : 1–12. 1973.

Hiramoto K, Yasuhara Y, Sako K, Aoki K and Kikugawa K. Suppression of free radical-induced DNA strand breaks by linoleic acid and low density lipoprotein in vitro. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 26 : 1129–1134. 2003.

Hoeg JM, Meng MS, Ronan R, Fairwell T and Brewer HB Jr. Human apolipoprotein A-I. Post-translational modification by fatty acid acylation. Journal of Biological Chemistry, 261 : 3911–3914. 1986.

Jester JV, Budge A, Fisher S and Huang J. Corneal keratocytes : phenotypic and species differences in abundant protein expression and in vitro light-scattering. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 46 : 2369–2378. 2005.

Jester JV. Corneal crystallins and the development of cellular transparency. Seminars in Cell & Developmental Biology, 19 : 82–93. 2008.

Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Critical Reviews in Toxicology, 23 : 21–48. 1993.

Kikugawa K, Yasuhara Y, Ando K, Koyama K, Hiramoto K and Suzuki M. Protective effect of supplementation of fish oil with high n-3 polyunsaturated fatty acids against oxidative stress-induced DNA damage of rat liver in vivo. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51 : 6073–6079. 2003.

Lassen N, Pappa A, Black WJ, Day BJ, Min E and Vasiliou V. Antioxidant function of corneal ALDH3A1 in cultured stromal fibroblasts. Free Radical Biology & Medicine, 41 : 1459–1469. 2006.

López-López R, López-Gallardo M, Pérez-Alvarez MJ and Prada C. Isolation of chick retina cones and study of their diversity based on oil droplet colour and nucleus position. Cell and Tissue Research, 332 : 13–24. 2008.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193 : 265–275. 1951.

Mehlhase J and Grune T. Proteolytic response to oxidative stress in mammalian cells. Biological Chemistry, 383 : 559–567. 2002.

Schaefer EJ, Eisenberg S and Levy RI. Lipoprotein apoprotein metabolism. Journal of Lipid Research, 19 : 667–687. 1978.

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O and Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Analytical Chemistry, 68 : 850–858. 1996.

Tsukahara N, Tani Y, Lee E, Kikuchi H, Endoh K, Ichikawa M and Sugita S. Microstructure characteristics of the cornea in birds and mammals. Journal of Veterinary Medical Science / Japanese Society of Veterinary Science, 72 : 1137–1143. 2010.

Tsukahara N, Tani Y, Nihei K, Kabuyama Y and Sugita S. High levels of apolipoproteins found in the soluble fraction of avian cornea. Experimental Eye Research, 92 : 432–435. 2011.

Tyrrell RM and Pidoux M. Singlet oxygen involvement in the inactivation of cultured human fibroblasts by UVA (334 nm, 365 nm) and near-visible (405 nm) radiations. Photochemistry and Photobiology, 49 : 407–412. 1989.

Cholesterol Ester and Apolipoprotein A-I in Chicken Cornea

Yuri Tani[1,2], Naoki Tsukahara[2,3], Yukihito Kabuyama[2], Ken-ichi Nihei[2] and Shoei Sugita[2,3]

[1] United Graduate School of Department of Animal Science, Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8, Saiwaicho, Fuchu-Shi, Tokyo 183-8509

[2] Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, 350, Minemachi, Utsunomiya-Shi, Tochigi 321-8505

[3] Utsunomiya University Center for Optical Research and Education, 7-1-2, Yoto, Utsunomiya-Shi, Tochigi 321-8585

In this study, various lipids in the corneas of birds and mammals were detected using thin-layer chromatography. Furthermore, apolipoprotein A-I was detected in the corneas of birds and mammals by two dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. Chickens, crows, rats, and rabbits were used. Cholesterol, phospholipid, neutral lipid, phosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerol and phosphatidylcholine were found in all corneas of all species. However, cholesterol ester was only found in birds. Cholesterol esters and apolipoprotein A-I were found in avian corneas ; however, they were not found in mammals. Three protein spots, each with a molecular mass of 25 kDa, were detected on the two dimensional gels prepared from bird extracts. The isoelectric points of these spots were 4.8, 5.0, and 5.7. In peripheral tissues, extra cholesterol is esterified as cholesterol esters, and apolipoprotein A-I forms lipoprotein complexes with the cholesterol esters. Moreover, cholesterol is stored as cholesterol ester. Therefore, cholesterol may work with apolipoprotein A-I as a physiologically activating substance in the avian cornea.

(*Japanese Journal of Poultry Science, **49** : J1-J6, 2012*)

Key words : apolipoprotein A-I, cholesterol ester, cornea, MALDI-TOF/MS, thin-layer chromatography