

博士<健康科学>論文

Caenorhabditis elegans を用いた $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析法の

開発と有効性の評価

—Postbiotics 研究への ^{13}C 呼気分析法の応用—

2022 年 3 月

三浦紀称嗣

川崎医療福祉大学大学院

医療技術学研究科

健康科学専攻

博士學位論文目次

第1章 序論

- 1-1. ポストバイオティクスの概要
- 1-2. 短鎖脂肪酸 (SCFAs)
- 1-3. *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) の概要
- 1-4. ^{13}C 呼気分析法
- 1-5. *C.elegans* を用いた SCFAs 研究の現状と ^{13}C 呼気分析法の応用
- 1-6. 目的
- 1-7. 利益相反

第2章 *C.elegans* への $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析法の適用条件の検討

- 2-1. 目的
- 2-2. 実験方法
 - 2-2-1. *C.elegans* の飼育方法
 - 2-2-2. *C.elegans* の同調化
 - 2-2-3. $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析装置の構成と測定方法
 - 2-2-4. 実験試薬
 - 2-2-5. 走化性実験による *C.elegans* のプロピオン酸に対する嗜好性の確認
 - 2-2-6. 大腸菌 OP-50 株が $[1-^{13}\text{C}]$ プロピオン酸を用いた $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析結果に及ぼす影響
 - 2-2-7. $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析法を用いた *C.elegans* のプロピオン酸代謝の測定条件

2-2-8. 統計処理

2-3. 結果

2-3-1. 走化性実験による *C.elegans* のプロピオン酸に対する嗜好性の確認

2-3-2. 大腸菌 OP-50 株が[1-¹³C]プロピオン酸を用いた ¹³CO₂ ガス分析結果に及ぼす影響

2-3-3. ¹³CO₂ ガス分析法を用いた *C.elegans* のプロピオン酸代謝の測定条件

2-4. 考察

第3章 ビタミン B₁₂ 投与が *C.elegans* のプロピオン酸代謝に及ぼす影響

3-1. 目的

3-2. 実験方法

3-2-1. ビタミン B₁₂ 投与が[1-¹³C]プロピオン酸からの ¹³CO₂ 産生に及ぼす影響

3-2-2. プロピオン酸およびビタミン B₁₂ 投与がグリコーゲン蓄積に及ぼす影響

3-2-3. ビタミン B₁₂ 投与がプロピオン酸代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響

3-2-4. ビタミン B₁₂ 投与が好気的環境下でのプロピオン酸代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響

3-2-5. 統計処理

3-3. 結果

3-3-1. ビタミン B₁₂ 投与が[1-¹³C]プロピオン酸からの ¹³CO₂ 産生に及ぼす影響

3-3-2. プロピオン酸およびビタミン B₁₂ 投与がグリコーゲン蓄積に及ぼす影響

3-3-3. ビタミン B₁₂ 投与がプロピオン酸代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響

3-3-4. ビタミン B₁₂ 投与が好氣的環境下でのプロピオン酸代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響

3-4. 考察

第 4 章 RNA 干渉法を用いたプロピオン酸代謝関連遺伝子の発現抑制と ¹³CO₂ 産生との関係性の確認

4-1. 目的

4-2. 実験方法

4-2-1. 二本鎖 RNA の作製

4-2-2. soaking 法を用いたプロピオン酸代謝関連遺伝子ノックダウンの確認

4-2-3. プロピオン酸代謝関連遺伝子ノックダウンが[1-¹³C]プロピオン酸からの ¹³CO₂ 産生に及ぼす影響

4-2-4. 統計処理

4-3. 結果

4-3-1. プロピオン酸代謝関連遺伝子ノックダウンの確認

4-3-2. プロピオン酸代謝関連遺伝子ノックダウンが[1-¹³C]プロピオン酸からの ¹³CO₂ 産生に及ぼす影響

4-4. 考察

第5章 総括

参考文献

投稿論文・学会発表

謝辞

第1章 序論

1-1. ポストバイオティクスの概要

近年、プロバイオティクス (Probiotics)、プレバイオティクス (Prebiotics)、およびシンバイオティクス (Synbiotics) に加えて新たに「ポストバイオティクス (Postbiotics)」の概念が提唱されている。ポストバイオティクスの定義は諸説あるが、概ね「腸内細菌の発酵によって生じる化合物や不活化された細菌のうち、宿主の健康に寄与するもの」を指す。大腸内発酵産物としての短鎖脂肪酸 (Short Chain Fatty Acids : SCFAs) の他、細胞外多糖類やテイコ酸など細菌の構成成分に由来する物質がこの定義に当てはまる^{1,2)}。

ポストバイオティクスの機能性は様々であり、例えば、SCFAsに分類されるプロピオン酸 (PA) や酪酸 (BA) はエピジェネティックに作用することで抗炎症効果や腸管のバリア機能を高めることが明らかになっている^{3,4)}。また、超音波処理などで得られる細菌の溶解物は、免疫系を刺激することで感染症のリスクを低減することが明らかになっている⁵⁾。これらのポストバイオティクスの機能性発現のメカニズムはプロバイオティクスと同様に主に宿主と腸内細菌のインタラクションによるものである。プロバイオティクスは以前より整腸作用や免疫機能の制御など様々な機能性を持つことが知られており⁶⁾、最近の研究では新型コロナウイルスCOVID-19への有効性も期待されている^{7,8)}。しかしながら、生菌を用いるために免疫不全の患者へ適用した場合に敗血症や肺炎等の重篤な副作用を引き起こす可能性がある⁹⁻¹¹⁾。一方、ポストバイオティクスはプロバイオティクスと異なり生菌を用いず¹²⁾、細菌の代謝産物あるいは加熱処理等で不活化された微生物を用いることから、小児など免疫力の乏しい患者への新たな治療方法として期待されている¹³⁾。

1-2. 短鎖脂肪酸 (SCFAs)

SCFAs は一般的に直鎖のアルキル基をもつモノカルボン酸の内、炭素数がおよそ 6 以下のものを指す。SCFAs は腸内細菌がルミナコイド（食物繊維やレジスタントスターチなど、ヒトの小腸内で消化・吸収されにくく、消化管を介して健康の維持に役立つ生理作用を発現する食物成分の総称）を発酵することで生成される。SCFAs の中でも酢酸（AA）、PA、BA は主に宿主のエネルギー源として利用されることが知られており、生成後速やかに大腸上皮細胞から吸収される。吸収された SCFAs は主に大腸上皮細胞および肝臓で代謝されるが、代謝率は種類によって異なる。AA は約 15%、PA は約 50%、BA はそのほとんどが大腸上皮細胞で利用され、残りは主に肝臓で代謝される¹⁴⁾。偶数炭素脂肪酸である AA および BA は、一般的な脂肪酸と同様にアセチル-CoA に変換された後にクエン酸回路（TCA 回路）で完全に代謝される。一方、奇数炭素脂肪酸である PA は通常スクシニル-CoA に代謝された後に TCA 回路に入る。そのため、他の脂肪酸とは異なり糖新生を介して血糖供給やグリコーゲンの基質としても利用される。また、SCFAs はエネルギー源として利用されるだけでなく、脂肪蓄積の抑制やミネラル吸収の促進などの機能性の他、代謝経路や免疫系などをエピジェネティックに変化させることが報告されている^{3,15,16)}。

1-3. *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) の概要

Caenorhabditis elegans (線虫: *C.elegans*) は線形動物門双腺綱桿線虫亜綱カンセンチュウ目カンセンチュウ科に属する雌雄同体の非寄生性細菌食性線虫である。孵化後第 1 期子虫 (L1 幼虫)、第 2 期子虫 (L2 幼虫)、第 3 期子虫 (L3 幼虫)、第 4 期子虫 (L4 幼虫)、young adult と成長し、およそ 4~5 日程度で卵から成虫に成熟する。寿命は約 3~4 週間であるが、生育不適な環境になると耐性型に変化し約 4 ヶ月生存する (図 1)。成虫は体長約 1 mm 程度で細胞数は約 1000 個と多細胞生物の中でも小型であるにもかかわらず、他の高等生物と同様に神経系、生殖系、筋肉、消化器系などの

組織を有する¹⁷⁾。1998年には多細胞生物としては初めて全ゲノム配列の解読が完了し、多くの遺伝子がヒトのオルソログであることや¹⁸⁾、遺伝子操作が容易でノックダウンおよびノックアウト型が比較的簡単に得られることから、モデル動物として広い分野で利用されている。例えば、ノーベル賞の受賞に至ったアポトーシスの発見、RNA干渉 (RNAi) 法の発見、そして緑色蛍光タンパク質の発見にはいずれも *C.elegans* がモデル生物として関わっている。近年ではがんのスクリーニング検査に *C.elegans* が有用であることが報告され¹⁹⁾、実際に早期がんの検査キットとして製品化されている。加えて、動物愛護の観点から動物実験の3R (Replacement, Reduction, Refinement) が強く求められるようになっており、動物実験が実施された一部商品を販売禁止とする国も増えてきている。これらの背景から多くの研究施設で実験動物使用数の削減や代替動物への移行が積極的に検討されており、動物倫理に抵触しない *C.elegans* のモデル動物としての需要は今後より一層高まることが予想される。栄養学的研究においても *C.elegans* の利用が検討されている^{20,21)}。

1-4. ¹³C 呼気分析法

呼気ガス診断は従来から疾病や手術に伴う生体機能の障害を調べる方法として用いられている。なかでも、¹³C でラベルされた標識化合物 (¹³C 標識化合物) を用いた呼気ガス診断は高い安全性から応用範囲が飛躍的に広がっている。¹³C は炭素 (¹²C) の中性子が1個多い安定同位体である。¹³C の自然存在率は約 1.1 %と少ないが、安定同位体の中では生体内で最も多く利用されている²²⁾。呼気中 ¹³C の分析には GC-MS、NMR 等を用いて ¹³C を直接定量する方法と、赤外線分光分析装置を用いて ¹³CO₂ と ¹²CO₂ の存在比を測定する方法がある。特に、後者は被験者の呼気を直接利用できることから簡便であり、臨床での種々の機能検査に応用されている。例えば、ピロリ菌の感染診断法として ¹³C-尿素呼気試験法が確立している。¹³C 呼気分析法は

[¹³C]標識化合物が消化管からの吸収、各組織での代謝という過程を経て呼気中に出現し、呼気中 ¹³CO₂/¹²CO₂ 比が増加することを利用して、このような特性から、¹³C 呼気分析法で得られるデータには吸収、代謝、排泄に至るまでの全身の生理的動態が関与する。SCFAs は速やかに吸収されエネルギーとして利用され、最終的に CO₂ となり体外に排出される。それゆえ、 [¹³C]SCFAs を用いることで吸収能や代謝能に影響がない非侵襲的な条件下で SCFAs の動態を測定することが可能である^{23,24)}。

1-5. *C.elegans* を用いた SCFAs 研究の現状と ¹³C 呼気分析法の応用

C.elegans はエネルギー代謝において特有の代謝経路を有している。例えば、糖新生において *C.elegans* はグルコース-6-フォスファターゼを有しておらず、グルコース-6 リン酸を一旦トレハロース合成経路にバイパスさせてグルコースを生成する²⁵⁾。

また、TCA 回路の一部を省略するグリオキシレートシャントと呼ばれる経路を有しており、この経路を利用することでアセチル-CoA を材料に糖新生を行うことができる。グリオキシレートシャントは生育環境が悪化した際に活性化され、トレハロースの生成を促進することで耐性型として長期的な生存を可能にする。このように一部の代謝経路はヒトとは異なるもののエネルギー代謝については概ねヒトと同様の代謝経路を有しており (図 2)、SCFAs 研究の分野においても *C.elegans* はモデル動物として利用されている。PA の代謝経路については、ヒトの高プロピオン酸血症における PA 代謝経路を解析するためのモデル生物として *C.elegans* を用いた Watson らの研究²⁶⁻²⁸⁾ によって PA 分解経路に関する遺伝子の転写レベルでの発現調節が詳細に明らかにされている (図 3)。しかしながら、線虫において摂取した SCFAs の個体全身を介した代謝産物の量的な変化を確認した報告は少ない。

筆者は、*C.elegans* が最終代謝産物として生成した CO₂ を拡散によって大気中に排出することに注目した。すなわち、 [¹³C]SCFAs を摂取させることで大気中に排出さ

れる $^{13}\text{CO}_2$ を測定することができれば、*C.elegans* においても非侵襲的、かつ定量的に代謝変化を検出できるはずである。 ^{13}C SCFAs を摂取させた *C.elegans* において、逆遺伝学的な遺伝子解析と大気中に排出される $^{13}\text{CO}_2$ を測定することによって代謝関連遺伝子の発現調節と代謝経路の定量的な変化を関連付けて解析できると考えられる。

1-6. 目的

本研究では、ポストバイオティクスである SCFAs の研究での新たな知見を得ることを目的とし、代謝関連遺伝子発現と代謝経路の定量的な変化を関連づけて分析する新しい方法を確立するために、逆遺伝学で一般的に用いられているモデル動物 *C.elegans* に対する ^{13}C 呼気分析の応用方法を開発し、その有用性について検討した（以下、本研究で開発した分析方法を $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析法とする）。また、 $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析法を用いて、エピジェネティックな調節作用が明らかになっている PA について、代謝関連遺伝子の発現と代謝経路の定量的な変化についても検討を行った。

