

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670669

研究課題名(和文)冬眠の各種治療への応用(HP Complexに注目して)

研究課題名(英文)Application of hibernation for various medical treatment

研究代表者

安田 善一(Yasuda, Yoshikazu)

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50252002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：冬眠を様々な医学的治療に応用できるかどうか検討するべく、現在は入手困難な冬眠タンパク(HP Complex)を人工的に合成するために、HP Complexの構成成分であるHP-20, HP-25, HP-27を、それぞれの相補的DNA(cDNA)をもとに、組換えタンパク質合成の手法の一つであるコールドショック発現系を用いて合成することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We tried to synthesize Hibernation protein Complex (HP Complex) to apply hibernation system to medical treatment. We successfully synthesized HP-20, HP-25 and HP-27 that constitute HP complex from the each complementary DNA using genetic recombination method.

研究分野：集中治療医学

キーワード：冬眠 HP Complex タンパク合成

1. 研究開始当初の背景

心肺蘇生後には、神経学的予後を改善させ社会復帰率を向上させるために、軽度低体温療法を行うことが推奨されている。しかし低体温により、電解質異常、凝固機能低下、免疫機能低下などの様々な合併症がもたらされてしまい、このために目標体温まで体温を下げるができなかったり、感染症が重症化してしまったりするなど様々な問題点が発生する。

そこで信川泰成助教(福井大学・医学部・附属病院)は、冬眠を低体温療法に応用するために、1992年に近藤宣昭博士らによってシマリスより発見された HP Complex に注目し(Kondo et al. J Biol Chem 1992)、平成 23 年度の挑戦的萌芽研究を申請し研究費を得た(課題番号:23659738)。しかし、HP Complex を入手しようと近藤博士に問い合わせたところ、研究所閉鎖のため HP Complex を販売や譲渡することができないとのことであった。そこで申請者は HP Complex を合成するべく、途中から連携研究者として参加した。

HP Complex は、HP-20、HP-25、HP-27、HP-55 の 4 種類のタンパク質により形成され、肝臓で合成されて血中に存在しているが、冬眠期間中には HP Complex は脳血液関門を通過して髄液中に移動し、このうち HP-20、HP-25、HP-27 の 3 種類が HP-55 と解離して活性化され、冬眠を引き起こすことが分かっている(Kondo et al. Cell 2006)。この 3 種類のタンパクについては、その cDNA がすでにクローニングされており(Takamatsu et al. Mol Cell Biol 1993)、申請者らは高松信彦博士より提供いただいた cDNA から無細胞タンパク合成という手法を用いて、3 種類のタンパクを合成しようと試みた。

しかしこの手法ではタンパクが合成されなかったり、合成された場合でもその量が

非常に微量であったりしたため、実際に実験に使用できるような量を得ることが不可能であった。

2. 研究の目的

そこでまず、より大量に確実にタンパク合成できる方法を見出し、そのタンパクを精製してラットに投与し、冬眠が実現できるかどうか調べようと考えた。

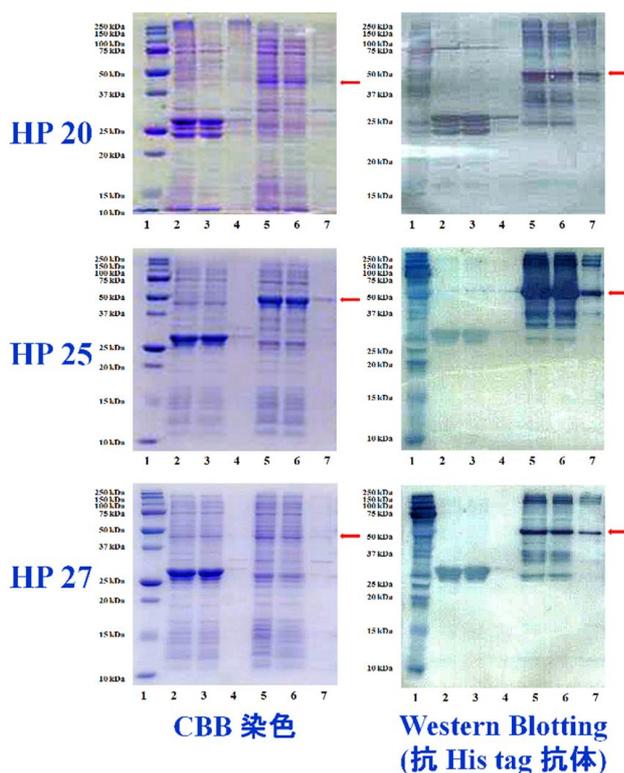
具体的には、コールドショック発現系というタンパク合成システムに着目して、HP-20、HP-25、HP-27 の 3 種類について大量に合成・精製しようと試みた。

