

第3回 神戸大学バイオサイエンス研究会・若手研究者交流会

2011年9月6日(火) 15:00~20:00 医学部神縁会館多目的ホールにて



(理研、RCAI,河本宏先生 画)

主催：神戸大学バイオサイエンス研究会・若手研究者交流会

(世話人：自然科学系先端融合研究環・斎藤尚亮、工学研究科・大谷亨、農学研究科・白井康仁、保健学研究科・伊藤光宏、農学研究科・中屋敦均、医学研究科・吉田優)

共催：神戸大学グローバルCOEプログラム

「統合的膜生物学の国際教育研究拠点」「次世代シグナル伝達医学の教育研究国際拠点」
生命医学イノベーション創出リーダー養成プログラム
一般社団法人 神縁会

第3回神戸大学バイオサイエンス研究会・若手研究者交流会

日時：2011年9月6日（火）15：00～20：00

会場：神戸大学医学部神緑会館多目的ホール

はじめに

15：00～15：05 開会の挨拶 先端融合研究環・齋藤尚亮

15：05～15：10

「神戸大学バイオサイエンス研究会・若手研究者交流会について」

医学研究科・吉田 優

第1部 (15：10～16：30)

15：10～15：30

特別講演1「筋肉におけるRhoファミリー低分子量G蛋白質の役割」

農学研究科 動物資源利用化学分野・上田 修司 先生

15：30～15：50

特別講演2「ガン細胞選択的殺傷能力を有する低分子ゲル化剤の開発」

工学研究科 応用化学専攻・丸山 達生 先生

15：50～16：10

特別講演3「トリセルラージャンクションによる細胞形態形成機構」

医学研究科 細胞生物学分野・小田 裕香子 先生

16：10～16：30

特別講演4「全身性エリテマトーデスにおけるMICA遺伝子多型の役割」

保健学研究科 病態解析学分野・吉田 幸祐 先生

16：30～16：50 《コーヒープレイク》

第2部 (16：50～19：00)

16：50～17：40

ポスターショートのプレゼンテーション 各1分

ポスター検討会

奇数番号：18：00～18：30

偶数番号：18：30～19：00

19：00 閉会の挨拶 保健学研究科・伊藤光宏

※その後 自由討論

筋肉におけるRhoファミリー低分子量G蛋白質の役割

神戸大学大学院農学研究科動物資源利用化学

上田 修司

uedas@people.kobe-u.ac.jp

骨格筋は、筋原線維の収縮・伸張による運動機能に加えて、糖、アミノ酸、脂質代謝を介した生体内の恒常性の維持に大きく関わり、加齢、不活動、低栄養などによる筋肉量の低下は、糖尿病をはじめとした代謝疾患の原因となる。筋肉を構成する筋繊維は、筋サテライト細胞から派生した多数の筋芽細胞が分化して生じる巨大な多核細胞で、血中のホルモンやサイトカイン濃度によって、最適な代謝速度や筋肉量が調節されている。低分子量 G 蛋白質の Rho ファミリーに属する Rho、Rac1、Cdc42、TC10 は、細胞内シグナル伝達の ON/OFF を司る分子として、発現組織に応じた様々な細胞機能に関与する。そのため、骨格筋の機能においても、これらの分子が多様な役割を果たしていると考えられており、糖代謝における Rho ファミリーのそれぞれの機能について関心が高まっている。

筋肉の糖代謝は、糖輸送担体 GLUT4 の細胞膜移行による筋細胞内へのグルコース取り込み速度によって、律速を受ける。この GLUT4 の細胞膜移行は、インスリン受容体の下流ではたらく PI3 キナーゼを介した Akt のリン酸化によって促進されることが知られているが、インスリンシグナル伝達における Rho ファミリーの機能については研究者間で十分なコンセンサスが得られていなかった。

我々は、GLUT4に関するRhoファミリーについて検討したところ、インスリン刺激したL6筋細胞株において、Rac1がPI3キナーゼの下流でRhoGEFの一種であるFLJ00068を介して活性化され、GLUT4のインスリン依存的な細胞膜移行促進に必須であることを見出した。更に、Rac1またはFLJ00068は、その活性だけでもGLUT4の細胞膜移行を促進することができ、その効果にAktのリン酸化は必要としないが、Akt自体は必要であることが分かった。Cre-loxPシステムを用いて骨格筋特異的なRac1ノックアウトマウスを作成し、検討したところ、骨格筋においてもRac1はインスリン依存的に活性化され、GLUT4の細胞膜移行に必要であった。

これらの結果、Rac1は骨格筋の血中インスリン濃度依存的なGLUT4の細胞膜移行に重要な機能を果たすことが明らかとなった。

ガン細胞選択的殺傷能力を有する低分子ゲル化剤の開発

神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻材料プロセス工学研究室
丸山達生・水口奈美・森本祐加・宝得一貴
(九大工) 香田大輔・(九大工) 後藤雅宏・松山秀人
tmarutcm@crystal.kobe-u.ac.jp

1. 緒言

近年、低分子の自己組織化を利用した低分子ゲル化剤の開発が盛んに行われている。この非共有結合性のゲルは、ゲルの調製が容易であることや分子設計によって新規機能を付与することが容易であるなどの利点を有している。本研究では、ガン細胞が分泌する酵素に反応してゲル化が誘導される低分子ゲル化剤の開発を行った。ペプチド鎖に脂肪酸が結合した構造の低分子ゲル化剤 Palmitoyl-Gly-Gly-Gly-His (Pal-GGGH) のペプチド配列に、ガン細胞が分泌する酵素 matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) に反応する部位を導入した Palmitoyl-Gly-Gly-Gly-His-Gly-Pro-Leu-Gly-Leu-Ala-Arg-Lys-NH₂ という構造の前駆体を作製した。こちらの分子にはゲル化を阻害する屈曲部位とカチオン性部位も導入されており、酵素の存在下あるいはこの酵素を分泌する細胞存在下でのみゲル化すると考えられる。

2. 結果と考察

合成したゲル化剤前駆体を Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂) に溶解して放置したがゲル化は起こらなかった。この前駆体溶液に MMP-7 を添加したところ、Fig. 1A に示すようにハイドロゲルが形成した。これは MMP-7 の作用により Gly-Leu 間で結合が切断され、ゲル化の阻害要因がなくなったためゲル化したものと考えられる。作製したハイドロゲルを TEM で観察したところ、Fig. 1B のようなファイバーが確認できた。

作製した前駆体を任意の濃度でガン細胞に添加し、Live/Dead 染色によりガン細胞の死滅に関して調査した。その結果、Fig. 2 に示すように 0.5 wt% の前駆体溶液を添加した時にほぼ全てのガン細胞の死滅 (赤色) が確認された。これは、ガン細胞の分泌する酵素に反応して前駆体がゲル化することで細胞が死滅したものと考えられる。

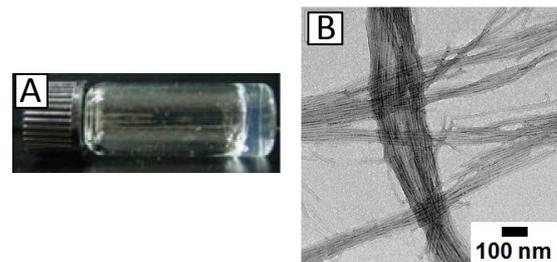


Fig. 1 Photo (A) and TEM images (B) of hydrogel induced by MMP-7. The

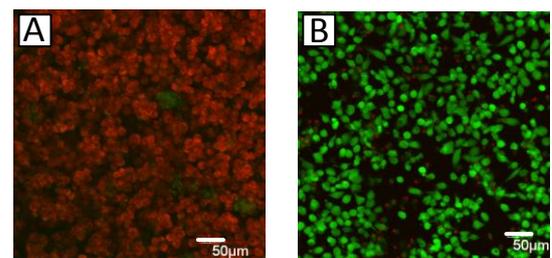


Fig. 2 Confocal laser scan microscope (CLSM) images of L929 cells adding

3. 参考文献 [1] D. Koda, T. Maruyama, N. Minakuchi, K. Nakashima, and M. Goto, *Chem. Commun.* 46, 979 (2010).

トリセルラージャンクションによる細胞形態形成機構

神戸大学大学院医学研究科細胞生物学

小田裕香子・古瀬幹夫

oday@med.kobe-u.ac.jp

体の表面を覆う上皮細胞シートは、体内を外界から遮断するバリアとして機能する。隣り合う上皮細胞同士は互いに接着し、敷石状の形態をとる。さらに、個々の上皮細胞の形態は構成する器官の機能と密接に関連している。例えば、目のレンズ上皮細胞は六角形の形態を示し、ハニカム構造をとることにより光の散乱を最小限にしている。また、腎臓尿細管細胞のヘンレの太い上行脚では隣り合う細胞の細胞膜が互いに複雑に入りくんだ形態をしており、これにより細胞膜表面積が増え体液の輸送効率を上げている。

多角形上皮細胞の頂点にあたる場所は、3つの細胞の角（かど）が接しており、トリセルラークontakt (TC) と呼ばれる。これまで、TCの役割についてはほとんど解析されてこなかった。我々は、TCに着目し研究をすすめている。TCではトリセルラージャンクション (TJ) と呼ばれる特殊な接着構造によって細胞膜が接着しており、最近、TJに特異的に局在するタンパク質トリセルリンおよびLSRが同定された。

我々は、上記のような上皮細胞の形態が、トリセルラージャンクションを構成するタンパク質トリセルリンによって制御されていることを見出した。上皮細胞においてトリセルリンをノックダウンすると、細胞間接着部位の膜形態の直線性が失われ、細胞は不均一な多角形構造を示した。

一方、トリセルリンを過剰発現させると細胞間境界部はより直線的となり、個々の細胞は均一な六角形の形状を示した。また、上皮細胞の細胞間接着形成過程において、アクチン細胞骨格がトリセルラージャンクション付近を起点として配向すること、さらにはこのアクチンの配向がトリセルリンノックダウン細胞では抑制されることを見いだした。これらの結果より、トリセルリンはアクチン細胞骨格を制御することで上皮の細胞形態を変化させると考えられた。