1-7. 利益相反

本研究において開示すべき利益相反はない。

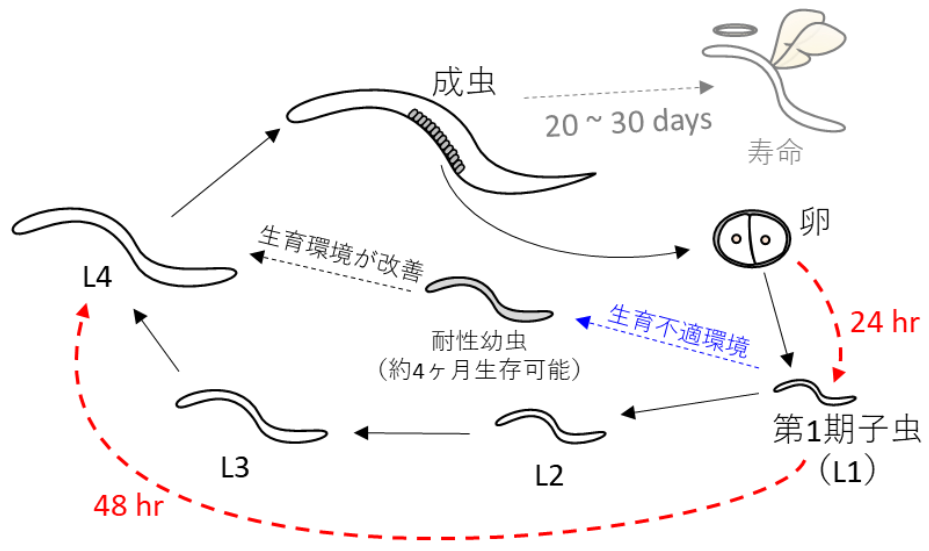


図1 *C.elegans* のライフサイクル

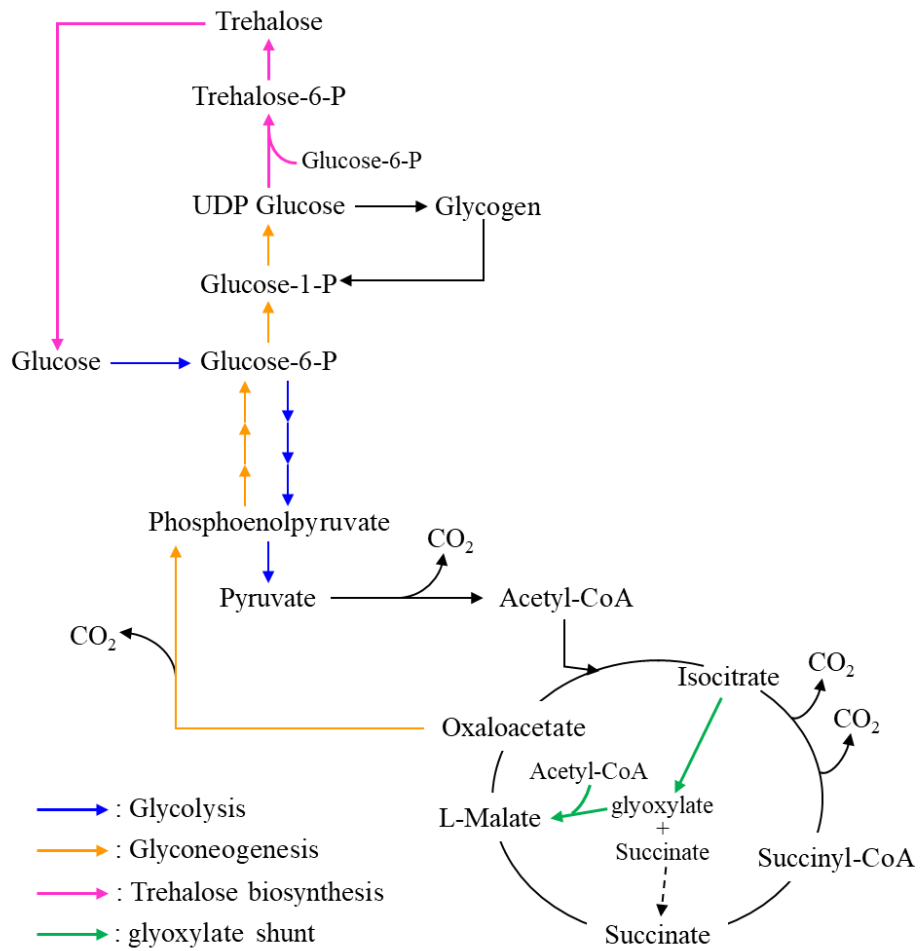


図2 *C.elegans* のエネルギー代謝経路

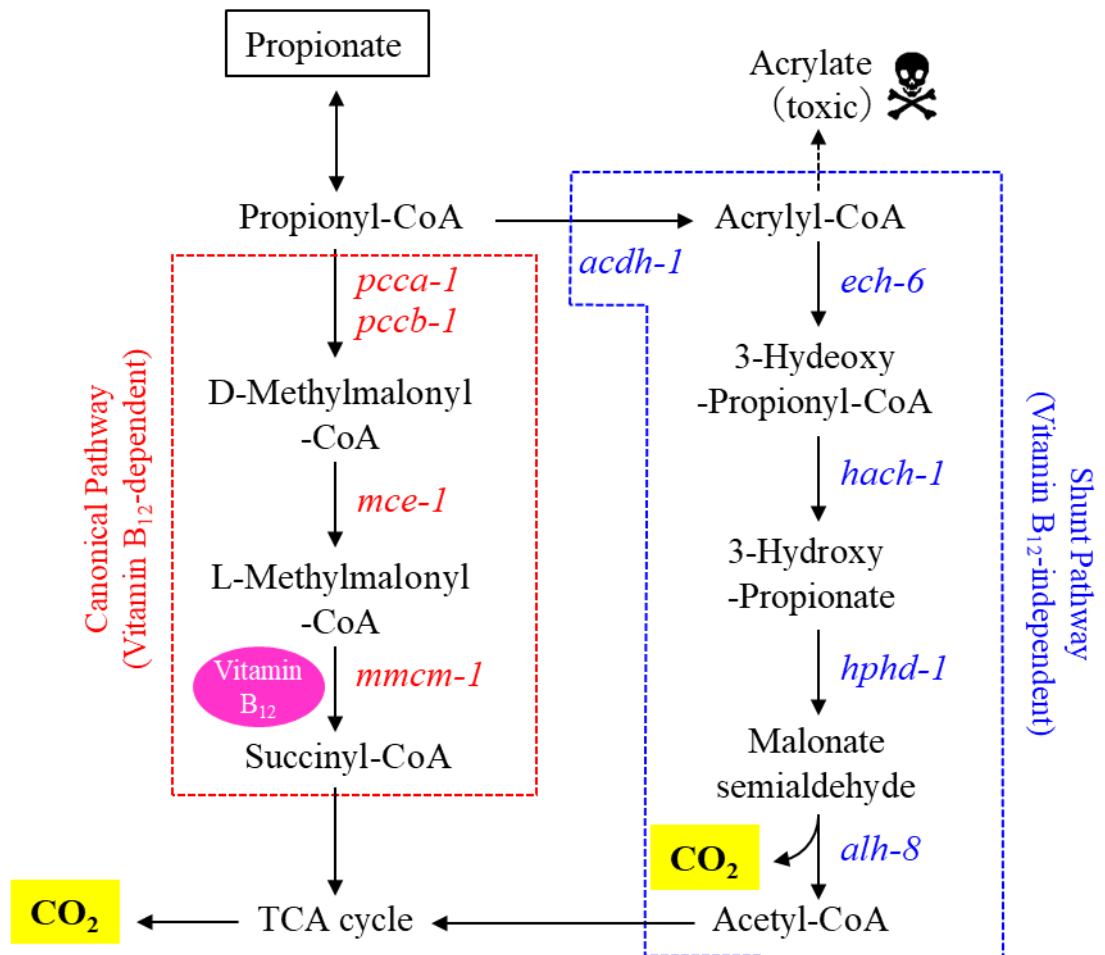


図3 *C.elegans* のプロピオン酸代謝経路²⁸⁾

斜体は遺伝子名を示す。*mmcm-1*は補酵素にビタミン B₁₂を必要とする。

第2章 *C.elegans* への $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析法の適用条件の検討

2-1. 目的

C.elegans に ^{13}C PA を投与することで、 $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析によって *C.elegans* の PA 代謝が測定可能であると考え、*C.elegans* から排出された $^{13}\text{CO}_2$ の回収方法について検討した。*C.elegans* の培養には非病原性である *Escherichia coli* OP-50 株 (OP-50) が一般的な飼料として用いられている。 ^{13}C 標識化合物を利用した場合、OP-50 が ^{13}C 標識化合物を異化することによって産生される $^{13}\text{CO}_2$ が $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析の結果に影響すると考えられる。そこで、飼料として用いる OP-50 が $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析結果に及ぼす影響を検討するために、OP-50 のみを添加した培地に ^{13}C 標識化合物を投与し、 $^{13}\text{CO}_2$ の出現の有無を確認した。なお、*C.elegans* の培養に用いる Nematode Growth Medium (NGM) には OP-50 の生育に必要なペプトンが含まれている。他の微生物のコンタミネーションの可能性を除外するため、実験で使用する培地はペプトンを含まない NGM (PF-NGM) を用いた。

2-2. 実験方法

2-2-1. *C.elegans* の飼育方法

C.elegans および OP-50 は *Caenorhabditis* Genetics Center (University of Minnesota, USA) から入手した。NGM は脱イオン水 975 mL あたり寒天 17.0 g, ペプトン 2.5 g, NaCl 3.0 g を加えて 121°C で 20 分間オートクレーブ滅菌を行った後、1M リン酸 buffer 25 mL, 1 M CaCl 1 mL, 1 M MgSO₄ 1 mL, 5 mg/mL コレステロール 1 mL を混和して作成した。OP-50 は LB Broth Base (LB 液体培地 : Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて 37°C で一晩培養し、9 cm シャーレに作成した NGM (9 cm NGM) に 1 枚当たり 400 μL 塗布して室温で一晩乾燥した。*C.elegans* は OP-50 を塗布した NGM 上で 20°C に設定したインキュベータ (Cool Incubator, 三菱電機エンジ

ニアリング株式会社) 内で培養し、1 週間ごとに *C.elegans* が存在する培地の一部を切り取って新しい NGM に継代した。

2-2-2. *C.elegans* の同調化

ライフステージを揃えるために実験前日に *C.elegans* の同調化処理を行った。同調化溶液は 100 mL あたり脱イオン水 50 mL, 5 %次亜塩素酸ナトリウム溶液 40 mL, 5 M NaOH 10 mL を混和して作成した。M9 buffer は Na_2HPO_4 6.0 g, KH_2PO_4 4.0 g, NaCl 5.0 g を脱イオン水で 1 L にメスアップして 121°C で 20 分間オートクレーブ滅菌を行った後、1 M MgSO_4 1 mL を混和して作成した。NGM 上の *C.elegans* を M9 buffer にて 15 mL チューブに回収し、2000 rpm で 1 分間遠心分離して液量が 1 mL になるまで上清を取り除いた。15 mL チューブの 3.5 mL の目盛りまで同調化溶液を加え、2~3 分間混和し、卵以外を溶解した。直ちに 2000rpm で 1 分間遠心して上清を取り除き、15 mL チューブの 6 mL の目盛りまで M9 buffer を加えて沈殿を完全に懸濁し、2000 rpm で 1 分間遠心して上清を取り除き、卵を洗浄した。M9 buffer による洗浄を 3 回繰り返し、最後の洗浄の際 15 mL チューブの 1 mL の目盛りまで上清を捨てた後、沈殿を完全に懸濁してインキュベータにて孵化するまで 20°C で約 24 時間保管した。

2-2-3. $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析装置の構成と測定方法

$^{13}\text{CO}_2$ ガス分析装置はラットやマウスに応用した Uchida らの報告²⁹⁾を改良して *C.elegans* へ応用した。135 mL 容量の小型真空デシケータ (AS ONE Co., 大阪) のチューブコネクタに外径 6 mm チューブを取り付け、密閉するためにコックを取り付けた。バルブには外径 8 mm チューブを取り付けた。*C.elegans* と ^{13}C 標識化合物の混合液を 6 cm シャーレに作成した 6 cm PF-NGM 上に添加した後、直ちにデシケー

ター内に密閉し、20°Cのインキュベータで測定を行うまで保管した。測定の際、 $\phi 8$ mm チューブに標準ガス (95% O₂/5% CO₂) 入りバッグを取り付け、 $\phi 6$ mm チューブにシリンジを取り付けた。コックを開きながらシリンジでデシケーター内の空気を回収し、呼気採取バッグ (大塚製薬株式会社, 大阪) に約 250 mL 採取した。赤外線分光分析装置 POC one (大塚製薬株式会社) に呼気採取バッグとベースラインとして標準ガス入りバッグを接続し、デシケーター内の ¹³CO₂/¹²CO₂ 比 ($\Delta^{13}\text{CO}_2\text{‰}$) を測定した (図 4)。測定はデシケーター内の $\Delta^{13}\text{CO}_2\text{‰}$ が陰性になるまで繰り返し行い、データの比較は測定した $\Delta^{13}\text{CO}_2\text{‰}$ の総和 ($\Sigma \Delta^{13}\text{CO}_2\text{‰}$) にて行った。

2-2-4. 実験試薬

[¹³C]標識化合物には、1位の炭素を ¹³C でラベルした [¹³C]プロピオン酸ナトリウム ([1-¹³C]PA, 分子量 97.05, [1-¹³C, 99 %], Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA) を滅菌生理食塩水で必要な濃度に調製して用いた。¹³C でラベルされていない一般的な PA はプロピオン酸ナトリウム (和光純薬工業株式会社, 大阪) を用いた。

2-2-5. 走化性実験による *C.elegans* のプロピオン酸に対する嗜好性の確認

(1) 走化性実験

走化性実験は margie らの方法³⁰⁾を参考に行った。洗浄液は 1M KH₂PO₄ (KOH で pH 6 に調整) 0.5 mL、0.01% Tween20 0.5 mL、1M CaCl₂ 0.1 mL、1M MgSO₄ 1.0 mL を純水 1 L にメスアップして作成した。同調化した *C.elegans* (L1) は OP-50 を塗布した NGM 上で L4 幼虫まで 20°C で培養した後、洗浄液 1 mL を NGM に投与して 15 mL チューブに L4 幼虫を回収した。直ちに洗浄液を 15 mL チューブの 10 mL の目盛りまで加えて 2000 rpm で 1 分間遠心分離して 15 mL チューブの 1 mL の目盛りまで上清を取り除いた。これを 3 回繰り返した後、M9 buffer にて同様の操作を 3

回繰り返し、線虫を洗浄した。洗浄した線虫は M9 buffer にて約 30 匹/10 μ L になるように希釈して実験に用いた。走化性試験用の培地は 9 cm NGM で作成した。マジックペンを用いてシャーレの裏側の原点を中心に 0.5cm の円をマークし、両側に線を引いた。左側の線より左を A エリア、右側の線より右を B エリアとした。中心から左右に 3 cm、そこからさらに上下に 1.5 cm 進んだところに点をマークした (図 5)。線虫が無作為に動かないように A エリアおよび B エリアの下側の点に忌避剤として 1 M NaN_3 1 μ L を滴下して乾燥させた。洗浄した線虫を中心の円内に約 30 匹添加した後、A エリアの上側の点に PA を 1 μ L 投与して直ちにフタを閉めパラフィルムで密閉した。室温で 1 時間静置し、その時点で各エリアの線虫の数をカウントした。各エリアの線虫数から走化性インデックス (Chemotaxis Index, $\text{CI} = (\text{A エリアの線虫数} - \text{B エリアの線虫数}) / (\text{A エリアの線虫数} + \text{B エリアの線虫数})$) を算出した。正の CI で PA に正の嗜好性、負の CI で PA に負の嗜好性を示すと判断した。PA 濃度は 1 mM, 10 mM, 100 mM に調製して用いた。

(2) PA 摂取の確認

10 mM PA にカルミンを加え超音波粉碎機 (超音波工業株式会社, 東京) で懸濁した PA-カルミン懸濁液を線虫培養中の NGM に 10 μ L 滴下し、線虫の PA-カルミン懸濁液の摂取を実体顕微鏡で直接確認した。

2-2-6. 大腸菌 OP-50 株が[1- ^{13}C]プロピオン酸を用いた $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析結果に及ぼす影響

OP-50 を LB 液体培地で培養した後、未滅菌の OP-50 (生菌)、121°C で 20 分間オートクレーブ滅菌を行った OP-50 (HK OP-50)、75°C で 1 分間処理した OP-50

(75°C OP-50) をそれぞれ 6 cm PF-NGM に 1 枚当たり 40 μ L 塗布した。OP-50 を塗布した NGM は室温で 24 時間静置して乾燥させ、150 mM [1- ^{13}C]PA を 100 μ L 投

与した後、直ちに密閉した。インキュベータで 20°C、72 時間培養後、¹³CO₂ ガス分析を行った。

2-2-7. ¹³CO₂ ガス分析法を用いた *C.elegans* のプロピオン酸代謝の測定条件

同調化した L1 幼虫を約 100 匹/5 μL になるように M9 buffer で希釈し、L1 幼虫を含む懸濁液 (L1 懸濁液) を作成した。96 well plate に 1 well あたり L1 懸濁液を 40 μL (約 800 匹)、HK OP-50 を 40 μL、M9 buffer を 20 μL 添加して L4 幼虫まで 20°C のインキュベータで培養した。¹³CO₂ ガス分析の用量応答性を検討するため、各 well に [1-¹³C]PA の最終濃度が 1 mM, 25 mM, 50 mM/150 μL となるように投与した。

20°C のインキュベータで 72 時間培養後、¹³CO₂ ガス分析を行った。また、¹³CO₂ ガス分析における [1-¹³C]PA 投与後の培養時間と Δ¹³CO₂‰ の関係を検討するため、[1-¹³C]PA を最終濃度が 50 mM/150 μL となるように投与して直ちに密閉した後、20°C で 24, 48, 72 時間培養し ¹³CO₂ ガス分析を行った。

2-2-8. 統計処理

結果は平均値 ± SE (標準誤差) で示した。各データの統計処理は、統計ソフト SPSS Statistics 23 (IBM, USA) を用いた。データはいずれも一元分散分析

(ANOVA) を行い、有意差がある場合、群間の平均値を比較する場合は Tukey-Kramer の方法、各処理群を control と比較する場合には Dunnett の方法を用いた。いずれの結果も、危険率が 5 % 未満 ($p < 0.05$) を有意とみなした。

2-3. 結果

2-3-1. 走化性実験による *C.elegans* のプロピオン酸に対する嗜好性の確認

走化性実験の結果を図 6 に示す。すべての PA 濃度で正の走化性を示した (1 mM : $CI = 0.12 \pm 0.10$, 10 mM : 0.29 ± 0.10 , 100mM : 0.26 ± 0.13)。また、実体顕微鏡にて PA-カルミン懸濁液の摂取および肛門部からのカルミンの排泄が確認された。PA-カルミン懸濁液を摂取した *C.elegans* を光学顕微鏡にて観察したところ、咽頭および消化管でのカルミンの存在が確認された (図 7)。

2-3-2. 大腸菌 OP-50 株が[1-¹³C]プロピオン酸を用いた ¹³CO₂ ガス分析結果に及ぼす影響

¹³CO₂ ガス分析の結果を図 8 に示す。生菌群ではデシケーター内に ¹³CO₂ が検出され ($\Sigma \Delta^{13}\text{CO}_2\text{‰} = 1997.4 \pm 262.4$)、75°C OP-50 群においてもわずかに ¹³CO₂ が検出された ($\Sigma \Delta^{13}\text{CO}_2\text{‰} = 0.8 \pm 0.8$)。HK OP-50 群では ¹³CO₂ は検出されなかった。

2-3-3. ¹³CO₂ ガス分析法を用いた *C.elegans* のプロピオン酸代謝の測定条件

[1-¹³C]PA 濃度に対する ¹³CO₂ 産生量の用量応答性の検討結果を図 9 に示す。すべての PA 濃度で ¹³CO₂ の出現が確認された。(1mM : $\Sigma \Delta^{13}\text{CO}_2\text{‰} = 7.8 \pm 0.6$, 25 mM : 37.9 ± 1.6 , 50 mM : 58.4 ± 4.0)。また、投与した PA 濃度と ¹³CO₂ 産生との関係には強い正の相関 ($r = 0.99$) があり、用量応答性が認められた。[1-¹³C]PA 投与後の培養時間と ¹³CO₂ 産生との関係を図 10 に示す。PA 投与 24 時間後には ¹³CO₂ 出現が確認された ($\Sigma \Delta^{13}\text{CO}_2\text{‰} = 10.6 \pm 1.4$)。48 時間後には約 2 倍の値となり (20.9 ± 1.7)、72 時間後には定常に達した (19.8 ± 1.5)。

2-4. 考察

C.elegans の消化管はわずか 20 個の細胞で構成されているが、消化、吸収、代謝および自然免疫応答など複数の機能を持っている。*C.elegans* において、PA は消化管細胞で代謝される³¹⁾。2-3-1 の結果より、*C.elegans* は PA に対して嗜好性を示し自発的に摂取することが確認されたため、*C.elegans* への ¹³C 呼気分析法の応用に [1-¹³C]PA が利用可能であることが示唆された。なお、高濃度の PA は *C.elegans* に毒性を示し、60 mM 以上の濃度で生存率が急激に低下することから²⁷⁾、本実験で用いる PA 濃度については 50 mM を最大濃度に設定した。[1-¹³C]PA を *C.elegans* に投与すると ¹³CO₂ の出現が確認されたことから、投与した PA を *C.elegans* が摂取し、消化管で吸収後、代謝したと考えられる。[1-¹³C]PA 由来の ¹³CO₂ の出現は、投与した ¹³C 化合物の摂取と消化管からの吸収、体内での代謝、ならびに CO₂ の排泄のすべての過程の影響を受けると考えられる。本実験では *C.elegans* が PA を定量的に摂取したかどうかは不明であるが、投与した [1-¹³C]PA の濃度と ¹³CO₂ の出現に正の相関が認められた。これらの結果から、*C.elegans* の PA 代謝能の測定に ¹³C 呼気分析法が応用可能であることが示唆された。

