

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670574

研究課題名(和文) 分子進化の概念に基づく新規遺伝子の探索と機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of novel genes based on molecular evolution

研究代表者

横山 幸浩 (Yokoyama, Yukihiro)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80378091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：チロシン、グルタミン、ロイシン、メチオニン、トリプトファン、アスパラギン、アスパラギン酸、アラニン、アルギニン、イソロイシン、グリシン、グルタミン酸、システイン、セリン、ヒスチジン、プロリン、リジン、バリン、トレオニン、フェニルアラニンなど各種アミノ酸の付加によりRaw細胞へのLPS投与後のエンドセリン1の発現が異なっていた。システイン40mMでLPSによるエンドセリン1の発現を完全に抑制し、iNOS発現を90%抑制することを明らかにした。アミノ酸の種類により細胞内のカルシウム濃度に著明な変動を認め、アミノ酸は細胞内外のカルシウムの動向と関連している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Various amino acids, such as tyrosine, leucine, methionine, tryptophan, asparagine, aspartic acid, alanine, arginine, isoleucine, glycine, glutamine, cysteine, serine, histidine, proline, lysine, valine, threonine and phenylalanine, induce altered expression of endothelin 1 in RAW cells after LPS administration. Cysteine (40 mM) suppressed endothelin 1 expression and the induction of iNOS in RAW cells. Administration of several amino acids induced significant alterations in intracellular calcium concentrations. These results suggest that amino acids are related to calcium concentrations both inside and outside the cell.

研究分野：外科学

キーワード：分子進化

1. 研究開始当初の背景

細胞において細胞外環境の認識は極めて重要である。細胞外からのシグナルが細胞機能に大きく影響を与えており、細胞は細胞外環境の変化に応じて細胞外環境に依存性、適応性を有する細胞になることが報告されている(Christina Set al, Cell, 2011)。われわれは、肝再生時のラット肝臓の網羅的遺伝子解析により CGRP(カルシトニン関連遺伝子ペプチド)遺伝子の発現が正常の約 20 倍亢進していることを報告している(Yokoyama S, Yokoyama Y et al, Biochem Biophys Res Commun, 2006)。生物の進化は、時間経過と共に生物集団の遺伝的構成が自然選択により変化する現象と定義されている。

生物進化においては、分子自体の遺伝子変異による経時的変化(分子進化)が明らかになっている。木村資生が提唱した「分子進化の中立説」では、分子進化である遺伝子変異は自然淘汰に対して有利でも不利でもなく中立であり、進化はその後に生じる遺伝子浮動が原因とするものである。例えば、環境の変化により生存できた生物群と生存できなかった生物群が存在した場合、生存できた生物群はその環境が変化した時に都合よく、必要な遺伝子に突然変異が起き適応したのではなく、もともと変異遺伝子を持っていた生物群であったと考えることができる。また発現していた遺伝子が環境の変化により機能しなくなった場合、機能しなくなっても遺伝子自体はそのまま残っていると考えられる。

「分子進化の中立説」の概念より、原始地球の環境条件下での細胞培養により、以前は発現していたが現在は発現していない未知の新規遺伝子の同定および機能解析が可能と考え、本研究の着想に至った。また大きな環境の変化がなければ、不必要な変異遺伝子は発現せず、そのまま蓄積されつづけており、細胞外環境の設定により、まだ発現されていない未知の新規遺伝子の同定および機能解

析も可能と考えられる。

2. 研究の目的

生物進化においては、分子自体の遺伝子変異による経時的変化(分子進化)が明らかになっている。本研究では原始地球の環境条件下での細胞培養を行うことにより、原始地球の環境では発現していたが、現在は発現していない未知の新規遺伝子や突然変異が生じているが大きな環境の変化がなかったため発現せず、そのまま蓄積されつづけている未知の新規遺伝子の同定を行う。同定した未知の新規遺伝子の機能解析により、これまでとは全く異なる新たなメカニズムの発見が可能と考え、本研究の着想に至った。本研究の目的は、新たなメカニズムの解明による新たな研究展開、現在行われている研究の発展に貢献することである。

