

|                  |                                                                                                                                                                                                                   |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title            | 2015年度学会要旨集                                                                                                                                                                                                       |
| Sub Title        |                                                                                                                                                                                                                   |
| Author           |                                                                                                                                                                                                                   |
| Publisher        | 慶應義塾大学湘南藤沢学会                                                                                                                                                                                                      |
| Publication year | 2015                                                                                                                                                                                                              |
| Jtitle           | 生命と情報 No.22 (2015. ) ,p.286- 331                                                                                                                                                                                  |
| JaLC DOI         |                                                                                                                                                                                                                   |
| Abstract         |                                                                                                                                                                                                                   |
| Notes            | 慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2015年度学生論文集                                                                                                                                                                              |
| Genre            | Technical Report                                                                                                                                                                                                  |
| URL              | <a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000022-0286">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000022-0286</a> |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

**Consumption of hot spring water including high concentration of hydrogen carbonate decreases serum glycoalbumin levels in human**

○Shinnosuke Murakami<sup>1,2</sup>, Yasuaki Goto<sup>3</sup>, Shigeo Kurihara<sup>3</sup>, Masaru Tomita<sup>1,2</sup>, Shinji Fukuda<sup>1,2</sup>

1. Systems Biology Program, Graduate School of Media and Governance, Keio University, Fujisawa, Kanagawa, Japan
2. Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Tsuruoka, Yamagata, Japan
3. Japan Health and Research Institute, Chuo-ku, Tokyo, Japan

Introduction: Self-medication is an important approach to maintain and promote human health. Consumption of hot spring water (HSW) is one of the strategies of self-medication as HSW has been therapeutically used to prevent or improve various diseases in many countries. Specifically, drinking of HSW including high concentration of hydrogen carbonate or sulfate has been reported to prevent or improve type 2 diabetes (T2D) in human [1,2]. However, the molecular mechanisms of the beneficial effects behind HSW consumption remain unclear.

Objective: To elucidate the molecular level effects of HSW drinking on human physiological homeostasis especially in the controlling of blood glucose levels.

Methods: HSW drinking test was conducted amongst 24 healthy volunteers (8 men and 16 women, ages from 26 to 59, 47 years old on the average). In this study, HSW was obtained from Nagayu hot spring (Taketa city, Oita, Japan) as its water contains one of the highest hydrogen carbonate concentrations in Japan. During the test, volunteers drank 500 ml of tap water (TW) or HSW thrice (30-60 minutes prior to each meal) daily. TW drinking periods and HSW drinking periods lasted for a week each and this cycle was repeated twice. Blood samples were obtained on the first day of the test and last days of every week. Biochemical tests and metabolome analysis of blood samples were conducted.

Results: Serum glycoalbumin levels, one of the index of glycemic controls, decreased significantly after HSW drinking periods as compared with TW drinking period as a whole. However, serum glycoalbumin levels in several individuals tended to decrease but not significantly by HSW consumption, suggesting that consumption of HSW including high concentrations of hydrogen carbonate has a potential to prevent and/or improve T2D, whereas the beneficial effects vary in individuals. Metabolome analysis of blood samples revealed that 21 metabolites were significantly different between TW drinking periods and HSW drinking periods. Especially, the concentrations of 5 amino acids (alanine, glycine, methionine, serine and tyrosine) were significantly decreased after drinking of HSW. Amino acids profiles in blood have been reported to be one of the risk assessment

factors of T2D [3], and a previous study reported that the concentrations of various amino acids including alanine, methionine and tyrosine in plasma were significantly increased in the state of hyperinsulinemia [4]. Therefore, the lowering of several amino acids after consumption of HSW including high concentrations of hydrogen carbonate may indicate prevention of T2D.

Conclusions: Our results demonstrated that consumption of HSW including high concentrations of hydrogen carbonate has the potential to prevent and/or improve T2D through the alterations of metabolites in the body.

Keyword: Hydrogen carbonate, Drinking, Glycoalbumin, Metabolome analysis

## Development of a new method for combinatorial drug discovery using a genome-scale metabolic model and database

○Keita Sasaki\*, Yasuhiro Naito\*, Kozo Nishida\*\*, Kazunari Kaizu\*\*, Koichi Takahashi\*\*, and Masaru Tomita\*

\* Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Japan.

\*\* RIKEN Quantitative Biology Center, Japan.

Antibiotics are indispensable to modern medical care. Recently, it is a serious problem that bacteria become resistant to multiple drugs by the overuse of antibiotics. Most of the current drug discovery approaches are finding out critical target and creating effective compounds to inhibit its functionality. However, the conventional approaches are facing the limit of defense against multiple drug resistant bacteria because the number of significant targets for drugs is quite limited and bacteria become resistant even to the new targets sooner or later. Therefore, in contrast to the conventional way, combinatorial drug discovery approach increases in importance. In the combinatorial drug discovery approach, it is quite important to find out effective combinations of available drugs and specific resistant cells based on the cellular network. Furthermore, according to the development of various high throughput measurement techniques and accumulation of *omics* data, the technology for cellular modeling and simulation has progressed dramatically too. Many large-scale models of bacteria have been published, such as the whole cell model of *Mycoplasma genitalium* (Karr *et al.*, 2012) and the genome-scale model of *Escherichia coli* (*E. coli*) metabolic pathway named iJO1366 (Orth *et al.*, 2011). iJO1366 includes 1,366 metabolic genes out of all 4,289 genes in *E. coli*, and it can reproduce single knockout phenotypes observed experimentally with more than 90% accuracy.

Prediction by such genome-scale models is indispensable to understand the systemic behaviour of large-scale cellular networks and to develop new drug combinations. In this study, we developed a new analysis method, named the “combinatorial knock-down”, to suggest the effective combinations of drug targets by using the genome-scale metabolic model and detailed drug database. In the combinational knock-down method, the limit of multiple fluxes in the metabolic pathway are decreased relative to the wild-type fluxes, and the synthetic effects on growth rate are indexed. This method was developed by modifying a module in COBRApy (The CONstraints Based Reconstruction and Analysis for Python, Ebrahim *et al.*, 2013). COBRApy is the tool for Flux Balance Analysis (FBA) that evaluates biomass synthesis as growth rate and enables one to analyze the iJO1366 model with Python scripting language. Compared to the knock-out analysis, our knock-down method can reveal the synergetic effect between the pair of targets (genes or reactions) in metabolic pathways. As a result, we found 150 sets of gene pairs indicating synergy. In addition,

we acquired the data of approved drugs by the detailed drug database, DrugBank (<http://www.drugbank.ca/>), and suggested synergetic pairs related to these drug targets by the double knock- down analysis, though the model was incomplete for drug discovery and knowledge for drug target and action mechanisms on the database was insufficient. The application of comprehensive simulation and metabolic engineering will be one of the major techniques to discover novel drug combinations efficiently.

## Identifying Key Regulators for TNF-induced Cancer Survival

○Fumie Nakasuka, Kentaro Hayashi, Masaru Tomita & Kumar Selvarajoo

Tumor Necrosis Factor (TNF), a well-known proinflammatory cytokine, has been recently observed to be elevated in tumor microenvironment. TNF stimulates normal and cancer cells to the production of key cytokines such as Interleukin-6, Chemokine (C-C motif) ligand 7, Matrix Metalloproteinase-3, which can assist cell growth and proliferation. Hence, the understanding of TNF response in cancer and normal cell is crucial for strategic cancer treatment. Previously, we have shown that TNF-induced proinflammatory gene expressions were suppressed by Receptor-Interacting Protein (RIP) 1 inhibitor, Necrostatin-1 (Nec-1) in mouse normal cells. In addition, we have also demonstrated that Protein Kinase C (PKC) inhibitor, Bisindolylmaleimide I (BIM-I), enhances apoptosis in TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)-resistant cancer cells. Based on these studies, we hypothesized that PKC and RIP1 can be key targets for cancer suppression. Here, we investigated TNF induced cell death with RIP1 and PKC inhibitors in MCF7, HT1080 and HT29 as cancer cells, and MRC5 as control normal cells. Our results show that, TNF and Nec-1 co-stimulation induced 37% cell death in MCF7 and 46 % in HT29 cells. Next, we tested the effect of BIM-I in MCF7 and HT1080. This time, the cell death was 73 % in MCF7 and 30% in HT1080. Notably, in both cases MRC5 cell survival was not largely affected. From these results, we gather that TNF and BIM-I co-stimulation in MCF7 cells possess the most selective effect. Next, we plan to investigate the mechanism for the cell death by measuring several survival and apoptotic signaling molecules and gene expressions. Overall, we hope to elucidate a single molecular target to optimize the cell death for various cancer cells through TNF signaling.

Key words : Cell survival, Apoptosis, Tumor Necrosis Factor, Necrostatin-1, Bisindolylmaleimide I

## Dynamic Proteome Analysis of Cisplatin-Resistant Cancer Cells

○Jun Yamakubo, Masaru Mori, Kumar Selvarajoo, Masaru Tomita

Drug resistance is a major setback during cancer treatment. Previous studies have identified several proteins and certain cellular functions, such as drug transport, DNA repair, anti-apoptosis and drug metabolism that contribute to cancer drug resistance. Nevertheless, detailed understanding of resistance mechanisms remains poorly understood. To uncover global resistance mechanisms, from the standpoint of intracellular protein aberrations and the corresponding network dysfunction, dynamical analysis of highthroughput proteomic data of resistant cancer cells is important. Here, we investigated the temporal proteome and phosphoproteome response of cisplatin -sensitive (A2780) and -resistant (A2780cis) ovarian cancer cells using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) at several time points (0, 1, 3, 5, 10, 30, 60 min, 3, 24, 48 h) after cisplatin treatment. Using statistical pathway analysis (Metacore), we identified differentially activated proteins and their biological functions. Our results showed phosphorylated proteins involved in DNA-damage response and apoptosis pathways were differentially expressed between A2780 and A2780cis. As these differences may likely contribute to cisplatin resistance, we screened for novel candidates of resistance proteins that are specifically upregulated in cisplatin-resistant A2780cis cells, and are currently investigating the different temporal profiles using statistical clustering approaches. Subsequently, we plan to investigate the expression of candidate proteins using western blotting and test their effect on cisplatin resistance through genetic knock-down approaches. Overall, from a global perspective, we hope to shed light into novel intracellular protein aberrations leading to drug resistance.

