

博士論文

腸管上皮細胞におけるタウリンによる
TXNIP 発現制御に関する研究

東京大学大学院 農学生命科学研究科
応用生命化学専攻
食糧化学研究室

平成 22 年度博士課程進学 権藤 祐輔
指導教員 東京大学教授 清水 誠

目次

略称一覧	1
序章	3
第1章 タウリンが腸管上皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響	
第1節 タウリンが腸管上皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響の網羅的解析	14
第2節 タウリンが TXNIP 発現に及ぼす影響	39
第2章 タウリンによる TXNIP 発現亢進機構の解析	
第1節 タウリンの TXNIP 発現誘導に関与するシグナル伝達経路の解析	56
第2節 タウリンによる TXNIP mRNA 発現亢進機構の解析	78
第3章 タウリンによる TXNIP 発現誘導が腸管上皮細胞に及ぼす影響	96
補章 タウリン結合タンパク質の探索	113
総合討論	126
参考文献	135
要旨	150
業績	154
謝辞	156

略称一覧

ACF	aberrant crypt foci
AGEs	advanced glycation endproducts
AMP	adenosine monophosphate
AMPK	AMP kinase
ARE	adenosine- and uridine- rich elements
AREBPs:	ARE binding proteins
ARRDC	arrestin-domain containing
ATF	activating transcription factor
BSA	bovine serum albumin ; ウシ血清アルブミン
ChoRE	carbohydrate response element
ChREBP	ChoRE binding protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DTT	dithiothreitol
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FCS	fetal calf serum
FOXO	forkhead box O
GABA	gamma-aminobutyric acid
GLUT	glucose transporter
GMA	polyglycizyl methacrylate
GO	Gene Ontology
GST	glutathione S transferase
HSE	heat shock element
HSF	heat shock protein
HIF-1	hypoxia-inducible transcriptional factor 1
IL	interleukin
IPTG	isopropyl- β -D(-)-thiogalactopyranoside
JNK	c-Jun N-terminal kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase

MAPKKK	MAPK kinase kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
MPO	myeloperoxidase
MT	metallothionein
mTOR	mammalian target of rapamycin
nAChR	nicotinic acetylcholine receptor
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
NMDA	N-methyl-D-aspartic acid
NEAA	non-essential amino acids
PBS	phosphate buffered saline
PDH	pyruvate dehydrogenase
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PKC	protein kinase C
POU	Pit-Oct-Unc
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
RMA	Robust Multi-Array Average
ROS	reactive oxygen species
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SAPE	Streptavidin Phycoerythrin
SLC	solute carrier family
SGLT	sodium-glucose transporter
TAUT	taurine transporter
TCA	trichloroacetic acid
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
TXNIP	thioredoxin interacting protein
VEGF	vascular endothelial growth factor
VSOAC	volume-sensitive organic anion channel

序論

食品には、1次機能としての栄養効果、2次機能としての美味しさだけではなく、3次機能としての体調調節機能を求められており、手軽に入手でき日常的に摂取することで健康改善効果をもたらす機能性食品の開発がおこなわれている。機能性食品の素材候補となりうる食品成分の研究も進み、多くの機能性成分が注目されるようになったが、その一つとしてタウリンがある。

(1) タウリン

タウリン (2-アミノエタンスルホン酸) は、メチオニン・システイン・ホモシステインなどと同じようにカルボキシル基の代わりに硫酸基を持つ β -アミノ酸であり、システインやメチオニンと違いタンパク質を構成しない遊離アミノ酸である[1]。生体内に豊富に存在し、特に網膜・心臓・骨格筋・肝臓といった組織に高濃度に存在する。食品中にも多く存在し、母乳・肉や魚などが代表例である。特に魚介類やイカ、タコといった軟体動物に豊富に含まれる。一方で植物や細菌には存在しない。食事からのタウリンの摂取量は一日当たり 40-400 mg である[2-4]。医学療法としてのタウリン投与量は、急性・慢性疾患により違いはあるものの一日当たり 500 -10000 mg となっている[4]。なお、過剰に摂取しても腎臓で調節され、尿により排出される[4]ため、他の含硫アミノ酸と違い毒性基準が設けられていない。また、ラットにおいて高タウリン含有食を 3 週間与え続けることで、血中タウリン濃度は 1.2 mM となり通常食と比べて 6 倍も増加する[5]ことから、吸収機構が発達しているといえる。タウリンは、ヒトではその一部は食品によって体内に取り込まれるが、細胞内への取り込みは、タウリンなどを基質とするタウリントランスポーター (taurine transporter ; TAUT) を介しておこなわれている。

(2) タウリントランスポーター (TAUT) (Fig. 0-1)

TAUT はその構造に 12 回膜貫通領域を有していると推定されており、生体内

のほとんどの組織で発現がみられる。TAUT は Na^+ および Cl^- 依存的な輸送特性を示し、タウリン 1 分子に対して 2 分子の Na^+ 、1 分子の Cl^- の割合で共輸送される[6]。基質としてはタウリン以外にも β -アラニンやヒポタウリン、GABA といった他の β -アミノ酸、 γ -アミノ酸が存在する。一方、細胞内からのタウリンの排出には TAUT は関与せず、クロライドチャネルが関与することが示唆されている。

TAUT は様々な要因および機構でその活性が制御される。例えば TAUT は基質であるタウリンの細胞内外濃度変化に応じてその発現が制御される。細胞外タウリン濃度が高い場合には TAUT mRNA 発現量および活性はいずれも減少し、一方、低タウリン濃度環境においては増加する[6]。このような基質による TAUT の制御は、腎臓、胎盤、腸管上皮、肝臓など様々な組織あるいは組織由来培養細胞で確認されている。また、炎症性サイトカインの一種である $\text{TNF-}\alpha$ によって TAUT は転写レベルで活性化され、その制御には $\text{NF-}\kappa\text{B}$ が関与していることが明らかとなっている[7]。また、高浸透圧条件によっても TAUT が活性化される。これも、腎臓、網膜、肝臓、腸管、アストロサイトといった様々な組織および組織由来培養細胞で報告されており、mRNA 発現の増加を伴っている[6]。

TAUT 転写制御に関しては、TAUT プロモーター活性は細胞内カルシウム濃度の上昇によって亢進すること[8]、転写因子 c-Jun/AP-1 によって活性化し定常的なプロモーター活性には Sp1 が必須であること[6]、酸化ストレス条件下において heat shock factor 1 (HSF1) によって亢進すること[9]、さらにガン抑制遺伝子である p53 によって負に制御されることが明らかとなっている[8]。また、翻訳過程以降での TAUT 活性調節として、protein kinase C (PKC) による活性調節が知られている[10]。PKC を活性化させると TAUT 活性は顕著に抑制され、PKC を阻害すると TAUT 活性は増加する。

タウリンはこの TAUT を通して細胞内に取り込まれるが、一部の組織ではタウリンの生合成経路も存在している[11]。タウリンは生体内でシステインやメチオニンから合成される。その主要な生合成経路では、システインを基質とした

酵素反応から始まり、数段階の反応を経てタウリンが生成する。すなわち、システインデオキシゲナーゼ (CDO) によりシステインを基質としてチオール基を酸化し、システインスルフィン酸を合成する。合成したシステインスルフィン酸はシステインスルホン酸脱炭酸酵素 (CSAD) によりヒポタウリンに変換され、ヒポタウリンからタウリンへの変換は非酵素的におこなわれる。CDO はタウリン生合成の律速酵素とされる。ヒトでは肝臓と胎盤に非常に高い発現がみられ、また脳や心臓、脂肪組織にも発現しているが、肺や腎臓、膵臓などでは発現が認められていない[12]。ヒト成人はタウリン生合成能をある程度有するが、乳幼児期には生合成能が十分に発達しておらず、食事からの摂取が必要とされる[1]。タウリンはヒトの母乳中に多く含まれることなどから、新生児及び乳児の脳・神経の発達などに重要であることが知られている[13]。また、タウリンの研究が盛んに進められるようになったきっかけは、タウリン生合成能をもっていないネコを用いておこなわれた研究であった。ネコにタウリンを含まない食事を与え続けたところ、体内タウリン濃度の低下とともに網膜に重篤な障害がみられ、やがて失明に至ることが報告され、タウリンが生体に重要な機能を果たしていることが初めて明らかになった[14]。以降タウリンが生体に及ぼす様々な生理作用が報告されてきた。以下にその代表的な生理作用を挙げる。

(3) 一般的なタウリンの生理作用

抗酸化作用

タウリンの抗酸化機構には、① reactive oxygen species (ROS) の発生を抑制する、② ROS を除去する、③ ROS の作用を妨害するといった 3 種類が考えられている。①の例は、カルシウムイオンの細胞内過剰蓄積によって生じる ROS の発生をカルシウムイオンの放出によって抑制する[15]。また、inducible nitric oxide synthase (iNOS) などの酸化体合成酵素活性を抑制することで ROS の発生を抑制する[16]。②は、タウリンは ROS 除去作用を持つ superoxide dismutase、glutathione peroxidase などの抗酸化酵素活性や HSP 70、glutathione などの抗酸化物質量の増加を誘導する[17]ことで ROS を除去する。③の例は、タウリンが膜構造を変化させることによって ROS の作用を妨害する[18]。このように

タウリンは酸化ストレスに対して直接関与しているのではなく、間接的に作用していると考えられている。一般的に、タウリンの抗酸化作用に関する報告は②に関するものが多い。

抗炎症作用

細胞傷害によって誘導される炎症時において、タウリンは炎症性サイトカインである interleukin (IL)-6 産生[19]や myeloperoxidase (MPO) 活性を抑制する[19,20]。また、白血球などでは過酸化水素とクロライドイオンから MPO の作用によって次亜塩素酸が生成する。この過剰な生成は細胞自身に毒性を示すため、タウリンは次亜塩素酸に直接反応して taurine chloramine (TauCl) を生成し、過剰に産生された次亜塩素酸は除去されるが、この TauCl は強力な抗炎症作用を示すことが報告されている。TauCl は活性化マクロファージにおける NO、tumore necrosis factor- α (TNF- α) の産生量を減少させる[21,22]。他にも IL-6 や IL-8 などの炎症性サイトカイン発現も抑制される[23]。これらのタウリンや TauCl の抗炎症作用は主として NF- κ B の活性化の阻害によるもの、または抗酸化作用によるものだとも考えられている。

浸透圧調節作用

低浸透圧環境におかれた細胞では、細胞内浸透圧を低下させるためにタウリンは放出され、高浸透圧環境におかれた細胞では、細胞内浸透圧を上昇させるために膨張しようとして蓄積される。浸透圧バランスの崩壊は様々な疾患により生じ、例えば低ナトリウム血症状態では細胞内の浸透圧が高くなる。その結果細胞が膨張し、低酸素症や、虚血などを引き起こす[24]。これは細胞遊走や増殖、アポトーシスなどに関わっているため、浸透圧の維持は重要といわれている。タウリンに限らず浸透圧調節作用をもつものは、インテグリンや成長因子受容体によるシグナル伝達、細胞内カルシウム濃度、チロシンキナーゼ活性化などを感知して細胞容積を調節すると報告されている[25]。細胞内の浸透圧増加が認識されるとタウリンは volume-sensitive organic anion channel (VSOAC) によって放出される。一方、高浸透圧条件下では、TAUT を介したタウリンの

取り込み量が増加する。またタウリンの生合成を促進することによってもタウリンを蓄積する。

神経伝達物質様作用

タウリンは抑制性神経伝達物質様の作用を示す。脳・神経において、タウリンはグルタミン酸による神経興奮毒性及びカルシウムチャンネルを介したカルシウムイオンの流入を抑制したり[15]、抑制性神経伝達をおこなうグリシン受容体や GABA_A 受容体のアゴニストとしてはたらく[26]。しかし例外もあり、タウリンは GABA_A 受容体を介しているが、GABA の抑制性神経伝達とは相反する作用を示すことがある。その例として、GABA_A 受容体を介した NMDA 受容体の活性化による ROS の発生をタウリンは抑制する[27]。これはタウリンの抗酸化作用によるものであるが、必ずしもアゴニストとしてはたらくわけではない。

胆汁酸の抱合

胆汁酸は腸管内での脂質や脂溶性ビタミンの乳化や吸収にはたらくと共に、肝臓におけるコレステロールの代謝をおこなう。しかし通常は不活性化しており、タウリンやグリシンによる抱合を受けて初めてこのような機能を示す。特にタウリンによる胆汁酸抱合体 **taurocholic acid** は、コレステロールの可溶化やその排出に寄与しており、血中コレステロール濃度を下げる効果を持つ[28]。

ミトコンドリアにおけるタンパク質合成の安定化

タウリンはミトコンドリアタンパク質をコードした tRNA のウリジンと結合して、ミトコンドリアにおけるタンパク質の合成を安定化している。タウリンは変異 tRNA には結合せず、さらに変異 tRNA ではミトコンドリアにおける正常なタンパク質合成がおこなわれないこと、またタウリンが結合しない人工的につくった tRNA を構築しタンパク質合成能を調べると、顕著な低下がみられることから、タウリンによるウリジン修飾が正常なタンパク質合成過程に必須であることが明らかとなった[17]。これによりタウリンの存在は、ミトコンドリアでおこなわれる電子伝達系の安定化につながり、ATP 産生の効率化につなが

ると共にスーパーオキシドである O_2^- の形成を抑制する抗酸化作用を示すことになる。

(4) 各疾患におけるタウリンの効用

糖尿病

糖尿病患者は、健常者に比べて血小板凝集が亢進しており、タウリンを投与することで糖尿病患者の過剰な血小板凝集を抑制する効果がある[28]。また、糖尿病患者に派生して起こる網膜やニューロン、腎臓の障害は、タウリン処理により軽減される[17]。主にタウリンによる糖尿病軽減効果はタウリンの抗酸化作用によるものとされている。もちろん他の作用によるものもあり、糖尿病時に生じる毒性物質である advanced glycation endproducts (AGEs) などとタウリンが結合して無毒化すること (glycation scavenger)、インスリンシグナルを刺激し glucose transporter 4 (GLUT4) を活性化させてグルコースを取り込むことで血糖値を下げる、膵β細胞においてミトコンドリアでの ATP 産生を亢進することでインスリン分泌を亢進すること、によるものなどがある[17]。しかし、タウリンの抗糖尿病効果は主に I 型糖尿病限定であり、II 型糖尿病では効果がみられないものがほとんどであり、詳細は未だ解明されていない。

高血圧

タウリン経口投与により高血圧が緩和するが、脳室投与においても同様の効果が得られた。タウリンの高血圧緩和作用の要因の一つとして、神経系に及ぼす抑制性作用、特に抗利尿作用を持つアルギニン、バソプレシン分泌活性の阻害や血圧調節に関わるレニン-アンジオテンシン系ホルモンの活性抑制作用が示唆されている[29]。

心疾患

タウリンは心臓中の全遊離アミノ酸のうち 50%以上を占める[28]ため、タウリンの欠乏は心臓に多大な影響を与えることが考えられる。タウリン摂取量の指標となる尿中排泄量と心筋梗塞をはじめとする虚血性心疾患 (IHD) による

死亡率との間には負の相関があるとされており、タウリン摂取による IHD の予防作用が示唆された[30]。また、IHD は心筋細胞のアポトーシスがその疾患の進展に大きく関与しているとされるが、タウリン添加により心筋細胞のアポトーシスが顕著に抑制されることから、タウリンは心筋障害を抑制することで IHD を軽減する可能性が示唆されている[31]。

網膜変性

タウリンは網膜中の全遊離アミノ酸のうち 50%以上を占める[32]ため、タウリンの欠乏は網膜に多大な影響を与えることが考えられる。事実 TAUT ノックアウトマウスでは自発的な網膜の変性が進み失明に至ることが報告された[33]。また加齢による網膜におけるタウリンの濃度減少にともなって網膜変性発症率が上昇することからタウリンが網膜変性を軽減することが示唆され、実際にタウリン投与により網膜変性が改善された。さらにこれはタウリンの抗酸化作用によるものであることが示唆された[32]。

骨格筋機能障害

タウリンには Ca-ATPase 活性を強化することで、細胞内カルシウム濃度を調節する作用がある[34]。また細胞内カルシウム濃度の上昇により炎症が引き起こされ、筋線維細胞のネクローシスや分解を誘導し、骨格筋機能障害に至る。しかしタウリン添加により細胞内カルシウム濃度の上昇が抑制され、障害を軽減する[34]。他にもクロライドチャネルの変異により生じる障害においても、タウリンはそのチャネルに作用することで障害を軽減する[34]。

上記のように、タウリンには多くの機能が報告されており、生体内の各所で重要な役割を果たしていることが推測される。摂取された食品成分が最初に接触し、作用する場である消化管にも TAUT が高発現しており、特に物質吸収や生体防御の最前線である腸管上皮細胞層におけるタウリンの役割には興味を持たれる。

(5) 腸管上皮細胞

腸管上皮細胞は、腸管壁の最内層を構成する粘膜の中でも最も内表面に位置しており、経口摂取された食品成分などといった外来因子に絶えず曝されている。そのため、栄養素の吸収の場であると共に外来因子から身を守るために独自の防御機構を発達させている。腸管上皮細胞の役割として、① transporter や transcytosis を介した能動輸送、paracellular pathway や transcellular pathway を介した受動輸送による物質輸送、② タイトジャンクションを形成し、有害物質の侵入を防ぐ物理的なバリアー機能、③ 外来因子に対してサイトカインなどの液性因子の分泌や薬物代謝酵素の発現といった細胞応答による生体防御、などが挙げられる。腸管上皮細胞がこのような役割を果たすことにより、我々の体の健康維持につながっている。

(6) 腸管上皮モデルとしての Caco-2 細胞

ヒト結腸癌由来の上皮細胞株である Caco-2 細胞は、分化させることにより円柱型で微絨毛やタイトジャンクションを持つ単層を形成すると共に、小腸に特徴的な加水分解酵素や各種トランスポーターを発現する。このように形態的にも機能的においても小腸上皮様の特徴を示すことから、腸管上皮様のモデルとして広く利用されている[35,36]。当研究室においても Caco-2 細胞を用いて、様々な食品成分が腸管上皮細胞の物質輸送、生体防御機構などに及ぼす影響に関する研究がおこなわれている。

(7) ニュートリゲノミクス

ニュートリゲノミクスは DNA マイクロアレイによって食品や個々の食品成分、栄養素などが遺伝子発現変化に及ぼす影響を網羅的に理解し、健康に与える影響を明らかにする学問である[37]。DNA マイクロアレイは細胞や組織の RNA を取り出し mRNA の cDNA への逆転写を経て蛍光標識した cRNA を合成し、cRNA を DNA マイクロアレイチップ上に配置された数万の遺伝子プローブと相補的にハイブリダイズさせて蛍光強度を測定することで遺伝子発現変化を網羅的に解析することが可能である (Fig. 0-2)。

ニュートリゲノミクスによる研究は様々な組織や細胞株でなされているが、食品の機能発現において重要な組織である腸管においてもヒト腸管上皮細胞である Caco-2 細胞を用いて、ビタミン D[38]、エピカテキンおよびココアポリフェノール抽出物[39]、共役リノール酸[39]などの食品成分について解析がおこなわれている。

(8) 本研究の目的

これまで述べてきたように、タウリンがヒト生体内に及ぼす生理作用は多数報告されており、当研究室においてもタウリンの抗炎症作用 (*in vivo* [40]、*in vitro* [41])、TAUT の発現調節[42]に関する研究がおこなわれてきた。しかしながらタウリンの生理作用に関しては現象論に止まっている研究が多く、その詳細な作用機序については不明な点が多い。さらに遺伝子・分子レベルでの解析も十分になされていないのが現状である。

そこで本研究では、腸管上皮細胞におけるタウリンの生理作用の分子レベルでの解析をおこなうために、ニュートリゲノミクスの概念をタウリンに応用した。腸管上皮モデル Caco-2 細胞においてタウリンがどのような遺伝子発現を調節しているのかを網羅的解析によって明らかにするとともに、その制御機構および遺伝子発現変化がもたらす細胞機能への影響を解明することを目的として研究を進めることとした。

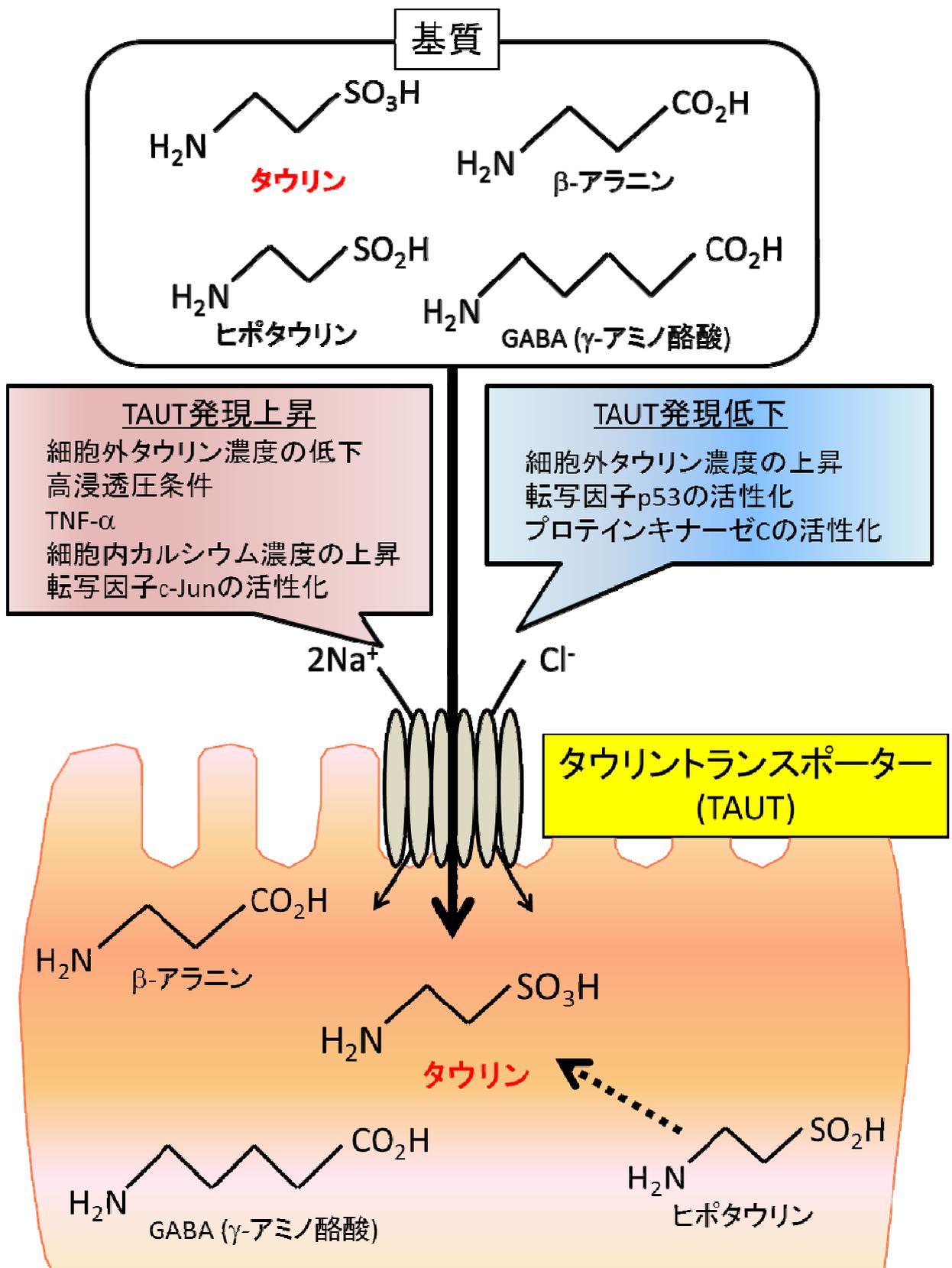


Fig 0-1 TAUT基質の細胞内への供給

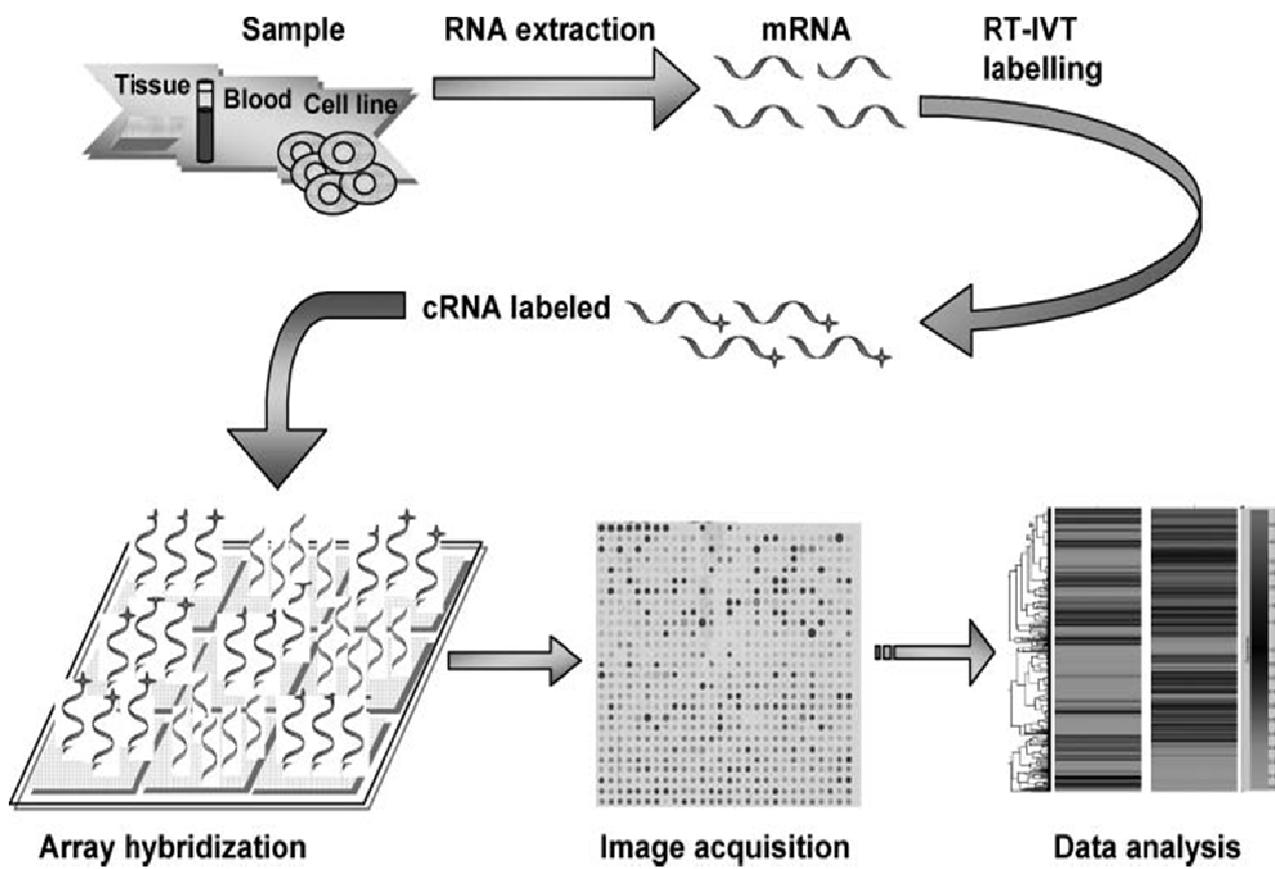


Fig. 0-2 DNA microarrayによる遺伝子発現変化の網羅的解析

文献[37]より抜粋

第 1 章

タウリンが腸管上皮細胞の 遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響

第 1 節

タウリンが腸管上皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響の網羅的解析

1. 緒言

近年のニュートリゲノミクスの進展に伴い、食品成分が様々な組織における遺伝子発現に及ぼす影響を網羅的に解析することで食品の機能性に関する科学的な根拠を立証する試みがなされるようになった。序論で述べたとおり、食品成分であるタウリンの生理作用については様々な報告がなされているものの、現象論に留まっているものが多く、遺伝子レベルでの研究は十分になされていない。そこでタウリンにもニュートリゲノミクスの概念・手法を適用することで、タウリンがもたらす生理作用の作用機序を遺伝子レベルで科学的に解明することが可能となると考えられる。さらに得られた知見は新たな生理作用の発見につながり、機能性食品成分としてのタウリンの理解が深まることが期待される。そこで本章では、タウリンが腸管上皮細胞のどのような遺伝子及び遺伝子群の発現を調節して、その結果としてタウリンがどのような生理作用を示す可能性があるのか、ということについて検討するために、DNA マイクロアレイを用いてタウリンによる遺伝子発現の網羅的な解析をおこなった。

2. 実験材料

(1) 細胞

ヒト結腸ガン由来株化細胞である Caco-2 細胞は American Type Culture Collection より購入した。

(2) 細胞培養関連試薬

ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) は和光純薬より購入した。PBS(-) 粉末は日水製薬より購入した。トリプシン粉末、牛胎児血清 (FCS)、非必須アミノ酸 (NEAA)、ペニシリン-ストレプトマイシン溶液は Gibco より購入した。コラーゲン type I-C 溶液は新田ゼラチンより購入した。トリパンプルー溶液は Sigma より購入した。

(3) 試薬類の調製

① PBS(-) : PBS(-)粉末 4.8 g を Milli-Q 水 500 ml に溶かし、オートクレーブ (121°C/20 分、以下すべて同様) した。

② トリプシン溶液 : トリプシン粉末 1 g、EDTA 0.2 g、PBS(-) 9.6 g を 800 ml 程度の Milli-Q 水に溶かし、攪拌しながら NaOH で pH8.0 に調整した。1 L に fill up して 4°C で一晩攪拌した後、HCl で pH7.2 に調整し、ろ過滅菌した。保存は -20°C で行った。

③ 0.02 N HCl 溶液 : Milli-Q 水で調製した 0.02 N HCl 溶液をオートクレーブした。

④ Caco-2 細胞培養培地 : 凍結保存された FCS を 37°C で融解後、56°C で 30 分間処理し補体成分を不活性化した。DMEM に対し、FCS 56 ml、NEAA 5.6 ml、ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (ペニシリン濃度 10000 U/ml、ストレプトマイシン濃度 10 mg/ml) 2 ml を無菌操作で混合し、細胞培養培地とした。

⑤ RNA 用 Milli-Q : Milli-Q 水をオートクレーブして使用した

⑥ 70% エタノール : オートクレーブした Milli-Q 水 150 ml にエタノール 350 ml を加えて調製した。

(4) 実験器具、機器

細胞培養用 100 mm ディッシュ、60 mm ディッシュ、24 ウェルプレート、50 ml 及び 15 ml 遠沈管、ろ過滅菌装置 (0.20 μm) は Corning より購入した。CO₂ インキュベーターは BNA-111 (ESPEC) を用いた。

(5) プレートのコラーゲンコーティング

コラーゲン type I-C 溶液を 0.02 N HCl で 15 倍希釈したものを 24 ウェルプレートに 400 μl ずつ加え、30~40 分静置した。その後コラーゲンを取り除き、PBS(-) 500 μl で二回洗浄した。その後、4°C で保存した。

(6) サンプル

タウリンは関東化学より購入した。

3. 実験方法

(1) Caco-2 細胞の培養

培養には 100 mm ディッシュを用い、5%CO₂ を含む 37 °C のインキュベーター内で行った。培地は 1 日ないし 2 日おきに新しいものと交換し、細胞が約 80% コンフルエントに達したら随時継代をおこなった。24 ウェルプレートに播いた細胞は上記と同様に培養を行い、14 日間培養することで腸管上皮様に分化させたものを実験に供した。なお継代数は 40~80 のものを用いた。

(2) 細胞の継代

100 mm ディッシュより培地を除いて PBS(-) で細胞を洗浄後、トリプシン溶液 1 ml を加え、37°C インキュベーター内で 5 分程度放置した。細胞が完全にディッシュからはがれたら、培地を 9 ml 加えて細胞を 50 ml 遠沈管に回収した。十分にピペッティングした後、500 μl ほどを細胞数計測用に分け、残りの細胞懸濁液を 800 rpm で 5 分間遠心し細胞を沈殿させた。上清を除去後、新しい培地を 1 ml 加えてペレットを懸濁した。その後培地を加えて 2.0×10^5 cell/ml の細胞懸濁液を作製した。100 mm ディッシュには、10 ml の培地に 2.0×10^5 個

の細胞を均一になるようにまいた。さらに、DNA マイクロアレイ用にはコラーゲンコートした 60 mm ディッシュを用いて、 2.0×10^5 cell/ml の Caco-2 細胞懸濁液を 5 ml 播いた。

(3) 生細胞数の計測

細胞数計測用の細胞懸濁液 40 μ l に、トリパンブルー染色液を 120 μ l 加えて十分ピペティングした。この希釈液を細胞計数板付きスライドガラスにのせ、細胞数を計数して懸濁液中の全細胞数を算出した。

(4) サンプル培地の調製

タウリンを添加した培地は、終濃度 50 mM になるように細胞培養培地に溶解し、ろ過滅菌装置を通すことによって調製した。

(5) DNA マイクロアレイ

① サンプル処理

60 mm ディッシュ上で 2 週間培養し、腸管上皮細胞様に分化させた Caco-2 細胞に上記で調製したタウリンを含んだ培地で 24 時間培養し、細胞を回収し網羅的な遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイ法により測定した。なお、サンプル群はコントロール・タウリン共に $n=3$ でおこない、total RNA 抽出後それぞれの群を一旦 1 つにプールした。その後に再び 3 つに分けて以降の作業をおこなうことで $n=3$ とした。

② total RNA の抽出

サンプル処理をおこなった Caco-2 細胞を 1% 2-メルカプトエタノールを含む細胞溶解緩衝液に溶解させ、Qiashredder および RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用い、付属のプロトコールに従い total RNA を調製した。調製の過程で、オプションの DNase 処理をおこなった。

③ cDNA の合成と精製

DNA マイクロアレイ用の cDNA 合成は GeneChip Expression 3'-Amplification One-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix) を用いた。Total RNA 5 μg に相当する液量に RNA 用 Milli-Q で 8 μl に fill up した後、Diluted poly-A RNA controls を 2 μl 、50 μM T7-Oligo(dT) Primer を 2 μl 加え 70°C で 10 分間加熱した。氷上で 2 分間静置し、5 x First strand cDNA buffer を 4 μl 、0.1 M ジチオスレイトール (dithiothreitol ; DTT) 溶液を 2 μl および 10 mM dNTP を 1 μl 加えた後、42°C で 2 分間静置した。SuperScript II 逆転写酵素を 1 μl 添加し、再び 42°C で 1 時間静置した。反応後、氷上で 2 分間静置した。次に、5 x Second strand reaction buffer を 30 μl 、10 mM dNTP を 3 μl 、*E coli* DNA ligase を 1 μl 、*E coli* DNA Polymerase I を 4 μl 、RNase H を 1 μl および RNase-free Water を 91 μl 加えた後、よく混ぜ、16°C で 2 時間静置した。T4 DNA Polymerase を 2 μl 加え、16°C で 5 分間静置した後、0.5 M EDTA を 10 μl 添加した。Double-Stranded cDNA Cleanup Kit (Affymetrix) を用いて、付属のプロトコールに従い二本鎖 cDNA の精製を行い 12~14 μl の cDNA 溶液を得た。

④ in vitro 転写 (in vitro transcription ; IVT) 反応によるビオチン標識相補的 RNA (cRNA) の合成と断片化

ビオチン標識 cRNA の合成は GeneChip Expression 3'-Amplification Reagents For IVT Labeling (Affymetrix) を用いた。Template cDNA を 12 μl に 10 x IVT Labeling Buffer を 4 μl 、IVT Labeling NTP Mix を 12 μl および IVT Labeling Enzyme Mix を 4 μl 加えた。RNase-free Water を 8 μl 加えてよく混ぜ、37°C で 16 時間反応させた。Biotin-Labeled cRNA Cleanup Kit (Affymetrix) を用いて、付属のプロトコールに従い cRNA の精製をおこなった。精製した cRNA 量を定量し、IVT 反応に持ち込んだ全 RNA 量を差し引くことで増幅した正味の cRNA 量を換算した。続いて cRNA を切断 (フラグメンテーション) するために、換算 cRNA 20 μg に 5 x Fragmentation Buffer を 8 μl 加えた。反応溶液が 40 μl になるよう RNase-free Water を加えよく混ぜ、94°C で 35 分間静置した。

⑤ ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションはHybridization Control Kit (Affymetrix) を用いた。断片化された cRNA 30 μ l に 3 nM Control Oligonucleotide B2 を 5 μ l、20 x Eukaryotic Hybridization Controls (bioB, bioC, bioD, cre) を 15 μ l、10 mg/ml Herring Sperm DNA を 3 μ l、50 mg/ml BSA を 3 μ l、2 x Hybridization Buffer を 150 μ l および dimethyl sulfoxide (DMSO) を 30 μ l を混合し、300 μ l になるように DEPC Treated Water を加え、ハイブリダイゼーション溶液を調製した。GeneChip (human Genome U133 Plus 2.0 ; Affymetrix) に Hybridization Buffer を 200 μ l 注入し、45°C、60 rpm で 10 分間回転させた。ハイブリダイゼーション溶液を 99°C で 5 分間静置し、45°C で 5 分間静置した後、12,000 rpm で 5 分間遠心した。GeneChip から Hybridization Buffer を抜き、遠心後の上清のハイブリダイゼーション溶液 200 μ l を注入し、45°C、60 rpm で 16 時間ハイブリダイズさせた。

⑥ 洗浄、染色、スキャニング

プローブアレイの洗浄と染色には Affymetrix GeneChip Fluidics Station450 (Affymetrix) を使用した。Non-Stringent Buffer (6 x SSPE, 0.01% Tween20) と Stringent Buffer (100 mM MES, 0.1 M [Na⁺], 0.01% Tween20) を用意し、付属のプロトコールに従って洗浄をおこなった。次に染色液 (100 mM MES, 1M [Na⁺], 0.05% Tween-20、2 mg/ml BSA、10 μ g/ml Streptavidin Phycoerythrin (SAPE)) で染色をおこなった。また、抗体溶液 (100 mM MES, 1M [Na⁺], 0.05% Tween-20、2 mg/ml BSA, 0.1 mg/ml Goat IgG Stock、3 μ g/ml biotinylated antibody) で処理し、発色強度の増幅をおこなった。その後、Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix) によりスキャニングをおこなった。

⑦ データ解析

得られたデータの解析は ArrayStar (DNASTAR) を用いておこなった。GeneChip のプローブデータを、プローブセットごとの発現データに変換し、ノ

ーマライズをおこなうためのアルゴリズムとして Robust Multi-Array Average (RMA) 法を用いた。その後、コントロール群とタウリン添加群を比較して、2倍、あるいは1.5倍発現変化した遺伝子のうち有意差が生じたものを抽出した。さらに、GeneOntology (GO) 解析を用いて遺伝子発現変化について機能的な側面から解析をおこなった。

(6) Real-time RT-PCR

① サンプル処理

DNA マイクロアレイ用に使用した細胞と同じ cDNA を用いて、thioredoxin interacting protein (TXNIP)、metallothionein 1H (MT1H)、solute carrier family 7A11 (SLC7A11)、activation of transcription factor (ATF4)、SLC2A3、SLC2A1 の mRNA 発現量を Real-time RT PCR 法によって測定した。

② Real-time RT-PCR

1 サンプル当たり 2 x SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa) を 5 μ l、Forward primer 0.4 μ l、Reverse primer 0.4 μ l、RNA 用 Milli-Q 3.2 μ l になるように混合し、キャピラリー (Roche) に 9 μ l ずつ分注した。その後、(2)で合成した cDNA をキャピラリーに 1 μ l ずつ添加した。キャピラリーにふたをして閉じ、4 $^{\circ}$ C 3000 rpm で 10 秒程度遠心して混合液をキャピラリーの下に落とした。PCR は Roche 社の Light Cycler system を用いた。

95 $^{\circ}$ C で 10 秒間変性させた後、「95 $^{\circ}$ C で 5 秒間変性させ、60 $^{\circ}$ C で 20 秒間アニーリング、72 $^{\circ}$ C で 15 秒間伸長させる」というサイクルを 35 回繰り返した。PCR プライマーによって単一の PCR 産物ができたことは、Light Cycler system の Melting curve 解析で単一のピークが見られることで確認した。用いたプライマーの配列、アニーリング温度、PCR 産物の大きさを以下の表に示した。また、housekeeping gene として β -actin を用いた。プライマーはいずれも Invitrogen より購入した。

Table 1-1-1 Real-time RT PCR に用いたプライマー

gene		primer sequence	annealing temperature(°C)	amplicon size(bp)
β-actin	forward	ccagcacaatgaagatcaaga	60	198
	reverse	agaaagggtgtaacgcaactaa		
TXNIP	forward	acgcttcttctggaagacca	60	93
	reverse	aagctcaaagccgaacttgt		
MT1H	forward	tgggaactccagtctcacct	60	106
	reverse	catttgcacttttgcacttg		
SLC7A11	forward	tcattggagcaggaatcttca	60	128
	reverse	ttcagcataagacaaagctcca		
ATF4	forward	tctccagcgacaaggctaa	60	106
	reverse	caatctgtcccgagaagg		
SLC2A3	forward	gccctgaaagtcccagattt	60	115
	reverse	ttcatctcctggatgtcttgg		
SLC2A1	forward	ggttgtgccatactcatgacc	60	66
	reverse	cagataggacatccagggtagc		

(7) 統計処理

結果は平均値±標準誤差で表した。2 標本間の有意差検定には Student's *t*-test を用い、有意水準 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 結果

4-1. タウリンにより発現が 2 倍以上変化した遺伝子

DNA マイクロアレイをおこない、データ解析をおこなった。まず、遺伝子発現が 2 倍以上変化した、かつ有意水準 5%未満かつコントロールの発現強度が log ratio で 4 以上の遺伝子プローブに絞り込んだところ、発現が亢進した遺伝子数は 10 個、発現が低下した遺伝子数は 12 個であった。遺伝子リストを Table 1-1-2、1-1-3 にそれぞれ示した。なお、同一遺伝子に対するプローブセットが複数存在

する際、Table における遺伝子の重複は省略し、未知の遺伝子については記載していない。また、その条件で GO 解析をおこない、P-value<0.05 である GO term を抽出した。発現が亢進した GO term は酵素阻害活性、ケラチノサイト分化であり (Table 1-1-4)、低下した GO term はアミノ酸輸送であった (Table 1-1-5)。

4-2. タウリンにより発現が 1.5 倍以上変化した遺伝子

発現が亢進したものについては遺伝子発現が 1.5 倍以上変化し、かつ有意水準 10%未満、かつコントロールの発現強度が log ratio で 4 以上の遺伝子プローブに絞り込んだところ、遺伝子プローブ数は 161 個であった (データ省略)。さらにその条件で GO 解析をおこない、P-value<0.05 である GO term を抽出し Annotation: Biological process に属する GO term に注目したところ、鞭毛・微小管・ヌクレオソームという各種オルガネラの凝集、固着に関わる遺伝子 term、また網膜・毛様体の発達に関する遺伝子 term において発現亢進する結果が得られた (Table 1-1-6)。発現が低下したものについては、遺伝子発現が 1.5 倍以上変化し、かつ有意水準 5%未満、かつコントロールの発現強度が log ratio で 4 以上の遺伝子プローブに絞り込んだところ、遺伝子プローブ数は 59 個であった (データ省略)。さらにその条件で GO 解析をおこない、P-value<0.05 である GO term を抽出し、Annotation: Biological process に属する GO term に注目したところ、アミノ酸輸送、グルコース代謝に関わる遺伝子 term の発現が低下する結果が得られた (Table 1-1-7)。それぞれにおいて具体的に発現が低下した遺伝子を Table 1-1-8、1-1-9 にそれぞれ示した。なお、同一遺伝子に対するプローブセットが複数存在する際、Table における遺伝子の重複は省略した。