3. 研究の方法

【異なるpHによる細胞培養】

生命誕生頃の原始地球の海水は大気中に存在していた塩酸を溶解していたために、pH3~4と考えられる。35億年頃前でも海水中の主成分であるナトリウム、カリウム、塩素などの濃度は現在と同じだが、マグネシウムや重炭酸の濃度は高く、pH6程度と考えられている。pHを3.0、4.0、6.0、8.0に変化させた培養液での膵癌細胞株の培養を行なった。Trypan blue法を用いて細胞死誘導能について検討した。

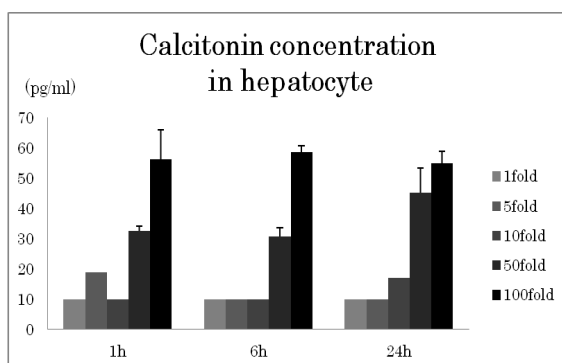
低pH下での培養時間を変更してTrypan blue法を用いて細胞死誘導能について検討し、低pHで生き残った細胞での細胞形態について検討した。pHを3.0、4.0、6.0、8.0に変化させた培養液での膵癌細胞株を培養しMTT assay法を用いて増殖能について検討した。

【カルシウム濃度による細胞培養】

科学研究費(基盤研究C:2008~2010)「肝再生早期におけるカルシトニンの役割をその

分子機構」(代表：横山幸浩)の研究過程において、カルシウム濃度を100倍まで大きく変化させた場合に、ラット肝細胞の初代培養株においてCGRP(カルシトニン関連遺伝子ペプチド)の発現が誘導されることを発見した(図1)。胆管癌細胞株HuCCCT1および膵癌細胞株KLM1の培養において培養液のカルシウム濃度を100倍まで大きく変化させ、リアルタイムPCRにてCGRPの発現を検討した。

図1



【アミノ酸濃度による細胞培養】

原始地球での生命誕生にはアミノ酸が大きく関与したと考えられており、アミノ酸の濃度も高かったと考えられる。チロシン、グルタミン、ロイシン、メチオニン、トリプトファン、アスパラギン、アスパラギン酸、アラニン、アルギニン、イソロイシン、グリシン、グルタミン酸、システイン、セリン、ヒスチジン、プロリン、リジン、バリン、トレオニン、フェニルアラニンのアミノ酸をそれぞれ培養液に加えて培養を行った。

Raw細胞 2×10^5 個に各アミノ酸を10、20、40mMで投与を行い、30分後にLPSを10ng/ml加えて4時間培養を行った。それぞれのRaw細胞におけるviabilityをトリパンブルー色素排出法で、エンドセリン1の発現をrealtime PCR法にて検討した。

Raw細胞にロイシン、アラニン、グリシン、システインを10、20、40mMで投与を行い、iNOSに関してrealtime PCR法にて検討した。シ

ステイン投与によるエンドセリン1、iNOSの発現制御に関するメカニズムとして、システイン代謝に関連しているタウリンの検討を行った。

【アミノ酸による細胞内カルシウム濃度の検討】

これまでの検討で、アミノ酸は細胞内外のカルシウムの動向と関連している可能性があり、培養液中のカルシウム濃度および細胞内のカルシウム濃度について検討した。

4. 研究成果

【異なるpHによる細胞培養】

生命誕生頃の原始地球の海水のpHとして考えられるpH3~4ではほとんどの細胞は24時間以上の生存はできなかった。低pH下での培養時間を変更した場合、低pHでも生き残る細胞の数は増加したが、低pHほど細胞形態に異常を認めた。膵癌細胞株では低pHになるほど増殖能は抑制されていた。

35億年頃前でも海水中のpHとして考えられるpH6程度での培養においても同様に増殖能は抑制されていた。またTrypan blue法の検討で低pHになるほど細胞死が誘導されていた。