## Simulation of changes in ionic mechanisms underlying contraction of ventricular cells during embryonic development

○Maiko Wakita, Hitomi I. Sano, Yasuhiro Naito, Masaru Tomita

1. Inst. Adv. Biosci. Keio Univ, Kanagawa, Japan
2. Env & Info Studies, Keio Univ, Kanagawa, Japan
3. Syst. Biol. Prog., Grad. Sch. Media & Governance, Keio Univ, Kanagawa, Japan

The heart develops and gains new functions while continuously pumping blood, and heart abnormalities progress to congenital heart malformations; therefore, the developmental program of the heart, including the expression of the genes responsible for various ionic channels, is likely to be tightly regulated. The quantitative changes in ionic channels, pumps, exchangers, and sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  kinetics are responsible for the changes in electrophysiological properties of the developing cardiomyocytes. Previously, we demonstrated that the developmental changes in action potentials of ventricular myocytes were well represented, as  $\text{Na}^+$  current ( $I_{\text{Na}}$ ) increased before the disappearance of and funny current ( $I_{\text{f}}$ ), followed by a 10-fold increase in inward rectifier  $\text{K}^+$  current ( $I_{\text{K1}}$ ) via simulation. In the previous study, however, the relative conductances of the 9 components were switched between early embryonic (EE) and late embryonic (LE) values and all the components were assumed to change equally during the course of embryonic development. Here, we constructed a model that represents “middle” embryonic (ME) stage of guinea pig ventricular cell on the basis of experimental data in order to consider differences in increment of developmental changes of the 9 ionic component. We changed the relative conductance of the 9 ionic components by increment of 10% both from EE to ME stages and from ME to LE stages, and compared the simulated results with the simulation in which the relative conductance of all 9 components were shifted equally from EE to LE stages without assuming ME stage. As a result, we determined that the balance of  $I_{\text{Na}}$  and  $I_{\text{K1}}$  conductances are important for spontaneous firing of action potentials when all components are shifted from EE to ME stages. In addition, we demonstrated that 80% decrease in  $I_{\text{f}}$  conductance by ME stage was necessary in order to evoke action potential by various amplitudes of external stimulation and maintain proper excitation-contraction coupling during ME to LE stages.

## **Prediction of changes in electrophysiological properties of human embryonic stem cell derived cardiomyocytes attributed to coupling with fibroblasts**

○Yuichiro Tanaka, Ayaka Matsuo, Takahiro Iwamiya, Hitomi I. Sano, Masaru Tomita

Regenerative medicine is a novel therapy for heart critical damage. And the methods towards clinical application have been confirmed (Limor Zwi et al. 2009, K. Shimoji et al. 2010, H. Uosaki et al. 2011). In particular, tissue engineering approach, constructing a cardiac tissue in vitro, showed much therapeutic efficacy (M. Kawamura et al. 2013). And It is suggested that appropriate intercellular networks and extracellular matrix (ECM) created by cardiac fibroblasts are important for cardiac regeneration (K. Matsuura et al. 2012, T. Iwamiya et al. 2014.).

The computer simulation is a powerful approach for confirming experimental data as well as providing new insights that could not be obtained from experiment by changing various parameters in the mathematical models. Jonsson et al., (2012), for example, combined molecular biology and computer simulations to demonstrate that human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes (hESC-CMs) have an immature electrophysiological phenotype, based on insufficient function of inward rectifier K<sup>+</sup> current (IK1) channels and a shift in the activation of sodium channels. In addition, Paci et al., (2012) integrated electrophysiological recordings of various ionic systems in hESC-CMs on the basis of a human ventricular cell model (Ten Tusscher et al., 2004) to reproduce action potential recordings of the hESC-CMs at 15–40 days of differentiation (“early” stage) and those at 50–110 days of differentiation (“late” stage); the constructed model was further modified by electrical coupling with fibroblasts. Here, we utilized the models developed by Paci et al., (2012) for simulation of increasing number of fibroblasts electrically coupled with myocardial cells, in both “early” and “late” stages. We also simulated the influence of changing current densities of various K(+) channels on fibroblast membrane to hESC-CMs. As a result of simulations, we demonstrated that both the number of fibroblasts and current densities of various K(+) channels on fibroblast membrane affect electrophysiological properties of hESC-CMs and the effects are different between early and late stages of differentiations.

## Modeling and simulation of interaction between murine gut microbiota and host immune system

○Wataru Takahagi<sup>1</sup>, Shinji Fukuda<sup>1,2</sup>, Hitomi I Sano<sup>1</sup>, Hiroshi Ohno<sup>2</sup>, Masaru Tomita<sup>1</sup>

1. Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Japan

2. RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, Japan

The mammals including humans are exposed to various bacteria immediately after birth, and gradually forming the intestinal bacterial flora. Gut microbiota is important for permanent maintenance of a living body immune system, but the process of forming gut microbiota, which is called primary succession, is not clearly understood. Here, we made a commensal bacterial flora in the gut of germ-free (GF) BALB/c mice as a minimum microbial ecosystem; we aimed to examine and simulate the interaction among *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bifidobacterium longum* (*B. longum*), and host immune response via production of intestinal immunoglobulin A (IgA). Intestinal IgA covers mucosal surfaces for protection against pathogens that contact the mucous membranes and restrains bacteria's growth and colonisation to the gut of mammals. We mathematically modeled host-microbe interactions in order to clarify the mechanisms underlying the process of forming microbial ecosystem under the host immune system. We measured populations of two bacteria and quantity of IgA in the mice feces. On the basis of the experimental data, we constructed a mathematical model based on exponential growth model of bacteria which expresses bacterial population growth and generalized Lotka- Volterra equation which expresses competition between two or more species, and we estimated the parameters using genetic algorithm. In order to model the host immune system in response to intestinal bacteria, both T-cell dependent and independent pathways of IgA secretion were considered. Subsequently, we simulated the process of forming intestinal microbiota through the interaction between IgA and bacteria. Additionally, we quantitatively compared parameters underlying the differences between *E. coli* and *B. longum* on the basis of simulation data of bacterial growth. The model well reproduced the dynamic changes in intestinal IgA production, and the populations of *E. coli* and *B. longum*. The simulation of the host-microbe interaction enabled us to quantitatively describe the contributions of various parameters to formation of gut microbiota and interaction among *E. coli*, *B. longum*, and intestinal IgA.

## **Modeling and simulation of developmental changes in contractile apparatus of ventricular cells**

○Mao Takiguchi, Tamami Toki, Hitomi Sano, Yasuhiro Naito, Masaru Tomita

The heart develops and acquires new functions, all while continuously pumping blood. Meanwhile, heart abnormalities that develop early in this process progress to congenital heart malformations.

Accordingly, the developmental program of the heart, including expression of genes encoding ion channels, is likely to be tightly regulated. We previously modeled developmental changes in action potentials (AP) in rodent ventricular cells by integration of quantitative changes in ionic components of the cellular membrane and sarcoplasmic reticulum (SR) throughout the course of development using the Kyoto model, a comprehensive model of guinea pig ventricular cells (Kuzumoto et al., 2008). We then incorporated a glycolysis model (Lambeth and Kushmerick., 2001) to represent developmental changes in contribution of glycolysis and mitochondrial oxidative phosphorylation to ATP production in ventricular cells. Here, we further modified the model to represent developmental changes in contractile apparatus of ventricular cells. During the course of development, the ventricular cells utilize different isoforms of both myosin heavy chain and troponinI; the differences in isoforms affect  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity, ATPase activity, and velocity of contraction. In order to consider the differences in isoforms, we integrated a new contraction model (Niederer et al., 2006) to the Kyoto model; briefly, the original contraction model (Negroni and Lascano, 1996) in the Kyoto model assumed 4 states of troponin C that represent cross-bridge dynamics; on the other hand, Niederer et al., (2006) considered tropomyosin which inhibits formation of cross-bridge by actin and myosin filaments. We varied the level of

$\text{Ca}^{2+}$  sensitivity in order to obtain similar traces for contractile force between the original Kyoto model and the modified model. We also modified the new contraction model to consider ATP consumption by myosin-ATPase in order to simulate the changes in ATPase activity caused by the difference in MHC isoforms. The modified model enabled us to compare the contribution of developmental changes in the ATP consumption via contraction to excitation-contraction coupling, which are regulated differently between fetal and adult guinea pigs.

## **Does Adaptive Evolution give an Explanation of Zonal Heterogeneity in Liver?: a Simulation Study**

○Shoko Jinno, Kazuto Yamada, Yasuhiro Nairo, Masaru Tomita

The liver metabolizes tremendous variety of chemical compounds. Almost all the intermediary metabolisms of carbohydrates, lipid and amino acids take place in the liver. Human liver include 250 billion hepatocytes and it consists of half a million hepatic lobule in which 5 billion hepatocytes are assembled. In the liver lobule, hepatocytes line along a fenestrated capillary vessel termed sinusoid. The blood from the portal vein and hepatic artery flows into the sinusoid and out to the central vein. This construct is referred to as port-central axis(PCA), which is the smallest repetitive unit of liver metabolism. The hepatic lobule is a parallel circuit of PCAs and the liver is also a parallel circuit of hepatic lobules. It is known that there is many heterogeneities of various metabolic aspects in the liver lobule. Gene expression levels, protein activities, and metabolite concentrations between periportal and perivenous zone are distinctly heterogeneous that is referred to as “metabolic zonation”. While many histological facts phenomena of metabolic zonation were reported, their biological significances and/or functions (essential qualities) are still unclear. Even the present gene engineering technologies cannot such as conditional gene knockout and/or knockdown are insufficient to regulate metabolic zonation at will. In this study, we tried to elucidate what is profit of metabolic zonation of liver ammonia metabolism using mathematical model and computer simulation. We expanded a previous mathematical PCA model by Ohno *et al.* (Ohno model). Ohno model contains the model of ammonia metabolism in PCA and express the difference in function of upper stream to downstream. By using the mathematical model, it is possible to change any variable in the model feely and produce various virtual PCAs. Through comparing these models, we estimated which elements play a major role to adapt various selective pressures in the actual PCA. We used genetic algorithm (GA) to mimic the process of the evolution. Several hypothetical selective pressures, e.g. elimination rate of ammonia, energy efficiency of urea production, acid-base balance, are used as the evaluation functions for GA. In Ohno model, there are twelve enzymes which are used in urea cycle or transamination reaction, oxidative deamination and so on. In consequence, it was suggested that localizations of some enzymes such as glutamine synthetase (GS) and carbamoylphosphate synthetase I (CPI) were indispensable for maximization of energy efficiency. Our simulation results suggested that GS and CPI should be highly expressed in perivenous (downstream) zone and peripotal (upstream) zone, respectively. These results are roughly consistent with actual enzyme localizations in the liver.

**Key Words:**computer simulation, liver lobule, ammonia metabolism, evolution, metabolic zonation

## **Transcriptome study of *Ramazzottius varieornatus* for the comprehensive identification of genes related to DNA damage response**

○Yuki Yoshida<sup>1</sup>, Daiki Horikawa<sup>1,3</sup>, Takekazu Kunieda<sup>2</sup>, Hirokazu Kuwabara<sup>2</sup>, Atsushi Toyota<sup>4</sup>, Toshiaki Katayama<sup>5</sup>, Masaru Tomita<sup>1</sup>, Kazuharu Arakawa<sup>1</sup>

1. Institute for Advanced Biosciences, Keio University
2. Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, University of Tokyo
3. Keio Research Institute at SFC, Keio University
4. National Institute of Genetics
5. Database Center for Life Science

Several terrestrial tardigrades are capable of tolerating agents that cause heavy DNA damage, such as high dosage of heavy ions, ultraviolet lights, and gamma rays. Previous studies have reported that stress response pathways are important factors of cellular protection, implying that these genes might be key factors to survival against such environments. In particular, gamma rays are known to generate severe oxidative stress, causing devastating damage to DNA, proteins, and other biological molecules. To clarify the mechanisms of gamma ray tolerance, we first irradiated the tardigrade *Ramazzottius varieornatus* with gamma rays below 1,000 Gy and conducted a survival assay. As a result, we found that tardigrades irradiated with 1,000 Gy had a short lifespan, and those with an irradiation above 600 Gy had low reproduction abilities, which shows consistency with the reports from Horikawa *et al.* (2006). Based on these results, we are currently conducting a time-course RNA-Seq analysis on *R. varieornatus* irradiated with 500 Gy, which is just below the LD50 of eggs, in order to understand the response to radiation as a system. We estimate that not only genes related to oxidative stress response, but several other pathways will be regulated after irradiation.

