

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20390058

研究課題名（和文）2型糖尿病発症リスクの分子メカニズムに関する研究

研究課題名（英文）Molecular mechanism on the development of type 2 diabetes

研究代表者

富澤 一仁 (TOMIZAWA KAZUHITO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：40274287

研究成果の概要（和文）：2型糖尿病と最も相関のある一塩基多型が認められた遺伝子の一つとして *Cdkal1* が同定されたが、その生理機能が全く不明の分子である。本研究では、*Cdkal1* の生理機能を明らかにし、また2型糖尿病発症分子機構を明らかにした。*Cdkal1* は、リジンに対応する tRNA の37番目アデニンをチオメチル化する酵素であることを突き止めた。*Cdkal1* の膵β細胞特異的欠損マウスでは、耐糖能ならびにブドウ糖応答性インスリン分泌がコントロールマウスと比較し低下していた。また、同マウスでは成熟インスリン量が低下していた。さらに同遺伝子欠損マウスに高脂肪食負荷を与えると、小胞体ストレスが上昇し、耐糖能のさらなる悪化、インスリン分泌低下が認められ、2型糖尿病を呈するようになった。本研究により、2型糖尿病の発症に tRNA 修飾異常が関与していることが明らかになり、tRNA 修飾酵素などを標的とした新たな糖尿病治療薬の開発が期待できることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：*Cdkal1* has been associated with an impaired insulin response and increased risk of type 2 diabetes (T2D), but its molecular function has not been characterized. Here, we show that *Cdkal1* is a mammalian methylthiotransferase that biosynthesizes 2-methylthio-*N*⁶-threonylcarbamoyladenosine (*ms*²*t*⁶A) in tRNA^{Lys}(UUU) and that it is required for the accurate translation of AAA and AAG codons. Pancreatic β -cell-specific *Cdkal1* knockout mice showed pancreatic islet hypertrophy, a decrease in insulin secretion and impaired blood glucose control. In *Cdkal1*-deficient β -cells, glucose-stimulated proinsulin synthesis was reduced. Moreover, the expression of endoplasmic reticulum (ER) stress-related genes was upregulated in these cells, and abnormally structured ER was observed. *Cdkal1* knockout mice were hypersensitive to high-fat diet-induced ER stress. These findings suggest that the induced translation of proinsulin may require fully modified tRNA^{Lys}(UUU), potentially explaining the molecular pathogenesis of T2D in patients carrying *cdka11* risk alleles.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：糖尿病、tRNA、化学修飾、インスリン、遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

2007年以降、多くの施設から2型糖尿病患者に関する大規模な遺伝子多型解析に基づく疫学研究の成果が報告されている。これらの研究で、2型糖尿病患者において最も有意に一塩基多型 (SNPs) が認められた遺伝子の一つとして Cdk5-associated protein 1-like 1 (Cdkal1) が同定された。Cdkal1 の第5イントロンに SNPs があると、インスリン分泌が減少することが臨床研究により明らかになった。Cdkal1 は、これまで機能解析などの研究が全くなされておらず、その生理機能は不明である。唯一の手がかりとして、CDK5RAP1 と相同性が高いことが知られている。CDK5RAP1 は、Cdk5 の活性化因子である p35 に結合する蛋白質として 2000 年に同定された蛋白質であり、In vitro において Cdk5 の活性を阻害する作用がある。以上のように、Cdk5 がインスリン分泌を制御していることを我々が 2005 年に最初に報告して以降、Cdk5 と 2 型糖尿病発症との関連性が急速にクローズアップされている。Cdkal1 の生理機能ならびに同遺伝子の一塩基多型がなぜ 2 型糖尿病発症の危険因子であるか明らかにすることは、糖尿病の病態を理解し、治療、予防のために重要である。

2. 研究の目的

本研究では、「Cdkal1 の生理機能の解明」と「Cdkal1 に SNPs があるとなぜ 2 型糖尿病発症リスクが高くなるか」を明らかにすることを目的とした研究を実施した。具体的には、Cdkal1 の生理機能を明らかにした。さらに、Cdkal1 の SNPs は、第 5 イントロンに集中しており、また同イントロン部位には siRNA のヘアピン配列は認められないことから、2 型糖尿病患者にみられる Cdkal1 SNPs は、Cdkal1 の発現あるいはスプライシング制御に異常を引き起こすのではないかと推測した。そこで本研究では、Cdkal1 遺伝子の膵β

