刷り上り見本



表題
発表者名
（全員の所属）

# 無菌ラットを用いた遺伝子発現の網羅的解析による メナキノン－4標的遺伝子の検索

大崎 雄介　白川 仁　佐藤 俊郎*
駒井三千夫
（東北大学大学院農学研究科栄養学分野，*J-オイルミルズ）

和文要旨
400字

要 旨： 生体内でビタミンK（K）から変換されるビタミン$K_2$の一種であるメナキノン－4（MK-4）の作用を解明する目的でMK-4欠乏モデル動物の作出を試みた．K欠乏による血液凝固不全を伴うことなくMK-4欠乏動物を作出するために，Wistar系無菌ラット（雄，5週齢）をコントロール飼料および2',3'－ジヒドロフィロキノン（$dK_1$）添加飼料を与えて飼育した．コントロール群と比較して$dK_1$群ではプロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間が有意に延長した．組織中のK含量を測定した結果，コントロール群と比較して$dK_1$群で精巣，脳のMK-4濃度がそれぞれ3分の1，7分の1と有意に低下した．遺伝子発現量を網羅的に解析した結果，精巣においてタンパク質プレニル化に関与するいくつかの遺伝子種の発現変化が認められ，MK-4がイソプレノイド代謝を調節している可能性が示唆された．

和文キーワード：5語まで

キーワード：ビタミンK（K），メナキノン－4（MK-4），2',3'－ジヒドロフィロキノン（$dK_1$），DNAマイクロアレイ，無菌ラット

本文 2000字程度

## I はじめに

他に、目的など

改行

ビタミンK(K)は，K依存性タンパク質のグルタミン酸残基をγ－カルボキシグルタミン酸残基に変換する反応（Gla化）の補因子として作用し，血液凝固や骨代謝において重要な役割を果たしている．Kは3位の側鎖の違いによっていくつかの同族体に分類され，$K_1$はフィチル基を側鎖とし，$K_2$はイソプレン側鎖を有している．Kは食事から摂取する他に腸内細菌によって生産され，宿主に吸収・利用される．これらK類の一部は各組織内の酵素により，$K_2$の一種であるメナキノン－4（MK-4）へと特異的に変換されることが明らかとなっており[1]，このことからMK-4はGla化以外の未知の作用を有している可能性が示唆されている．

従来，MK-4の作用解明を目的として組織中のMK-4濃度を低下させるために，実験動物にK欠乏飼料を与える方法が採られてきた．しかし，K欠乏食の給餌により速やかにK欠乏症が発症するため，比較的MK-4濃度の高い精巣や脳などでは十分にMK-4濃度を低下させることができなかった．近年，加工油脂の製造工程で行なわれる水添反応において$K_1$から生じる2',3'－ジヒドロフィロキノン（$dK_1$）はK類のGla化能を有していながらMK-4へと変換されないことが報告された[2]（Figure 1）．本研究は$dK_1$を無菌ラットに与えることによってK欠乏状態を引き起こすことなくMK-4を欠乏させたモデル動物を作出し，DNAマイクロアレイ法を用いてMK-4欠乏時に発現量が変化する遺伝子種を検索することによって，MK-4が有する特異的な作用に関する知見を得ることを目的として行なわれた．

## II 方法

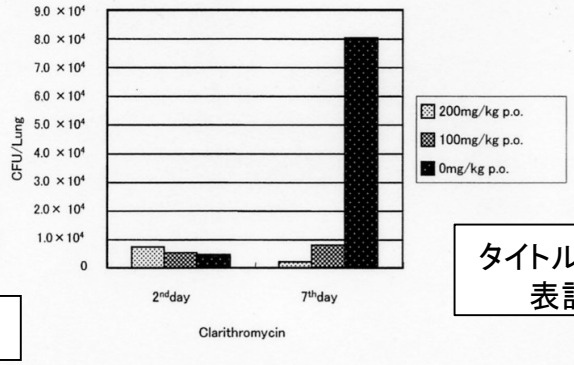
他に、対象と方法など

改行

Kは腸内細菌叢によって合成されて宿主に吸収・利用されることから，実験にはWistar系無菌ラット（雄，5週齢）を用いた．市販K欠乏飼料（TD97053，米国Harlan Teklad社）に2 mg/kg飼料の$K_1$を添加したコントロール群，および2 mg/kg飼料の$dK_1$を添加した$dK_1$群とに分け（各群5匹），26日間飼育した後に解剖に供した．体重，肝臓重量，大腿骨重量，ならびにGla化活性の評価を行なうために，プロトロンビン時間（PT）および活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）を測定した．また，血漿，肝臓，精巣，脳の

**図表合わせて3点以内。**
**図表は全て、英文表記とし、白黒の図を用意してください。**
**カラーの図を白黒に変換することはできません。**






タイトルも英文表記で

Figure 番号.