全身性エリテマトーデスにおけるMICA遺伝子多型の役割

¹神戸大学大学院保健学研究科病態解析学 ²神戸大学大学院医学研究科内科学

³神戸大学医学部附属病院リウマチセンター

吉田幸祐¹・塩沢俊一^{1,2,3}

yoshida@harbor.kobe-u.ac.jp

全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus;SLE)は我が国において難病(特定疾患)に指定されており、未だ原因が明らかではない。遺伝素因としてその関与が示唆されてきたヒト白血球抗原(HLA)遺伝子でさえSLEの発症を100%規定する因子ではなく、SLEはさまざまな遺伝素因と環境因子が複合的に関与する多因子病であると考えられている。

今回着目したMICA(MHC class I polypeptide-related sequence A)遺伝子はHLA遺伝子の近傍に位置しているため、当初、HLA遺伝子の影響を大きく受けているのではないかと考えられた。しかしながら本研究において、これまでSLEの発症に関与するとされてきたHLA遺伝子型(*HLA-DRB1**1501)を持っていなくても、ある一つのMICA遺伝子型(*MICA*129Met-A9ハプロタイプ)を持っているだけでSLEを発症する危険因子となること、さらにMICA遺伝子はHLA遺伝子と相加的に作用してSLEの発症リスクを増大させることが明らかとなった。

一方、MICAのタンパク質としての機能はナチュラルキラー(NK)細胞を活性化させることである。MICA遺伝子多型によるNK細胞機能への影響はこれまで検討されていなかったが、SLE発症の危険因子となるMICA129Met-A9は、対照MICA(129Val-A5:日本人に最も多いMICAハプロタイプ)と比較してNK細胞のインターフェロン- γ 産生能を亢進させる一方で、標的細胞に対する細胞傷害活性を強く抑制することが明らかとなった。これらの結果は実際、SLE患者血清中のインターフェロン- γ が高値であることやNK細胞の細胞傷害活性が低下しているといった報告と一致しており、MICAの作用がSLEの病態を反映している可能性が考えられる。

以上のことから、MICAは遺伝的にSLEの発症に関与し、さらに機能的にもNK細胞の機能異常を誘導することでSLEの病態に関与することが考えられた。

膠原病における組織傷害の誘導に重要な抗原のクロスプレゼンテーションの経路の検討

¹神戸大学大学院保健学研究科病態解析学 ²神戸大学大学院医学研究科内科学

³神戸大学医学部附属病院リウマチセンター

積山賢¹・塩沢俊一^{1,2,3}

tsumiyama@port.kobe-u.ac.jp

【目的】 私達は膠原病の発症理論として、自己臨界点説を見出した。マウスに抗原を繰り返し投与すると、過剰な刺激を受けたCD4⁺ T細胞は、末梢リンパ組織においてT細胞受容体 (TCR) 遺伝子の再構成を起し、自己抗体産生誘導性CD4⁺ T (autoantibody-inducing CD4⁺ T; *a*iCD4⁺ T) 細胞になった。また、この*a*iCD4⁺ T細胞からのヘルプと、樹状細胞 (DC) における抗原のクロスプレゼンテーションにより活性化したCD8⁺ T細胞は、細胞傷害性T細胞 (CTL) へと分化し、糸球体腎炎をはじめとするヒトの全身性エリテマトーデス (SLE) に酷似した組織傷害を引き起こした。このように、免疫システムの安定性には限界点が存在し、その自己臨界点を超えて過剰な刺激が作用すると免疫システムは破綻し、その結果、膠原病が発症することを見出している。私達は今回、組織傷害を誘導するCTLの生成に重要な抗原のクロスプレゼンテーションの経路について検討を行った。

【方法】 BALB/cマウスより骨髓由来DC (BMDC) を得た。BMDCを蛍光標識OVAと培養後、エンドソームマーカであるEEA1、小胞体マーカであるカルネキシン、トランスロコンであるSec61を蛍光免疫染色し、蛍光顕微鏡下において、OVAの細胞内局在を検討した。また、BALB/cマウスにOVAを繰り返し投与し、膠原病の発症を誘導した。プロテアソーム阻害剤のMG132をOVAと共にマウスに投与し、*in vivo*においてプロテアソームを阻害した。同様に、エンドソームから細胞表面への輸送を阻害するプリマキンをOVAと共にマウスに繰り返し投与した。これらのマウスにおけるCTLの生成と腎炎の発症を検討するため、脾臓におけるIFN γ 産生CD8⁺ T細胞とタンパク尿を検出した。

【結果】 BMDCを用いた検討において、細胞内に取り込まれたOVAはEEA1と共局在を示した。しかし、OVAとの培養時間が長くなるにつれてOVAはエンドソームから離れ、培養30分後ではEEA1と同じ局在を示さなくなった。一方、OVAはカルネキシンとは同じ局在を示さなかった。培養15分後以降では、OVAはトランスロコンであるSec61と共局在を示した。このことから、エンドソーム内のOVAはSec61を介して細胞質に放出されることが示唆された。*in vivo*における検討では、OVAの繰り返し投与により膠原病を発症したマウスにおいて増加したIFN γ 産生CD8⁺ T細胞は、MG132によるプロテアソームの阻害により減少した。またタンパク尿もMG132の投与により減少した。同様に、プリマキンの投与によりエンドソームから細胞表面への輸送を阻害した場合にも、IFN γ 産生CD8⁺ T細胞の増加とタンパク尿は抑制された。

【結語】 クロスプレゼンテーションの際、エンドソーム内の抗原はSec61を介して細胞質に放出され、プロテアソームで分解された後、エンドソームから細胞表面に輸送されることが示された。よって、Sec61が抗原のクロスプレゼンテーションに重要であることが示唆された。

CD45RB^{lo} 122^{lo} を呈する自己抗体産生誘導性 CD4⁺ T 細胞が膠原病発症のキイとなる

¹神戸大学大学院保健学研究科病態解析学 ²神戸大学大学院医学研究科内科学

³神戸大学医学部附属病院リウマチセンター

宮崎由実¹・積山賢¹・塩沢俊一^{1,2,3}

086k602k@stu.kobe-u.ac.jp

【目的】 私達は膠原病の発症理論として、自己臨界点説を見出した。マウスに抗原を繰り返し投与すると、過剰な刺激を受けたCD4⁺ T細胞は、末梢リンパ組織においてT細胞受容体遺伝子の再構成を起こし、自己抗体産生誘導性CD4⁺ T (autoantibody-inducing CD4⁺ T; *a/CD4⁺ T*) 細胞になった。また、樹状細胞における抗原のクロスプレゼンテーションにより活性化したCD8⁺ T細胞は、細胞傷害性T細胞 (CTL) へと分化し、糸球体腎炎をはじめとするヒトの全身性エリテマトーデス (SLE) に酷似した組織傷害を引き起こした。このように、免疫システムの安定性には限界点が存在し、その自己臨界点を超えて過剰な刺激が作用すると免疫システムは破綻し、その結果、膠原病が発症することを見出している。今回、CTLの生成と組織傷害の誘導における*a/CD4⁺ T*細胞の必要性と、*a/CD4⁺ T*細胞の表現型について検討した。

【方法】 BALB/c マウスに卵白アルブミン (OVA) を繰り返し投与した。その際、抗 CD4 抗体の投与により CD4⁺ T細胞を除去した。これらのマウスにおける CTL の生成と腎炎の発症を評価するため、脾臓 IFN γ 産生 CD8⁺ T細胞とタンパク尿を検討した。また、OVA8 回投与マウスの CD4⁺ T細胞を除去した後、keyhole limpet hemocyanin (KLH) 12 回投与マウス由来の *a/CD4⁺ T*細胞を養子移入し、レシピエントマウスにおける脾臓 IFN γ 産生 CD8⁺ T細胞とタンパク尿を検討した。更に、*a/CD4⁺ T*細胞の表現型を検討するため、OVA、KLH、または staphylococcal enterotoxin B (SEB) をそれぞれ繰り返し投与したマウスにおける、自己抗体の産生と脾臓 CD4⁺ T細胞の表面マーカーを検討した。また、OVA 投与マウスの脾臓 CD4⁺ T細胞を CD45RB、CD27、CD122 発現の有無により分離し、未感作マウスに移入後、レシピエントにおける自己抗体を検出した。

【結果】 CD4⁺ T細胞を除去したマウスでは、対照群と比較してIFN γ 産生CD8⁺ T細胞が有意に減少し、タンパク尿スコアも低下した。更に、*a/CD4⁺ T*細胞の移入によりIFN γ 産生CD8⁺ T細胞が生成しタンパク尿スコアが上昇した。また、いずれの抗原を投与したマウスにおいてもリウマチ因子 (RF)、抗Sm抗体、または抗dsDNA抗体の産生が誘導され、これらのマウスでは共通して、CD45RB^{lo}、CD27^{lo}、CD122^{hi} を呈するCD4⁺ T細胞が増加した。更に、CD45RB^{lo} 122^{lo} CD4⁺ T細胞の養子移入によりRFと抗dsDNA抗体の産生が誘導された。

【結語】 CD45RB^{lo} 122^{lo}を呈する*a/CD4⁺ T*細胞がCTLの生成と組織傷害を誘導し、SLE発症のキイとなることが示唆された。

混合性結合組織病 (MCTD) 患者を特徴づける抗U1RNP自己抗体はTNF- α ,
IL-6と協調的に血管新生因子 Angiopoietin-1 (*Ang-1*) の
スプライシングを変化させ病態形成に関与する

¹神戸大学大学院保健学研究科病態解析学 ²甲南病院加古川病院リウマチセンター
³神戸大学大学院医学研究科内科学 ⁴神戸大学医学部附属病院リウマチセンター
奥山樹¹・駒井浩一郎¹・佐々木陽平¹・塩沢和子²・柱本照^{1,3,4}・塩沢俊一^{1,3,4}
114k103k@stu.kobe-u.ac.jp

【目的】 MCTDは関節炎、血管病変、線維症など様々な膠原病の症状を伴う難治性疾患であり、抗U1RNP自己抗体の増加が診断基準の1つとなっている。*Ang-1*は主に血管内皮細胞に発現するTie-2のリガンドであり、細胞の分化増殖、アポトーシスの抑制に働く血管新生因子である。*Ang-1*はMCTD合併肺高血圧症(PH)患者に高発現が認められ、重要な病態形成要因と考えられる。これまでに我々は*Ang-1* mRNAにおいて²⁶⁹Glyをコードするnt805GGT挿入型(*Ang-1/ins*)と欠損型(*Ang-1/del*)のスプライスバリエーションを見出しており、MCTD患者において*Ang-1/ins*の発現頻度が有意に増加していること、MCTD患者における抗U1RNP抗体価と*Ang-1/ins*発現に有意な相関がある事を見出した。