4-3. α -arrestin family の遺伝子発現変化

Table 1-1-2 において発現が大きく亢進した TXNIP と arrestin-domain containing 3 (ARRDC3)はいずれも α -arrestin family に属している。そのため、タウリンによる α -arrestin family の遺伝子発現変化を調べたところ、ARRDC4 において有意差はないものの発現が約 2.2 倍亢進する傾向が見られた。一方でその他の α -arrestin family については顕著な発現変化が見られなかった (Table

1-1-10)。

4-4. Real-time RT-PCRによるDNAマイクロアレイの再現性

タウリンにより発現が変化した遺伝子の中で、タウリンによる発現変化が大きく、生理機能が明確になっている遺伝子について Real-time RT-PCR により発現変化の再現性を確認した。TXNIP、MT1H、SLC2A3 については DNA マイクロアレイよりも大きい発現変化が確認され、その他の遺伝子については DNA マイクロアレイと同程度の発現変化が確認された (Table 1-1-11)。

5. 考察

発現が亢進した遺伝子・遺伝子 term について

タウリン添加により 2 倍以上発現が亢進し、有意水準 5%未満の遺伝子プローブ数 (Table 1-1-2) は 10 個に留まり、遺伝子数としては 8 個であった。それらの中で、有益な情報があるものについて抜粋し簡単に記載したい。最も発現変化が高かったものは TXNIP であった。この遺伝子についての詳細な考察は第 2 節以降で扱うが、GO 解析 (Table 1-1-4) において発現増加がみられた酵素阻害活性やケラチノサイト分化に関わる遺伝子 term に該当する遺伝子については、プローブ数は複数あるもののいずれも TXNIP のプローブである。そのためこれらの遺伝子 term に有意な発現上昇がみられたことは、TXNIP がそれらの生理機能に果たす役割は大きいことが言える。酵素阻害活性について、具体的にはチオレドキシンの活性阻害であり、TXNIP はチオレドキシンの相互作用することでその活性を抑制する [43,44]。分化誘導に関してはケラチノサイトに限らず消化管上皮 [45]、NK 細胞 [44]、破骨細胞 [46] などにおいても関わっているとされている。本研究ではすでに分化している Caco-2 細胞を用いて実験をおこなったため、実際にタウリンが腸管上皮細胞において分化を誘導しているかどうかについては未分化の Caco-2 細胞に対してタウリンを与え続け、アルカリフォスファターゼ [47] スクラーゼ-イソマルターゼ [48] などの腸管上皮特異的分化マーカーの発現変化を調べる必要がある。

TXNIPの次に大きい発現誘導がみられたARRDC3はTXNIPのホモログであ

り、同じ α -arrestin familyに属する[49]。そこでタウリンによる α -arrestin familyの遺伝子発現変化を調べたところ、TXNIP、ARRDC3の他にも、有意差はないもののARRDC4についても増加傾向がみられた (Table 1-1-10)。

α -arrestin familyは β -arrestinと共にタンパク質構造にarrestin fold (a two-lobe, immunoglobulin-like β -strand sandwich structures) を持つタンパク質の総称であり、中心部に極性残基を持たず、PPxY motifと呼ばれるアミノ酸配列を持っている点で β -arrestinと異なる[50] (Fig 1-1-1 (A)、(B))。

α -arrestin familyの中でも、TXNIP、ARRDC3、ARRDC4は、遺伝子系統樹において最も近縁関係にあり[49]、実際に80%の相同性を持っている[51]ため、その生理機能が類似していることが推察される。TXNIPとARRDC4については*in vitro*においてグルコースの吸収を抑制するという点で共通しているが、ARRDC3はこの生理機能を有していない[52]。また、ARRDC3は肥満を誘導する因子であり、ARRDC3 KOマウスは熱産生が増加しエネルギー消費率が向上すること[53]から、エネルギーを蓄積することが考えられる。一方でTXNIPについて、TXNIP KOマウスは絶食によるエネルギー不足時に死に至りやすく[54]、また絶食時に心筋などにおいてATP保存、合成に関与するAMP kinase (AMPK) [55]の活性が抑制される[56]ことからTXNIPはエネルギーの維持に関与することが考えられ、この点においてはARRDC3の生理機能と類似している。なお、ARRDC4はこれらに関する報告は為されていないため、この機能を有しているかについては不明である。このように、ARRDC3、ARRDC4それぞれについてTXNIPと共通する生理機能が2つほど考えられ、タウリンがこれらの作用を増強している可能性が考えられる。この検証については第3章でおこなう。

また、他の発現亢進が見られた遺伝子について、PDE4DIPは筋収縮を制御する機能を持ち肥大型心筋症との関連も示唆されている[57]。タウリン欠乏マウスは心筋症を誘発し、タウリンが心筋症発症を抑止すると考えられている[58,59]ことから、PDE4DIPはその制御因子と考えられる。また、CAT1 (SLC24A1) は K^+ 依存性Na-Ca交換チャネルであり、腸管上皮細胞における報告はないものの、網膜の杆体視細胞などで発現が確認されており、このチャネルの変異体は網膜疾患を引き起こす[60]。これは、タウリンの網膜変性緩和作用[32]との関連性が

考えられる。

次に、発現変化が 1.5 倍以上、有意水準が 10%未満の遺伝子について、その GO 解析をもとに機能的な側面から遺伝子発現変化の傾向を探った。このとき、Table 1-1-6 に示すように、微小管の固着、鞭毛やヌクレオソームの凝集に関わるタンパク質の遺伝子、また網膜の桿体細胞発達や恒常性維持に関わるタンパク質の遺伝子群などに発現上昇がみられた。タウリンと微小管、鞭毛、ヌクレオソームの関係についての報告はなされていない。一方、タウリンが網膜に及ぼす影響について、TAUT ノックアウトマウスでは自発的な網膜の変性が進み失明に至ることが報告されており、タウリンが網膜機能の維持に必須であることが示唆されている[33]が、この遺伝子群がタウリンの網膜に対する作用の分子機序に関わっている可能性が考えられる。また、タウリンによる胆汁酸の抱合はペルオキシソームにおいておこなわれる[61,62]ので、Annotation : Cellular Component におけるペルオキシソーム関連の遺伝子群は、タウリンの胆汁酸の抱合との関与が考えられる。

ただし、今回発現亢進が見出された遺伝子群のタンパク質については、GO 解析する限り腸管の生理機能ではないものが多く、今後は実際に該当する組織においてタウリンによる目的遺伝子の発現変化を確認する必要がある。

発現が低下した遺伝子・遺伝子 term について

タウリンにより 2 倍以上発現が低減し、有意水準 5%未満の遺伝子に注目すると遺伝子プローブ数は 12 個であった (Table 1-1-3)。GO 解析の結果アミノ酸輸送に関するタンパク質の遺伝子群について有意な差がみられ (Table 1-1-5)、さらに 1.5 倍以上低減した遺伝子についての GO 解析より、タウリンはアミノ酸輸送だけでなくグルコース輸送・代謝に関する遺伝子 term の発現を抑制することが考えられた (Table 1-1-7)。

アミノ酸輸送について、Table 1-1-8 に示す transport の遺伝子 term に属する遺伝子のうち、アミノ酸トランスポーターは SLC6A6、SLC7A11、SLC38A2、SLC38A1、SLC7A1、SLC7A5 である。一般にアミノ酸トランスポーターは輸

送されるアミノ酸の種類や輸送機構によって分類されている[63]が、上記の6つのトランスポーターについては基質アミノ酸や輸送機構に共通点はほとんどなく、トランスポーターの特性の点からは説明できない。そこで、各トランスポーターの発現制御機構という点から考察を進める。

最も遺伝子発現が下がった TAUT (SLC6A6) は、序論でも示した通りタウリンやβ-アラニン、γ-aminobutyric acid (GABA) などの細胞内取り込みを担っている[42]。xCT (SLC7A11) は、様々なアミノ酸トランスポーターに共通する4F2hc と呼ばれる heavy subunit とヘテロダイマーを形成することで x_c トランスポーターとなり、細胞内にシスチンを取り込み、細胞外へグルタミン酸を放出する交換輸送体である[64]。また、SNAT2 (SLC38A2)、LAT1 (SLC7A5) は中性アミノ酸の輸送を担うトランスポーターであり、xCT、SNAT2、LAT1 の mRNA 発現を転写活性レベルで誘導する共通の転写因子として ATF4 が知られている[65-67]。Table 1-1-9 よりタウリンは ATF4 mRNA 発現を抑制しており、本実験におけるタウリンによるこれら3つのトランスポーター mRNA 発現量の減少は ATF4 を mRNA レベルで抑制しているためだと推察される。さらに、SNAT2 は浸透圧調節作用を持ち、高浸透圧条件下で発現・活性が上昇し、細胞内にアミノ酸を取り込むことで細胞内浸透圧を高めている[68]。この点で SNAT2 は TAUT と共通しており[6]、さらに、アミノ酸欠乏時においてタウリンが TAUT 同様 SNAT2 の mRNA 発現を低下することが報告されている[66]。このことから、タウリンは TAUT と同様の制御機構で SNAT2 mRNA 発現を抑制していることが推察される。一方で、SNAT2 と同じアミノ酸輸送系であり、ほぼ同じアミノ酸を基質とする中性アミノ酸トランスポーター SNAT1 (SLC38A1) については浸透圧調節作用を有しておらず、アミノ酸欠乏時のタウリンによる mRNA 発現低下も生じていない[66]。そのため、SNAT2 などとは別の機構でタウリンによって制御されていると考えられる。また、塩基性アミノ酸トランスポーターである CAT1 (SLC7A1) [69]に関しては、その mRNA の誘導に ATF4 が関与するという報告はなされていないが、GCN2 の活性化が必要であり[70]、アミノ酸欠乏時に GCN2-ATF4 シグナルが誘導され ATF4 mRNA が転写されること[71]から、本研究におけるタウリンによる CAT1 mRNA の発

現抑制機構についても ATF4 mRNA の発現抑制によるものだと推察される。本研究においてはアミノ酸を欠乏させた条件ではないため実験条件が異なるが、タウリンによるアミノ酸トランスポーターの mRNA 発現抑制には主として ATF4 mRNA 発現の低下によるものだという可能性が推察された。

次に、タウリンによるグルコース輸送、代謝の抑制 (Table 1-1-9) に関して考察する。2型糖尿病患者においてTAUTのmRNA発現は抑制されること[72]、また造血幹細胞においてグルコース添加によっても抑制されたりすること[73]から、タウリンまたはTAUTがグルコース代謝に影響を与えていることが考えられている。PDK1はピルビン酸脱水素酵素キナーゼであり、pyruvate dehydrogenase (PDH) をリン酸化することで不活性化し、解糖系においてピルビン酸からアセチルCoAへの変換を阻害する[74]。その上流としてMYCは hypoxia-inducible transcriptional factor 1 (HIF-1) 存在下でPDK1の遺伝子発現を誘導しており[75]、解糖系の抑制に関与している。また、ATF4ノックアウトマウスでは糖新生の減少に伴う低血糖を生じること[76]から糖新生に関与していることが考えられる。このようにタウリンはグルコース代謝に関して、解糖系を抑え、ならびに糖新生を誘導する遺伝子の発現を抑制するため、遺伝子発現を通して解糖系を活性化することが推察される。またLAT1は基質の選択性が低く、糖原性アミノ酸を含む多くの中性アミノ酸の取り込みを担っている。そのため、この遺伝子発現を抑えることは糖新生の抑制につながるものが考えられ、上述した解糖系の活性化とも一致する。しかしながら一方で、グルコース取り込みに関与するGLUT3 (SLC2A3) の遺伝子発現も抑制しており解糖系の材料となるグルコース量を減少させることになる。これらを考慮するとタウリンはグルコースの取り込みを抑え、かつ解糖系を誘導することで「細胞内グルコース量を減らす方向にはたらく」ことが考えられる。

このように、DNAマイクロアレイの結果よりタウリンがアミノ酸輸送やグルコース代謝に影響を与えていることが推察されたが、実際にはタウリンがこれらの生理作用を発揮しているのかについて検証する必要がある。

なお、DNAマイクロアレイを用いたタウリンによる遺伝子発現変化の研究については、肝臓モデルであるHepG2細胞において以前におこなわれていた（タウリン濃度：20 mM）[77]が、今回の結果とは一致しなかった。これは細胞株の特性や実験条件の違いによるものと思われる。

Real-time RT PCRにより再現性が得られた遺伝子の生理的意義について

これまで、DNAマイクロアレイ解析を用いてタウリンによって1.5倍以上の発現変化が見られた遺伝子について網羅的な解析をおこなったが、それらの中でも発現変化が大きく、生理機能が明確になっている遺伝子についてReal-time RT-PCRを用いてマイクロアレイの再現性を確認した。以下TXNIP以外について考察する。

MT1Hはmetallothionein (MT) familyの一つである。DNAマイクロアレイ解析結果において、タウリンにより1.5倍以上の発現変化が見られた具体的な遺伝子の中にはMT1Hを含め5つのMT familyが存在し（データ省略）、Table 1-1-6においてAnnotation:Molecular Functionに属するcadmium ion bindingに該当する遺伝子termである。さらに、発現がpresentと判断されたMT familyはすべてタウリンにより1.34~1.71倍の間で発現誘導がみられた（データ省略）。MT1Hはその代表として選択した。MTは分子量6-7 kDaの小タンパク質でシステイン残基を30%含み、銅、カドミウム、亜鉛などの2価の重金属イオンと高い親和性を持って結合する。これにより細胞内の重金属量を一定に維持している。特にMT1、2はアストログリア、ミクログリア、マクロファージ、上皮細胞を主としてユビキタスに存在しており、様々なストレスにより誘導される[78]。MTがCaco-2細胞に及ぼす作用についていくつかの報告がなされており、重金属の解毒・恒常性維持[79-81]、抗炎症作用[82]、各種フラボノイドによるmRNAレベルでの誘導を介した抗酸化活性などが挙げられる[83-85]。腎臓において、タウリンの前処理がカドミウムストレスによって誘導される脂質過酸化やタンパク質カルボニル化を抑制し、カドミウム毒性から保護すること[86]もふまえると、タウリンの抗酸化作用を中心とした生理作用の一部がMTの発現亢進を介したものである可能性も大いに考えられる。

Caco-2 細胞はヒト結腸ガン由来細胞であるためガン細胞の性質も持っている。以下 xCT (SLC7A11)、ATF4、GLUT3 (SLC2A3)、GLUT1 (SLC2A1) については Caco-2 細胞をガン細胞と見なした上で、ガン細胞における生理機能の観点から考察したい。

xCT のトランスポーターを抑制することはガン細胞にアポトーシスを誘導するため様々なガン疾患に有効だとされている[64,87]。その mRNA を転写活性レベルで誘導する転写因子 ATF4[65]も xCT と同様にガン発症に関与しており、ガン転移因子を誘導するほか、ガン抑制遺伝子 p53 の働きを抑制する[88]。

GLUT3、GLUT1 はグルコースに対する親和性が高く、基礎状態におけるグルコース輸送に深く関わっているとされている[89,90]。しかしながら、大部分の組織においてガンが発症した際に GLUT1 の過剰発現が確認されており[91]、また肺や卵巣、消化管などにおいて正常組織では GLUT3 の発現が見られないが、ガン発症により誘導される[92]といった報告などから、GLUT1 および GLUT3 の過剰発現は、ガン細胞へのグルコースの供給を通してガン細胞の増殖、進行・転移を助長すると考えられている。特に GLUT1、GLUT3 に関しては実際の腸管上皮細胞の基底膜においては発現しておらず、腸管において外部からグルコースの供給を担っているのは sodium-glucose transporter 1 (SGLT1) [93,94]である。その点からもガン細胞における生理的意義という考察は妥当である。タウリンは GLUT1、GLUT3 の mRNA 発現を抑制し、ガン細胞にとっての栄養源であるグルコースの吸収を抑制することでガンの悪化を抑える可能性が考えられる。

このように複数の遺伝子の生理機能からタウリンの抗ガン作用の可能性が示唆されたが、タウリンのガン抑制に関する報告はなされていない。大腸ガンを予防する作用を持つ食品成分の評価系として用いられている大腸異常腺窩巢 (aberrant crypt foci, ACF) モデルマウス[95-97]等を用いて、腫瘍の形成、拡大がタウリンにより抑制されるか検討することでタウリンの抗ガン作用を示すことができるかもしれない。

一方で、Caco-2 細胞を腸管上皮細胞と見なした場合アポトーシスと分化の関係から考えてみる。これらはどちらも増殖を止めるという点で共通しており、

シグナル経路は類似している[98-100]。Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)などは分化とアポトーシスどちらにも関わり、低濃度において分化を誘導し、高濃度になるとアポトーシスを引き起こす[101]。上皮細胞において、幹細胞は活発に分裂し増殖しているがその細胞が管腔側へ移動していくと増殖が止まり、アポトーシス様のシグナル伝達が誘導されて上皮細胞へと分化していく。タウリンに関して、アポトーシスや毒性に関する報告がなされていないことから、これらの遺伝子発現変化は、アポトーシスを示さない程度の影響を与えて分化を誘導する可能性が考えられる。腸管上皮細胞は絨毛の基部にあるクリプトと呼ばれるくぼみに存在する幹細胞から作られる単層の上皮細胞からなる細胞層であり、活発に分裂している幹細胞は絨毛の表面を移動しながら機能を持った上皮細胞に分化していく。最終的には絨毛の先端から脱落したり、マクロファージに貪食されたりすることにより消失し、新陳代謝の活発な組織である。そのため、分化を誘導することにより腸管上皮細胞の入れ替わりが活発になり、上皮細胞に比較的新しい細胞が存在することになる。その結果として腸管上皮細胞の生理機能が高まるという利点が考えられる。実際にタウリンがアポトーシスを誘導しているのか分化を誘導しているのかについては、今後それぞれのマーカーの変化について検討する必要がある。

このようにタウリンによる遺伝子発現変化について網羅的に解析してきたが、次節ではDNAマイクロアレイ結果から、タウリンにより最も大きい発現変化を示したTXNIPに着目し、タウリンによる発現亢進の特性について解析をおこなった。

Table 1-1-2 タウリン処理により遺伝子発現が2倍以上亢進したもののうちcontrolの発現強度がlog ratioで4以上かつp<0.05である遺伝子

RefSeq Transcript ID	Gene Symbol	Gene Title	Fold change	control (log ratio)	taurine (log ratio)
NM_006472	TXNIP	thioredoxin interacting protein	9.91	5.28	8.58
NM_020801	ARRDC3	arrestin domain containing 3	3.61	3.36	5.21
NM_001002810, NM_001002811, NM_001002812, NM_014644, NM_022359	PDE4DIP	phosphodiesterase 4D interacting protein	2.82	2.73	4.23
XR_040048, XR_040049, XR_040050	PPP1R3E	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3E	2.48	3.52	4.83
NM_002618	PEX13	peroxisomal biogenesis factor 13	2.33	4.07	5.29
NM_004727	SLC24A1	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 1	2.29	4.55	5.75
NM_003528	HIST2H2BE	histone cluster 2, H2be	2.15	4.43	5.53
NM_032783	CBR4	carbonyl reductase 4	2.14	5.02	6.11
NM_016311, NM_178190, NM_178191	ATPIF1	ATPase inhibitory factor 1	2.10	5.09	6.17
NM_032890	DISP1	CDNA FLJ25803 fis, clone TST07160	2.09	4.96	6.03

Table 1-1-3 タウリン処理により遺伝子発現が2倍以上低下したもののうちcontrolの発現強度がlog ratioで4以上かつp<0.05である遺伝子

RefSeq Transcript ID	Gene Symbol	Gene Title	Fold change	control	taurine
NM_001134367, NM_001134368, NM_003043	SLC6A6	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	0.24	7.85	5.80
NM_015440	MTHFD1L	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1-like	0.42	5.64	4.39
NM_014331	SLC7A11	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	0.42	5.43	4.19
NM_006785, NM_173844	MALT1	mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1	0.42	4.95	3.71
NM_004419	DUSP5	dual specificity phosphatase 5	0.44	7.31	6.13
NM_002165, NM_181353	ID1	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	0.45	6.78	5.61
NM_002610	PDK1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	0.46	5.84	4.72
NM_020371	AVEN	apoptosis, caspase activation inhibitor	0.46	5.11	3.99
NM_015659	RSL1D1	ribosomal L1 domain containing 1	0.47	6.16	5.06
NM_018976	SLC38A2	solute carrier family 38, member 2	0.48	10.24	9.17
NM_006469	IVNS1ABP	influenza virus NS1A binding protein	0.50	8.33	7.32
NM_006372	SYNCRIP	synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	0.50	7.49	6.49

Table 1-1-4 タウリンによって2倍以上発現が亢進した遺伝子を
GO解析にかけたとき、P-valueが0.05未満のGO term

Annotation: Molecular Function	プローブ数	P-value
enzyme inhibitor activity	4	9.6E-03

Annotation: Cellular Component	プローブ数	P-value

Annotation: Biological process	プローブ数	P-value
keratinocyte differentiation	3	2.7E-03

Table 1-1-5 タウリンによって2倍以上発現が低減した遺伝子を
GO解析にかけたとき、P-valueが0.05未満のGO term

Annotation: Molecular Function	プローブ数	P-value

Annotation: Cellular Component	プローブ数	P-value

Annotation: Biological Process	プローブ数	P-value
organic acid transport	3	3.4E-02
amine transport	3	3.7E-02
amino acid transport	3	3.9E-02
carboxylic acid transport	3	4.5E-02

Table 1-1-6 タウリンによって1.5倍以上発現が亢進した遺伝子をGO解析にかけたとき、P-valueが0.05未満であるGO term

Annotation: Molecular Function	プローブ数	P-value
cadmium ion binding	5	2.1E-05

Annotation: Cellular Component	プローブ数	P-value
protein-DNA complex	6	2.5E-03
nucleosome	6	3.0E-03
BBosome	3	3.4E-03
motile secondary cilium	2	2.0E-02
microbody	5	3.6E-02
cilium membrane	2	3.7E-02
peroxisome	5	3.7E-02
vacuolar lumen	2	4.4E-02

Annotation: Biological process	プローブ数	P-value
microtubule anchoring	2	9.2E-03
positive regulation of flagellum assembly	2	1.1E-02
sensory cilium assembly	3	1.3E-02
regulation of flagellum assembly	2	1.4E-02
nucleosome assembly	6	1.8E-02
microtubule anchoring at centrosome	2	1.8E-02
sensory processing	2	2.1E-02
nucleosome organization	6	2.4E-02
retinal rod cell development	2	2.5E-02
retina homeostasis	3	2.6E-02
intracellular sequestering of iron ion	2	2.7E-02
convergent extension involved in gastrulation	2	3.0E-02
convergent extension	2	3.3E-02
regulation of cilium movement involved in ciliary motility	2	3.4E-02
regulation of microtubule-based movement	2	3.6E-02
regulation of cilium beat frequency involved in ciliary motility	2	3.9E-02
pigment granule aggregation in cell center	2	4.5E-02
striatum development	2	4.8E-02

Table 1-1-7 タウリンによって1.5倍以上発現が低減した遺伝子をGO解析にかけたとき、P-valueが0.05未満であるGO term

Annotation : Molecular Function	プローブ数	P-value
neutral amino acid transmembrane transport	5	2.0E-06
amino acid transmembrane transporter activity	6	3.3E-06
amine transmembrane transporter activity	6	1.4E-05
organic acid transporter activity	6	1.5E-05
carboxylic acid transmembrane transporter activity	6	1.9E-05
active transmembrane transporter activity	9	1.0E-04
secondary active transmembrane transporter activity	7	2.4E-04
symporter activity	6	4.1E-04
solute:cation symporter activity	5	1.6E-03
transmembrane transporter activity	10	7.0E-03
organic acid:sodium symporter activity	3	7.3E-03
substrate-specific transmembrane transporter activity	9	1.6E-02
L-amino acid transmembrane transporter activity	3	1.7E-02
transporter activity	11	1.7E-02
solute:amino acid symporter activity	2	3.6E-02
solute:sodium symporter activity	3	4.0E-02
glucose transmembrane transporter activity	2	4.0E-02
hexose transmembrane transporter activity	2	4.4E-02
cation:amino acid symporter activity	2	4.6E-02
substrate-specific transporter activity	9	4.7E-02
monosaccharide transmembrane transporter activity	2	5.0E-02

Annotation : Cellular Component	プローブ数	P-value
cellular_component	52	3.6E-03
cell part	50	4.0E-03

Annotation : Biological Process	プローブ数	P-value
amino acid transport	8	9.5E-08
transmembrane transport	10	2.6E-07
amine transport	8	2.7E-07
organic acid transport	8	5.2E-07
carboxylic acid transport	8	6.3E-07
neutral amino acid transport	4	6.3E-05
cellular process	44	3.3E-03
biological_process	47	3.2E-02
carbohydrate metabolic process	9	3.8E-02

Table 1-1-8 タウリンによって発現が1.5倍以上低減したもののうち、GO termのtransportに属しP-valueが0.05未満である遺伝子

RefSeq Transcript ID	Gene Symbol	Gene Title	Fold change	control (log ratio)	taurine (log ratio)
NM_001134367, NM_001134368, NM_003043	SLC6A6	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	0.24	7.85	5.80
NM_014331	SLC7A11	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	0.42	5.43	4.19
NM_006785, NM_173844	MALT1	mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1	0.42	4.95	3.71
NM_018976	SLC38A2	solute carrier family 38, member 2	0.48	10.24	9.17
NM_001077484, NM_030674	SLC38A1	solute carrier family 38, member 1	0.58	8.00	7.20
NM_016354, XM_001720240	LOC100134295, SLCO4A1	similar to Solute carrier organic anion transporter family, member 4A1; solute carrier organic anion transporter family, member 4A1	0.59	5.77	5.00
NM_003045	SLC7A1	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1	0.61	7.69	6.99
NM_007052, NM_013955	NOX1	NADPH oxidase 1	0.61	6.90	6.20
NM_018941	CLN8	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 8 (epilepsy, progressive with mental retardation)	0.63	6.24	5.56
NM_006931	SLC2A3	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	0.65	10.14	9.51
NM_003486	SLC7A5	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5	0.65	7.52	6.90
NM_002729	HHEX	hematopoietically expressed homeobox	0.66	5.88	5.28

Table 1-1-9 タウリンによって発現が1.5倍以上低下したもののうち、GO termの carbohydrate metabolic processに属しP-valueが0.05未満である遺伝子

RefSeq Transcript ID	Gene Symbol	Gene Title	Fold change	control (log ratio)	taurine (log ratio)
NM_001134367, NM_001134368, NM_003043	SLC6A6	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	0.24	7.85	5.8
NM_002610	PDK1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	0.46	5.84	4.72
NM_002467	MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	0.51	8.81	7.84
NM_003680	YARS	tyrosyl-tRNA synthetase	0.55	7.02	6.16
NM_004751	GCNT3	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3, mucin type	0.56	5.94	5.11
NM_001675, NM_182810	ATF4	activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)	0.58	10.06	9.28
NM_006931	SLC2A3	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	0.65	10.14	9.51
NM_003486	SLC7A5	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5	0.65	7.52	6.9

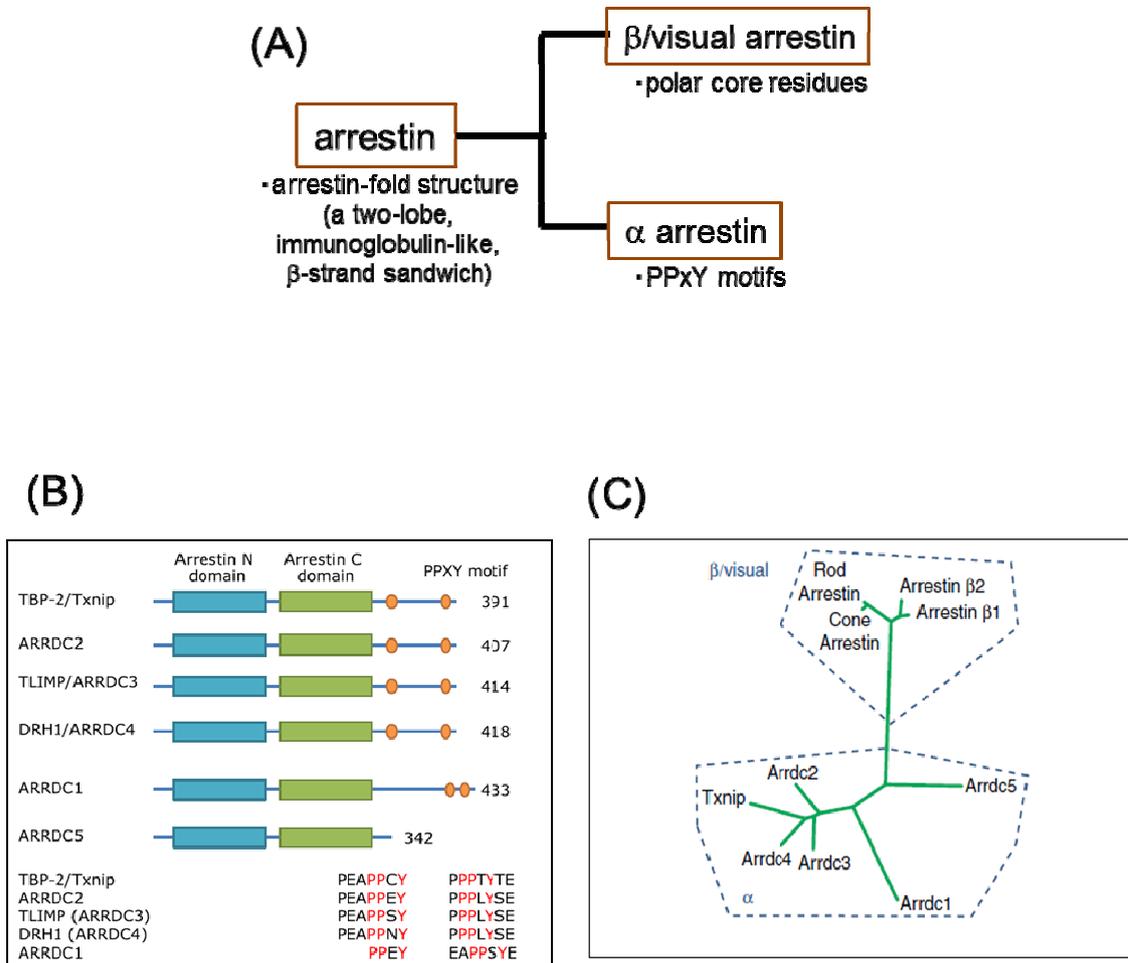


Fig. 1-1-1 arrestin family

(A) arrestin familyの定義と分類、(B) α-arrestin familyのアミノ酸配列
(C) arrestin familyの進化系統樹

(B)は文献[51]、(C)は文献[49]より抜粋

Table 1-1-10 α-arrestin familyの遺伝子発現変化

RefSeq Transcript ID	Gene Symbol	Gene Title	Fold change	Control (log ratio)	Taurine (log ratio)
NM_006472	TXNIP	thioredoxin interacting protein	9.91	5.28	8.58
NM_152285	ARRDC1	arrestin domain containing 1	1.14	2.77	2.96
NM_001025604, NM_015683	ARRDC2	arrestin domain containing 2	0.83	3.63	3.36
NM_020801	ARRDC3	arrestin domain containing 3	3.61	3.36	5.21
NM_183376	ARRDC4	arrestin domain containing 4	2.23	1.85	3.01

Table 1-1-11 Real-time PCRによるDNAマイクロアレイの再現性

accession number	gene symbol	gene title	fold change (DNA microarray)	fold change* (real-time PCR)
NM_006472	TXNIP	thioredoxin interacting protein	9.91	14.6 ± 0.54
NM_005951	MT1H	metallothionein 1H	1.69	3.43 ± 0.11
NM_014331	SLC7A11	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	0.42	0.42 ± 0.02
NM_001675, NM_182810	ATF4	activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)	0.58	0.57 ± 0.03
NM_006931	SLC2A3	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	0.65	0.39 ± 0.10
NM_006516.1	SLC2A1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	0.58	0.54 ± 0.07

*値は平均値±S.E. (n=3)

第 1 章

第 2 節 タウリンが TXNIP 発現に及ぼす影響

1. 緒言

第 1 節におけるタウリンによる遺伝子発現変化の網羅的解析により、タウリンがどのような遺伝子・遺伝子群の発現を調節しているかが明らかとなり、タウリンがどのような生理作用をもたらすのかについていくつかの可能性が示唆された。第 2 節では、DNA マイクロアレイの結果からタウリンにより発現が変化した遺伝子の中で最も大きい変化が確認された TXNIP について、その mRNA およびタンパク質発現変化およびタウリンによる特異性について検討をおこなった。

2. 実験材料

(1) 細胞

ヒト結腸ガン由来株化細胞である LS180 細胞、ヒト肝ガン由来株化細胞 HepG2 細胞いずれも、American Type Culture Collection より購入した。

(2) 実験器具、機器

ヒートブロックは IWAKI より購入した。6 ウェルプレートは Corning より購入した。25G needle、1 ml シリンジはテルモより購入した。電気泳動装置、パワーサプライ、ブロットティング装置はニホンエイドーより、3MM 濾紙はアトーより購入した。ルミノイメージアナライザー (LAS-1000 mini)、画像解析ソフト (Image gauge) は富士フィルムより購入した。

(3) 試薬類の調製

① 0.1% Triton-X : Milli-Q 水 100 ml に Triton-X を 100 μ l 添加した。

② 50% TCA : トリクロロ酢酸 (trichloroacetic acid, TCA) 50 g を Milli-Q 水

50 ml に溶かした。

③ TNE buffer : 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% NP-40、20 mM NaF、100 μ M Na₃VO₄、0.1 % inhibitor cocktail (Sigma、使用直前に添加)

④ 2 x Loading buffer : 125 mM Tris-HCl pH 6.8、4% (w/v) SDS、14% グリセロール、10% (w/v) β -メルカプトエタノール、0.05% (w/v) ブロモフェノールブルーを混ぜて調製した。

⑤ 分離ゲル溶液 (10%アクリルアミド) : 蒸留水 2.5 ml に 30%アクリルアミド+0.8%ビスアクリルアミド溶液を 2 ml、1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)+0.4%SDS 溶液を 1.5 ml、10%APS 溶液を 40 μ l を混合し、さらに TEMED 3.3 μ l を混合して分離ゲル溶液とした。

⑥ 濃縮ゲル溶液 (4.5%アクリルアミド) : 蒸留水 2.4 ml に 30%アクリルアミド+0.8%ビスアクリルアミド溶液を 0.6 ml、1.5 M Tris-HCl (pH 6.8)+0.4% SDS 溶液を 1 ml、10%APS 溶液を 20 μ l 混合し、さらに TEMED 6.7 μ l を混合して濃縮ゲル溶液とした。

⑦ PBS-T : PBS(-) 500 ml に Tween 20 を 250 μ l 添加した。

⑧ 泳動バッファー : 2.5 mM Tris-HCl、19.2 mM グリシン、0.1% (w/v) SDS を混合して泳動バッファーとした。

⑨ ブロッキングバッファー : 100 mM Tris-HCl、192 mM グリシン、20% メタノールを混合してブロッキングバッファーとした。

⑩ ブロッキングバッファー : PBS-T にスキムミルク粉末を 5%になるように

溶かして調製した。

⑪ LS 180 細胞培養培地： Caco-2 細胞と同様のものを用いた。

⑫ HepG2 細胞培養培地： DMEM に対し、不活性化した FCS 56 ml、ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 2 ml を無菌操作で混合し、細胞培養培地とした。

(3) サンプル

ヒポタウリンは Sigma、 β -アラニン は和光純薬工業、GABA は東京化成工業よりそれぞれ購入した。

(4) サンプル培地の調製

各サンプルをそれぞれの終濃度になるように細胞培養培地に溶解し、0.20 μm のフィルターを通すことによって調製した。

その他上記以外は第 1 節に準じた。

3. 実験方法

(1) Caco-2、LS180、HepG2 細胞の培養、継代

100 mm ディッシュによる培養と継代は LS180 細胞、HepG2 細胞いずれも Caco-2 細胞と同様の方法でそれぞれの細胞培養培地でおこなった。

Real time RT-PCR 用には、いずれもコラーゲンコートした 24 ウェルプレートを用いておこない、 2.0×10^5 cell/ml の細胞懸濁液を 500 μl ずつ播いた。細胞内アミノ酸量の測定用には、Caco-2 細胞を用いて上記と同様の操作をおこなった。Western blotting 用には、コラーゲンコートした 6 ウェルプレートを用いておこない、 2.0×10^5 cell/ml の Caco-2 細胞懸濁液を 2 ml ずつ播いた。

(2) Real-time RT PCR

① サンプル処理

・ Caco-2 細胞における TXNIP mRNA 発現変化の測定

プレート上で 2 週間培養し、小腸上皮細胞様に分化させた Caco-2 細胞（以下分化 Caco-2 細胞とする）をタウリン 5、10、25、50、100 mM を含む培地で 48 時間培養した。

・ LS180、HepG2 細胞における TXNIP mRNA 発現変化の測定

LS180、HepG2 細胞を 24 ウェルプレート上に播いて 3 日後にタウリン 100 mM を含む培地で 48 時間培養した。

・ タウリンや他のアミノ酸による TXNIP mRNA 発現変化の測定

分化 Caco-2 細胞をタウリン、ヒポタウリン、 β -アラニン、GABA 100 mM をそれぞれ含んだ培地で 48 時間培養した。

・ タウリンと β -アラニンの競合実験

分化 Caco-2 細胞にタウリン 25 mM や β -アラニン 100 mM、または両方を含んだ培地で 48 時間培養した。

② total RNA の抽出

プレートの各ウェルから培地を除き、PBS(-)で洗浄した。PBS(-)を除去後、ISOGEN (ニッポンジーン) を 500 μ l ずつ添加して細胞を溶解し、エッペンチューブに回収した。その後ボルテックスして細胞を更に溶解したものにクロロホルムを 100 μ l 加え、よく混ぜてから室温で 2~3 分静置し、4°C 15,000 rpm で 15 分間遠心した。RNA が存在する水層のみを新しいエッペンチューブに回収した。回収した水層と等量の 2-プロパノールを加えてよく混合した後、室温で 10 分程度放置した。4°C 15,000 rpm で 10 分間遠心した後上清を取り除き、70% エタノール 500 μ l でリンスして更に 4°C で 15,000 rpm、5 分間遠心した。再び上清を取り除き、RNA の沈殿を風乾させた後、RNA 用 Milli-Q 水に溶解させた。

③ cDNA の合成

cDNA の合成は PrimeScript RT Master Mix (TaKaRa) を使用し、すべて氷上でおこなった。(1)で抽出した total RNA 0.5 μg に相当する液量に、RNA 用 Milli-Q で 8 μl に fill up した。その後、5 x PrimeScript RT Master Mix 2 μl を加え、静かに混合した。スピンドウンした後、37 $^{\circ}\text{C}$ のヒートブロックの上で 15 分間インキュベートした。その後、85 $^{\circ}\text{C}$ で 5 秒間加熱することで逆転写酵素を失活させ、氷上に回収して反応を停止させた。合成した cDNA は-30 $^{\circ}\text{C}$ に保存した。

(3) 細胞内アミノ酸量の測定

① サンプル処理

24 ウェルプレート上で 2 週間培養し、腸管上皮細胞様に分化させた Caco-2 細胞をタウリンを含んだ培地で 24 時間培養し、細胞を回収し細胞内タウリン濃度をアミノ酸分析計により測定した。

② サンプル調製及び細胞内アミノ酸量の測定

Caco-2 細胞を PBS(-) で 2 回洗浄し、0.1% Triton X-100 250 μl で細胞を可溶化、エッペンに回収した。10,000 rpm で 2-3 分間、室温で遠心し、上清 225 μl を別のエッペンに回収、そこに 50% TCA を 25 μl ずつ加えた。ボルテックスでよく攪拌した後、10,000 rpm で 15 分、室温で遠心した。その後、上清をシリンジで回収し、0.2 μm のフィルター (クラボウ) を通してアミノ酸分析用のサンプルとした。このサンプルをアミノ酸分析計 (L-8900 high-speed amino acid analyzer : 日立ハイテック) に供し、細胞内のアミノ酸 (タウリン) 量を測定した。

(4) Western blotting

① サンプル処理

6 ウェルプレート上で 2 週間培養し、腸管上皮細胞様に分化させた Caco-2 細胞を上記で調製したタウリン 25、50、100 mM を含んだ培地中で 48 時間培養した。その後、細胞を回収し、TXNIP のタンパク質発現量を検出した。

② whole cell extract の調製

4°Cに冷やした PBS(-)で細胞を2回洗浄した後、セルスクレイパーで細胞を回収した。1,000 x g、4°Cで5分遠心し、上清を除いた後、100 µl の TNE buffer を加え、25G シリンジに通すことで細胞を破碎した。15,000 rpm、4°Cで10分遠心し、上清を whole cell extract として回収した。

そのうち 4 µl はタンパク質定量用に分けておき、残りの液量と等量の 2 x Loading バッファーを加え、98°Cで5分ボイルして急冷することにより western blotting のサンプルとした。

③ タンパク質量の定量

前項で得られた上清 1 µl に Milli-Q 水 49 µl を加えることにより 50 倍希釈溶液を調製した。この 50 倍希釈液を 96 ウェルプレートの 3 ウェルに 10 µl ずつ入れ、5 倍希釈した BIO-RAD Protein Assay 反応液 (BIO-RAD) を 200 µl 加えた。室温で 5 分間反応させた後、吸光光度計 (MODEL 550 : BIO-RAD) で 595nm の吸光度を測定した。検量線用に、標準タンパク質として BSA 31.25、62.5、125、250、500 µg/ml をそれぞれ 2 ウェルに 10 µl ずつ入れ、同様に反応、測定を行った。

④ SDS-PAGE

ガラス板の間にシリコンシールをはさみ、クリップでとめた。分離ゲル溶液を混合してすばやくガラス板の間に流し込んだ。その上から Milli-Q 水を注ぎ、ゲルが固まるまで静置した。ゲルが固まったのを確認したら Milli-Q 水を除き、ろ紙などを用いて余分な水分を除いた。続いて濃縮ゲル溶液を混合し、分離ゲルの上に注いでコームをさした。ゲルが固まったらゲル板からコームを抜き、シリコンシールを外し、泳動槽にセットした。泳動バッファーを注いでゲルが完全に浸るようにした後、各レーンにタンパク量がそれぞれ一定になるようにサンプルを添加した。ゲル一枚につき定電流で 20 mA の電流を流して約 90 分間泳動を行った。

⑤ ブロットティング

PVDF 膜 (Immobilion : Millipore) を適当な大きさに切り、メタノールに 20 秒程浸した後、ブロットティングバッファーに 15~20 分程度浸した。ろ紙も同様にブロットティングバッファーに浸した。ブロットティング装置に下から順に、ろ紙 3 枚、PVDF 膜、ゲル、ろ紙 3 枚を重ね、ブロットティングバッファーを全体に行き渡らせてからブロットティング装置をセットした。ブロットティングは定電流で 200 mA、2 時間おこなった。

⑥ ブロッキング

ブロットティング終了後、タンパク質の転写された PVDF 膜を PBS-T で一度洗浄してからブロッキングバッファーに浸し、室温で 1.5 時間振とうまたは 4℃で一晩静置した。