**Keywords :** *Ramazzottius varieornatus*, Gamma ray, Expression Analysis

## **Modeling and simulation of developmental changes in contractile apparatus of ventricular cells**

○Mao Takiguchi<sup>1,2</sup>, Tamami Toki<sup>1,2</sup>, Hitomi I.Sano<sup>1,3</sup>, Yasuhiro Naito<sup>1,2,3</sup>, Masaru Tomita<sup>1,2,3</sup>

1. Inst. Adv. Biosci. Keio Univ, Kanagawa, Japan

2. Syst. Biol. Prog., Grad. Sch. Media & Governance, Keio Univ, Kanagawa, Japan

3. Env & Info Studies, Keio Univ, Kanagawa, Japan.

The heart develops and acquires new functions, all while continuously pumping blood. Meanwhile, heart abnormalities that develop early in this process progress to congenital heart malformations. Accordingly, the developmental program of the heart, including expression of genes encoding ion channels, is likely to be tightly regulated. We previously modeled developmental changes in action potentials (AP) in rodent ventricular cells by integration of quantitative changes in ionic components of the cellular membrane and sarcoplasmic reticulum (SR) throughout the course of development using the Kyoto model, a comprehensive model of guinea pig ventricular cells. We then incorporated a glycolysis model to represent developmental changes in contribution of glycolysis and mitochondrial oxidative phosphorylation to ATP production in ventricular cells. Here, we further modified the model to represent developmental changes in contractile apparatus of ventricular cells. During the course of development, the ventricular cells utilize different isoforms of both myosin heavy chain and troponinI; the differences in isoforms affect  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity, ATPase activity, and velocity of contraction. In order to consider the differences in isoforms, we integrated a new contraction model to the Kyoto model; briefly, the new model considered tropomyosin which inhibits formation of cross-bridge by actin and myosin filaments. We varied the level of  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity in order to obtain similar traces for contractile force between the original Kyoto model and the modified model. We also modified the new contraction model to consider ATP consumption by myosin-ATPase in order to simulate the changes in ATPase activity caused by the difference in MHC isoforms. The modified model enabled us to compare the contribution of developmental changes in the ATP consumption via contraction to excitation-contraction coupling, which is regulated differently between fetal and adult guinea pigs.

## **Modulation for the energetic state of continuously grown yeast by chemical and genetic approaches**

○Chisato Baba, Andrew Hesketh, Masaru Tomita, Douglas B. Murray

Regulating the supply (catabolism) and demand (anabolism) of energy in eukaryotic systems is one of the most important and conserved processes in biology. While a vast amount of information is available about the individual components, global structure and local regulation of energetics, relatively few detailed studies exist on the global dynamic influence of energetic state on cellular physiology. Therefore, we are investigating how growth rate, glucose feed and [ATP], [ATP]:[ADP] and energy charge influences the physiology of continuously grown bakers' yeast, using physiological, chemical and genetic approaches. In this study we used an accellerostat, where the dilution rate (growth rate) is changed continuously and oscillatory growth conditions (cells autosynchronise metabolic activity resulting in an large amplitude oscillation in [ATP]:[ADP]). Additionally, we plan to use chemical perturbation, dynamically changing glucose feed (dstat) and a synthetic doxycycline-inducible ATP-burning circuit. It is envisaged that these studies will help unravel the complex metabolic involved in the cells response to energy availability and lead to a deeper understanding of cellular energetics eukaryotes. Thus providing invaluable insights into consequences of energetic dysregulation involved in conditions such as cancer (Warburg effect), metabolic syndrome and ageing.

## 中鎖脂肪酸を切り出すチオエステラーゼ遺伝子と アシルキャリアープロテイン遺伝子の同時導入による *Chlamydomonas reinhardtii* の脂肪酸の炭素鎖長の改変

### Alteration of fatty acid chain length of *Chlamydomonas reinhardtii* by simultaneous expression of medium chain specific thioesterase and acyl carrier protein

稲葉遊 (B4 2015. 3. 29時点)、中東憲治、伊藤卓朗、富田勝

太陽光や風力などの再生可能エネルギーで代替出来ないエネルギーであるジェット燃料を、藻類由来のオイルで代替することが航空業界から求められている。ジェット燃料の原料として用いることができ、凝固点が低いため寒冷地でも使用することができるオイルを生成する藻類の幅を広げるために、オイル産生藻類に炭素鎖長が 8-15 (C8-15) の脂肪酸を生成させる遺伝子改変技術の創出が求められている。

脂肪酸の炭素鎖伸長時に結合しているアシルキャリアープロテイン (ACP) に結合し、中鎖脂肪酸の段階で脂肪酸を ACP から切り出すチオエステラーゼ (TE) 遺伝子を導入することが有効な手段だと考えられている中、中鎖脂肪酸 (C8-12) を選択的に切断する TE 遺伝子を *Chlamydomonas reinhardtii* に導入した研究\*1 では *C. reinhardtii* の ACP が、外来の TE と結合できなかったために中鎖脂肪酸の蓄積が起きなかったと考えられている。そこから私は、種子中に中鎖脂肪酸鎖 (C10:0) を蓄積する *Cuphea lanceolata* の TE 遺伝子 (*CITE*) と同 ACP 遺伝子 (*CIACP*) を同時に *C. reinhardtii* に組み込むことによって中鎖脂肪酸の割合を増加させる事を目指した。

*CITE* のみ発現するカセット (TEc), *CITE* と *CIACP* を同時発現するカセット (TEACPc), 及び、これら *CITE* と *CIACP* のプラスチド移行配列を *C. reinhardtii* の対応するプラスチド移行配列に変えたカセット (mTEc, mTEmACPc) の 4 つを作製し、*C. reinhardtii* TKAC1017 株をエレクトロポレーション法により形質転換し、核に遺伝子カセットを導入した。遺伝子カセットにおいて、TE 遺伝子と ACP 遺伝子には *PSAD* プロモーターを用い、薬剤選択マーカーとしてゼオシン耐性遺伝子 *ble* を用いた。ゼオシン耐性を指標に得たそれぞれの形質転換体から、導入カセットの全長を保持している株をコロニーPCR によって選択し、遊離脂肪酸の鎖長を LC/MS で測定し分析した。TEc, mTEc, TEACPc, mTEmACPc それぞれを導入した形質転換体の脂肪酸組成分析の結果を報告し、*C. lanceolata* の TE 単独、TE と ACP 共導入の効果を明らかにする。

#### 参考文献

\*1 Blatti et al., (2012), PLoS One, 7, e42949.

## 温泉水飲用がもたらす健康増進効果の分子機構の解明

村上慎之介 12, 後藤康彰 3, 伊藤恭 4, 早坂信哉 3, 栗原茂夫 3, 富田勝 12

福田真嗣 12

1 慶應義塾大学大学院 政策・メディア研究科, 2 慶應義塾大学 先端生命科学  
研究所, 3 日本健康開発財団, 4 伊藤医院

少子高齢化や医療費高騰を背景に、自らの健康を自身で管理するセルフメディケーションへの意識が高まっている。温泉水を飲用する「飲泉」もその 1 つであり、特に炭酸水素塩を含む温泉水の飲用は、糖尿病の予防・改善効果が報告されている。しかし飲泉効果の分子機構は不明瞭なことから、本研究では 24 名の健常者に対し、水道水または炭酸水素塩を含む温泉水を 1 週間ずつ、それぞれ交互に 2 回ずつ飲用する試験を実施した。1 週間ごとに血液を採取し、臨床検査および血中代謝物質の網羅的な測定を行なった。その結果、血糖状態を表す指標の 1 つである血中グリコアルブミン (GA) 値が飲泉後に有意に低下しており、また飲泉前後では糖尿病との関連が指摘されている物質も含む 20 種の血中代謝物質が有意に変化した。一方で、GA 値の変化には個人差があったため、GA 値の相対的な変動パターンを階層的クラスタリングによって分類し、GA 値が有意に減少するグループとその他を区別した。飲泉によって GA 値が有意に減少したグループとそうでないグループ間では試験開始前における 6 種の血中代謝物質の濃度が有意に異なり、これらの濃度情報に基づいたランダムフォレストによって、70%以上の被験者を正しく分類することができた。以上ことから、個人差はあるものの、炭酸水素塩を含む温泉水の飲用は体内の代謝変動を介して糖尿病を予防できる可能性が示唆された。(589 文字)

キーワード：温泉水・飲泉・グリコアルブミン値・メタボローム解析・糖尿病

## 認知コンピューティングのための汎用ソフトウェアプラットフォームの 設計と開発

板谷琴音

認知コンピューティングのための 汎用ソフトウェアプラットフォームの設計と開発

近年の計算論的神経科学の発展に触発され、脳の器官を機械学習アルゴリズムとして書き下してそれらを脳に学んで結合することで人並みかそれ以上の能力を持つ知能機会を実装できるのではないかという仮説が提唱された。この通称全脳アーキテクチャ（WBA）中心仮説を構成論的に検証するために脳に学んだ機械学習アルゴリズムの開発やソフトウェアを用いたそれらのアルゴリズムの実装が精力的に進められている。しかし、あまりにも複雑な脳の器官たちを一人の人間が解き明かすことはできない。加えて、それらを組み合わせるためにはソフトウェア・ハードウェアの知識が問われるため、実際に WBA を実装するにはコミュニティベースの分散開発が必須条件となる。そこで WBA プロジェクト内の有志が集まって発足したチームによって Brain-inspired Computing Architecture (BriCA) と呼ばれるソフトウェアの開発が開始された。BriCA のプラットフォーム上に実装された機械学習アルゴリズムは任意に繋ぐことや一定時間ごとに呼び出すことが可能になる。今後、誰かが実装したアルゴリズムを使いまわすための機構やプログラムを書かずに定義だけを列挙することで使うアルゴリズムや結合をプログラムに変換する機能を実装する予定である。