C.elegans の培養には一般的に非病原性大腸菌 OP-50 株が飼料として用いられている。しかしながら、生きた状態の OP-50 は投与した [1-¹³C]PA を代謝して大量の ¹³CO₂ を排泄するため、¹³CO₂ ガス分析に用いる *C.elegans* の培養には殺菌処理された OP-50 を飼料とする必要がある。大腸菌は 65°C 以上の加熱により容易に死滅することが知られている³²⁾。しかしながら、75°C で 1 分間処理した OP-50 に [1-¹³C]PA を投与するとわずかであるが ¹³CO₂ が検出され、[1-¹³C]PA 代謝が確認された。大腸菌は抗生物質の曝露など生育に好ましくない条件下においては、生きてはいるが培養できない (Viable But Non-Culture, VBNC) 状態になる^{33,34)}。VBNC 状態の細菌は、正常な生菌と比較して著しく劣っているものの代謝活性を示すことが知られている³⁵⁾。本研究で使用した 75°C OP-50 100 μL を NGM 培地に塗布し、37°C で 48 時間培養した後

に実体顕微鏡で培地を確認したところ、コロニーの出現は認められなかった。一般的な低温殺菌条件で処理した OP-50 は少なくとも培養不能な状態まで不活化されているが、 $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析結果に影響を及ぼすことが示唆された。これに対して、HK OP-50 では $^{13}\text{CO}_2$ が検出されなかった。また、実験終了後も *C.elegans* の活動が確認されたことから、HK OP-50 が *C.elegans* の活動に及ぼす負の影響は小さいと判断し、以降の実験でも HK OP-50 を飼料として用いた。しかしながら過剰な殺菌処理は飼料としての栄養価を低下させる可能性があるため、OP-50 の適切な殺菌条件についても今後検討すべき課題である。

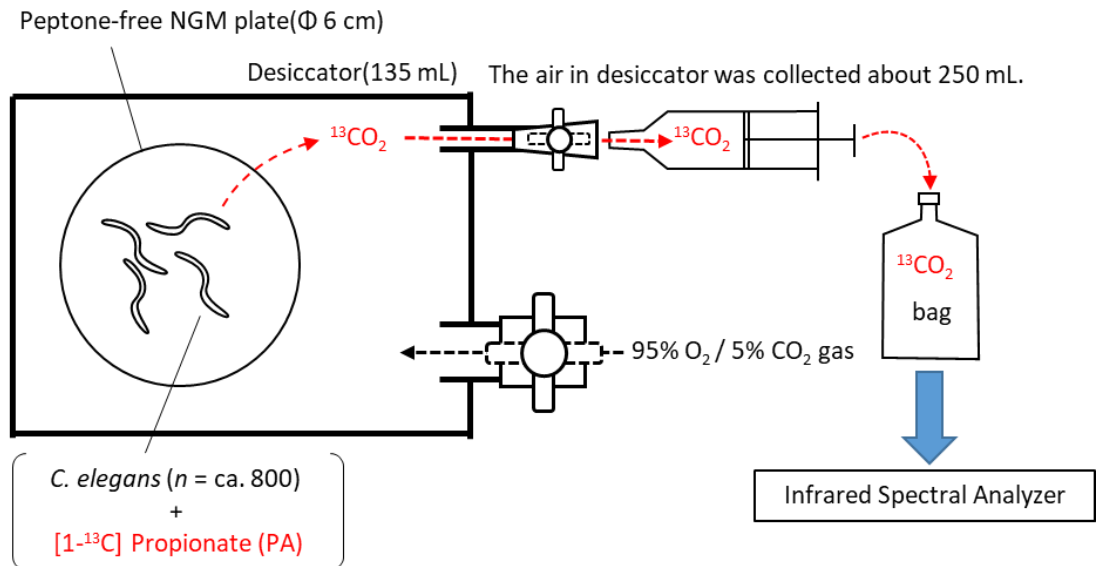


図4 $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析の構成

135 mL 容量の小型真空デシケーターのチューブコネクタに $\phi 6$ mm チューブとコックを取り付けた。バルブには $\phi 8$ mm チューブを取り付けた。*C.elegans* と [^{13}C]プロピオン酸の混合液を 6 cm シャーレに作成したペプトンフリーNGM 上に添加した後、直ちにデシケーター内に密閉し、測定まで 20°C に設定したインキュベーターで保管した。 $\phi 8$ mm チューブに標準ガス (95% O_2 / 5% CO_2) 入りバッグ、 $\phi 6$ mm チューブにシリンジを取り付けてデシケーター内の空気を回収した後、呼気採取バッグに約 250 mL 採取した。赤外線分光分析装置 POC one に呼気採取バッグと標準ガス入りバッグ (ベースライン) を装着し、呼気採取バッグ内に回収した空気の $^{13}\text{CO}_2$ / $^{12}\text{CO}_2$ 比を測定した。

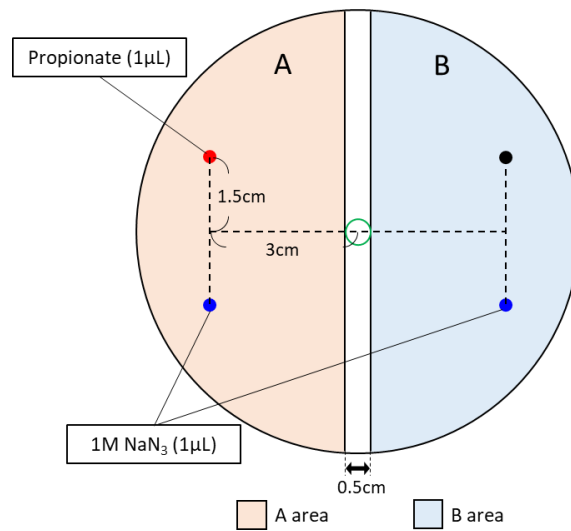


図5 走化性試験

走化性試験用の培地は9 cm NGMで作成した。線虫が無作為に動かないようにAエリアおよびBエリアの下側に忌避剤(1 M NaN_3) 1 μL を滴下して乾燥させた。洗浄した線虫を中心に約30匹添加した後、Aエリアの上側にプロピオン酸を1 μL 投与して直ちにフタを閉めパラフィルムで密閉した。室温で1時間静置し、その時点で各エリアの線虫の数をカウントした。各エリアの線虫数から Chemotaxis Index (Aエリアの線虫数 - Bエリアの線虫数)/(Aエリアの線虫数 + Bエリアの線虫数)を算出した。

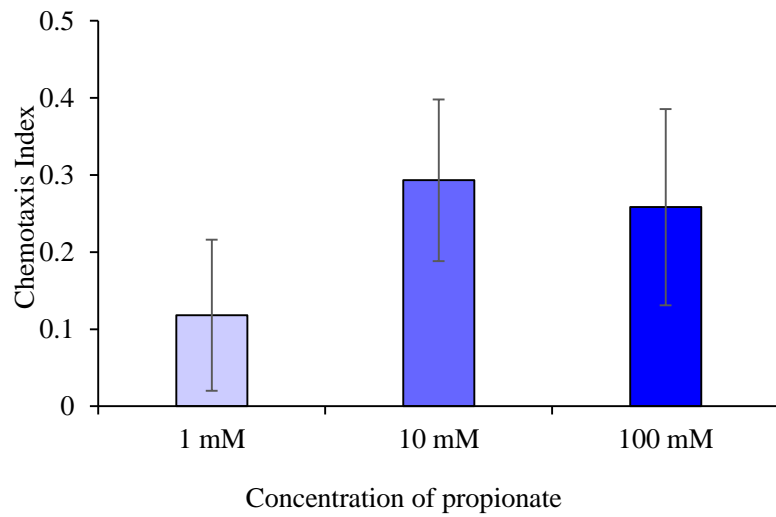


図6 プロピオン酸 (PA) の濃度変化が線虫の走化性に及ぼす影響

1 mM : 1 mM PA を投与した NGM

10 mM : 10 mM PA を投与した NGM

100 mM : 100 mM PA を投与した NGM

mean ± SE ($n = 6$ plates)

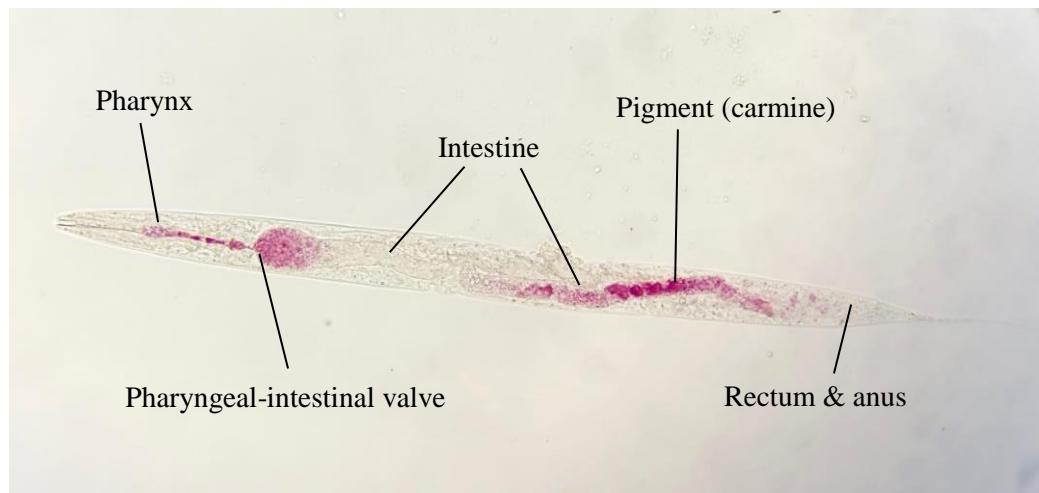


図7 PA-カルミン懸濁液を摂取した *C.elegans* の顕微鏡写真

咽頭および消化管内にカルミンの存在が確認された。また、肛門部よりカルミンを含んだ消化管内容物の排泄が確認された。

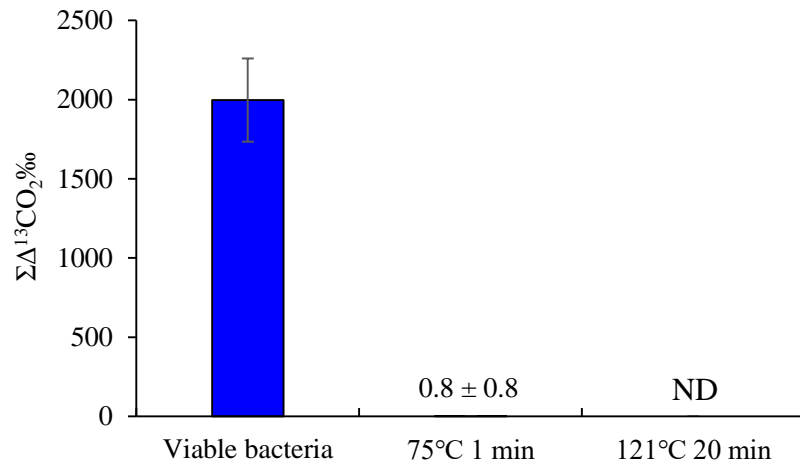


図8 OP-50 が[1-¹³C]プロピオン酸を用いた ¹³CO₂ ガス分析結果に及ぼす影響
 いずれの群も 150 mM [1-¹³C]PA を 100 μL 投与し、20°C で 72 時間培養した後に
¹³CO₂ ガス分析を行った。

Viable bacteria : 未滅菌 OP-50 群

75°C 1 min : 75°C 1 分で処理した OP-50 群

121°C 20 min : オートクレーブ滅菌で処理した OP-50 群

mean ± SE (n = 6 plates) , ND : Δ¹³CO₂‰未検出

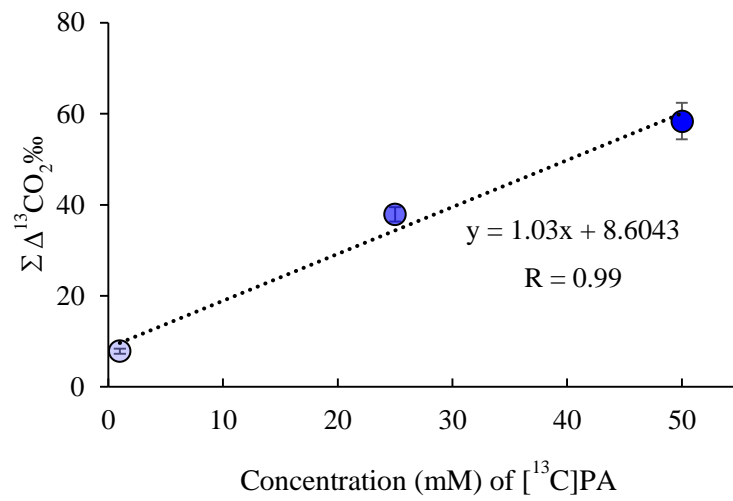


図9 *C.elegans* における[1-¹³C]PA 濃度と ¹³CO₂ 産生の用量応答性

[1-¹³C]PA を最終濃度 1 mM, 25 mM, 50 mM となるように投与し、20°Cで72時間培養した後に ¹³CO₂ ガス分析を行った。

mean ± SE (*n* = 4 plates)

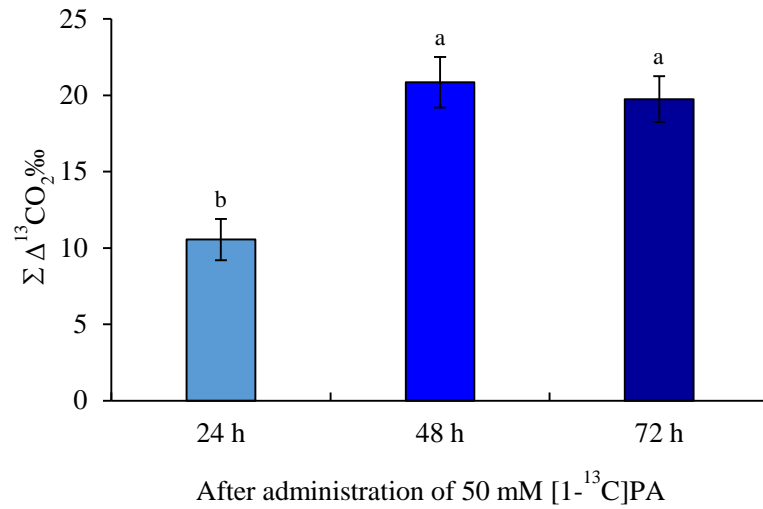


図 10 *C.elegans* における[1-¹³C]PA 投与後の培養時間と ¹³CO₂ 産生との関係

[1-¹³C]PA を最終濃度 50 mM となるように投与し、20°Cで 24 時間、48 時間、72 時間培養した後にそれぞれ ¹³CO₂ ガス分析を行った。

mean ± SE ($n = 4$ plates) , 異なるアルファベットは有意差を示す ($p < 0.05$)

第3章 ビタミン B₁₂ 投与が *C.elegans* のプロピオン酸代謝に及ぼす影響

3-1. 目的

C.elegans の PA 代謝経路にはビタミン B₁₂ (VB₁₂) 依存性経路と VB₁₂ 非依存性経路 (シャント経路) があり、体内に保有する VB₁₂ 量に応じて異なる代謝経路で PA を代謝することが知られている。通常、PA は VB₁₂ 依存性経路において代謝され、PA から生じるプロピオニル-CoA がメチルマロニル-CoA に変換され、さらに VB₁₂ を補酵素とするメチルマロニル-CoA ムターゼによってスクシニル-CoA となる。しかしながら、VB₁₂ の欠乏や過剰な PA の摂取によって VB₁₂ 依存性経路での PA 代謝能が飽和状態になった場合、PA はプロピオニル-CoA からアクリリル-CoA を経て有毒物質のアクリル酸に変換される。それを阻止するため、非常経路としてシャント経路が急速に誘導される。シャント経路は、アクリリル-CoA から 3-ヒドロキシプロピオン酸を経てアセチル-CoA と CO₂ に代謝する経路であり、この経路によってアクリル酸の生成を回避し、結果的に PA の過剰蓄積による毒性を抑制する (図 3)。ヒトにおいても先天性代謝異常症によって高プロピオン酸血症となった患者で 3-ヒドロキシプロピオン酸が検出されるため、シャント経路に類似した経路を有していると考えられる³⁶⁾。過剰な PA 摂取によって誘導されるシャント経路は VB₁₂ が充足すると抑制され、再び VB₁₂ 依存性経路での代謝が優勢となる。このように、PA 代謝経路は PA と VB₁₂ の量的な関係によって調節されることから、PA 代謝経路のエピジェネティックな調節により結果的に最終代謝産物である CO₂ の生成に影響を及ぼすと考えられる。しかしながら、代謝経路の変化による PA 代謝量の変化を確認した報告は少ない。本研究では、代謝経路の変化が実際の代謝量に及ぼす影響について明らかにするため、VB₁₂ 投与が PA 代謝に及ぼす影響について RT-PCR 法を用いて PA 代謝関連遺伝子発現を測定するとともに、¹³CO₂ ガス分析法を用いて実際の代謝を測定し、遺伝子発現と表現型の

双方から PA 代謝変化を検討した。また、PA 代謝には糖新生が関わるため、グリコーゲン蓄積の変化についても検討した。

3-2. 実験方法

3-2-1. ビタミン B₁₂ 投与が[1-¹³C]プロピオン酸からの ¹³CO₂ 産生に及ぼす影響

VB₁₂ はシアノコバラミン（富士フィルム和光純薬株式会社、大阪）を用いた。2-2-7 と同様の方法で L1 幼虫懸濁液を作成した。96 well plate に 1 well あたり L1 懸濁液を 40 μL、HK OP-50 を 40 μL、M9 buffer を 18 μL、50 μM VB₁₂ を 2 μL（1 μM VB₁₂/100 μL）添加して L4 幼虫まで 20°C で培養した（PA+VB₁₂ 群）。50 μM VB₁₂ を M9 buffer に置き換えて同様に培養した *C.elegans* を PA 群とした。各 well に[1-¹³C]PA を最終濃度が 50 mM/150 μL となるように投与して直ちに密閉した後に 20°C で 24 時間あるいは 48 時間培養し、¹³CO₂ ガス分析を行った。