⑦ 抗体反応

ブロッキングをした PVDF 膜を PBS-T で 5 分間 x 3 回洗浄した後、1 次抗体反応をおこなった。TXNIP は monoclonal anti-Txnip (医学生物学研究所 (MBL)) を Can Get Signal 1 (TOYOBO) で 1000 倍希釈したもの、 β -actin は monoclonal anti- β -actin antibody (Sigma-Aldrich) を Can Get Signal 1 で 2500 倍希釈したものを反応溶液とし、これに洗浄した PVDF 膜を浸して室温で 1 時間静置した。1 次抗体反応が終わった PVDF 膜を PBS-T で 5 分 x 3 回洗浄した後、2 次抗体反応をおこなった。TXNIP は HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Amersham) を Can Get Signal 2 (TOYOBO) で 1000 倍希釈したもの、 β -actin は HRP 標識抗マウス IgG 抗体を同じく can get signal 2 で 2500 倍希釈したものを反応溶液とし、これに洗浄した PVDF 膜を浸して室温で 1 時間静置した。

⑧ ECL 反応

検出には ECL plus Western Blotting Detection System (GE healthcare) を用いた。A 液 1000 μ l、B 液 25 μ l を混合して反応液を調製した。二次抗体反応を終えた PVDF 膜を PBS-T で 5 分 x 3 回洗浄してサランラップの上へのせた後、

調製した反応液を全量のせて 5 分間反応を行った。その後ルミノイメージアナライザーLAS-1000 mini で解析し、得られたバンドを Image gauge を用いて定量した。

(5) 統計処理

結果は平均値±標準誤差で表した。有意差検定には Dunnett's test、Student's *t*-test、Tukey's test を用い、有意水準 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

その他上記以外は第 1 節に準じた。

4. 結果

4-1. タウリンによる TXNIP mRNA 発現誘導の濃度依存性

DNA マイクロアレイ解析により見出された「タウリンにより発現変化が得られた遺伝子」のうち、最も顕著な変化が見られた TXNIP に着目した。Caco-2 細胞をタウリン 5、10、25、50、100 mM の濃度で 48 時間処理した後、Real-time RT PCR 法により TXNIP mRNA 発現量を調べた。その結果、タウリン濃度依存的に TXNIP mRNA 発現量の増加が見られ、25 mM 以上の濃度で有意な発現上昇となった (Fig. 1-2-1)。

4-2. タウリンが TXNIP のタンパク質発現量に与える影響

Caco-2 細胞をタウリンを含む培地で培養した後、細胞を回収し TXNIP のタンパク質発現量を Western blotting 法により調べた。タウリンを 25、50、100 mM で 48 時間処理した結果、タウリンの濃度依存的に TXNIP のタンパク質発現量の上昇が認められ、100 mM においてはコントロールと比べて約 3.8 倍まで増加した (Fig. 1-2-2)。以上より、タウリンはタンパク質レベルで TXNIP の発現を亢進することが示された。

4-3. タウリンが LS180、HepG2 細胞の TXNIP mRNA 発現量に与える影響

タウリンを 100 mM の濃度で 48 時間、ヒト結腸ガン由来細胞 LS180 に処理

したところ、約 2.5 倍の TXNIP mRNA 発現量の増加が見られた (Fig. 1-2-3-A)。同様の条件でヒト肝ガン由来細胞 HepG2 を処理したところ、約 1.5 倍の TXNIP mRNA 発現量の増加が見られた (Fig. 1-2-3-B)。このことからタウリンは腸管上皮細胞だけでなく、肝臓においても TXNIP の発現を誘導することが示唆された。

4-4. 他のアミノ酸が TXNIP mRNA 発現量に与える影響

タウリン添加による TXNIP mRNA 発現量の増加がタウリン特異的なものであるか調べるために、タウリンと構造的または機能的に類似したアミノ酸であるヒポタウリン、 β -アラニン、GABA を用いて TXNIP mRNA 発現量に与える影響を調べた。それぞれのアミノ酸 100 mM で 48 時間処理した結果、ヒポタウリンはタウリンほどではないものの TXNIP mRNA の有意な発現上昇が見られたが、一方で β -アラニンや GABA は TXNIP mRNA の発現変化を誘導しなかった (Fig 1-2-4)。以上より、TXNIP mRNA 発現はタウリン特異的に誘導されることが示唆された。

4-5. β -アラニン存在下でのタウリンによる TXNIP mRNA 発現変化

Caco-2 細胞において β -アラニンは TAUT の基質として知られており、競合的にタウリンの吸収を阻害する [102]。そのため、 β -アラニンがタウリンによる TXNIP mRNA の誘導を阻害するかどうかについて検討した。タウリン 25 mM で 48 時間処理した結果、TXNIP mRNA 発現量は 2.7 倍上昇した一方で、タウリン 25 mM と β -アラニン 100 mM を同時に添加すると、その上昇がコントロールレベルまで抑制された (Fig. 1-2-5)。このことからタウリンによる TXNIP mRNA 発現誘導に TAUT が関与していることが考えられた。

4-6. β -アラニン存在、非存在下での細胞内タウリン濃度の変化

タウリンと β -アラニンを同時に添加した場合に、タウリン単独添加時と比べて細胞内のタウリン濃度がどの程度減少しているかを調べるためにアミノ酸分析計を用いて細胞内タウリン濃度を測定した。その結果、タウリン添加 24 時間後

において、細胞内タウリン濃度は約 15 倍上昇したが、 β -アラニン存在下では細胞内タウリン濃度が約 55%にまで減少した (Fig. 1-2-6)。

5. 考察

TXNIP は DNA マイクロアレイの結果よりタウリンによって最も大きい発現誘導を示した遺伝子である。この発現亢進はタウリン濃度依存的にみられ (Fig. 1-2-1)、タンパク質レベルにおいても同様にタウリン濃度依存的な発現誘導が確認された (Fig. 1-2-2)。また、タウリンによる TXNIP mRNA 発現量の増加は他の腸管モデル細胞株である LS180、肝臓モデル細胞株である HepG2 においてもみられ (Fig. 1-2-3)、肝臓においても誘導されることが示唆された。

TXNIP については様々な生理機能が報告されている[44]。TXNIP KO マウスはエネルギー不足に対する適応性が著しく低下する[54,56,103-105]。脂肪酸の代謝効率の低下[54]、高脂血症の発症[103,106]、低血糖状態などの代謝異常[104,105]を生じるためである。さらに、TXNIP は肝臓の糖新生に寄与しており[107]、TXNIP の変異と糖尿病、高血圧発症には関連性が示唆されている[106,108]。また、TXNIP は心臓の肥大を制御するとされている[109]。さらには、TXNIP を適度に強発現させることによる免疫増強も考えられている[44]。腸管における生理機能としては Takahashi らによって報告されている[110]。慢性炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎の患者の炎症部位である大腸粘膜における TXNIP mRNA の発現は低下しており、それが潰瘍性大腸炎発症の一因だと考えられている。なお、当研究室においてタウリンはデキストラン硫酸ナトリウムによって誘導される大腸炎に対して抗炎症作用を示すことが報告されており[41]、それがタウリンの TXNIP 発現誘導によるものである可能性が考えられる。このように、TXNIP の発現を亢進することにより様々な疾患を予防、治療することが期待される。

タウリンによる TXNIP 発現の亢進が、タウリン特異的な誘導かどうかを明らかにするために、他のアミノ酸 (ヒポタウリン、 β -アラニン、GABA) (Fig. 1-2-4 (A)) が TXNIP mRNA 発現に与える影響を検討した。今回用いた他のアミノ酸は、いずれも TAUT の共通基質であり[102]、TAUT を介して細胞内に取り込ま

れる。その中で、タウリンの生合成における中間体であるヒポタウリンは TXNIP mRNA を誘導したもののβ-アラニンや GABA では誘導がみられなかった (Fig. 1-2-4 (B))。構造的な側面からみると、タウリンはβ-アラニンのカルボキシル基部分が硫酸基になっており、ヒポタウリンではスルフィノ基になっている。ヒポタウリンでは TXNIP mRNA の発現亢進がみられるもののタウリンと比べてその上昇は弱いことから、硫酸基が TXNIP 誘導に重要であることが推察された。TXNIP を誘導する化合物としてグルコース、H₂O₂、transforming growth factor β (TGF-β)、アニソマイシン、デキサメタゾンなど[44]様々なものが報告されているが、それらはいずれも硫酸基を有していないことからこれらとは違う新規的な作用機構で TXNIP mRNA 発現を亢進していることが考えられる。

また、β-アラニン添加によってタウリンの細胞内への取り込みを阻害した時、タウリンによる TXNIP mRNA 発現量の増加はコントロールレベルまで抑制された (Fig. 1-2-5) ことから、TAUT がタウリンによる TXNIP mRNA の誘導に関与していることが示唆され、この制御には細胞内のタウリンが重要であることが推察された。タウリンは脳組織において GABA-A 受容体やグリシン受容体に作用し[111]、弱いアゴニストとして働く[112,113]ことが知られているが、これらの受容体は細胞膜に発現しており[114]、β-アラニンによっても活性化される[111]。そのため、これらの受容体は関与していないと思われる。さらに、これらの受容体の発現については神経組織においてのみ報告されており、本研究の DNA マイクロアレイの結果において発現が **absent** となっている(データ省略)ことから、Caco-2 細胞において発現していないことが推察される。これらのことから、細胞内にタウリンを特異的に認識する受容体が存在する可能性が考えられる。さらに、β-アラニンとタウリンを同時に添加した場合、24 時間後の細胞内のタウリン濃度はタウリン単独添加時に比べ約 55%まで減少し (Fig. 1-2-6) 、そのとき TXNIP mRNA 発現量は増加しなかった (Fig. 1-2-5) ことから、TXNIP mRNA 発現を誘導するためには、タウリン添加 24 時間後において 350 μM 以上の細胞内タウリン濃度が必要であることが示唆された。

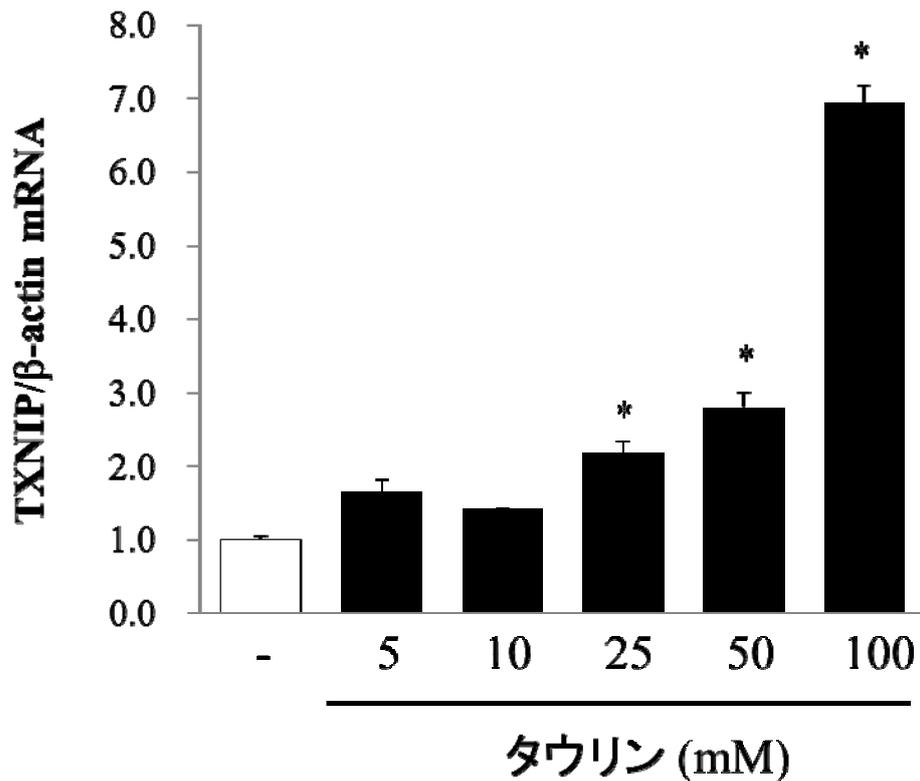


Fig. 1-2-1 タウリンがTXNIPのmRNA発現に与える影響

Caco-2細胞をタウリン5、10、25、50、100 mMを含む培地中で培養し、48時間後のRNAを回収した。cDNAを合成し、TXNIP mRNA発現量をReal-time RT-PCRにより測定した。結果はコントロール値を1とした相対値で表記した。

各値は平均±S.E. 各群n=3、p<0.05 (Dunnett's test)

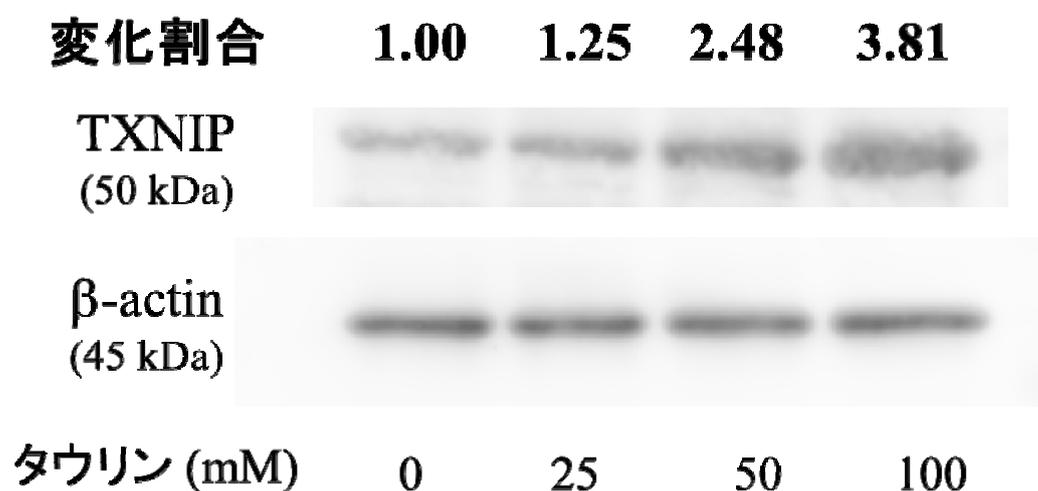


Fig. 1-2-2 タウリンがTXNIPのタンパク質発現に与える影響

Caco-2細胞をタウリン25、50、100 mMを含む培地中で培養し、48時間後の細胞を回収し、western blottingによりTXNIPタンパク質の発現量を定量した。TXNIPについては40 μ g分のタンパク質量、 β -actinについては5 μ g分のタンパク質量をSDS-PAGEに供した。

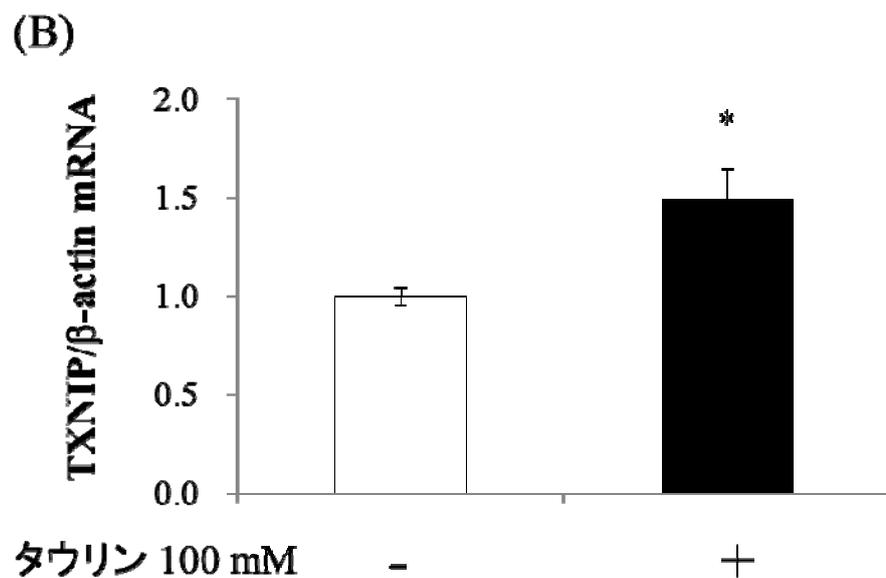
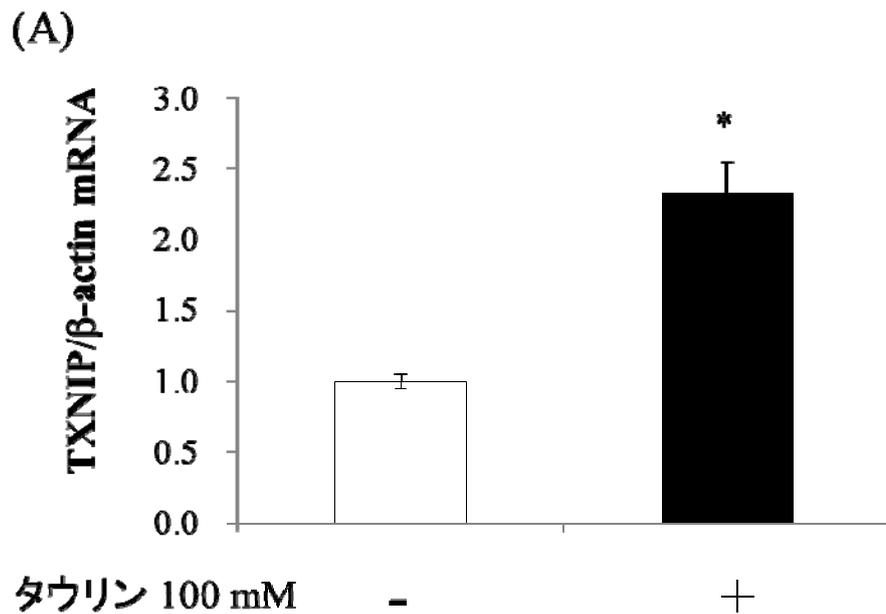


Fig. 1-2-3 タウリンが他の細胞株におけるTXNIPのmRNA発現に与える影響

LS180 (A)、HepG2 (B) 細胞をタウリン100 mMを含む培地中で培養し、48時間後のRNAを回収した。cDNAを合成し、Real-time RT-PCRによりTXNIP mRNA発現量を測定した。結果はコントロール値を1とした相対値で表記した。

各値は平均±S.E. 各群n=3、 $p < 0.05$ (Student's *t*-test)

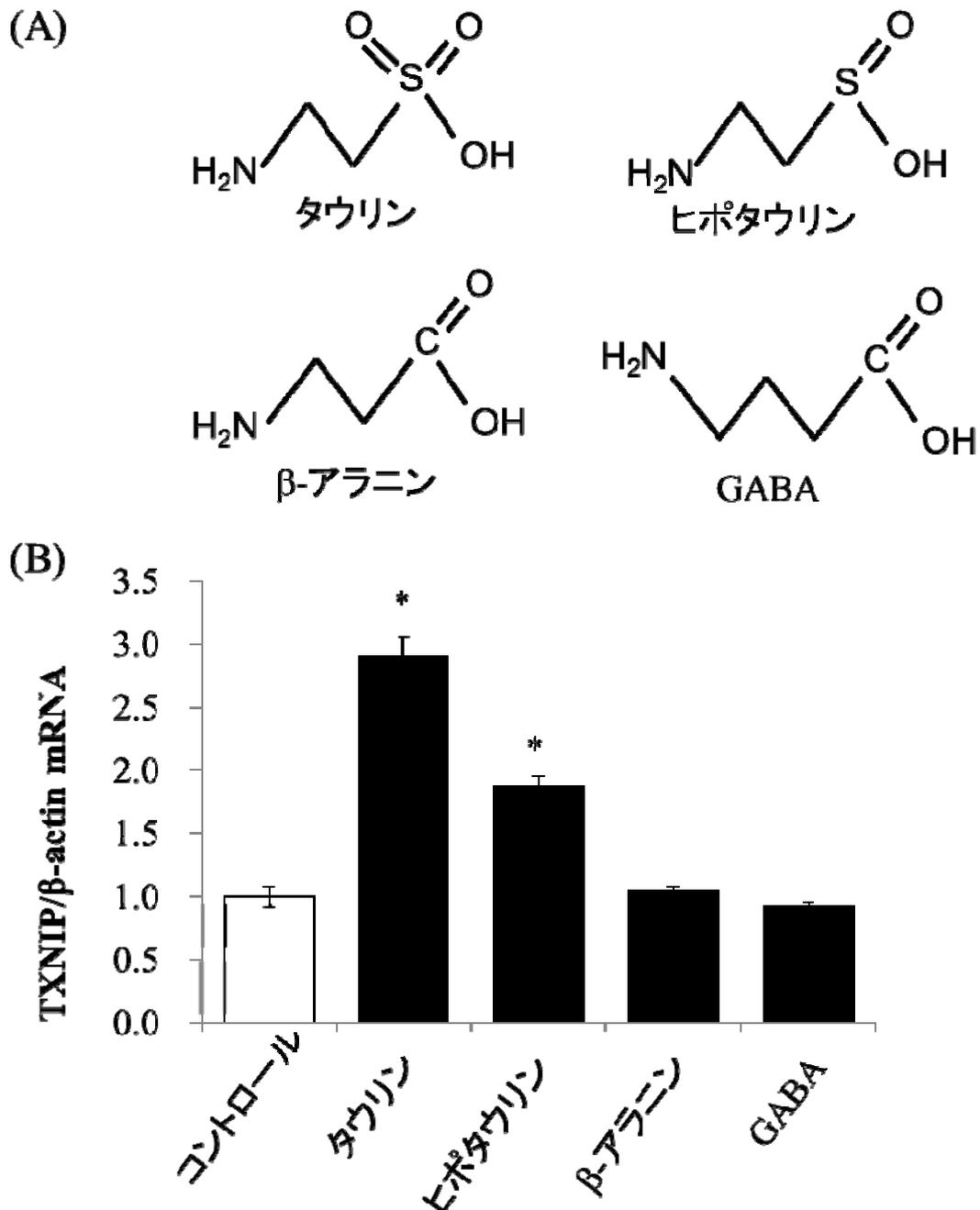


Fig. 1-2-4 他のアミノ酸がTXNIPのmRNA発現に与える影響

(A) タウリンと他のアミノ酸の構造

(B) Caco-2細胞を各種アミノ酸100 mMを含む培地中で培養し、48時間後のRNAを回収した。cDNAを合成し、Real-time RT-PCRによりTXNIP mRNA発現量を測定した。結果はコントロール値を1とした相対値で表記した。

各値は平均±S.E. 各群n=3、p<0.05 (Dunnett's test)

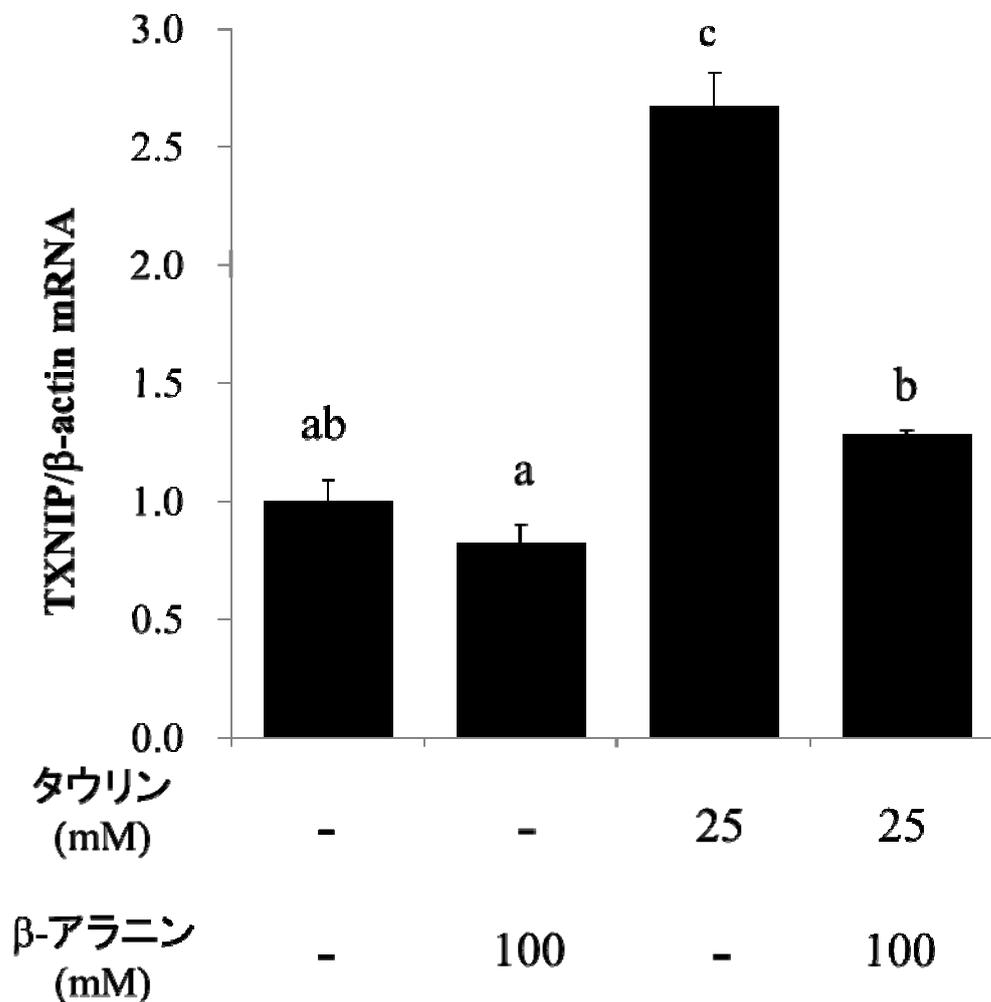


Fig. 1-2-5 β-アラニン存在下でのタウリンによる TXNIP mRNA発現変化

Caco-2細胞をタウリン25 mM、β-アラニン100 mM、または両方を含む培地中で培養し、48時間後のRNAを回収した。cDNAを合成し、Real-time RT-PCRによりTXNIP mRNA発現量を測定した。結果はコントロール値を1とした相対値で表記した。

各値は平均±S.E. 各群n=3、p<0.05 (Tukey's test)

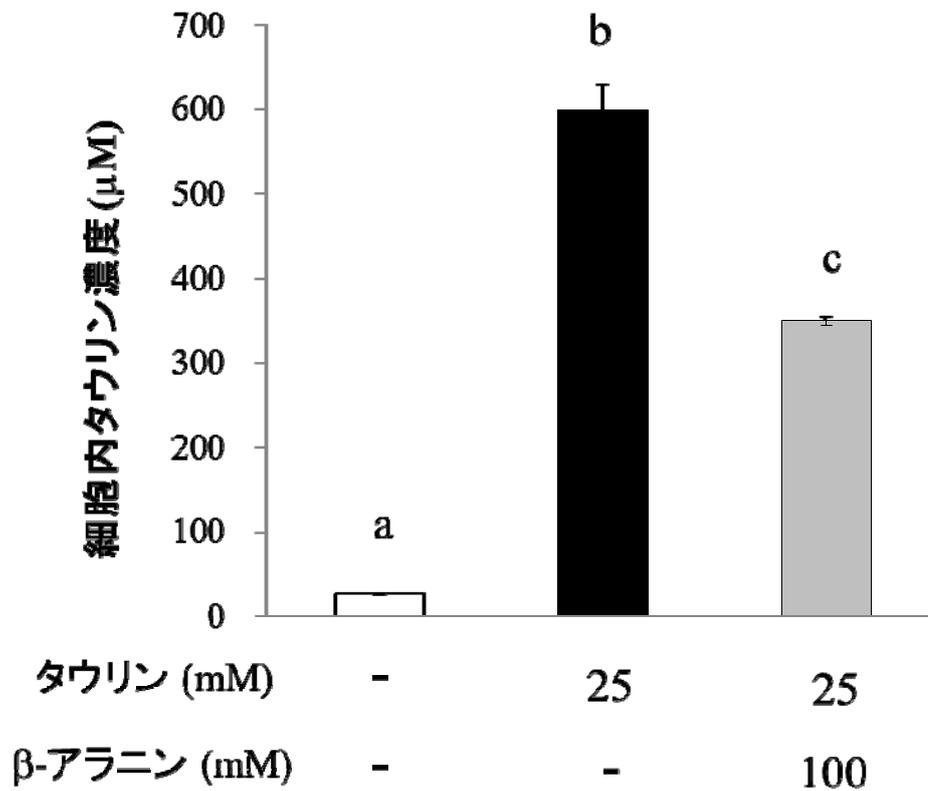


Fig. 1-2-6 β-アラニン存在・非存在下での細胞内タウリン濃度の変化

Caco-2細胞をタウリン25 mM、β-アラニン100 mM、または両方を含む培地中で培養し、24時間後の細胞を回収し、アミノ酸分析計により細胞内タウリン濃度を測定した。

各値は平均±S.E. 各群n=3、p<0.05 (Tukey's test)

第 2 章

タウリンによる TXNIP 発現亢進機構の解析

第 1 節

タウリンによる TXNIP mRNA 発現亢進機構の解析

1. 緒言

第 1 章における DNA マイクロアレイ解析により、タウリンが TXNIP mRNA の発現を顕著に誘導することが明らかとなった。TXNIP は第 1 章第 2 節で前述したとおり多機能性の分子であり、タウリンの多彩な生理作用に関与する可能性が考えられる。そのためこの分子に着目し、タウリンによる TXNIP 発現亢進機構を解析することとした。本節では TXNIP mRNA 発現を亢進する直接の作用機序に着目した。すなわちタウリンが TXNIP mRNA 発現を亢進する際に考えられる可能性として、タウリンが TXNIP の ①mRNA 安定性を向上させているのか、または ②転写活性化を誘導しているのか、という 2 点について検討することとした。

2. 実験材料

(1) 試薬

アクチノマイシン D はナカライテスクより購入した。OPTI-MEM® I は Gibco より購入した。

(2) 実験器具、機器

PCR による DNA 増幅装置 PCR SPRINT は Thermo Scientific より購入した。電気泳動槽 Mupid-2 plus はコスモバイオより購入した。UV トランスイルミネーター FAS-III は TOYOBO より購入した。シェーカー (MODEL BC-730) は BIO CRAFT より購入した。ルミノメーター Lumat LB 9507 は Berthold より

購入した。ルミノメーターチューブは SARSTEDT より購入した。

(3) 試薬類の調製

① 滅菌水 : Milli-Q 水をオートクレーブしたものを用いた。

② TAE buffer : 40 mM Tris-HCl, pH 7.5、40 mM 氷酢酸、1 mM EDTA

③ LB 培地 : LB Broth (Sigma) を 1 L あたり 20 g となるように溶解し、オートクレーブした。

④ 抗生物質 (アンピシリン) プレート

LB 培地に 1.5% (w/v) となるように寒天を加え、オートクレーブした。アンピシリン (終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加え、100 mm プレートに流し込んで固めた。

⑤ TFB1 : 30 mM CH_3COOK 、100 mM RbCl 、10 mM CaCl_2 、50 mM MnCl_2 、15% glycerol。0.2 mM CH_3COOH で pH 5.8 に調整し、ろ過滅菌装置に通した。

⑥ TFB2 : 10 mM MOPS、75 mM CaCl_2 、10 mM RbCl 、15% glycerol。KOH で pH 6.5 に調整後、オートクレーブした。

⑦ 30% (w/v) PEG 溶液 : ポリエチレングリコール 6000 を 30% (w/v) で含む溶液を作り、ろ過滅菌した。

⑧ 10 x KCM : 1 M KCl 、0.3 M CaCl_2 、0.5 M MgCl_2 を含む溶液を作り、ろ過滅菌した。

3. 実験方法

(1) Real-time RT PCR

○サンプル処理 (アクチノマイシン D 処理)

24 ウェルプレート上で 2 週間培養し、腸管上皮細胞様に分化させた Caco-2 細胞にタウリン 100 mM を含んだ培地を添加した。48 時間培養した後、アクチノマイシン D 10 µg/ml とタウリン 100 mM を含む培地に交換し、3、12、24 時間処理した後の細胞をそれぞれ回収した。回収後、TXNIP mRNA 発現量を Real-time RT PCR により測定した。

(2) Luciferase vector の作製

① PCR による DNA 増幅

まず、TXNIP プロモーター全領域[115]を PCR により増幅した。1 サンプルあたり 5 x PS buffer (TaKaRa) 10 µl、dNTP (2.5 mM) 4 µl、プライマー (10 µM) 1 µl、Prime STAR (TaKaRa) 0.5 µl、ゲノム DNA 12.5 ng を混合し、滅菌水で 50 µl に fill up した。これを 4 サンプル (200 µl) 分調製し、PCR に供した。PCR は、98°C で 2 分間変性させた後、「98°C で 10 秒間変性させ、55°C で 5 秒間アニーリング、72°C で 90 秒間伸長させる」というサイクルを 30 回繰り返した。また、TXNIP プロモーター部分領域の PCR による増幅については、鋳型 DNA としてゲノム DNA の代わりに、上記で作製した TXNIP プロモーター全領域を含む luciferase vector 100 ng を用いた。

なお、プライマー配列および PCR における 72°C の伸長時間を以下 Table 2-2-1 に示す。プライマーについては、forward の 5' 末端に CC + Kpn I 認識配列、reverse の 5' 末端に GC + Hind III 認識配列を付加した。

Table 2-1-1 TXNIP プロモーター（全領域、部分領域）プライマー

領域		プライマー配列 (5'→3')	伸長時間
-1299/+256 (全領域)	forward	CCGGTACCCCAACAAAGAATGAAGAGAGAG	90 秒
	reverse	GCAAGCTTCTCCAAATCGAGGAAACCC	
-109/+256	forward	CCGGTACCAGCCAATGGGAGGGATG	25 秒
	reverse	-1299/+256 と同じものを用いた。	
-39/+256	forward	CCGGTACCCGGGCTACTATATAGAGACG	20 秒
	reverse	-1299/+256 と同じものを用いた。	
-39/+142	forward	-39/+256 と同じものを用いた。	15 秒
	reverse	GCAAGCTTCTAGGTTTTTCGAAAAGGCGCC	
-39/+65	forward	-39/+256 と同じものを用いた。	10 秒
	reverse	GCAAGCTTCCCAATTGCTGGAGAAAAG	
-1299/+142	forward	-1299/+256 と同じものを用いた。	90 秒
	reverse	-39/+142 と同じものを用いた。	
+122/+256	forward	CCGGTACCGGCGCCTTTTTTCGAAAACCTAG	25 秒
	reverse	-1299/+256 と同じものを用いた。	

② DNA の電気泳動

泳動バッファーは TAE バッファーを用いた。泳動アガロースゲルはアガロース ME（岩井化学薬品）を TAE バッファーに溶かして作製した。アガロースゲルの濃度は DNA の塩基数に応じて 1%、2%、3% で使い分けた。マーカーは 100 bp DNA ladder、1 kb DNA ladder (Bio Labs) を用いた。泳動後のアガロースゲルはエチジウムブロマイドを溶解させた TAE に 15 分程度浸し、UV トランスイルミネーター FAS-III を用いて DNA のバンドを検出した。

③ Gene clean

PCR 産物（溶液）を 1.5 ml チューブに回収した。300 bp 以上の産物については、GENECLEAN II kit（フナコシ）を用いた。3 倍量の NaI を入れた後、

Milli-Q 水に溶かした GLASS MILK 5 μ l を加え、室温で 2 分放置しさらに氷上に 3 分置いた。10,000 rpm で 10 秒遠心し、上清を取り除いた。そこに 500 μ l の New Wash を加え沈殿を溶かした後、同様に遠心し上清を取り除いた。この過程を 3 回繰り返した。その後、沈殿を室温で 20 分放置して乾燥させた。乾燥した沈殿は Milli-Q 水 8 μ l に懸濁し、55°C で 3 分インキュベートした。10,000 rpm で 3 分遠心し、上清を回収した。オプションとして、回収後の沈殿に Milli-Q 水 8 μ l を加え同様の作業をもう一度繰り返すことで回収率を上げた。

また、300 bp 以下の産物については、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて、付属のプロトコールに従い精製をおこなった。

④ 制限酵素による double digestion

制限酵素は Kpn I と Hind III (いずれも TaKaRa) を用いた。10 x buffer M (TaKaRa) 20 μ l、Kpn I 4 μ l、Hind III 4 μ l、gene clean 産物全量を混合し、滅菌水で 200 μ l に fill up した。これを 37°C で 4 時間反応させた。また、インサート DNA を組み込む pGL4 vector についても同様に double digestion をおこなった。なお、pGL4 vector に関して、Table 2-2-1 に示すインサートのうち -1299/+142 までは pGL4.15 [luc2P/Hygro] Vector (Promega) を、また +122/+256 および以下の Table 2-2-2 に示すインサートは pGL4.27 [luc2P/minP/Hygro] Vector (Promega) をそれぞれ用いた。Double digestion 後に再び GENE CLEAN II kit による gene clean をおこない、DNA を精製した。なお、300 bp 以下の DNA については NaI と混合した際に、1/10 量の TBE Modifier を加えた。

以降の操作は⑦以下に記す。

⑤ オリゴ DNA 配列のアニーリング

60 bp 以下の DNA 配列についてはその全配列プライマー(オリゴ DNA 配列)を注文し、相補的配列とアニーリングさせた。なお、プライマーについては 5' 側に制限酵素切断後の Kpn I 配列、3' 側に切断後の Hind III を付加することで、アニーリング後の double digestion を不要にした。プライマー配列を Table

2-2-2 に示す。アニーリングについては、プライマー溶液（100 μ M ; TE buffer [10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA pH 8.0] に溶解）5 μ l ずつ、5 M NaCl 1 μ l、Milli-Q 水 39 μ l を混合し、100°C で 5 分処理した後、65°C で 10 分インキュベートした。さらに、ヒートブロックを 37°C に変更することで徐々に温度を下げていき、37°C になったら混合液を取り出し室温で 2 時間放置した。

Table 2-1-2 アニーリング用の TXNIP プロモーター部分配列（オリゴ DNA）

領域		プライマー配列（5'→3'）
+122/+178	forward	cgggcgcttttcgaaaacctagtagttaatattcatttgtttaaactcttattttata
	reverse	agcttataaaaataagatttaaacaatgaatattaactactaggtttcgaaaaggcgccggtac
+162/+218	forward	cttaaactctattttatttttaagctcaaactgettaagaataccttaattccttaaaga
	reverse	agcttctttaaggaattaaggtattcttaagcagtttgagcttaaaaataaaaataagatttaaggtac
+211/+256	forward	cccttaaagtgaataatTTTTGCAAAGGGGTTTCTCGATTGGAGA
	reverse	agcttctccaaatcgaggaaaccctttgcaaaaaattatttcactttaaggggtac

⑥ エタノール沈殿

⑤でアニーリングした二本鎖 DNA 溶液をエタノール沈殿によって精製した。溶液 50 μ l に 3 M 酢酸アンモニウム 10 μ l、100%エタノール 125 μ l を加え、室温で 15 分放置した。15,000 rpm で 20 分遠心し上清を取り除いた後、70%エタノール 250 μ l を加えて 15,000 rpm で 5 分遠心した。上清を取り除いた後、真空遠心をおこなうことで完全に乾燥させた。乾燥後 20 μ l の滅菌水に溶かした。

⑦ ライゲーション

④と⑥で回収したインサート DNA とベクターDNA の一部を電気泳動し、得られた DNA バンドで DNA 濃度を判断し、インサート比とベクター比が 10 : 1 になるように混合し、さらにその混合液と等量の Ligation High (TOYOBO) を加えた。その後 14°C で 30 分間反応させ、ligation solution とした。

⑧ コンピテントセルの作成

大腸菌 K-12 由来株である DH5 α を OD₅₅₀ が 0.7 程度になるまで 37°C で振盪培養した。氷上に 15 分程度放置した後、遠心して上清を除き、菌体に培養液の 1/10 量の TFB1 を加え丁寧に懸濁した。氷上に 5 分放置した後、遠心し上清を除き、菌体に 1/25 量の TFB2 を加え丁寧に懸濁した。氷上に 15 分程度静置しコンピテントセルを得た。これは -80°C にてイソプロピルアルコールを入れたラックにて保存した。

⑨ 形質転換

DNA 溶液を滅菌水で 41 μ l に調製し、30% PEG 溶液 4 μ l、10 x KCM 5 μ l、コンピテントセル 50 μ l を加え、氷上で 20 分間、室温で 10 分間静置した。適量の LB 培地で 1 時間培養し、抗生物質を含む寒天培地に播いた。

⑩ コロニーPCR

⑨により LB 寒天培地に生えたコロニーをコロニーPCR に供した。1 コロニーにつき、5 x Green Go Taq Reaction Buffer (Promega) 4 μ l、dNTP (2.5 mM) 1.6 μ l、プライマー (10 μ M) 0.5 μ l、Go Taq DNA Polymerase (Promega) 0.1 μ l、Milli-Q 13.3 μ l を混合し、混合液中に爪楊枝で掻き取ったコロニーを加え、PCR に供した。PCR は、95°C で 2 分間変性させた後、「95°C で 30 秒間変性させ、58°C で 30 秒間アニーリング、72°C で伸長（伸長時間は DNA 1kb につき 60 秒）させる」というサイクルを 30 回繰り返した。電気泳動後目的 DNA のバンドが検出されたサンプルについて、そのコロニーを抗生物質含有 LB 培地 3 ml に播いて 37°C で一晩培養し、ミニプレップに供した。

⑪ プラスミド DNA の調製～ミニプレップ

ChargeSwitch[®]-Pro Plasmid MiniPrep Kit (Invitrogen) を用いた。コロニーを 3 ml の抗生物質を含む LB 培地に植菌し、37°C で一晩振盪培養した後、15,000 rpm、4°C で 30 秒遠心して 1.5 ml チューブに菌体を回収した。回収した菌体に Resuspension Buffer を 250 μ l 加え懸濁し、Lysis Buffer を 250 μ l 加えエッペ

ンを緩やかに上下反転し菌体を溶解した。室温に 2~5 分静置後、Presipitation Buffer を 250 μ l 加えエッペンを緩やかに上下反転して混ぜた。15,000 rpm で 10 分遠心後、上清を ChargeSwitch[®]-Pro MiniPrep Colum に移し、15,000 rpm で 1 分遠心した。透過した液を捨て、Wash Buffer1 を 750 μ l 加えて 15,000 rpm で 1 分遠心した。透過した液を捨てた後、Wash Buffer2 を 250 μ l 加え 15,000 rpm で 1 分遠心した後、カラムを新しい 1.5 ml チューブに移した。Elusion Buffer を 30~50 μ l 添加した後 15,000 で 1 分遠心し、プラスミド DNA 溶液を得た。

⑫ プラスミドの Sequence 解析

・サンプルの調製

PCR 反応には Big Dye Terminater Cycle Sequencing v3.1 Ready Reaction kit (Applied Biosystems) を用いて解析した。得られたプラスミド 250 ng、5 x buffer 1 μ l、1 μ M プライマー 2.5 μ l、MilliQ 水 2 μ l、BigDye2 μ l を混合した。PCR 反応は熱変性 97 $^{\circ}$ C、1 分おこなった後、97 $^{\circ}$ C、30 秒、アニーリングは 50 $^{\circ}$ C、30 秒、伸長反応は 60 $^{\circ}$ C、4 分で 25 サイクルおこなった。反応終了後、PCR チューブに 25 μ l のエタノール、1 μ l の 3 M 酢酸ナトリウムを加え 1.5 ml チューブに移して氷上で 10 分静置した。その後室温で 15 分静置し、15,300 rpm、室温にて 20 分遠心を行い、アスピレーターで上清を除き 250 μ l の 70 %エタノールを加え、15,300 rpm、室温にて 10 分遠心した。アスピレーターで上清を除き、遠心吸引機でペレットを乾かし、12.5 μ l の High Dye を加えて溶解し、95 $^{\circ}$ C で 5 分インキュベートした後、氷上で急冷した。その後シーケンス操作に用いるか、遮光して-20 $^{\circ}$ Cにおいて保存した。