また内皮細胞において*Ang-1/ins*は*Ang-1/del*と比べてより強くTie-2をリン酸化することを見出した。U1RNPはスプライシングにおけるイントロン5'末端(5' -ss)の決定に重要な因子であり、nt805GGTの挿入は選択的5' -ssに依存すると考えられたため、MCTD患者では抗U1RNP抗体によるU1RNPへの干渉作用により5' -ssがずれ、その結果*Ang-1/ins*発現が誘導される可能性が考えられた。また多くの膠原病で増加する炎症性サイトカインがスプライシングに関与するという報告があり、ヒト肺動脈平滑筋細胞(HPASMC)に抗U1RNP抗体を導入した結果、TNF- α , IL-6刺激下で特に抗U1C抗体が*Ang-1/ins*発現を有意に増加させることを見出している。そこでTNF- α , IL-6刺激下で(1) 導入抗体の核への局在性及び細胞内抗体導入率、(2) U1RNP構成成分の発現量について検討を行った。

【方法】 HPASMCに抗体導入試薬PULSin (Polyplus Transfection社)を用いて蛍光標識した抗U1RNP抗体(抗U1A, U1C, U1-70K各抗体)を導入し、TNF- α , IL-6で刺激し24時間培養後、蛍光顕微鏡により導入抗体の細胞内分布を確認し、FACSにより細胞内への抗体導入率を解析した。また、HPASMCをTNF- α , IL-6で刺激して24時間培養後、Taq Man法による定量PCRとウエスタンブロット法によりU1A, U1C, U1-70KのmRNAとタンパク質の発現量を検討した。

【結果】 TNF- α , IL-6の刺激によって導入抗体の核への局在性や細胞内への抗体導入率に差異は認められなかった。一方、U1Cの発現亢進がmRNA, タンパク質共に認められた。

【結論】 TNF- α , IL-6はU1C発現量を亢進させることで抗U1C抗体と協調的にスプライシングに干渉し、*Ang-1/ins*発現に関与する可能性が示唆された。

自己抗体産生誘導性CD4⁺ T細胞は末梢でのTCR遺伝子再構成により生成する

¹神戸大学大学院保健学研究科病態解析学 ²神戸大学大学院医学研究科内科学

³神戸大学医学部附属病院リウマチセンター

生戸健一¹・積山賢¹・塩沢俊一^{1,2,3}

kenichi-uto@people.kobe-u.ac.jp

【目的】 私達は膠原病の発症理論として、自己臨界点説を見出した。マウスに抗原を繰り返し投与すると、過剰な刺激を受けたCD4⁺ T細胞は、リウマチ因子 (RF) やヒトの全身性エリテマトーデス (SLE) に特徴的な抗Sm抗体などの様々な自己抗体の産生を誘導するような自己抗体産生誘導性CD4⁺ T (autoantibody-inducing CD4⁺ T; *a/CD4⁺ T*) 細胞になった。また、この*a/CD4⁺ T*細胞からのヘルプと、樹状細胞における抗原のクロスプレゼンテーションにより活性化したCD8⁺ T細胞は、細胞傷害性T細胞 (CTL) へと分化し、糸球体腎炎をはじめとするSLEに酷似した組織傷害を引き起こした。このように、免疫システムの安定性には限界点が存在し、その自己臨界点を超えて過剰な刺激が作用すると免疫システムは破綻し、その結果、膠原病が発症することを見出している。私達は今回、*a/CD4⁺ T*細胞の生成における末梢でのTCR遺伝子再構成の関与を検討した。

【方法】 BALB/cマウスにstaphylococcal enterotoxin B (SEB) を繰り返し腹腔内投与した。脾臓CD4⁺ T細胞よりRNAを抽出し、recombination-activating gene (RAG)1/2、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)、pre-TCR alpha chain (pTα) の発現をRT-PCRにより検討した。*in vivo*におけるRAGの発現を検討するため、RAG1遺伝子座にGFP遺伝子を導入した*rag1/gfp*ノックインマウスにSEBを繰り返し投与し、脾臓CD4⁺ T細胞におけるGFP⁺細胞をFACSにより検出した。脾臓CD4⁺ T細胞よりDNAを抽出し、TCR遺伝子再構成においてDNA切断の際に生じるDNAの平滑末端をLM-PCRにより検出した。更に、脾臓CD4⁺ T細胞におけるTCR遺伝子座のヒストン修飾をクロマチン免疫沈降法により解析した。

【結果】 SEBの繰り返し投与後の脾臓CD4⁺ T細胞では、通常の成熟した末梢T細胞では検出されないRAG1/2やTdTなどのTCR遺伝子再構成に関わる一連の酵素群が発現していた。同様に、胸腺でのTCR遺伝子再構成の過程でのみ発現するpTαが、SEBの繰り返し投与後の脾臓CD4⁺ T細胞で発現していた。*rag1/gfp*ノックインマウスを用いた検討では、PBS投与の対照群と比較して、SEBの繰り返し投与により脾臓でのGFP⁺ (= RAG1⁺) CD4⁺ T細胞が有意に増加した。更に、SEBの繰り返し投与後の脾臓CD4⁺ T細胞では、TCRβ遺伝子の再構成は検出されなかったが、TCRα鎖ではDNAの切断により生じる平滑末端が検出され、TCRα遺伝子の再構成が起きていた。また、SEBの繰り返し投与の有無に関わらず、脾臓CD4⁺ T細胞におけるTCR遺伝子座のヒストン修飾は胸腺細胞と同様のパターンであった。このことから、末梢リンパ組織のCD4⁺ T細胞はクロマチンの構造レベルではTCR遺伝子の再構成が起きうる状態であることが示された。**【結語】** 過剰刺激を受けたCD4⁺ T細胞において、TCRα遺伝子の再構成が末梢で起こることにより*a/CD4⁺ T*細胞が生成し、この*a/CD4⁺ T*細胞が自己抗体やCTLの生成を誘導することで、膠原病を発症させることが示唆された。

誘導性 Cre/loxP システムを用いた膵β細胞の運命追跡

¹神戸大学大学院医学研究科細胞分子医学 ²千葉大学大学院医学研究院代謝生理学

³神戸大学大学院医学研究科糖尿病・内分泌内科学

田村香楠子¹・南幸太郎¹・家本啓佑¹・三木隆司²・清野進^{1, 3}

kanako.t@stu.kobe-u.ac.jp

【目的】膵β細胞の量は生涯にわたってダイナミックに維持されている。マウスを用いた研究から、出生直後には膵β細胞量が劇的に増加し、成体においても一定の割合でターンオーバーが生じ、条件によっては再生現象も認められる。また、肥満や妊娠時など、インスリン要求量の増加に伴い、膵β細胞量が増加することも知られている。このような膵β細胞量の維持のメカニズムとしては、膵β細胞自体の自己複製が主要なものであるとの報告があるが、確定的な見解は存在しない。そこで本研究では誘導性の Cre/loxP システムを利用し、膵β細胞を様々なタイミング、条件で標識し、増殖、死、再生などの運命を解析する。

【方法】膵β細胞を高度に選択的に標識するために、マウスインスリン 2 遺伝子座に改変型エストロゲン受容体と融合した Cre リコンビナーゼ遺伝子を導入したノックインマウス (Ins2-CreER) を作製した。このマウスを Rosa26 遺伝子座に YFP を導入したマウス (R26R-YFP) と交配して Ins2-CreER/R26R-YFP マウスを作製した。このマウスでは、タモキシフェンを投与することで任意の時期に膵β細胞を選択的に標識することができる。加齢にともなう膵β細胞量維持の解析では、6 週齢のマウスにタモキシフェン投与後 12 ヶ月まで観察した。病的条件下における解析では、タモキシフェン投与の 10 日後にストレプトゾトシン (STZ) を投与して膵β細胞を破壊し、その後の標識率の推移を検討した。また、出生直後における膵β細胞量増加の解析では、出生直前の E18.5 にタモキシフェン投与による標識を行い、出生後 28 日目までの膵臓切片を作製して標識細胞を観察した。

【結果】Ins2-CreER/R26R-YFP 成体マウスにおいてタモキシフェン投与により、約 30%の膵β細胞が標識された。生理的条件下で標識後 12 ヶ月まで観察したところ、膵β細胞の標識率に有意な変化は認められなかった。また、STZ 投与による膵β細胞傷害時においても標識率は変化せず、これらの条件下では膵β細胞の維持における非β細胞の寄与はほとんどないものと考えられた。一方、出生直後から 2 週間では膵β細胞の標識率に有意な変化はなかったが、4 週目の標識率は有意に低下した。また、このとき、YFP で標識されない数個から数十個のインスリン陽性細胞のクラスターが散見された。これらの結果は、出生直後のβ細胞の増加には、既存のβ細胞の自己複製だけでなく非β細胞からの新生も寄与する可能性を示している。

【結論】膵β細胞量の維持には週齢や条件によって異なるメカニズムが寄与している可能性がある。

cAMP不応性の膵β細胞から構成された偽膵島におけるcAMP応答性の誘導

¹神戸大学大学院医学研究科糖尿病・内分泌内科学

²神戸大学大学院医学研究科細胞分子医学

艾尼吾甫尔江¹・岩崎真宏²・小倉雅仁²・柴崎忠雄²・南幸太郎²・清野進^{1, 2}

Aini.9@stu.kobe-u.ac.jp

【背景と目的】細胞間相互作用は様々な細胞の機能調節に関与していることが知られている。インスリン分泌においても、膵島のインスリン分泌反応は、単離したβ細胞での分泌反応より良好であることから、細胞間相互作用はインスリン分泌にも関与していると考えられる。本研究では、インスリン分泌における膵β細胞の細胞間相互作用の役割を明らかにするために、マウス膵β細胞株を用いて、単層培養細胞と正常膵島構造に類する三次元の細胞塊である偽膵島との比較解析を行った。

【方法】膵β細胞腫瘍を形成するIT6マウスからクローン化した膵β細胞（MIN6-K20と命名）をゼラチンコートした培養皿で7日間培養することによって偽膵島を形成した。グルコース応答性インスリン分泌とcAMPシグナルを活性化するインクレチンホルモン（GLP-1およびGIP）によるインスリン分泌増強反応（インクレチン応答性）を検討した。さらに、キャピラリー電気泳動/質量分析（CE/MS）により様々な条件における細胞内代謝物を網羅的に解析した。