3-2-2. プロピオン酸およびビタミン B₁₂ 投与がグリコーゲン蓄積に及ぼす影響

(1) ヨウ素染色法による *C.elegans* の体内グリコーゲン蓄積の確認

ヨウ素染色法は Frazier らの方法³⁷⁾に準じて行った。L1 幼虫を 3-2-1 と同様の培養液で L4 幼虫になるまで 20°C で培養した（PA+VB₁₂ 群および PA 群）。各 well に PA を最終濃度が 50 mM/150 μL となるように投与（Control 群は M9 buffer を投与）した後に 9 cm PF-NGM の上に全量添加し、20°C で 24 時間あるいは 48 時間培養した。ヨウ素染色する際は、線虫が存在する部分を培地ごと切り出し、スライドガラスに移した。ヨウ素（和光純薬工業株式会社）の試薬ボトルの蓋を開封し、切り出した培地にヨウ素蒸気が曝露するようにスライドガラスを蓋口に置いて 60 秒間静置した。染色写真は BX-50 顕微鏡（OLYMPUS, 日本）に取り付けられたオリンパス DP22 カメラ（OLYMPUS）を使用して、ヨウ素蒸気の曝露から 60 秒後に撮影した。

(2) *C.elegans* の体内に蓄積したグリコーゲン量の定量

Glycogen assay kit (Sigma Aldrich Chemical Co., USA) を用いて測定した。ヨウ素染色法と同様に培養した線虫 (Control 群、PA 群および PA+VB₁₂ 群) を M9 buffer で 15 mL チューブに回収し、遠心分離して上清を取り除いた後、2 mL チューブに移し超純水で 100 μ L になるように調製した。線虫を氷冷しながら超音波粉碎機 (CHO-ONPA KOGYO, 東京) で 10 秒 \times 3 回処理して粉碎し、5 分間煮沸した後、遠心分離 (13500 rpm、5 分間) した。その上清を用いて、測定キットの方法に準じてグリコーゲン量を測定した。また、沈殿物は M9 buffer で調製した 8 M 尿素溶液を加えて溶解し、タンパク質を TaKaRa BCA protein kit (タカラバイオ株式会社) を用いて定量した後、グリコーゲン量 (μ g) をタンパク質量 (μ g) で除して正規化した。

3-2-3. ビタミン B₁₂ 投与がプロピオン酸代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響

遺伝子発現は半定量的 RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) 法を用いて測定した。

(1) *C.elegans* の調製

OP-50 を塗布した NGM に同調化した L1 幼虫を添加し L4 幼虫まで 20°C で培養した後、M9 buffer で回収し約 1000 匹となるように 15 mL チューブに分注した。PA を最終濃度 50 mM となるように投与 (PA 群) および PA を最終濃度 50 mM、VB₁₂ を最終濃度 1 μ M となるように投与し (PA+VB₁₂ 群)、20°C で 24 時間培養した。VB₁₂ および PA を M9 buffer に置き換えた群を Control 群とした。培養後、2000 rpm で 1 分間遠心分離して上清を取り除いた。15 mL チューブの 6 mL の目盛りまで M9 buffer を加えて沈殿を完全に懸濁し、2000 rpm で 1 分間遠心して上清を取り除き、*C.elegans* を洗浄した。M9 buffer による洗浄を 3 回繰り返した後、液体窒素を用いて沈殿を凍結し、乳鉢でパウダー状になるまで粉碎した。

(2) RNA の抽出、精製および cDNA の合成

RNA の抽出、精製は RNeasy Plus micro kit (Qiagen, USA) を用いた。粉碎物を RNeasy Plus micro kit のマニュアルに準じて処理し、精製した total RNA 濃度を紫外可視分光光度計 (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡株式会社, 東京) を用いて、抽出した total RNA 200 ng を鋳型に cDNA を合成した。

(3) プライマー

プライマーは、VB₁₂ 依存性 PA 分解経路酵素遺伝子 (*pcca-1*, *pccb-1*, *mce-1*, *mmcm-1*)、VB₁₂ 非依存性 PA 分解経路酵素遺伝子 (*acd-1*, *ech-6*, *hach-1*, *hphd-1*, *alh-8*)、糖新生関連酵素遺伝子 (*pck-1*, *gsy-1*)、トレハロース代謝酵素遺伝子 (*gob-1*, *tre-1*, *tre-2*, *tre-3*) を用いた (表 1)。

(4) PCR

PCR チューブに Emerald Amp PCR Master Mix (EA: タカラバイオ株式会社, 滋賀) を 12.5 μ L、10 μ M forward primer を 0.5 μ L、10 μ M reverse primer を 0.5 μ L、cDNA を 3 μ L、超純水を 8.5 μ L を混合した。サーマルサイクラーの温度サイクルは 94°C を 2 分間の後、denaturation temperature、annealing temperature、elongation temperature をそれぞれ 94°C・30 秒間、55°C・30 秒間、72°C・1 分間で 1 サイクルとし、30 サイクル繰り返して PCR 反応を行った。PCR 産物は電気泳動によって確認した。泳動用 1% アガロースゲル (泳動用ゲル) の溶媒および泳動槽培溶媒は 0.5 \times TBE (Tris-HCl/ホウ酸/EDTA) を用いた。泳動用ゲルはアガロース濃度が 1% となるように 0.5 \times TBE を加えて加熱溶解し、核酸蛍光染色試薬 GelRed (Biotium, Inc., USA) を 1 μ L/100 mL 加えてコームを設置した型に流し込み、完全にゲル化するまで室温で約 30 分間静置した。ゲル化した泳動用ゲルを 0.5 \times TBE で満たした泳動槽に移し、試料溝に 100 bp DNA Ladder (タカラバイオ株式会社) を 3 μ L、PCR 産物を 3

μL を注入した。泳動は 135 V で 20 分間行った。泳動後、WSE-5300 プリントグラフ CMOS I (アトー株式会社, 東京) にてゲル上のバンドを撮影した。画像解析ソフト ImageJ を用いて撮影データからバンドの濃淡を定量化した。なお、それぞれの遺伝子発現量をハウスキーピング遺伝子である *snb-1* の発現量をもとに正規化し、さらにそれぞれの遺伝子発現量を Control 群の遺伝子発現量で除して標準化した。

3-2-4. ビタミン B₁₂ 投与が好氣的環境下でのプロピオン酸代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響

3-2-1 と同様に L1 幼虫を 1 μM VB₁₂/100 μL の培養液 (PA+VB₁₂群) および VB₁₂ を M9 buffer に置き換えた培養液 (PA 群) で L4 幼虫になるまで 20°C で培養した。各 well に PA を最終濃度が 50 mM/150 μL となるように投与した後に 6 cm PF-NGM の上に全量添加し、20°C で 24 時間あるいは 48 時間培養した。VB₁₂ および PA を M9 buffer に置き換えた群を Control 群とした。6 cm PF-NGM 上の線虫を M9 buffer で 15 mL チューブに回収し、2000 rpm で 1 分間遠心分離して上清を取り除いた後、3-2-3 と同様の方法で遺伝子発現を定量した。プライマーは 3-2-3 と同様のものに追加して TCA 回路関連酵素遺伝子 (*pdha-1*, *icl-1*) を用いた (表 1)。

3-2-5. 統計処理

2-2-8 と同様に各データの統計処理を行った。いずれの結果も、危険率が 5 %未満 ($p < 0.05$) を有意とみなした。

3-3. 結果

3-3-1. ビタミン B₁₂ 投与が[1-¹³C]プロピオン酸からの ¹³CO₂ 産生に及ぼす影響

$^{13}\text{CO}_2$ ガス分析の結果を図 11 に示した。[1- ^{13}C]PA 投与後 24 時間, 48 時間培養のいずれにおいても、PA 群と比較して PA+VB₁₂ 群で $\Sigma \Delta^{13}\text{CO}_2\text{‰}$ が有意に増加した。

3-3-2. プロピオン酸およびビタミン B₁₂ 投与がグリコーゲン蓄積に及ぼす影響

ヨウ素染色法の結果を図 12 に示した。ヨウ素染色法では、すべての群で *C.elegans* の貯蔵グリコーゲンが赤色に染色された。Control 群と比較して PA 群および PA+VB₁₂ 群でより強い染色がみられ、特に咽頭部、消化管部および尾部でグリコーゲンの蓄積が確認された (図 12C-F)。グリコーゲン測定の結果を図 13 に示した。グリコーゲン蓄積量は PA 投与 24 時間後で Control 群と比較して PA 群および PA+VB₁₂ 群で有意に増加し、さらに PA 群と比較して PA+VB₁₂ 群で有意に増加した。PA 投与 48 時間後では、Control 群と PA 群の間で有意な差は見られなかったが、PA+VB₁₂ 群において Control 群および PA 群と比較してグリコーゲン蓄積量の有意な増加が見られた。

3-3-3. ビタミン B₁₂ 投与がプロピオン酸代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響

遺伝子発現の結果を図 14 に示す。PA 分解経路酵素遺伝子で PA 群と比較して PA+VB₁₂ 群で VB₁₂ 依存性 PA 分解経路酵素遺伝子である *mce-1* の発現および VB₁₂ 非依存性 PA 分解経路酵素遺伝子である *ech-6*, *hphd-1* の発現が有意に低下した (図 14A)。グリコーゲン酵素遺伝子およびトレハロース代謝酵素遺伝子では PA 群と PA+VB₁₂ 群で有意な差は見られなかった (図 14B)。

3-3-4. ビタミン B₁₂ 投与が好氣的環境下でのプロピオン酸代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響

遺伝子発現の結果を図 15 に示した。PA 分解経路酵素遺伝子では、PA 投与後 24 時間培養において PA 群と比較して PA+VB₁₂群で VB₁₂非依存性 PA 分解経路酵素遺伝子である *ech-6*, *hphd-1*, *alh-8* の発現が有意に上昇した。PA 投与後 48 時間培養においては PA 群と比較して PA+VB₁₂群で VB₁₂非依存性 PA 分解経路酵素遺伝子である *acdh-1*, *ech-6*, *hach-1*, *hphd-1* の発現が有意に低下した (図 15A)。糖新生関連酵素遺伝子では PA 投与後 48 時間培養において PA 群と比較して PA+VB₁₂群で *pck-1*, *gsy-1* の発現が有意に上昇した。トレハロース代謝酵素遺伝子では、PA 投与後 24 時間培養において PA 群と比較して PA+VB₁₂群で *tre-2* の発現が有意に上昇した (図 15B)。TCA 回路関連酵素遺伝子では、PA 投与後 24, 48 時間培養のいずれも PA 群と PA+VB₁₂群で有意な差は見られなかった (図 15C)。

3-4. 考察

PA は VB₁₂ 依存性経路またはシャント経路を介して代謝される。VB₁₂ が豊富な条件下では、PA は VB₁₂ 依存性経路で優先的に代謝されるためシャント経路は抑制される。一方、VB₁₂ が欠乏している条件下では VB₁₂ 依存性経路を介して代謝される PA が減少し、シャント経路が誘導される²⁸⁾。シャント経路では PA がマロン酸セミアルデヒド (MSA) に代謝され、さらに MSA からアセチル-CoA と CO₂ が生成される。また、アセチル-CoA は TCA 回路で完全に代謝され CO₂ を生成する。50 mM PA の溶液中で *C.elegans* を液体培養すると、培養後 24 時間でシャント経路の律速酵素をコードする *acdh-1* の発現が Control 群と比較して約 1.2 倍程度誘導された (図 14A)。さらに、50 mM PA を投与した後に好氣的に培養した *C.elegans* では、PA 投与後 48 時間で *acdh-1* の発現量が Control 群の約 3 倍にまで誘導された (図 15A)。したがって、過剰な PA 存在下でのシャント経路の発現には十分な O₂ を必要とし、シャント経路の活性化までおよそ 48 時間必要であることが確認された。この結果は、¹³CO₂ ガス分析

によって測定された $^{13}\text{CO}_2$ 濃度が、 $[1-^{13}\text{C}]$ PA の投与後 48 時間でピークとなること (図 9) と一致している。 $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析によって測定された PA の投与濃度の上昇に伴う $^{13}\text{CO}_2$ 濃度の増加は、PA の過剰蓄積による毒性を回避するために活性化されたシャント経路を介した PA 分解の促進を反映することが示唆された。

哺乳類では PA から生成されたスクシニル-CoA の殆どが糖新生に利用される³⁸⁾。*C.elegans* においても同様の糖新生経路を有しており、PA はスクシニル-CoA を介して糖新生に入る。本実験でも *C.elegans* への PA 投与により Control 群と比較してグリコーゲン蓄積量が増加しており、*C.elegans* においても PA 由来のスクシニル-CoA の多くが糖新生を介してグリコーゲン合成に利用されたと考えられる。本研究で用いた $[1-^{13}\text{C}]$ PA はカルボキシ基に ^{13}C が位置していることから、糖新生経路で $[1-^{13}\text{C}]$ PA 由来のオキサロ酢酸がホスホエノールピルビン酸に代謝される際に $^{13}\text{CO}_2$ を生成すると考えられる。したがって、スクシニル-CoA を介した糖新生での PA 利用の増加は $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析における $^{13}\text{CO}_2$ 濃度の増加に大きく寄与する可能性がある。実際に好気的環境下において、PA のみを投与した *C.elegans* と比較して VB_{12} を投与した *C.elegans* で $^{13}\text{CO}_2$ 濃度の増加がみられ、シャント経路関連遺伝子の顕著な低下とグリコーゲン蓄積量の顕著な増加がみられた。したがって、 VB_{12} 投与による PA 代謝の促進は糖新生での PA 由来スクシニル-CoA 利用の増加を反映していることが示唆された。また、 VB_{12} の欠乏はメチルマロン酸の過剰な蓄積を引き起こし TCA 回路等の有酸素系代謝経路を阻害するため³⁹⁾、 VB_{12} 欠乏状態も $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析結果に影響を及ぼす可能性がある。OP-50 は VB_{12} を合成できないことから、OP-50 を飼料として飼育された *C.elegans* は慢性的な VB_{12} 不足であると考えられている^{26,27)}。OP-50 で飼育した *C.elegans* ではメチルマロン酸の蓄積がみられ、 VB_{12} を補充することでメチルマロン酸が有意に減少することが報告されており⁴⁰⁾、 VB_{12} 投与による $^{13}\text{CO}_2$ 濃度の増加は VB_{12} 依存性経路の亢進を反映したと考えられる。本実験結果より、 $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析の

結果は遺伝子発現の変化に伴う実際の代謝変化を反映することが明らかとなった。ところで、Bito らの報告では、慢性的な VB₁₂ 欠乏を引き起こすには 5 世代にわたって *C.elegans* に VB₁₂ 欠乏飼料を与える必要があると報告している⁴¹⁾。本実験で使用した *C.elegans* が慢性的な VB₁₂ 不足に陥っているかどうかは不明であり、VB₁₂ 欠乏状態 *C.elegans* を用いた ¹³CO₂ ガス分析についても今後検討する必要がある。

表 1 Primer sequence

gene name	5' to 3'	
	Forward	Reverse
<i>snb-1</i> (internal control)	TGGAGCGTGATCAGAAGTTGTC	TCCACCAATACTTGCGCTTCAG
<i>pcca-1</i>	TGTCGCGTGATCAAAACTGC	TTTGGCAGTTGGAGCTTCTC
<i>pccb-1</i>	AAAGTTTGCTGCTGGATGCC	TGAAAGCATCGCAGAATCGG
<i>mce-1</i>	TTTCGCTGTCCACAAGAACC	ACAGCCTCGCTAACTTTTGC
<i>mmcm-1</i>	AGGAGCAATGTGCCAAGTTG	TTGCATCCAACGCCTTTTGG
<i>acdh-1</i>	AAGCTGCAATGGCGAAACTG	ACCACCGAGCCATTTTACAC
<i>ech-6</i>	GCCGCATTTTCAAGCAAAGC	GCGCACAAAGCATTCAAAGC
<i>hach-1</i>	ACGCGTTGAACCTCGAAATG	AAAGATCGCACAAACGGCAAG
<i>hphd-1</i>	TTAAAAACGCCGAGCAAGCC	GCTTCGATTTGGCAAATGCG
<i>alh-8</i>	TCAGCCAAAATGCCAACAGC	ATCCACAGCTTGACAGTTGG
<i>pck-1</i>	TGCACGATCCAATGGCAATG	AAGATCTTTGGCGCCTTGTG
<i>gsy-1</i>	TTGTGTTCGAATGCGCTTGG	ACTTCAAGCCGCCATTTTCC
<i>gob-1</i>	AATTGGGCAGCTCTGTGAAC	TTCCAACCAACGCGAATTGC
<i>tre-1</i>	ATCCCAGCCGATTTAAACGC	TCACGCATTTCCCGTTTTGC
<i>tre-2</i>	AAAATCCGGTGGCAAGTTGC	AAAGAGGCGAGCAGTTGAAG
<i>tre-3</i>	TATGAAACCGGCCACATGTG	TCCGTTGCTCCATCCAAATC
<i>pdha-1</i>	ATTTGGTCGACGGCAATGTC	AACTTGCTGTGTGCGGATTC
<i>icl-1</i>	AAAACGTTGCTGGAGACGAG	AAACGGCGAGGGTTGAATTC