・シーケンス操作

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いておこなった。添付のシーケンシング操作ガイドに準じて行い、DNA 配列をデータベースのものと比較し、一致することが確認できたものを実験に用いた。

⑬ プラスミド DNA の調製～ラージプレップ

NUCLEOBOND AX500 カラム (MACHERY-NAGEL) を用いた。抗生物質を含む LB 培地 150 ml で一晩培養した大腸菌を、50 ml チューブに移し 3,500 rpm、4°C で 10 分遠心し、菌体を沈殿させた。菌体は S1 溶液 12 ml に懸濁し、S2 溶液 12 ml を加えチューブを緩やかに上下反転し菌体を溶解した。室温に 5 分程度放置した後、S3 溶液 12 ml を加えチューブを緩やかに上下反転して混ぜ、氷上に 5 分放置した。15,000 rpm、4°C で 10 分遠心し、上清を濾過した。NUCLEOBOND AX500 カラムを N2 溶液 6 ml で平衡化した後、濾過液をカラムに通した。N3 溶液 16 ml を 2 回カラムに加え洗浄した。新しいチューブに移して N5 溶液 15 ml を加えてプラスミドを溶出した。イソプロピルアルコール 11 ml を加えて 15,000 rpm、4°C で 30 分遠心し、核酸を沈殿させた。上清を除き、70%エタノール 5 ml を加え、15,000 rpm、4°C で 10 分遠心した。上清を除いて風乾し、適量の MilliQ 滅菌水に溶かした。

(3) Luciferase assay

① 遺伝子導入

Caco-2 細胞をコラーゲンコートした 24 ウェルプレートに 0.66×10^5 cells/ml で 500 μ l ずつ播いて一晩培養した。80%程度コンフルエントとなったところでリポフェクション法によりベクターをトランスフェクトした。

リポフェクション法には LipofectAMINE Reagent (Invitrogen) を用いた。80%程度コンフルエントになった細胞 (24 ウェルプレート) の培地を OPTI-MEM® I 500 μ l へ置換し 37°C で 1 時間培養した。また 1 時間培養後、OPTI-MEM® I 200 μ l へ置換した。

その間に、1 ウェルあたり TXNIP プロモーター領域を含む pGL4 luciferase vector 1 μ g、pRL-CMV vector 0.05 μ g、Plus Reagent (Invitrogen) を 1 μ l 含んだ 25 μ l の OPTI-MEM® I を調製し、ボルテックス後 15 分間静置した。その後、1 ウェルあたり 25 μ l の OPTI-MEM® I に 1 μ l の LipofectAMINE Reagent (Invitrogen) を含んだ溶液と混合しボルテックス後、再び 15 分間静置した。その後 1 時間培養した OPTI-MEM® I 200 μ l を含む 24 ウェルプレート

に 50 μ l ずつ添加することで遺伝子導入をおこなった。遺伝子導入の 4 時間後に通常の Caco-2 培養培地に交換した。

② サンプル添加

遺伝子導入した翌日にタウリンを含む培地に交換し、24 時間後の細胞を回収し、Luciferase assay に供した。

③ Luciferase assay

サンプル処理した細胞の培地を取り除き PBS (-) で 2 回洗浄した。そこに、50 μ l の Passive Lysis Buffer (Promega) を加え、15 分間室温にてシェーカーで振盪した。その後細胞を剥ぎ取り、エッペンに回収した。回収後 15,000 rpm で 5 分遠心し、上清を Luciferase 活性測定に使用した。

Luciferase 活性の測定には、同一サンプルを用いて pGL4-promoter vector と pRL-CMV に由来する発光を測定できる Dual-Luciferase Reporter assay system (Promega) を用いて、ルミノメーターで測定した。測定時間は 10 秒に設定した。

50 μ l の Luciferase Assay Reagent II (LAR) に、上清サンプル 10 μ l を混合し、レポータージーンであるホタルルシフェラーゼ活性を測定した。その後、50 μ l の Stop&Glo™ Reagent をさらに添加し、インターナルコントロールベクターである pRL-CMV により発現するウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。この値を遺伝子導入効率の補正值として用い、コントロールを 1 としたときの値を RLU (Relative Luciferase Unit) として示した。

(4) 統計処理

結果は平均値 \pm 標準誤差で表した。有意差検定には Tukey's test、Student's *t*-test を用い、有意水準 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

その他上記以外は前章に準じた。

4. 結果

4-1 タウリンが TXNIP mRNA の安定性に及ぼす影響

タウリンによる TXNIP mRNA 発現亢進機構の解析として、まずタウリンが TXNIP mRNA の安定性に影響を与えているのかについて mRNA 合成阻害剤であるアクチノマイシン D を用いて検討した。タウリンのみを含む培地で 48 時間インキュベートした後、アクチノマイシン D を加えて 3、12、24 時間後の TXNIP mRNA 発現変化を検討したところ、3、12 時間後ではコントロール群、タウリン群いずれにおいても mRNA の有意な減少はみられなかったが、24 時間後においていずれも約 60%にまで減少した (Fig. 2-1-1)。アクチノマイシン D を処理し mRNA 合成を阻害した後の TXNIP mRNA 発現量がコントロール、タウリン添加群において同じ割合で減少したことから、タウリンが TXNIP の mRNA 安定性に影響しないことが示唆された。

4-2 タウリンが TXNIP の転写活性に及ぼす影響

次に、タウリンが TXNIP の転写活性に影響を及ぼしているかについて検討するために、TXNIP プロモーター領域を含むルシフェラーゼベクターを作製し、ルシフェラーゼアッセイにより検討した。その結果、タウリンの濃度依存的に TXNIP の転写活性上昇がみられた (Fig. 2-1-2)。このことから、タウリンは TXNIP mRNA 発現を転写レベルで亢進していることが明らかとなった。

4-3 タウリンが TXNIP プロモーター部分配列の転写活性に及ぼす影響①

タウリンにより TXNIP 転写活性が亢進したことから、TXNIP プロモーター領域中にタウリンによって活性化される遺伝子配列 (タウリン応答配列) が存在することが示唆された。そこで、そのタウリン応答配列を同定するために詳細な TXNIP のプロモーター解析をおこなった。具体的には、TXNIP プロモーター領域を一部欠損させたルシフェラーゼベクターを作製し転写活性を調べること (deletion 解析) で応答配列を絞り込むこととした。まず 5'側を欠損させたベクターを作製し、転写活性を調べたところ、-109 / +256 およびさらに欠損させた -39 / +256 領域においてもタウリンによる転写活性の亢進はみられた (Fig.

2-1-3 (A))。そこでさらに領域を欠損させることとし、基本転写因子を残すために3'末端を欠損させることとした。その結果、-39/+256 でみられた転写活性の増加が、-39/+142 や-39/+65 の領域においてはみられなくなった (Fig. 2-1-3 (B))。これよりタウリンによる TXNIP の転写活性亢進には、少なくとも TXNIP プロモーター領域中の+143/+256 が重要であることが示唆された。

4-4 タウリンが TXNIP プロモーター部分配列の転写活性に及ぼす影響②

Deletion 解析により TXNIP プロモーター領域中の+143/+256 がタウリンによる転写活性化に必要であることが考えられたため、次に+143/+256 のみのプロモーター領域でタウリンによる転写活性の誘導がみられるか検討した。なお、+142/+143 部分に何らかの応答配列が存在する可能性を考慮し、5'側の配列を20塩基ほど5'側に伸ばした+122/+256 を含むルシフェラーゼベクターを作製しておこなった。また、対照群として-1299/+142 の領域についても検討した。Fig. 2-1-4 に示すように、-1299/+142 ではタウリンによる転写活性は亢進しないのに対し、+122/+256 において有意な転写活性の上昇がみられた。このことから、タウリンは TXNIP プロモーター中の+122/+256 領域内の遺伝子配列を認識して TXNIP 転写活性を亢進していることが明らかとなった。

4-5 TXNIP プロモーター+122/+256 領域中におけるタウリン応答配列候補の解析

TXNIP プロモーター解析に関する報告は複数存在するものの、+122/+256 領域においてはこれまで検討されておらず、この領域内にどのような転写因子応答配列が存在するかについては不明である。そこで、*in silico* 分野において転写制御領域の配列解析を専門とされている東京大学医科学研究所 機能解析イン・シリコ分野 中井研究室 (中井謙太教授) との共同研究により TXNIP プロモーター+122/+256 領域に存在する転写因子候補配列の解析をおこなった。

転写因子結合配列予測データベースである TRANSFAC を用いた検索により TXNIP プロモーター中の転写因子応答配列を調べた結果を Fig. 2-1-5 (A) に示す。横軸は TXNIP の転写開始点 (0 ; 青矢印) からの距離を示し、水色のプロ

ックはその配列を認識する転写因子の数の程度を示す。この図から、+122 / +256 領域内に 6 つの転写因子応答配列（重複含む）が存在することが分かった。また、進化的に高く保存された遺伝子配列が mRNA 発現誘導に重要ではないかという仮説から、哺乳類 46 種のプロモーター配列の比較をおこなった。配列の保存度を評価するパラメータである phastCons[116]による計算結果を Fig. 2-1-5 (B) に示す。ピークが高いほど進化的保存度が高いことを表す。-100 前後に保存度が非常に高い一連の配列が存在している一方で、+122 / +256 内では比較的短い配列ではあるが保存度の高い配列が 2 つ存在することが分かった。なお、水色のブロックは (A) と同様にその位置に転写因子応答配列が存在することを示しているが、進化的保存度の高い配列とは一致しない配列であった。+122 / +256 中の具体的な遺伝子配列および(A)、(B)の情報をまとめたものを Fig. 2-1-5 (C) に示す。それぞれの転写因子応答配列の中でコア配列となるものを大文字で示した。また、進化的保存度の高い配列は 1 つ目が 7 塩基、2 つ目が 9 塩基長であった。

4-6 タウリンが TXNIP プロモーター部分配列の転写活性に及ぼす影響③

4-5 で得られた情報をもとにさらに deletion 解析を進めた。TXNIP プロモーター+122 / +256 の領域を+122 / +178、+162 / +218、+211 / +256 の 3 つに分け、それぞれを含むルシフェラーゼベクターを作製し、タウリンを添加した後の Caco-2 細胞の転写活性を調べた。これらの 3 つの領域のうち、タウリン添加によって+162 / +218 領域においてのみ転写活性が有意に上昇し、+122 / +178、+211 / +256 の 2 つの領域では転写活性に変化がみられなかった (Fig. 2-1-7)。これより、タウリン応答配列は TXNIP プロモーター領域中の+162 / +218 に存在することが明らかとなった。Fig. 2-1-6 (C) よりこの領域内には転写因子 FOXJ2 の応答配列、進化的保存度の高い配列が 2 つ、転写因子 Tst-1 の応答配列が存在している。しかしながら、FOXJ2 については転写活性亢進がみられなかった+122 / +178 と重複しているため、残りの 3 つの配列がタウリン応答配列の候補として考えられた。

5. 考察

TXNIP の mRNA 発現を亢進する機構として、(1) mRNA の安定性の向上、(2) TXNIP 遺伝子における転写活性の亢進の 2 つの可能性が考えられる。

(1) について、真核生物において、転写された一次産物である RNA は、5'末端に cap 構造、3'末端に polyA 配列が付加された mRNA として細胞質に移動する。その後、polyA 部分には細胞質に存在する polyA 結合タンパク質が付加し、cap 構造には eIF2 や eIF4 などの高分子複合体が結合する。一例として 3'側の非翻訳領域に存在する adenosine- and uridine- rich elements (ARE 配列；(AUUUA)) を有する遺伝子は ARE 配列に特異的な結合タンパク質によって制御を受けると考えられている[117,118]。これらの結合タンパク質が mRNA を環状化させ、翻訳が効率よくおこなわれると共に mRNA の安定性も向上すると言われているが[119]、本研究においてタウリンは TXNIP の mRNA 安定性には影響を与えていないことから (Fig. 2-1-1)、TXNIP mRNA の転写活性の亢進に寄与していることが考えられた。

そのため、タウリンが TXNIP の転写活性に及ぼす影響を検討したところ、Fig. 2-1-2 に示すように TXNIP プロモーター領域を含む Luciferase vector を遺伝子導入した Caco-2 細胞においてタウリンによる転写活性が上昇しており、タウリンは転写レベルで TXNIP の発現を誘導していることが明らかとなった。

タウリンにより TXNIP の転写活性が誘導されたことから、TXNIP プロモーター領域中にタウリンによる活性化に関与する塩基配列 (タウリン応答配列) が存在することが考えられた。そこでタウリン応答配列を同定するために、プロモーター解析 (deletion 解析) を進めた。TXNIP プロモーター全領域-1299 / +256 においてみられたタウリンによる転写活性の上昇は、-109 / +256 の領域においてもみられた (Fig.2-1-3 (A))。このことから、TXNIP プロモーター領域の-109 よりも 5'側にはタウリン応答配列は存在しないことが考えられた。Bosc 細胞を高密度で播くことで TXNIP の転写活性は上昇し、その応答配列は-650 / -643 の heat shock element (HSE) であること[115]、また、正常ヒト大動脈内皮細胞においてグルコースは転写因子 forkhead box O1 (FOXO1) の-142 / -137 における応答配列への結合により転写活性を誘導する[120,121]が、タウリンは

これらの応答配列に関与しないことが示された。グルコースについては FOXO1 応答配列に加えて -90 / -73 に存在する carbohydrate response element (ChoRE) を介して TXNIP の転写活性を亢進している [122]。ChoRE を介した TXNIP 転写活性の上昇は、グルコースの他にも NAD⁺などの adenosine-containing molecules [123,124] によって引き起こされている。さらに、ChoRE に結合する転写因子 ChoRE binding protein (ChREBP)-Mlx 複合体は解糖系の中間代謝物によって活性化され [125]、そのターゲット遺伝子は新規脂質合成に関与するものであることから [126]、TXNIP プロモーター領域の ChoRE は代謝系の恒常性の維持に重要な応答配列と考えられている。そこで、TXNIP の ChoRE に変異を導入した TXNIP プロモーターベクターを作製しタウリンの影響を調べた。しかしながら、TXNIP ChoRE mutant ベクターにおいても、wildtype と同様の転写活性の上昇がみられた (データ省略)。このことからタウリンは ChoRE を応答配列としないことが示された。-39 / +256 のプロモーター領域においてタウリンによる転写活性が亢進する (Fig. 2-1-3 (A)) という deletion 解析の結果もこれを支持しており、-39 よりも 5'側においてタウリンは影響を与えないことが示された。

さらに deletion 解析を進めた結果、TXNIP プロモーター領域中の +143 / +256 がタウリンによる転写活性亢進に重要であることが示唆された (Fig. 2-1-3 (B))。そこで、+122 / +256 を含むルシフェラーゼベクターを作製し検討したところ、タウリンによる有意な転写活性上昇がみられた (Fig. 2-1-4)。このことから、タウリン応答配列が +122 / +256 領域内に存在することが明らかとなった。

TXNIP のプロモーター解析について、-39 よりも 3'側の領域に関する報告はなされておらず、この領域にどのような転写因子応答配列が存在するか不明である。そのため、東京大学医科学研究所 中井研究室において転写因子結合配列予測データベースによる配列、また哺乳類 46 種における進化的保存度の高い配列の検索をおこない、それらを転写因子応答配列の候補とした。その結果、TXNIP +122 / +256 内に転写因子応答配列 6 種類 (重複含む)、進化的保存度の高い配列 2 種類を見出すことができた (Fig. 2-1-5)。そこで、候補配列に留意して +122 / +256 領域をさらに 3 つに分けたルシフェラーゼベクター (+122 /

+178、+162/+218、+211/+256) を作製しそれぞれ検討した結果、+162/+218 のベクターのみでタウリンによる転写活性の亢進がみられた (Fig. 2-1-6)。このことから+162/+218 領域内にタウリン応答配列が存在することが明らかとなった (Fig. 2-1-7)。この領域内には進化的保存度の高い配列が 2 つ、さらに転写因子 Tst-1 の応答配列が存在している。Tst-1 は Pit-Oct-Unc (POU) ドメインを持つ遺伝子ファミリーに属し、脳に発現しているとされており [127]、細胞表面接着分子である P0 遺伝子発現に対して抑制的にはたらいたり [127]、nicotinic acetylcholine receptor (nAchR) のサブユニットである $\alpha 3$ の遺伝子発現を特異的に誘導する [128]。しかしながら、Tst-1 については脳における報告に留まっており、他の組織については検討されておらず、本研究の DNA マイクロアレイの結果では発現が **absent** となっている (データ省略) ことから、Caco-2 細胞において発現していない可能性が高い。しかしながら、DNA マイクロアレイの発現データは参考程度であるため、今後 Tst-1 応答配列のみを含むルシフェラーゼベクターを作製し、検討したい。

なお、deletion 解析において、それぞれの TXNIP プロモーター部分配列によってコントロールにおけるルシフェラーゼ活性値が異なっており、基本的に部分配列長が長いほどその値は高い (Fig. 2-1-3、Fig. 2-1-4、Fig. 2-1-6)。これは、それぞれのプロモーター部分領域において定常的に様々な転写因子がその応答配列に結合して転写活性が制御されている可能性が考えられる。Deletion 解析によりプロモーター領域を欠損させると転写因子応答配列も減少するため、それぞれのコントロールにおける転写活性も変化し、ルシフェラーゼ活性値が異なると推察される。

このように deletion 解析と *in silico* の観点からプロモーター解析を進めた結果、タウリン応答配列のある程度の範囲を決定することができた。タウリン応答配列の同定のために今後さらに deletion 解析または mutation 解析を進める必要がある。

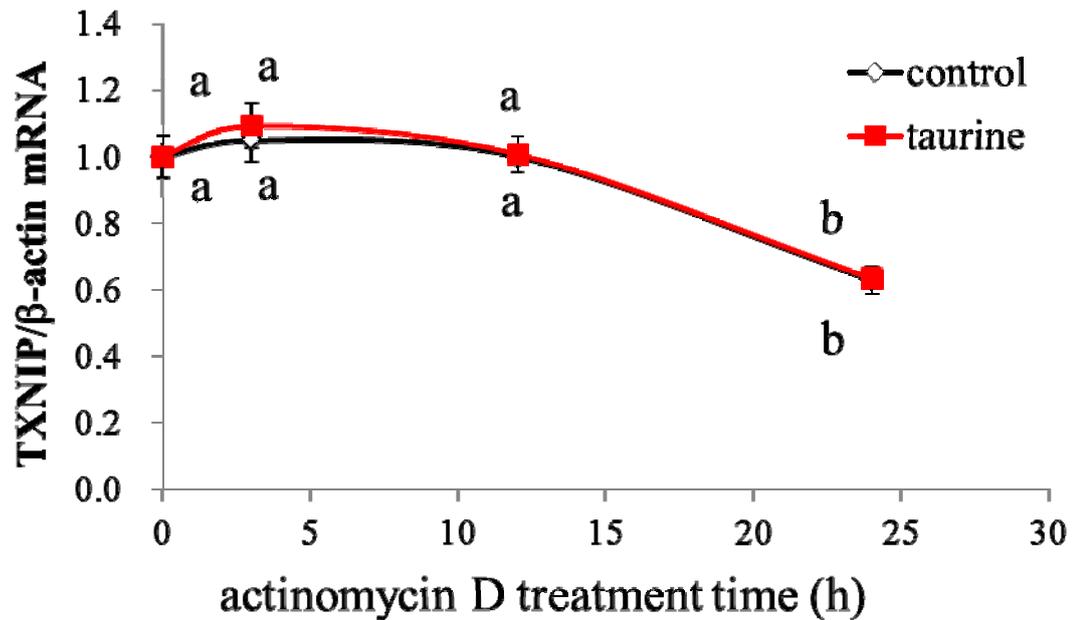


Fig. 2-1-1 タウリンがTXNIP mRNAの安定性に及ぼす影響

タウリン100 mMを含む培地で48時間培養後、タウリンとactinomycin D 10 μg/mlを含む培地に交換し、3、12、24時間後の細胞を回収し、Real time RT-PCRに供した。

各値は平均±S.E. 各群n=3、p<0.05 (Tukey's test)

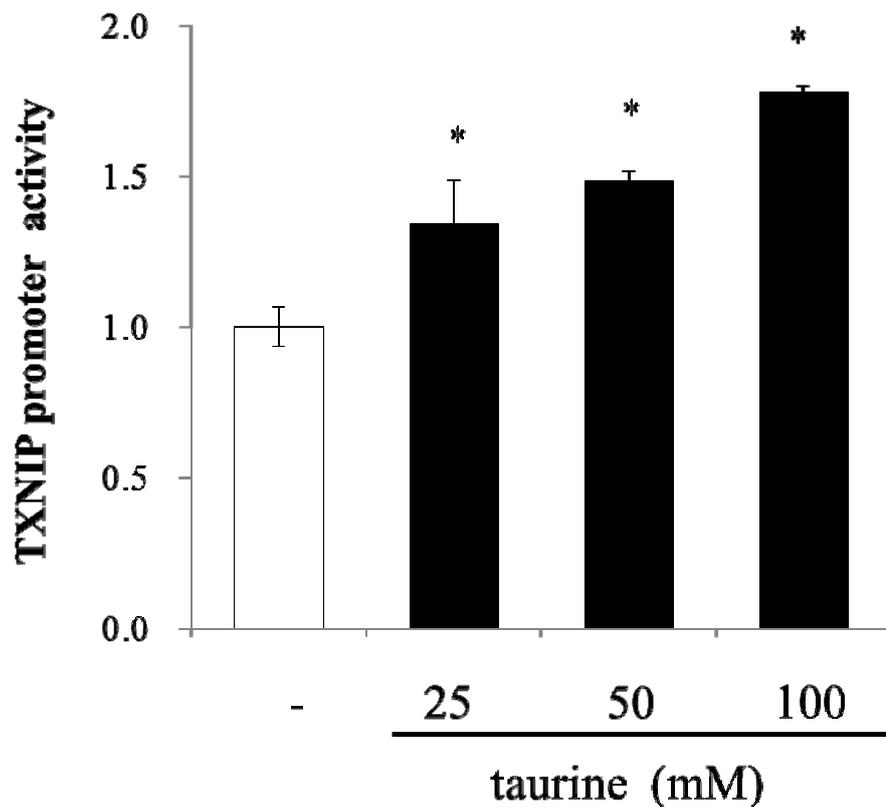


Fig. 2-1-2 タウリンがTXNIPの転写活性に及ぼす影響

TXNIPのプロモーター領域を含むルシフェラーゼベクターをトランスフェクション後、タウリン25 mM、50 mM、100 mMを含む培地に交換し、24時間後の細胞を回収してルシフェラーゼアッセイに供した。結果はコントロール値を1とした相対値で表記した。

各値は平均±S.E. 各群n=3、p<0.05 (Dunnett's test)

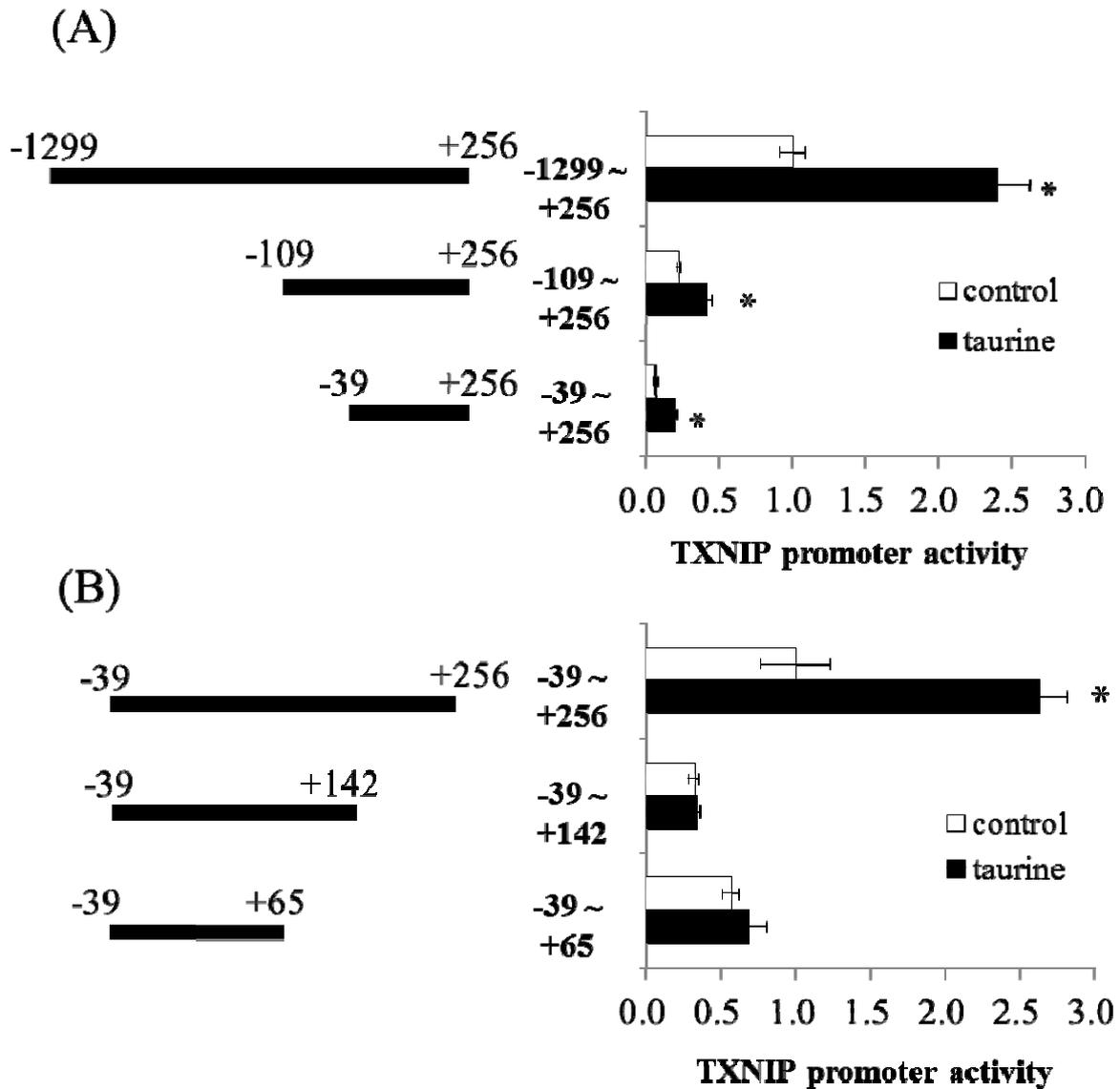


Fig. 2-1-3 タウリンが各種TXNIPプロモーター部分配列の転写活性に及ぼす影響①

TXNIPのプロモーター部分領域を含むルシフェラーゼベクターをトランスフェクション後、タウリン含む培地に交換し、24時間後の細胞を回収してルシフェラーゼアッセイに供した。

(A) TXNIPプロモーター部分配列: -1299/+256、-109/+256、-39/+256
結果は-1299/+256のコントロール値を1とした相対値で表記した。

(B) TXNIPプロモーター部分配列: -39/+256、-39/+142、-39/+65
結果は-39/+256のコントロール値を1とした相対値で表記した。

各値は平均±S.E. 各群n=3、p<0.05 (Student's *t*-test)

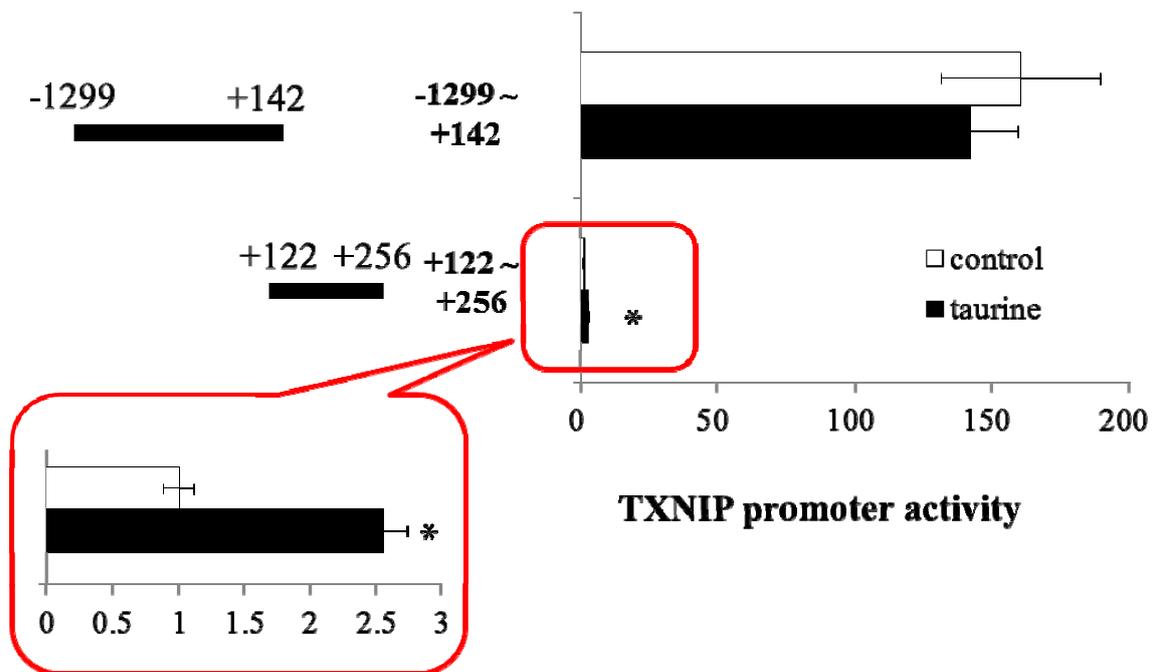


Fig. 2-1-4 タウリンが各種TXNIPプロモーター部分配列の転写活性に及ぼす影響②

TXNIPのプロモーター部分領域を含むルシフェラーゼベクターをトランスフェクション後、タウリン含む培地に交換し、24時間後の細胞を回収してルシフェラーゼアッセイに供した。結果は+122/+256のコントロール値を1とした相対値で表記した。

各値は平均±S.E. 各群n=3、p<0.05 (Student's *t*-test)

※なお、+122 / +256のグラフについては左下に拡大して表示した。

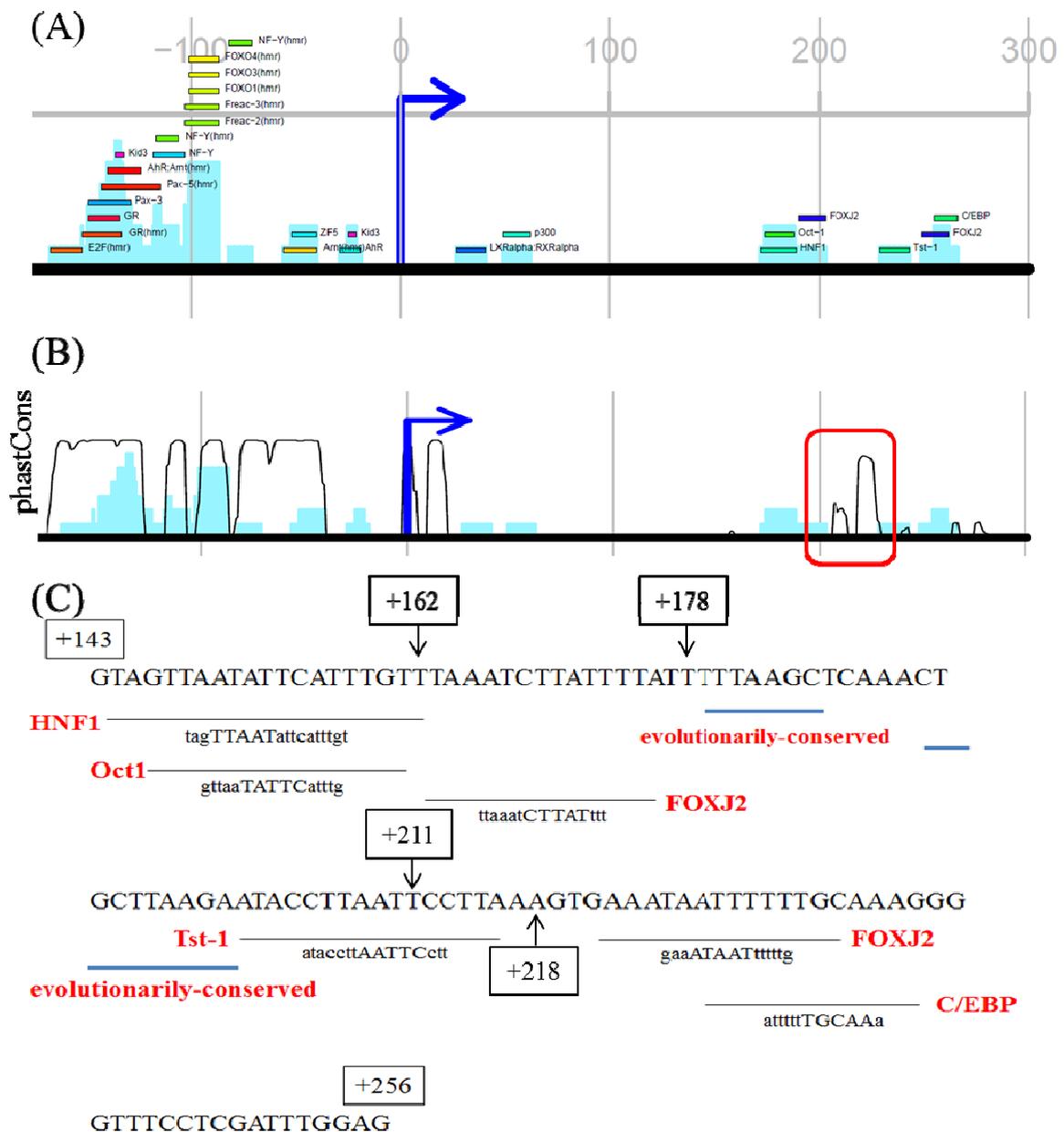


Fig. 2-1-5 TXNIP +122 / +256領域における転写因子応答配列候補と配列の進化的保存度

TXNIP -39/+256プロモーター領域の配列をバイオインフォマティクス解析に供した。(A) データベースTRANSFACを用いた転写因子結合領域の予測、(B) phastCons計算法による哺乳類46種間での配列の保存性評価 (C) (A)、(B)に該当する具体的な遺伝子配列アラインメント

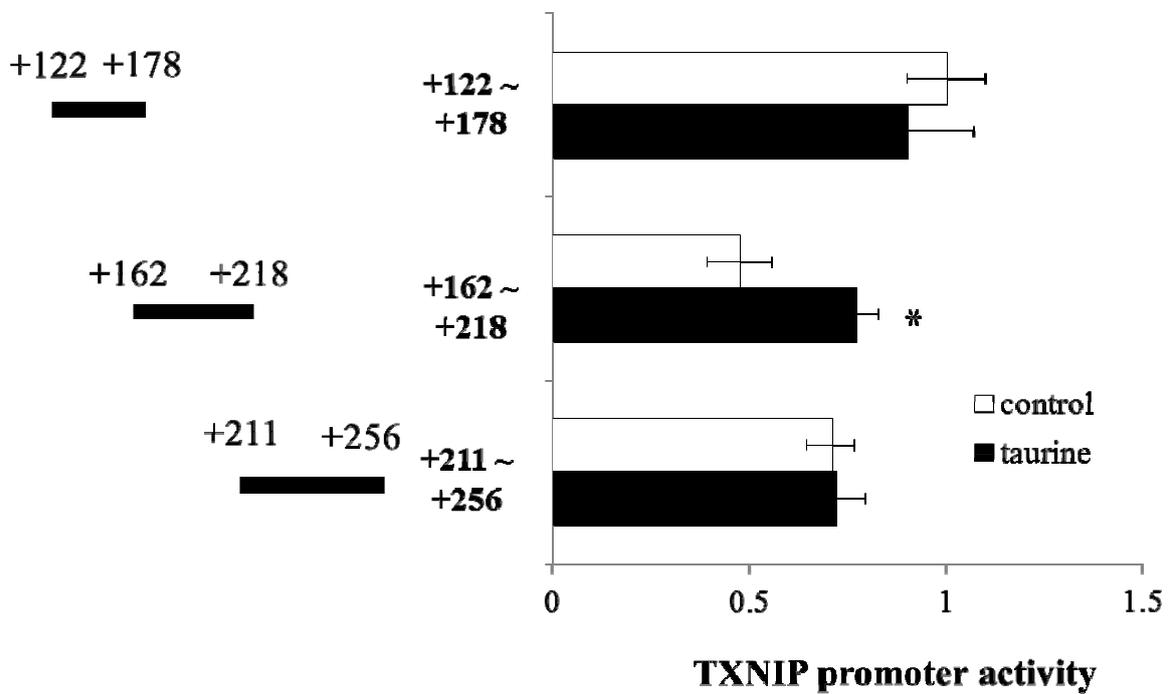


Fig. 2-1-6 タウリンが各種TXNIPプロモーター部分配列の転写活性に及ぼす影響③

TXNIPのプロモーター部分領域を含むルシフェラーゼベクターをトランスフェクション後、タウリン含む培地に交換し、24時間後の細胞を回収しルシフェラーゼアッセイに供した。結果は+122/+178のコントロール値を1とした相対値で表記した。

各値は平均±S.E. 各群n=3、p<0.05 (Student's *t*-test)

第 2 章

第 2 節

タウリンの TXNIP 発現誘導に關与するシグナル伝達経路の解析

1. 緒言

前節より、タウリンは TXNIP mRNA 安定性の向上ではなく、転写活性の亢進により TXNIP mRNA 発現を誘導していることが明らかとなった。そこでその上流の機構として、タウリンがどのようにして TXNIP 転写活性を上昇し mRNA 発現を誘導しているのかについて解析するために、タウリンが TXNIP mRNA 発現を誘導するシグナル伝達経路の解析をおこなった。

タウリンが TXNIP mRNA 発現を亢進するシグナル伝達経路を探索するために、(1) タウリンの生理作用やタウリンが誘導することが知られているシグナル伝達経路、(2) 他の化合物が TXNIP mRNA 発現を誘導するシグナル伝達経路という 2 つの観点からシグナル伝達経路の候補を挙げ、それぞれのシグナル経路に対する特異的阻害剤を用いてタウリンによる TXNIP mRNA 発現亢進のメカニズムを検討した。

2. 実験材料

(1) 試薬

EGTA はナカライテスクより購入した。BAPTA-AM は Sigma より購入した。SB203580、SP600125、PD98059 は Calbiochem より購入した。

(2) 試薬類の調製

① 1M EGTA : EGTA 7.6 g を Milli-Q 水 15 ml に溶かし、5 M NaOH を用いて pH を 7.0 に調整した。その後 Milli-Q 水で 20 ml に fill-up し、ろ過滅菌装置に通した。

② 50 mM BAPTA-AM : 購入時の濃度で用いた。

③ SB203580 (20 mM) 、 SP600125 (100 mM) 、 PD98059 (50 mM) : それぞれの粉末を DMSO に溶かした。

④ リン酸化測定用 Lysis buffer : 50 mM HEPES (pH 7.5)、150 mM NaCl、1% NP-40、0.5% sodium deoxycholate、1 mM NaVO₃、50 mM NaF、20 mM β-glycerophosphate、0.1% inhibitor cocktail (Sigma、使用直前に添加)

⑤ その他の Western blotting 用試薬 : 第 1 章第 2 節参照

3. 実験方法

(1) Real-time RT PCR

○サンプル処理 (阻害剤の添加)

24 ウェルプレート上で 2 週間培養し、腸管上皮細胞様に分化させた Caco-2 細胞に前処理として各種阻害剤を含んだ培地で 2 時間インキュベートし、その後タウリンと阻害剤を含んだ培地に交換した。48 時間培養して細胞を回収した後、TXNIP、ARRDC3、ARRDC4 の mRNA 発現量を Real-time RT PCR により測定した。なお、用いた阻害剤については Table 2-1-1 に示す。また、本節で新たに用いたプライマーを Table 2-1-2 に示す。

Table 2-1-1 用いた阻害剤とその終濃度

阻害剤	阻害作用	希釈倍率	終濃度
EGTA	細胞外カルシウムキレート	1/1000	1 mM
BAPTA-AM	細胞内カルシウムキレート	1/5000	10 μM
SB203580	p38 MAPK 阻害	1/1000	20 μM
SP600125	JNK MAPK 阻害	1/10000	10 μM
PD98059	ERK MAPK 経路(MEK1)阻害	1/2500	20 μM

Table 2-1-2 Real-time RT PCR に用いたプライマー

gene		primer sequence	annealing temperature(°C)	amplicon size(bp)
ARRDC3	forward	cacttctgaaagacctgaagc	60	89
	reverse	agcactcactggtgcaagatt		
ARRDC4	forward	ttggcagcagaaactccag	60	118
	reverse	tcctctgataccacatctgcat		

(2) Luciferase assay

○ サンプル添加

遺伝子導入した翌日に、MEK1 阻害剤 PD98059 50 μ M を含んだ培地で 2 時間インキュベートし、その後タウリン 100 mM と PD98059 を含んだ培地に交換した。24 時間培養して細胞を回収し、Luciferase assay に供した。

(3) Western blotting

① サンプル処理

6 ウェルプレート上で 2 週間培養し、腸管上皮様に分化させた Caco-2 細胞にタウリン 100 mM を含んだ培地に交換した。そして、3、24、48 時間後のリン酸化型 ERK 1/2 (Thr202/Thr204) および不活性型 ERK 1/2 の発現量を Western blotting により検出した。

② whole cell extract の調製

4°C に冷やした PBS(-) で細胞を 2 回洗浄した後、セルスクレイパーで細胞を回収した。1,000 x g、4°C で 5 分遠心し、上清を除いた後、100 μ l のリン酸化測定用 Lysis buffer を加え、25G シリンジに通すことで細胞を破碎した。15,000 rpm、4°C で 10 分遠心し、上清を whole cell extract として回収した。

③ 抗体反応

1 次抗体反応について、リン酸化型 ERK 1/2 は p-ERK 1/2 (Thr 202/Tyr 204)

(Santa Cruz) を Can Get Signal 1 で 200 倍希釈したもの、不活性型 ERK 1/2 は ERK 1 (Santa Cruz) を Can Get Signal 1 で 1000 倍希釈したものを反応溶液とし、これに洗浄した PVDF 膜を浸して室温で 1 時間静置した。1 次抗体反応が終わった PVDF 膜を PBS-T で 5 分 x 3 回洗浄した後、2 次抗体反応をおこなった。2 次抗体反応は、リン酸化型 ERK 1/2 および不活性型 ERK 1/2 いずれも HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham) を Can Get Signal 2 で 1000 倍希釈したものを反応溶液とし、これに洗浄した PVDF 膜を浸して室温で 1 時間静置した。

その他上記以外は前章に準じた。

(4) 統計処理

結果は平均値±標準誤差で表した。有意差検定には Tukey's test を用い、有意水準 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 結果

4-1 タウリンの TXNIP 発現誘導とカルシウムイオンとの関与

まず、タウリンの生理作用および TXNIP 発現亢進に関与していることが報告されているカルシウムイオンに着目し、細胞外のカルシウムキレート剤である EGTA、細胞内へ透過するカルシウムキレート剤である BAPTA-AM を用いて、タウリンによる TXNIP mRNA 発現誘導に与える影響を調べたところ、Caco-2 細胞をいずれのキレート剤で処理した場合においても、タウリンによる TXNIP mRNA 発現量の増加に変化はみられなかった (Fig 2-2-1)。