【結果と考察】MIN6-K20細胞は単層培養でグルコース応答性インスリン分泌を認めるが、インクレチン応答性は認めなかった。しかし、この細胞を用いた偽膵島形成により、正常膵島に近いインクレチン応答性が誘導された。単層培養では正常膵島に比べて低値であったインスリン含量は、偽膵島形成により正常膵島とほぼ同等量まで増加した。MIN6-K20細胞ではGLP-1によるcAMP産生量も偽膵島形成により亢進した。また、偽膵島ではcAMPの基質であるATPの産生量が増加していたことから、細胞内代謝が亢進していることが考えられたため、CE/MSを用いたメタボローム解析を行ったところ、解糖系やTCA回路に関する代謝物が偽膵島形成により増加していた。このことから、偽膵島ではグルコース代謝が亢進していることが示唆された。

【結論】β細胞-β細胞相互作用による三次元構築はグルコース代謝を活性化し、インスリン分泌特性を示すために重要であると考えられる。

Aspp1 regulates SMC coverage and lymphatic vascular remodeling

神戸大学大学院医学研究科血管生物学
池田大樹・森脇一将・佐野圭吾・丁国・劉歆儀・白壁正規・平島正則
dikeda@med.kobe-u.ac.jp

脊椎動物の循環器系は、血管およびリンパ管系が密接に関連し成り立っており、体液の恒常性維持に重要な役割を果たしています。我々は、以前ジーントラップ法によりマウス内皮細胞特異的遺伝子としてAspp1を同定しました(Hirashima *et al.*, 2004)。Aspp1ノックアウトマウスを複製・解析することで胎仔期にリンパ管形成の異常と皮下浮腫を見出しました。一方、成体Aspp1ノックアウトマウスにおいては浮腫を認めないものの、下肢の血管と併走する集合リンパ管が融合や蛇行などの異常な走行パターンを示すことが明らかになっています(Hirashima *et al.*, 2008)。本研究において、我々はAspp1が血管・リンパ管内皮細胞のみならず平滑筋細胞にも発現していることを示しました。また、胎仔期における毛細リンパ管に平滑筋細胞が見られるなどの異常な局在や、成体期においても異常な平滑筋細胞の被覆がみられ、それに伴い集合リンパ管のリモデリングに異常をきたし、その結果として走行異常が引き起こされる可能性を見出しました。

Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) 分泌における Noc2 の役割

¹神戸大学大学院医学研究科細胞分子医学 ²千葉大学大学院医学研究院代謝生理学
³北海道大学大学院医学研究科生体機能学 ⁴神戸大学大学院医学研究科糖尿病・内分泌内科学
⁵CREST

岸本垂野¹・柴崎忠雄¹・松村公男¹・建部将夫¹・宮澤康太郎¹・藤本和歌子¹
三木隆司²・岩永敏彦³・清野進^{1,4,5}
kishimoto1@stu.kobe-u.ac.jp

【目的】 Noc2 は低分子量 G タンパク質 Rab3 や Rab27 のエフェクター分子であり、膵 β 細胞からのインスリン分泌や種々の外分泌細胞からの酵素分泌に関与している。一方、腸管内分泌細胞から分泌される Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) や glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) はインクレチンホルモンとしてインスリン分泌を増強することが知られている。最近 GLP-1 の作用を利用した血糖降下薬が開発され注目されているが、インクレチン分泌の分子機構は未だ不明である。本研究では GLP-1 分泌における Noc2 の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】 Noc2 欠損マウスを用い、随時および食餌負荷時の血中 GLP-1 量の測定、および腸管内分泌細胞での GLP-1 顆粒の分布を免疫組織学的解析により検討した。また Noc2 を標的とした shRNA をアデノウィルスを用いて腸管内分泌細胞株 STC-1 に導入し、内在性 Noc2 の発現を抑制した時の GLP-1 分泌量を測定した。

【結果】 Noc2 欠損マウスにおいては随時および食餌負荷後の血中 GLP-1 量は野生型マウスと比べ、顕著に低下していたことから、Noc2 が GLP-1 分泌に関与することが示唆された。また腸管内分泌細胞での Noc2 の局在を免疫組織学的に解析したところ、野生型マウスでは GLP-1 顆粒が主として基底外側に局在しているのに対し、Noc2 欠損マウスでは基底外側と頂端側の両方に散在していたことから、Noc2 は GLP-1 顆粒の局在に関わることが示唆された。さらに Noc2 に対する shRNA を導入した腸管内分泌細胞株 STC-1 を高濃度グルコースで刺激し、GLP-1 分泌量を測定したところ、コントロール shRNA を導入した細胞と比べ、有意に低下していた。

【結論】 腸管内分泌細胞において GLP-1 分泌顆粒が正常な分泌経路に従うためには、Noc2 が顆粒を適切に局在させることが必要である可能性が示唆された。

**Neonatal Fc receptor for IgG (FcRn) expressed in the gastric epithelium
regulates bacterial infection in mice**

Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine,
Kobe University Graduate School of Medicine
Yahaya BenSuleiman, Masaru Yoshida, Shin Nishiumi, Takeshi Azuma
yahaya@med.kobe-u.ac.jp

It has been reported that neonatal Fc receptor for IgG (FcRn) plays a major role in regulating host IgG levels and transporting IgG across polarized epithelial barriers. Therefore, we examined whether FcRn can be functionally expressed in the stomach and whether FcRn-mediated transport of IgG into the gastric mucosa can regulate bacterial infection in the stomach.

The expression of FcRn was detected in the gastric epithelium of adult wild-type mice by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry with anti-mouse FcRn antibody, but not in that of FcRn^{-/-} mice. To determine whether IgG in the serum could be transported into the gastric lumen by FcRn, 2 hours after intravenous injection of rabbit IgG, gastric juice was collected and subjected to measure the levels of rabbit IgG using ELISA. The elevated levels of rabbit IgG in their gastric juice were detected in the gastric juice of wild-type mice, but not in that of FcRn^{-/-} mice. These results indicate that FcRn can be functionally expressed in gastric epithelium. Next, we examined whether FcRn can regulate bacterial infection in the stomach. To do so, *Helicobacter heilmannii* (*H. heilmannii*) infection model was used. It is reported that *H. heilmannii* is a tightly coiled, Gram-negative bacterium and can induce chronic gastritis as well as low-grade mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma in animals. *H. heilmannii* was inoculated into wild-type or FcRn^{-/-} mice and then the gastric lesions and the level of antigen-specific IgG in serum and gastric juice were analyzed 3 month after infection. The levels of anti-bacterial IgG in serum were equally elevated in both group. On the other hand, the levels of anti-bacterial IgG in gastric juice of wild-type mice increased, but not in that of FcRn^{-/-} mice. Histological examination showed remarkable lymphocytic infiltration in gastric mucosa of FcRn^{-/-} compared to wild-type mice. The bacterial loads in the stomach of FcRn^{-/-} were also higher than that of wild-type mice.

Our findings indicate that FcRn^{-/-} mice are susceptible to infection with *H. heilmannii*, and suggest that FcRn can be functionally expressed in the stomach and deliver anti-bacterial IgGs into the gastric juice which regulate gastric bacterial infection in mice.

Claudin-2 は MLCK 依存的経路を介して大腸の炎症を制御する

¹神戸大学大学院医学研究科消化器内科学 ²神戸大学大学院医学研究科細胞生物学
西田真之¹・西海信¹・吉田優¹・古瀬幹夫²・東健¹
masayuki@med.kobe-u.ac.jp

【背景と目的】 Tight junctionはclaudinやoccludin、そして、裏打ちタンパク質のZO-1で構成される細胞間接着装置として知られている。近年、Tight junctionの構成分子であるclaudinの発現変動が、様々な疾患に関係することが報告されており、上皮機能の破綻や自然免疫、獲得免疫などにより引き起こされる多因子性疾患として知られる炎症性腸疾患においても、claudinの関与が明らかにされた。しかしながら、大腸の炎症におけるclaudin-2の役割については未だ明らかになっていない。そこで本研究では、大腸組織におけるTNF・誘導性炎症反応に対するclaudin-2の役割を解明することを目的とした。

方法：大腸組織におけるclaudin-2の役割を検討するため、claudin-2 (-/-) マウスを用いて実験を行った。claudin-2 (-/-) マウスにTNF・を腹腔内投与し、その4時間後に大腸上皮細胞におけるNF- κ Bの活性化、IL-6のmRNA発現、上皮細胞の透過性に関与するmyosin light chain kinase (MLCK) の発現について評価した。さらに、炎症性腸疾患のマウスモデルとして知られているDextran sulfate sodium (DSS) 誘発性腸炎をclaudin-2 (-/-) マウスに誘導し、DSS腸炎に対するclaudin-2の関与を検討した。また、claudin-2の発現をsiRNAにより低下させたCaco-2細胞を用いて、claudin-2の腸の炎症への関与を検討した。

【結果】 claudin-2 (-/-) マウスでは、claudin-2 (+/+) マウスと比較して、NF- κ Bを介したTNF・誘導性炎症反応の増悪とMLCKの発現量増加が認められ、さらには、claudin-2 (-/-) マウスにおけるDSS腸炎の増悪も観察された。*In vitro*の実験においても、claudin-2のknockdownによってTNF・誘導性炎症反応性が増強されることが確認できた。

【考察】 本研究により、claudin-2と腸の炎症反応との関係性が明らかにされた。TNF・を投与したclaudin-2 (-/-) マウスにおいて、大腸組織におけるMLCKの発現が増加していたことから、claudin-2はMLCKを制御しているとともに、MLCKの炎症反応への関与の可能性が示唆された。これらのことから、claudin-2とMLCKとが炎症性疾患の病態に関与している可能性が示された。

乳酸菌由来タンナーゼの多様性に関する研究

¹神戸大学大学院農学研究科応用動物学講座 ¹神戸大学大学院農学研究科応用生命化学講座
上田宗平¹・吉田健一²・大澤朗¹
113a204a@stu.kobe-u.ac.jp