細胞特異的のノックアウトマウスを作製し、同マウスの表現型を解析することにより、Cdkal1 SNPs 保有者の 2 型糖尿病発症の分子機構を明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

(1) 膵β細胞特異的 Cdkal1 欠損マウスの作製

Cdkal1 遺伝子は、23 のエクソンから成り、開始コドンはエクソン 4 に存在する。エクソン 5 は、4 つの ATG を含むため、Exon4 を欠失させるとエクソン 5 の ATG から翻訳される可能性があったため、アミノ基末側オリジナル蛋白質の配列が多少翻訳されても、確実にフレームシフトを起こさせるために Exon5 を欠失させるようなターゲティングベクターの構築を行った (図 1)。

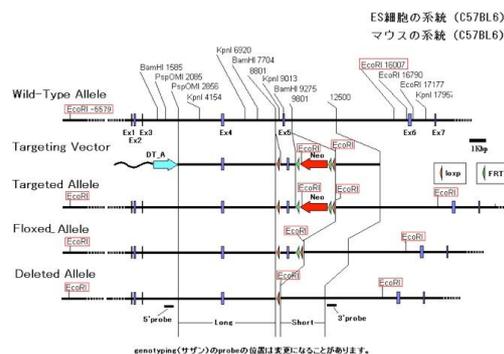


図1 膵β細胞特異的Cdkal1マウス作製用ベクター設計図

同ベクターをマウス ES 細胞に導入し、相同組換え ES 細胞から loxP 発現トランスジェニックマウスを作製した。同マウスとインスリンプロモーター下に Cre リコンビナーゼ遺伝子を有するトランスジェニックマウスを交配することにより、KO マウスを作製した。同マウスにおける Cdkal1 遺伝子の欠損を、サザンブロットおよび RT-PCR 法にて確認した。

(2) tRNA の化学修飾同定

ノックアウトならびに野生型マウスより膵島ならびに肝臓を単離し、その後全 RNA を抽出した。抽出した RNA をスクレアーゼ P1 で一個のヌクレオチドまで消化した後、質量分析機器を用いて tRNA の修飾を分析した。

(3) 耐糖能試験

生後 5, 10 ならびに 15 週齢のノックアウトおよび野生型マウスを 7 時間絶食させた。その後、1g/kg のブドウ糖を腹腔内に投与し、投与後 15、30 分、1、2 時間の血糖値を尾静脈血から測定した。

(4) ぶどう糖応答性インスリン分泌試験

7 時間絶食後、マウスに 1g/kg のブドウ糖を腹腔内に投与した。投与 15 分および 30 分後に尾静脈より採血し、血清インスリン量について ELISA 法にて測定した。

(5) 蛋白合成量およびインスリン合成量の測定

膵島を単離後、³⁵S で標識したメチオニンおよびシステインを含む HEPES バッファー内で低グルコース (2.8 mM) ならびに高グルコース (16.7 mM) で 1 時間刺激した。刺激後に TCA で総蛋白質を沈降させ、総蛋白質量を Bradford 法にて測定した。また新規合成蛋白質量について ³⁵S をシンチレーションカウンターにて測定し求めた。同様に各マウスから単離した膵島を ³⁵S で標識したメチオニンおよびシステインを含む HEPES バッファー内でグルコース刺激後、プロインスリンを特異抗体で免疫沈降した。その後、新規合成プロインスリン量について ³⁵S をシンチレーションカウンターにて測定することにより求めた。

(6) マウスへの高脂肪食負荷試験

8 週齢のノックアウトマウスならびに野生型マウスに総カロリーの 45% が脂肪成分からなる高脂肪食を 7-9 週間自由摂食させた。その後、耐糖能試験、ぶどう糖応答インスリン分泌試験を行った。コントロールとして、相カロリーの 10% が脂肪成分から成る低脂肪食を常食させた。