4-2 タウリンの TXNIP 発現誘導と MAPK シグナル伝達経路との関与

次に、タウリンの生理作用もしくは TXNIP 発現亢進に関与していることが報告されている mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル伝達経路である p38 経路、c-Jun N-terminal kinase (JNK) 経路、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路に着目し、それぞれのシグナル伝達経路阻

害剤を用いて、タウリンによる TXNIP mRNA 発現誘導に与える影響を調べた。その結果、Caco-2 細胞を p38 経路の阻害剤である SB203680 や JNK 経路の阻害剤である SP600125 で処理しても、タウリンによる TXNIP mRNA 発現量の増加に変化はみられなかったが、ERK 経路における MAPK/ERK kinase 1 (MEK1) の阻害剤である PD98059 を添加したところ、タウリンによる TXNIP mRNA 発現量の増加はコントロールと同程度まで抑制された (Fig. 2-2-2)。

4-3 タウリンの TXNIP mRNA 発現誘導と ERK 経路との関与

タウリンによる TXNIP mRNA 発現誘導を抑制した PD98059 を 10、20、50 μM の濃度でそれぞれタウリンを含む培地に添加し細胞を 48 時間インキュベートしたところ、10 μM の濃度においては有意な差はみられないもののタウリンによる TXNIP mRNA 発現誘導を抑制する傾向が認められた。さらに 20 μM や 50 μM においてはコントロールと同程度まで抑制され、タウリンによる TXNIP mRNA 発現亢進において PD98059 の濃度依存的な抑制が確認された (Fig 2-2-3)。これより、タウリンによる TXNIP mRNA 発現誘導に ERK-MAPK シグナル伝達経路が関与していることが示唆された。

4-4 タウリンによる TXNIP 転写活性亢進における ERK 経路の関与

タウリンによる TXNIP mRNA 発現誘導は ERK-MAPK シグナル伝達経路を介していることが示唆されたため、その上流であるタウリンによる TXNIP 転写活性の亢進も ERK シグナル伝達経路を介しているか検討した。Caco-2 細胞を ERK 経路の阻害剤である PD98059 で処理し、タウリンによる TXNIP 転写活性の亢進に与える影響を調べたところ、Fig. 2-2-4 に示すように、タウリンによる TXNIP 転写活性の上昇は、PD98059 50 μM 添加により有意に抑制された。このことから、タウリンは ERK-MAPK シグナル伝達経路を活性化することで TXNIP の転写活性を亢進していることが示唆された。

4-5 タウリンが ERK1/2 の活性化に与える影響

4-3、4-4 より、タウリンによる TXNIP 発現誘導は ERK-MAPK シグナル伝

達経路を介していることが示唆されたため、実際にタウリンにより ERK-MAPK シグナル伝達経路が活性化されているか検討した。タウリン 100 mM を添加して 3、24、48 時間後における、ERK シグナル経路の活性化指標である Thr 202/Tyr 204 残基リン酸化型の ERK1/2 発現量を測定したところ、タウリン添加 3 時間後と 24 時間後によってリン酸化型 ERK1/2 発現量の増加が見られた一方で 48 時間後においては発現量の増加はみられなかった (Fig. 2-2-5)。このことからタウリンは少なくとも 3 時間から 24 時間にかけて ERK1/2 を活性化しており、その活性化は徐々に減衰することが示された。

4-6 タウリンによる ARRDC3、ARRDC4 発現誘導における ERK 経路の関与

第 1 章第 1 節で示したように、タウリンは TXNIP の他にも同じ α -arresin family に属する ARRDC3、ARRDC4 の mRNA 発現も亢進した。そこで、これらの発現制御にも TXNIP と同様に ERK 経路が関与しているか調べるために、PD98059 を用いてタウリンによるそれぞれの mRNA 発現誘導に与える影響を検討した。その結果、タウリンによる ARRDC4 mRNA 発現の上昇は PD98059 20 μ M 添加によって抑制された (Fig. 2-2-6 (A)) が、一方で ARRDC3 については PD98059 による抑制はみられなかった (Fig. 2-2-6 (B))。このことから、タウリンによる ARRDC4 mRNA 発現誘導は TXNIP と同じ ERK-MAPK 経路を介しているが、ARRDC3 については ERK 経路とは異なる機構で誘導していることが示唆された。

4-7 TXNIP と ARRDC4 のプロモーター領域 0/+300 における配列比較

タウリンは TXNIP と ARRDC4 の mRNA 発現を同じ ERK-MAPK 経路を介して誘導していることが示唆された。そのため、TXNIP と ARRDC4 はタウリン添加によって同じ転写因子を介して転写されている可能性が考えられた。そこで、TXNIP と ARRDC4 のプロモーター領域 0/+300、特に +162/+218 の配列に共通の配列が存在するかについて、東京大学医科学研究所 中井研究室で解析したところ、TXNIP プロモーター領域の +162/+218 において、ARRDC4 のプロモーター領域と 4 塩基以上連続で共通する配列はみられず、また第 1 節で

見出された進化的保存度の高い配列 2 つ、および Tst-1 応答配列においても塩基配列に高い相同性はなかった (Fig. 2-2-7 (A))。また、TRANSFAC による転写因子結合配列の検索においても ARRDC4 プロモーター領域において Tst-1 の応答配列はみられなかった (Fig. 2-2-7 (B))。

5. 考察

タウリンによる TXNIP mRNA 発現を誘導するシグナル伝達経路の解明のために、タウリンが活性化するシグナル伝達経路と TXNIP mRNA を誘導するシグナル伝達経路に関する報告をもとに検討をおこなった。

タウリンによってカルシウムイオンの細胞内への流入が心臓細胞や[129]神経細胞において誘導される[130]ことが知られている。一方で、TXNIP mRNA 発現を亢進する分子として NAD⁺、NADPH、ATP、ADP、cAMP などの adenosine-containing molecules が報告されている[123]。少なくとも NAD⁺[131,132]、ATP[132,133]はカルシウムイオンの細胞内への流入を促進し、さらにそれらによる TXNIP mRNA の誘導には細胞内のカルシウムイオンが必要だとされている[123]。このことから、タウリンがカルシウムイオンの流入を介して TXNIP mRNA 発現を誘導している可能性が考えられたが、カルシウムキレート剤を添加してもタウリンによる TXNIP mRNA 発現誘導に変化はみられず (Fig. 2-2-1)、Caco-2 細胞においてタウリンはカルシウムイオンの細胞内への流入を誘導していないと考えられた。

TXNIP mRNA を誘導する代表的なシグナル伝達経路は MAPK 経路であり、グルコース添加による TXNIP mRNA 発現の上昇には p38[120]または p38 および ERK[134]が、セラミドによる発現上昇には p38 および JNK[135]が関与しているとされている。一方で、タウリンは様々な細胞において MAPK の中でも ERK シグナルを活性化する報告がなされている[136-139]。そのため、各種 MAPK 阻害剤を用いてタウリンによる TXNIP mRNA 発現亢進に及ぼす影響を調べたところ、ERK 経路の阻害剤である PD98059 によってタウリンによる TXNIP mRNA 発現の上昇が抑制された (Fig. 2-2-2)。さらに、PD98059 の濃

度依存的に TXNIP mRNA 発現の上昇を抑制することが確認された (Fig. 2-2-3)。さらに PD98059 によってタウリンによる TXNIP の転写活性上昇も抑制された (Fig. 2-2-4)。このことは、タウリンは転写レベルで TXNIP の発現を亢進していることを支持している。しかしながら、mRNA レベルにおいて PD98059 は 20 μ M の濃度で効果があったのに対し、転写活性レベルにおいては 20 μ M では効果的ではなく (データ省略)、50 μ M において抑制がみられた。この濃度の違いについては細胞の培養条件の違いが考えられる。mRNA 発現については Caco-2 を 2 週間培養させて小腸上皮様に分化させたものを実験として用いたが、転写活性については 2 日間しか培養しておらず Caco-2 細胞は未分化の状態でおこなっており、両者の細胞の性質の違いが表れたものだと考えられる。

阻害剤の実験により、タウリンによる TXNIP mRNA 発現誘導に ERK が関与していることが示唆された。そこで、タウリンが ERK を活性化しているか検討したところ、タウリン添加による ERK のリン酸化 (活性化) がみられた (Fig. 2-2-4)。このことから、タウリンは ERK 経路を介して TXNIP mRNA 発現を誘導していることが示唆された。

哺乳類において上記 3 種類の MAPK 経路は互いに深く関わり合いながら増殖因子やストレス刺激に対する細胞応答を調節し、細胞表面から核内へと情報を伝達する役割を担っている [140]。これら MAPK 経路の活性化は主に kinase 類のリン酸化の亢進、もしくは脱リン酸化酵素の活性化を介している [141]。増殖因子やサイトカインによる刺激が加わると MAPK kinase kinase (MAPKKK) が多量体化などによってすぐさま活性化し、下流にある MAPKK をリン酸化する。続いて MAPK がリン酸化され、特異的な標的をリン酸化したり、MAPK 自身の転写活性化を活性化したりする [142]。ERK 経路は、多くの細胞外刺激や細胞内における変化によって、Ras などの低分子量 G タンパク質の活性化によりシグナルカスケードが始まり [143-145]、増殖、分化、発生、生存、記憶、遊走などの誘導において中心的な役割を果たす [146]。しかしながら、同じ ERK の活性化でもその活性の持続性により機能は異なる [146,147]。細胞種や刺激によって違いはあるものの、60 分以内に終わるような一過性の ERK 活性化は細

胞増殖を誘導する一方で、持続的な活性化は細胞分化へ導く[146]。また、一過性の活性化では ERK 自身の核内移行がおこなわれず下流のキナーゼが核内に移行するが、持続的な活性化の場合は ERK 自身が核内へ移行し転写因子を直接リン酸化するという違いがあるため、シグナル伝達経路が異なり遺伝子発現のプロファイルも変わってくる[147]。本研究においてタウリンによる ERK の活性化は少なくとも 3 時間から 24 時間までみられており、比較的持続的である (Fig. 2-2-5)。そのため、タウリンは ERK を活性化することにより ERK 自身が核内に移行し、転写因子を活性化していることが推察された。同時に ERK の活性化はタウリン添加後 48 時間においてみられなくなったことから、タウリンによる TXNIP mRNA 発現の上昇は一時的なものであることが考えられた。

タウリンによる TXNIP mRNA 発現亢進は JNK 阻害剤である SP600125 によって抑制されるのではなく、さらに亢進したこと (Fig. 2-2-2) から、Caco-2 細胞において JNK 経路は TXNIP mRNA 発現を抑制しているということが考えられる。タウリンは肝臓や心臓において様々なストレスによって活性化された JNK 経路を阻害する[148-150]ことから、本研究においてはタウリンが JNK 経路を阻害することで TXNIP mRNA 発現を誘導し、JNK 阻害剤によりさらに亢進したという可能性が考えられる。JNK 経路が TXNIP mRNA 発現を低下するという報告はなされていないが、一般的に ERK 経路は細胞増殖や抗アポトーシスにはたらくのに対し、p38 経路や JNK 経路は炎症やアポトーシスを誘導する[151,152]。また vascular endothelial growth factor (VEGF) は ERK 経路を活性化し JNK 経路を不活性化することでアポトーシスを抑制すること[153]が報告されており、同じ MAPK 経路でも ERK 経路と JNK 経路は逆の生理作用を示す場合がある。本研究においても同様の機構がはたらいっている可能性がある。

なお、上記以外のシグナル伝達経路がタウリンによる TXNIP mRNA 発現誘導に与える影響についても検討した。タウリンによる活性化が報告されている mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナル経路[154]や phosphoinositide 3-kinase (PI3K) シグナル経路[138]について、それぞれの阻害剤である rapamycin、LY294002 を用いて調べたところ、いずれにおいても

阻害剤を添加したサンプル群のコントロールにおける TXNIP mRNA 発現量が阻害剤無添加のコントロールと比べて有意に増加した（データ省略）。そのため、これらの阻害剤自身が TXNIP mRNA 発現に影響を与えていることが示唆され、タウリンによる TXNIP mRNA 発現に mTOR 経路や PI3K 経路が関与しているかについては、阻害剤の実験からでは判断できない。

また、DNA マイクロアレイ解析においてタウリンは TXNIP と同じ α -arrestin family である ARRDC3 や ARRDC4 の mRNA 発現も誘導することが見出されたことから、これらについても ERK 経路の阻害剤を用いてその影響を検討したところ、ARRDC4 については TXNIP と同様に抑制した (Fig. 2-2-6 (A)) が、ARRDC3 については阻害剤の濃度依存的に発現が亢進する結果となった (Fig. 2-2-6 (B))。このことから、タウリンが同様の作用機構で TXNIP と ARRDC4 の mRNA 発現を誘導することが示唆された。また、ARRDC3 は核内受容体である PPAR γ のターゲット遺伝子であると考えられている [155]。一方で、ERK 経路は PPAR γ の 112 番目の Ser 残基をリン酸化することでその転写活性を抑制する [156]。このことから、ERK 経路阻害剤の添加によりタウリンによる ERK 活性化が抑制されたため、内因性 PPAR γ の転写活性が誘導され ARRDC3 mRNA 発現が亢進したと考えられる。

タウリンが TXNIP と ARRDC4 mRNA 発現を同様の機構で誘導していることが考えられたため、それぞれのプロモーターにおける共通配列から応答配列を同定しようと試みた。第 1 節よりタウリンは TXNIP プロモーター領域 +162 / +218 における遺伝子配列を認識していることが示唆されている (Fig. 2-1-6) が、その領域について共通配列を調べたところ、TXNIP プロモーター +162 / +218 において ARRDC4 と 4 塩基以上で共通する配列は存在せず、相同性の高い配列は得られなかった (Fig. 2-2-7 (A))。また、+162 / +218 に存在する転写因子 Tst-1 の応答配列も ARRDC4 には存在しなかった (Fig. 2-2-7 (B))。なお、Tst-1 応答配列については、ARRDC4 のプロモーター領域 -1300 / +300 に広げて検索しても存在しなかった (データ省略)。このことから考えられる可能性は、(1) タウリンによる TXNIP と ARRDC4 mRNA 発現亢進機構は異なること、ま

たは(2) ARRDC4 プロモーター領域の-1300 / +300 以外の部分に共通配列が存在することである。ARRDC4 のプロモーター領域はグルコースなどによって認識される ChoRE を持つことが報告されている[157]が、第 1 節より ChoRE はタウリンと関与しないことが明らかとなっている。TXNIP と ARRDC4 の ORF は 80%もの相同性がある[51]ものの、プロモーター領域においては少なくとも 0 / +300 における相同性は約 30%であり高いとはいえない (Fig. 2-2-7 (A))。ARRDC4 の転写制御機構は前述した ChoRE 配列以外については報告されておらず、TXNIP とのプロモーター配列の違いがその一因であることが考えられる。ARRDC4 のプロモーター配列から TXNIP プロモーター領域におけるタウリンが認識する遺伝子配列を推察することはできなかつたため、今後さらに deletion 解析などで TXNIP のプロモーター解析を進めていく必要がある。

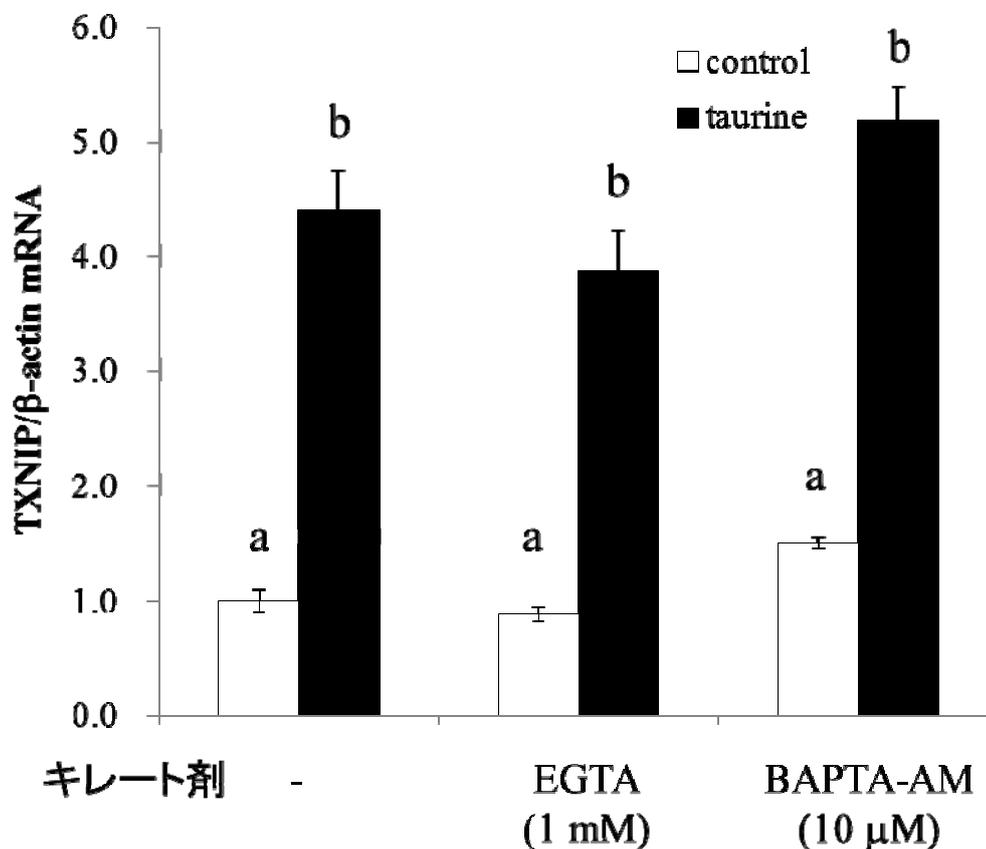


Fig. 2-2-1 タウリンによるTXNIP mRNA発現亢進に対するカルシウムイオンの関与

Caco-2細胞をカルシウムキレート剤EGTA、BAPTA-AMで2時間前処理した後、タウリン100 mMとそれぞれのキレート剤を含む培地中で培養し、48時間後のRNAを回収した。cDNAを合成し、Real-time RT-PCRによりTXNIP mRNA発現量を測定した。結果はキレート剤無処理のコントロール値を1とした相対値で表記した。

各値は平均±S.E. 各群n=3、p<0.05 (Tukey's test)

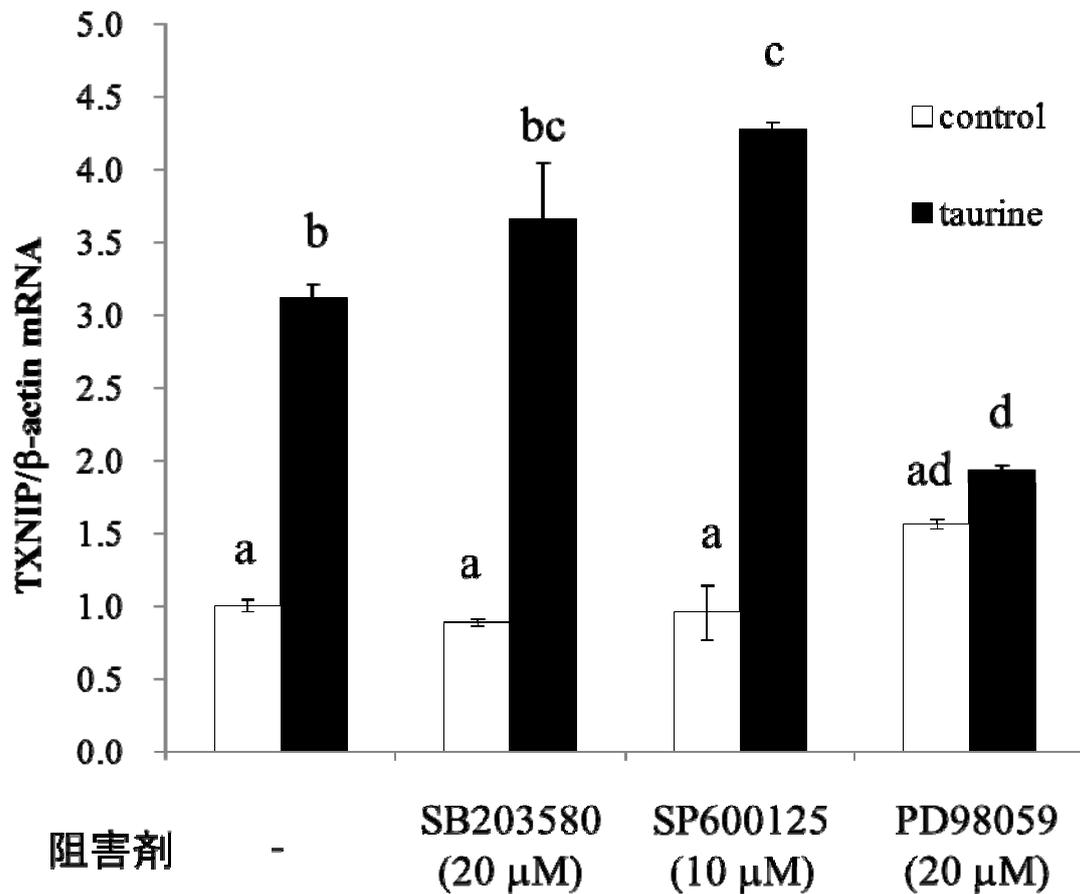


Fig. 2-2-2 タウリンによるTXNIP mRNA発現亢進に対するMAPKシグナル伝達経路の関与

Caco-2細胞を3種類のMAPK阻害剤でそれぞれ2時間前処理した後、タウリン100 mMとそれぞれの阻害剤を含む培地中で培養し、48時間後のRNAを回収した。cDNAを合成し、Real-time RT-PCRによりTXNIP mRNA発現量を測定した。結果は阻害剤無処理のコントロール値を1とした相対値で表記した。

各値は平均±S.E. 各群n=3, p<0.05 (Tukey's test)

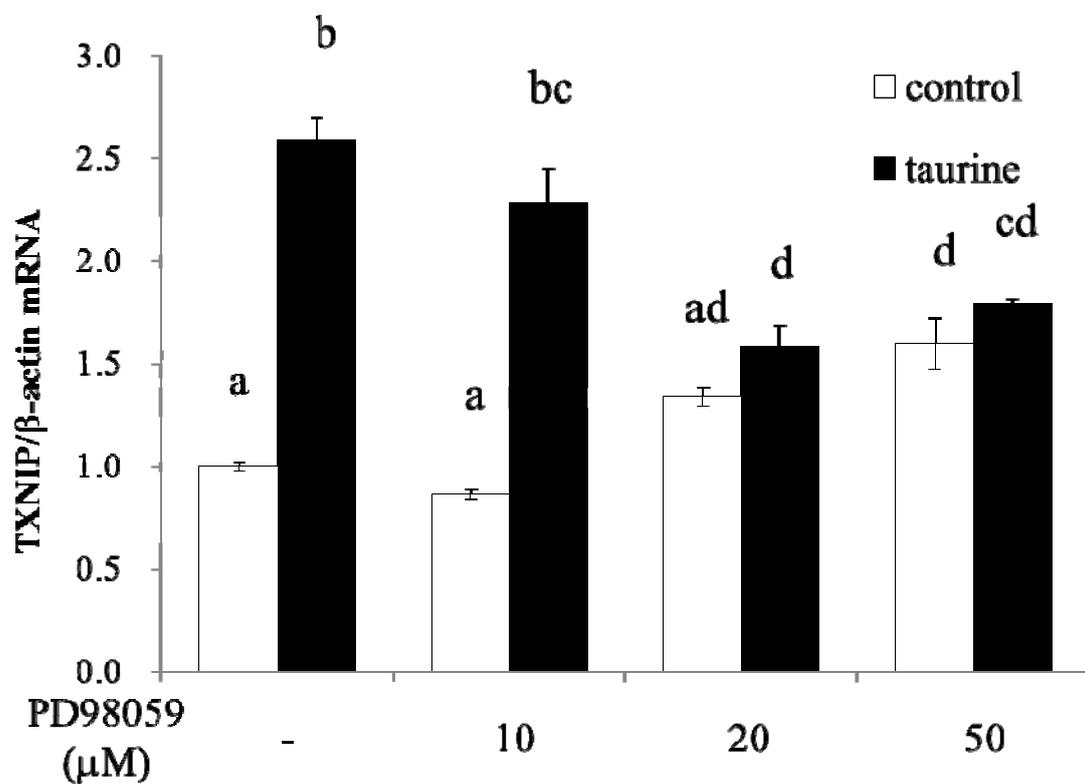


Fig. 2-2-3 タウリンによるTXNIP mRNA発現亢進に対するERKシグナル経路の関与

Caco-2細胞をMEK1阻害剤であるPD98059で2時間前処理した後、タウリン100 mMとPD98059阻害剤を含む培地中で培養し、48時間後のRNAを回収した。cDNAを合成し、Real-time RT-PCRによりTXNIP mRNA発現量を測定した。結果は阻害剤無処理のコントロール値を1とした相対値で表記した。各値は平均±S.E. 各群n=3、p<0.05 (Tukey's test)

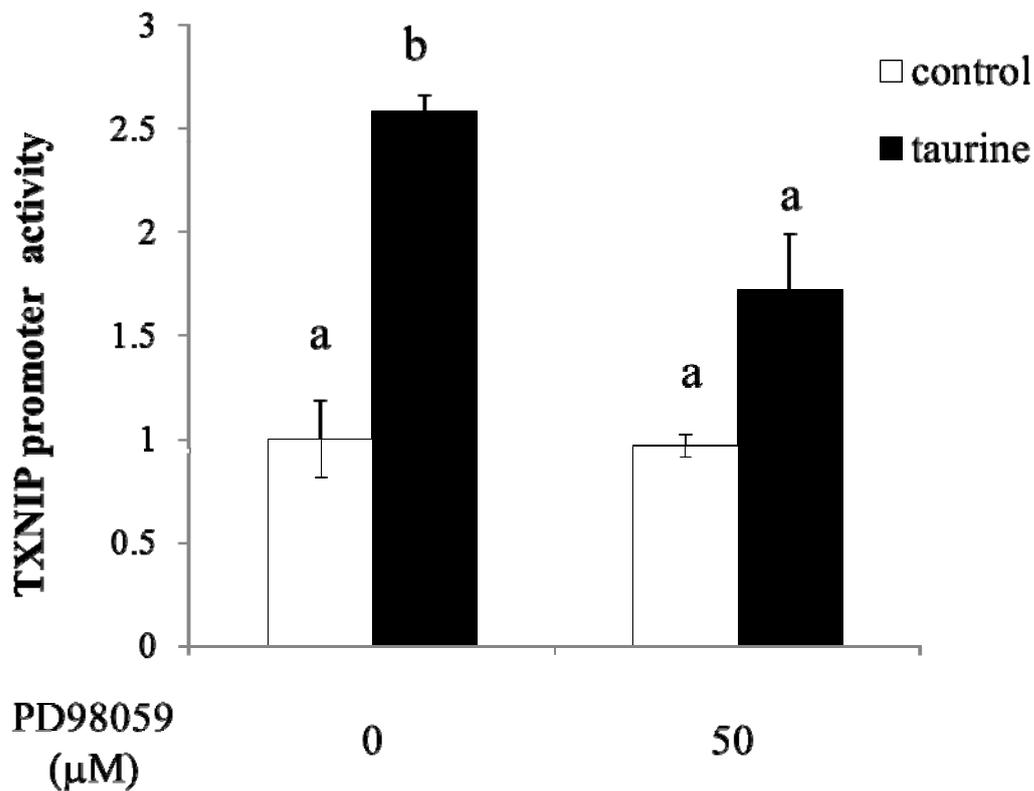


Fig. 2-2-4 タウリンによるTXNIPの転写活性亢進におけるERKシグナル経路の関与

TXNIPのプロモーター領域を含むルシフェラーゼベクターをトランスフェクション後、前処理としてMEK1阻害剤であるPD98059を50 μMの濃度で加え、2時間後タウリンとPD98059を含む培地に交換し、24時間後の細胞を回収しルシフェラーゼアッセイに供した。結果は阻害剤無処理のコントロール値を1とした相対値で表記した。各値は平均±S.E. 各群n=3、p<0.05 (Tukey's test)

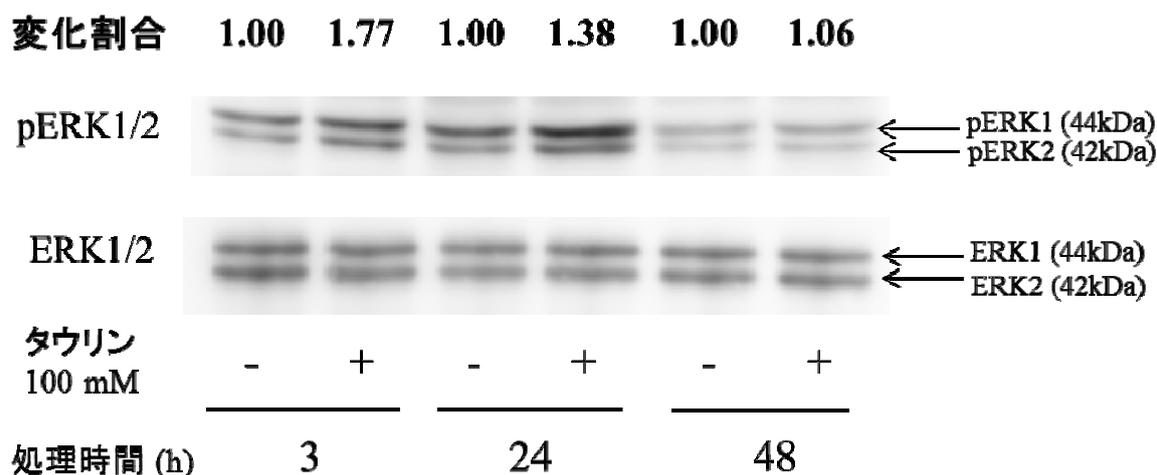


Fig. 2-2-5 タウリンがERK1/2の活性に及ぼす影響

Caco-2細胞をタウリン100 mMを含む培地中で培養し、3、24、48時間後の細胞を回収し、western blottingによりTXNIPタンパク質の発現量を定量した。pERK1/2についてタウリン3時間処理においては40 µg分、24、48時間処理においては60 µg分のタンパク質量を、ERK1/2についてはすべての処理群において5 µg分のタンパク質量をSDS-PAGEに供した。発現変化はそれぞれの処理時間のコントロールにおける発現量を1とした相対値で表記した。

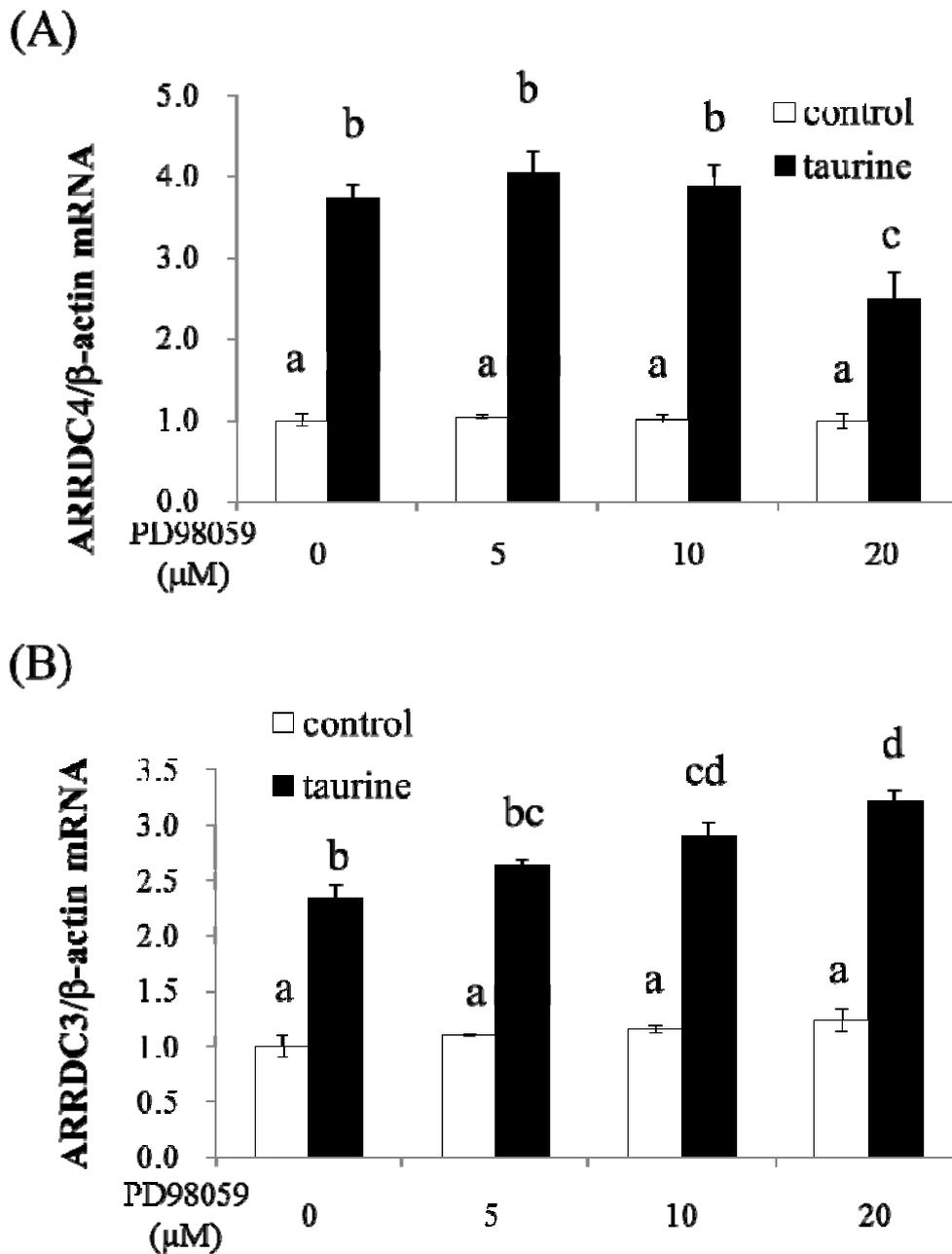


Fig. 2-2-6 タウリンによるARRDC4、ARRDC3 mRNA発現亢進におけるERKシグナル経路の関与

Caco-2細胞をERK阻害剤であるPD98059で2時間前処理した後、タウリン 100 mMとPD98059を含む培地中で培養し、48時間後のRNAを回収した。cDNAを合成し、Real-time RT-PCRによりTXNIP mRNA発現量を測定した。結果は阻害剤無処理のコントロール値を1とした相対値で表記した。各値は平均±S.E. 各群n=3、p<0.05 (Tukey's test)