【背景と目的】加水分解型タンニンを特異的に分解するタンナーゼ活性を有する微生物には真菌類（酵母など）の他、真正細菌では *Streptococcus* 属や *Lonepinella* 属、*Bacillus* 属などに報告例がある。特に、人の腸管や発酵食品から分離される *Lactobacillus plantarum*、*L. paraplantarum*、*L. pentosus* などの分類学的に近縁な乳酸菌類においてはタンナーゼの保有が見出されており、我々はこの遺伝子の多様性に着目した。この研究の先駆けとして、我々はまず *L. plantarum* ATCC14917[†] のタンナーゼ遺伝子 (*TanLpl*) を同定し、これを足がかりとして *L. pentosus*、および *L. paraplantarum* のタンナーゼ遺伝子を取得して具体的な比較検討に着手した。そして、乳酸菌由来タンナーゼの酵素学的性質については大腸菌の発現系よりもタンパク質の分泌発現に優れる *B. subtilis* の分泌発現系の利用を検討する方針である。

【材料と方法】 *L. paraplantarum* NOS120 株、*L. pentosus* 21A-3 のゲノム DNA を鋳型としてインバース PCR 法によって、それぞれのタンナーゼ遺伝子候補およびその周辺領域を含む DNA 断片を得てシーケンス解析を行った。タンナーゼの酵素学的な比較を行うためのテストケースとして、まず *Bacillus subtilis* Secretory Protein Expression System を用いて *TanLpl* 発現系の構築を試みた。

【結果および考察】 *L. paraplantarum* NOS120 株、*L. pentosus* 21A-3 のタンナーゼ遺伝子 (1415 bp) の全塩基配列を決定した結果、*TanLpl* とのアミノ酸配列の相同性は *TanLpa* では 88%、*TanLpe* では 72%となり 16S、23S rRNA において高い類似性を持ち 16S/23S rDNA によって分類されるこれらの種で予想以上の多様性が確認された。タンナーゼ遺伝子の発現系構築については、発現ベクター (pBE-S) に PCR によって単離した *TanLpl* を挿入し、シグナルペプチド DNA (173 種類) 全て含む pBE-S のライブラリーを得るため、大腸菌を形質転換して約 1500 の独立コロニーよりプラスミドライブラリーを構築した。現在、プラスミドライブラリーの *B. subtilis* への導入、さらにタンナーゼ分泌生産クローンの選抜を進めている。

血清メタボロミクスによる消化管がん診断法の有用性の検討

¹神戸大学医学研究科内科学講座消化器内科学 ²神戸大学医学研究科質量分析総合センター
池田篤紀¹・西海信¹・吉江智郎¹・篠原正和²・波多野直哉²
奥野達哉¹・竹縄忠臣²・東健¹・吉田優¹
atsukiik@med.kobe-u.ac.jp

【目的】現在のところ、消化管がんの早期発見において血清腫瘍マーカーは有効性や利便性は示されていない。これまでに我々は、膵がん患者の血清中における様々な低分子代謝物の変動することを、ガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）を用いたメタボロミクスにより見出した。そこで本研究では、食道、胃、大腸がん患者、ならびに、健常人の血清の代謝物をメタボロミクスにより分析することにより、より感度や特異度の優れたバイオマーカー候補の探索を実施した。

【対象】神戸大学病院において、入院、および、通院加療を行なっている各消化管がん患者のうち、同意の得られた食道がん患者 15 人、胃がん患者 11 人、結腸直腸がん患者 12 人、および、画像血液検査で健常が証明された 12 人の健常人の血清を分析対象とした。GC/MS 用いたメタボロミクスに分析された結果から、多変量解析にて各がん種に特異的である代謝物を決定し、ROC 曲線を用いて感度、ならびに、特異度を求めた。

【結果】血清中において同定された代謝物 58 個のうち、食道がん、胃がん、結腸直腸がん患者でそれぞれ、9 個、5 個、12 個の代謝物が健常人と比較して統計学的に有意に変動することを明らかにした。多変量解析により、食道がんでは malonic acid と L-serine が、胃がんでは 3-hydroxypropionic acid と pyruvic acid が、結腸直腸がんでは L-alanine と glucuronic lactone、L-glutamine が各がん種に特異的に変動した。これらの代謝物の感度、特異度は、各がん腫の従来の血液腫瘍マーカーよりも優れている傾向にあった。

【結語】今回のわれわれの研究から、メタボロミクスは消化管がんの早期発見にも有効であり、早期発見の一助になる可能性が示唆された。

ジアシルグリセロールキナーゼ β (DGK β) による 神経特異的突起伸長機構の解明

¹神戸大学大学院農学研究科動物資源利用化学

²神戸大学バイオシグナル研究センター分子薬理分野

³神戸大学バイオシグナル研究センター情報伝達経路研究分野

中井寛子¹・加野拓也¹・上月健²・齋藤尚亮²・中嶋昭雄³

116a421a@stu.kobe-u.ac.jp

【背景・目的】 ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) はジアシルグリセロール (DG) をリン酸化し、フォスファチジン酸 (PA) に変換する脂質キナーゼである。DG は PKC の活性化剤であり、産生される PA も様々な酵素活性を調節することから、DGK は PKC の抑制や PA の産生を介して生体内において重要な働きをしていると考えられている。なかでも、10 種類あるサブタイプのうち β サブタイプは神経特異的であり、神経細胞に過剰発現すると神経突起の伸長及びスパイン構造の増加が引き起こされること、また DGK β KO マウスは記憶及び感情障害が認められていることなどから、DGK β は神経細胞の形態を維持することにより神経ネットワーク形成、ひいては記憶などの脳高次機能において重要な働きをしていることが明らかになっている。しかし、DGK β が引き起こす神経突起伸長の詳しい細胞内分子メカニズムは未だ不明である。一方、mTOR は PA によって活性化され、スパイン形成に関与すると報告されている。そこで本研究では、DGK β が産生する PA が mTOR を活性化し、神経突起伸長を誘起している可能性について調べた。

【方法】 SH-SY5Y 神経芽種細胞に GFP を融合させた DGK β (GFP-DGK β) を導入し、その後 DGK 阻害剤、mTOR 阻害剤を 24 時間処置し、突起伸長した細胞の割合をコントロールのそれと比較することで、DGK β の酵素活性及び mTOR の突起伸長への関与を評価した。

【結果・考察】 コントロールの GFP を発現させた SH-SY5Y 細胞は、突起をもたない細胞の割合が約 60% と最も多い。しかし、GFP-DGK β を過剰発現させると、3 本以上の複数の突起をもつ細胞が約 50% と最も多くなった。この突起伸長は、DGK 阻害剤により有意に減少したことから、DGK β による神経突起伸長には酵素活性が必要であることが明らかになった。ついで、PA によって活性化される mTOR 阻害剤 (Ku0063994) の効果を検討したところ、DGK β による突起伸長を濃度依存的に抑制した。一方、mTOR は TORC1 および TORC2 と呼ばれる 2 種類の複合体を形成し機能を果たすことが明らかになっている。そこで、TORC1 のみを特異的に阻害する rapamycin を処置したところ、mTOR 阻害剤の時と同様に複数の突起をもつ細胞が有意に減少した。以上のことから、DGK β による神経細胞の突起伸長の少なくとも一部は、産生された PA により TORC1 系の mTOR の活性化を介して引き起こされることが明らかとなった。

膵β細胞特異的C/EBPβトランスジェニックマウスを用いた膵β細胞不全に対するDPP-4阻害剤ビルダグリプチンの効果の検討

¹神戸大学大学院保健学研究科病態解析学 ²神戸大学大学院医学研究科糖尿病・内分泌内科学
清水忍¹・細岡哲也²・松田友和²・浅原俊一郎²・清野進²・木戸良明^{1,2}
109k112k@stu.kobe-u.ac.jp

【背景・目的】

近年、膵β細胞不全に対するインクレチンの有用性が注目を集めている。これまでに、GLP-1やGLP-1アナログの膵β細胞保護作用については多くの報告がなされているが、DPP-4阻害剤の膵β細胞保護作用やその分子機構に関しては明らかではない。最近、我々は、糖尿病モデルマウスの膵島において転写因子C/EBPβの発現が増加すること、膵β細胞特異的C/EBPβトランスジェニックマウスは膵β細胞量の減少により高血糖をきたすことを報告した。今回、C/EBPβによって誘導される膵β細胞不全に対するDPP-4阻害剤ビルダグリプチンの効果と分子機構について検討した。

【方法および結果】

膵β細胞特異的C/EBPβトランスジェニックマウス(C/EBPβ-TG)は、膵β細胞における小胞体ストレスと膵β細胞量の減少により随時血糖200mg/dl程度の高血糖を呈した。C/EBPβ-TGおよび対照マウスを、薬剤投与群と非投与群に分類し、投与群にはDPP-4阻害剤ビルダグリプチン(vilda)を0.6mg/mlの濃度で飲水に溶解し4週齢より経口投与した。

Vilda投与は体重や摂餌量に影響を与えなかったが、C/EBPβ-TGマウスの高血糖および低インスリン血症を有意に改善した。経口糖負荷試験では、Vilda投与により糖負荷後高血糖を有意に改善し、血糖値依存的なインスリン分泌の促進ならびにグルカゴン分泌の抑制を認めた。膵島のインスリン/グルカゴン免疫染色を行い膵β細胞量を評価したところ、減少していたC/EBPβ-TGマウスの膵β細胞量がVildaの投与により有意に改善し、またPCNAで示される細胞増殖能の増加を認めた。単離膵島の蛋白発現解析では、C/EBPβ-TGマウスで認められるPERKやeIF2α、c-junのリン酸化など小胞体ストレスの亢進がVilda投与によって軽減し、アポトーシスの抑制や細胞増殖に重要なIRS-2の発現やAKTのリン酸化、CREBのリン酸化が回復した。

【結論】

DPP-4阻害剤であるビルダグリプチンは、膵β細胞量を増加させることにより膵β細胞特異的C/EBPβトランスジェニックマウスの糖代謝異常を改善した。このような作用は、膵β細胞における小胞体ストレスの軽減およびアポトーシス抑制、細胞増殖の促進によりもたらされたと考えられた。

包括的メタボローム解析による2型糖尿病バイオマーカーの探索

¹神戸大学大学院医学研究科細胞分子医学 ²神戸大学大学院医学研究科糖尿病・内分泌内科学
吉田衣里¹・横井伯英¹・星川律子¹・日高志保美¹・清野進^{1,2}
e.yoshida@stu.kobe-u.ac.jp