## 高線量 $\gamma$ 線に対するヨコヅナクマムシの応答解明に向けた経時的微量トランスクリプトーム解析

吉田祐貴 1,2, 堀川大樹 1,3, 坂下哲哉 4, 小林泰彦 4, 富田勝 1,2, 荒川和晴 1

1 慶應義塾大学 先端生命科学研究所

2 慶應義塾大学 環境情報学部

3 慶應義塾大学 SFC 研究所

4 日本原子力研究開発機構 量子ビーム応用研究センター

陸生のクマムシは周辺環境が乾燥することにより乾眠と呼ばれる状態に移行することが可能である。特にヨコヅナクマムシはこの乾眠状態では高低温・高低圧・高線量の放射線などの極限環境に対して高い耐性を持つことが知られる。しかし、DNA に二重鎖切断 (DSB) のような損傷を引き起こす放射線に限っては通常の活動状態でも乾眠状態に匹敵する耐性を示すことから、ヨコヅナクマムシはストレスに対する細胞の防御機構だけではなく、強力な修復機構を持つと考えられる。そこで我々はヨコヅナクマムシの強力な修復機構が存在するかを検証すべく、飼育の難しさから困難であったレプリケートありの経時的 RNA-Seq 解析を 30 匹という微量の個体数よりシーケンスすることで実現し、 $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  線を 500 Gy 照射したヨコヅナクマムシに対して解析を行った。その結果、照射後の早い段階で非相同末端結合と遅い段階で相同末端結合修復が誘導されており、更に照射直後にヨコヅナクマムシ特有でパラログを持つ遺伝子の発現増加が認められた。今後はこれらの知見をもとに DNA の損傷量や DNA の複製を実験的に測定する予定である。

### Keywords :

ヨコヅナクマムシ,  $\gamma$  線, DNA 二重鎖切断, 微量 RNA-Seq

## 温泉水飲用がもたらす健康増進効果の解明と腸内細菌叢プロファイルからの評価

慶應義塾大学大学院 政策・メディア研究科

村上 慎之介

炭酸水素塩を含む温泉水の飲用は、糖尿病の予防や改善効果があると報告されているが、その分子機構は不明である。そこで本研究では、健常者への飲泉試験を実施した。飲泉後は水道水飲用時と比べて血糖状態を表す指標の1つである血中グリコアルブミン値が有意に低下したものの、その効果に個人差があることが明らかとなった。効果が得られる人とそうでない人は、試験開始前の血中代謝物質濃度や腸内細菌叢プロファイルに基づき、70%以上の確率で分類可能であったことから、本手法は飲泉を効果的に実施するための有効な手段となり得る。

## 超好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* における rRNA 及び tRNA 前駆体のプロセシング因子の系統的な解析

○ 今井淳之介<sup>1,2</sup>、佐藤朝子<sup>1</sup>、野呂絵美子<sup>1</sup>、富田勝<sup>1,2,3</sup>、森大<sup>1,2</sup>、金井昭夫<sup>1,2,3</sup>  
(1 慶大・先端生命研、2 慶大・政策・メディア、3 慶大・環境情報、)

## Systematic analysis of factors involved in the processing of precursor rRNA and precursor tRNA in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*

○ Junnosuke Imai<sup>1,2</sup>, Asako Sato<sup>1</sup>, Emiko Noro<sup>1</sup>, Masaru Tomita<sup>1,2,3</sup>, Masaru Mori<sup>1,2</sup>, Akio Kanai<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Tsuruoka 997-0017, Japan

<sup>2</sup> Systems Biology Program, Graduate School of Media and Governance, Keio University, Fujisawa 252-0882, Japan

<sup>3</sup> Faculty of Environment and Information Studies, Keio University, Fujisawa 252-0882, Japan

アーキア（古細菌）の遺伝情報制御系に関わる因子群は、バクテリアのものより真核生物のそれに似ていることは周知のことである。ここで、*Pyrococcus furiosus* のように 100 °C に及ぶ超高温環境下で生息する超好熱性アーキアのゲノムには、わずか 2,000 種のタンパク質がコードされており、由来するタンパク質が極めて耐熱性の高いことから、生化学的な解析に適していると考えられる。また、単独の酵素やその複合体を系統的、かつ網羅的に解析していけば、アーキアにおける遺伝情報制御系を包括的に理解できることはもとより、真核生物の該当分子の原型を知れる可能性につながるはずである。我々は古典的な non-coding RNA である rRNA や tRNA の進化研究が遺伝情報制御系の成り立ちに欠かせないとの観点から研究を推進してきた。今回、以下の 2 点においてその成果を報告したい。(1) *P. furiosus* の全細胞抽出液を調製し、主にゲルろ過カラムクロマトグラフィーを中心とした分画と LC-MS/MS によるタンパク質同定をもって、RNA 分解酵素（とその複合体）の網羅的な性状解析を試みたこと。(2) 我々が独自に同定した、あるいは、これまでに真核生物で報告があった RNA プロセシング因子のアーキアでの相同タンパク質を用いることで、試験管内の rRNA や tRNA 前駆体のプロセシング再構成系を構築したこと。アーキアのゲノム情報と、ゲノムにコードされるタンパク質の生化学的な解析を用いることで、システムとしての RNA 学を遂行し、遺伝情報制御系の基盤となるような因子について考察したい。

## **The consumption of bicarbonate-rich mineral water improves glycemic control via alterations in blood metabolome and gut microbiota profiles**

Shinnosuke Murakami, Yasuaki Goto, Kyo Ito, Shinya Hayasaka,  
Shigeo Kurihara, Tomoyoshi Soga, Masaru Tomita, Shinji Fukuda

Self-medication is an important approach to maintain and promote human health. Since the preventive and/or therapeutic effects derived from consumption of hot spring water and natural mineral water have been reported, it is commonly used as a self-medication approach. Specifically, consumption of bicarbonate-rich mineral water (BMW) has been reported to prevent or improve type 2 diabetes (T2D) in humans. However, the molecular mechanisms of the beneficial effects derived from BMW consumption remain obscure. Therefore, to elucidate the molecular level effects derived from consumption of BMW on glycemic control, blood metabolome profiles and fecal microbiota profiles were compared between tap water (TW) consumption periods and BMW consumption periods in human volunteers. Firstly, serum glycoalbumin levels, one of the indexes of glycemic controls, decreased significantly after BMW consumption. Blood metabolome analysis revealed that 19 metabolites including glycolysis-related metabolites and 3 amino acids were significantly different between TW and BMW consumption periods. Additionally, it was observed from fecal microbiota analysis that composition of lean-inducible bacteria increased after BMW consumption. These results suggest that consumption of BMW may potentially prevent and/or improve T2D through the alterations of host metabolism and gut microbiota composition. Moreover, the current study provides important lines of evidence detailing the molecular level effects of BMW consumption.

## 先天性筋ジストロフィーモデル *rmd* マウスのマルチオミックス解析

(理研 IMS<sup>1</sup>・慶應大環境情報<sup>2</sup>・慶應大先端生命研<sup>3</sup>・獨協医大<sup>4</sup>)

たかとう ま ゆ こ<sup>1,2,3</sup>・いけだ かずたか<sup>1</sup>・あおやま ち え こ<sup>4</sup>・みつはし さ と み<sup>4</sup>・すぎもと ひろゆき<sup>4</sup>・とみた まさる<sup>2,3</sup>・ありた まこと<sup>1</sup>  
高藤真由子<sup>1,2,3</sup>・池田和貴<sup>1</sup>・青山智英子<sup>4</sup>・三橋 里美<sup>4</sup>・杉本博之<sup>4</sup>・富田勝<sup>2,3</sup>・有田 誠<sup>1</sup>

## Multi-omics analysis of congenital muscular dystrophy in rostral-to-caudal muscular dystrophy mice

(Laboratory for Metabolomics, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences (IMS)<sup>1</sup>・Faculty of Environment and Information Studies, Keio University<sup>2</sup>・Institute for Advanced Biosciences, Keio University<sup>3</sup>・Department of Biochemistry, School of Medicine, Dokkyo Medical University<sup>4</sup>)

Mayuko Takato<sup>1,2,3</sup>, Kazutaka Ikeda<sup>1</sup>, Chieko Aoyama<sup>4</sup>, Satomi Mitsuhashi<sup>4</sup>, Hiroyuki Sugimoto<sup>4</sup>, Masaru Tomita<sup>2,3</sup>, Makoto Arita<sup>1</sup>

**Keywords:** Multi-omics, Metabolomics, Transcriptomics, Congenital muscular dystrophy

Congenital muscular dystrophy (CMD) is a group of inherited genetic disorders with muscle weakness and hypotonia as representative symptoms in early infancy. Recently we reported a new type of CMD, characterized by mitochondrial disorder. Biological analysis of this disease has shown that Choline Kinase  $\beta$  (*CHKB*), the first enzyme of the biosynthetic pathway of phosphatidylcholine (PC), the most abundant phospholipid in mammals, is responsible.

The aim of this research is what kind of effect on lipid metabolism by *CHKB* deletion and PC decrease, based on the comparison between control and rostral-to-caudal muscular dystrophy (*rmd*) mice with abnormalities of *CHKB* and mitochondrial disorders. We conducted a metabolic variability analysis of the quadriceps muscles from hindlimb and forelimb using transcriptomics (microarray analysis) and metabolomics (LC-MS and CE-MS analyses). As a result, *CHKB* deletion in hindlimb muscles may have significant effects on phospholipid distribution of cell membrane and fatty acid metabolism by some types of phospholipase A<sub>2</sub>, and it might result in inflammation of the hindlimb muscles and lead to the muscular dystrophy.

## ヨコヅナクマムシの染色体損傷応答解明に向けた経時的遺伝子発現解析

○吉田祐貴 1, 2, 堀川大樹 3, 坂下哲哉 4, 小林泰彦 4, 富田勝 1, 2, 荒川和晴 2

- ・ 慶應義塾大学 環境情報学部
- ・ 慶應義塾大学 先端生命科学研究所
- ・ 慶應義塾大学 SFC 研究所
- ・ 日本原子力研究開発機構 量子ビーム応用研究センター

いくつかの陸生のクマムシは周辺環境が乾燥することにより乾眠と呼ばれる状態に移行することが可能である。特にヨコヅナクマムシはこの乾眠状態では高低温・高低圧・高線量の放射線などの極限環境に対して高い耐性を持つことが知られる。しかし、放射線に限っては通常の活動状態でも乾眠状態に匹敵する耐性を示すことから、ストレスに対する細胞の防御機構だけではなく、強力な修復機構を持つと考えられる。そこで我々はヨコヅナクマムシの強力な修復機構を解明すべく、放射線を照射したクマムシの経時的トランスクリプトーム解析を行っている。コバルト 60  $\gamma$  線を、500Gy の線量でヨコヅナクマムシの成体に照射し、3 時間ごとに 24 時間までの RNA-Seq を現在取得中である。網羅的に発現変動を見る事により、DNA 修復や酸化ストレス応答に関わるパスウェイだけでなく、その制御を含めたシステムレベルのクマムシの染色体損傷応答機構について明らかにできると考えられる。

Keywords : *Ramazzottius varieornatus*,  $\gamma$  線, 遺伝子発現量解析

## 超好熱性アーキア由来 *Pf-Nob1* 及び *Pf-Dim2* による rRNA 前駆体のプロセシング制御

○今井 淳之介<sup>1,2</sup>、佐藤 朝子<sup>1</sup>、野呂 絵美子<sup>1</sup>、富田 勝<sup>1,2,3</sup>、金井 昭夫<sup>1,2,3</sup>  
(<sup>1</sup>慶大・先端生命研、<sup>2</sup>同・政策メディア・先端生命、<sup>3</sup>同・環境情報)

### Regulation of pre-rRNA processing by archaeal proteins, *Pf-Nob1* and *Pf-Dim2*

○Junnosuke Imai<sup>1,2</sup>, Asako Sato<sup>1</sup>, Emiko Noro<sup>1</sup>, Masaru Tomita<sup>1,2,3</sup>, Akio Kanai<sup>1,2,3</sup>  
(<sup>1</sup> Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., <sup>2</sup> Syst. Biol, Prog. Grad. Sch. Media & Governance Keio Univ., <sup>3</sup> Environment & Info. Studies, Keio Univ.)