4. 研究成果

(1) Cdkal1 機能の同定

Cdkal1 の機能を同定するために、まずそのアミノ酸配列と相同性が高い蛋白質についてバイオインフォマティクス手法にて探索した。その結果、枯草菌が発現している MiaB ならびに YqeV と相同性が高いことが判明した。いずれの分子もラジカル反応を起こす酵素活性があるラジカル SAM ドメインならびに tRNA と結合能力がある TRAM ドメインを保持していた (図 2 A)。また、Cdkal1 は、そのカルボキシル末端に疎水性ドメインを有

していた (図 2 A)。枯草菌において MiaB ならびに YqeV は、tRNA の 37 番目のアデニンをチオメチル化する修飾酵素であることが知られている。しかし、基質となるアデニンの構造が異なり、MiaB の場合あらかじめイソペンテニル化したアデニンを修飾し、一方、YqeV はスレオニノカルボニル化したアデニンを基質として修飾する。そこで、Cdkal1 が、MiaB タイプの修飾酵素か、あるいは YqeV タイプの修飾酵素か枯草菌を用いて検討した。枯草菌の MiaB および YqeV 欠損株に、ヒト Cdkal1 遺伝子を形質転換した。その後 tRNA を精製し、質量分析法にてチオメチル化修飾の有無について解析した。MiaB 欠損株に Cdkal1 遺伝子を形質転換しても、tRNA のチオメチル化修飾は認められなかった。一方、YqeV 欠損株では、Cdkal1 遺伝子を形質転換することにより、tRNA にチオメチル化修飾が付加された (図 2 B)。以上の結果より、Cdkal1 はリジンに対応する tRNA の 37 番目のスレオニノカルボニル化アデニンをさらにチオメチル化する酵素であることが明らかになった¹⁾ (図 2 C)。

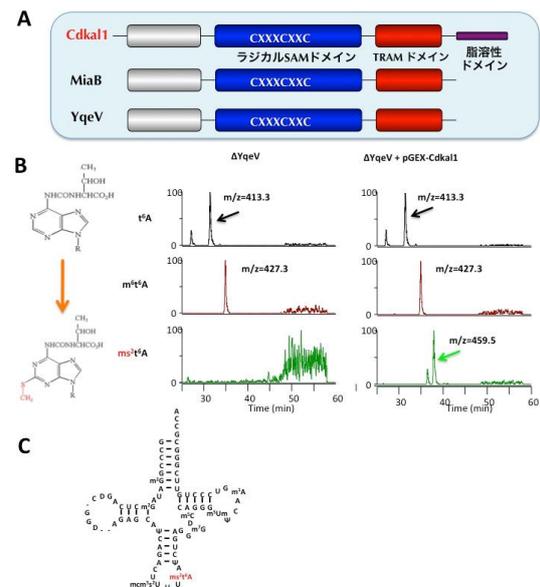


図2 A. Cdkal1, MiaBならびにYqeVの一次構造。B. YqeV欠損枯草菌株ならびにヒトCdkal1遺伝子を形質転換したYqeV欠損株におけるチオメチル化 (m^2) 修飾。Cdkal1遺伝子形質転換株では、 m^2 修飾のピークが認められる(緑矢印)。C. Cdkal1により37番目のアデニンがチオメチル化されたtRNAの一次構造。赤字:チオメチル化アデニン。

(2) 膵臓β細胞特異的 Cdkal1 欠損マウスの作製とその耐糖能

膵β細胞特異的 Cdkal1 ノックアウトマウス (KO) と野生型マウス (Floxed) の体重について比較検討した。両群に有意な差は認めなかった (図 3A)。

次に Cdkal1 の欠損が膵島の形成・発育に影響を及ぼしていないかを検討するために、KO マウスと Floxed マウスを灌流固定後、膵臓を摘出し薄片を作製した。同切片を、抗グ

ルカゴン抗体ならびに抗インスリン抗体で染色し、膵島の数、大きさならびに α 細胞と β 細胞数について比較検討した。両群で有意な差は認められなかった(図3B)。このことから、Cdkal1は膵臓の発育に影響を及ぼさないことが明らかになった。