【カルシウム濃度による細胞培養】

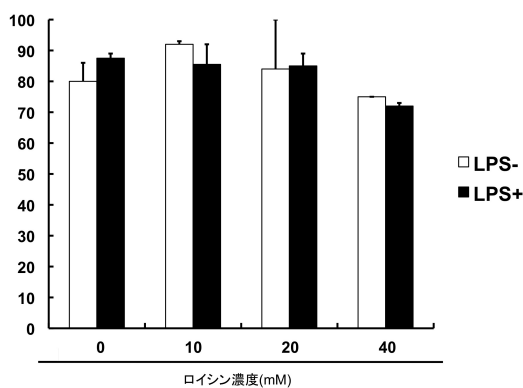
胆管癌細胞株HuCCCT1および膵癌細胞株KLM1において高カルシウム濃度での培養の結果、CGRP(カルシトニン関連遺伝子ペプチド)の発現亢進を認めた。

【アミノ酸濃度による細胞培養】

チロシン、グルタミン、ロイシン、メチオニン、トリプトファン、アスパラギン、アスパラギン酸、アラニン、アルギニン、イソロイシン、グリシン、グルタミン酸、システイン、セリン、ヒスチジン、プロリン、リジン、バリン、トレオニン、フェニルアラニンなど付加されるアミノ酸によりviabilityが異なっていた。ロイシンに関しては40mMにおいてviabilityは80%であり、ロイシンの投与は

viabilityに影響を与えなかった。またLPS10ng/mlの投与により、LPS投与群はLPS非投与群と比較して軽度のviabilityの低下を認めるが、viabilityに有意差を認めなかった(図1)。

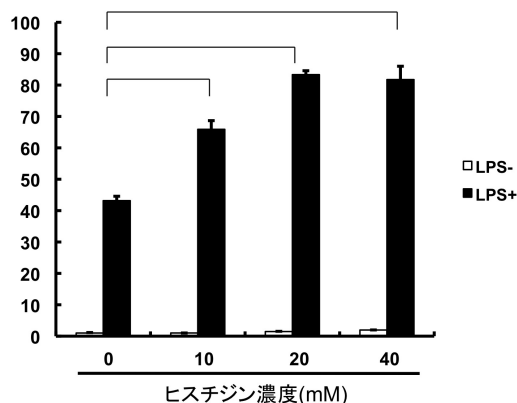
図1



チロシンに関しては10mMにおいて100%の細胞死が誘導された。

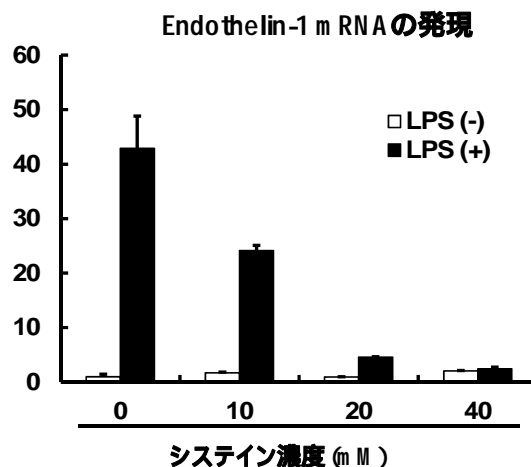
アミノ酸の種類によって濃度依存的に誘導されるエンドセリン1の発現が異なっており、ヒスチジンではエンドセリン1の発現が亢進していた(図2)。

図2



システイン、ロイシンなどでは濃度依存的にエンドセリン1の発現が減弱していた。特にシステインに関しては40mMにより、LPSによるエンドセリン1の発現を完全に抑制していた(図3)。

図3



プロリンやセリンではLPS投与により非投与と比較して、エンドセリン1の発現は亢進していたが、濃度依存的な差は認めなかった。ロイシン、システインでは濃度依存的にiNOSの発現が減弱しており、システインでは40mMで90% iNOSの発現が抑制された。

システイン投与によるタウリンの検討を行ったが、タウリンの発現に有意差は認めなかった。

【アミノ酸による細胞内カルシウム濃度の検討】

アミノ酸の種類による細胞内のカルシウム濃度に著明な変動を認め、アミノ酸は細胞内外のカルシウムの動向と関連している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

横山 幸浩 (YOKOYAMA, YUKIHIRO)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80378091

(2)研究分担者

棚野 正人 (NAGINO, MASATO)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号 : 20237564

國料 俊男 (KOKURYO, TOSHIO)

名古屋大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号 : 60378023