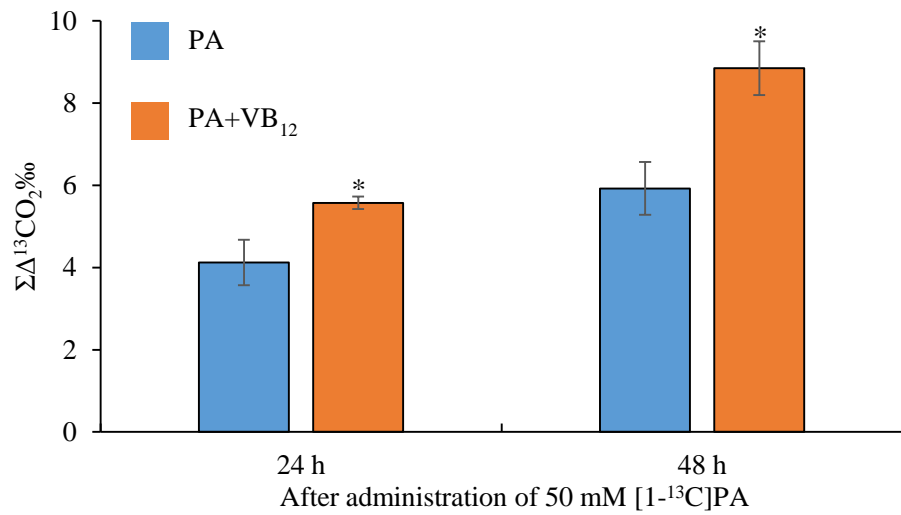


図 11 ビタミン B₁₂ 投与が¹³Cプロピオン酸を用いた ¹³CO₂ 産生に及ぼす影響

PA : L4 幼虫まで培養した *C.elegans* に¹³C]PA を投与した群

PA+VB₁₂ : 1 μM VB₁₂ を 100 μL 投与した培養液で L4 幼虫まで培養した *C.elegans* に¹³C]PA を投与した群

mean ± SE (n = 4 plates) , * : p < 0.05

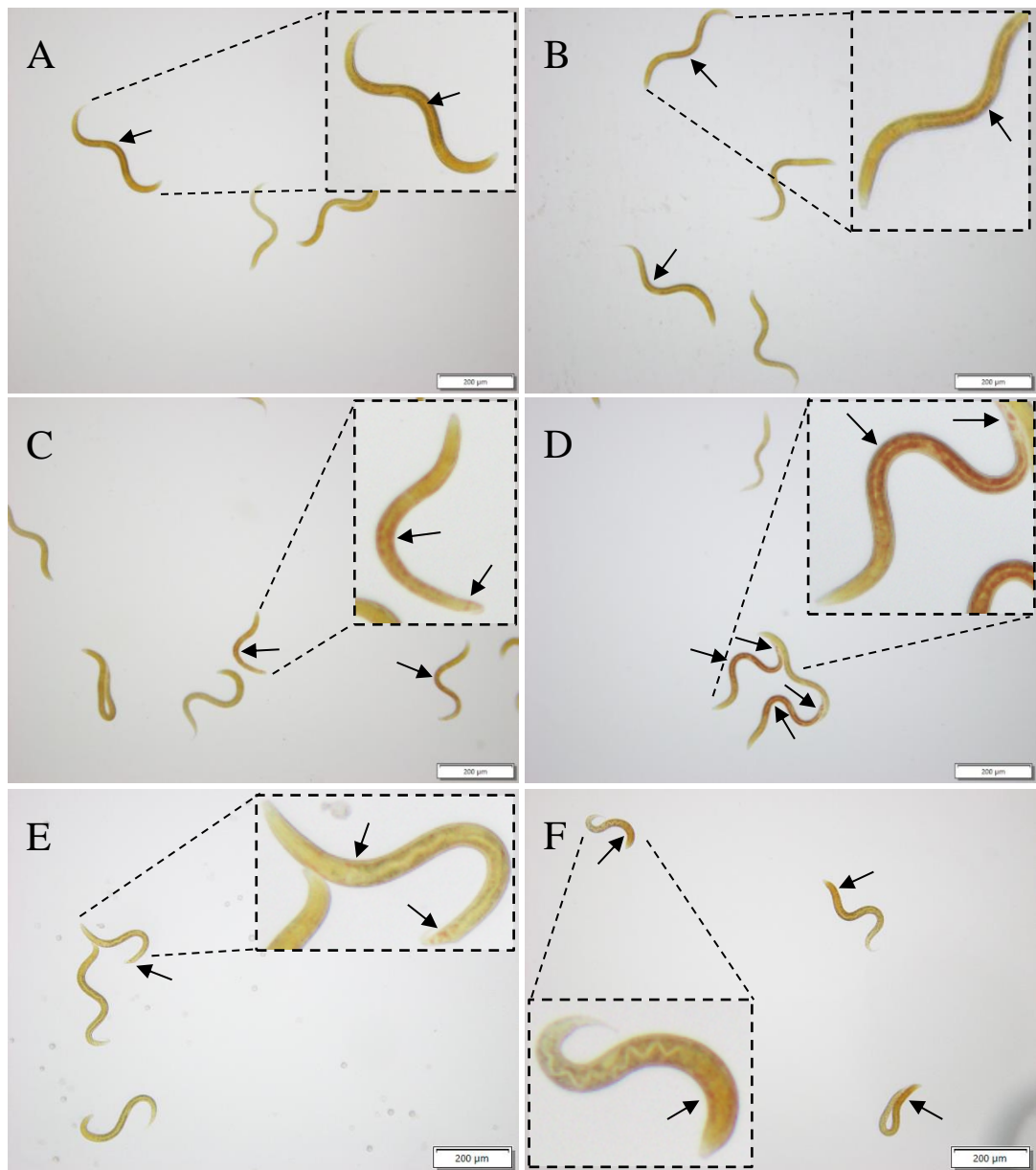


図 12 ヨウ素染色法を用いた *C.elegans* のグリコージェン蓄積の確認

矢印は主なグリコージェン蓄積部位を示す。点線枠内の画像はグリコージェン蓄積が確認される代表的な線虫の拡大写真を示す

A : M9 投与 24 時間後にヨウ素蒸気に曝露した群

B : M9 投与 48 時間後にヨウ素蒸気に曝露した群

C : 50 mM PA 投与 24 時間後にヨウ素蒸気に曝露した群

D : 50 mM PA 投与 48 時間後にヨウ素蒸気に曝露した群

E : 1 μ M VB₁₂ を 100 μ L 投与した培養液で L4 幼虫まで培養し、50 mM PA 投与 24 時間後にヨウ素蒸気に曝露した群

F : 1 μ M VB₁₂ を 100 μ L 投与した培養液で L4 幼虫まで培養し、50 mM PA 投与 24 時間後にヨウ素蒸気に曝露した群

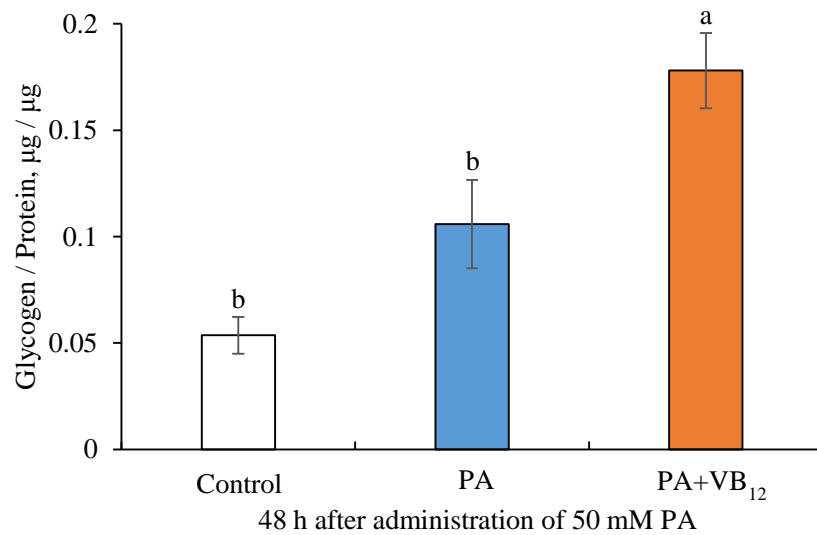
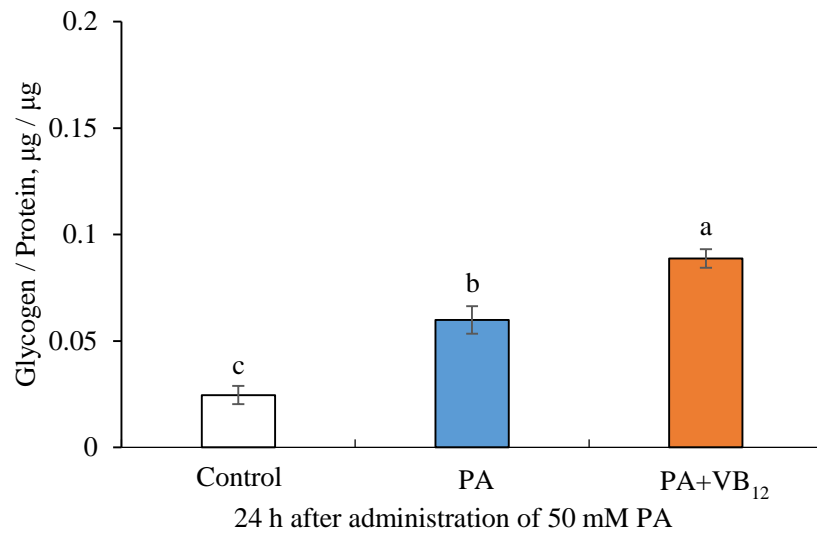


図 13 プロピオン酸およびビタミン B₁₂ 投与が *C.elegans* のグリコーゲン蓄積に及ぼす影響

Control : L4 幼虫まで培養した *C.elegans* に M9 buffer を投与した群

PA : L4 幼虫まで培養した *C.elegans* に PA を投与した群

PA+VB₁₂ : 1 μM VB₁₂ を 100 μL 投与した培養液で L4 幼虫まで培養した *C.elegans* に PA を投与した群

mean \pm SE ($n = 4$ plates) , 異なるアルファベットは有意差を示す ($p < 0.05$)

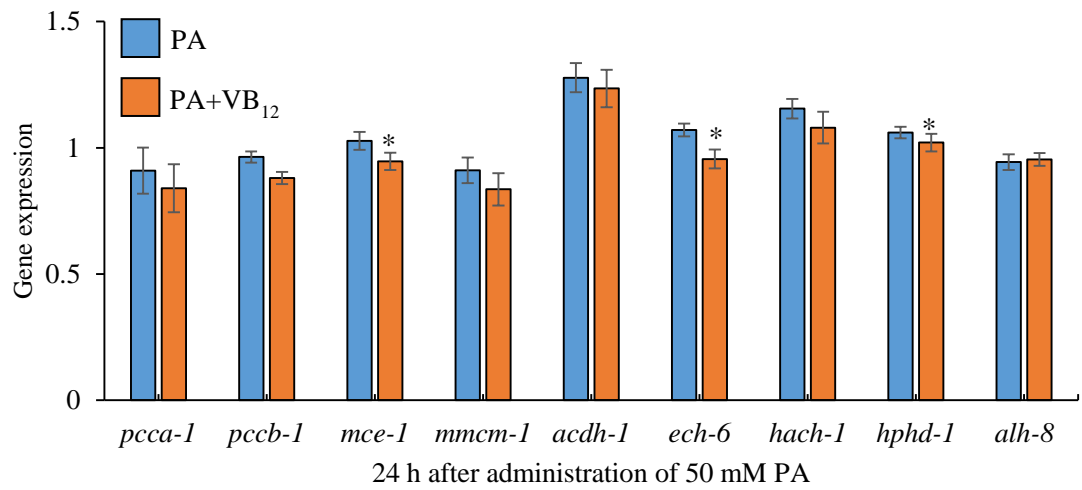


図 14A ビタミン B₁₂ 投与がプロピオン酸代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響

PA : L4 幼虫まで培養した *C.elegans* に PA を投与した群

PA+VB₁₂ : 1 μM VB₁₂ を 100 μL 投与した培養液で L4 幼虫まで培養した *C.elegans* に PA を投与した群

mean ± SE (n = 4 plates) , * : p < 0.05

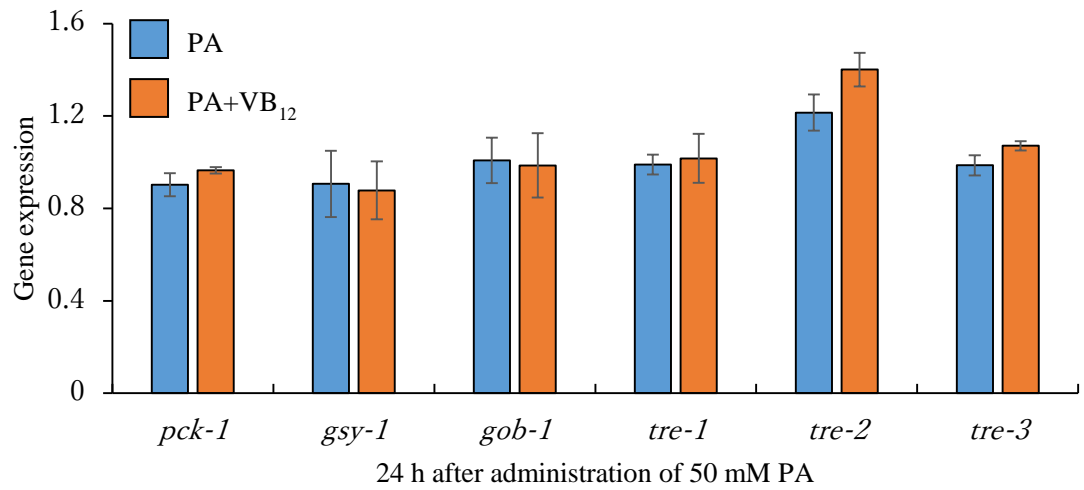


図 14B ビタミン B₁₂ 投与がプロピオン酸代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響

PA :L4 幼虫まで培養した *C.elegans* に PA を投与した群

PA+VB₁₂ :1 μM VB₁₂ を 100 μL 投与した培養液で L4 幼虫まで培養した *C.elegans* に PA を投与した群

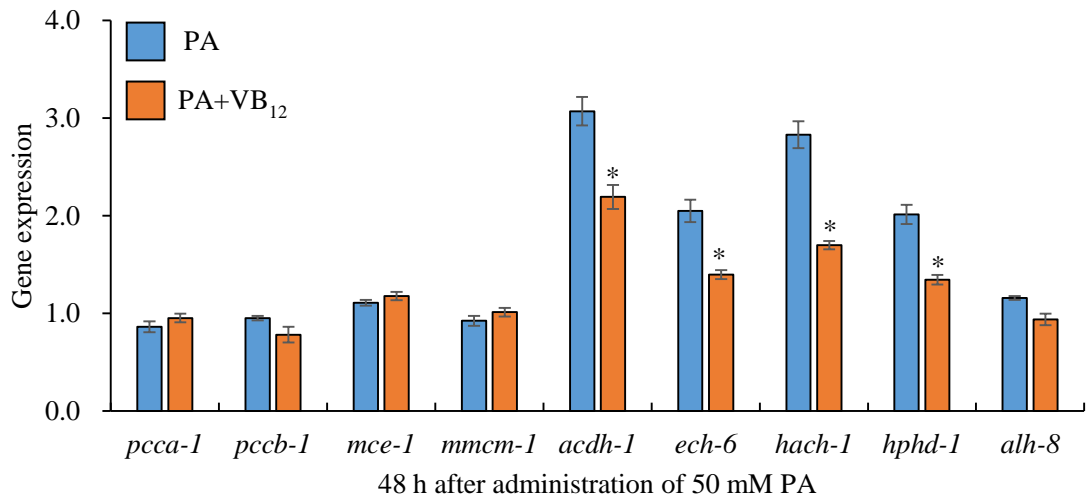
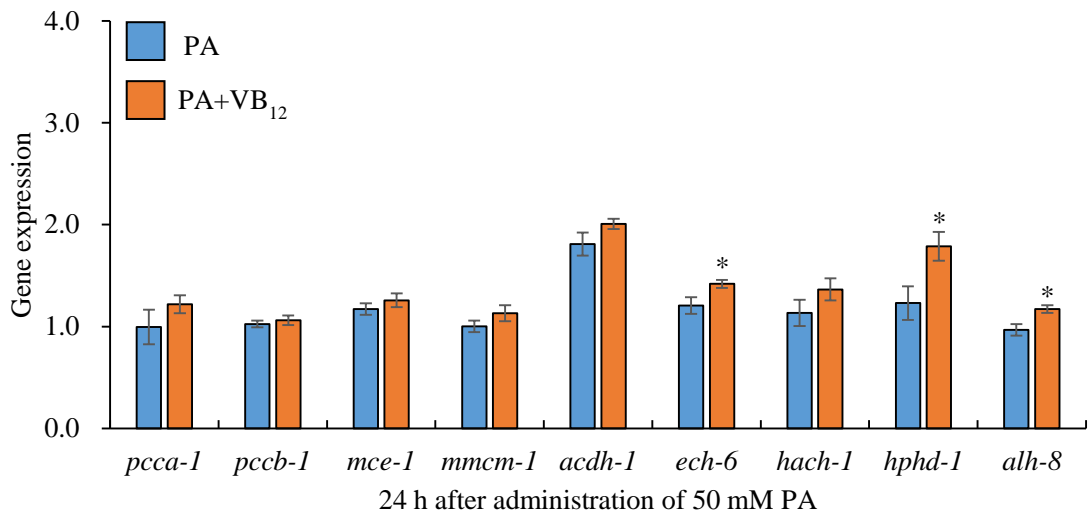


