

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10998

研究課題名(和文)酸化ストレス誘導蛋白質であるWDR35/naofen遺伝子の転写制御因子の同定

研究課題名(英文)Analysis of regulatory mechanisms of WDR35/naofen gene expression

研究代表者

馮 国剛 (Feng, Guo-Gang)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：70351111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：WD-repeat domainを持つ蛋白質WDR35/naofenの発現調節機構の解明を目的として、転写因子の結合配列を変異させた各種プロモーターを用いたレポーター遺伝子アッセイにより転写調節部位を特定し、プロモーター活性に必要な最小領域を確定できた。また、ゲルシフトアッセイとChIPを用いて転写因子EGR-1が本プロモーターに結合することを同定できた。さらに、bupivacainはEGR-1の活性化を介してWDR35/Naofenの発現を増加させることが解明した。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the transcriptional regulatory mechanisms of WDR35/naofen, a WD repeat (WDR)-containing protein, we cloned and functionally characterized the promoter region of the gene. The putative promoter activity was confirmed using dual luciferase reporter gene assay system. The minimal region required for basal activity of the promoter was determined by generating a series of deletion and point mutation constructs. The binding of a transcriptional factor EGR-1 to the minimal region was identified using electrophoretic mobility shift assay. Furthermore, binding activity of EGR-1 to the minimal region was confirmed using chromatin immunoprecipitation assay. We also showed that EGR-1 play an important role in modulating the expression of WDR35/naofen in Neuro2a cells. And bupivacaine induced the WDR35/naofen expression via enhancing EGR-1 activity.

研究分野：医歯薬学

キーワード：プロモーター活性 転写調節 転写因子 Egr-1 WD-repeat domain gene expression

1. 研究開始当初の背景

遺伝子が持つ2種類の機能部分には、コーディング領域とプロモーター領域がある。コーディング領域は、転写および翻訳メカニズムを介して生成されるタンパク質の情報を持つDNA配列である。プロモーター領域は遺伝子の転写を調節する特定のDNA配列であり、遺伝子発現を活性化または抑制することができる。生体内において、遺伝子のプロモーター領域に様々な転写調節因子の結合によって遺伝子の転写制御が行われている。細胞は生存状況に応じて、発現する遺伝子の種類や量を変化させ、生命活動を司る蛋白質の発現を調節する。さまざまな原因により、蛋白質の質、量あるいは発現場所などに異常が起こり、生命活動の恒常性を破綻させ、疾病発生へと至る。

申請者らは腸管出血性大腸菌外毒素であるベロ毒素の抗体を用いて、WD-repeat domainを持つ蛋白質 WDR35/naofen をクローニングした。WDR35/naofen は BCL-2 ファミリー蛋白質の発現を抑制し、アポトーシスを誘導することが報告してきた。WDR35/naofen のシグナル伝達に関して、その一部を解明されているが、WDR35/naofen の発現調節の機序や標的分子は依然として不明である。

2. 研究の目的

1) 酸化ストレス誘導蛋白質である WDR35/naofen 遺伝子のプロモーター領域を解析する。

2) WDR35/naofen 遺伝子の転写を制御する因子を同定する。

3) Bupivacaine を投与した培養細胞において WDR35/naofen の発現及び発現の調節因子をを検索する。

3. 研究の方法

1) ルシフェラーゼレポーターアッセイ用プラスミド作製

PROMOTER SCAN software

(<http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan>) を用いて WDR35/Naofen 遺伝子のプロモーター領域を解析し、その発現を制御する転写因子を同定した。マウスの WDR35/Naofen

遺伝子を持つ大腸菌人工染色体である BAC clone (RP-23-450M16) を培養し、BAC DNA を抽出し、精製した。BAC DNA をテンプレートとして各種のフォワードプライマーとリバースプライマーを用いて WDR35/Naofen 遺伝子の転写開始点から上流 5kp までの領域をそれぞれ増幅し、ホタルルシフェラーゼレポーターベクター-pGL4.17 luc2/Neo vector に組み込んで、レポーターアッセイ用プラスミドを作製した。さらに、それをテンプレート DNA として、KOD-Plus-Mutagenesis Kit を用いて各種転写因子の結合配列に点変異を作った。得られたすべての PCR 産物のシーケンスの配列を確認した。