【目的】 現在、糖尿病や耐糖能異常の診断には、血糖値やHbA1cといった血糖に依存した指標が用いられている。糖尿病を早期に診断するためには、血糖に依存しない新たな診断指標が必要である。メタボローム解析は疾患のバイオマーカー探索において有効な手法であると考えられている。最近我々は、糖尿病の早期診断や病態評価に有用なバイオマーカーの同定を目的としてメタボローム解析を用いた研究を開始した。今回、2型糖尿病モデルGKラットおよび対照LEWラットの血液サンプルを用いて包括的メタボローム解析を行った。

【方法】 12週齢のGKラットおよびLEWラットを用いて静脈内糖負荷試験（IVGTT）を行い、糖負荷前（0分）および糖負荷後（1、5、12、19、30、60、90、120分）の血液を採取した。次に、採取した0分、1分、19分、120分の血清サンプルを用いて、ガスクロマトグラフ-質量分析計（GC-MS）によるメタボローム解析を行った。得られた約300個のピークについて、独自に作成した代謝物ライブラリーを用いた検索を行い、代謝物候補を同定した。主成分分析によってGKとLEWの分類を行うとともに、GKとLEWの平均値の差（倍率変化）とt検定による有意差を考慮してGKとLEWとの間で相違が大きい代謝物を抽出した。

【結果と考察】 主成分分析では、0分と120分において、血清中の代謝物の相違によってGKとLEWが明らかに分類された。t検定で有意差（ $p < 0.001$ ）がありかつ1.5倍以上の差のある代謝物候補が、0分では23個、120分では28個得られた。これらのことより、血液サンプルを用いたメタボローム解析は糖尿病バイオマーカーの探索に有用であることが示唆された。今後、代謝物標準品を用いて代謝物の同定を行うとともに、異なる2型糖尿病モデルおよび2型糖尿病患者のサンプルを用いて検証を行う。

2型糖尿病関連遺伝子Kcnq1領域が膵β細胞に及ぼす影響の検討

¹神戸大学大学院保健学研究科病態解析学 ²神戸大学大学院医学研究科糖尿病・内分泌内科学³
 京都大学大学院医学研究科糖尿病・栄養内科学 ⁴国立国際医療研究センター
 江藤博昭¹・浅原俊一郎²・照山杏子¹・井上裕行¹・渋谷由紀²・小柳真希²・松田友和²
 長嶋一昭³・西村渉⁴・安田和基⁴・稲垣暢也³・清野進²・春日雅人⁴・木戸良明^{1,2}
 hiroaki420etou@gmail.com

【背景・目的】 肥満が少なく初期からインスリン分泌が低下していると言われる日本人2型糖尿病患者では、糖尿病発症に膵β細胞不全が強く関わっている可能性が指摘されている。近年日本人2型糖尿病患者のSNP解析より、第11番染色体上のKcnq1遺伝子領域に有意な変異が報告された。Kcnq1はimprinting遺伝子であり、その遺伝子領域から発現するnon-coding RNA ‘Kcnq1ot1’ が、DNAメチル化やヒストンメチル化を介して近傍遺伝子の発現を制御していることが報告されている。しかしながらKcnq1が変異によってどのように糖尿病発症に関わっているのかは全く分かっていない。我々はKcnq1の変異が膵β細胞へ及ぼす影響を検討し、糖尿病発症機構解明を目的として以下の解析を行った。

【方法】 Kcnq1 遺伝子の exon2 をネオマイシン耐性遺伝子に置換し作成した全身性 Kcnq1 欠損マウスを用いた。imprinting 制御の影響を検討する為、Neo 耐性遺伝子で父方アリルに変異を有する父方ヘテロマウス (PH)、母方アリルに変異を有する母方ヘテロマウス (MH)、野生型マウス (WT) の3群を解析した。さらに Kcnq1ot1 の発現量を全身において抑制した Kcnq1ot1 truncation マウスを、父方由来アリルに変異を有するマウス、母方由来の変異マウス、野生型マウスの3群に分けて解析を行った。

【結果】 通常の Kcnq1 ヘテロノックアウトマウスを用いた解析では、通常食飼育で、体重、随時血糖、随時インスリン値、OGTT で有意差を認めなかった。そこで Kcnq1 遺伝子のインプリンティング機構における影響を検討するために、父方変異マウス (PH)、母方変異マウス (MH)、野生型マウス (WT) に分けて解析を開始した。出生時および胎生 15.5 日の膵切片において、PH 群では膵β細胞量の減少が認められた。また膵島における Kcnq1ot1 の発現量は PH 群で有意に低下していた。近傍遺伝子のヒストン修飾を検討する為 ChIP assay を行ったところ、PH 群の膵島では細胞周期調節因子 Cdkn1c の promoter 領域における H3K27me3 が低下し、Cdkn1c の発現量は増加していた。

【結論】 Kcnq1ot1 の発現量が低下すると Cdkn1c promoter 領域におけるヒストン修飾が変化することで Cdkn1c の発現亢進を誘導する。このことが膵β細胞増殖不全を引き起こし、糖尿病発症要因となる可能性が考えられた。

低出生体重モデルマウスにおける膵β細胞量調節機構の検討

¹神戸大学大学院保健学研究科病態解析学 ²神戸大学大学院医学研究科糖尿病・内分泌内科学
³国立国際医療研究センター
淵田愛¹・吉田有里¹・小柳真希²・浅原俊一郎²・井上妙²・春日雅人³・清野進²・木戸良明^{1,2}
fuchy1013@yahoo.co.jp

【目的】 2型糖尿病に認めるインスリン分泌不全の要因のひとつに膵β細胞量の減少が挙げられる。近年、低出生体重児が出生後に catch-up growth と呼ばれる成長を示し、将来肥満や高脂血症、高血圧、糖尿病などの生活習慣病に罹患しやすいことが知られている。我々は、妊娠後期に食餌制限をかけた母親マウスから生まれた低出生体重モデルマウスを用いて、子宮内低栄養による臓器形成期の飢餓ストレスが膵β細胞量に及ぼす影響およびその調節メカニズムを解明することを目的とした。

方法：妊娠したメスの C57BL/6J マウスに妊娠後期から 30%の食餌制限を行い、低出生体重モデルマウスを作製した。出生したマウスを同時に出産したメスの ICR マウスを里親として飼育した。生後 4 週目から高脂肪食を与えて、膵β細胞における影響をコントロール群 (CG) と食事制限群 (RG) との間で比較した。

【結果】 RG 群は CG 群に比べて有意に出生時体重が減少していたが、出生後 7 日目前後で CG 群の体重と同等となる catch-up growth を認めた。出生時膵β細胞量は RG 群で約 70%まで減少していた。4 週齢から与えた高脂肪食負荷により膵β細胞量は、12 週齢で RG 群が CG 群を有意に上回ったが、20 週齢において再び減少する傾向を認めた。また 20 週齢における経口糖負荷検査において、RG 群では CG 群に比較して耐糖能が悪化している傾向を認めた。

我々はこれまでに、膵β細胞のインスリンシグナルが膵β細胞量の調節に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた (Nat Genet 38: 589, 2006, Mol Cell Biol 28:2971, 2008)。そこで、本実験の低出生体重モデルマウスにおける膵β細胞量調節メカニズムにおけるインスリンシグナルの関与を検討するために、インスリン受容体から class IA PI-3 キナーゼを通るシグナルを 50%減量させた膵β細胞特異的 PDK1 遺伝子ヘテロ欠損マウス (β PDK1^{+/-}マウス) を用いて低出生体重モデルマウスの作製・解析を行った。 β PDK1^{+/-}マウスの出生時体重は、RG 群で CG 群の約 80%と減少傾向を示した。これは、野生型マウスを用いた解析と同程度の減少であった。一方、 β PDK1^{+/-}マウスの膵β細胞量は RG 群において CG 群の約 60%まで減少しており、野生型マウスを用いた RG 群の膵β細胞量よりさらに減少していた。

【結論】 妊娠後期飢餓ストレスによる低出生体重モデルマウスでは、出生時膵β細胞量が減少しており、その後の膵β細胞量の増殖および維持が障害されていた。膵β細胞におけるインスリンシグナルが飢餓ストレス下における膵β細胞量維持に関与している可能性が示唆された。

膵炎モデルマウスを用いたメタボロミクスによる膵炎治療薬の探索

神戸大学大学院医学研究科消化器内科学

坂井文・西海信・吉田優・東健

aya0910@med.kobe-u.ac.jp

【背景・目的】急性膵炎は膵臓が自己消化される疾患であり、そのほとんどは可逆的であるが、一旦重症化すると死亡率 9%以上と、良性ながら致死率の高い疾患である。そこで本研究では、2種類の膵炎モデル(セルレイン誘発性膵炎、アルギニン誘発性膵炎)を用いて、急性膵炎における低分子代謝物の変動をガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)を用いたメタボロミクスにより網羅的に解析することで、膵炎に特異的な変動を示す低分子代謝物を見出すとともに、急性膵炎の治療へつなげる知見を得ることができるか否かを検討した。

【方法】セルレイン誘発性膵炎モデルでは、C57BL/6J マウスに Cerulein 50 μ g/kgBW を 1 時間毎に計 6 回腹腔内投与し、投与開始 8 時間後に、血清、ならびに、膵組織を採取した。アルギニン誘発性膵炎モデルでは、C57BL/6J マウスに L-Arginine monohydrochloride 4.7 g/kgBW を 1 時間毎に 2 回腹腔内投与し、投与開始 48 時間後と 72 時間後に、血清、ならびに、膵組織を採取した。それぞれの膵炎モデルにおいて、膵組織の HE 染色、組織病理学的スコア、血清 Amylase 値を評価した。また、血清・膵組織における低分子代謝物の変動を GC/MS により解析し、2 種類の膵炎マウスモデルで共通に変動した低分子代謝物を特定した。さらに、低分子代謝物の変動から、膵炎の治療に有効な候補分子を見出し、その膵炎治療効果について検討した。

【結論】セルレイン誘発性膵炎とアルギニン誘発性膵炎モデルにおいて、組織学的、ならびに、生化学的に膵炎が発症していることが確認できた。セルレイン誘発性膵炎で有意な変動を示す低分子代謝物は、血清で 19 種類、膵組織で 42 種類存在した。一方、アルギニン誘発性膵炎においては、アルギニン投与 48 時間後で有意な変動を示す代謝物が血清で 40 種類、膵組織で 39 種類、そして、72 時間後では、血清で 30 種類、膵組織で 48 種類存在した。次に、2 つの膵炎モデルで共通した変動を示す低分子代謝物のうち、膵組織で有意に減少したグルタミン酸(Glu)と O-ホスホエタノールアミン(PEA)に注目し、セルレイン処理した C57BL/6J マウスに Glu と PEA を投与した結果、共に膵炎を改善できることが組織学的、ならびに、生化学的に確認できた。