(A)

```
TXNIP      ataatagagac gtttccgct cctgcttga actaacccct cttttctcc
ARRDC4     g--acaggc ctctggc-----ga gccggtgcc catcgggtac
Clustal Co.  * * * * * * * * * * * * * * * * * *

TXNIP      aaaggagtgc ttgtggagat cggatcttt ctccagcaat tgggggaaag
ARRDC4     cgcacggctg ccggggggc ctaccctgc cgcgagcgc tgtgacagcg
Clustal Co.  * * * * * * * * * * * * * * * * * *

TXNIP      aaggctttt -----ct ctgacttog----- --cttagtg-
ARRDC4     gccgcctgt gctcgcgac ccgctcggg gctctgcgg acctcagggg
Clustal Co.  * * * * * * * * * * * * * * * * * *

TXNIP      ----- -taaccagc gctatattt tttaggcgc ttttgaaaa
ARRDC4     caggaaagag tcgccggcg gtagggcgg gtaggctgg tgcgcggcg
Clustal Co.  * * * * * * * * * * * * * * * * * *

          +162
          ↓
TXNIP      cc-tagtagt taatattcat ttgtttaat cttatttat ttttaagctc
ARRDC4     ccgtgggtgc ccagggcgc gtaagagcc tggctctgt gttcaggac
Clustal Co.  * * * * * * * * * * * * * * * * * *

          +218
          ↓
TXNIP      aaactgctta agataccct aattccttaa agtgaataa tttttgcaa
ARRDC4     ggc----- gcaagggctg ctattccagc gccgagaca-----gtgg
Clustal Co.  * * * * * * * * * * * * * * * * * *

TXNIP      aggggtttcc tcgatttga gcttttttt tcttc
ARRDC4     ccggcacgt gctgctggag gct----- --ccg
Clustal Co.  * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

進化保存①

進化保存②

Tst-1

(B)

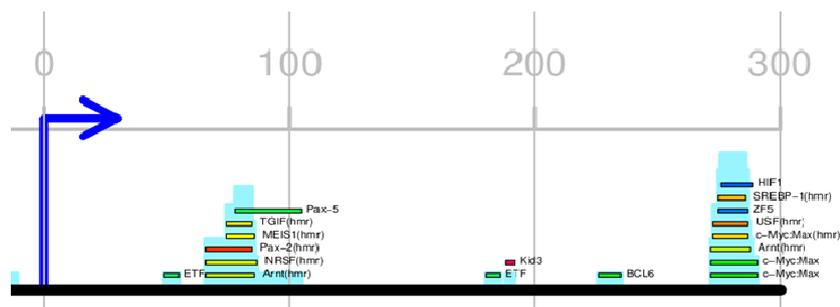


Fig. 2-2-7 TXNIPとARRDC4のプロモーター領域0/+300周辺の遺伝子配列アラインメント

- (A) MAFFTソフトウェアを用いたTXNIPとARRDC4のプロモーター領域0/+300周辺の塩基配列比較。TXNIPとARRDC4の配列が一致しているものについてはその下(Clustal Consensus (Co.))に、*で示してある。
- (B) データベースTRANSFACによるARRDC4プロモーター領域0/+300周辺の転写因子結合領域の予測。

第3章

タウリンによる TXNIP 発現誘導が腸管上皮細胞 に及ぼす影響

1. 緒言

第1章においてタウリンは TXNIP の発現を誘導することを明らかにし、第2章ではその作用機序について解析を進めた。本章では、タウリンが TXNIP 発現を亢進することで誘導されるその下流の変化を解析するために、タウリンが TXNIP を介して腸管上皮 Caco-2 細胞にどのような影響を与えるのかについて大きく3つに分けて研究を進めた。(1) TXNIP を強発現することによりグルコースの吸収が抑制される[52,123]ことから、タウリンがグルコース吸収に及ぼす影響を調べた。(2) TXNIP ノックアウトマウスは絶食時に心筋などにおいて AMP kinase (AMPK) の活性が抑制される[56]ことから、タウリンが AMPK 活性に与える影響を検討した。(3) TXNIP はチオレドキシシンと相互作用することでその活性を抑制する[43,44]ため、タウリンがチオレドキシシン活性に及ぼす影響を検討した。

2. 実験材料

(1) 試薬

TritonX-100、クリアゾル II (液体シンチレーション用カクテル) はナカライテスクより購入した。D-[2-³H]グルコース (比放射能 21.2 Ci/mmol) は Moravek Biochemicals より購入した。ネガティブコントロール (ON-TARGETplus Non-targeting Pool) および TXNIP の siRNA (ON-TARGETplus SMARTpool siRNA) は Thermo Scientific より購入した。Lipofectamine™ RNAiMAX は Invitrogen より購入した。

(2) 実験器具、機器

液体シンチレーションアナライザーはAloka社のLSC5100液体シンチレーションアナライザーを用いた。12 ウェルプレートは Corning より購入した。96 ウェルプレート (ブラック) は Thermo より購入した。

(3) 試薬類の調製

① HBSS (Glc-): 以下の組成 (Table 3-1) で Milli-Q 水 1000 ml に溶かし、KOH で pH7.4 に調整した。

Table 3-1 HBSS (Glc-)の組成

CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.185 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.10 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.10 g
KCl	0.40 g
KH ₂ PO ₄	0.06 g
NaHCO ₃	0.35 g
NaCl	8.00 g
Na ₂ HPO ₄	0.048 g

② 0.05%アジ化ナトリウム溶液 : アジ化ナトリウムを 0.05%になるように PBS(-) に溶かした。

③ 0.1% TritonX-100 溶液:TritonX-100 を 0.1%になるように Milli-Q 水に溶かした。

④ [³H]-グルコース溶液

使用直前に[³H]-グルコースの原液を 1000 倍 (約 50 nM) 希釈になるように HBSS (Glc-) 溶液に加え、十分に混合した。

⑤ siRNA 溶液 : RNA 用 Milli-Q 水 250 μ l に溶かし、20 μ M にした。

⑥ TE buffer : 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA

その他の試薬、器具に関しては前章までに準じた。

3. 実験方法

(1) グルコース取り込み実験

① サンプル処理

24 ウェルプレート上で 2 週間培養し、腸管上皮細胞様に分化させた Caco-2 細胞にタウリン含んだ培地に交換し、48 時間培養した。また、ノックダウン誘導下におけるグルコース取り込み実験については、siRNA を添加し 2 日後の Caco-2 細胞を使用し、上記と同様に処理した。また、これらはすべて実験時に同一の細胞を 2 枚の 24 ウェルプレートに播き、一方をグルコース取り込み用、もう一方をタンパク質定量用として用いた。

② グルコース取り込み実験

輸送実験をおこなう前に PBS(-)、HBSS (Glc-) を 37°C でプレインキュベートした。また、0.05% アジ化ナトリウム溶液は氷冷しておいた。24 ウェルプレートから培地を除去し、各ウェルを 37°C で保温しておいた PBS(-) 700 μ l で 2 回洗浄した。その後、HBSS (Glc-) を 1 ウェルあたり 300 μ l 加え、37°C で 10 分間インキュベートした。HBSS (Glc-) を除去し、 ^3H -グルコース溶液を 1 ウェルあたり 300 μ l 加え、37°C で 10 分間インキュベートした。 ^3H -グルコース溶液を除去し、氷冷しておいた 0.05% アジ化ナトリウム溶液を 1 ウェルあたり 700 μ l ずつ加えることで反応を停止させた。0.05% アジ化ナトリウム溶液を除去し、再度同量の 0.05% アジ化ナトリウム溶液で洗浄した。その後、0.1% TritonX-100 溶液を 1 ウェルあたり 250 μ l ずつ加え、37°C で 10 分間インキュベートした。細胞をよく懸濁して 2.5 ml の液体シンチレーションカクテルに回収し、ボルテックスで均一になるまで混合した。このカクテル中の ^3H 量を液体シンチレーシ

ヨンアナライザーにより測定した。

③ 細胞のタンパク質定量法

第 1 章第 2 節参照

(2) RNA 干渉

Caco-2 細胞を 0.5×10^5 cell の細胞数で 24 well プレートに播いた翌日に、30-50%コンフルエントになっていることを確認した。そしてトランスフェクションする 1 時間前に培地を OPTI-MEM® I に交換し、1 well あたり 500 μ l 加えた。その後、以下の 2 種類の混合液をつくった。1 well あたりの量を示す。

A. 50 μ l の OPTI-MEM® I 中に siRNA を 6 pmol 加えて、穏やかに混合した。

B. 50 μ l の OPTI-MEM® I 中に Lipofectamine™ RNAiMAX を 1 μ l 加えて、穏やかに混合した。

次に、A 液と B 液を混合し、室温で 15 分放置した。その後、プレートの各 well に混合液 (100 μ l) を加えて最終 RNA 濃度を 10 nM、最終容量を 600 μ l とした。このまま 48 時間培養することで遺伝子ノックダウンをおこなった。その後、サンプル処理をおこなった。

(3) Western blotting

① サンプル処理

6 ウェルプレート上で 2 週間培養し、腸管上皮様に分化させた Caco-2 細胞にタウリン 25、50、100 mM を含んだ培地に交換した。そして、48 時間後のリン酸化型 AMPK α (Thr172) および不活性型 AMPK α の発現量を Western blotting により検出した。

② whole cell extract の調製

4°C に冷やした PBS(-) で細胞を 2 回洗浄した後、セルスクレイパーで細胞を回収した。1,000 x g、4°C で 5 分遠心し、上清を除いた後、100 μ l のリン酸化測定用 Lysis buffer を加え、25G シリンジに通すことで細胞を破碎した。15,000

rpm、4°Cで10分遠心し、上清を whole cell extract として回収した。

③ 抗体反応

1 次抗体反応について、リン酸化型 AMPK α は AMPK α (Thr172) (Cell Signaling Technology) を Can Get Signal 1 で 2000 倍希釈したもの、不活性型 AMPK α は AMPK α (Cell Signaling Technology) を Can Get Signal 1 で 1000 倍希釈したものを反応溶液とし、これに洗浄した PVDF 膜を浸して 4°Cで一晩振盪した。1次抗体反応が終わった PVDF 膜を PBS-T で 5分 x 3回洗浄した後、2次抗体反応をおこなった。2次抗体反応は、リン酸化型 AMPK α および不活性型 AMPK α いずれも HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham) を Can Get Signal 2 で 1000 倍希釈したものを反応溶液とし、これに洗浄した PVDF 膜を浸して室温で 1 時間静置した。

(4) 細胞内 ATP 量の測定

① サンプル処理

24 ウェルプレート上で 2 週間培養し、腸管上皮細胞様に分化させた Caco-2 細胞にタウリン含んだ培地に交換し、48 時間培養した。

② サンプル調製

ATP 量は ATP Bioluminescence Assay Kit HS II (Roche)を用いて測定した。Caco-2 細胞を冷 PBS(-)で洗浄し、冷 PBS(-)を 1 ウェルあたり 500 μ l 加えて細胞を剥ぎ取り、1.5 ml チューブに回収した。1,700 rpm、4°Cで 5 分遠心し PBS を取り除いた後、沈殿に Dilution Buffer 100 μ l を加えて希釈した(細胞希釈液)。細胞希釈液 10 μ l に Dilution Buffer を 40 μ l 加えて 50 μ l にし (※A)、さらにそこから 6 μ l とり、Dilution Buffer を 54 μ l 加えて計 50 倍希釈にした。Cell Lysis Reagent を 60 μ l (等量) 加えて、室温で 5 分間静置した。また、検量線用として Dilution Buffer で希釈した ATP Standard の各濃度の液 (10⁻¹¹~10⁻⁷ M) 60 μ l についても同様の処理をおこなった。サンプルについてはさらに 100°C で 2 分インキュベートし、10,000 x g で 1 分遠心して上清 100 μ l を調製サンプ

ルとした。なお、サンプルは測定直前まで氷上で保存した。

③ ATP 量の測定

Kit のプロトコールに従い、以下のようにして ATP 量を測定した。

各サンプルを 100 μ l ずつ入れたルミノメーターチューブに Luciferase Reagent 100 μ l を添加し、ルミノメーターによりルシフェラーゼ活性を測定した。測定時間は 10 秒に設定した。

また、②の※A で残ったサンプル液を用いてタンパク質量を測定した。サンプル液 10 μ l に滅菌水 30 μ l を加えて希釈した溶液のタンパク質量を色素結合法（第 1 章第 2 節参照）により定量した。ルシフェラーゼ活性値を ATP 量に換算した後タンパク質量で補正して、各サンプルの細胞内 ATP 量 (M/ μ g protein) とした。

(5) チオレドキシシン活性

① サンプル処理

12 ウェルプレート上で 2 週間培養し、腸管上皮細胞様に分化させた Caco-2 細胞をタウリン 100 mM を含んだ培地に交換し、72 時間培養した。

② cell lysate の調製

4°C に冷やした PBS(-) で細胞を 1 回洗浄した後、セルスクレイパーで細胞を回収した。1,000 x g、4°C で 5 分遠心し、上清を除いた後、200 μ l の TE buffer を加え、25G シリンジに通すことで細胞を破碎した。10,000 rpm、4°C で 20 分遠心し、上清を cell lysate として回収した。

③ タンパク質量の定量

前項で得られた上清 5 μ l に Milli-Q 水 45 μ l を加えることにより 10 倍希釈溶液を調製した。その後は第 1 章第 2 節に準じた。

④ チオレドキシン活性

Thioredoxin Activity Fluorescent Assay Kit (Cayman Chemical) を用いて測定した。96 ウェルプレート (ブラック) に 10 μg 相当の cell lysate を加え、assay buffer で 65 μl に fill-up した。Recombinant thioredoxin reductase を 10 μl 加えた後、 β -NADPH を 5 μl 加えてプレートに蓋をして 37°C で 30 分インキュベートした。その後、fluorescent substrate を 20 μl 添加し、37°C で 5 分インキュベートした。インキュベート後、室温で 485 nm の励起波長、544 nm の蛍光波長を測定し、0 分後の蛍光値とした。また、30 分後に同様の測定をおこない、30 分後の蛍光値とした。チオレドキシン活性は、各サンプルの 30 分後の 0 分後の蛍光値の差を測定時間 30 分で割りさらにタンパク質量 10 μg で割ることで酵素活性とし、コントロールの値を 1 としたときの相対値で示した。

(6) 統計処理

結果は平均値 \pm 標準誤差で表した。有意差検定には Dunnett's test、Tukey's test、Student's *t*-test を用い、有意水準 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

その他上記以外は前章に準じた。

4. 結果

4-1 タウリンがグルコース取り込み活性に及ぼす影響

Caco-2 細胞をタウリン 25、50、100 mM で処理して 48 時間後のグルコース取り込み活性を測定したところ、タウリンの濃度依存的にグルコース取り込み活性を抑制する結果が得られた (Fig. 3-1)。タウリン 100 mM においてコントロールと比べて取り込み活性は約 60%となった。このことからタウリンは Caco-2 細胞においてグルコースの取り込みを抑制することが示された。

4-2 タウリンによるグルコース吸収の抑制における TXNIP の関与

4-1 よりタウリンがグルコースの取り込みを抑制することが見出されたが、その作用が TXNIP の誘導によるものかについて明らかにするために、siRNA を

用いて TXNIP mRNA のノックダウンをおこない、グルコース取り込みへの影響を検討した。その結果、siRNA ネガティブコントロールにおいてはタウリンによるグルコース取り込み抑制がみられたのに対し、TXNIP の siRNA を添加しノックダウンを誘導したときにその抑制効果が解除された (Fig. 3-2)。このことからタウリンによるグルコース取り込み抑制はタウリンによる TXNIP 発現誘導を介していることが示唆された。

4-3 タウリンが AMPK 活性に及ぼす影響

Caco-2 細胞をタウリン 25、50、100 mM で 48 時間処理し、細胞を回収して Thr172 残基リン酸化型の AMPK α 発現量を測定したところ、タウリンの濃度依存的にリン酸化型 AMPK α 発現の亢進がみられ、タウリン 100 mM において約 1.5 倍まで上昇した (Fig. 3-3)。このことからタウリンは AMPK を活性化していることが明らかとなった。

4-4 タウリンが細胞内 ATP 量に及ぼす影響

タウリンによって活性化された AMPK はエネルギー源である ATP 量の維持および合成に関与している [55]。そこで、タウリンが細胞内の ATP 量に与える影響を検討した。タウリン 100 mM を含む培地で 72 時間培養し、細胞内 ATP 量を測定したところ、コントロールと比べて有意な上昇がみられた (Fig. 3-4)。このことからタウリンはエネルギー産生を誘導することが示された。

4-5 タウリンがチオレドキシシン活性に及ぼす影響

Caco-2 細胞をタウリン 100 mM で処理し、72 時間後のチオレドキシシン活性を測定したところ、コントロールと比べて有意なチオレドキシシン活性の低下がみられた (Fig. 3-5)。このことからタウリンによって誘導された TXNIP はチオレドキシシンと相互作用し、チオレドキシシン活性を低下させることが示唆された。

5. 考察

TXNIP は多彩な生理機能に関与していることが知られているが、それらの中で多くの報告がなされており中心的な機能と考えられる「エネルギー代謝」と「チオレドキシンの相互作用による redox 制御」に着目して、タウリンによる TXNIP 発現誘導が Caco-2 細胞に及ぼす影響を検討した。

TXNIP の発現上昇によりグルコースの吸収が抑制されることからタウリンは TXNIP を誘導することでグルコースの取り込み活性を抑えることが考えられる。そこで、Caco-2 細胞においてタウリンがグルコース取り込み活性に及ぼす影響を検討したところ、添加したタウリンの濃度依存的にグルコースの取り込みを抑制した (Fig. 3-1)。さらに、その生理作用に TXNIP が関与しているかについて TXNIP の siRNA を用いて検討したところ、TXNIP をノックダウンすることによりタウリンによるグルコース取り込み活性の抑制が解除された (Fig. 3-2)。このことから、タウリンは TXNIP の発現誘導を介してグルコースの吸収を抑制していることが明らかとなった。心臓において TXNIP をノックアウトしたときにはグルコースの取り込みに顕著な増加がみられる[158]。グルコースや adenosine-containing molecule は、転写因子 ChREBP-Mlx 複合体がプロモーター領域の ChoRE に結合することで TXNIP を誘導し、グルコースの吸収を抑制する[123,125]。ChREBP-Mlx 複合体はグルコースによって応答する遺伝子の多くに関与していること[126]から、グルコースの代謝に関して ChREBP-Mlx や ChoRE をターゲットとした研究が進められてきた[159,160]。しかしながら、第 2 章第 1 節で述べたようにタウリンによる TXNIP 発現誘導に ChoRE は関与しなかったこと、また遺伝子導入による TXNIP の強発現がグルコースの吸収を抑制すること[123]から、TXNIP を誘導する化合物やその転写制御機構が異なっても、同じ TXNIP を誘導することでグルコース吸収抑制という共通の生理機能が発揮されると考えられた。

第 1 章第 1 節において見出されたタウリンによる GLUT1 および GLUT3 の mRNA 発現の抑制 (Table 1-1-11) は、タウリンによるグルコース取り込み活性抑制作用の一因だと考えられる。一方で、TXNIP のノックダウンによりグルコース取り込み活性の低下が完全に抑制されたこと (Fig. 3-2) から、TXNIP のグ

ルコース吸収抑制機構として GLUT1 及び GLUT3 を mRNA レベルで抑制していることが推察される。また、TXNIP は核内にのみ発現がみられると報告されている[52,161]ため、TXNIP が転写レベルで GLUT1、GLUT3 mRNA を制御している可能性も考えられる。実際にはその検証のために、Caco-2 細胞における TXNIP の局在や、TXNIP のノックダウンによりタウリンによる GLUT1 および GLUT3 の mRNA 発現抑制が解除されるか検討する必要がある。

TXNIP ノックアウトマウスにおいて AMPK の活性が抑制されること[56]、また TXNIP は mTOR シグナル経路を抑制し[162]、mTOR 経路は一般的に AMPK によって抑制される[163]ことから、TXNIP が AMPK の活性化に関与している可能性が考えられる。そこで、本研究において TXNIP 発現を亢進するタウリンが AMPK の活性化を誘導しているか検討したところ、添加したタウリンの濃度依存的に AMPK の活性が上昇した (Fig. 3-3)。AMPK は通常エネルギー不足時 (AMP/ATP 比または ADP/ATP 比の上昇時) に活性化され、同化を抑制し異化を促進することで ATP の維持、合成を誘導する[164]。具体的なエネルギー不足としてグルコース欠乏や、代謝毒、筋収縮などによる ATP の消費などが挙げられる。またエネルギー不足に限らず、抗糖尿病薬 (メトホルミン、フェンホルミン) などの薬物、レスベラトロールやエピガロカテキンガレートなどの植物成分といった外来物質によっても AMPK は活性化される。本研究においてタウリンが AMPK を活性化したことから、タウリンが ATP の維持や合成を促進している可能性が考えられた。そのため、タウリンが細胞内 ATP 量に及ぼす影響を調べたところ、タウリン 100 mM 添加により有意な細胞内 ATP 量の増加がみられた (Fig. 3-4)。このことから、タウリンは TXNIP を誘導することによって AMPK を活性化し、細胞内 ATP 量を増加させる可能性が考えられた。一方で、タウリンはミトコンドリアタンパク質をコードした tRNA のウリジンと結合して、ミトコンドリアにおけるタンパク質の合成を安定化しており ATP 産生の効率化につながる[165]と報告されているため、それにより ATP 産生量の増加につながることも考えられる。しかしながらタウリンのウリジン修飾に関しては、内因性のタウリンが恒常的にウリジンに結合しており定常状態における正常な

タンパク質合成に必須であるといわれているため、本研究のような外因性のタウリンが作用するとは考えにくい。タウリンによる細胞内 ATP 量の増加は AMPK 活性化によるものだと考えられる。

タウリンによる TXNIP 発現誘導を介したグルコース吸収の抑制と AMPK 活性との関連性について考察する。グルコース吸収抑制により細胞内のグルコース量は減少しているため、エネルギー不足が生じている可能性が考えられる。AMPK はグルコース不足といったエネルギー不足により活性化する[164]ため、タウリンが TXNIP の発現を誘導してグルコースの吸収を抑制した結果、AMPK が活性化され細胞内 ATP 量が増加するという一連の流れが成立する。栄養源であるグルコースの吸収を抑制することは、タウリンが細胞に貧栄養というストレスをもたらしてしまうが、細胞内 ATP 量を増加させるためのプロセスと考えれば生理的意義として妥当な生理作用である。この仮説を検証するためには、グルコース不足時に AMPK が活性化するための条件である、AMP/ATP 比や ADP/ATP 比の増加[166]が Caco-2 細胞においても生じているか調べる必要がある。なお、タウリンによるグルコース吸収抑制が細胞に貧栄養をもたらすという点については、AMPK 活性化によりグルコーストランスポーターである GLUT1 や GLUT4[167]、SGLT1[168]の細胞膜への移行が生じグルコースの吸収が亢進するため、タウリンによるグルコース吸収抑制は一過性のものであり恒常性は維持されると思われる。

TXNIP はチオレドキシシンと相互作用しその活性を抑制する[43,44]ことから、タウリンがチオレドキシシン活性に及ぼす影響を検討したところ、タウリン 100 mM 添加によりチオレドキシシン活性の有意な抑制がみられた (Fig. 3-5)。TXNIP を誘導することにより抗酸化力を持つチオレドキシシンの活性が抑制されるため、活性酸素種 (ROS) が増加すると報告されている[120,169,170]。そのため、タウリンが TXNIP を誘導することで ROS を産生する可能性が考えられた。しかしながらタウリン自身は抗酸化作用を有しているため[15-18]、タウリンによる ROS の産生については実際に検討する必要がある。

TXNIPはチオレドキシンの相互作用において247番目のCys残基が重要とされており、その変異体はチオレドキシンの結合しない[171]。TXNIPのグルコース取り込み抑制作用に関しては、変異体においてもみられること[52]からチオレドキシンの相互作用することが重要ではなく、さらにチオレドキシンの活性の低下によって誘導される機能ではないと考えられる。そのため、タウリンがTXNIP発現を誘導することによって生じるグルコース取り込み抑制作用とチオレドキシンの抑制作用は独立した機能であることが示唆される。

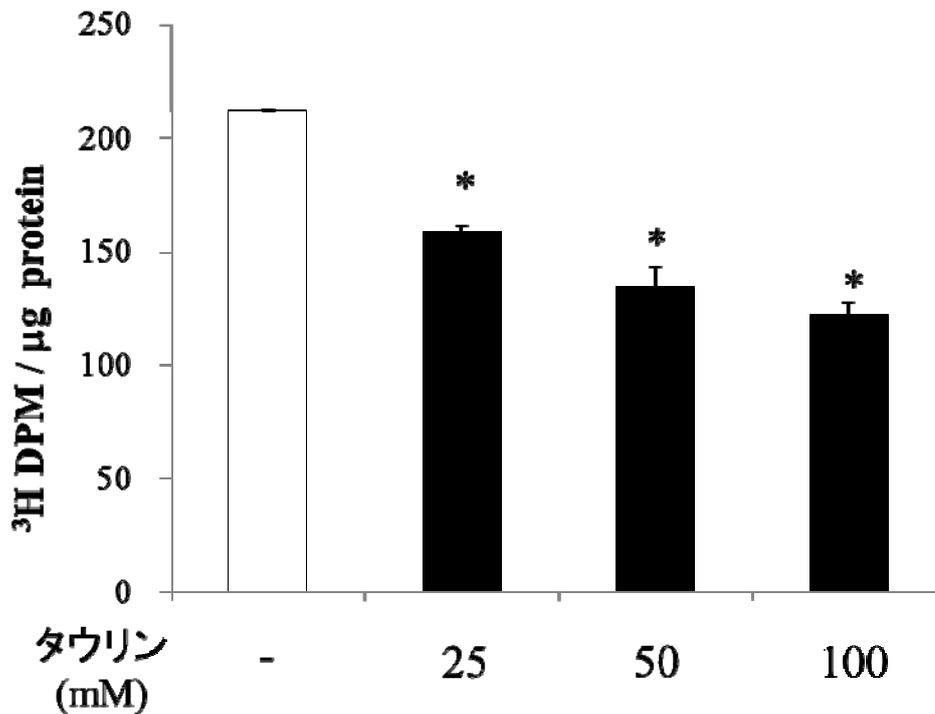


Fig. 3-1 タウリンがグルコース取り込み活性に与える影響

Caco-2細胞をタウリン5、10、25、50、100 mMを含む培地中で培養し、48時間後に ^3H で標識したグルコースの取り込み量を液体シンチレーションカウンターで測定した。取りこんだ放射線量について、同一の細胞を別のプレートに播いて処理し測定したタンパク質量の各群の平均値で割ることで、 $1 \mu\text{g}$ あたりのグルコース取り込み量で表した。

各値は平均 \pm S.E. 各群 $n=3$ 、 $p<0.05$ (Dunnett's test)

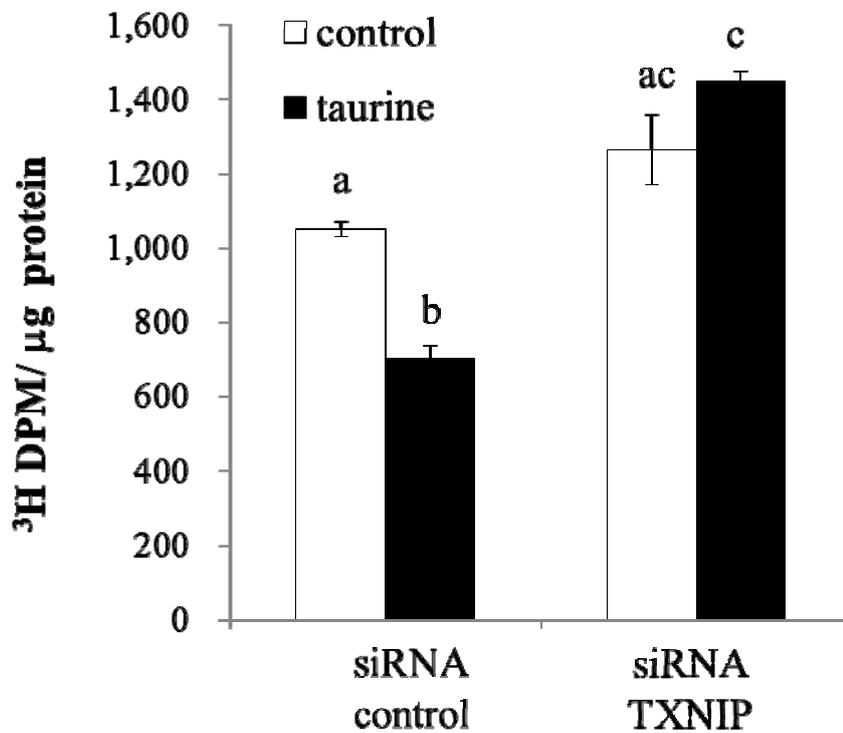


Fig. 3-2 タウリンによるグルコース吸収の抑制におけるTXNIPの関与

TXNIPをノックダウンしたCaco-2細胞を、タウリン100 mMを含む培地中で培養し、48時間後に ^3H で標識したグルコースの取り込み量を液体シンチレーションカウンターで測定した。取りこんだ放射線量について、同一の細胞を別のプレートに播いて処理し測定したタンパク質量の各群の平均値で割ることで、1 μg あたりのグルコース取り込み量で表した。各値は平均 \pm S.E. 各群n=3、 $p<0.05$ (Tukey's test)

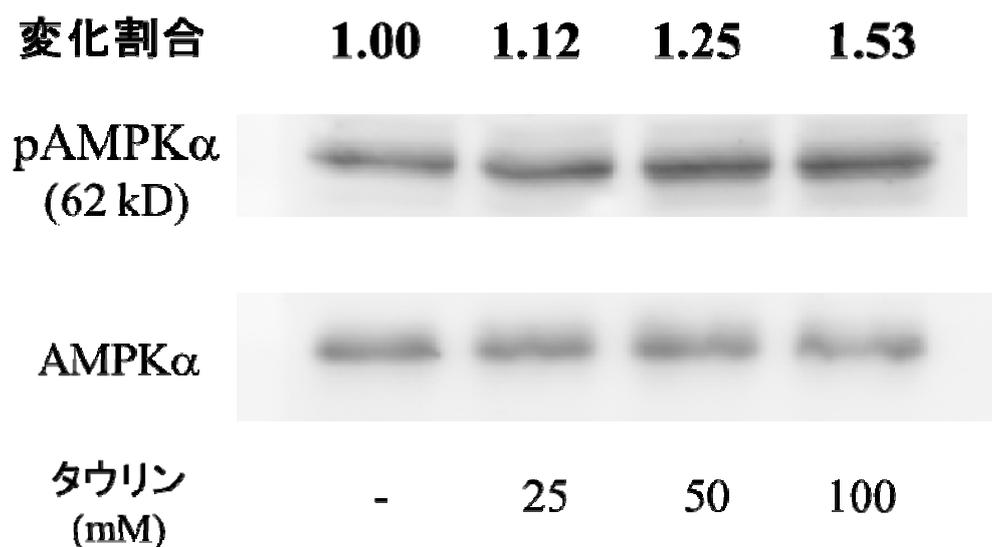


Fig. 3-3 タウリンがAMPKの活性に及ぼす影響

Caco-2細胞をタウリン25、50、100 mMを含む培地中で培養し、48時間後の細胞を回収し、western blottingによりpAMPKおよび内部標準としてAMPKの発現量をそれぞれ定量した。pAMPKについては50 μ g分のタンパク質量を、AMPKについては10 μ g分のタンパク質量をSDS-PAGEに供した。変化割合はコントロールにおける値を1とした相対値で表記した。

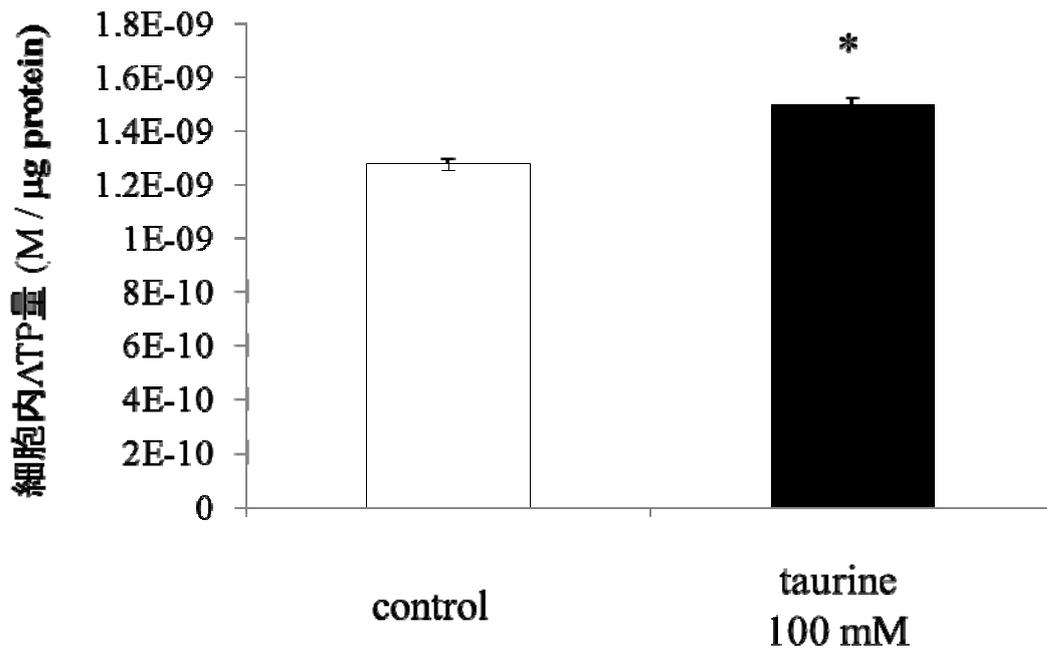


Fig. 3-4 タウリンがATP産生に及ぼす影響

タウリン100 mMを含む培地に交換して72時間後の細胞を回収し、ATP産生量を測定した。産生量は細胞のタンパク質量で補正し、1 μgあたりの濃度で示した。

各値は平均±S.E. 各群n=3、p<0.05 (Student's *t*-test)

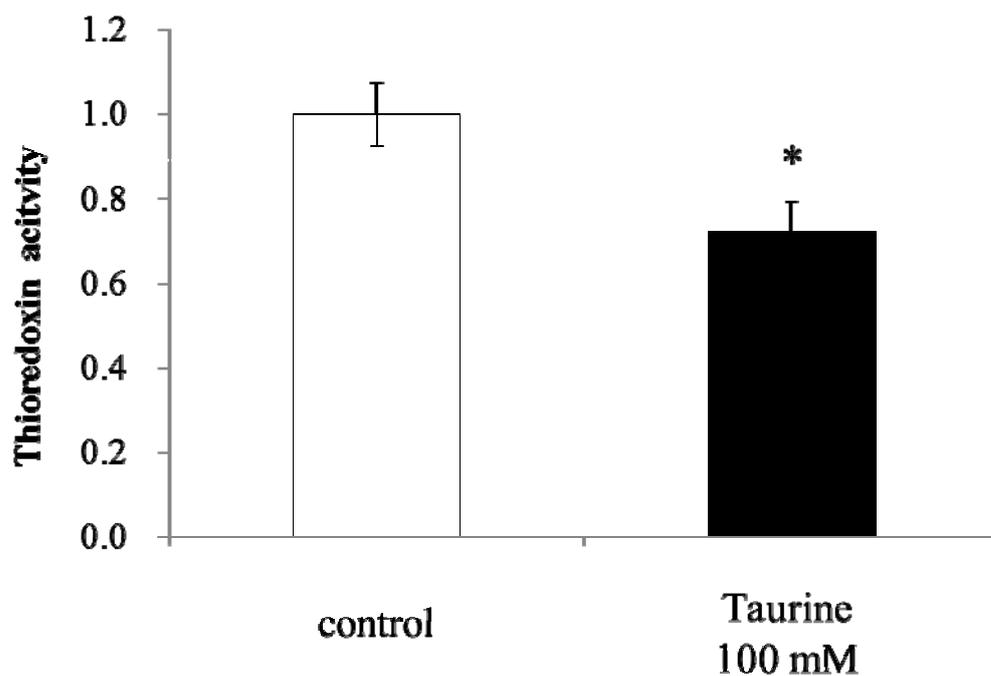


Fig. 3-5 タウリンがチオレドキシシン活性に及ぼす影響

Caco-2細胞をタウリン 100 mMを含んだ培地に交換し、72時間後に細胞を回収し、チオレドキシシン活性を測定した。結果はコントロールにおける値を1とした相対値で表記した。

各値は平均±S.E. 各群n=3、 $p < 0.05$ (Student's *t*-test)

補章

タウリン結合タンパク質の探索

1. 緒言

ヒトゲノムの解析が完了した現在、低分子化合物を利用して生体内のタンパク質の機能やそれが関与する生体反応の制御機構及びネットワークを研究する概念として、化学的観点から生命現象を解明するケミカルバイオロジーが注目されている。この学問は、低分子化合物を用いて生体内で起こる表現型を解析し、その作用機構及び標的タンパク質が関わる生体制御やネットワークを解明するものであり、医薬品などを中心にしてその解析がおこなわれている。一方、タウリンは腸管上皮細胞において遺伝子発現を制御していることから、腸管上皮細胞にはタウリン濃度変化を認識する分子の存在が考えられる。そのためケミカルバイオロジーの概念を食品成分であるタウリンの受容・認識機構解明に応用して、腸管上皮細胞におけるタウリンの標的タンパク質を同定し、十分な研究がおこなわれていないタウリンの分子レベルでの詳細な作用機序を解明しようとした。

本章の内容は、東京工業大学 半田宏研究室で開発された FG ビーズを用いたアフィニティ製法を用いて進めたタウリン結合タンパク質の探索に関わるものである。FG ビーズはフェライトを芯に持ち、表面をポリグリシジルメタクリレート (polyglycizyl methacrylate: GMA) で覆われた粒径約 200 nm のナノ磁性ビーズであり、① 粒径が小さいので単位容積あたりの表面積が大きく、多量のリガンドを固定できる、② 非特異的吸着がほとんどない、③ 分散性・可動性なのでリガンドと標的物質との結合・再結合頻度が高まり、リガンドの標的物質を高効率、かつ高純度に単離できる、などの優れた特徴を持っている。このビーズを用いることにより、低分子化合物をリガンドとする目的タンパク質を少量で、迅速・簡便に見つけることが可能である。これまでに当研究室の Ishimoto らによって、腸管上皮モデル細胞である Caco-2 細胞のライセート中のタウリン結合タンパク質の探索がおこなわれ、候補分子として 1 つのタンパ

ク質 (protein taurine-binding-protein (TBP) : 仮称) が見出された。

本章では、タンパク質 protein TBP について大腸菌組み換えタンパク質を作製し、精製したタンパク質とタウリンとの結合の確認をおこなった。

2. 実験材料

(1) 試薬類の購入

Glutathione Sepharose 4B は GE healthcare より購入した。

(2) 試薬類の調製

① Isopropyl- β -D(-)-thiogalactopyranoside (IPTG) 1 M 溶液 : Milli-Q 水に溶かした 1 M IPTG 溶液を 0.20 μ m のろ過滅菌装置を通すことによって調製した。

② TNE buffer : 第 1 章第 2 節参照

③ glutathione elution buffer : 10 mM 還元型 glutathione、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

④ 100 mM binding buffer : 10 mM Tris-HCl (pH8.0)、10% Glycerol、50 mM NaCl、0.1 mM EDTA、0.1% NP-40、1 mM DTT、0.5 mM PMSF (DTT と PMSF は使用直前に添加)

⑤ elution buffer : 10 mM Tris-HCl (pH8.0)、10% Glycerol、1M NaCl、0.1 mM EDTA、0.1% NP-40、1 mM DTT、0.5 mM PMSF (DTT と PMSF は使用直前に添加)

⑥ CBB 染色液 : CBB R-250 2.5 g、メタノール 500 ml、酢酸 100 ml、滅菌水 400 ml

⑦ 2 \times Loading buffer : 第 1 章第 2 節参照

⑧ 固定液 1 : メタノール 25 ml、酢酸 2.5 ml、Milli-Q 水 22.5 ml

⑨ 固定液 2 : メタノール 25 ml、Milli-Q 水 25 ml

(2) 実験器具、機器

攪拌機 (小型ロータリーミキサー) Rotary Mixer NRC-20D は日伸理化より購入した。

3. 実験方法

(1) protein TBP の大腸菌組み換えタンパク質の作製

① タウリン結合タンパク質候補の発現

protein TBP のコーディング領域を含む大腸菌発現ベクター pGEX 6P-1-protein TBP については東京工業大学 半田宏研究室より御供与頂いた。このベクターをコンピテントセル TG1 (大腸菌 K-12 由来株) に形質転換し、アンピシリンプレートに播いた。翌日生えてきたコロニーを採取し、坂口フラスコ 300 ml×2 に植菌した。OD₆₀₀=0.5 になったら IPTG を終濃度 1 mM になるように加え、一晩培養させた。

② タウリン結合タンパク質候補の精製

ペレットを回収し、TNE buffer を入れて懸濁した。その後、1 分おきに超音波破碎を計 5 回おこない細胞膜を破碎した。15,000 rpm で 10 分遠心し、上清を回収した。上清に、あらかじめ 10 倍量の PBS で洗浄しさらに等量の PBS を加えた 50% Glutathione Sepharose 4B 400 μl を入れ、1 時間回転攪拌 (6 rpm) させた。その後、1,500 rpm で 2 分遠心して Sepharose を回収し、PBS 500 μl を加えて懸濁し洗浄した。この洗浄作業は 4 回おこなった。そして、250 μl の glutathione elution buffer を加え、10 分回転攪拌 (6 rpm) させた。この作業を 2 回おこなうことで、500 μl の elution buffer に回収した。なお、検出は SDS-PAGE を経て CBB 染色によりおこなった。

③ SDS-PAGE : 第 1 章第 2 節参照

④ CBB 染色

SDS-PAGE のゲルを CBB 染色液に浸して 20 分振盪した。その後ゲルを、キムワイプを入れておいた熱湯に浸し振盪することで脱色をおこなった。脱色において適宜キムワイプと熱湯は交換し、十分脱色するまで繰り返した。

(2) タウリン固定化 FG ビーズの作成 (Fig. 4-1)

① カルボン酸型 FG ビーズの大量製造

2 ml のエッペンチューブに FG 粒子 10 mg をとり、500 μ l の MilliQ 水を加え懸濁し 15,000 rpm, 室温, 5 min 遠心後上清を除去することで洗浄した。同様に MilliQ 水で 2 回、N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) で 5 回洗浄した後、DMF 300 μ l に懸濁し、トリエチルアミン 100 μ l、500 mM 無水コハク酸 600 μ l を添加し、遮光条件下室温で 24 時間反応させた。その後、DMF で洗浄後、430 μ l の DMF に懸濁し、Et₃N 50 μ l、無水酢酸 20 μ l 添加し、室温で 2 時間振とうした。MilliQ 水で 2 回洗浄後、450 μ l の MilliQ 水に懸濁し、1N NaOH 50 μ l を添加して室温で 30 分間振とうした。MilliQ 水で 5 回洗浄後、MilliQ 水 500 μ l に懸濁して 4°C で保存した。

② カルボン酸型 FG ビーズへのタウリンの固定化法

2 ml のエッペンチューブにカルボン酸型 FG ビーズ 1 mg (50 μ l、20 mg/ml) をとり、遠心・上清の除去という操作を繰り返してメタノールと MilliQ 水を任意の比率で混合した溶液 (メタノールと MilliQ 水の比率は反応に使用するタウリンストック溶液における比率に準ずる) で 3 回洗浄した。ここにあらかじめ MilliQ 水で 500 mM に調製したタウリン溶液 (タウリンストック溶液、pH9.0) をメタノールで 0、100 mM、250 mM 各濃度に希釈した溶液を 500 μ l 添加し、さらにカルボキシアミド合成用カップリング剤である 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride

(DMT-MM) 27.7 mg (終濃度 0.2 M) を粉末のまま加え、室温で 72 時間振とうし、ビーズのカルボキシル基とタウリンのアミノ基を反応させた。15,000 rpm で 5 min 遠心し、上清を回収後、1 M エタノールアミン (溶媒: メタノール) 500 μ l を添加し、さらに DMT-MM 27.7 mg (終濃度 0.2 M) を粉末のまま加え、引き続き室温で 72 時間振とうすることで未反応のカルボキシル基をマスクした。遠心して上清を回収し、ビーズを MilliQ 水で 5 回洗浄後、MilliQ 水 200 μ l で懸濁、4°C 遮光条件で保存した。

(3) protein TBP のタウリン固定化 FG ビーズへの結合 (Fig. 4-2)

① protein TBP とタウリン固定化 FG ビーズの反応および溶出

タウリン固定化ビーズ(40 μ l、5 mg/ml)を 1.5 ml チューブに 0.2 mg とり、100 mM binding buffer 200 μ l を加え懸濁後、磁石でビーズを集めて上清を取り除いた。この操作をもう一度繰り返し洗浄したビーズに、先程の binding buffer と glutathione 以外は同様の組成になるように調製した任意のタンパク質量を含むタンパク質溶液を 200 μ l 加えて、粒子を再分散させた。これを、ローテーターを用いて 4°C、4 時間回転攪拌 (6 rpm) させ、タウリン固定化ビーズと細胞抽出液を反応させた。

このビーズを磁石で集めて上清を取り除いた後、200 μ l の 100mM binding buffer を用い、再分散・磁石によるビーズの回収・上清の除去という操作を 3 回繰り返し、非特異的結合タンパク質の除去、ビーズの洗浄をおこなった。

次に、ビーズの表面に特異的に結合していると考えられるタンパク質を溶出するために、以下の操作をおこなった。

* 塩溶出

洗浄したビーズに 30 μ l の elution buffer を加え、ビーズを再分散させた後 10 分間氷上で放置した。磁石でビーズを集めた後上清を回収し、これを塩によるタンパク質溶出画分 (塩溶出) とした。

* 界面活性剤による溶出

塩による溶出をおこなった後、30 μ l の 1× Loading buffer を加え、ビーズを再分散させた。その後、98°C で 5 分間煮沸し 15,000 rpm、5 分間、室温で遠心分離した後、上清を回収し、これを界面活性剤によるタンパク質溶出画分 (SDS 溶出) とした。

以上のように溶出させたタンパク質溶出画分を各々 9 μ l ずつとり、2× Loading バッファ 9 μ l を加えた後、98°C で 5 分間加熱して変性させ SDS-PAGE をおこなった。検出は銀染色法を用いた。

② SDS-PAGE : 第 1 章第 2 節参照

③ 銀染色法

銀染色は Silver Stain MS Kit (Wako) を用いておこなった。SDS-PAGE のゲルを固定液 1 で 20 分 (または一晩) 振盪した。20 分後、固定液 2 に浸して 10 分浸透した。10 分後、Milli-Q 水で 10 分浸透した。その後、増感液 (原液を Milli-Q 水で 10 倍希釈) で 1 分振盪し、Milli-Q 水で 1 分振盪、再び Milli-Q 水で 1 分浸透した。さらに、37°C のウォーターバスで温めておいた染色液 (原液を 10 倍希釈) に浸し、20 分浸透した。20 分後 Milli-Q 水で 1 分振盪を 2 回おこなった後、同様に温めておいた現像液 (1% 現像粉末、溶媒は現像原液を 10 倍希釈したもの) に浸しバンドが見えるまで振盪した。バンドが見えたら停止液を加え、1 分振盪した。

4. 結果

4-1 ヒト protein TBP の発現・精製

腸管上皮 Caco-2 細胞におけるタウリン結合タンパク質候補である protein TBP について大腸菌 TG1 を用いて発現・精製をおこなった。glutathion-S-transferase (GST) タグを持つ pGEX ベクターにより発現させて、タグである GST の基質であるグルタチオンを、エポキシ結合を介して結合させ

た Sepharose 4B を用いて精製した。精製後の CBB 染色の結果、protein TBP の目的分子量位置にバンドが検出された (Fig 4-3、分子量非公開)。

4-2 protein TBP のタウリン固定化 FG ビーズへの結合

タウリン固定化 FG ビーズと精製した protein TBP との結合を確認したところ、塩溶出・SDS 溶出いずれにおいても、タウリン非固定化ビーズ (NC) ではバンドが確認されず、タウリン固定化ビーズ (taurine) のみにおいて精製された protein TBP と同じ分子量位置に、総タンパク質量依存的にバンドが確認された (Fig 4-4)。このことから、protein TBP はタウリンと結合することが示唆された。

5. 考察

これまでタウリンの受容体としては、脳神経において GABA_A 受容体 [112,113,172]、グリシン受容体 [112,173] のアゴニストとして結合することが報告されているが、GABA_A やグリシンに比べて受容体との結合親和性は弱い。また、脳神経以外の組織において、これらの受容体と結合しているという報告はなされていない。また、タウリンは腸管上皮細胞において TAUT の発現調節に寄与しているが、GABA やグリシンは TAUT の発現調節に寄与していない [102]。このことからタウリンは GABA_A 受容体やグリシン受容体とは違った分子に結合していることが考えられる。本実験では、タウリンの構造類似体であるβ-アラニンとは結合しないタンパク質を抽出するために、タウリンのアミノ基部分を固定化 FG ビーズと結合させており、β-アラニンと異なっている硫酸基部分がビーズに対して外側を向いている構造をとっている (Fig. 4-1)。さらに、Caco-2 細胞のライセートからのタウリン結合タンパク質候補の抽出は通常のプロトコールでは検出が困難であるため、drug elution、competition assay という 2 種類の戦略をおこなうことでタウリン特異的に結合するタンパク質が見出された。drug elution は、塩溶出の buffer に過剰量のタウリンを溶解させておくことで、塩溶出の際にタウリン結合タンパク質をより高濃度に存在する buffer 側のタウリンに結合させやすくし、タウリン結合タンパク質をより多く溶出させること

で、検出バンドを濃くする方法である。一方で、**competition assay** は Caco-2 細胞のライセート中に過剰量のタウリンを溶解させておくことでビーズへの結合を抑え、ライセートのみの場合と比較してタウリン結合タンパク質のバンドが薄くなることを利用した方法である。このようにタウリン結合 **FG** ビーズを用いること、溶出過程を工夫することで、タウリン特異的に結合するタンパク質の抽出が可能となる。このようにして Caco-2 細胞におけるタウリン結合タンパク質の探索をおこない、候補として **protein TBP** が見出された。

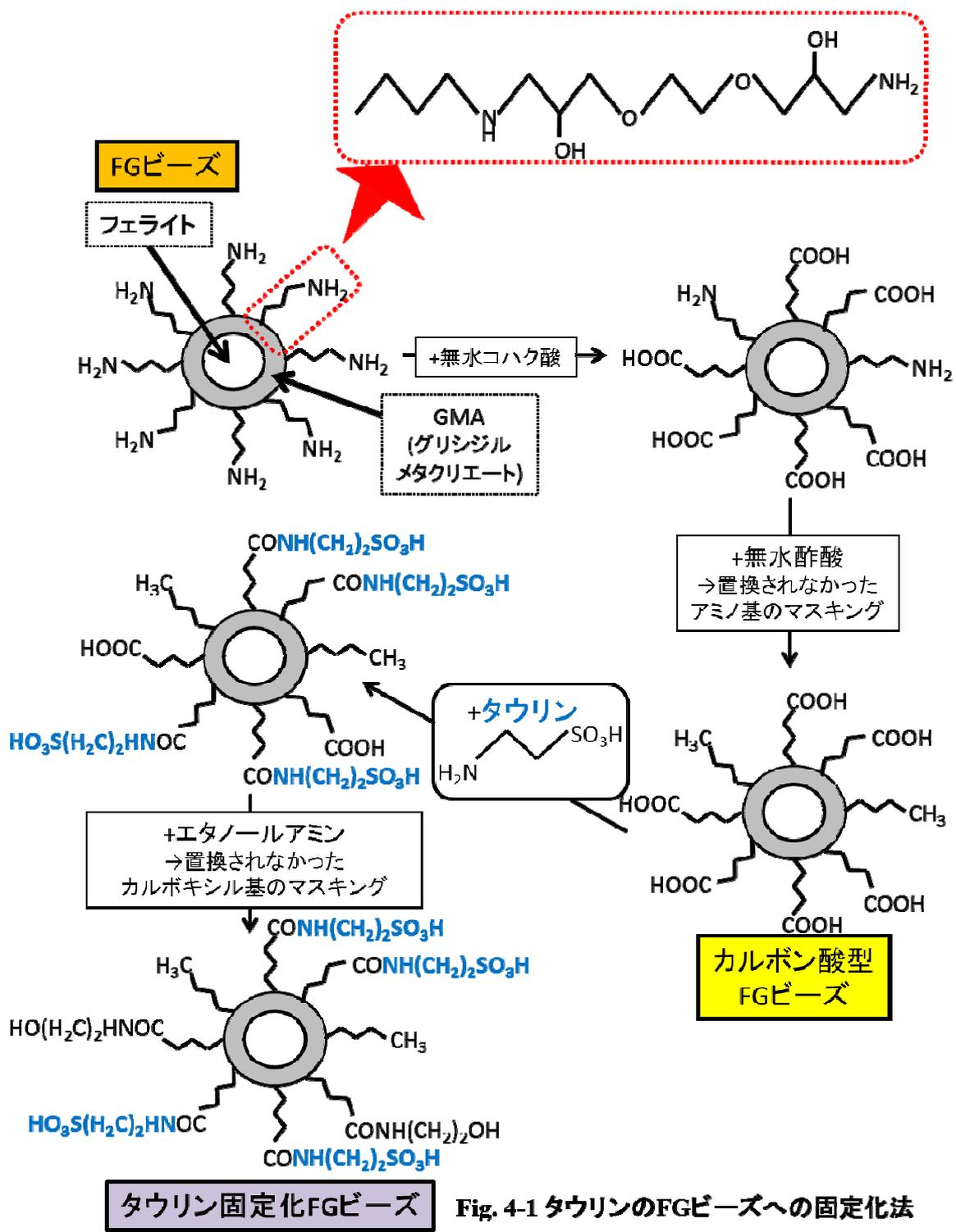
なお、本実験は東京工業大学 半田宏研究室との共同研究によりおこなわれたものであり、共同研究により **protein TBP** についてはタンパク質名や参考文献を記載できないことをご容赦いただきたい。

本章では、まず **protein TBP** の大腸菌組み換えタンパク質を発現し、精製した。その確認のために **CBB** 染色を用いて溶液中のタンパク質を検出したところ、目的位置にバンドを得ることができた (**Fig 4-3**)。目的バンドよりも下位に **protein TBP** 分解物または大腸菌由来成分などの不純物と思われるバンドが見られるが、本研究で用いている **FG** ビーズは非特異的吸着がほとんどなく、高純度に単離できる優れた特徴をもっているため、ある程度の不純物が存在していても問題ないと考えられる。

そこで、この **protein TBP** 精製溶液をタウリン固定化 **FG** ビーズと反応することでタウリンとの結合確認をおこなった。その結果、塩溶出、**SDS** 溶出いずれにおいてもタウリン固定化ビーズのみで結合が見られた (**Fig. 4-4**)。このことから **protein TBP** はタウリンに結合することが示唆された。また、塩溶出よりも **SDS** 溶出の方で濃いバンドが確認された。一般的に塩溶出はタウリンと親水的な結合タンパク質が溶出され、**SDS** 溶出では疎水的な結合や強い結合力(共有結合など)を持つタンパク質が溶出される。そのため、タウリンと **protein TBP** の結合様式は疎水的結合、もしくは共有結合などの強い結合である可能性が高いが、実際には結合親和性を測定する必要がある。

本章の結果 **protein TBP** がタウリン結合タンパク質の有力な候補であることが示された。**protein TBP** がタウリンと結合する意義として、タウリンのどのような生理機能に関与しているか明らかにする必要がある。そこで、その一手段

として、タウリンによる遺伝子発現変化に protein TBP が関与しているか protein TBP の siRNA を用いてその影響を検討することとした。第 3 章と同様の手法でノックダウンをおこない、タウリンによって発現変化がみられた遺伝子のうち、TXNIP、SLC24A1 (Table 1-1-2) 、TAUT (Table. 1-1-3) について、Real time RT-PCR により protein TBP ノックダウン下でのタウリンによる遺伝子発現変化を検討した。しかしながら、いずれの遺伝子においても protein TBP siRNA 添加群におけるタウリンによる遺伝子発現変化は、siRNA negative control 群と比べて有意な差はみられなかった (データ省略)。このことから protein TBP は TXNIP、SLC24A1 および TAUT の遺伝子発現機構に関与していないことが示唆された。なお、DNA マイクロアレイに供した Caco-2 細胞は分化させたものを用いており、siRNA によるノックダウンは未分化 Caco-2 細胞を用いなければならず、分化細胞ではみられた発現変化が未分化細胞ではみられないような遺伝子も多く、それらについては検討できなかった。今後、未分化 Caco-2 細胞でもタウリンによる発現変化がみられる他の遺伝子について protein TBP の関与を検討する予定である。また、分化 Caco-2 細胞でのみみられるタウリンの遺伝子発現変化への protein TBP の影響を検討するために、レンチウイルスの実験系を用いて shRNA を作製して遺伝子導入することも必要である。さらに、遺伝子発現変化に留まらず腸管上皮細胞におけるタウリンの抗炎症作用[41]、および Caco-2 細胞傷害の回復作用[41]などについても protein TBP の関与の有無を検討したい。そして、いずれかにおいて protein TBP との関与がみられた場合、protein TBP がタウリン受容体であることを証明できる。



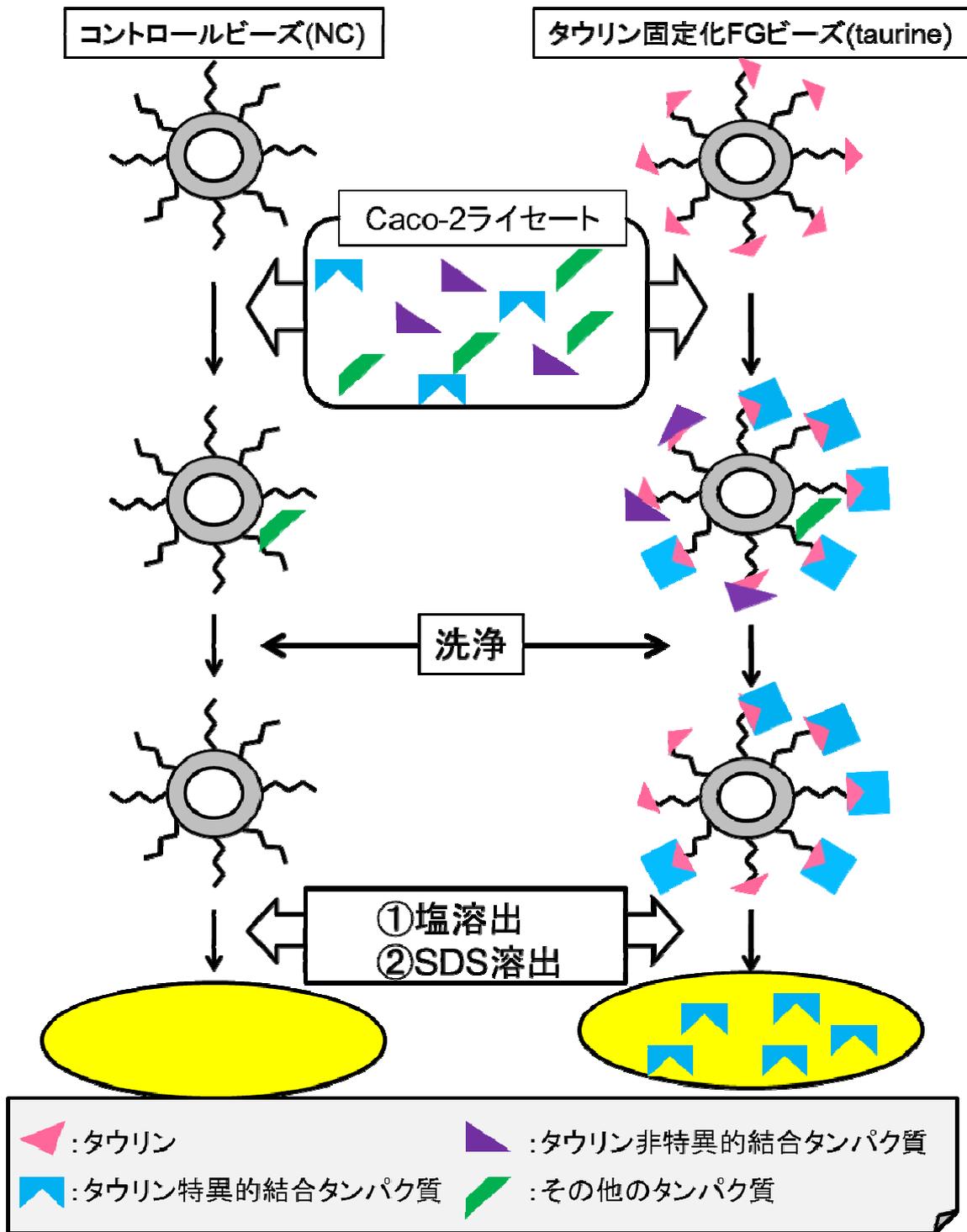


Fig. 4-2 タウリン結合タンパク質抽出法の概念図

protein TBP



Fig. 4-3 protein TBPの大腸菌リコンビナントの発現・精製

protein TBPを大腸菌により発現させ、Glutathione-Sepharose 4Bを用いて精製した。得られた2 x Loading bufferで希釈したelution buffer 20 μ lをSDS-PAGEに供した。検出はCBB染色によりおこなった。

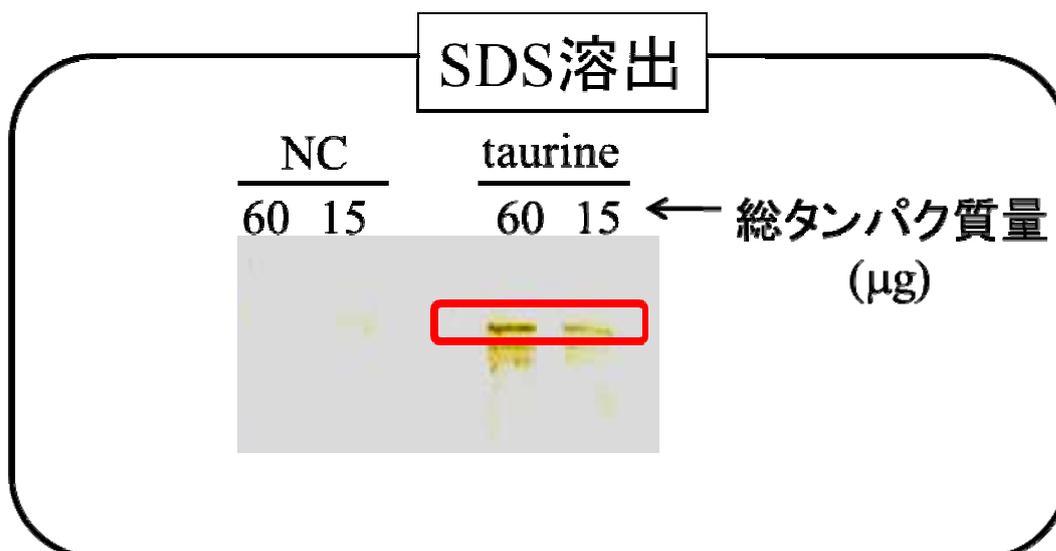
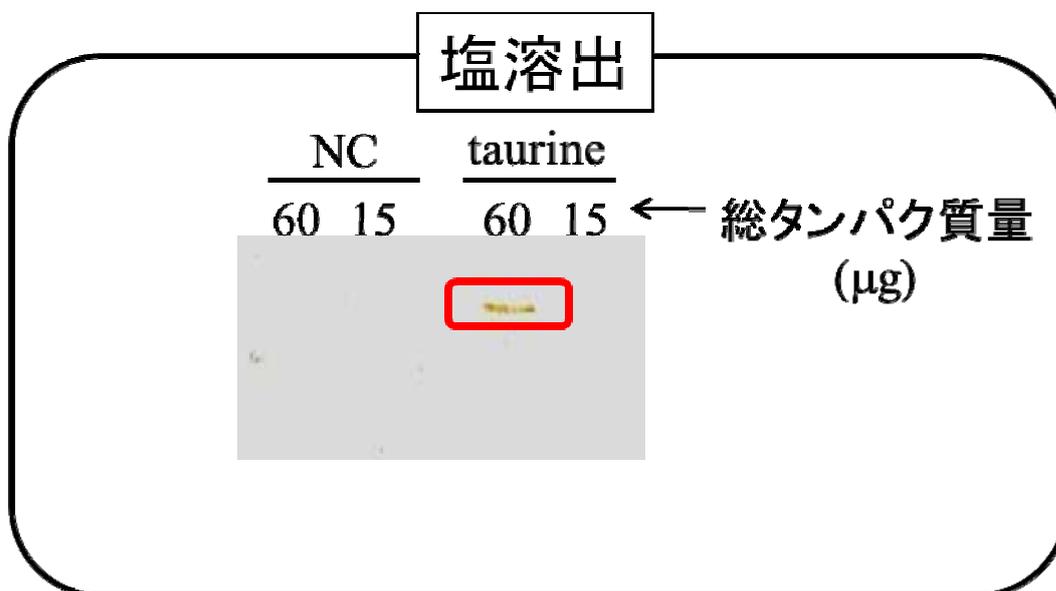


Fig. 4-4 protein TBPのタウリン固定化ビーズへの結合

protein TBPの大腸菌組み換えタンパク質をコントロールFGビーズ(NC)とタウリン固定化FGビーズ(taurine)に反応させた後、塩溶出とSDS溶出をおこない、それぞれ表記の総タンパク質量に相当する液量をSDS-PAGEに供した。検出は銀染色法によりおこなった。

総合討論

(0) 本研究の総括 (Fig. 5-1)

本研究では、タウリンが細胞に与える作用の遺伝子・分子レベルでの解析のために、腸管上皮 Caco-2 細胞における遺伝子発現変化という視点から研究を進めた。第 1 章では、DNA マイクロアレイによりタウリンが Caco-2 細胞において TXNIP の mRNA 発現を顕著に亢進することを見出した。さらにタウリンの TXNIP 発現誘導に関する特性の解析を進めることで、タウリンによる TXNIP 発現制御は構造的、機能的に類似しているβ-アラニンや GABA ではみられない特異性の高いものであることが明らかとなった。さらに、TXNIP 発現誘導のためには高濃度のタウリンが必要であり、タウリンは TAUT を介して細胞内に取り込まれた後、細胞内受容体により認識されている可能性が考えられた。その受容体は明らかになっていないものの、第 2 章におけるタウリンによる TXNIP 発現亢進機構の解析から、タウリンは ERK-MAPK シグナル伝達経路を介して TXNIP プロモーター領域の+162 / +218 に存在する遺伝子配列に転写因子が結合することで、転写レベルで mRNA 発現を誘導していることが示唆された。また、TXNIP を転写レベルで誘導する他の化合物とは異なる新規な制御機構で誘導していることも明らかとなった。このようにして誘導された TXNIP はエネルギー代謝や redox 制御に影響を与え、前者はグルコースの吸収抑制、また AMPK の活性化に伴う細胞内 ATP 量の増加、後者はチオレドキシン活性の抑制といった生理機能を発揮していることが示唆された。

本研究を総括した上で、総合討論では、(1) タウリンの濃度 (25-100 mM) が非現実的ではないか、(2) ERK 経路の上流、下流のシグナルはどのようになっているのか、(3) *in vivo* においてタウリンによる TXNIP の発現が亢進されるか、(4) 腸管上皮細胞において報告されているタウリンの抗炎症作用に TXNIP が関与しているか、(5) タウリンが TXNIP の発現を亢進することによって発揮する 3 つの生理機能の意義、(6) グルコース吸収における Caco-2 細胞の捉え方、(7) 今後の展望について、それぞれ考察していきたい。

(1) 添加したタウリンの濃度について