2) 細胞培養

10% のウシ胎児血清と抗生物質を添加したダルベッコ改変イーグル培養液を用いて、マウス神経芽細胞腫である Neuro2a 細胞を 5% CO₂ の混合空気の存在下、37 °C の条件で培養した。

3) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

WDR35/naofen 遺伝子のプロモーター活性測定には Dual-Luciferase Reporter Assay System を用いた。Neuro2a 細胞を 96 well プレートに播種し、一晩培養した。Lipofectamine 2000 を用いてリポフェクション法により作製したレポータープラスミドとウミシイタケのルシフェラーゼレポータープラスミド(トランスフェクション効率の違いを標準化するため)を同時に導入した。24 時間後に、細胞に Passive Lysis Buffer を加えて細胞ライセートを調製した。Luciferase Assay Reagent II を加えてホタルルシフェラーゼ活性を測定した後に Stop & Glo Reagent を加えてウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。ウミシイタケのルシフェラーゼ活性による細胞間の遺伝子導入効率を補正し、各種マウス WDR35/naofen 遺伝子のプロモーター領域活性あるいは転写因子の結合配列に点変異による活性変化を評価した。

4) ゲルシフトアッセイ

DIG Gel Shift Kit を用いて、DIG 標識したプローブ DNA に対する核内タンパク質の結合を検出した。DIG 標識したプローブ DNA を Neuro2a 細胞の核内抽出液と混合し、室温で 30min 反応させた。Native PAGE (80V, 1hr) にて各サンプルを分離した後、ゲル中の DIG 標識した DNA をメンブレンに転写 (400mA, 30min) を行い、302nm UV で、3 分間の照射によって DNA を架橋させた。メンブレンをブロッキングし、Anti-Digoxigenin AP と反応させた、洗浄処理し、CSPD の添加により得られた発光を ImageQuant LAS 4000 を用いて検出した。

5) クロマチン免疫沈降法

SimpleChIP Plus Enzymatic Chromatin IP Kit を用いて細胞レベルにおける DNA への転写因子の結合性の評価を行った。Neuro2a 細胞に 37%ホルムアルデヒドを加えて DNA とタンパク質をクロスリンクさせた。Cell Lysis Buffer を加えて細胞ライセートを調製し、超音波処理機を用いて核膜を破碎した。Micrococcal nuclease 処理により DNA を断片化させた後、抗体 (normal Rabbit IgG, Anti-activator protein (AP)-2, -2, -2, -2, -2 Rabbit antibody あるいは Anti-EGR-1 Rabbit antibody) を加え、ChIP Grade Protein G 磁気ビーズにより目的の DNA-タンパク質を精製した。得られたサンプルからタンパク質を取り除き、特異的プライマーセットを用いて SYBR Green によるリアルタイム PCR 反応を行った。

6) ウェスタンブロットニング

Bupivacaine を投与した Neuro2a 細胞からの蛋白質を抽出し、定量した。SDS-PAGE によりタンパク質 (30-50 μg) を泳動分離し、メンブレンにブロットニングした。Egr-1、GAPDH や WDR35/Naofen に対する抗体と反応させた後、HRP (Horse-Radish Peroxidase) で標識した二次抗体を一次抗体に反応させて、化学発光により Egr-1 や WDR35/Naofen 蛋白質の発現を検出した。