図 15A ビタミン B₁₂ 投与がプロピオン酸代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響

PA : L4 幼虫まで培養した *C.elegans* に PA を投与した群

PA+VB₁₂ : 1 μM VB₁₂ を 100 μL 投与した培養液で L4 幼虫まで培養した *C.elegans* に

PA を投与した群

mean ± SE (n = 4 plates) , * : p < 0.05

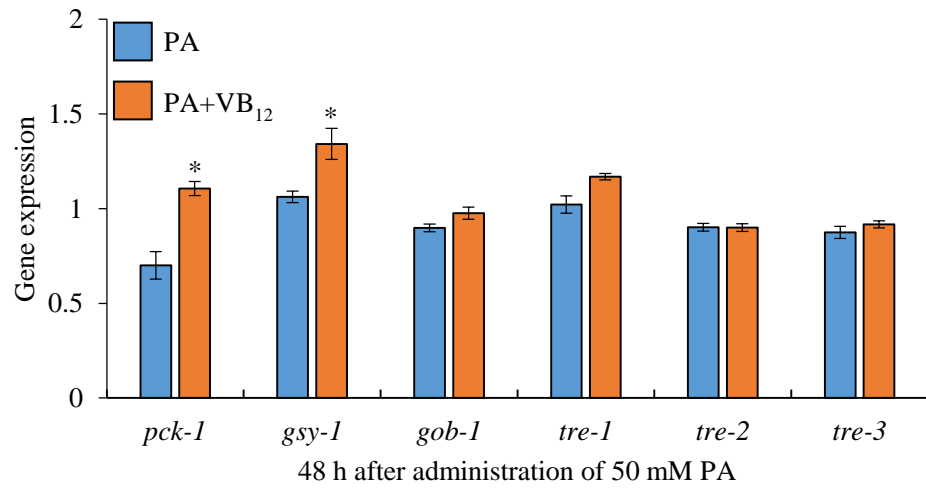
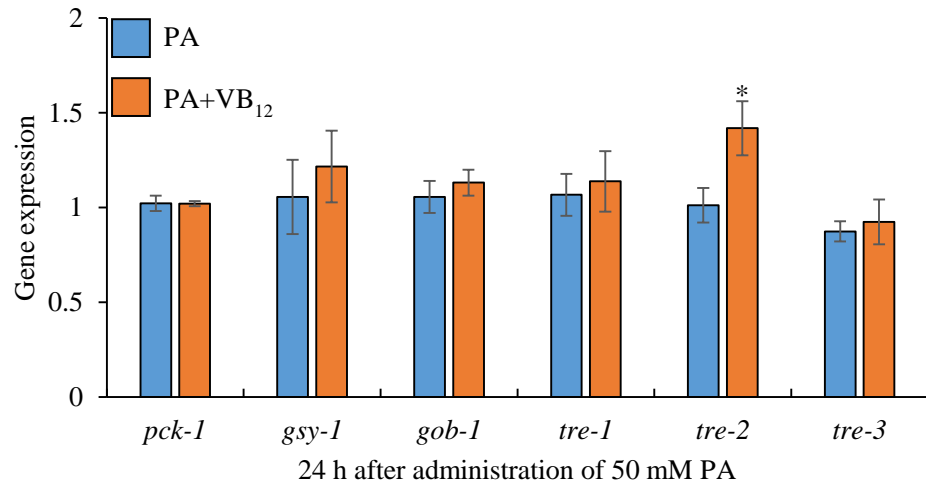


図 15B ビタミン B₁₂ 投与がプロピオン酸代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響

PA : L4 幼虫まで培養した *C.elegans* に PA を投与した群

PA+VB₁₂ : 1 μM VB₁₂ を 100 μL 投与した培養液で L4 幼虫まで培養した *C.elegans* に

PA を投与した群

mean ± SE (n = 4 plates) , * : p < 0.05

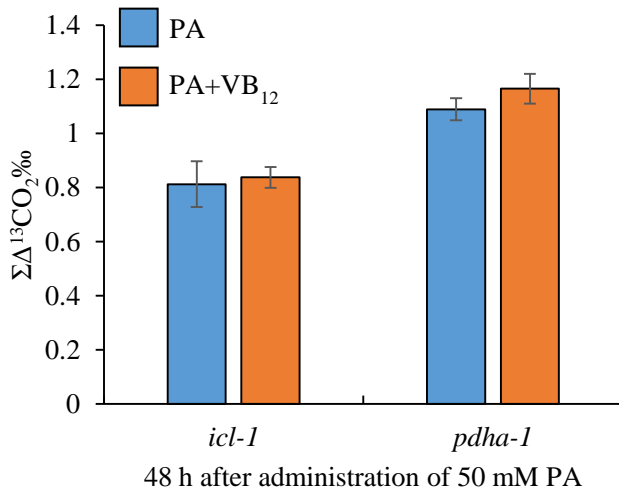
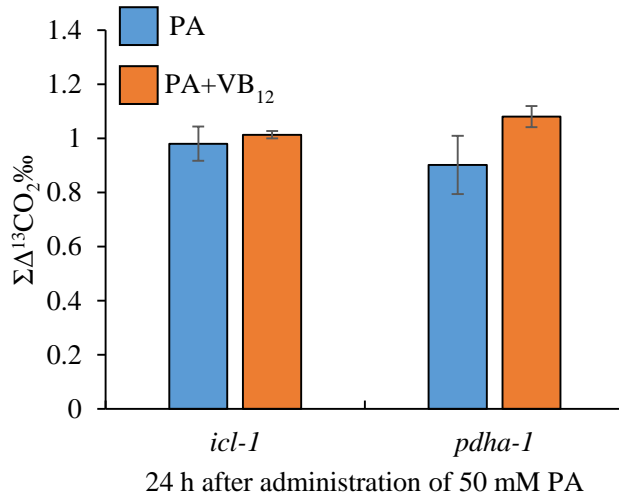


図 15C ビタミン B₁₂ 投与がプロピオン酸代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響

PA : L4 幼虫まで培養した *C.elegans* に PA を投与した群

PA+VB₁₂ : 1 μM VB₁₂ を 100 μL 投与した培養液で L4 幼虫まで培養した *C.elegans* に

PA を投与した群

mean ± SE (*n* = 4 plates)

第4章 RNA干渉法を用いたプロピオン酸代謝関連遺伝子の発現抑制と¹³CO₂産生との関係性の確認

4-1. 目的

RNAiは二本鎖RNA(dsRNA)と相補的な塩基配列を持つmRNAが分解される現象であり、1998年にFireらによって*C.elegans*を用いた研究で発見された⁴²⁾。RNAi法はこの現象を利用し、化学的に合成したdsRNAをモデル動物に導入することにより特定の遺伝子の発現を抑制する手法である。この方法は目的の遺伝子の塩基配列が明らかであれば比較的簡便に遺伝子発現を抑制できることから、全ゲノム配列が解読されている生物に対して有用である。既に*C.elegans*へのRNAi法の適用方法は複数確立されており、幅広い分野で*C.elegans*がモデル生物として利用される理由のひとつとなっている。

第3章では、[1-¹³C]PAを用いた¹³CO₂ガス分析によって*C.elegans*によるPA代謝の最終生成物である¹³CO₂産生の変化とPA代謝関連遺伝子発現の変化とが密接に関連していることが示唆された。この関連性が事実であるならば、PA代謝関連遺伝子発現を抑制すれば、その表現型である¹³CO₂産生能(=PA代謝能)も抑制されると考えられる。本研究では、RNAi法を用いてPA代謝関連遺伝子をノックダウンした*C.elegans*のPA代謝能について¹³CO₂ガス分析法を用いて¹³CO₂産生を測定し、PA代謝関連遺伝子発現と¹³CO₂産生能との関係について検討した。

4-2. 実験方法

4-2-1. 二本鎖RNAの作製

RNAiクローンは表2のプライマーを用いて作製した。クローニングに用いるPCR産物はTakara Ex Taq(タカラバイオ株式会社)を用いて作製した。サーマルサイクラーの温度サイクルは95°Cを5分間の後、3-2-3と同様のサイクルを35サイクル繰り返す。

して PCR 反応を行った。PCR 産物に Loading Buffer (ニッポンジーン, 東京) を加えて 3-2-3 と同様の方法で 25 分間電気泳動を行い、WSE-5300 プリントグラフ CMOS I でゲル上のバンドを確認した後、速やかに目的のバンドをカッターでくり抜いて 1.5 mL チューブに回収した。Nucleo Spin Gel and PCR Clean UP (タカラバイオ株式会社) を用いて回収したバンドから cDNA 断片を抽出した。cDNA 断片のライゲーションには TOPO™ TA Cloning™ Kit for Subcloning, without competent cells (Thermo Fisher Scientific) を用いた。トランスフォーメーションには One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Thermo Fisher Scientific) を用いた。トランスフォーメーションした *E. coli* に SOC 培地を 200 μ L 添加し、150 rpm で 37°C 30 分間振とう培養した。LB agar (Thermo Fisher Scientific) にアンピシリンナトリウム (富士フイルム和光純薬株式会社) (5 mg / 100 mL) を加えた培地 (LB + Amp 寒天培地) を 9 cm シャーレに作製し、振とう培養した *E. coli* を滅菌コンラージ棒で均一に塗布して 37°C で一晚培養した。LB + Amp 寒天培地上に単独で存在するコロニーを 5-10 個選択し、選択したコロニー数と同様の本数になるように LB 液体培地にアンピシリンナトリウム (10 mg / 100 mL) を加えた培地 (LB + Amp 液体培地) 15 μ L を PCR チューブに分注した。0.1-10 μ L 用ピペットチップを用いて選択したコロニーを採取し、PCR チューブに分注された LB + Amp 液体培地にそれぞれ懸濁した (コロニー懸濁液)。また、選択したコロニー数と同様の本数になるように PCR チューブに EA を 2.5 μ L、10 μ M M13 forward primer を 1 μ L、10 μ M M13 reverse primer を 1 μ L、超純水 8.5 μ L を混合し、コロニー懸濁液を 2 μ L 加えて混和した後、3-2-3 と同様のサイクルを 20 サイクル繰り返して PCR 反応を行った。PCR 産物を 3-2-3 同様の方法で 20 分間電気泳動を行い、WSE-5300 プリントグラフ CMOS I でゲル上のバンドを確認した。バンドサイズから正しくトランスフォーメーションされている *E. coli* のコロニーを選択し、LB + Amp 液体培地約 8 mL を分注した 15 mL チューブに目的のコロ

ニー懸濁液 2 μL を加え 37°Cで一晩培養した。NucleoSpin Plasmid Easy Pure (タカラバイオ株式会社) を用いて培養したコロニー懸濁液からプラスミドを抽出した。EA を 100 μL 、T7 プロモーター配列 (TAATACGACTCACTATAGGG) を追加した 10 μM forward primer および 10 μM reverse primer をそれぞれ 15 μL 、プラスミドを 1 μL 、超純水を 69 μL 混合して PCR チューブに 25 μL ずつ分注し、3-2-3 と同様のサイクルを 45 サイクル繰り返して PCR 反応を行った。PCR 産物を Nucleo Spin Gel and PCR Clean UP を用いて精製した後、精製した PCR 産物を鋳型に MEGAscript T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて dsRNA を合成した。dsRNA は MEGAclear Transcription Clean-Up Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて精製し、16 μL の超純水に溶解して-80°Cで保管した (dsRNA 溶液)。

4-2-2. soaking 法を用いたプロピオン酸代謝関連遺伝子ノックダウンの確認

Conte らの方法を参考に soaking 法により RNAi を行った⁴³⁾。2-2-7 と同様の方法で L1 懸濁液を作成した。96 well plate に 1 well あたり L1 懸濁液を 40 μL 、HK OP-50 を 30 μL 、10 x soaking buffer を 10 μL 、10 % スペルミジンを 0.4 μL 、M9 buffer を 19.6 μL 添加して L4 幼虫まで 20°Cで培養した (normal)。ノックダウン *C.elegans* は dsRNA 溶液を dsRNA 濃度が 5000 ng となるように M9 buffer と置き換えて投与し、*mmcm-1* ノックダウンおよび *acdh-1* ノックダウンを作製した。L4 幼虫まで成長した後に 6 cm PF-NGM の上に全量添加し、20°Cで 24 時間培養した。3-2-3 と同様の方法で PCR 反応を行い、*mmcm-1* および *acdh-1* の遺伝子発現を定量化した。

4-2-3. プロピオン酸代謝関連遺伝子ノックダウンが[1-¹³C]プロピオン酸からの ¹³CO₂ 産生に及ぼす影響

2-2-7 と同様の方法で L1 懸濁液を作成した。96 well plate に 1 well あたり L1 懸濁

液を 40 μL 、HK OP-50 を 30 μL 、10 x soaking buffer を 10 μL 、10 % スペルミジンを 0.4 μL 、M9 buffer を 17.6 μL 、50 μM VB₁₂ を 2 μL (1 μM VB₁₂/100 μL) 添加して L4 幼虫まで 20°C で培養した (PA+VB₁₂ 群)。50 μM VB₁₂ を M9 buffer に置き換えて同様に培養した *C.elegans* を PA 群とした。ノックダウン *C.elegans* は 4-2-2 と同様の方法で dsRNA と M9 buffer を置き換えて *mmcm-1* ノックダウンおよび *acdh-1* ノックダウンを作製した。各 well に [1-¹³C]PA を最終濃度が 50 mM/150 μL となるように投与して直ちに密閉した後に 20°C で 24 時間あるいは 48 時間培養し、¹³CO₂ ガス分析を行った。

4-2-4. 統計処理

2-2-8 と同様に各データの統計処理を行った。いずれの結果も、危険率が 5 % 未満 ($p < 0.05$) を有意とみなした。

4-3. 結果

4-3-1. プロピオン酸代謝関連遺伝子ノックダウンの確認

遺伝子発現の結果を図 16 に示した。normal と比較して dsRNA を投与した *C.elegans* で *mmcm-1* および *acdh-1* の発現が低下する傾向がみられた。

4-3-2. プロピオン酸代謝関連遺伝子ノックダウンが [1-¹³C]プロピオン酸からの ¹³CO₂ 産生に及ぼす影響

¹³CO₂ ガス分析の結果を図 17 に示した。*mmcm-1* ノックダウンでは PA 投与後 24 時間において PA 群および PA+VB₁₂ 群の両群で normal と比較して $\Sigma \Delta^{13}\text{CO}_2\%$ が有意に低下した。PA 投与後 48 時間では PA 群で normal と比較して $\Sigma \Delta^{13}\text{CO}_2\%$ が有意に低下した (図 17A)。*acdh-1* ノックダウンでは PA 投与後 24 時間および 48 時間にお

いて PA 群で normal と比較して $\Sigma \Delta^{13}\text{CO}_2\%$ が有意に低下した。PA+VB₁₂ 群では有意差はみられなかった (図 17B)。

4-4. 考察

C.elegans への RNAi の適用方法は feeding 法、microinjection 法、soaking 法が知られている⁴³⁾。feeding 法は多くの研究で用いられている方法であり、目的の dsRNA を発現させた遺伝子組み換え大腸菌を飼料に *C.elegans* を培養することで目的の遺伝子の発現を抑制できる。しかしながら、feeding 法では生菌を用いる必要がある。また、feeding 法の遺伝子組み換え大腸菌として用いられている大腸菌 HT115 株は OP-50 と比較して VB₁₂ を豊富に含んでいることから⁴⁴⁾、本実験結果に影響を及ぼす可能性が考えられた。これらの理由から、本研究では soaking 法を用いることとした。soaking 法は dsRNA を溶解した soaking buffer で *C.elegans* を培養し、直接 dsRNA を取り込ませることで目的の遺伝子の発現を抑制させる方法である。この方法は feeding 法と比較して手技が複雑であるが、生菌を使用せずに RNAi 効果を得ることが可能である。本研究では ¹³CO₂ ガス分析結果と遺伝子発現結果を比較するために、¹³CO₂ ガス分析と同様の培養条件となるように soaking 法を一部改変した。*C.elegans* に dsRNA を投与すると、目的の遺伝子の発現が低下する傾向にあったことから、改変した手法においても RNAi 効果が得られることが確認された。一方、*mmcm-1* ノックダウンにおいても *acdh-1* の発現が低下傾向を示した。生体内に導入された dsRNA は細胞内で酵素によって 21-23 塩基の短い dsRNA (siRNA) に分解され、目的の遺伝子の発現を抑制するように働く。本研究では RNAi 効果を高めるために、*C.elegans* に導入する dsRNA を 500 塩基と長く設定したことから、細胞内で多量に生成された siRNA の一部がオフターゲット効果を引き起こした可能性が考えられる。¹³CO₂ ガス分析では RNAi 効果によることを示す [1-¹³C]PA 代謝の抑制が確認された。補酵素として VB₁₂

を必要とするメチルマロニル-CoA ムターゼをコードする *mmcm-1* をノックダウンすると、VB₁₂ 投与の有無に関係なく normal と比較して ¹³CO₂ 濃度が減少した。また、*acdh-1* をノックダウンした場合、PA のみの投与では ¹³CO₂ 濃度の減少がみられたが、VB₁₂ を投与すると normal と同等の値まで ¹³CO₂ 濃度が上昇した。これらの結果は、RNAi 効果による PA 代謝経路での代謝抑制を反映していると考えられる。

一方、哺乳類では PA 代謝過程で生成される中間物質の蓄積によって、肝臓のミトコンドリアの機能阻害とそれに伴う肝機能障害が生じる⁴⁵⁻⁴⁷)。PA 代謝経路関連遺伝子のノックダウンで生じた ¹³CO₂ 濃度の減少は、単に PA 代謝経路の抑制による TCA 回路への代謝物流入の減少が起因しただけではなく、中間物質の蓄積等の複合的な要素によって好氣的代謝を阻害した結果も反映していると考えられる (図 18)。シャント経路で生成される中間物質には好氣的代謝を阻害する物質が含まれていることから、VB₁₂ 依存性経路は結果的に PA を効率的に代謝することが示唆された。

表 2 Cloning Primer sequence

gene	5' to 3'	
name	Forward	Reverse
<i>mmcm-1</i>	TGACTGAGCAGGATCCATACA	GGTGGCACGGATATGGTTCA
<i>acdh-1</i>	AATTCAGGAGAGGCACAGGT	TGTGATGCAAACAGTTTCGCC

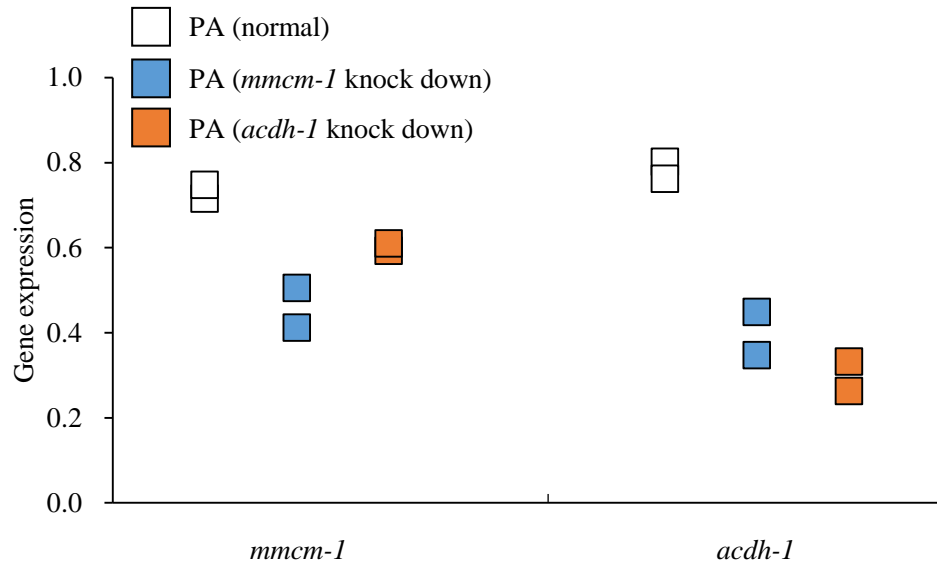


図 16 ノックダウン *C.elegans* における遺伝子発現

括弧内はノックダウンの有無またはノックダウンした遺伝子を示す ($n = 2$ plates)