次にKOマウスの耐糖能を調べるために、ブドウ糖負荷試験を行った。生後5(図3C)、10(図3D)ならびに15週齢(図3E)の耐糖能について比較検討した。すべての週齢において、糖負荷前の血糖値は両群で有意差は認められなかったが、ぶどう糖負荷後KOマウスの血糖値がFloxマウスより高かった(図3C-E)。

さらにはぶどう糖負荷後の血清インスリン濃度について両群で比較検討した。ぶどう糖負荷15分後において、KOマウスの血清インスリン濃度がFloxマウスより有意に少なかった(図3F)。

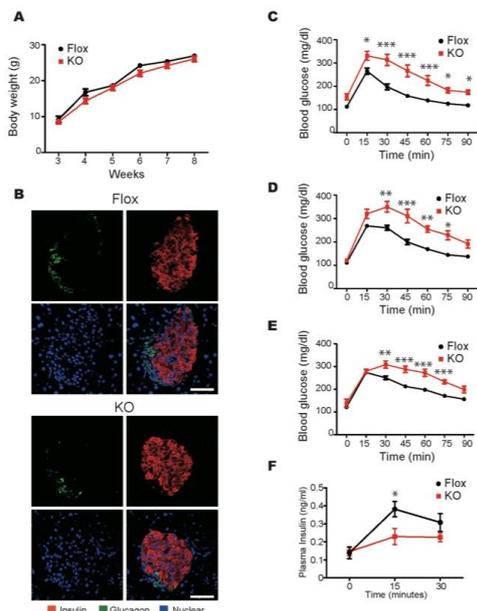


図3 A. KOとFloxマウスの各週齢における体重比較。B. 10週齢KOならびにFloxマウス膵臓の形態比較。抗インスリン抗体(赤)および抗グルカゴン抗体(緑)で2重染色後、DAPで核染色(青)を行った。バー:200 μ m。C-E. ぶどう糖負荷試験結果。C. 5週齢、D. 10週齢、E. 15週齢。各群n=6-8。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005。F. ぶどう糖負荷後の血清インスリン濃度。各群n=6。*P<0.05。

った(図3F)。

(3) Cdkal1欠損マウスにみられる小胞体ストレスと成熟インスリン量の低下

KOマウスにおけるインスリン遺伝子ならびに β 細胞マーカー遺伝子群の発現について検討した。KOマウスのインスリン遺伝子の発現量は、Floxマウスと同程度であった(図4A)。膵 β 細胞マーカー遺伝子(MafA, Pdx1, Kir6.2, SUR1, GCK, Glut1-3)の発現量では、Glut2 mRNAの発現のみKOマウスにおいてFloxマウスと比較して低かった(図4B)。

次にKOマウスの膵 β 細胞において小胞体ストレスが惹起されていないか調査するため、KOマウス膵島における小胞体ストレスマーカー遺伝子(Bip, Chop, Elf2, Xbp1, Gadd34)の発現について、Floxマウス群と比

較検討した。小胞体ストレスマーカー遺伝子群のなかで、Xbp1のスプライシングフォームの発現のみが、KOマウスにおいて上昇していた(図4C)。細胞に強い小胞体ストレスが負荷されると、小胞体の構造に変化が見られることが報告されている。そこで、KOおよびFloxマウス膵 β 細胞の小胞体構造について、電子顕微鏡を用いて観察した。Floxマウスの膵 β 細胞では、小胞体は細長い層構造を形成していた(図4D)。一方、KOマウスでは、膨張した小胞体が見られ、また層構造をとらない小胞体の散見された(図4D)。以上の結果より、Cdkal1欠損膵 β 細胞では、小胞体ストレスを受けていることが明らかになった。