4. 研究成果

1) マウス WDR35/naofen 遺伝子のプロモーター領域の同定

まず、各種のプロモーターを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイを行い、マウス WDR35/naofen プロモーター領域を検索した結果、WDR35/naofen 遺伝子の転写開始点から上流 -350bp までの領域に高い転写活性を見出した。その転写活性は転写開始点上流の -107bp までにも有し、-39bp までになくなることから、その転写活性の必須のプロモーター領域は転写開始点から上流の -39bp から -107bp までの間に存在することが見出した (下記の図 1)。さらに、PROMOTER SCAN software を用いて WDR35/naofen 遺伝子の転写開始点から上流の -350bp までの領域に転写因子の結合部位を解析し、NF- B、AP-2、EGR-1 などの転写因子の結合配列が存在することが判明した。さらに、転写開始点から上流の -107bp までにそのプロモーターの転写活性に必須の領域があることが明らかにした。この転写活性の必須領域に Sp-1、AP-2 と EGR-1 など転写因子が結合する部位が存在する。さらに、転写因子の AP-2 と EGR-1 の結合部位が重なって存在することも見出した (下記の図 2)。

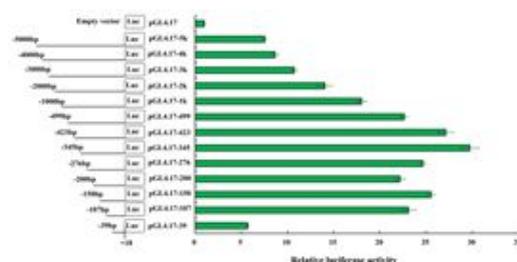


図 1

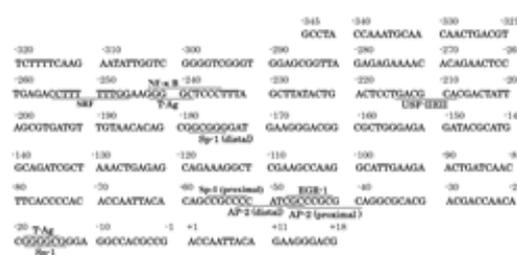


図 2

2) WDR35/naofen 遺伝子プロモーターの転写活性の必須領域の同定

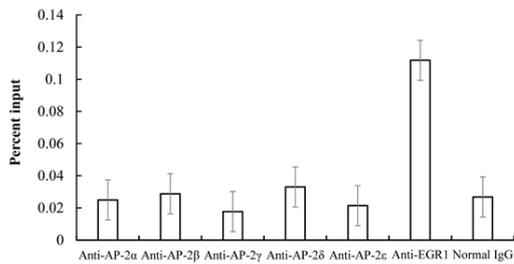


図 5

4) EGR-1 と WDR35/Naofen の発現に対する bupivacaine の影響

Neuro2a 細胞において bupivacaine の投与は EGR-1 蛋白質の発現を増加させ、2 時間後に最大になった。同様に、WDR35/Naofen 蛋白質の発現も増加され、9 時間後に最大となった。これらの結果から bupivacaine は EGR-1 を活性化させることを介して WDR35/Naofen の発現を増加することが示唆された(下記の図 6)。

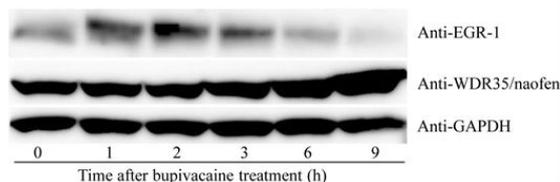


図 6

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

- Human albumin and oxidative stress in preeclamptic women and the mechanism of albumin for stress reduction. Hiroyuki Kinoshita, Toshiharu Azma, Guo-Gang Feng, Akihiko Wakatsuki. 2017, Volume 3, Issue 8, Article e00369. doi: 10.1016/j.heliyon.2017. e00369. 査読有
- Lidocaine Prevents Oxidative Stress-Induced Endothelial Dysfunction of the Systemic Artery in Rats With Intermittent Periodontal Inflammation. Saito T, Yamamoto Y, Feng GG, Kazaoka Y, Fujiwara Y, Kinoshita H.