Keywords: Pre-rRNA processing, Ribonuclease, Archaea

全ての生物種において、rRNA前駆体からrRNAの切り出しは極めて重要なRNAプロセシング過程の一つと言える。ここで真核生物においてはエンドリボヌクレアーゼであるNob1とその補助因子であるDim2/PNO1が18S rRNAの切り出しに関与している事が知られている。一方、アーキア（古細菌）ではこれらのタンパク質について分子構造学的な研究にその主眼が注がれており、生物学的な作用機序に関してはほとんどわかっていない。

本研究ではNob1, Dim2 両タンパク質による RNA 切断活性の解明を目的にすえ、超好熱性のアーキアである *Pyrococcus furiosus* をモデルケースに研究を遂行した。まず、同アーキア由来の相同タンパク質 (*Pf-Nob1* 及び *Pf-Dim2* と命名) を His-tag を付加した組換え体として大腸菌において産生、精製し、16S rRNA 前駆体プローブを用いた試験管内反応系を構築した。その結果、60℃という高温下で特異的な切断箇所が検出され、*Pf-Nob1* がエンドヌクレアーゼ活性を持つことを確認できた (変異型である D6N *Pf-Nob1* では該当する活性が検出できなかった)。そこで、5' RACE 法により切断部位を決定したところ、16S rRNA の3'末端を主に切断している事が明らかとなった。次に *Pf-Dim2* 存在下に *Pf-Nob1* による切断解析をしたところ、*Pf-Dim2* の濃度依存的に *Pf-Nob1* の切断部位が変わりうる事が新たに明らかとなった。変化後の切断部位は、RNA マーカーとの相対位置より、rRNA 前駆体上に存在する tRNA<sup>Ala</sup> の3'末端を切断していることが推定された。以上の結果は16S rRNA の3'末端の成熟化に関与する Nob1 が Dim2 依存的に切断部位を変化させることで tRNA 前駆体のプロセシングも制御している可能性（オルタナティブプロセシング）を示唆している。

## 胎児期・成体の心室筋細胞における収縮機構のモデリングとシミュレーション

瀧口 真央 佐野 ひとみ 内藤 泰宏 富田 勝

齧歯類の発生過程において、心臓は劇的な形態形成変化を経る。心臓を構成する心筋細胞ではイオンチャネルや交換体の量的変化はもちろん、胎児と成体では異なるアイソフォームが使われる質的な変化が報告されている。心筋細胞の収縮に関わるタンパク質のアイソフォームの変化はミオシン重鎖 (Myosin heavy chain: MHC) とトロポニンI (Troponin I: TnI) で報告されている。ラットの心室のMHCでは、生後5日頃に $\beta$ MHCから $\alpha$ MHCへ、TnIでは、骨格筋型トロポニンI (slow skeletal TnI: ssTnI) から、心筋型トロポニンI (cardiac TnI: cTnI) へと切り替わる。MHCのアイソザイムの割合の変化は、筋収縮時のATPase活性や筋収縮の速度に変化を及ぼし、TnIにおいては $\text{Ca}^{2+}$ の感受性に差を生じさせること報告されている。

本研究では、発生過程による収縮タンパク質のアイソフォームの変化が胎児期から新生仔期、そして成体の心臓において、収縮に必要なエネルギー消費に影響を及ぼすことに着目し、包括的な検討を行うための数理モデルを構築した。胎児期・新生仔と成体での収縮機構の比較を行なうため、包括的心筋細胞モデル (Kyoto model) にアイソフォームの違いを表現可能なNiedererら (2006)の収縮モデルを統合した。また統合したモデルに容積の調整やATP消費の考慮を加えた。心肥大などの疾病は胎児期特異的に発現するアイソフォームが再出現することが知られている。従って、アイソフォームを考慮した収縮機構のシミュレーションが可能になれば、胎児期の心筋細胞における収縮の動態を検討する数理モデルを病態の心筋細胞シミュレーションに応用することが可能であると考えられる。

## 胎生期の心室筋細胞において興奮収縮連関を司る要素の変化に関する コンピュータシミュレーション

脇田舞子、佐野ひとみ、内藤泰宏、富田勝

慶大・環境情報

心臓は、原始心臓筒から成体個体としての二心房二心室の形態変化に至るまで複雑な分化・発達を遂げながらも、その発生過程で一度も停止することなくポンプとしての機能を維持する。心臓の発生段階における異常は先天性心疾患に至る場合もあることから、種々のイオンチャネルが司る電気生理学的興奮や収縮の発生プログラムは厳密に制御される必要がある。心臓を構成する心筋細胞の多くは、胎生初期段階では自律的な興奮収縮を行う、後期段階に至る過程でその自律性が消滅し、刺激伝導系から受け取った電気刺激で活動電位を形成する受動的な細胞に変化を遂げる。このような発生過程の心筋細胞の遷移は細胞膜上のイオンチャネル、ポンプ、交換機転および筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  動態に関わるタンパク質の量的・質的变化が関わっている。

細胞の電氣的な挙動は単一細胞・単一イオンチャネルレベルでパッチクランプ法により高精度に計測され、定量データに基づく心筋細胞のシミュレーションモデルも数多く構築されてきた。我々の研究室では、モルモット心室筋細胞モデルである **Kyoto model** に基づいて、各イオン電流の電流密度を相対的に変化させることで胎生初期、後期の心筋細胞の膜興奮を再現した[1]。また、胎生初期と後期で異なる値をとるイオン電流のコンダクタンスを対象にし、全ての量的変化の組み合わせである 512 通りの心筋細胞をコンピュータ上で再現し、 $\text{Na}^+$ チャネル電流( $I_{\text{Na}}$ )の増加、ペースメーカー電流( $I_f$ )の消失、内向き整流性  $\text{K}^+$ 電流( $I_{\text{K1}}$ )の増加が順番に起こることをシミュレーションにより示唆した[2]。さらに  $I_{\text{Na}}$  と  $I_f$  が胎生初期における自律拍動の基本周期長の決定に関与していること、また  $I_f$  と  $I_{\text{K1}}$  の量において細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇するケースがあることを明らかにした。

本研究では、胎生初期から後期にかけての心室筋細胞の発生過程をより包括的に捉えるために、文献から取得した定量データに基づいてモルモット心室筋細胞の「胎生中期」段階を想定した数値を設定し、胎生初期から中期を経て後期へ発達する 9 つの要素の移り変わりを予測した。その結果、自律拍動が停止して外部刺激による興奮収縮に移行した胎生中期から後期での心室筋細胞では、 $I_f$ が早い段階で消失していることが興奮収縮連関に重要であることが示唆された。

[1]Itoh H, Naito Y, Tomita M. Simulation of developmental changes in action potentials with ventricular cell models. *Syst Synth Biol* **2007**;1:11–23.

[2]Okubo C, Sano HI, Naito Y, Tomita M. Contribution of quantitative changes in individual ionic current systems to the embryonic development of ventricular myocytes: a simulation study. *J Physiol Sci* **2013**;63:355–367.

## 包括的心筋細胞モデルに基づくヒト胚性幹細胞由来心筋細胞のシミュレーション

○松尾 采佳,田中雄一郎,佐野ひとみ,岩宮貴紘,富田勝 慶大・環境情報

再生医療は生体内の心臓の傷痕に対する新たな治療法として期待されており,近年発展が顕著な研究分野のひとつである.損傷した臓器の機能回復を目的とし,組織工学的アプローチにより幹細胞から作成したヒト心臓組織はブタへの移植実験において、非常に高い治療効果をもたらすことが示されており、ヒトへの臨床試験も開始されようとしている[1,2].このような移植を目的とした高機能な心臓組織の作成においては,心筋細胞のみではなく,心臓線維芽細胞が創り出す適切な細胞間ネットワークと細胞外マトリックスの重要性が示唆されている[3,4].コンピュータシミュレーションは,数理モデルに含まれるパラメータを変更することによって,実験データの追試に留まらず,実験では観察が難しい視点から定量的な予測データを提供する上で有効なアプローチである.Paci ら(2012)は,分化誘導開始後15~40日(初期) および分化50~110日目(後期)の心筋細胞でのヒト胚性幹細胞由来心筋細胞(hESC-CM) の活動電位を再現するため,hESC-CMにおける種々のイオンチャネルの電流密度を既存の包括的心筋細胞モデルに統合した[5].

本研究では,hESC-CM の挙動を再現する Paci model で採用されたパラメータセットをヒト心室筋細胞モデル[6]に統合し,ヒト成体心室筋細胞と分化誘導後の代表的な2つの時期における膜興奮のシミュレーションを行った.本発表では,予備検討として実施した,心臓線維芽細胞と心室筋細胞モデルの組合せによる膜興奮への影響についても議論したい.

[1]M. Kawamura et al.,Feasibility, safety, and therapeutic efficacy of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte sheets in a porcine ischemic cardiomyopathy model (2012). Circulation 126(11): 29-37 [2]M. Kawamura et al.,Enhanced survival of transplanted human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by the combination of cell sheets with the pedicled omental flap technique in a porcine heart (2013). Circulation 128: S87-S94

[3]K. Matsuura et al.,Creation of human cardiac cell sheets using pluripotent stem cells (2012) Biochemical and Biophysical Research Communications 425(2): 321-327 [4]T.Iwamiya et al.,特願2014—142804,PCT/JP2015/050028

[5] M. Paci et al.,Mathematical modelling of the action potential of human embryonic stem cell derived cardiomyocytes (2012) Biomedical Engineering Online, 11:61 [6]K. Asakura et al.,EAD and DAD mechanisms analyzed by developing a new human ventricular cell model.(2014) Progress in Biophysics and Molecular Biology 116(1):11-24

## アブラナ科植物芽生えにおける代謝物質と系統関係

西村光平, 若山正隆, 曾我朋義, 富田勝

アブラナ科植物は自家不和合成を持つことから多様性に富む植物である。また、広く野菜として食される品種が多く、近縁でありながら特性が異なる品種もある。しかしながら、それらの系統関係と網羅的な代謝物の構成比の関係について考察した研究は少ない。アブラナ科植物における代謝物と系統の関係性はその特性を高めるための育種研究においても重要である。我々は代謝物と系統の関連性を明らかにすることを目的とし、生育条件をそろえやすい芽生えを中心にアブラナ科植物のメタボローム解析を実施した。アミノ酸、有機酸などのイオン性代謝物は CE-MS、単糖・二糖は LC-MS を用いて測定を行った。測定結果を階層的クラスタリング解析及び主成分分析を用いて統計学的に表現し、系統との関係性について考察した。