Cdkal1はtRNA修飾酵素であるため、KOマウスでは蛋白合成に何らかの異常があることが推察された。そこで、KOマウス膵島における新規合成蛋白質量ならびにインスリン合成について、Floxマウス膵島と比較した。新規合成蛋白質量は、低グルコースおよび高グルコース刺激いずれにおいても、KOマウスとFloxマウスから単離した膵島で有意な差は認められなかった(図4E)。新規合成プロインスリン量は、低グルコース刺激時は両群で有意な差は認めなかったが(図4F)、高グルコース刺激時ではKOマウスから単離した膵島内の総蛋白質量に対するプロインスリン量が減少していた(図4G)。さらに膵島内のインスリンの最終プロセッシング産物である成熟インスリン量について、KOマウスとFloxマウスで比較検討した。KOマウス膵臓の成熟インスリン量は、Floxマウスと比較して低下していた(図4H)。以上の結果より、Cdkal1欠損膵 β 細胞では、インスリン合成が低下していることが示唆された。

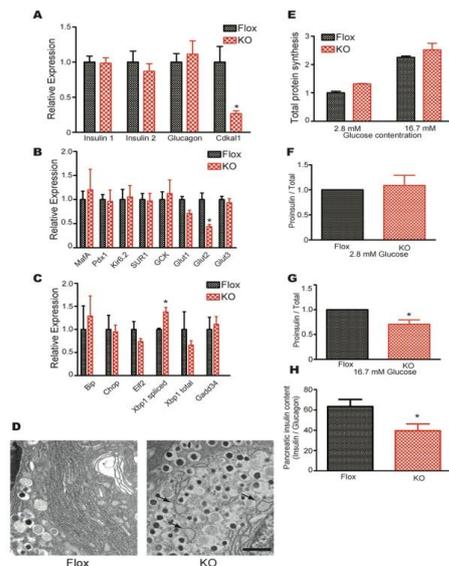


図4 KOとFloxマウス表現型比較。A. インスリン、グルカゴンおよびCdkal1遺伝子の発現。各群n=5。*P<0.001。B. 膵 β 細胞マーカー遺伝子の発現。各群n=5。*P<0.01。C. 膵島の小胞体ストレスマーカー遺伝子の発現。各群n=5-6。*P<0.05。D. 膵 β 細胞の小胞体形態。バー:2 μ m。E. 膵島の新規合成総蛋白質量の比較。各群n=4。F. 膵島の総蛋白質量に対するプロインスリン量の比較。各群n=4。G. の高グルコース刺激時の総蛋白質量に対するプロインスリン量の比較。各群n=4。P<0.05。H. 成熟インスリン量の比較。各群n=5。P<0.05。

(4) Cdkal1 欠損マウスに対する高脂肪食負荷の耐糖能に及ぼす影響

高脂肪食負荷が KO ならびに Flox マウス体重に及ぼす影響に差があるか検討した。8 週齢の KO ならびに Flox マウスに総カロリーの 45% が脂肪成分からなる高脂肪食を 9 週間自由摂食させ、1 週間毎体重を測定した。KO ならびに Flox マウスともそれぞれの低脂肪食摂食群と比較して体重が増加するが、両群において有意差は認めなかった (図 5A)。次に高脂肪食の KO マウスの耐糖能に及ぼす影響について検討した。KO ならびに Flox マウスに 3 週間もしくは 8 週間高脂肪食を自由摂食させ、その後ぶどう糖負荷試験を行った。3 週間高脂肪食を摂食していた KO マウスでは、高脂肪食を摂食していた Flox マウスより糖負荷後 15 分、30 分ならびに 1 時間の血糖値が有意に上昇した (図 5B)。さらに 8 週間高脂肪食を摂食させると、糖負荷後 90 分、120 分においても Flox マウスより血糖値が上昇した (図 5C)。以上の結果より、Cdkal1 欠損マウスに高脂肪食を負荷すると、耐糖能異常が憎悪することが示唆された。さらに KO ならびに Flox マウスに 3 週間もしくは 8 週間高脂肪食を負荷した後、空腹時血糖値について比較検討した。KO マウスに 3 週間 (図 5D) あるいは 8 週間 (図 4E) 高脂肪食負荷を与えると、Flox マウスと比較して有意に空腹時血糖値が上昇していた。Cdkal1 欠損マウスに高脂肪食を負荷すると、2 型糖尿病を呈することが明らかになった。