Anesth Analg. 2017; 124: 2054-2062. doi: 10.1213/ANE.0000000000002102. 査読有

- Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition induces vasodilator effect of sevoflurane via reduction of Rho kinase activity. Miyamoto Y, Feng GG, Satomi S, Tanaka K, Fujiwara Y, Kinoshita H. Life Sci. 2017. 177: 20-26. doi: 10.1016/j.lfs.2017.04.005. 査読有
- Branched-chain amino acids alleviate hepatic steatosis and liver injury in choline-deficient high-fat diet induced NASH mice. Takashi Honda, Masatoshi Ishigami, Fangqiong Luo, Guo-Gang Feng, Yoshiaki Katano, Yoshiharu Shimomura, Hidemi Goto, Yoshiki Hirooka. Metabolism Clinical And Experimental. 2017. 69: 177-187. doi: 10.1016/j.metabol.2016.12.013. 査読有
- Intermittent local periodontal inflammation causes endothelial dysfunction of the systemic artery via increased levels of hydrogen peroxide concomitantly with overexpression of superoxide dismutase. Yamamoto Y, Saito T, Feng GG, Li J, Yasuda Y, Kazaoka Y, Fujiwara Y, Kinoshita H. Int J Cardiol. 2016. 222:901-7. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.08.099. 査読有
- High oxygen modifies vasodilator effect of cysteine via enhanced oxidative stress and thromboxane production in the rat mesenteric artery. Yasuda Y, Feng GG, Li J, Nakamura E, Hayashi H, Sato M, Fujiwara Y, Kinoshita H. Pflugers Arch. 2016. 468:1555-64. doi: 10.1007/s00424-016-1857-y. 査読有
- Sevoflurane inhalation accelerates the long-term memory consolidation via small GTPase overexpression in the hippocampus of mice in adolescence. Nakamura E, Kinoshita H, Feng GG, Satomoto M,

- Fujiwara Y. PloS One. 2016. 11:e0163151. doi: 10.1371/journal.pone.0163151. 査読有
8. Propofol reduces liver dysfunction caused by tumor necrosis factor- α production in Kupffer cells. Li J, Kandatsu N, Feng GG, Huang L, Kinoshita H, Okada S, Fujiwara Y. J Anesth. 2016. 30:420-6. doi: 10.1007/s00540-016-2145-x. 査読有
9. Kynunine causes vasodilation and hypotension induced by activation of KCNQ-encoded voltage-dependent K(+) channels. Sakakibara K, Feng GG, Li J, Akahori T, Yasuda Y, Nakamura E, Fujiwara Y, Kinoshita H. J Pharmacol Sci. 2015. 129: 31-7. doi: 10.1016/j.jphs.2015.07.042. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Tanaka K, Sakakibara K, Hashimoto A, Feng GG, Fujita Y, Fujiwara Y. プピバカインは T 型カルシウムチャネルを阻害し神経細胞死を誘導する. 日本麻酔科学会第 64 回学術集会 (神戸) 2017. 6. 8-10.
2. Tanaka K, Sakakibara K, Hashimoto A, Feng G.G, Fujita Y, Fujiwara Y. Inhibition of T-type Ca^{2+} channel induces human neuroblastoma cell death and enhances neurotoxicity of bupivacaine. Euroanaesthesia 2017 (Geneva, Switzerland) 2017. 6. 3-5.
3. 田中 久美子, 馮 国剛, 藤原 祥裕. プピバカインは T 型 Ca^{2+} チャネルを阻害し、神経細胞死を誘導する. 日本区域麻酔学会 第 4 回学術集会 (名古屋) 2017. 4. 14-15.
4. 馮 国剛, 田中 久美子, 藤原 祥裕, 岡田 尚志郎. SH-SY5Y 細胞においてプピバカインは T 型カルシウムチャネルを抑制し、アポトーシスを誘導する. 第 90 回日本薬理学会年会 (長崎)

2017. 3. 15-17.

5. 馮 国剛、岡田 尚志郎. Neuro2a 細胞における EGR-1 は WDR35 の発現を制御する. 第 89 回日本薬理学会年会 (横浜) 2016. 3. 9-11.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 取得年月日 :
 国内外の別 :

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 馮国剛 (Feng Guo-Gang)
 愛知医科大学・医学部・講師
 研究者番号 : 70351111

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :

(4) 研究協力者 ()