## ノルウェー産オイル産生微細緑藻類未同定株の系統的位置と形態的特徴

○川崎悠里子<sup>1,2</sup>, 仲田崇志<sup>1,2</sup>, 富田勝<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>慶大・先端生命研、<sup>2</sup>慶大・政策メディア・先端生命)

オオヒゲマワリ目の藻類の分類は、主に形態学に基づいており、分子系統学を用いた見直しが必要である。我々はこれまでに、主に形態学に基づいて分類されたオイル産生性の不動性藻類 *Chlorococcum oleofaciens* (緑藻綱、オオヒゲマワリ目) とその異名とされた 6 種、さらにその近縁種や近縁株全 18 株について、18S rRNA 遺伝子系統解析、ITS1 および ITS2 rRNA の二次構造比較、光学顕微鏡観察に基づいて種分類を再検討した (2013 年大会)。検討した株の中で、ノルウェーで採集された cf. *Chlorococcum* sp. の株がオイル産生微細藻類の未記載種の可能性があったため、本研究では 18S rRNA 遺伝子解析の見直しと形態観察を行った。本種は 18S rRNA 遺伝子系統解析において *C. oleofaciens* を含む 15 株と単系統群を形成し、中でも *Macrochloris radiosa* の正統株と特に近縁であった。また、成熟した細胞が球形で、細胞の中心付近に集まった複数の核を持つことから、*C. oleofaciens* とその近縁種と区別され、*Macrochloris* 属に同定された。また、本種は主に最大細胞サイズが小さいことから、*M. radiosa* を含む *Macrochloris* 属の他の種と区別された。本種は成熟細胞が赤い油滴を蓄積することが特徴であるが、細胞が赤くなることが知られている他の不動性オオヒゲマワリ目と比較しても不均等な油滴サイズや肥厚しない細胞壁などの形態的特徴から区別され、新種であることが示唆された。

## 異なる体表部位における皮膚常在菌叢の機能推定

### Estimation of the skin microbiota function in different human body surfaces

吉川実亜<sup>1,2</sup>, 出来尾格<sup>3</sup>, 富田勝<sup>1,2</sup>, 福田真嗣<sup>2</sup>

1 慶大・先端研

2 慶大・環境情報学部

3 東女医大・東医療皮膚科

ヒトの皮膚には多数の細菌が生息している。これら皮膚常在菌叢の構成は部位ごとに大きく異なることが報告されているが、それぞれの部位でどのような機能を有しているかは明らかになっていない。そこで本研究では、多部位の細菌叢が有する遺伝子機能を推定した。その結果、いずれの体表部位においても全体的には類似した遺伝子機能を有していることが示唆された。一方でいくつかの遺伝子群では部位ごとに有意な違いが見受けられた。本研究成果は部位特異的な皮膚疾患の病態解明における有用な知見につながる可能性があると考えられる。

## 欧米食がもたらす腸内細菌叢および腸内代謝物質の変動

○石井千晴<sup>1,2</sup>、中西裕美子<sup>1,2</sup>、村上慎之介<sup>1,2</sup>、野津量子<sup>4</sup>、植野昌未<sup>4</sup>、  
日置恭司<sup>4</sup>、高倉彰<sup>4</sup>、平山明由<sup>1,2</sup>、曾我朋義<sup>1,2,3</sup>、伊藤守<sup>4</sup>、富田勝<sup>1,2,3</sup>、  
福田真嗣<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>慶應義塾大学先端生命科学研究所

<sup>2</sup>慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科

<sup>3</sup>慶應義塾大学環境情報学部

<sup>4</sup>実験動物中央研究所

keyword: 腸内細菌叢、腸内代謝物質、欧米食

【背景・目的】 近年、腸内細菌叢の構成や、腸内細菌叢が産生する代謝物質が宿主に正負両面の影響を与えることが明らかになってきた。特に欧米型の脂肪過多な食生活を長期的に継続することで、アンバランスな腸内細菌叢が誘導され、その結果として大腸がんや肝臓がん、2 型糖尿病をはじめとするメタボリックシンドロームなどのリスクが高まることが報告されている。しかし、これらの報告におけるマウス実験においては、脂肪分が30~60%の高脂肪食が使用されており、ヒトが摂取する食事としては非現実的である。そこで本研究では、現実的な高脂肪食がマウス腸内環境に与える影響を解析した。

【実験】 アメリカ人の食事の栄養組成を模倣した脂肪分 15%の飼料、もしくは脂肪分

5%のコントロール食を C57BL/6J マウスに投与し、経時的に(8, 12, 24, 36, 52 週齢)体重測定および糞便採取を行った。糞便サンプルから超並列シーケンサーを用いた腸内細菌叢の網羅的解析および、キャピラリー電気泳動時間飛行型質量分析装置(CE-TOF/MS)を用いた腸内代謝物質の網羅的解析を行った。

【結果・考察】 欧米食群とコントロール群のマウスの体重には有意な差は見られなかった。

一方で、腸内細菌叢プロファイルの判別分析からは、欧米食群で *Lachnospiraceae* 科、*Oscilliospira* 属の割合が高く、*Bacteroides* 属の割合が低いことが示された。代謝物質解析からは、欧米食群においてビタミン B6 濃度の減少や短鎖脂肪酸濃度の増加が示された。これらのことから、現実には脂肪割合の食事は、体重に変化を及ぼすことはなかったが、腸内環境を変動させることが明らかとなった。

マウスマクロファージ様細胞株の内毒素耐性時における代謝動態の解明  
**Elucidation of the metabolic dynamics in murine macrophage cell line during  
endotoxin tolerance**

伊藤 優太郎

慶應義塾大学大学院 政策・メディア研究科

マクロファージは連続的な抗原刺激に対して応答性が低下することが知られており、この現象は内毒素耐性と呼ばれる。われわれは内毒素耐性時の細胞内代謝動態に着目し、マウスマクロファージ様細胞株に連続的に抗原（大腸菌のリポ多糖）を曝露した際の細胞内代謝物質を網羅的に解析した。その結果、内毒素耐性時は糖ヌクレオチド代謝経路が活性化することが明らかとなった。内毒素耐性は敗血症等との関連が報告されており、本研究成果は臨床応用へも繋がると考えられる。

## RNA - RNA 結合タンパク質の結合領域を 2 次元可視化するソフトウェアの開発とその応用

○玉木 聡志<sup>1,2</sup>、富田 勝<sup>1,2,3</sup>、金井 昭夫<sup>1,2,3</sup> (1.慶大・院・政策・メディア 先端生命科学、2.慶大・先端生命科学研究所、3.慶大・環境情報学部)

キーワード: バイオインフォマティクス, tRNA, タンパク質, 可視化, 進化遺伝情報の制御

機構を正確に解析するためには、核酸とそれを認識するタンパク質の高次構造上での理解が必須である。特にRNAとタンパク質の複合体は転写、RNAプロセッシング、翻訳といった遺伝情報発現系の根幹をなす機能に直結しており、両者が結合する領域に対する理解はその機能を解明する上で必要不可欠であると考えられる。近年、核酸とその制御タンパク質の立体構造データが蓄積してきている一方で、これらの構造を網羅的に比較解析していくことは未だに困難さを伴っている。そこで、我々はタンパク質構造データベース(PDB)から取得したデータを基に、contact mapアルゴリズムを拡張する方法で、核酸とその制御タンパク質の結合に関与する塩基配列やこれを認識するアミノ酸残基を二次元空間上の写像に描画する方法を考案した。本発表では、具体例として、tRNA及びtRNAに特定のアミノ酸を結合させるアミノアシルtRNA合成酵素(RS)の複合体を解析した結果について報告する。バクテリアとアーキア8種を対象とし、tRNA - RSの構造データを網羅的に取得、解析を行った。その結果、例えばtRNA<sup>Val</sup>では、これまでtRNA認識のアイデンティティ関わるアンチコドン領域や3'末端側に対応する領域の塩基が特定され、また、これらの塩基を認識するRS上のアミノ酸を2次元上で可視化することができた。さらに、可視化されたパターンはtRNA毎に様々な特徴を有することが明らかとなり、異なる構造データを簡便に比較検討することが可能になった。これらのデータを配列の保存性と共に解析することで、分子進化的な解析にも応用できる可能性がある。

## Genome-wide identification of A-to-I editing in human miRNA by ADAR isoform-specific RIP-sequencing

○石黒 宗<sup>1,2</sup>、ガリポン ジョゼフィーヌ<sup>1</sup>、石井 倫太郎<sup>3</sup>、鈴木 穰<sup>3</sup>、近藤 伸二<sup>4</sup>、岡田 眞里子<sup>5</sup>、富田 勝<sup>2</sup>、程 久美子<sup>1,3</sup> (1.東大・理院・生物科学、2.慶大・先端生命、3.東大・新領域・情報生命、4.国立極地研、5.理研・統合生命医科学)

キーワード:RNA editing, ADAR, miRNA

Adenosine deaminases acting on RNA (ADARs) catalyze the deamination of adenosine (A) to inosine (I). A- to-I RNA editing occurs specifically on double-stranded RNA (dsRNA) region, and increases the complexity of gene regulation by modulating crucial base pairing-dependent processes such as splicing, translation, and microRNA (miRNA)-mediated gene silencing. In human, the ADAR1-p150, -p110, and ADAR2 isoforms have deaminase activity. However, the editing sites and target RNA species specific for each ADAR isoform have not yet been determined in a comprehensive manner. To identify as much candidate editing sites as possible, RNA immunoprecipitation-sequencing (RIP-seq) was performed using HeLa cells transfected with either one of human ADAR isoform. In miRNAs, a total of 33 editing sites was identified for ADAR1-p110 and ADAR2, 24% of which overlapped with the known editing sites identified in the previous studies. Interestingly, such editing sites were significantly concentrated in the miRNA seed regions that are essential for target recognition. Furthermore, the nucleotide motifs of editing site for ADAR1-p110 was different from that for ADAR2. In addition, we provide insight that ADAR binding to miRNAs may result in regulation of miRNA processing.