Figure 1. Number of viable *Mycoplasma pneumoniae* in the lung of gnotobiote mouse

Table 番号.

Table 1. Histopathological examination of the lung

| Clarithromycin | Infection with *M. pneumoniae* | | Inoculation with antigens with *M. pneumoniae* sonicated antigens | |
|---|---|---|---|---|
| | 2nd day | 7th day | 2nd day | 7th day |
| 200mg/kg p.o. | normal | normal | slight inflammation | normal |
| 100mg/kg p.o. | normal | slight inflammation | moderate inflammation | normal |
| 0mg/kg p.o. | slight inflammation | severe inflammation | severe inflammation | normal |

Table 2. Cytokine productivity of lymphocytes in the lung after Infection with *M. pneumoniae*

| Clarithromycin | 2ndday | | | 7thday | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | IL-4 | IFN-γ | TNF-α | IL-4 | IFN-γ | TNF-α |
| 200mg/kg p.o. | 3.6 | 0.17 | 31 | 1.5 | 0.51 | 8 |
| 100mg/kg p.o. | 1.8 | 0 | 25 | 1.5 | 0.17 | 12 |
| 0mg/kg p.o. | 0.7 | 0 | 157 | 5.2 | 1.02 | 73 |

英文タイトル



# Physiological evaluation of the ability to utilize barely soluble phosphate compounds in transgenic rice with altered citrate metabolism in aseptic cell culture system

英文名前（全て大文字で）

TOMONORI KIHARA*, TOMOMI KANI*, YUJI SUZUKI*·** and HIROYUKI KOYAMA*

*Laboratory of Plant Cell Technology, Faculty of Agriculture, Gifu University, Gifu

**New Energy and Industrial Technology Development Organization, Tokyo

英文所属（全てイタリックで）、最後に都市名をつける

英文抄録
250語

Organic acid excretion from roots is one of the most available mechanisms to acquire phosphate from barely soluble phosphate compounds. We determined whether rice (*Oryza sativa L.*), which is known to be with lower level of citrate excretion, with citrate metabolism altered by gene manipulation could enhance an ability to excrete citrate.

We generated transgenic rice with repressed expression of cytosolic NADP-specific isocitrate dehydrogenase (cytNADP-ICDH), which is involved in citrate catabolism, by the RNAi method. However, it is difficult to quantify organic acid excreted under septic condition because of a little bit of it. Therefore, we evaluated an ability to excrete citrate at cultured cell level using aseptic cell culture system. While wild-type cells and transgenic lines grew at almost same rate in a medium containing available P, growth of transgenic lines was 1.5 − 2.0 times greater than that of wild-type cells in a medium with aluminum-phosphate as a sole source of P. Soluble phosphate in transgenic line showed the greatest growth in aluminum-phosphate medium was 20 nmol (flask)$^{-1}$, which corresponded to 2.3 times that in wild-type cells. This transgenic line showed 2.2 times higher citrate content and 4.3 times higher citrate excretion compared with those of wild-type cells. These results indicate that the repression of cytNADP-ICDH expression in rice cells improve the growth in Al-phosphate medium probably as a result of enhanced citrate excretion.