【考察】本研究において、メタボロミクスにより膵炎に特異的な変動を示す低分子代謝物を同定できた。また、膵炎マウスの膵組織において有意に減少した Glu と PEA を補うことで膵炎を改善できたことから、メタボロミクスは膵炎治療薬の探索に有用であると考えた。

THE ROLE OF MED1 IN GATA1-MEDIATED ERYTHROID DIFFERENTIATION OF K562 ERYTHROLEUKEMIA CELLS

¹神戸大学大学院保健学科研究科病態解析学
神永千尋・水田駿平・南智也、織田華澄、藤田陽加、南佳織、伊藤光宏
*chiee624@e-broad.ne.jp

The multi-protein complex TRAP/Mediator, a subcomplex of RNA polymerase II holoenzyme, integrates a wide variety of intracellular signals. The MED1 subunit serves in the process of GATA1-mediated erythropoiesis as a GATA1-specific coactivator. In this study, we analyzed the mechanism of MED1 action in GATA1-mediated erythroid differentiation by use of K562 human erythroleukemic cells, because GATA1-mediated erythroid differentiation is efficiently induced with hemin in these cells. When MED1 in hemin-treated K562 cells was knocked down, erythroid differentiation was significantly delayed. Inversely, when the full-length MED1 was overexpressed in these cells, erythroid differentiation was enhanced. Unexpectedly, overexpressions of the N-terminal MED1 truncations, which were devoid of the GATA1-binding ability, also enhanced erythroid differentiation of K562 cells. Further, these N-terminal MED1 truncations rescued GATA1-mediated transactivation in *Medt*^{+/-} MEFs. Hence, a bypassed GATA1 signaling that escapes its interaction with MED1 appears to exist. Recently, CCAR1 was reported as a bypass molecule that simultaneously binds to nuclear receptors and the N-terminus of MED1. When CCAR1 was tested, luciferase reporter assays showed a cooperative transactivation in the γ -globin promoter by GATA1 and CCAR1, and GST-pulldown and mammalian two-hybrid assays showed direct interaction between CCAR1 and the C-terminal zinc finger domain of GATA1. Taken together, dual mechanisms in a GATA1-MED1 pathway appear to exist that induce GATA1-mediated erythroid differentiation of K562 cells.

転写メディエーターサブユニット MED1 の PPAR γ 結合能を廃絶したマウスで インスリン抵抗性が改善する

¹神戸大学大学院保健学科研究科病態解析学 ²ロックフェラー大学生化学・分子生物学
森本由紀¹・松井啓治¹・長谷川菜摘¹・石野瑠璃²・池内友紀子¹
窪田奈々¹・藤田あずさ¹・Robert G. Roeder¹・伊藤光宏^{1,2}
yuuuuuki@wing.ocn.ne.jp

転写メディエーター複合体を構成する約 25 個のサブユニットのうち、MED1/TRAP220 は唯一リガンド依存性に核内受容体のシグナルを統合し、細胞・個体の増殖・分化・恒常性維持を司る。私達はこれまでに MED1 が PPAR γ 2 を介した脂肪分化に必須であること、しかし培養系では MED1 と PPAR γ 2 との物理的結合が脂肪分化に必ずしも必須でないことを明らかにし、報告した。一方私達は、個体レベルについて細胞培養と同様のことが観察されるかを核内受容体結合能を廃絶した変異 MED1 をノックインした変異マウスを作製して検討したところ、核内受容体結合能廃絶 MED1 ノックインマウスが肥満に抵抗性を示すことが明らかになり、従って生体内では PPAR γ の最大限の機能発揮のために MED1 の核内受容体結合能は必要であることが示唆されることを報告した。本研究では引き続き、これらのノックインマウスの耐糖能やインスリン感受性を検討した。普通餌で飼育する限り、脂肪量の大きな変化を認めないが、高脂肪食負荷を 8 週間行ったマウスでは、野生型に比べてノックインマウスで白色脂肪の肥大化が抑制されていた。これらのマウスの糖代謝を検討した。ノックインマウスでは野生型に比べ定常時のインスリンレベルが有意に低かった。また、グルコース負荷試験を行ったところ、野生型に比べてノックインマウスの血糖はピーク値が低く、定常状態に早く戻り、2 時間後には負荷前よりもむしろ低値になった。グルコース負荷試験中の血中インスリンレベルはノックインマウスで野生型よりいずれの時点でも有意に低かった。次にインスリン負荷試験を行ったところ、ノックインマウスでは野生型に比べ有意に強い血糖の低下を示した。以上の結果より、MED1 の核内受容体結合能はインスリン感受性に関与することが明らかになり、肥満において MED1 の受容体結合能をブロックすることによりインスリン抵抗性や耐糖能異常が改善する可能性が示唆された。

転写メディエーターサブユニット MED1 は TSH β プロモーターでリガンド依存症および非依存症性のコアクチベーターとして機能する

神戸大学大学院保健学科研究科病態解析学
織田華澄・松井啓治・水田駿平・伊藤光宏
pnfmw931@yahoo.co.jp

転写Mediator複合体は約30個のサブユニットからなるタンパク複合体で、細胞内シグナルを最終的に総合し、RNAポリメラーゼIIに直接伝達する基本的な転写共役体である。そのサブユニットであるMED1/TRAP220は甲状腺ホルモン受容体にリガンド依存性に結合する蛋白として同定され、後に他の核内受容体やGATAファミリーなどのアクチベーターと結合し、その特異的コアクチベーターとして転写を活性化することが明らかになった。

下垂体前葉ではよく知られているホルモンの負のフィードバック機構があるが、その詳細な分子機序は十分知られていない。甲状腺刺激ホルモンの β サブユニット(TSH β)の遺伝子プロモーターには甲状腺ホルモン受容体結合部位TREがあるが、そこでは他のプロモーターにおけるTREと反対に、p160やCBP/p300のようなコアクチベーターはコレプレッサーとして作用し、NCoRのようなコレプレッサーがコアクチベーターとして作用することが知られている。本研究で私たちは、甲状腺ホルモン受容体コアクチベーターとしてのMED1がTSH β プロモーターでどのように挙動するのかを明らかにするため、MED1変異マウスの下垂体前葉の表現型を検討した。

我々はこれまでに、MED1のヘテロノックアウトマウスで下垂体前葉でのTSH β の発現の低下に起因する血清中の遊離T3、遊離T4の濃度の低下と発育遅延がみられることを報告した。従ってMED1はTSH β でコアクチベーターとして機能することが明らかになった。TSH β プロモーターにはGATA2とPit-1がアクチベーターとして作用することが知られ、MED1のリガンド非依存性の機序が予想されたが、最近他研究者により、MED1はGATA2やPit-1と結合することによって量依存性にTES β の転写を活性化させることが報告され、この予想が証明された。一方、最近私たちは核内受容体結合能を廃絶した変異MED1ノックインマウスを作製し血清遊離T3、遊離T4の濃度を調べたところ、ヘテロ変異ノックインマウスの甲状腺ホルモンには異常が見られなかったが、ホモ変異ノックインマウスでは血清遊離T4のみ有意な低下が見られた。また、下垂体前葉のホルモン産生レベルをノーザンブロットで検討したところ、ホモ変異ノックインマウスのTDH β のみに有意な発現低下を認められた。これらより、ホモ変異ノックインマウスにサブクリニカルな下垂体性甲状腺機能低下が示唆され、TSH β プロモーターでMED1による核内受容体結合能依存性の転写活性化の機序の存在が考えられた。そこで、MED1はTSH β プロモーターのnTREにおいてもホルモン依存性のコアクチベーターとして転写活性化を担うことが強く示唆された。

MEDIATOR のサブユニット MED1 と MED24 はエストロゲン受容体機能と 乳腺の発達に協調的に寄与する

神戸大学大学院保健学科研究科病態解析学

藤田あずさ・有留奈見・長谷川菜摘・松井啓治・住友明子・石野瑠璃・水田駿平・伊藤光宏
atafutachan@yahoo.co.jp

転写 Mediator のサブユニット MED1 はエストロゲン受容体をはじめとした核内受容体特異的コアクチベーターとして重要であって、乳腺特異的ノックアウトマウスの解析により MED1 が乳腺の発達や授乳機能に必要不可欠であることが報告されている。最近私達は MED1 の核内受容体結合能を破壊した変異 MED1 ノックインマウスを作製し、MED1 の核内受容体結合能が MED1 を高発現する乳腺腺管細胞の増殖・分化を司ることにより、正常な乳腺発育に特異的に必要であることを見出した。一方、Mediator の別のサブユニット MED24 は MED16 や MED23 とともにサブモジュールを形成し、よりジェネラルな転写を司る。今回私達は、MED1 と MED24 のダブルノックアウトを用いて、これらのサブユニットの乳腺発育における役割を検討した。いずれのサブユニットノックアウトもホモ変異体は胎児致死性であるが、いずれのシングルヘテロノックアウトマウス乳腺も発達と機能に異常を認めなかった。一方、MED1/MED24 ダブルヘテロノックアウトマウスで、乳腺の発育の顕著な遅延を認めた。しかし、ダブルヘテロノックアウトマウス乳腺は妊娠・授乳時には正常に発達・機能した。BrdU を投与後に BrdU の取込みを免疫染色で検討したところ、ダブルヘテロノックアウトマウス乳腺で腺管細胞と筋上皮細胞のいずれでも DNA 合成が減弱していた。乳腺上皮細胞を初代培養して細胞培養系で検討したところ、ダブルヘテロノックアウト乳腺細胞でエストロゲン受容体の標的遺伝子の発現やエストロゲン依存性の細胞増殖が減弱していた。胎児線維芽細胞を用いてルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったところ、ダブルヘテロノックアウト細胞でエストロゲン受容体機能の選択的な機能不全が見られた。これらの結果より、エストロゲン受容体機能や乳腺の発達において、Mediator サブユニットの MED1 と MED24 の間に機能的なコミュニケーションが存在することが考えられる。