## 内毒素耐性時のマウスマクロファージ様細胞株における代謝動態の解明

○伊藤 優太郎<sup>1,2</sup>、田畑 祥<sup>1,2</sup>、富田 勝<sup>1,2,3</sup>、福田 真嗣<sup>1,2</sup> (1.慶大・先端生命研、2.慶大・院・政策・メディア、3.慶大・環境情報)

哺乳類の腸内には宿主免疫細胞と腸内細菌が共生する非常に複雑な生態系が構築されている。この共生関係を維持する上で、宿主の免疫細胞における自己、非自己の認識は必要不可欠な機能である。マクロファージは腸管内において非自己抗原を認識し、自然免疫応答を活性化する重要な役割を担う免疫細胞として知られている。また、マクロファージは同一抗原による複数回の刺激に対して応答性が低下することが報告されており、この現象は内毒素耐性と呼ばれている。現在、内毒素耐性が起こるメカニズムとしてエピジェネティック修飾、キナーゼ等によるシグナル伝達経路の調節、miRNAによる転写後調節などが指摘されているが、これらの調節機能のみで内毒素耐性時に生じる全ての現象を説明することは難しく、その他にも細胞内に何らかの変化が生じていると考えられる。一方で、マクロファージは代謝動態を変えることで、様々な抗原に対する応答性を変化させることが知られている。そのため、内毒素耐性時における代謝動態を明らかにすることで、本現象のメカニズムをより詳細に理解することができる考えた。そこで本研究ではマウスのマクロファージ様細胞株であるRAW264.7を用いて、大腸菌のリポ多糖による刺激を2回行うことで、マクロファージの内毒素耐性を*in vitro*で再現し、その際の細胞内代謝物質を網羅的に解析した。その結果、内毒素耐性時には解糖系から分岐した代謝経路である糖ヌクレオチド代謝が活性化していることが示唆された。糖ヌクレオチドの1種であるUDP-N-アセチルグルコサミンは、炎症性サイトカイン等の発現を調節する転写因子であるNF- $\kappa$ Bの糖鎖修飾に関与するなど、自然免疫応答に重要な物質であることが知られている。したがって、マクロファージにおいて内毒素耐性が生じるメカニズムの一端は糖ヌクレオチド代謝によって制御されている可能性が考えられた。マクロファージの内毒素耐性は敗血症等の疾患に関与することが報告されていることから、本研究成果は臨床応用の可能性も秘めていると考えられる。

## 高精度に腎機能を予測する新規バイオマーカー探索

○岡崎 仁美<sup>1,2</sup>、平山 明由<sup>1</sup>、秋山 真一<sup>3</sup>、丸山 彰一<sup>3</sup>、安田 宜成<sup>3</sup>、富田 勝

<sup>1,2</sup> (1.慶大・先端生命研、2.慶大・環境情報、3.名古屋大・医学部・腎臓内科)

キーワード: Renal function, Metabolomic signature, Metabolomics

慢性腎臓病(CKD)は新たな国民病といわれている。日本において、糸球体濾過量(GFR)はCKDを評価する診断の一つである。また、CKDの重症度の評価にもGFRは用いられている。現在、GFR測定のゴールドスタンダードはイヌリンクリアランス測定である。しかし、イヌリンクリアランスの測定には多くの時間と労力を要する。そのため、医療現場では血清クレアチニン値や血清シスタチンC値から算出する推定糸球体濾過量(eGFR)が用いられている。しかしながら、血清クレアチニン値は筋肉量や肝機能によって、血清シスタチンC値は甲状腺機能やウイルス感染等によって濃度が変化するため、正確な値を求めることができない。そこで、イヌリンやクレアチニン、シスタチンCに代わる新しいバイオマーカーを探索するために、本研究はキャピラリー電気泳動-質量分析法 (CE-MS)を用いてイヌリンクリアランスのわかっている173人の血漿と尿の網羅的メタボローム測定を行った。その結果、血漿では250種類の代謝物由来と思われるピークが検出された。検出された血漿中代謝物質のプロファイルを調べるために主成分分析を行ったところ、ゴールドスタンダードであるイヌリンクリアランスの値にしたがって対象者を分けることができた。さらに、主成分分析の因子負荷量の結果から、血漿中の幾つかの代謝物が対象者の分離に大きく寄与していることがわかった。現在、これらの代謝物の同定作業を進めているところである。また、尿中代謝物質の解析も進行中であり、各代謝物の血中および尿中の存在比を考慮しながら解析することで、代謝物の移行性を加味した新しい診断指標を作成できるのではないかと考えている。

## 高線量ガンマ線に対するヨコヅナクマムシの応答解明に向けた経時的微量トランスクリプトーム解析

○吉田 祐貴<sup>1,2</sup>、堀川 大樹<sup>3</sup>、坂下 哲哉<sup>4</sup>、國枝 武和<sup>5</sup>、桑原 宏和<sup>5</sup>、豊田 敦<sup>6</sup>、  
片山 俊明<sup>7</sup>、小林 泰彦<sup>4</sup>、富田 勝<sup>1,2</sup>、荒川 和晴<sup>1,2</sup>

(1.慶大・先端生命、2.慶大・環境情報、3.慶大・SFC研、4.原子力機構・マイクロビーム細胞照射、5.東大・院理・生物化学、6.遺伝研、7.ライフサイエンス統合データベースセンター)

キーワード: *Ramazzottius varicornatus*, Gamma ray, DNA double strand breaks, Low input RNA-Seq

いくつかの陸生のクマムシは周辺環境が乾燥することにより乾眠と呼ばれる状態に移行することが可能である。特にヨコヅナクマムシはこの乾眠状態では低温・高圧・高線量の放射線などの極限環境に対して高い耐性を持つことが知られる。しかし、DNAに二重鎖切断(DSB)のような損傷を引き起こす放射線に限っては通常の活動状態でも乾眠状態に匹敵する耐性を示すことから、ストレスに対する細胞の防御機構だけではなく、強力な修復機構を持つと考えられる。そこで我々はヨコヅナクマムシの強力な修復機構が存在するかを検証すべく、飼育の難しさから困難であったレプリケートありの経時的RNA-Seq解析を30匹という微量の個体数よりシーケンスすることで実現し、<sup>60</sup>Coガンマ線を500 Gy照射したヨコヅナクマムシに対して解析を行った。その結果、照射によって発生したDSBの修復は早い段階で非同末端結合によって行われ、その後に細胞分裂が起きている可能性が示唆され、更にヨコヅナクマムシ特有の遺伝子の多数にも発現増加が認められた。今後はこれらの知見をもとにDNAの損傷量やDNAの分裂を実験的に測定する予定である。

## 両生類胚の初期発生においてIRG1は高温特異的に発現する

○久保 友理恵<sup>1</sup>、伊藤 弓弦<sup>2</sup>、小沼 泰子<sup>2</sup>、富田 勝<sup>1,3</sup>、黒田 裕樹<sup>1,3</sup>

(1.慶應大学・環境情報、2.産総研、3.慶應大学・先端生命科学)

キーワード:初期発生, 温度変化, IRG1, マイクロアレイ, in situ hybridization

代表的なモデル実験動物であるアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)は、13 °Cから30 °Cという幅広い温度範囲において正常に胚発生を進めることができる。そのためには温度依存的に生じるタンパク質コンフォメーション変化等のダメージを軽減させるための遺伝子発現が行われていることが示唆される。そこで、我々は温度特異的に胚発生で発現する遺伝子の同定ならびに解析に取り組むことにした。

低温として15 °C、常温として22 °C、そして高温として29 °Cの3段階で原腸胚期まで培養したそれぞれのサンプルからTotal RNA抽出し、マイクロアレイスクリーニング解析を行ったところ、高温条件においてIRG1 ( immunoresponsive gene 1)が有意に高い発現を示すことを発見した。IRG1はその大部分をMmgE/PrpDというプロピオン酸代謝に関わるドメインで占められたタンパク質であり、ゼブラフィッシュの成体における強制発現では、マクロファージの活性化ならびにミトコンドリア内で活性酸素の生成の促進などが起こることが報告されている。我々は、IRG1の高温特異的な発現をRT-PCRでもin situ hybridizationで確認した上で、IRG1のツメガエル胚への顕微注入を軸とした機能解析に取り組んだ。その結果、予想していた通り、IRG1 mRNAを注入した胚では温度変化に対する胚の感受性が変化することが確認された。これらのことから、IRG1は初期発生においてタンパク質コンフォメーション変化などが生じる過酷な条件下において、何らかの代謝経路を制御することによって生体を受けるダメージを緩和させるために発現する遺伝子であることが推定される。

## 先天性筋ジストロフィーモデルrmdマウスのマルチオミックス解析

○高藤 真由子<sup>1, 2</sup>、池田 和貴<sup>3</sup>、青山 智英子<sup>4</sup>、三橋 里美<sup>4</sup>、杉本 博之<sup>4</sup>、有田 誠<sup>3</sup>、富田 勝<sup>1, 2</sup>

(1. 慶大・先端生命研、2. 慶大・環境情報、3. 理化学研究所統合生命医科学研究センター メタボローム研究チーム、4. 獨協医大・医学部・生化学講座)

キーワード:rmdマウス, 筋ジストロフィー, グリセロリン脂質, メタボローム, LC-MS

Congenital muscular dystrophy (CMD) is a group of inherited genetic disorders with muscle weakness and hypotonia as representative symptoms in early infancy. Recently we reported a new type of CMD, characterized by mitochondrial disorder. Biological analysis of this disease has shown that choline kinase  $\beta$  (Chkb), the first enzyme of the biosynthetic pathway of phosphatidylcholine (PC), the most abundant phospholipid in mammals, is responsible. The aim of this research is what kind of effect on lipid metabolism by Chkb deletion and PC decrease, based on the comparison between control and rostral-to-caudal muscular dystrophy (rmd) mice with abnormalities of Chkb and mitochondrial disorders. We conducted a metabolic variability analysis of the quadriceps muscles using transcriptomics (microarray analysis) and metabolomics (LC-MS analyses). As a result, Chkb deletion influenced phospholipid distribution of cell membrane qualitatively and quantitatively. PC molecular species were tend to decrease in rmd mouse, in particular, PC containing docosahexaenoic acid (22:6) are significantly decreased. On the other hand, phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS) molecular species were mostly increased in rmd mouse. Some types of phospholipase A2 (Pla2g2d, Pla2g2e) were up regulated in rmd mouse, which might result in an increase of Lyso PE or Lyso PS and the fatty acids. Among them, inflammatory mediators such as prostaglandin E2 and prostaglandin D2, and these synthase expression levels were dramatically increased. That might result in inflammation of muscles and lead to the muscular dystrophy.