次に高脂肪食負荷が KO マウスのインスリン抵抗性に及ぼす影響について検討した。KO ならびに Flox マウスに 7 週間高脂肪食あるいは低脂肪食を自由摂食させ、その後インスリン抵抗試験を実施した。いずれの群もインスリン (1 U/kg) 投与後の血糖値に有意な差は認められなかった (図 5F)。すなわち、Cdkal1 はインスリン抵抗性に関与していないことが示唆された。さらに Cdkal1 欠損マウスについて高脂肪食負荷のぶどう糖応答性インスリン分泌に及ぼす影響について検討した。KO ならびに Flox マウスを 7 週間高脂肪食負荷後、7 時間絶食させた。その後、1g/kg ぶどう糖を腹腔内に投与し、投与 15 分、20 分後の血清インスリン濃度について ELISA 法にて調査した。KO マウスのぶどう糖負荷 15 分後の血清インスリン濃度が、Flox マウスと比較して少なかった (図 5G)。

最後に、KO マウスにおいて高脂肪食負荷が膵β細胞の小胞体ストレスに及ぼす影響について検討した。KO ならびに Flox マウスに高脂肪食を 8 週間自由摂食させた後、膵島を摘出し、小胞体ストレスマーカー遺伝子の発現について定量 RT-PCR 法にて比較検討した。その結果、KO マウスにおいてすべてのマーカー遺伝子の発現が Flox マウスと比較して、

有意に上昇していた (図 5H)。

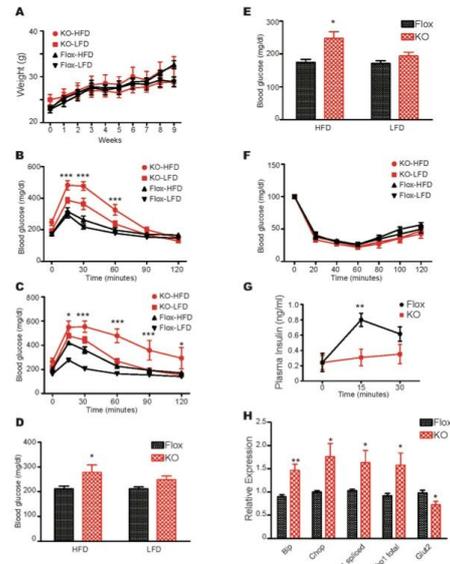


図5 高脂肪食のKOマウスに及ぼす影響。A. 体重に及ぼす影響。各群n=7-8。B & C. 耐糖能に及ぼす影響。各群 n=5。*P<0.05, ***P<0.005。D & E. 空腹時血糖に及ぼす影響。3週間 (D) もしくは8週間摂食させた。各群 n=5。*P<0.05。F. インスリン抵抗性への影響。各群 n=5。G. ぶどう糖応答性インスリン分泌に及ぼす影響。各群 n=5。**P<0.01。H. 小胞体ストレスマーカー遺伝子発現に及ぼす影響。各群n=5。*P<0.05, ***P<0.01。