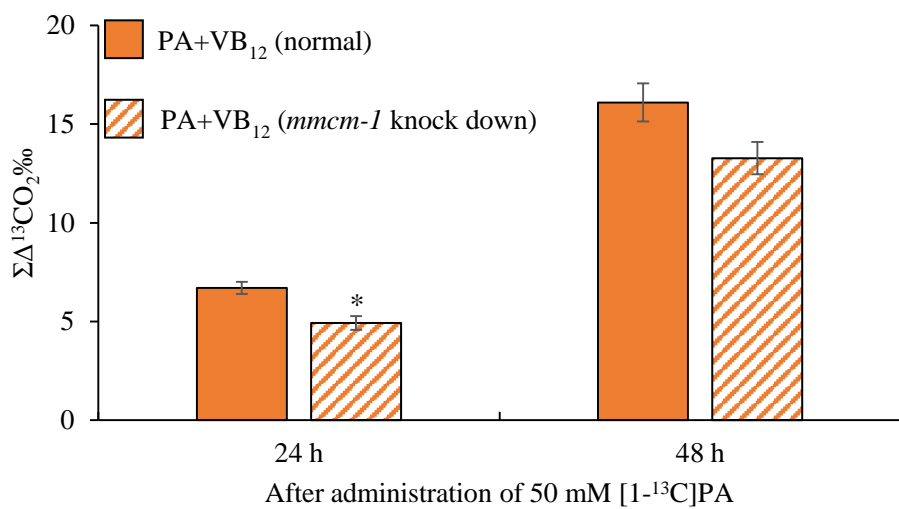
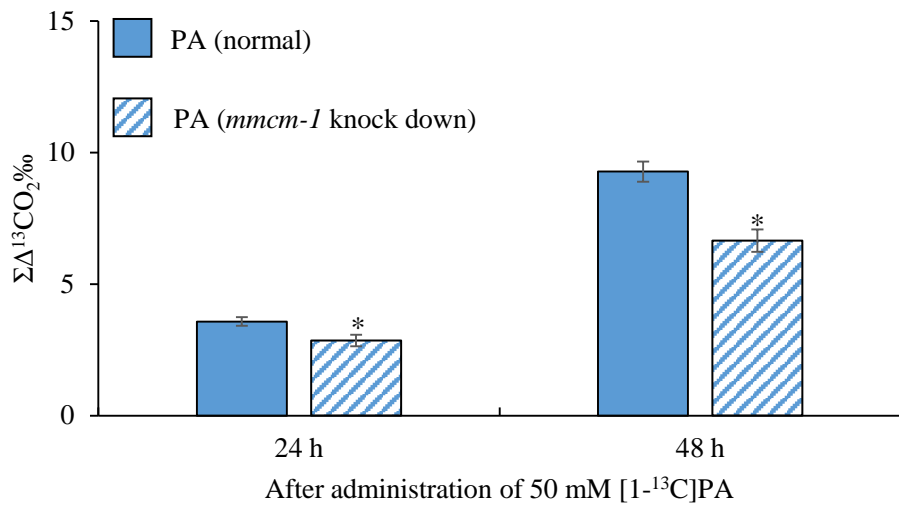


図 17A *mmcm-1* ノックダウン *C.elegans* における [1-¹³C]プロピオン酸からの ¹³CO₂ 産生に及ぼす影響

PA : L4 幼虫まで培養した *C.elegans* に [1-¹³C]PA を投与した群

PA+VB₁₂ : 1 μM VB₁₂ を 100 μL 投与した培養液で L4 幼虫まで培養した *C.elegans* に [1-¹³C]PA を投与した群

mean ± SE (n = 4 plates) , * : p < 0.05

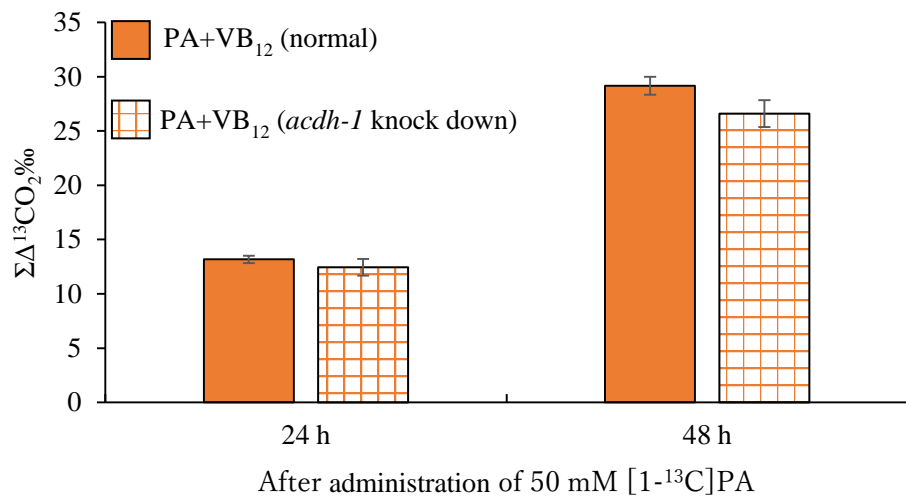
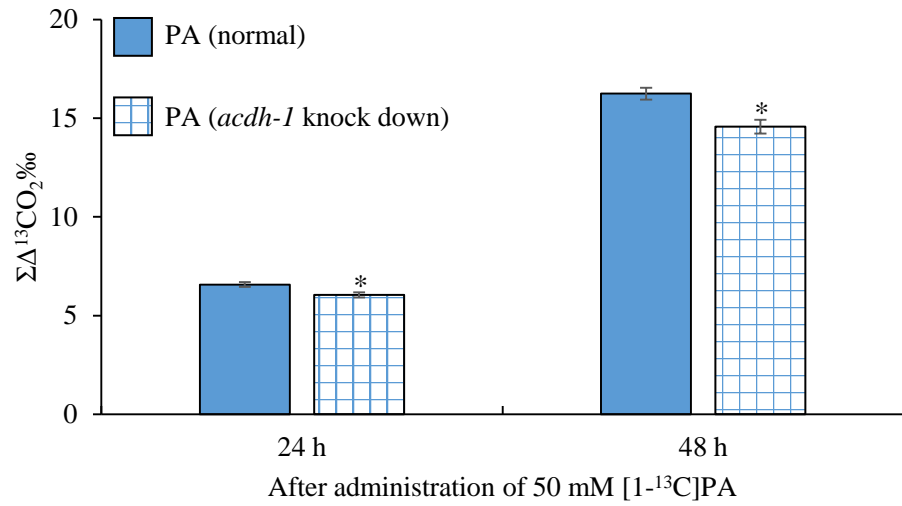


図 17B *acdh-1* ノックダウン *C.elegans* における $[1-^{13}\text{C}]$ プロピオン酸からの $^{13}\text{CO}_2$ 産生に及ぼす影響

PA : L4 幼虫まで培養した *C.elegans* に $[1-^{13}\text{C}]$ PA を投与した群

PA+VB₁₂ : 1 μM VB₁₂ を 100 μL 投与した培養液で L4 幼虫まで培養した *C.elegans* に $[1-^{13}\text{C}]$ PA を投与した群

mean \pm SE ($n = 4$ plates) , * : $p < 0.05$

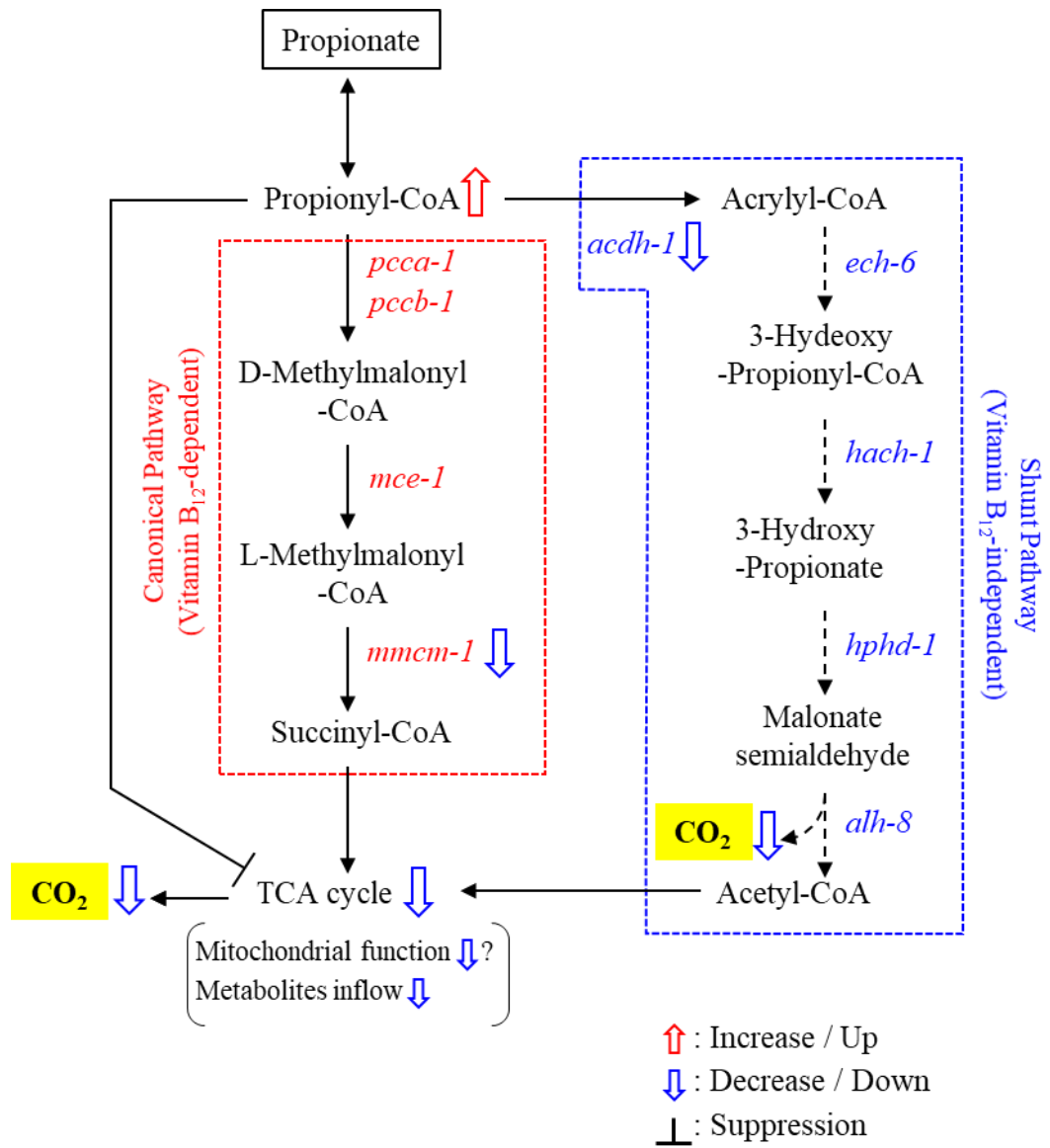


図 18 プロピオン酸代謝関連遺伝子ノックダウンによる好氣的代謝の変化

第5章 総括

ポストバイオティクスは、概ね「腸内細菌の発酵によって生じる化合物や不活化された細菌のうち、宿主の健康に寄与するもの」と定義されている。代表的なポストバイオティクスである SCFAs は代謝経路をエピジェネティックに変化させることが報告されており、PA については *C.elegans* を用いた研究によって代謝経路関連遺伝子の転写レベルでの発現調節が明らかにされている。しかしながら、遺伝子発現の変化と実際の代謝量の変化を確認した報告は少ない。そこで、本研究では SCFAs 研究での新たな知見を得ることを目的とし、 ^{13}C 呼気分析法を *C.elegans* に応用することで代謝関連遺伝子発現と代謝経路の定量的な変化を関連づけて分析できる新しい方法を確立し、エピジェネティックな調節が明らかになっている PA 代謝に注目して、代謝関連遺伝子の発現と代謝経路の定量的な変化との関係性についても検討を行った。

第2章では *C.elegans* の PA 代謝能を測定するための $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析法の設定条件を検討した。初めに、走化性実験および PA-カルミン懸濁液の添加実験で *C.elegans* が PA を自発的に摂取することを確認した。[1- ^{13}C]PA を投与した *C.elegans* を自作の小型 $^{13}\text{CO}_2$ 回収デシケーター内で培養し、装置内の空気を回収することで *C.elegans* が産生し排泄した $^{13}\text{CO}_2$ の測定を試みた。デシケーターから回収した空気中に $^{13}\text{CO}_2$ の出現が確認されたことから、 $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析での測定結果 ($^{13}\text{CO}_2$ 産生量) と投与した [1- ^{13}C]PA 濃度との関係には強い正の相関 ($r = 0.99$) のある用量応答性が認められ、*C.elegans* の PA 代謝能の測定に ^{13}C 呼気分析法が応用可能であることを示した。さらに、*C.elegans* の飼料である大腸菌 OP-50 は生きた状態あるいは 75°C の殺菌条件では [1- ^{13}C]PA を代謝して $^{13}\text{CO}_2$ を排出することが確認されたため、オートクレーブ滅菌処理をした HK OP-50 を飼料として用いた。HK OP-50 が *C.elegans* に及ぼす負の影響

響は小さいと考えられるが、過剰な殺菌処理は飼料としての栄養価を低下させる可能性があるため、OP-50の適切な殺菌条件について今後検討する必要がある。

第3章では、PAの主な代謝経路でありPAとVB₁₂の量的関係によって切り替わるVB₁₂依存性経路およびVB₁₂非依存性のシャント経路に注目し、VB₁₂投与が*C.elegans*のPA代謝に及ぼす影響についてRT-PCR法および¹³CO₂ガス分析法を用いて遺伝子発現と表現型(CO₂産生)の双方からPA代謝の変化を検討した。PA代謝遺伝子の発現においてPAのみを投与したPA群では48時間の好氣的培養でシャント経路の律速酵素をコードする*acdH-1*の発現量がControl群の約3倍にまで誘導され、その下流に位置する酵素をコードする*ech-6*、*hach-1*、*hphd-1*についても約2倍に誘導されたことからシャント経路の顕著な活性化が認められた。この結果は、第2章で¹³CO₂ガス分析の結果が48時間でピークとなったことと一致していた。線虫をL1期からVB₁₂を投与して培養したPA+VB₁₂群では、これらのシャント経路関連遺伝子の発現は有意に低下し、VB₁₂投与によるPA代謝経路の切り替わりが確認された。VB₁₂依存性経路関連酵素遺伝子に有意な差は認められなかったが、¹³CO₂ガス分析ではPA+VB₁₂群に[1-¹³C]PAを投与すると、PA群と比較して¹³CO₂濃度が有意に増加した。また、VB₁₂投与によってPA由来のグリコーゲン蓄積量が有意に増加し、糖新生酵素遺伝子*pck-1*の発現、グリコーゲン合成酵素遺伝子*gsy-1*の発現が有意に上昇した。本研究で用いた[1-¹³C]PAはカルボキシ基に¹³Cが位置していることから、[1-¹³C]PA由来のスクシニル-CoAから糖新生経路でオキサロ酢酸が糖新生経路でホスホエノールピルビン酸に代謝される際に¹³CO₂を生成する。したがって、VB₁₂投与によるPA代謝の促進は糖新生での[1-¹³C]PA由来のスクシニル-CoA利用の増加が寄与していると考えられる。本章の結果より、¹³CO₂ガス分析の結果は遺伝子発現の変化に伴う実際の代謝変化(表現型の変化)を反映することが明らかとなった。

第4章では、RNAi法を用いて、PA代謝関連遺伝子発現をノックダウンさせ、[1-¹³C]PA由来の¹³CO₂産生に及ぼす影響について検討した。RNAi法は二本鎖RNA (dsRNA) と相補的な塩基配列を持つ mRNA が分解される現象を利用し、化学的に合成した dsRNA をモデル動物に導入することにより特定の遺伝子の発現を抑制する方法である。本研究では VB₁₂ 依存性経路の VB₁₂ を補酵素とするメチルマロニル-CoA ムターゼをコードする *mmcm-1*、シャント経路の律速酵素をコードする *acdh-1* について soaking 法を一部改変してノックダウンした線虫において、RT-PCR 法および ¹³CO₂ ガス分析法を用いて [1-¹³C]PA からの ¹³CO₂ 産生の変化について解析した。

C.elegans に dsRNA を投与すると、目的の遺伝子の発現が低下する傾向にあったことから、改変した手法においても RNAi 効果が得られることが確認された。ノックダウン線虫における ¹³CO₂ ガス分析では、RNAi 効果によるものと考えられる ¹³CO₂ 産生の減少が確認された。*mmcm-1* ノックダウンでは VB₁₂ 投与の有無に関係なくノックダウンをしていない normal と比較して ¹³CO₂ 濃度が減少した。また、*acdh-1* ノックダウンでは PA 群において ¹³CO₂ 濃度の減少がみられた。PA+VB₁₂ 群では normal と同等の値まで ¹³CO₂ 濃度が上昇した。第3章で明らかにしたように、VB₁₂ 依存性経路は PA を効率的に代謝するための主要経路であることから、*mmcm-1* のノックダウンによる ¹³CO₂ 産生の減少は VB₁₂ 依存性経路の抑制を反映していると考えられる。さらに、VB₁₂ 投与によって VB₁₂ 依存性経路での PA 代謝が促進することから、VB₁₂ を投与した *acdh-1* ノックダウン *C.elegans* では PA 代謝が normal と同等の値まで回復したと考えられる。PA 代謝遺伝子ノックダウン線虫を用いた ¹³CO₂ ガス分析の結果は、代謝遺伝子発現への影響によって生ずる代謝変化を反映することが明らかとなった。