メタボロミクスによるリン酸代謝関連遺伝子欠損酵母の発酵特性の解析

¹神戸大学大学院工学研究科 ²神戸大学バイオシグナル研究センター
藤富桂介¹・蓮沼誠久²・近藤昭彦¹
110t461t@stu.kobe-u.ac.jp

【背景・目的】 リグノセルロースからのバイオエタノール生産では、ヘミセルロースの主要構成成分であるキシロースを効率的にエタノールへ変換する微生物の創製が重要である。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はエタノール生合成能力が高いため、発酵プロセスに用いる微生物として最も有力であるが、キシロース資化能力を持たないため外来のキシロースレダクターゼ (XR)、キシリトールデヒドロゲナーゼ (XDH) およびキシロキナーゼ (XK) を機能発現させる必要があった。しかしながら、XR、XDH および XK 遺伝子を過剰発現させても中間生成物であるキシリトールの蓄積が生じる点、グルコースと比べてキシロースの消費速度が遅い点が問題であった。これまでの研究で、機能未知のアルカリフォスファターゼ (PH013) 遺伝子を欠損させた XR/XDH/XK 過剰株が高いキシロース資化能力を示すことが示唆されてきた。そこで本研究では、リン酸代謝に関与する種々のタンパク質を欠損させた XR/XDH/XK 過剰発現株シリーズを構築し、PHO 関連遺伝子欠損がキシロース発酵に及ぼす影響を調べることにした。

【手法】 微好気条件下におけるキシロース発酵中の培養液を経時的にサンプリングし、菌体内代謝物を LC/MS-MS、GC/TOF-MS および CE/TOF-MS に供した。また HPLC 分析により得られたキシロース消費速度および生成物生産速度に基づき、ゲノムスケールの代謝フラックス解析を行った。

【結果および考察】 PH080 遺伝子を欠損させることにより、キシリトール蓄積の解消およびエタノール生産性の向上がみられた。この株のメタボローム解析では、コントロール株と比較してペントースリン酸回路 (PPP) に位置する中間代謝物の蓄積量に変化が確認された。MFA の結果からは非酸化的 PPP フラックスが PH080 遺伝子欠損株で増加していることが明らかとなった。

質量分析総合センターにおける タンパク質同定受託解析・低分子代謝物解析（メタボロミクス）

神戸大学医学研究科質量分析総合センター
山川知恵子・入野康宏・波多野直哉・吉田優・西村紀・竹縄忠臣
yamachie@med.kobe-u.ac.jp

医学研究科質量分析総合センターでは、平成 22 年度より技術補佐員を配置し、タンパク質同定に関しては受託解析、低分子代謝物解析（メタボロミクス）に関しては共同研究の補助を担当している。本ポスター発表では技術補佐員が担当している作業のワークフローに関してご紹介したい。

タンパク質同定は現在、LC-MS/MS 解析（島津 LCMS-IT-TOF）を行っており、クマシー（CBB）染色バンドのみならず銀染色バンドも解析の対象となりうる。タンパク質含有ゲル片の脱色・還元アルキル化・酵素消化・消化ペプチドの抽出・LC-MS/MS による解析という一連の流れをご紹介する。

低分子代謝物解析に関しては、分析対象をアミノ酸のみ、脂肪酸のみ、アミノ酸＋有機酸と限定すればほぼ一定の実験プロトコールにて解析が可能である。しかしメタボロミクスにおいては、様々な化学的性質を持ち、様々な濃度で存在する代謝物総体が解析対象であり、1つの実験系のみで得られる情報量は決して多くはない。今後測定対象に応じた、また実験サンプルに応じた前処理系を構築する必要がある。

受託解析のご依頼・共同研究のご相談は 質量分析総合センター（内線 5355）もしくは myoshida@med.kobe-u.ac.jp までご連絡ください。

メタボローム解析手法、及び統計解析を用いた発酵阻害物質阻害作用機序の特定

¹神戸大学大学院工学研究科 ²神戸大学バイオシグナル研究センター
吉村一也¹・蓮沼誠久²・近藤昭彦¹
yoshimura@people.kobe-u.ac.jp

【背景・目的】 発酵前処理工程で生成するリグノセルロースの過分解物質はグルコースやキシロースからのエタノール生産や微生物の生育を阻害することが知られている。主な阻害物質は酢酸、ギ酸、フルフラール、5-HMFなどである。この阻害物質存在下で発酵能力を向上させるため、代謝改変による戦略的育種方法を用いて、現在までに個々の阻害物質に対する耐性株が作製されてきた。その結果、阻害物質存在下でもエタノール生産量は向上したが、細胞内における阻害物質作用機序はいまだ不明のままである。また、実際のバイオマスを用いた発酵の場合、発酵阻害の原因因子が特定できない場合には、最適な酵母育種戦略を策定するのが非常に困難である。そこで本研究では阻害物質存在下で発酵する酵母菌体内の代謝産物をメタボローム解析に供し、主成分分析などによる統計解析手法を用いて処理し、代謝プロファイルから阻害物質作用機序の傾向と相関を推定するための指針作りを目的としている。

【実験手法】 各阻害物質存在下でキシロースを単一炭素源として発酵を行い、発酵中の酵母菌体からコールドメタノールクエンチング法、及びボイリングエタノール法により、総代謝物質の抽出を行った。得られた代謝物抽出液を GE-TOF-MS, GC-TOF-MS により解析し、サンプルごとに約 100 種類の代謝物の定量を行った。その後、代謝物データを用いて統計処理用ソフト pirouette による主成分分析を行った。実バイオマスを用いた発酵においても同様の実験で総代謝物のデータを得た。

【結果】 阻害物質ごとに発酵中の代謝物質の変動に隔たりがあることが主成分分析により明らかになった。特に factor2 に関してギ酸の実験区がフルフラール及び、酢酸の実験区と比べて大きく異なるクラスターを形成していることから、異なる阻害作用機序であることがうかがえる。今後は実バイオマスの総代謝物データを導入し、多数考えられる阻害要因のうち最もクリティカルな要因を策定していく。

ポスター演題 (※自由討論形式 奇数番号・18:00~18:30, 偶数番号・18:30~19:00)

NO.	TITLE	NAME
P-1	膠原病における組織傷害の誘導に重要な抗原のクロスプレゼンテーションの経路の検討	積山 賢 保健学研究科 病態解析学
P-2	CD45RB ^{lo} 122 ^{lo} を呈する自己抗体産生誘導性 CD4 ⁺ T細胞が膠原病発症のキイとなる	宮崎 由実 保健学研究科 病態解析学
P-3	混合性結合組織病 (MCTD) 患者を特徴づける抗U1RNP自己抗体は TNF- α , IL-6と協調的に血管新生因子 Angiopoietin-1 (<i>Ang-1</i>) のスプライシングを変化させ病態形成に関与する	奥山 樹 保健学研究科 病態解析学
P-4	自己抗体産生誘導性CD4 ⁺ T細胞は末梢でのTCR遺伝子再構成により生成する	生戸 健一 保健学研究科 病態解析学
P-5	誘導性 Cre/loxP システムを用いた膵・細胞の運命追跡	田村 香楠子 医学研究科 細胞分子医学
P-6	cAMP不応性の膵 β 細胞から構成された偽膵島におけるcAMP応答性の誘導	艾尼吾甫尔江 医学研究科 糖尿病・内分泌内科学
P-7	Aspp1 regulates SMC coverage and lymphatic vascular remodeling	池田 大樹 医学研究科 血管生物学
P-8	Glucagon-like peptide 1(GLP-1)分泌における Noc2 の役割	岸本 亜野 医学研究科 細胞分子医学
P-9	Neonatal Fc receptor for IgG (FcRn) expressed in the gastric epithelium regulates bacterial infection in mice	Yahaya BenSuleiman 医学研究科 消化器内科学
P-10	Claudin-2 は MLCK 依存的経路を介して大腸の炎症を制御する	西田 真之 医学研究科 消化器内科学
P-11	乳酸菌由来タンナーゼの多様性に関する研究	上田 宗平 農学研究科 応用動物学講座
P-12	血清メタボロミクスによる消化管がん診断法の有用性の検討	池田 篤紀 医学研究科 消化器内科学
P-13	ジアシルグリセロールキナーゼ β (DGK β)による神経特異的突起伸長機構の解明	中井 寛子 農学研究科 動物資源利用化学
P-14	膵 β 細胞特異的C/EBP β トランスジェニックマウスを用いた膵 β 細胞不全に対するDPP-4阻害剤ビルダグリプテンの効果の検討	清水 忍 保健学研究科 病態解析学
P-15	包括的メタボローム解析による2型糖尿病バイオマーカーの探索	吉田 衣里 医学研究科 細胞分子医学
P-16	2型糖尿病関連遺伝子Kcnq1領域が膵 β 細胞に及ぼす影響の検討	江藤 博昭 保健学研究科 病態解析学
P-17	低出生体重モデルマウスにおける膵 β 細胞量調節機構の検討	淵田 愛 保健学研究科 病態解析学
P-18	膵炎モデルマウスを用いたメタボロミクスによる膵炎治療薬の探索	坂井 文 医学研究科 消化器内科学
P-19	THE ROLE OF MED1 IN GATA1-MEDIATED ERYTHROID DIFFERENTIATION OF K562 ERYTHROLEUKEMIA CELLS	神永 千尋 保健学研究科 病態解析学
P-20	転写メディエーターサブユニット MED1 の PPAR γ 結合能を廃絶したマウスでインスリン抵抗性が改善する	森本 由紀 保健学研究科 病態解析学

ポスター演題（続き）（※自由討論形式 奇数番号・18:00～18:30, 偶数番号・18:30～19:00）

NO.	TITLE	NAME
P-21	転写メディエーターサブユニット MED1 は TSH β プロモーターでリガンド依存症および非依存症性のコアクチベーターとして機能する	織田 華澄 保健学科研究科 病態解析学
P-22	MEDIATORのサブユニット MED1 と MED24 はエストロゲン受容体機能と乳腺の発達に協調的に寄与する	藤田 あずさ 保健学科研究科 病態解析学
P-23	メタボロミクスによるリン酸代謝関連遺伝子欠損酵母の発酵特性の解析	藤富 桂介 工学研究科
P-24	質量分析総合センターにおけるタンパク質同定受託解析・低分子代謝物解析(メタボロミクス)	山川 知恵子 医学研究科 質量分析総合センター
P-25	メタボローム解析手法、及び統計解析を用いた発酵阻害物質阻害作用機序の特定	吉村 一也 工学研究科