タウリンによる TXNIP 発現誘導には少なくとも 25 mM 以上の濃度である必要があり、その時の細胞内のタウリン濃度に関しては24時間後において 350 μ M である (Fig. 1-2-1, Fig. 1-2-6)。このように高濃度のタウリンが必要であるが、他の研究においてもタウリンの生理作用がみられるのは mM 単位であるものが多い。網膜上皮細胞においてはカテコールアミンにより誘導された細胞損傷を 10、20 mM の濃度で抑制し[174]、新生児ラット心筋細胞においては 20 mM の濃度で[175]、交感神経細胞 PC-12 細胞においては 60 mM、80 mM で[154]それぞれ抗アポトーシス作用を示す、というように他のタウリンに関する研究例と比べて本研究で用いた濃度が特に高濃度であるとは言えない。また、栄養ドリンク剤などのサプリメントにタウリンは高濃度含まれており、その濃度は 240 mM に達するものもあるので、摂取した場合に胃や腸上部においては 25-100 mM 程度の濃度で到達することが考えられる。腸管上皮細胞は胃から消化されたものに直接曝されているため、本研究において Caco-2 細胞を処理したタウリン濃度は現実的だと考えられる。また、胃上皮細胞をタウリン 100 mM で処理した研究例[176]も報告されている。

高濃度のタウリンが必要である理由として、まず受容体との親和性の低さが考えられる。タウリンはグリシン受容体や GABA 受容体のリガンドとなるがその親和性が低いこと[111]から、TXNIP を誘導するための細胞内タウリン受容体となるものに対しても親和性が低いことが考えられる。さらに、タウリンは結合の親和性が低いため、細胞内の様々な分子と非特異的に結合することで、細胞内タウリン濃度に対して目的の受容体と結合する割合が低くなるという可能性も考えられる。事実タウリンは胆汁酸[28]やウリジン tRNA[165]と結合するなど、様々な分子と結合することが推察される。一方で、タウリンは最終代謝産物で安定であるため[12]、代謝や分解によって細胞内でタウリンとして存在する量が少なくなっているという可能性は考えにくい。

このように結合という点で柔軟性の高いタウリンは、親和性が低いという点で強い活性を示すとは考えにくいだが、逆に高い柔軟性ゆえに多彩な生理機能を生み出すことができると考えている。

(2) ERK-MAPK 経路の上流、下流のシグナル

タウリンによる TXNIP 発現亢進機構として ERK-MAPK 経路を介して転写レベルで TXNIP を誘導していることが明らかになったが、タウリンが ERK を活性化する機構や、ERK を活性化して転写活性を誘導するまでの機構については明らかになっていない。

ERK 経路の上流シグナルとして、Ras/Raf/MEK/ERK[177]、Ras/PKC/MEK/ERK[178]、PKC/Ras/MEK/ERK[179]、Ras および Raf を介さない PKC/MEK/ERK[180]などが報告されている。この4種類の経路のうち3つにおいて PKC 経路が関与しているため、その阻害剤である Ro318220 を用いてタウリンによる TXNIP mRNA 発現に与える影響を検討したところ、第2章第2節考察で示した rapamycin、LY294002 と同様に、タウリンではなく阻害剤のみを処理することで TXNIP mRNA 発現量が有意に増加した(データ省略)。そのためタウリンによる TXNIP mRNA 発現に PKC 経路が関与しているかについては、阻害剤の実験からでは判断できない。また Ras の阻害剤は見出されていないことから、ERK 経路の上流経路を明らかにするためにはまずタウリンが PKC と Ras を活性化するか検討する必要がある。

一方、ERK 経路の下流としてタウリンにより ERK の活性化が長く続いたことから ERK が核内に移行し転写因子を直接活性化している可能性が考えられた(第2章2節考察参照)。そのためには、タウリンによる ERK の核内移行を検討する必要がある。また、核内移行が確認された場合は ERK により活性化した転写因子が TXNIP プロモーターのアクチベーターになる可能性が高い。そのため、ERK が直接活性化する転写因子という点からもタウリンにより認識される遺伝子配列を同定することが可能となる。ERK が直接活性化する転写因子として c-Fos、Elk1、Ets1、SP-1[181]が知られており、これらの応答配列が TXNIP プロモーター領域+162/+218 中に存在するか *in silico* 解析をおこないたい。

(3) in vivo における検討

本研究において腸管上皮細胞である Caco-2 細胞においてタウリンは TXNIP の発現を亢進したが、機能性食品成分として応用されるには *in vivo* における検

討が必要である。そこで、腸管におけるタウリンの抗炎症作用が報告されている C57/BL6J マウス (6 週齢、♀) [40]を用いてタウリンが TXNIP mRNA 発現に与える影響を検討した。3 日間予備飼育後、タウリンを 4%の濃度になるように滅菌した水道水に溶かし、1 週間自由摂取させた。その後、頸椎脱臼法で屠殺し、小腸から腸管上皮細胞を精製した。そして、Real-time RT PCR 法により腸管上皮細胞におけるマウス TXNIP の mRNA 発現量を調べたが、コントロール群とタウリン投与群で有意な発現上昇はみられなかった (データ省略)。実験条件を変え、タウリンの投与期間を 2 週間に延ばしたり、タウリンをできるだけ多く摂取するために自由摂取に加えて 150 mg/kg/day のタウリン強制経口投与を 1 週間あるいは 2 週間続けたりしたが、いずれにおいても TXNIP mRNA 発現に変化はみられなかった。

考えられる原因として、まず投与期間の不適切性が考えられる。タウリンの濃度に関しては報告されている限りでの最大の濃度で設定しているため、問題があるとすれば投与期間だと考えられる。本研究より、タウリンによる TXNIP 発現誘導は一過性のものであると考えられるため、1 週間より短い期間や 2 週間より長い期間において今後条件検討を繰り返す必要がある。また、ヒトとマウス間でのプロモーター領域の相同性が低いことも理由として考えられる。ヒトとマウスでは TXNIP プロモーター領域+162/+218 の相同性が 50%であり (Fig. 5-2)、進化的保存性の高い 2 つの配列や転写因子 Tst-1 の応答配列においてもいずれも 50%程度の相同性である。「進化的保存性の高い配列」は哺乳類 46 種で比較した場合に保存度が高い配列であり、ヒトとマウスではそれほど高くないといえる。そのため、ヒトのみでみられる配列をタウリンが認識している場合、マウスにおいては mRNA 発現の亢進はみられないことになる。これらを解決するためにもプロモーター解析を進め、タウリンによって認識される遺伝子配列を同定する必要がある。

(4) タウリンの抗炎症作用と TXNIP の関連性

タウリンは腸管上皮 Caco-2 細胞において TNF- α によって亢進した炎症性ケモカインである IL-8 の産生を抑制することで抗炎症作用を示す[41]。そのため、

本研究でタウリンによる発現亢進が認められた TXNIP がこの抗炎症作用に関与しているか明らかにすることは重要である。TNF- α による IL-8 産生亢進の一機構として、nuclear factor-kappa B (NF- κ B) の活性化が知られている [182-184]。一方で、TXNIP はその強発現により TNF- α で誘導された NF- κ B の活性化を抑制する [185]。このことから、TXNIP は TNF- α で誘導された NF- κ B の活性化を抑制することで、IL-8 産生を低下する可能性が考えられる。また、タウリンは活性化された NF- κ B を抑制するという報告がある [150] ことから、タウリンの抗炎症作用には、タウリンが TXNIP の発現を誘導することによる NF- κ B の抑制が関与しているという仮説が成り立つ。

そこでその検証として、Caco-2 細胞においてタウリンが TNF- α による NF- κ B の活性化を抑制しているかを確認する必要がある。そのために、NF- κ B 応答配列を含むルシフェラーゼベクターを遺伝子導入し、ルシフェラーゼアッセイにより検討していきたい。

タウリンの抗炎症作用に関して TXNIP の関与は現在のところ見出すことができていないが、第 1 章第 2 節で述べたように臨床的な観点から TXNIP と抗炎症の関連性は示唆されている [110]。慢性炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎の患者の炎症部位である大腸粘膜における TXNIP mRNA の発現は低下しており、それが潰瘍性大腸炎発症の一因だと考えられている。(3)で述べたように *in vivo* においてタウリンが TXNIP を誘導する結果は得られていないが、今後の検討で誘導がみられた場合、潰瘍性大腸炎疾患モデルを用いてタウリンの抗炎症作用に TXNIP が関与しているか明らかにしていきたい。

(5) タウリンが TXNIP 発現誘導を介して発揮する生理機能の意義

タウリンは、TXNIP 発現を亢進することで、グルコースの吸収抑制、また AMPK の活性化に伴う細胞内 ATP 量の増加、チオレドキシン活性の抑制などの作用を発揮するが、それらがもたらす意義を考えたい。

グルコースの吸収抑制に関しては第 3 章でも述べたとおり、AMPK を活性化するために一時的に細胞を貧栄養状態にするという意義が考えられる。そして、そのようにして活性化された AMPK は細胞内 ATP 量を増加させる。ATP はエ

エネルギー源であり、ATP binding cassette (ABC) トランスポーターによる能動輸送[63]、同化、熱産生、またアクチン・ミオシンの収縮による筋収縮[186]など様々な生命活動の基本となる。

AMPK 活性化に関しては明らかとなっていないが、少なくともグルコース吸収抑制に関しては、TXNIP はチオレドキシシンと結合する必要がない[52]。しかしながら、チオレドキシシン活性の抑制にはチオレドキシシンと相互作用する必要があり、その相互作用しているという点に注目したい。TXNIP は単独で存在する場合、ユビキチンリガーゼである ITCH によってユビキチン化されプロテアソーム系により分解されてしまう[52]が、チオレドキシシンは TXNIP と相互作用することで TXNIP タンパク質を安定化させている[187]。その点でチオレドキシシンと相互作用することは重要であり、TXNIP が機能を発揮するためにはチオレドキシシンと結合することが必須である。また、TXNIP によるチオレドキシシン活性の抑制に伴う ROS の増加が懸念されるが、TXNIP はその原理上、自身が新しく ROS を産生するわけではないこと、タウリン自身が抗酸化作用を持っていること[15-18]、タウリンによる TXNIP 発現亢進も一時的なものだと考えられること（第 2 章第 2 節考察参照）という点で、ROS が増加したとしても大きな影響を及ぼすとは考えにくい。

(6) グルコース吸収における Caco-2 細胞の捉え方

Caco-2 細胞は分化させることで小腸上皮様の特徴を示すことから、腸管上皮様のモデルとして広く利用されている[35,36]。しかしながら小腸においてグルコースの供給を主に担っている SGLT1 [93,94]は Caco-2 細胞に発現しておらず、Caco-2 細胞は主に GLUT1 を介してグルコースを吸収すること[188]から、グルコースの吸収において Caco-2 細胞を小腸上皮モデルとして捉えることはできない。一方で、GLUT1 は大腸上皮細胞において発現している[94]ため、Caco-2 細胞を大腸上皮細胞として見なすことができる。ただし、大腸上皮細胞では GLUT1 の発現は基底膜側であり[94]、GLUT1 は向きの無い促進拡散型のトランスポーターであること[189]から、血中からのグルコース再吸収をタウリンが抑制することになる。

(7) 今後の展望

本研究ではニュートリゲノミクスの概念に基づき、タウリンが細胞に与える作用の遺伝子・分子レベルでの解析に取り組んだ。その結果として見出されたタウリン応答性分子 TXNIP に着目し、タウリンが細胞内に取り込まれてからシグナル伝達を経て TXNIP の発現を誘導し、TXNIP 発現制御を介したタウリンの生理機能を見出すという一連の流れを示すことが出来た。第 3 章までの考察および総合討論を踏まえた上で、今後優先的に明らかにすべきことは

①ERK シグナル経路の上流部分 (Ras、PKC の活性化)

②TXNIP プロモーター解析による転写因子応答配列、転写因子の同定

③TXNIP を介したグルコース取り込み抑制機構、AMPK 活性上昇機構

④TXNIP を介した NF- κ B の活性化 (炎症) 抑制の有無とその機構

であり、特に②について TXNIP プロモーター領域+162 / +218における deletion、mutation 解析を進めることが急務である。

TXNIP については、本研究において示した 3 つの生理作用以外にも、第 1 章第 2 節で記したような様々な組織における生理機能が報告されており、タウリンの多彩な生理作用を司る制御因子としての可能性も考えられる。未だ不明な点が多いタウリンの機能とその作用機序の解析において本研究がその一助となり、タウリンの機能性食品成分としての理解が深まることを期待しつつ、本論文を締めくくりたい。

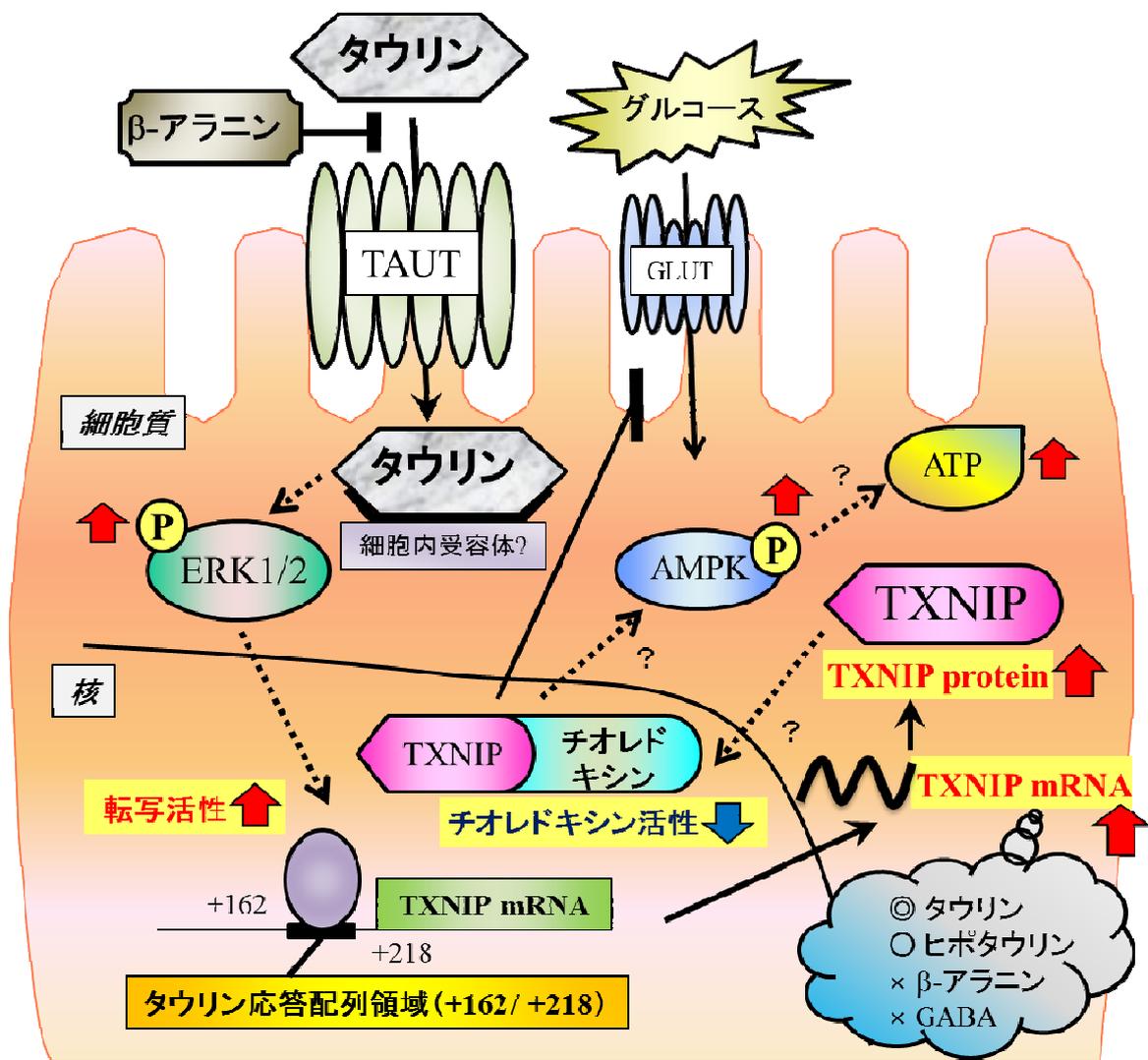
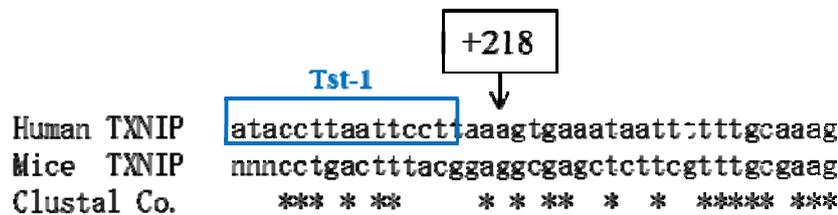
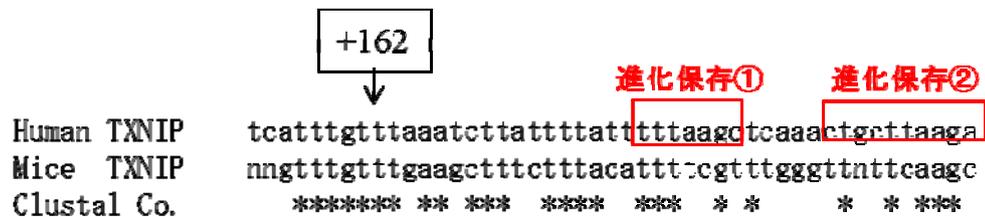


Fig. 5-1 本研究の総括



**Fig. 5-2 human TXNIPとmice TXNIPのプロモーター
+162/+218周辺の配列アラインメント**

MAFFTソフトウェアを用いたhuman TXNIPとmice TXNIPのプロモーター領域+162/+218の比較。両者の配列が一致しているものについてはその下(Clustal Consensus (Co.))に、*で示す。

参考文献

- [1] Sturman, J.A. (1993). Taurine in development. *Physiol Rev* 73, 119-47.
- [2] Rana, S.K. and Sanders, T.A. (1986). Taurine concentrations in the diet, plasma, urine and breast milk of vegans compared with omnivores. *Br J Nutr* 56, 17-27.
- [3] Laidlaw, S.A., Shultz, T.D., Cecchino, J.T. and Kopple, J.D. (1988). Plasma and urine taurine levels in vegans. *Am J Clin Nutr* 47, 660-3.
- [4] Shao, A. and Hathcock, J.N. (2008). Risk assessment for the amino acids taurine, L-glutamine and L-arginine. *Regul Toxicol Pharmacol* 50, 376-99.
- [5] Satsu, H., Kobayashi, Y., Yokoyama, T., Terasawa, E. and Shimizu, M. (2002). Effect of dietary sulfur amino acids on the taurine content of rat tissues. *Amino Acids* 23, 447-52.
- [6] Han, X., Patters, A.B., Jones, D.P., Zelikovic, I. and Chesney, R.W. (2006). The taurine transporter: mechanisms of regulation. *Acta Physiol (Oxf)* 187, 61-73.
- [7] Mochizuki, T., Satsu, H. and Shimizu, M. (2005). Signaling pathways involved in tumor necrosis factor alpha-induced upregulation of the taurine transporter in Caco-2 cells. *FEBS Lett* 579, 3069-74.
- [8] Han, X., Budreau, A.M. and Chesney, R.W. (2000). Identification of promoter elements involved in adaptive regulation of the taurine transporter gene: role of cytosolic Ca²⁺ signaling. *Adv Exp Med Biol* 483, 535-44.
- [9] Jung, M.K. et al. Expression of Taurine Transporter (TauT) is Modulated by Heat Shock Factor 1 (HSF1) in Motor Neurons of ALS. *Mol Neurobiol*
- [10] Loo, D.D., Hirsch, J.R., Sarkar, H.K. and Wright, E.M. (1996). Regulation of the mouse retinal taurine transporter (TAUT) by protein kinases in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett* 392, 250-4.
- [11] Bella, D.L. and Stipanuk, M.H. (1996). High levels of dietary protein or methionine have different effects on cysteine metabolism in rat hepatocytes. *Adv Exp Med Biol* 403, 73-84.
- [12] Tsuboyama-Kasaoka, N., Hosokawa, Y., Kodama, H., Matsumoto, A., Oka, J. and Totani, M. (1999). Human cysteine dioxygenase gene: structural organization, tissue-specific expression and downregulation by phorbol 12-myristate 13-acetate. *Biosci Biotechnol Biochem* 63, 1017-24.
- [13] Sturman, J.A. (1988). Taurine in development. *J Nutr* 118, 1169-76.
- [14] Hayes, K.C., Carey, R.E. and Schmidt, S.Y. (1975). Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat. *Science* 188, 949-51.

- [15] Wu, H., Jin, Y., Wei, J., Jin, H., Sha, D. and Wu, J.Y. (2005). Mode of action of taurine as a neuroprotector. *Brain Res* 1038, 123-31.
- [16] Gurujeyalakshmi, G., Wang, Y. and Giri, S.N. (2000). Suppression of bleomycin-induced nitric oxide production in mice by taurine and niacin. *Nitric Oxide* 4, 399-411.
- [17] Schaffer, S.W., Azuma, J. and Mozaffari, M. (2009). Role of antioxidant activity of taurine in diabetes. *Can J Physiol Pharmacol* 87, 91-9.
- [18] Merezak, S., Hardikar, A.A., Yajnik, C.S., Remacle, C. and Reusens, B. (2001). Intrauterine low protein diet increases fetal beta-cell sensitivity to NO and IL-1 beta: the protective role of taurine. *J Endocrinol* 171, 299-308.
- [19] Nakajima, Y., Osuka, K., Seki, Y., Gupta, R.C., Hara, M., Takayasu, M. and Wakabayashi, T. (2009). Taurine reduces inflammatory responses after spinal cord injury. *J Neurotrauma*
- [20] Sener, G., Sehirli, O., Ipci, Y., Cetinel, S., Cikler, E., Gedik, N. and Alican, I. (2005). Protective effects of taurine against nicotine-induced oxidative damage of rat urinary bladder and kidney. *Pharmacology* 74, 37-44.
- [21] Barua, M., Liu, Y. and Quinn, M.R. (2001). Taurine chloramine inhibits inducible nitric oxide synthase and TNF-alpha gene expression in activated alveolar macrophages: decreased NF-kappaB activation and IkappaB kinase activity. *J Immunol* 167, 2275-81.
- [22] Schuller-Levis, G.B. and Park, E. (2003). Taurine: new implications for an old amino acid. *FEMS Microbiol Lett* 226, 195-202.
- [23] Park, E., Alberti, J., Quinn, M.R. and Schuller-Levis, G. (1998). Taurine chloramine inhibits the production of superoxide anion, IL-6 and IL-8 in activated human polymorphonuclear leukocytes. *Adv Exp Med Biol* 442, 177-82.
- [24] Vazquez-Juarez, E., Ramos-Mandujano, G., Hernandez-Benitez, R. and Pasantes-Morales, H. (2008). On the role of G-protein coupled receptors in cell volume regulation. *Cell Physiol Biochem* 21, 1-14.
- [25] Schliess, F. and Haussinger, D. (2006). Osmosensing and signaling in the regulation of liver function. *Contrib Nephrol* 152, 198-209.
- [26] Albrecht, J. and Schousboe, A. (2005). Taurine interaction with neurotransmitter receptors in the CNS: an update. *Neurochem Res* 30, 1615-21.
- [27] Zhao, P., Huang, Y.L. and Cheng, J.S. (1999). Taurine antagonizes calcium overload induced by glutamate or chemical hypoxia in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 268, 25-8.
- [28] Birdsall, T.C. (1998). Therapeutic applications of taurine. *Altern Med Rev* 3, 128-36.

- [29] Militante, J.D. and Lombardini, J.B. (2002). Treatment of hypertension with oral taurine: experimental and clinical studies. *Amino Acids* 23, 381-93.
- [30] Yamori, Y., Liu, L., Ikeda, K., Miura, A., Mizushima, S., Miki, T. and Nara, Y. (2001). Distribution of twenty-four hour urinary taurine excretion and association with ischemic heart disease mortality in 24 populations of 16 countries: results from the WHO-CARDIAC study. *Hypertens Res* 24, 453-7.
- [31] Takatani, T. et al. (2004). Taurine inhibits apoptosis by preventing formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C949-53.
- [32] Militante, J. and Lombardini, J.B. (2004). Age-related retinal degeneration in animal models of aging: possible involvement of taurine deficiency and oxidative stress. *Neurochem Res* 29, 151-60.
- [33] Heller-Stilb, B., van Roeyen, C., Rascher, K., Hartwig, H.G., Huth, A., Seeliger, M.W., Warskulat, U. and Haussinger, D. (2002). Disruption of the taurine transporter gene (*taut*) leads to retinal degeneration in mice. *FASEB J* 16, 231-3.
- [34] Conte Camerino, D. et al. (2004). Taurine and skeletal muscle disorders. *Neurochem Res* 29, 135-42.
- [35] Hashimoto, K. and Shimizu, M. (1993). Epithelial properties of human intestinal Caco-2 cells cultured in a serum-free medium. *Cytotechnology* 13, 175-84.
- [36] Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stammati, A. and Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 21, 1-26.
- [37] Masotti, A., Da Sacco, L., Bottazzo, G.F. and Alisi, A. Microarray technology: a promising tool in nutrigenomics. *Crit Rev Food Sci Nutr* 50, 693-8.
- [38] Wood, R.J., Tchack, L., Angelo, G., Pratt, R.E. and Sonna, L.A. (2004). DNA microarray analysis of vitamin D-induced gene expression in a human colon carcinoma cell line. *Physiol Genomics* 17, 122-9.
- [39] Noe, V., Penuelas, S., Lamuela-Raventos, R.M., Permanyer, J., Ciudad, C.J. and Izquierdo-Pulido, M. (2004). Epicatechin and a cocoa polyphenolic extract modulate gene expression in human Caco-2 cells. *J Nutr* 134, 2509-16.
- [40] Shimizu, M., Zhao, Z., Ishimoto, Y. and Satsu, H. (2009). Dietary taurine attenuates dextran sulfate sodium (DSS)-induced experimental colitis in mice. *Adv Exp Med Biol* 643, 265-71.
- [41] Zhao, Z. et al. (2008). Attenuation by dietary taurine of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice and of THP-1-induced damage to intestinal Caco-2 cell monolayers. *Amino Acids* 35, 217-24.

- [42] Shimizu, M. and Satsu, H. (2000). Physiological significance of taurine and the taurine transporter in intestinal epithelial cells. *Amino Acids* 19, 605-14.
- [43] Kaimul, A.M., Nakamura, H., Masutani, H. and Yodoi, J. (2007). Thioredoxin and thioredoxin-binding protein-2 in cancer and metabolic syndrome. *Free Radic Biol Med* 43, 861-8.
- [44] Kim, S.Y., Suh, H.W., Chung, J.W., Yoon, S.R. and Choi, I. (2007). Diverse functions of VDUP1 in cell proliferation, differentiation, and diseases. *Cell Mol Immunol* 4, 345-51.
- [45] Takahashi, Y., Ishii, Y., Murata, A., Nagata, T. and Asai, S. (2003). Localization of thioredoxin-interacting protein (TXNIP) mRNA in epithelium of human gastrointestinal tract. *J Histochem Cytochem* 51, 973-6.
- [46] Aitken, C.J., Hodge, J.M., Nishinaka, Y., Vaughan, T., Yodoi, J., Day, C.J., Morrison, N.A. and Nicholson, G.C. (2004). Regulation of human osteoclast differentiation by thioredoxin binding protein-2 and redox-sensitive signaling. *J Bone Miner Res* 19, 2057-64.
- [47] Ding, Q., Wang, Q. and Evers, B.M. (2001). Alterations of MAPK activities associated with intestinal cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 284, 282-8.
- [48] Zhou, J., Wu, K., Fernandes, C.L., Cheng, A.L. and Finch, P.W. (1998). Keratinocyte growth factor down-regulates expression of the sucrase-isomaltase gene in Caco-2 intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 273, 33367-73.
- [49] Patwari, P. and Lee, R.T. An expanded family of arrestins regulate metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 23, 216-22.
- [50] Alvarez, C.E. (2008). On the origins of arrestin and rhodopsin. *BMC Evol Biol* 8, 222.
- [51] Masutani, H., Yoshihara, E., Masaki, S., Chen, Z. and Yodoi, J. Thioredoxin binding protein (TBP)-2/Txnip and alpha-arrestin proteins in cancer and diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr* 50, 23-34.
- [52] Patwari, P., Chutkow, W.A., Cummings, K., Verstraeten, V.L., Lammerding, J., Schreiter, E.R. and Lee, R.T. (2009). Thioredoxin-independent regulation of metabolism by the alpha-arrestin proteins. *J Biol Chem* 284, 24996-5003.
- [53] Patwari, P. et al. The arrestin domain-containing 3 protein regulates body mass and energy expenditure. *Cell Metab* 14, 671-83.
- [54] Oka, S. et al. (2006). Impaired fatty acid utilization in thioredoxin binding protein-2 (TBP-2)-deficient mice: a unique animal model of Reye syndrome. *FASEB J* 20, 121-3.
- [55] Rubin, L.J., Magliola, L., Feng, X., Jones, A.W. and Hale, C.C. (2005). Metabolic

- activation of AMP kinase in vascular smooth muscle. *J Appl Physiol* 98, 296-306.
- [56] Andres, A.M., Ratliff, E.P., Sachithanatham, S. and Hui, S.T. Diminished AMPK signaling response to fasting in thioredoxin-interacting protein knockout mice. *FEBS Lett* 585, 1223-30.
- [57] Uys, G.M., Ramburan, A., Loos, B., Kinnear, C.J., Korkie, L.J., Mouton, J., Riedemann, J. and Moolman-Smook, J.C. Myomegalin is a novel A-kinase anchoring protein involved in the phosphorylation of cardiac myosin binding protein C. *BMC Cell Biol* 12, 18.
- [58] Schaffer, S., Solodushko, V. and Azuma, J. (2000). Taurine-deficient cardiomyopathy: role of phospholipids, calcium and osmotic stress. *Adv Exp Med Biol* 483, 57-69.
- [59] Ito, T., Oishi, S., Takai, M., Kimura, Y., Uozumi, Y., Fujio, Y., Schaffer, S.W. and Azuma, J. Cardiac and skeletal muscle abnormality in taurine transporter-knockout mice. *J Biomed Sci* 17 Suppl 1, S20.
- [60] Sharon, D. et al. (2002). Mutated alleles of the rod and cone Na-Ca+K-exchanger genes in patients with retinal diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 1971-9.
- [61] Visser, W.F., van Roermund, C.W., Ijlst, L., Waterham, H.R. and Wanders, R.J. (2007). Demonstration of bile acid transport across the mammalian peroxisomal membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 357, 335-40.
- [62] Kase, B.F. and Bjorkhem, I. (1989). Peroxisomal bile acid-CoA:amino-acid N-acyltransferase in rat liver. *J Biol Chem* 264, 9220-3.
- [63] 竹谷豊、薩秀夫、伊藤美紀子、武田英二. (2011) 栄養・食品機能とトランスポーター
- [64] Lo, M., Wang, Y.Z. and Gout, P.W. (2008). The x(c)-cystine/glutamate antiporter: a potential target for therapy of cancer and other diseases. *J Cell Physiol* 215, 593-602.
- [65] Lewerenz, J. and Maher, P. (2009). Basal levels of eIF2alpha phosphorylation determine cellular antioxidant status by regulating ATF4 and xCT expression. *J Biol Chem* 284, 1106-15.
- [66] Grewal, S. et al. (2009). SNAT2 amino acid transporter is regulated by amino acids of the SLC6 gamma-aminobutyric acid transporter subfamily in neocortical neurons and may play no role in delivering glutamine for glutamatergic transmission. *J Biol Chem* 284, 11224-36.
- [67] Wang, Q. et al. Androgen receptor and nutrient signaling pathways coordinate the demand for increased amino acid transport during prostate cancer progression. *Cancer Res* 71, 7525-36.
- [68] Franchi-Gazzola, R., Dall'Asta, V., Sala, R., Visigalli, R., Bevilacqua, E., Gaccioli, F., Gazzola, G.C. and Bussolati, O. (2006). The role of the neutral amino acid

- transporter SNAT2 in cell volume regulation. *Acta Physiol (Oxf)* 187, 273-83.
- [69] Verrey, F., Closs, E.I., Wagner, C.A., Palacin, M., Endou, H. and Kanai, Y. (2004). CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch* 447, 532-42.
- [70] Fernandez, J., Lopez, A.B., Wang, C., Mishra, R., Zhou, L., Yaman, I., Snider, M.D. and Hatzoglou, M. (2003). Transcriptional control of the arginine/lysine transporter, *cat-1*, by physiological stress. *J Biol Chem* 278, 50000-9.
- [71] Averous, J. et al. Amino acid deprivation regulates the stress-inducible gene *p8* via the GCN2/ATF4 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 413, 24-9.
- [72] Bianchi, L., Lari, R., Anichini, R., De Bellis, A., Berti, A., Napoli, Z., Seghieri, G. and Franconi, F. Taurine transporter gene expression in peripheral mononuclear blood cells of type 2 diabetic patients. *Amino Acids* 42, 2267-74.
- [73] Askwith, T., Zeng, W., Eggo, M.C. and Stevens, M.J. (2009). Oxidative stress and dysregulation of the taurine transporter in high-glucose-exposed human Schwann cells: implications for pathogenesis of diabetic neuropathy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E620-8.
- [74] Semenza, G.L. (2007). Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem J* 405, 1-9.
- [75] Huang, L.E. (2008). Carrot and stick: HIF- α engages c-Myc in hypoxic adaptation. *Cell Death Differ* 15, 672-7.
- [76] Wang, C. and Guo, F. Effects of activating transcription factor 4 deficiency on carbohydrate and lipid metabolism in mammals. *IUBMB Life* 64, 226-30.
- [77] Park, S.H., Lee, H., Park, K.K., Kim, H.W. and Park, T. (2006). Taurine-responsive genes related to signal transduction as identified by cDNA microarray analyses of HepG2 cells. *J Med Food* 9, 33-41.
- [78] Thirumoorthy, N., Manisenthil Kumar, K.T., Shyam Sundar, A., Panayappan, L. and Chatterjee, M. (2007). Metallothionein: an overview. *World J Gastroenterol* 13, 993-6.
- [79] Shen, H., Qin, H. and Guo, J. (2008). Cooperation of metallothionein and zinc transporters for regulating zinc homeostasis in human intestinal Caco-2 cells. *Nutr Res* 28, 406-13.
- [80] Ranaldi, G., Caprini, V., Sambuy, Y., Perozzi, G. and Murgia, C. (2009). Intracellular zinc stores protect the intestinal epithelium from Ochratoxin A toxicity. *Toxicol In Vitro* 23, 1516-21.
- [81] Natoli, M., Felsani, A., Ferruzza, S., Sambuy, Y., Canali, R. and Scarino, M.L. (2009). Mechanisms of defence from Fe(II) toxicity in human intestinal Caco-2 cells. *Toxicol*

- In Vitro 23, 1510-5.
- [82] Dooley, T.P., Curto, E.V., Reddy, S.P., Davis, R.L., Lambert, G.W., Wilborn, T.W. and Elson, C.O. (2004). Regulation of gene expression in inflammatory bowel disease and correlation with IBD drugs: screening by DNA microarrays. *Inflamm Bowel Dis* 10, 1-14.
- [83] Kameoka, S., Leavitt, P., Chang, C. and Kuo, S.M. (1999). Expression of antioxidant proteins in human intestinal Caco-2 cells treated with dietary flavonoids. *Cancer Lett* 146, 161-7.
- [84] Kuo, S.M. and Leavitt, P.S. (1999). Genistein increases metallothionein expression in human intestinal cells, Caco-2. *Biochem Cell Biol* 77, 79-88.
- [85] Kuo, S.M., Leavitt, P.S. and Lin, C.P. (1998). Dietary flavonoids interact with trace metals and affect metallothionein level in human intestinal cells. *Biol Trace Elem Res* 62, 135-53.
- [86] Manna, P., Sinha, M. and Sil, P.C. (2009). Taurine plays a beneficial role against cadmium-induced oxidative renal dysfunction. *Amino Acids* 36, 417-28.
- [87] Lo, M., Ling, V., Wang, Y.Z. and Gout, P.W. (2008). The xc⁻ cystine/glutamate antiporter: a mediator of pancreatic cancer growth with a role in drug resistance. *Br J Cancer* 99, 464-72.
- [88] Ameri, K. and Harris, A.L. (2008). Activating transcription factor 4. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 14-21.
- [89] Keller, K., Strube, M. and Mueckler, M. (1989). Functional expression of the human HepG2 and rat adipocyte glucose transporters in *Xenopus* oocytes. Comparison of kinetic parameters. *J Biol Chem* 264, 18884-9.
- [90] Burant, C.F. and Bell, G.I. (1992). Mammalian facilitative glucose transporters: evidence for similar substrate recognition sites in functionally monomeric proteins. *Biochemistry* 31, 10414-20.
- [91] Macheda, M.L., Rogers, S. and Best, J.D. (2005). Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol* 202, 654-62.
- [92] Younes, M., Lechago, L.V., Somoano, J.R., Mosharaf, M. and Lechago, J. (1997). Immunohistochemical detection of Glut3 in human tumors and normal tissues. *Anticancer Res* 17, 2747-50.
- [93] Dyer, J., Daly, K., Salmon, K.S., Arora, D.K., Kokrashvili, Z., Margolskee, R.F. and Shirazi-Beechey, S.P. (2007). Intestinal glucose sensing and regulation of intestinal glucose absorption. *Biochem Soc Trans* 35, 1191-4.
- [94] Yoshikawa, T., Inoue, R., Matsumoto, M., Yajima, T., Ushida, K. and Iwanaga, T. Comparative expression of hexose transporters (SGLT1, GLUT1, GLUT2 and

- GLUT5) throughout the mouse gastrointestinal tract. *Histochem Cell Biol* 135, 183-94.
- [95] Dionne, S., Elimrani, I., Roy, M.J., Qureshi, I.A., Sarma, D.R., Levy, E. and Seidman, E.G. Studies on the chemopreventive effect of carnitine on tumorigenesis in vivo, using two experimental murine models of colon cancer. *Nutr Cancer* 64, 1279-87.