本研究により、Cdkal1 が tRNA 修飾酵素であることが明らかになった。すべての tRNA を修飾するのではなくリジンに対応する tRNA のみを修飾する酵素であった。Cdkal1 のホモロジー遺伝子である YqeV 遺伝子を欠損した枯草菌では、リジン翻訳時に誤翻訳を起こす確率が高くなった。これらのことから、Cdkal1 はリジン翻訳時に生じる誤翻訳を防ぐ機能があると考えられた。プロインスリンから分泌型インスリンにプロセッシングされる時、プロインスリンは2つの部位で蛋白質分解酵素により切断されなければならない。その一つの部位にリジンが存在する。もしこのリジン残基の部位で誤翻訳が生じ、リジン以外のアミノ酸が翻訳されると、分泌型インスリンにプロセッシングされなくなる。Cdkal1 欠損膵β細胞では分泌型インスリン量がコントロール細胞より少なく、同遺伝子欠損細胞ではプロセッシングを受けることができない未成熟インスリンが多く存在すると推測された。このような異常蛋白質の蓄積は小胞体ストレスを引き起こすことが知られている。本研究においても、Cdkal1 欠損膵β細胞では、著明な小胞体ストレスが認められた。本研究では明らかな膵β細胞の細胞死は認められなかったが、小胞体ストレスが長期に持続すると細胞死を誘導すると推察される。今後は、Cdkal1 欠損マウスに 3~6 ヶ月の長期高脂肪食負荷を与え、膵β細胞死が誘導されるか検討したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Li, A., Saito, M., Chuang, J.-Z., Tseng, Y.-Y., Dedesma, C., Tomizawa, K., Kaitsuka, T., and Sung, C.-H. Ciliary transition zone activation of phospho-Tctex-1 controls ciliary resorption, S-phase entry and fate of neural progenitors. *Nat. Cell Biol.* 2011, in press. 査読有
2. Fujimura, A., Michiue, H., Nishiki, T., Ohmori, I., Wei, F.-Y., Matsui, H., and Tomizawa, K. Expression of a constitutively active calcineurin encoded by an intron-retaining mRNA in follicular keratinocytes. *PLoS One* 6, e17685, 2011. 査読有
3. Arragain, S., Handelman, S. K., Forouhar, F., Wei, F.-Y., Tomizawa, K., Hunt, J. F., Douki, T., Fontecave M., Mulliez, E and Atta, M. Identification of eukaryotic and prokaryotic methylothiotransferases for biosynthesis of 2-methylthio-N⁶-threonylcarbamoyladen osine in tRNA. *J Biol. Chem.* 285, 28425-28433, 2010. 査読有
4. Matsushita, M., Tomizawa, K., Okimoto, N., Nishiki, T., Ohmori, I., and Matsui, H. Oxytocin mediates the antidepressant effects of mating behavior in male mice. *Neurosci. Res.* 68, 151-153, 2010. 査読有
5. Feng, B., Tomizawa, K., Michiue, H., Han, X.-H., Miyatake, S., and Matsui, H. Development of a bifunctional immunoliposome system for combined drug delivery and imaging *in vivo*. *Biomaterials* 31, 4139-4145, 2010. 査読有
6. Araki, D., Takayama, K., Inoue, M., Watanabe, T., Kumon, H., Futaki, S., Matsui, H., and Tomizawa, K. Cell-penetrating D-isomer peptides of p53 C-terminus: Long-term inhibitory effect on the growth of bladder cancer. *Urology* 75: 813-819, 2010. 査読有
7. Takayama, K., Nakase, I., Michiue, H., Takeuchi, T., Tomizawa, K., Matsui, H., and Futaki, S. Enhanced intracellular delivery using arginine-rich peptides by the addition of penetration accelerating sequences (Pas). *J Control Release* 138: 128-133, 2009. 査読有
8. Feng, B., Tomizawa, K., Michiue, H., Miyatake, S., Han, X.-H., Fujimura, A., Seno, M., Kirihata, M., and Matsui, H. Delivery of sodium borocaptate to glioma cells using immunoliposome conjugated with anti-EGFR antibodies by ZZ-His. *Biomaterials* 30: 1746-1755, 2009. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1. 富澤一仁. ヒト tRNA 修飾と疾患. 第 12 回日本 RNA 学会年会、2010 年 7 月 27 日、学術総合センター—ツ橋記念講堂 (東京)。
2. 富澤一仁. Functional characterization of CDKAL1, a risk factor of T2DM. 第 53 回日本糖尿病学会、2010 年 5 月 28 日、岡山コンベンションセンター (岡山)。
3. Fan-Yan Wei, Kazuhiro Tomizawa. Functional characterization of a novel type 2 diabetes risk factor, Cdk5 regulator subunit association protein 1-like 1 (CDKAL1). The 25th Kumamoto Medical Bioscience Symposium, November 12, 2009, ANA Hotel Kumamoto New Sky (Kumamoto).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 2 型糖尿病モデル非ヒト動物

発明者: 富澤一仁、魏 范研

権利者: 熊本大学

種類: 特許権

番号: 2009-258382

出願年月日: 2009 年 11 月 11 日

国内外の別: 国内および国外

[その他]

ホームページ等

<http://kumamoto-physiology.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富澤 一仁 (TOMIZAWA KAZUHITO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号: 40274287

(2) 研究分担者: 無し

(3) 連携研究者: 無し