3. 研究の方法

まず、プラスミドベクター pBluescript KS (+) Vector (Stratagene 社) の multicloning sites 内の EcoRI 部位に、シマリスの HP-20、HP-25、HP-27 の cDNA を挿入したものを入手した。つぎに制限酵素処理により、それぞれ目的遺伝子である HP-20、HP-25、HP-27 の cDNA を取得した。これを組換えタンパク質合成用発現ベクターである、コールドショックベクター(タカラバイオ株式会社) pCold[®] ProS2 DNA の BamHI と EcoRI サイト間に HP-20、HP-25、HP-27 の cDNA を導入して作製した発現ベクタープラスミドを用いて、宿主大腸菌 BL21 T1R の形質転換体を調製して培養した。得られた菌体を PBS で懸濁後、超音波破碎し、遠心分離により可溶性画分と不溶性画分に分け、12.5% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE/CBB 染色により分析した。また、His Tag 付加の目的タンパク質について 12.5% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE 後、抗 His Tag 抗体を用いて Western Blotting 解析を施行した。

4. 研究成果

HP-20, HP-25, HP-27 とともに, コールドショックベクター pCold[®] ProS2 DNA にそれぞれの cDNA が組み込まれた大腸菌の可溶性画分に, タンパクが合成されていることが, Coomassie Brilliant Blue 染色, 抗 His



tag 抗体を用いた Western Blotting 解析により確認できた。(下図参照)

1 Precision Plus Protein Standards Dual color

2 Control (pCold ProS2) 全蛋白

3 Control (pCold ProS2) 上清

4 Control (pCold ProS2) 沈殿

5 Sample (HP-20 or 25 or 27/pCold ProS2) 全蛋白

6 Sample (HP-20 or 25 or 27/pCold ProS2) 上清

7 Sample (HP-20 or 25 or 27/pCold ProS2) 沈殿

しかし, HP-20, HP-25, HP-27 の精製や、ラットへの応用までは行うことができなかった。これらは今後の課題である。

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 6 件)

安田 善一, 図表から学ぶ麻酔の知識力 UP セミナー「周術期合併症」, OPE NURSING 29(7): 94-96. 2014.7 査読無

Y.Matsuki, Y.Matsuki, Y.Yasuda, K.Takakura, K.Shigemi, Formation of a fibrin net on the polypropylene membrane oxygenator used for percutaneous cardiopulmonary support in a patient with acute myocarditis, J Clin Anesth 26 (4): 338-9, 2014.6 査読有, DOI:10.1016/j.clinane.2014.03.002

Y.Matsuki, Y.Matsuki, Y.Yasuda, M.Mizogami, K.Takakura, K.Shigemi, Successful treatment of severe legionella pneumonia and acute kidney injury with polymyxin B-immobilized fiber column direct hemoperfusion, Anaesth Pain & Intensive Care 17(1): 88-90, 2013.4 査読有

[学会発表](計 17 件)

佐上 祐介, 小畑 友里江, 神澤 聖一, 松木 悠佳, 安田 善一, 高倉 康, 重見 研司, 福井大学医学部附属病院集中治療部における最近 5 年間の鎮痛鎮静薬の使用状況, 第 42 回日本集中治療医学会学術集会, ホテル グランパシフィック(東京都), 2015.2.11

小畑 友里江, 佐上 祐介, 松木 悠佳, 安田 善一, 高倉 康, 重見 研

司, 福井大学医学部附属病院における壊死性筋膜炎の統計学的検討, 第 42 回日本集中治療医学会学術集会, ホテルグランパシフィック(東京都), 2015.2.10