- [96] Toya, K., Hirata, A., Ohata, T., Sanada, Y., Kato, N. and Yanaka, N. Regulation of colon gene expression by vitamin B6 supplementation. *Mol Nutr Food Res* 56, 641-52.
- [97] Chiou, Y.S., Tsai, M.L., Wang, Y.J., Cheng, A.C., Lai, W.M., Badmaev, V., Ho, C.T. and Pan, M.H. Pterostilbene inhibits colorectal aberrant crypt foci (ACF) and colon carcinogenesis via suppression of multiple signal transduction pathways in azoxymethane-treated mice. *J Agric Food Chem* 58, 8833-41.
- [98] Burdick, A.D., Kim, D.J., Peraza, M.A., Gonzalez, F.J. and Peters, J.M. (2006). The role of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta in epithelial cell growth and differentiation. *Cell Signal* 18, 9-20.
- [99] Polakowska, R.R., Piacentini, M., Bartlett, R., Goldsmith, L.A. and Haake, A.R. (1994). Apoptosis in human skin development: morphogenesis, periderm, and stem cells. *Dev Dyn* 199, 176-88.
- [100] Maruoka, Y., Harada, H., Mitsuyasu, T., Seta, Y., Kurokawa, H., Kajiyama, M. and Toyoshima, K. (1997). Keratinocytes become terminally differentiated in a process involving programmed cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 238, 886-90.
- [101] Cerbone, A., Toaldo, C., Laurora, S., Briatore, F., Pizzimenti, S., Dianzani, M.U., Ferretti, C. and Barrera, G. (2007). 4-Hydroxynonenal and PPARgamma ligands affect proliferation, differentiation, and apoptosis in colon cancer cells. *Free Radic Biol Med* 42, 1661-70.
- [102] Satsu, H., Watanabe, H., Arai, S. and Shimizu, M. (1997). Characterization and regulation of taurine transport in Caco-2, human intestinal cells. *J Biochem* 121, 1082-7.
- [103] Donnelly, K.L., Margosian, M.R., Sheth, S.S., Lusic, A.J. and Parks, E.J. (2004). Increased lipogenesis and fatty acid reesterification contribute to hepatic triacylglycerol stores in hyperlipidemic Txnip^{-/-} mice. *J Nutr* 134, 1475-80.
- [104] Hui, S.T. et al. (2008). Txnip balances metabolic and growth signaling via PTEN disulfide reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3921-6.
- [105] Sheth, S.S. et al. (2005). Thioredoxin-interacting protein deficiency disrupts the fasting-feeding metabolic transition. *J Lipid Res* 46, 123-34.
- [106] van Greevenbroek, M.M., Vermeulen, V.M., Feskens, E.J., Evelo, C.T., Kruijshoop,

- M., Hoebee, B., van der Kallen, C.J. and de Bruin, T.W. (2007). Genetic variation in thioredoxin interacting protein (TXNIP) is associated with hypertriglyceridaemia and blood pressure in diabetes mellitus. *Diabet Med* 24, 498-504.
- [107] Chutkow, W.A., Patwari, P., Yoshioka, J. and Lee, R.T. (2008). Thioredoxin-interacting protein (Txnip) is a critical regulator of hepatic glucose production. *J Biol Chem* 283, 2397-406.
- [108] Ferreira, N.E. et al. Thioredoxin interacting protein genetic variation is associated with diabetes and hypertension in the Brazilian general population. *Atherosclerosis*
- [109] Yoshioka, J., Schulze, P.C., Cupesi, M., Sylvan, J.D., MacGillivray, C., Gannon, J., Huang, H. and Lee, R.T. (2004). Thioredoxin-interacting protein controls cardiac hypertrophy through regulation of thioredoxin activity. *Circulation* 109, 2581-6.
- [110] Takahashi, Y., Masuda, H., Ishii, Y., Nishida, Y., Kobayashi, M. and Asai, S. (2007). Decreased expression of thioredoxin interacting protein mRNA in inflamed colonic mucosa in patients with ulcerative colitis. *Oncol Rep* 18, 531-5.
- [111] Horikoshi, T., Asanuma, A., Yanagisawa, K., Anzai, K. and Goto, S. (1988). Taurine and beta-alanine act on both GABA and glycine receptors in *Xenopus* oocyte injected with mouse brain messenger RNA. *Brain Res* 464, 97-105.
- [112] Hussy, N., Deleuze, C., Pantaloni, A., Desarmenien, M.G. and Moos, F. (1997). Agonist action of taurine on glycine receptors in rat supraoptic magnocellular neurones: possible role in osmoregulation. *J Physiol* 502 (Pt 3), 609-21.
- [113] del Olmo, N., Bustamante, J., del Rio, R.M. and Solis, J.M. (2000). Taurine activates GABA(A) but not GABA(B) receptors in rat hippocampal CA1 area. *Brain Res* 864, 298-307.
- [114] Whatley, V.J. and Harris, R.A. (1996). The cytoskeleton and neurotransmitter receptors. *Int Rev Neurobiol* 39, 113-43.
- [115] Kim, K.Y., Shin, S.M., Kim, J.K., Paik, S.G., Yang, Y. and Choi, I. (2004). Heat shock factor regulates VDUP1 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 315, 369-75.
- [116] Siepel, A. et al. (2005). Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res* 15, 1034-50.
- [117] Stoecklin, G., Stubbs, T., Kedersha, N., Wax, S., Rigby, W.F., Blackwell, T.K. and Anderson, P. (2004). MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *EMBO J* 23, 1313-24.
- [118] Espel, E. (2005). The role of the AU-rich elements of mRNAs in controlling translation. *Semin Cell Dev Biol* 16, 59-67.
- [119] Gallie, D.R. (1998). A tale of two termini: a functional interaction between the

- termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. *Gene* 216, 1-11.
- [120] Li, X., Rong, Y., Zhang, M., Wang, X.L., LeMaire, S.A., Coselli, J.S., Zhang, Y. and Shen, Y.H. (2009). Up-regulation of thioredoxin interacting protein (Txnip) by p38 MAPK and FOXO1 contributes to the impaired thioredoxin activity and increased ROS in glucose-treated endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 381, 660-5.
- [121] Papadia, S. et al. (2008). Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nat Neurosci* 11, 476-87.
- [122] Minn, A.H., Hafele, C. and Shalev, A. (2005). Thioredoxin-interacting protein is stimulated by glucose through a carbohydrate response element and induces beta-cell apoptosis. *Endocrinology* 146, 2397-405.
- [123] Yu, F.X., Goh, S.R., Dai, R.P. and Luo, Y. (2009). Adenosine-containing molecules amplify glucose signaling and enhance txnip expression. *Mol Endocrinol* 23, 932-42.
- [124] Yu, F.X. and Luo, Y. (2009). Tandem ChoRE and CCAAT motifs and associated factors regulate Txnip expression in response to glucose or adenosine-containing molecules. *PLoS One* 4, e8397.
- [125] Yu, F.X., Chai, T.F., He, H., Hagen, T. and Luo, Y. Thioredoxin-interacting protein (Txnip) gene expression: sensing oxidative phosphorylation status and glycolytic rate. *J Biol Chem* 285, 25822-30.
- [126] Ma, L., Robinson, L.N. and Towle, H.C. (2006). ChREBP*MLx is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver. *J Biol Chem* 281, 28721-30.
- [127] He, X., Gerrero, R., Simmons, D.M., Park, R.E., Lin, C.J., Swanson, L.W. and Rosenfeld, M.G. (1991). Tst-1, a member of the POU domain gene family, binds the promoter of the gene encoding the cell surface adhesion molecule P0. *Mol Cell Biol* 11, 1739-44.
- [128] Yang, X., McDonough, J., Fyodorov, D., Morris, M., Wang, F. and Deneris, E.S. (1994). Characterization of an acetylcholine receptor alpha 3 gene promoter and its activation by the POU domain factor SCIP/Tst-1. *J Biol Chem* 269, 10252-64.
- [129] Bkaily, G. et al. (1998). Taurine indirectly increases $[Ca]_i$ by inducing Ca^{2+} influx through the Na^{+} - Ca^{2+} exchanger. *Mol Cell Biochem* 188, 187-97.
- [130] Liu, H.Y., Chi, F.L. and Gao, W.Y. (2008). Taurine modulates calcium influx under normal and ototoxic conditions in isolated cochlear spiral ganglion neurons. *Pharmacol Rep* 60, 508-13.
- [131] Bruzzone, S., Moreschi, I., Guida, L., Usai, C., Zocchi, E. and De Flora, A. (2006). Extracellular NAD^{+} regulates intracellular calcium levels and induces activation of human granulocytes. *Biochem J* 393, 697-704.

- [132] Gerth, A., Nieber, K., Oppenheimer, N.J. and Hauschildt, S. (2004). Extracellular NAD⁺ regulates intracellular free calcium concentration in human monocytes. *Biochem J* 382, 849-56.
- [133] Bay, B.H. (1997). Extracellular ATP induces cytosolic calcium oscillations associated with an increase in intracellular pH in human Chang liver cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 43, 521-8.
- [134] Fang, S. et al. High glucose condition upregulated Txnip expression level in rat mesangial cells through ROS/MEK/MAPK pathway. *Mol Cell Biochem* 347, 175-82.
- [135] Chen, C.L., Lin, C.F., Chang, W.T., Huang, W.C., Teng, C.F. and Lin, Y.S. (2008). Ceramide induces p38 MAPK and JNK activation through a mechanism involving a thioredoxin-interacting protein-mediated pathway. *Blood* 111, 4365-74.
- [136] Feng, X. et al. Taurine suppresses osteoblastic differentiation of aortic valve interstitial cells induced by beta-glycerophosphate disodium, dexamethasone and ascorbic acid via the ERK pathway. *Amino Acids* 43, 1697-704.
- [137] Yuan, L.Q., Lu, Y., Luo, X.H., Xie, H., Wu, X.P. and Liao, E.Y. (2007). Taurine promotes connective tissue growth factor (CTGF) expression in osteoblasts through the ERK signal pathway. *Amino Acids* 32, 425-30.
- [138] Baek, Y.Y. et al. Extracellular taurine induces angiogenesis by activating ERK-, Akt-, and FAK-dependent signal pathways. *Eur J Pharmacol* 674, 188-99.
- [139] Jeon, S.H. et al. (2007). Taurine increases cell proliferation and generates an increase in [Mg²⁺]_i accompanied by ERK 1/2 activation in human osteoblast cells. *FEBS Lett* 581, 5929-34.
- [140] Hazzalin, C.A. and Mahadevan, L.C. (2002). MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 30-40.
- [141] Lewis, T.S., Shapiro, P.S. and Ahn, N.G. (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 74, 49-139.
- [142] Davis, R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-52.
- [143] Torii, S., Nakayama, K., Yamamoto, T. and Nishida, E. (2004). Regulatory mechanisms and function of ERK MAP kinases. *J Biochem* 136, 557-61.
- [144] Viala, E. and Pouyssegur, J. (2004). Regulation of tumor cell motility by ERK mitogen-activated protein kinases. *Ann N Y Acad Sci* 1030, 208-18.
- [145] Yoon, S. and Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24, 21-44.
- [146] Shaul, Y.D. and Seger, R. (2007). The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1213-26.

- [147] Marshall, C.J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80, 179-85.
- [148] Das, J., Ghosh, J., Manna, P. and Sil, P.C. Protective role of taurine against arsenic-induced mitochondria-dependent hepatic apoptosis via the inhibition of PKCdelta-JNK pathway. *PLoS One* 5, e12602.
- [149] Wu, N. et al. Taurine prevents free fatty acid-induced hepatic insulin resistance in association with inhibiting JNK1 activation and improving insulin signaling in vivo. *Diabetes Res Clin Pract* 90, 288-96.
- [150] Ghosh, J., Das, J., Manna, P. and Sil, P.C. (2009). Taurine prevents arsenic-induced cardiac oxidative stress and apoptotic damage: role of NF-kappa B, p38 and JNK MAPK pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 240, 73-87.
- [151] Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J. and Greenberg, M.E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326-31.
- [152] Kaminska, B. (2005). MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta* 1754, 253-62.
- [153] Gupta, K., Kshirsagar, S., Li, W., Gui, L., Ramakrishnan, S., Gupta, P., Law, P.Y. and Hebbel, R.P. (1999). VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling. *Exp Cell Res* 247, 495-504.
- [154] Li, Y. et al. Taurine attenuates methamphetamine-induced autophagy and apoptosis in PC12 cells through mTOR signaling pathway. *Toxicol Lett* 215, 1-7.
- [155] Oka, S., Masutani, H., Liu, W., Horita, H., Wang, D., Kizaka-Kondoh, S. and Yodoi, J. (2006). Thioredoxin-binding protein-2-like inducible membrane protein is a novel vitamin D3 and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)gamma ligand target protein that regulates PPARgamma signaling. *Endocrinology* 147, 733-43.
- [156] Takano, H. and Komuro, I. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cardiovascular diseases. *Circ J* 73, 214-20.
- [157] Stoltzman, C.A., Peterson, C.W., Breen, K.T., Muoio, D.M., Billin, A.N. and Ayer, D.E. (2008). Glucose sensing by MondoA: Mlx complexes: a role for hexokinases and direct regulation of thioredoxin-interacting protein expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6912-7.
- [158] Yoshioka, J. et al. (2007). Targeted deletion of thioredoxin-interacting protein regulates cardiac dysfunction in response to pressure overload. *Circ Res* 101, 1328-38.

- [159] Poupeau, A. and Postic, C. Cross-regulation of hepatic glucose metabolism via ChREBP and nuclear receptors. *Biochim Biophys Acta* 1812, 995-1006.
- [160] Iizuka, K. and Horikawa, Y. (2008). ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome. *Endocr J* 55, 617-24.
- [161] Nishinaka, Y., Masutani, H., Oka, S., Matsuo, Y., Yamaguchi, Y., Nishio, K., Ishii, Y. and Yodoi, J. (2004). Importin alpha1 (Rch1) mediates nuclear translocation of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3)-up-regulated protein 1. *J Biol Chem* 279, 37559-65.
- [162] Jin, H.O. et al. TXNIP potentiates Redd1-induced mTOR suppression through stabilization of Redd1. *Oncogene* 30, 3792-801.
- [163] Shaw, R.J. (2009). LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol (Oxf)* 196, 65-80.
- [164] Hardie, D.G., Ross, F.A. and Hawley, S.A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 251-62.
- [165] Suzuki, T., Wada, T., Saigo, K. and Watanabe, K. (2002). Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases. *EMBO J* 21, 6581-9.
- [166] Wilson, W.A., Hawley, S.A. and Hardie, D.G. (1996). Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr Biol* 6, 1426-34.
- [167] Fujii, N., Jessen, N. and Goodyear, L.J. (2006). AMP-activated protein kinase and the regulation of glucose transport. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, E867-77.
- [168] Sopjani, M., Bhavsar, S.K., Fraser, S., Kemp, B.E., Foller, M. and Lang, F. Regulation of Na⁺-coupled glucose carrier SGLT1 by AMP-activated protein kinase. *Mol Membr Biol* 27, 137-44.
- [169] Nishiyama, A. et al. (1999). Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *J Biol Chem* 274, 21645-50.
- [170] Junn, E. et al. (2000). Vitamin D3 up-regulated protein 1 mediates oxidative stress via suppressing the thioredoxin function. *J Immunol* 164, 6287-95.
- [171] Patwari, P., Higgins, L.J., Chutkow, W.A., Yoshioka, J. and Lee, R.T. (2006). The interaction of thioredoxin with Txnip. Evidence for formation of a mixed disulfide by disulfide exchange. *J Biol Chem* 281, 21884-91.
- [172] Taber, K.H., Lin, C.T., Liu, J.W., Thalmann, R.H. and Wu, J.Y. (1986). Taurine in hippocampus: localization and postsynaptic action. *Brain Res* 386, 113-21.

- [173] Lewis, C.A., Ahmed, Z. and Faber, D.S. (1991). A characterization of glycinergic receptors present in cultured rat medullary neurons. *J Neurophysiol* 66, 1291-303.
- [174] Eppler, B. and Dawson, R., Jr. (2002). Cytoprotective role of taurine in a renal epithelial cell culture model. *Biochem Pharmacol* 63, 1051-60.
- [175] Takatani, T., Takahashi, K., Uozumi, Y., Matsuda, T., Ito, T., Schaffer, S.W., Fujio, Y. and Azuma, J. (2004). Taurine prevents the ischemia-induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiomyocytes through Akt/caspase-9 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 484-9.
- [176] Sun, J. et al. The role of small molecular weight compounds to increase vacuolation induced by VacA toxin in vitro. *Toxicol In Vitro* 24, 1373-8.
- [177] Harrisingh, M.C. and Lloyd, A.C. (2004). Ras/Raf/ERK signalling and NF1. *Cell Cycle* 3, 1255-8.
- [178] Zhao, Y., Liu, J., Li, L., Liu, L. and Wu, L. (2005). Role of Ras/PKCzeta/MEK/ERK1/2 signaling pathway in angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *Regul Pept* 128, 43-50.
- [179] Lee, H.Y., Crawley, S., Hokari, R., Kwon, S. and Kim, Y.S. Bile acid regulates MUC2 transcription in colon cancer cells via positive EGFR/PKC/Ras/ERK/CREB, PI3K/Akt/IkappaB/NF-kappaB and p38/MSK1/CREB pathways and negative JNK/c-Jun/AP-1 pathway. *Int J Oncol* 36, 941-53.
- [180] Wen-Sheng, W. (2006). Protein kinase C alpha trigger Ras and Raf-independent MEK/ERK activation for TPA-induced growth inhibition of human hepatoma cell HepG2. *Cancer Lett* 239, 27-35.
- [181] Roskoski, R., Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 66, 105-43.
- [182] Jobin, C., Holt, L., Bradham, C.A., Streetz, K., Brenner, D.A. and Sartor, R.B. (1999). TNF receptor-associated factor-2 is involved in both IL-1 beta and TNF-alpha signaling cascades leading to NF-kappa B activation and IL-8 expression in human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 162, 4447-54.
- [183] Roebuck, K.A., Carpenter, L.R., Lakshminarayanan, V., Page, S.M., Moy, J.N. and Thomas, L.L. (1999). Stimulus-specific regulation of chemokine expression involves differential activation of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *J Leukoc Biol* 65, 291-8.
- [184] Ahn, K.S. and Aggarwal, B.B. (2005). Transcription factor NF-kappaB: a sensor for smoke and stress signals. *Ann N Y Acad Sci* 1056, 218-33.
- [185] Kwon, H.J. et al. Vitamin D3 upregulated protein 1 suppresses TNF-alpha-induced NF-kappaB activation in hepatocarcinogenesis. *J Immunol* 185, 3980-9.

- [186] 東京大学生命科学教科書編集委員会. (2006) 理系総合のための生命科学
- [187] Chutkow, W.A. and Lee, R.T. Thioredoxin regulates adipogenesis through thioredoxin-interacting protein (Txnip) protein stability. *J Biol Chem* 286, 29139-45.
- [188] Harris, D.S., Slot, J.W., Geuze, H.J. and James, D.E. (1992). Polarized distribution of glucose transporter isoforms in Caco-2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7556-60.
- [189] Wood, I.S. and Trayhurn, P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* 89, 3-9.

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 22 年度博士課程 進学

氏 名 権藤 祐輔

指導教員名 清水 誠

論文題目 腸管上皮細胞におけるタウリンによる TXNIP 発現制御に関する研究

遊離アミノ酸の 1 つであるタウリンは、カルボキシル基の代わりに硫酸基を持つβ-アミノ酸である。魚介類に多く含まれ、主に食品を介して摂取される。生体内に取り込まれたタウリンは、各組織において抗酸化作用・抗炎症作用・浸透圧調節作用といった多彩な生理作用を示すことが報告されている。当研究室においても腸管上皮細胞におけるタウリンの抗炎症作用、タウリンの輸送を担うタウリントランスポーター (TAUT) の発現調節に関する研究がおこなわれてきた。しかしながらタウリンの生理作用に関しては現象論に留まっている研究が多く、その詳細な作用機序については不明な点が多い。さらに遺伝子・分子レベルでの解析も十分になされていないのが現状である。

近年のニュートリゲノミクスの進展に伴い、食品成分が様々な組織における遺伝子発現に及ぼす影響を網羅的に解析することで食品の機能性に関する科学的な根拠を立証する試みがなされるようになった。食品の機能発現において重要な組織である腸管においても、ヒト腸管上皮細胞である Caco-2 細胞を用いて解析がおこなわれている。

そこで本研究ではこの概念をもとに、腸管上皮細胞における遺伝子発現に及ぼす影響について、Caco-2 細胞を用いて検討することにした。すなわち、Caco-2 細胞においてタウリ

ンがどのような遺伝子発現を制御しているのかを網羅的解析によって明らかにすると共に、その制御機構および遺伝子発現変化がもたらす細胞機能への影響を解明することを目的として研究を進めることとした。

第1章 タウリンが腸管上皮細胞の遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響

タウリンがどのような遺伝子発現を制御するのかについて明らかにするために、DNA マイクロアレイを用いて網羅的な解析をおこなった。

Gene Ontology 解析の結果、タウリンはアミノ酸輸送を主とするトランスポーターに関する遺伝子群やグルコース代謝に関する遺伝子群の発現を抑制する可能性が示された。一方で、具体的な遺伝子としてタウリンは **thioredoxin interacting protein (TXNIP)** の mRNA 発現を顕著に亢進することが見出され、タンパク質レベルにおいてもその亢進は確認された。この誘導はタウリンと構造的、機能的に類似しているアミノ酸であるβ-アラニンやγ-aminobutyric acid (GABA) ではみられず、タウリン特異的であることが明らかとなった。さらに、β-アラニンはタウリンと同様に **TAUT** の基質でありタウリンの細胞内吸収を競合的に阻害するため、タウリンとβ-アラニンを同時に添加しタウリンの細胞内取り込みを阻害したときの **TXNIP mRNA** 発現に与える影響を調べたところ、β-アラニン存在下においてタウリンによる **TXNIP mRNA** 発現上昇が抑制された。このことからタウリンによる **TXNIP mRNA** 発現誘導に **TAUT** が関与していることが示唆され、細胞内のタウリンが重要である可能性が考えられた。

第2章 タウリンによる TXNIP 発現亢進機構の解析

第1章で見出されたタウリンによる **TXNIP mRNA** 発現誘導に関して、その作用機序の解析をおこなった。タウリンによる **TXNIP mRNA** 発現亢進機構として、タウリンが **TXNIP** の mRNA を安定化させているのか、または転写活性を亢進しているのかという2つの可能性が考えられる。mRNA 合成阻害剤であるアクチノマイシン D を用いてタウリンが **TXNIP** の mRNA 安定性に与える影響を調べたところ、タウリンの有無に関わらずアクチノマイシン D 添加後の **TXNIP mRNA** の分解速度に違いが見られなかった。このことから、タウリンは mRNA の安定性に影響を与えていないことが考えられた。一方で、タウリンが **TXNIP** の転写活性に及ぼす影響を検討するために、**TXNIP** プロモーター領域を含むルシフェラー

ゼベクターを作製しルシフェラーゼアッセイをおこなったところ、タウリンの濃度依存的に TXNIP 転写活性の亢進がみられた。このことからタウリンによる TXNIP mRNA 発現亢進機構として、TXNIP の転写活性に影響を与えていることが明らかとなり、同時に TXNIP のプロモーター領域中にタウリンを認識する遺伝子配列が存在することが示唆された。そのため、その遺伝子配列を同定するためにプロモーター解析を進めた。

TXNIP プロモーター領域を部分的に欠損させたベクターを数種類作製し、それぞれにおいてタウリンによる転写活性への影響を検討したところ、TXNIP プロモーター領域の +142/+256 を欠損させた場合にタウリンによる転写活性の亢進がみられなくなった。さらに、その領域の中でも+162/+218 のみを含むルシフェラーゼベクターをトランスフェクションさせた細胞において、タウリンがその転写活性を亢進したため、タウリンを認識する遺伝子配列がこの領域内に存在することが示された。この領域についてイン・シリコ解析によりタウリン応答配列の候補を分析したところ、哺乳類における遺伝子配列の保存度が高いものが2つ、および転写因子 Tst-1 の応答配列が存在しており、これらの配列が候補として考えられた。

並行して、タウリンがどのようなシグナル伝達経路を介して TXNIP 発現を亢進しているかについて明らかにするために、様々なシグナル伝達経路阻害剤を用いて検討をおこなった。その結果、mitogen-activated protein kinases (MAPKs) の3種類の経路のうち、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路の阻害剤である PD98059 添加によって、タウリンによる TXNIP mRNA 発現量の増加が抑制された。また、その抑制は mRNA だけでなく転写活性レベルにおいてもみられた。さらに、タウリンによる ERK1/2 の活性化が確認されたため、タウリンは ERK-MAPK シグナル伝達経路を介して TXNIP mRNA 発現を亢進していることが示唆された。

第3章 タウリンによる TXNIP 発現誘導が腸管上皮細胞に及ぼす影響

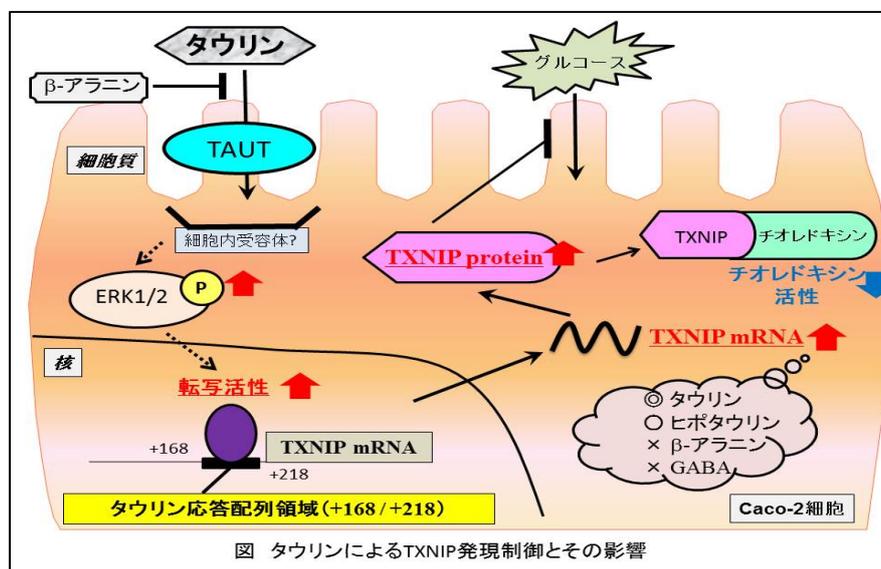
第1章で見出されたタウリンによる TXNIP 発現誘導が、細胞機能にどのような影響を及ぼすのかについて検討した。TXNIP はグルコースの吸収抑制に関与していることが報告されているため、タウリンによるグルコース取り込みに与える影響を検討したところ、タウリンの濃度依存的なグルコース取り込み量の低下がみられた。さらに、TXNIP のノックダウンを誘導することによりその低下が解除する結果が得られた。このことから、タウリン

が TXNIP の誘導を介してグルコースの吸収を抑制することが示された。

また、TXNIP はチオレドキシシンと相互作用して、その抗酸化活性 (チオレドキシシン活性) を負に制御し、活性酸素 (ROS) の増加につながる事が知られている。そのため、タウリンがチオレドキシシン活性に与える影響を検討したところ、その活性の低下がみられた。このことから、タウリンはチオレドキシシンの抗酸化作用を低下させ、それにより ROS を増加させる可能性が考えられた。

総括

本研究ではニュートリゲノミクスの概念に基づき、タウリンが細胞に与える作用の遺伝子・分子レベルでの解析に取り組んだ。その結果として見出されたタウリン応答性分子 TXNIP に着目し、その解析を進めた結果、TXNIP 発現制御を介したタウリンの生理機能を見出すことができた。TXNIP は redox 制御以外にも抗炎症作用をはじめとする様々な生理機能を有することが報告されており、タウリンの多彩な生理作用を司る制御因子としての可能性も考えられる。未だ不明な点が多いタウリンの作用機序の解析において本研究がその一助となり、タウリンの機能性食品成分としての理解が深まることを期待したい。



発表論文

Gondo Y., Satsu H., Ishimoto Y., Iwamoto T., Shimizu M. (2012)

Effect of taurine on mRNA expression of thioredoxin interacting protein in Caco-2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 426(3), 433-437

業績

<投稿論文>

Gondo Y., Satsu H., Ishimoto Y., Iwamoto T., Shimizu M. (2012)

“Effect of taurine on mRNA expression of thioredoxin interacting protein in Caco-2 cells.”

Biochemical and Biophysical Research Communications. 426(3), 433-437

<学会発表>

【国際学会】

○Yusuke Gondo, Hideo Satsu and Makoto Shimizu

「Effect of taurine on gene expression profile in human intestinal Caco-2 cells.」

2011 Internal Conference on Food Factors (ICoFF), Taipei, Taiwan, November, 2011

(ポスター発表)

→ポスター賞および **Young Investigator Award** を受賞

(Young Investigator Award は日本フードファクター学会 (JSoFF)より授与された。)

【国内学会】

○榎藤祐輔、薩 秀夫、石本容子、清水 誠

「タウリンがヒト腸管上皮細胞に及ぼす遺伝子発現変化の網羅的解析」

日本農芸化学会 2008 年度大会、福岡、2009 年 3 月 (ポスター発表)

○榎藤祐輔、薩 秀夫、岩本 拓、石本容子、清水 誠

「タウリンが腸管上皮 Caco-2 細胞遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響の解析」

日本アミノ酸学会 2009 年度大会、京都、2009 年 9 月 (ポスター発表)

○榎藤祐輔、薩 秀夫、岩本 拓、石本容子、清水 誠

「タウリンがヒト腸管上皮細胞の遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響」

日本農芸化学会 2009 年度大会、東京、2010 年 3 月 (口頭発表)

○榎藤祐輔、薩 秀夫、清水 誠

「タウリンによる TXNIP mRNA 発現亢進機構の解析」

日本農芸化学会 2010 年度大会、京都、2011 年 3 月（口頭発表）

○榎藤祐輔、薩 秀夫、清水 誠

「タウリンが TXNIP 転写活性に与える影響の解析」

日本農芸化学会 2011 年度大会、京都、2012 年 3 月（口頭発表）

○榎藤祐輔、薩 秀夫、朴 聖俊、若林 俊一、中井 謙太、清水 誠

「腸管上皮細胞におけるタウリンによる TXNIP 発現制御に関する研究」

日本農芸化学会 2012 年度大会、仙台、2013 年 3 月（口頭発表予定）

謝辞

本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 食糧化学研究室にておこなわれたものです。

本研究を遂行するにあたり、終始にわたり懇切丁寧なご指導、ご鞭撻を賜りました、食糧化学研究室 清水 誠 教授に感謝いたしますとともに、心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、有益かつ的確なご助言を賜りました、食糧化学研究室 戸塚 護 准教授に感謝いたしますとともに、心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、些細な疑問にも答えていただき、終始に渡って多大で熱心なご指導を賜りました、食糧化学研究室 薩 秀夫 助教に深く感謝し、心より御礼申し上げます。

実験技術、研究の進め方等全般に関して 3 年間様々な助言をいただき、励ましていただきました、石本 容子 博士に厚く御礼申し上げます。

DNA マイクロアレイをおこなうにあたって、実験技術並びに解析方法に関して懇切丁寧にご指導いただきました、岩本 拓 博士に厚く御礼申し上げます。

タウリン結合タンパク質の探索にあたって、アフィニティービーズをご供与いただき、またアフィニティービーズを用いた実験技術に関して懇切丁寧にご指導いただき、かつ的確なご助言をいただきました、東京工業大学大学院生命理工学研究科 半田 宏 教授、坂本 聡 助教に厚く御礼申し上げます。

プロモーター解析にあたって、バイオインフォマティクスの視点から多様なプログラムを用いた分析、指導をしていただき研究の視野を広げてくださった東京大学医科学研究所 ヒトゲノム解析センター 機能解析イン・シリコ分野 中井 謙太 教授、若林 俊一 先生、朴 聖俊 博士に深く御礼申し上げます。

共同研究として研究費をご供与いただき、タウリンに関して様々なご助言を賜りました大正製薬株式会社 村上 茂 様に厚く御礼申し上げます。

研究室配属から研究室生活を共に過ごし励まし合った同期の尾形 悠氏、知立 慧美氏、日置 裕美子氏、研究全般に関する考え方および姿勢についてご指導いただきました吉田 綾子 博士、動物実験で多大なるご助力を賜りました源 壮平氏、西田 実紗氏、赤木 裕氏、杉山 ひかり氏をはじめ、研究生活を共にして日々の生活を意義深く充実した素晴らしいものにしていただきました食糧化学研究室の皆様に深く感謝いたします。

奨学金を貸与いただきました日本学生支援機構に感謝し、深く御礼申し上げます。研究に専念できる生活環境を整えることができました。

最後に、学生生活を送るにあたって多大な援助をいただき、また心の支えとして常に見守りながら応援しつづけてくださった家族、良き理解者であり励ましてくださった友人に心より感謝申し上げます。

2012 年 12 月