本研究では ¹³C 呼気分析法を応用した ¹³CO₂ ガス分析法を用いて、線虫 *C.elegans* に投与した PA の最終代謝産物である CO₂ を定量的に測定することに成功した。これにより、*C.elegans* をモデル生物に用いた代謝実験において、遺伝子発現と表現型の双方

から検討することが可能となった。また、実際に $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析法を用いることで、 VB_{12} 依存性経路での PA の利用が糖新生の亢進等の複合的な要素によって結果的に PA 代謝を促進することを明らかにした。 $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析法は、研究目的と合致する ^{13}C 化合物を用いれば SCFAs 研究に限らず様々な代謝研究に応用可能であると考えられる。

しかしながら、本研究で得られたデータの利用には様々な制約がある。*C.elegans* は遺伝子においてはその多くがヒトと類似しているものの、哺乳類と線形動物門である *C.elegans* では生体の構造および機能が明らかに異なる。そのため、線虫を用いて得られたデータをそのまま哺乳類に当てはめて解釈することは慎重であるべきであり、本研究で用いた PA のように哺乳類と線虫で類似した代謝経路を有していることが明らかである場合に限られる。また、試料の投与方法にも制限がある。試料を含む溶液に浸漬した状態での培養が基本となるため経口的に摂取したのか、あるいは定量的に摂取したのかを確認することが困難である。 $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析の手法にもいくつかの課題がある。現在の方法では飼料（大腸菌）をオートクレーブなどにより滅菌する必要があることから、RNAi 法の代表的な手段である feeding 法を適用できないことや、線虫の栄養素補給からも長期的な培養を必要とする実験には不適であると考えられる。一方、線虫の培養には栄養源として細菌を用いる他に、線虫の培養に必要な栄養素組成となるように成分を調製した液体培地による無菌的な培養方法等がある^{48,49)}。液体培養では栄養素組成を自由に組み替えることが可能であり、この培養方法を $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析に応用することで栄養素と代謝の関係性を簡便に測定することが可能になることから、今後検討する必要がある。また、 $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析法では、1 検体につき約 800 匹の線虫が必要であり、厳密に線虫数を合わせることに困難である。より精度を高めるためには、得られたデータを標準化する方法についても検討する必要がある。このような制約はあるものの、*C.elegans* に対して比較的簡便に非侵襲的かつ定量的な代謝変

化の検出を可能にする $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析法は、SCFAs 研究での新たな知見を得るうえで有用な分析ツールになると考えられる。加えて、健康科学分野の研究においても、動物倫理に抵触しないモデル動物としての *C.elegans* の有用性はより高まると考えられる。

近年、腸内細菌と宿主との関係性（クロストーク）がヒトの健康や様々な疾病の発症と予防に係ることも明らかになっており⁵⁰⁾、腸内細菌が大腸内で産生した SCFAs のバランスや SCFAs そのものがシグナルとして作用する可能性などが指摘されている⁵¹⁾。ポストバイオティクスとしての SCFAs に対する研究は、今後もさらに広がるものと考えられる。本研究で得られた知見が、腸内細菌と宿主とのクロストークを解明する手がかりを提供する一助となり、健康科学分野の研究の更なる発展に寄与することを期待している。

参考文献

- 1) Wagh CAM, Geerlings SY, Knol J, Roeselers G, Belzer C : Postbiotics and their potential applications in early life nutrition and beyond. *International Journal of Molecular Sciences* **20** (19), 4673–4696, 2019
- 2) Nataraj BH, Ali SA, Behare P V., Yadav H : Postbiotics-parabiotics: The new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microbial Cell Factories* **19** (1), 168–190, 2020
- 3) Tedelind S, Westberg F, Kjerrulf M, Vidal A : Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, **13** (20), 2826–2832, 2007
- 4) Holota Y, Dovbynychuk T, Kaji I, Vareniuk I, Dzyubenko N, Chervinska T, Zakordonets L, Stetska V, Ostapchenko L, Serhiychuk T, Tolstanova G : The long-term consequences of antibiotic therapy: Role of colonic short-chain fatty acids (SCFA) system and intestinal barrier integrity. *PLoS ONE*, **14** (8), 1–25, 2019
- 5) Suárez N, Ferrara F, Rial A, Dee V, Chabalgoity JA : Bacterial Lysates as Immunotherapies for Respiratory Infections: Methods of Preparation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **8**, 1–8, 2020

- 6) Liu Y, Tran DQ, Rhoads JM : Probiotics in Disease Prevention and Treatment. *Journal of Clinical Pharmacology*, **58** (10), 164–179, 2018
- 7) Khaled JMA : Probiotics, prebiotics, and COVID-19 infection: A review article. *Saudi Journal of Biological Sciences* **28** (1), 865–869, 2021
- 8) Belkina TV, Averina OV, Savenkova EV, Danilenko VN : Human Intestinal Microbiome and the Immune System: The Role of Probiotics in Shaping an Immune System Unsusceptible to COVID-19 Infection. *Biology Bulletin Reviews*, **11** (4), 329–343, 2021
- 9) Oggioni MR, Pozzi G, Galieni P, Valensin PE, Bigazzi C : Recurrent septicemia in an immunocompromised patient due to probiotic strains of *Bacillus subtilis*. *Journal of Clinical Microbiology* **36** (1), 325–326, 1998
- 10) Tommasi C, Equitani F, Masala M, Ballardini M, Favaro M, Meledandri M, Fontana C, Narciso P, Nicastrì E : Diagnostic difficulties of *Lactobacillus casei* bacteraemia in immunocompetent patients: A case report. *Journal of Medical Case Reports*, **2** (315), 1–4, 2008
- 11) Vahabnezhad E, Mochon AB, Wozniak LJ, Ziring DA : *Lactobacillus* Bacteremia Associated With Probiotic Use in a Pediatric Patient With Ulcerative Colitis. *Journal of Clinical Gastroenterology*, **47** (5), 437–439, 2013
- 12) Żółkiewicz J, Marzec A, Ruszczyński M, Feleszko W : Postbiotics—a step

beyond pre-and probiotics. *Nutrients* **12** (8), 1–17, 2020

- 13) Malagón-rojas JN, Mantziari A, Salminen S, Szajewska H : Postbiotics for preventing and treating common infectious diseases in children: A systematic review. *Nutrients* **12**, 389–403, 2020
- 14) Sakata T, Ichikawa H : 短鎖脂肪酸の生理活性. 日本油化学会誌, **46** (10), 143–150, 1997
- 15) Hara H, Suzuki T, Kasai T, Aoyama Y, Ohta A : Ingestion of guar-gum hydrolysate partially restores calcium absorption in the large intestine lowered by suppression of gastric acid secretion in rats. *British Journal of Nutrition*, **81** (4), 315–321, 1999
- 16) Kimura I, Ozawa K, Inoue D, Imamura T, Kimura K, Maeda T, Terasawa K, Kashihara D, Hirano K, Tani T, Takahashi T, Miyauchi S, Shioi G, Inoue H, Tsujimoto G : The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nature Communications*, **4** (1), 1–12, 2013
- 17) Sulston JE, Horvitz HR : Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, **56** (1), 110–156, 1977
- 18) Kaletta T, Hengartner MO : Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature Reviews Drug Discovery* **5**, 387–399, 2006

- 19) Hirotsu T, Sonoda H, Uozumi T, Shinden Y, Mimori K, Maehara Y, Ueda N, Hamakawa M : A Highly Accurate Inclusive Cancer Screening Test Using *Caenorhabditis elegans* Scent Detection. *PLOS ONE*, **10** (3), 1–15, 2015
- 20) Gottschling D-C, Döring F : Is *C. elegans* a suitable model for nutritional science? *Genes & Nutrition*, **14** (1), 1–4, 2019
- 21) 西川禎一 : 食品成分による線虫の老化制御 統合栄養科学へのモデルケース. *化学と生物*, **52** (7), 453–459, 2014
- 22) NAKADA K, KAWASAKI N, NAKAYOSHI T, HANYU N, KASHIWAGI H, YANAGA K : ^{13}C 呼気ガス診断の臨床応用—その現状と展望—. *RADIOISOTOPES*, **56** (10), 629–636, 2007
- 23) 若狭麻未, 三浦紀称嗣, 宮田富弘 : ラットにおける ^{13}C 呼気分析を用いた大腸内短鎖脂肪酸の吸収と代謝の評価. *川崎医療福祉学会誌*, **26** (1), 49–57, 2016
- 24) 若狭麻未, 三浦紀称嗣, 宮田富弘 : ^{13}C 呼気分析法によるラットの盲腸内に単独投与した酢酸, プロピオン酸およびn-酪酸の動態. *ルミナコイド研究 : 日本食物繊維学会会誌*, **20** (1), 39–47, 2016
- 25) Watts JL, Ristow M : Lipid and Carbohydrate Metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **207** (2), 413–446, 2017
- 26) Watson E, MacNeil LT, Arda HE, Zhu LJ, Walhout AJM : Integration of

- metabolic and gene regulatory networks modulates the *C. elegans* dietary response. *Cell*, **153** (1), 253–266, 2013
- 27) Watson E, Macneil LT, Ritter AD, Yilmaz LS, Rosebrock AP, Caudy AA, Walhout AJM : Interspecies systems biology uncovers metabolites affecting *C. elegans* gene expression and life history traits. *Cell*, **156** (4), 759–770, 2014
- 28) Watson E, Olin-Sandoval V, Hoy MJ, Li CH, Louisse T, Yao V, Mori A, Holdorf AD, Troyanskaya OG, Ralser M, Walhout AJM : Metabolic network rewiring of propionate flux compensates vitamin B₁₂ deficiency in *C. elegans*. *eLife*, **5**, 1–21, 2016
- 29) Uchida M, Kimiko S : ¹³C-Acetic Acid Is More Sensitive Than ¹³C-Octanoic Acid for Evaluating Gastric Emptying of Liquid Enteral Nutrient Formula by Breath Test in Conscious Rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **30** (3), 487–489, 2007
- 30) Margie O, Palmer C, Chin-Sang I : *C. elegans* chemotaxis assay. *Journal of Visualized Experiments*, (74), 1–6, 2013
- 31) Bulcha JT, Giese GE, Ali MZ, Lee Y-U, Walker MD, Holdorf AD, Yilmaz LS, Brewster RC, Walhout AJM : A Persistence Detector for Metabolic Network Rewiring in an Animal. *Cell reports*, **26** (2), 460–468, 2019
- 32) 伊藤武, 甲斐明美 : 腸管出血性大腸菌O157感染症と食品. 食品衛生学雑

誌, **38** (5), 275–285, 1997

- 33) Bruhn-Olszewska B, Szczepaniak P, Matuszewska E, Kuczyńska-Wiśnik D, Stojowska-Swędryńska K, Moruno Algara M, Laskowska E : Physiologically distinct subpopulations formed in *Escherichia coli* cultures in response to heat shock. *Microbiological Research*, **209**, 33–42, 2018
- 34) Orman MA, Brynildsen MP : Establishment of a Method To Rapidly Assay Bacterial Persister Metabolism. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57** (9), 4398–4409, 2013
- 35) Oliver JD : Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, **34** (4), 415–425, 2010
- 36) Ando T, Rasmussen K, Nyhan WL, Hull D : 3-hydroxypropionate: significance of -oxidation of propionate in patients with propionic acidemia and methylmalonic acidemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **69** (10), 2807–2811, 1972
- 37) Frazier HN, Roth MB : Adaptive Sugar Provisioning Controls Survival of *C. elegans* Embryos in Adverse Environments. *Current Biology*, **19** (10), 859–863, 2009
- 38) Al-Lahham SH, Peppelenbosch MP, Roelofsen H, Vonk RJ, Venema K : Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential

- applications and underlying mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1801** (11), 1175–1183, 2010
- 39) Toyoshima S, Watanabe F, Saido H, Pezacka EH, Jacobsens DW, Miyatake K, Nakano Y : Accumulation of methylmalonic acid caused by vitamin B₁₂-deficiency disrupts normal cellular metabolism in rat liver. *British Journal of Nutrition*, **75** (6), 929–938, 1996
- 40) Andra A, Tanigawa S, Bito T, Ishihara A, Watanabe F, Yabuta Y : Effects of Vitamin B₁₂ Deficiency on Amyloid- β Toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Antioxidants*, **10** (6), 2021
- 41) Bito T, Matsunaga Y, Yabuta Y, Kawano T, Watanabe F : Vitamin B₁₂ deficiency in *Caenorhabditis elegans* results in loss of fertility, extended life cycle, and reduced lifespan. *FEBS Open Bio*, **3**, 112–117, 2013
- 42) Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC : Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806–811, 1998
- 43) Conte D, Jr., MacNeil LT, Walhout AJM, Mello CC : RNA Interference in *Caenorhabditis Elegans*. *Current protocols in molecular biology*, **109**, 1–39, 2015
- 44) Revtovich A V, Lee R, Kirienko N V : Interplay between mitochondria and diet

- mediates pathogen and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics*, **15** (3), 1–27, 2019
- 45) Wilson KA, Han Y, Zhang M, Hess JP, Chapman KA, Cline GW, Tochtrop GP, Brunengraber H, Zhang G-F : Inter-relations between 3-hydroxypropionate and propionate metabolism in rat liver: relevance to disorders of propionyl-CoA metabolism. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, **313** (4), 413–428, 2017
- 46) Cheema-Dhadli S, Leznoff CC, Halperin ML : Effect of 2-Methylcitrate on Citrate Metabolism: Implications for the Management of Patients with Propionic acidemia and Methylmalonic aciduria. *Pediatric Research*, **9** (12), 905–908, 1975
- 47) Lagerwaard B, Pougovkina O, Bekebrede AF, Brinke H te, Wanders RJA, Nieuwenhuizen AG, Keijer J, Boer VCJ de : Increased protein propionylation contributes to mitochondrial dysfunction in liver cells and fibroblasts, but not in myotubes. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **44** (2), 438–449, 2021
- 48) Szewczyk NJ, Kozak E, Conley CA : Chemically defined medium and *Caenorhabditis elegans*. *BMC Biotechnology*, **3** (1), 1–7, 2003
- 49) Nass R, Hamza I : The Nematode *C. elegans* as an Animal Model to Explore Toxicology In Vivo: Solid and Axenic Growth Culture Conditions and Compound Exposure Parameters. *Current Protocols in Toxicology*, **31** (1), 1.9.1-

1.9.18, 2007

- 50) 後藤義幸, 清野宏 : 腸内フローラと宿主粘膜免疫のクロストーク. 腸内細菌学会雑誌, **25**, 235–243, 2011

- 51) 森田達也, 園山慶, 辻英明編 : 腸内細菌-宿主のクロストークと食事要因. 建帛社, 2019

学術論文

1. 宮田富弘, 三浦紀称嗣. 大腸内短鎖脂肪酸の吸収と代謝-¹³C 呼気分析法による解析-. ルミナコイド研究, **24**(2), 79-86, 2020
2. Kiyoshi MIURA, Hiroki YAMAGUCHI, Keita MIYATA, Tomihiro MIYADA. Bioscience, Biotechnology & Biochemistry. 令和 4 年 1 月 25 日現在 投稿中

学会発表

本研究の一部については下記の学会で報告した。

1. ◎三浦紀称嗣, 山口大貴, 宮田恵多, 宮田富弘. 線虫 (*Caenorhabditis elegans*) を用いた短鎖脂肪酸の測定-¹³C 呼気分析の応用-. 日本栄養・食糧学会大会第 74 回学術集会, 宮城, 令和 2 年 5 月 16 日.
2. ◎三浦紀称嗣, 山口大貴, 宮田恵多, 宮田富弘. ¹³C 呼気分析を応用した線虫における短鎖脂肪酸の測定. 日本食物繊維学会第 25 回学術集会, web 開催, 令和 2 年 11 月 21~23 日.
3. ◎三浦紀称嗣, 宮田富弘. ビタミン B₁₂ の投与が線虫 (*Caenorhabditis elegans*) のプロピオン酸代謝能に与える影響. 日本栄養・食糧学会大会第 75 回学術集会, web 開催, 令和 3 年 7 月 4 日.
4. ◎三浦紀称嗣, 宮田富弘. ¹³C 分析による線虫 (*C.elegans*) のプロピオン酸代謝変化の解析. 第 54 回 日本栄養・食糧学会 中国・四国支部大会 第 7 回日本栄養改善学会 四国支部学術総会合同大会, web 開催, 令和 3 年 10 月 31 日
5. ◎三浦紀称嗣, 宮田富弘. 線虫 (*C. elegans*) におけるビタミン B₁₂ 投与がプロピオン酸代謝能に及ぼす影響. 日本食物繊維学会第 26 回学術集会, web 開催, 令和 3 年 11 月 6~7 日.

謝 辞

本研究に際して、終始適切なご助言を賜り、学部生の頃より惜しみないご指導を下さりました宮田富弘先生に深謝いたします。さらに、実験を遂行するにあたり丁寧かつ熱心なご指導を賜りました川崎医療福祉大学医療技術学部臨床栄養学科 宮田恵多講師（現山梨学院大学准教授）に厚く御礼申し上げます。また、ご高閲の労を賜りました奥和之教授に深く感謝申し上げます。そして、数々の実験にご協力頂きました川崎医療福祉大学大学院医療技術学研究科健康科学専攻 山口大貴氏（現広島文教大学助教）に厚く御礼申し上げます。また、研究を遂行するにあたりご助言、ご協力頂きました健康科学専攻教職員並びに臨床栄養学科教職員各位に厚く御礼申し上げます。さらに、数々の実験で補助を頂いた研究室の後輩に深く感謝申し上げます。最後に、博士課程に進学する機会を与えてくださり、温かく見守り続けてくれた両親と、陰ながら支えて下さりました親族に心より感謝し、謝辞といたします。