小畑 友里江, 佐上 祐介, 神澤 聖一, 松木 悠佳, 安田 善一, 重見 研司, Streptococcus pyogenes による壊死性筋膜炎に対し PMX-DHP と CHDF を施行した 2 救命例, 第 18 回北陸急性血液浄化療法談話会, 金沢都ホテル(金沢市), 2014.11.22

滝川 千陽, 神澤 聖一, 松木 悠佳, 安田 善一, 高倉 康, 重見 研司, 大理石骨病の麻酔経験, 日本臨床麻酔学会第 34 回大会, グランドプリンスホテル新高輪(東京都), 2014.11.2

神澤 聖一, 佐上 祐介, 小畑 友里江, 松木 悠佳, 木下 義和, 安田 善一, 重見 研司, 弓部大動脈人工血管置換術後に septic shock ARDS となり PCPS および ECMO 導入を必要とした 1 例, 第 3 回「集中治療ミーティング福井」, 福井商工会議所(福井市), 2014.9.5

松木 悠佳, 石本 雅幸, 塩濱 恭子, 松木 泰成, 上田 雅史, 木下 義和, 安田 善一, 溝上 真樹, 重見 研司, 初診時症状による神経障害性疼痛患者のプレガバリン鎮痛効果, 日本ペインクリニック学会第 48 回大会, 京王プラザホテル(東京都), 2014.7.25

小畑 友里江, 佐上 祐介, 三田 建一郎, 次田 佳代, 松木 悠佳, 信川 泰成, 安田 善一, 重見 研司, 頭部

外傷へのバルビツレート療法中に重症低カリウム血症を呈した 1 例, 第 22 回日本集中治療医学会東海北陸地方会, 愛知医科大学(名古屋市), 2014.6.14

佐上 祐介, 松木 悠佳, 三田 建一郎, 信川 泰成, 安田 善一, 重見 研司, 硬膜外麻酔の有無が定期開腹結腸/直腸手術後の手術部位感染に及ぼす影響, 日本麻酔科学会第 61 回学術集会, パシフィコ横浜(横浜市), 2014.5.16

安田 善一, 信川 泰成, 三田 建一郎, 小畑 友里江, 松木 悠佳, 次田 佳代, 高倉 康, 重見 研司, 福井大学医学部附属病院における腸腰筋膿瘍症例の臨床的検討(2006 年から 2013 年まで), 第 41 回日本集中治療医学会学術集会, 国立京都国際会館(京都市), 2014.3.1

三田 建一郎, 次田 佳代, 小畑 友里江, 神澤 聖一, 信川 泰成, 安田 善一, 溝上 真樹, 重見 研司, 未診断の褐色細胞腫を合併し、緊急帝王切開術中に羊水塞栓症に陥り心停止をきたしたが社会復帰できた一症例, 第 41 回日本集中治療医学会学術集会, 国立京都国際会館(京都市), 2014.2.28

小畑 友里江, 本定 侑子, 三田 建一郎, 次田 佳代, 信川 泰成, 安田 善一, 高倉 康, 重見 研司, 急性塞栓症に対する PCPS 挿入により後腹膜血腫をきたしたが救命しえた 1 例, 第 41 回日本集中治療医学会学術集会, 国立京都国際会館(京都市),

2014.2.27

信川 泰成, 小畑 友里江, 三田
建一郎, 次田 佳代, 松木 悠佳,
安田 善一, 重見 研司, 肺嚢胞感
染による septic shock にトロンボモ
ジュリンが効果的であった一症例,
第2回「集中治療ミーティング 福
井」, ホテルフジタ福井(福井市),
2013.9.13

三田 建一郎, 神澤 聖一, 小畑
友里江, 信川 泰成, 安田 善一,
重見 研司, 門脈大循環シャントに
よるジアゼパム排泄代謝遅延のため
意識障害が著名に遷延した一症例,
第21回日本集中治療医学会東海北陸
地方会, じゅうろくプラザ(岐阜市),
2013.6.15

Y.Obata, Y.Yasuda, K.Shigemi, The
difference between calculated functional
ejection fraction by using cardio ankle
vascular index examination and
measured ejection fraction by using
transthoracic echocardiography,
Experimental Biology 2013,
Boston(USA), 2013.4.24

6 . 研究組織

- (1) 安田 善一 (Yasuda, Yoshikazu)
福井大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 : 50252002