英文
キーワード

**Keywords:** rice, citrate excretion, altered metabolism, phosphate, aseptic cell culture system

参考文献: 全著者名前、論文タイトル、雑誌名、巻、頁、年

*References*

1. KIHARA, T., KOYAMA, H., EGAWA, M., MIZUNO, H. & HARA, T.: Detection of organic acids in root exudates of transgenic *Arabidopsis* carrying modified organic acid metabolism under aseptic culture conditions with hypersensitive assay system. *J. germfree life gnotobiol.* **31**, 45-49, 2001. (in Japanese).
2. KOYAMA, H., KAWAMURA, A., KIHARA, T., HARA, T., TAKITA, E. & SHIBATA, D.: Overexpression of mitochondrial citrate synthase in *Arabidopsis thaliana* improved growth on a phosphorus -limited soil. *Plant Cell Physiol.,* **41**, 1030-1037, 2000.
3. ANOOP, V.M., BASU, U., McCAMMON, M.T., McALISTER-HENN, L. & TAYLOR G.J.: Modulation of Citrate Metabolism Alters Aluminum Tolerance in Yeast and Transgenic Canola Overexpressing a Mitochondrial Citrate Synthase. *Plant Physiol.,* **132**, 2205-2217, 2003.
4. HIEI, Y., OHTA, S., KOMARI, T. & KUMASHIRO T, : Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. Plant J., **6**, 271-282, 1994.
5. OHNO, T., KIHARA, T., KOYAMA, H., EGAWA, M., KANI, T. & HARA, T.: Establishment of the highly frequent *Agrobacterium*-mediated transformation in carrot cell culture. *J. germfree life gnotobiol.* **32**, 86-89, 2002. (in Japanese) .

et.alと省略せず著者全員の名前を記載して最後は＆でつなぐ。

正しい雑誌名の略称を記載。

和文雑誌からの引用も英文に直し、最後に（in Japanese)と記載する。

改行

## Ⅲ 結果

1．経口摂取アレルゲンへの免疫応答に対するラフィノース摂取の影響（Table 1）[2]

ラフィノース摂取 TCR-Tg 群の IgE 抗体価はコントロール群に対して有意に低値を示し，また，ラフィノース群の腸管膜リンパ節 CD4T 細胞の IL-4 応答がコントロール群と比較して有意に低かった．さらにラフィノース摂取 BALB/c 群のパイエル板細胞による IL-12産生がコントロールと比較して有意に高かった．

図表番号を明示してください。

2．無菌 TCR-Tg における応答

無菌 TCR-Tg においては，腸管におけるパイエル板個数，パイエル板・腸管リンパ節の CD4T 細胞数が通常 TCR-Tg と比較して減少していたが，腸管由来の OVA 刺激に対するサイトカイン応答は増強される傾向にあった（Table 2）．卵白飼料を摂取した場合の血中 OVA 特異的 IgG 1 抗体，IgG2a 抗体，IgE 抗体いずれも通常マウスと比較して高かった（Table 3）．

改行

## Ⅳ 考察

ラフィノースはマウスの腸管または近傍の免疫器官の Th 2 応答を調節することにより，全身性の IgE 産生応答を抑制することが示唆された．ラフィノースが腸内フローラに影響を及ぼし，免疫応答を調節したと考えられるが，盲腸内容物から bifidobacteria は検出されず，ヒトの場合とは関与する菌種が異なる可能性が考えられた．一方，無菌 TCR-Tg マウスにおいては，これまで報告されているように腸管免疫系の量的な発達が通常マウスと比較して劣っていたが[3]，腸管 T 細胞のサイトカイン応答はむしろ増強される傾向にあり，また，無菌 TCR-Tg マウスのが卵白飼料摂取に対して強い血中抗体応答を示すことから，腸内細菌が免疫応答を抑制している可能性が考えられた．これらの結果は食品アレルギーと腸内フローラの関わりを示唆し，プレバイオティックスによるアレルギー抑制の可能性を示すものである．

改行

## Ⅴ 結論

1．ラフィノースはマウスの腸管または近傍の免疫器官の Th 2 応答を調節することにより，全身性の IgE 産生応答を抑制することが示唆された．

2．腸内細菌は腸管免疫系組織の発達を促進するものの，無菌マウスの腸管 T 細胞のサイトカイン応答はむしろ増強される傾向にあり，また，無菌 TCR-Tg マウスが卵白飼料摂取に対して強い血中抗体応答を示すことから，腸内細菌が免疫応答を抑制している可能性が考えられた．

- 原稿と一緒にファイルの提出をお願いします。本文につきましてはMicrosoft wordの文書ファイルでお願いします。図表につきましては、Wordにはつけたもの、ExcelおよびPower pointその他画像ファイル(JPEG,PICT)などでも受け付けます。（掲載用のサイズに仕上げてください）
- 出力原稿3部と、ファイルの入ったフロッピィディスクもしくはCDを提出してください。（メディアは後日返却いたします。）