## ランダム増幅多型DNA法による*Bifidobacterium longum*のゲノム配列比較

○渡部 翔<sup>1, 2</sup>、富田 勝<sup>1, 2, 3</sup>、福田 真嗣<sup>1, 3</sup>

(1. 慶大・先端生命研、2. 慶大・環境情報、3. 慶大・院・政策・メディア)

ヒト腸内細菌叢は、宿主の消化、吸収、代謝への関与、免疫機能の活性化や病原菌の増殖抑制など、宿主の恒常性維持に重要な役割を担っている。腸内細菌叢のバランスを維持するには、プロバイオティクスが効果的であることが知られているが、個々人の腸内環境は異なっているため、その効果には個人差があると考えられる。一人ひとりの腸内環境に合わせたパーソナライズドプロバイオティクスを確立することができれば、健康維持・増進につながると考えられることから、本研究では、プロバイオティクスの腸内定着メカニズムを明らかにするための第一段階として、腸管内に生息しているビフィズス菌(*Bifidobacterium longum*)を分離・培養し、ランダム増幅多型DNA法によってゲノム配列の比較を行った。2名の健常者から14ヶ月に渡り糞便を3回採取し、分離した*B. longum*のゲノムをランダム増幅多型DNA法により解析したところ、*B. longum*のゲノム配列は個人間で異なることが明らかになった。各個人には1～4株の*B. longum*が存在していることが示唆され、2名に共通した株は存在しなかった。この結果は、*B. longum*のゲノム配列の違いが腸管内への定着効率に影響している可能性を示唆している。さらに、個人内での時間経過に伴った*B. longum*の変化を調べたところ、6ヶ月程度維持されている株は存在したが、14ヶ月維持されている株はいなかった。本研究の結果より、個人固有のビフィズス菌が腸管内に存在しているが、時間経過に伴ってゲノム配列あるいは株レベルでの変化が生じている可能性が示唆された。今後はこれらのゲノム解析を行うことで、腸内定着に関与する遺伝子の探索を実施する。プロバイオティクスの腸内定着メカニズムを明らかにできれば、科学的根拠に基づく新たなプロバイオティクス開発につながると考えられる。

## 異なる体表部位における皮膚常在菌叢の機能推定

○吉川 実亜<sup>1,2</sup>、出来尾 格<sup>4</sup>、富田 勝<sup>1,2,3</sup>、福田 真嗣<sup>1,3</sup>

(1. 慶大・先端生命研、2. 慶大・環境情報、3. 慶大・院・政策・メディア、4. 東女医大・東医療皮膚科)

ヒト一人の皮膚には多数の細菌が生息しており、皮膚常在菌叢を形成している。これらは紫外線や温度、湿気等を含む環境ストレスに対して、皮膚の耐性を高める可能性があることが示唆されている一方、皮膚疾患にも関連していることが知られている。また、皮膚常在菌叢の構成は経時的な変化が少ないことや、同一個人においても部位ごとに大きく異なることが報告されている。しかし、これらの皮膚常在菌叢がそれぞれの部位でどのような機能を有しているかは明らかになっていない。そこで本研究では、頭皮、顔面、臀部の皮膚常在菌叢を解析したところ、遺伝子機能全体に大きな違いはなかったものの、いくつかの遺伝子群については、体表部位ごとに有意な差があることが明らかとなった。われわれはまず異なるヒト体表部位から皮膚常在菌叢を採取し、超並列シーケンサーにより16S rRNA遺伝子の網羅的解析を実施した。その結果、過去の知見と同様に細菌叢構成は部位により大きな違いがあることが示唆された。さらに臀部は他部位と比較して有意に多様性が高いことも明らかとなった。また、細菌叢が有する遺伝子機能についてPICRUSTを用いて推定したところ、いずれの体表部位においても全体的には類似した遺伝子機能を有していることが示唆された。一方で、いくつかの遺伝子群では部位ごとに有意な違いが見受けられ、例えば臀部においてリノール酸代謝に関わる遺伝子群の存在量が有意に高く、リボ酸代謝に関わる遺伝子群の存在量が有意に低いことが明らかになった。皮膚疾患は部位特異的に発症することが多いことが知られていることから、本研究成果は皮膚疾患の病態解明に有用な知見につながる可能性があると考えられる。

## HIV-1 pol領域における配列類似性ネットワーク構築と段階的クラスタリングによる配列保存性解析

○永田 祥平<sup>1, 2</sup>、今井 淳之介<sup>1, 3</sup>、牧野 岳都<sup>1, 2</sup>、富田 勝<sup>1, 2, 3</sup>、金井 昭夫<sup>1, 2, 3</sup>

(1. 慶大・先端生命研、2. 同・環境情報、3. 同・政策メディア・先端生命)

キーワード:HIV, Bioinformatics, Protein domain, Molecular evolution

RNAウイルスは進化速度が非常に速く、生命の分子進化プロセスを観察する上で良いモデル系の一つとなっている。その中でもレトロウイルスの一種であるヒト免疫不全ウイルス(HIV)は系統間や同一宿主内においても高い遺伝的多様性をもつ。一方で、このような多様な配列を用いて全体の系統関係とその保存性の傾向を可視化して俯瞰することはこれまで困難であった。本研究では、HIV-1のpolタンパク質アミノ酸配列2052配列を用いた大規模な系統ネットワークの描写を通じて、ウイルス進化に伴う機能ドメイン領域の変異部位にどのような特徴があるのかの検証を行った。まず、HIV-1の主系統であるGroup M (Subtype A:144配列, B:1528配列, C:380配列)に由来するpol領域のアミノ酸配列を対象に、総当たりで相同性解析を行い、配列類似性ネットワークの描写と、配列類似度に基づいたクラスタリングを行った。クラスタリングを行う際、ネットワーク間の構造に基づいたクラスター分画手法であるスペクトラルクラスタリングを行い、段階的にクラスター数を変更する事でpolタンパク質の変異の要因を解析した。その結果、全体のウイルス進化を俯瞰するとともに、分割数を増加させてしていくのに従い、Subtype A, Cはそれぞれで1つのクラスターを形成したまま、Subtype Bがより詳細に分画されることが明らかになった。クラスター内の配列の内訳を観察すると、サンプリングされた年代や地域によってより詳細に分画されることが示唆された。さらに、それらの違いがpolタンパク質のどの領域の変異に起因するのか検証するために、各クラスターごとに機能ドメイン配列を抽出して配列保存性解析を行った。その結果、Reverse transcriptase thumb domain領域に特に変異が多く見受けられるなど、ドメインごとに配列保存性の傾向が異なることが示唆された。本大会では、HIV-1 polタンパク質配列の配列保存性の傾向と合わせ、HIV-1におけるサブタイプの分化とその分子進化について考察したい。

## ダイコンのメタボローム解析における前処理方法 —凍結乾燥処理を中心とした解析—

西村光平, 若山正隆, 曾我朋義, 富田勝

メタボローム解析において試料の保存、破碎、抽出処理は常に行われているが、その影響に関する研究は限られる。凍結乾燥は長期間品質を落とさず保存できるため食品では広く活用され、メタボローム解析においても用いられる。凍結乾燥は予備凍結、一次乾燥、二次乾燥の3つの工程に分けられる。予備凍結では試料を冷却し、試料内の水分を凍らせる。一次乾燥では試料を減圧し、氷を昇華させることで、脱水の大部分を行う。二次乾燥では一次乾燥で取り除けない不凍水分を温度上昇により気化して取り除く。昇華を伴う一次乾燥では予備凍結での試料の完全凍結が必須である。しかし試料内部の凍結状態を正確に把握することは難しく、凍結が不十分のまま減圧処理を行うことも考えられる。本研究では凍結乾燥における十分な予備凍結の有無をはじめ、前処理手法の違いによる代謝物質への影響を明らかにした。ダイコン芽生えを材料にアミノ酸、有機酸を CE-MS、糖を LC-MS で網羅的に解析した。液体窒素による予備凍結を行った試料は、乾燥後もその形状をとどめていたが、氷上での冷却のみ行った試料では、茎の切断面および葉の表面が大きく波打つように萎縮していた。代謝物への影響は凍結乾燥処理において、氷上での冷却し凍結乾燥機にかけた試料では GABA の濃度が著しく上昇し、逆にグルタミン酸の濃度が減少した。その他の代謝物への影響については本発表において報告する。

## 玄米の発芽に伴う代謝変動の解析

松田りら，若山正隆，曾我朋義，富田勝

種子の発芽は，温度や湿度といった物理的要因の他に吸水による水の浸潤と浸透に伴う各酵素の活性化，貯蔵物質の分解などの生理的要因が関係している．イネの種子発芽制御に関しては，胚乳組織内の貯蔵物質の分解に関与する酵素および遺伝子発現などの分子メカニズムに着目した研究が報告されている．また，玄米を一定温度下でわずかに発芽させた発芽玄米の GABA を富化させる条件検討や発根制御に関する研究が進められている．しかしながら，GABA や主要アミノ酸以外の代謝物についての調査は少なく，また発芽時の詳細な代謝変動は明らかにされていない．そこで，玄米発芽に伴う代謝変動を明らかにするために，イネの発芽期の温度である 20℃での発芽処理を行い，48 時間のメタボローム解析を行った．糖は LC-MS，有機酸およびアミノ酸は CE-MS を用いて測定した．その結果，グルコースおよびスクロースは発芽処理後 12 時間までは増加した．その後，スクロースは減少し続け，グルコースは一旦減少し，再び増加した．一方で，フルクトースは 24 時間以降に急激に増加することが確認された．これらの変化に伴い，胚部の肥大が見られた．このことから，発芽および伸長成長に必要な炭素源，エネルギー源として利用されたために，減少したと考えられる．

## **Does Metabolic Heterogeneity in Liver Optimize the Efficiency of Ammonia Elimination? : a Simulation Study**

Shoko Jinno, Yasuhiro Naito and Masaru Tomita

The liver metabolizes wide variety of chemical compounds. Human liver consists of half a million hepatic lobule in which 5 billion hepatocytes are assembled. In the liver lobule, hepatocytes line along a fenestrated capillary vessel termed sinusoid. The blood from the portal vein and hepatic artery flows into the sinusoid and out to the central vein. This construct is referred to as port-central axis(PCA), which is the smallest repetitive unit of liver metabolism. It is known that there is many heterogeneities of various metabolic aspects in PCA. It is referred to as &quot;metabolic zonation&quot;. While many histological facts phenomena of metabolic zonation were reported, their biological significances and/or functions are still unclear. Even the present gene engineering technologies cannot such as conditional gene knockout and/or knockdown are insufficient to regulate metabolic zonation at will. In this study, we tried to elucidate what drives metabolic zonation of liver ammonia metabolism using mathematical model and computer simulation. Mathematical model allows to change arbitrary variable in the model. Various &quot;possible&quot; PCA models were created through virtual evolution using genetic algorithm (GA). We compared the models and estimated which elements play a major role to adapt various selective pressures in PCA. The simulation results suggested that gradual expression of solo or a few enzymes along PCA enhanced the efficiency of ammonia elimination.

## Developmental changes in ventricular cell contraction: a simulation study

Maiko Wakita, Hitomi I. Sano, Yasuhiro Naito, Masaru Tomita

As the heart develops, it gains new functions while continuously pumping blood; abnormalities during this developmental period may cause congenital heart malformations. Therefore, the developmental program of the heart, including expression of genes encoding various ion channels, is likely to be tightly regulated. Previously, we demonstrated that developmental changes in action potentials were well represented the  $\text{Na}^+$  current ( $I_{\text{Na}}$ ) increased before the disappearance of the funny current ( $I_f$ ) followed by a 10-fold increase in inward rectifier  $\text{K}^+$  current ( $I_{\text{K1}}$ )—via simulation of the 512 combinations between early embryonic (EE) and late embryonic (LE) stages. Here, we constructed a model of the middle embryonic (ME) stage of a guinea pig ventricular cell based on experimental data and considered structural changes during embryonic development. We then shifted relative current densities from EE, ME, to LE stages to determine factors that contribute to developmental changes in the contraction of a ventricular cell. We demonstrated that a decrease in  $I_f$  density was necessary for proper excitation-contraction coupling after the disappearance of spontaneous activity. Furthermore, we showed that representation of developmental changes in transverse tubules in a ventricular cell is necessary to quantitatively describe the contraction of a developing ventricular cell.