

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19031

研究課題名(和文)グリオキサレース1の新規遺伝子多型による転写発現調節機構の解明

研究課題名(英文) A novel polymorphism-driven transcriptional regulation of human glyoxalase 1 gene

研究代表者

原島 愛 (Harashima, Ai)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：50705522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者が初めて見出したGlyoxalase 1 (GL01)のプロモーター領域内の複数の遺伝子多型の中に、ヒトGL01の転写活性を著しく亢進させる遺伝子多型が存在していた。この遺伝子多型の転写調節機構を解明すると、エピジェネティックな変化が関与していた。また、当該遺伝子多型と1型糖尿病患者の糖尿病血管合併症の発症進展の程度には相関があることも明らかとなり、当該遺伝子多型は糖尿病合併症のリスク予測因子や予防・治療の新規ターゲットになりうる。また、当該遺伝子多型の出現は環境因子に影響を受けることも初めて明らかとなった。他の遺伝子にも同様な調節機構が働いているのかどうか、今後の研究に期待したい。

研究成果の概要(英文)：Detoxifying enzyme glyoxalase 1 (GL01) is known to be involved in the development of diabetes and its complications. However, the transcriptional regulation of GL01 is not yet fully understood. In this study, we have identified novel polymorphisms in the human GL01 promoter region. One of the polymorphisms was found to significantly upregulate the transcription of GL01. We next addressed to reveal molecular mechanisms under the upregulation of the GL01 transcription. As a result, the recruitment of histone proteins and the epigenetic modifications were involved in the transcriptional regulation. Cell culture conditions such as high glucose concentration or normoxia could change the frequency of the polymorphisms of the GL01 gene. The polymorphisms were also found to link to the development of advanced diabetic vascular complications. These findings will offer a possible new avenue for the prevention and the treatment of GL01-related diseases.

研究分野：分子生物学

キーワード：転写調節

1. 研究開始当初の背景

Glyoxalase1(GLO1)は、後期糖化反応生成物 (advanced glycation end-products, AGE) の前駆体で反応性の高い α -ジカルボニル化合物メチルグリオキサール (MG) を解毒する酵素である。これまでの研究により、GLO1は糖尿病、がん、精神疾患などに関与していることが明らかになっている。しかし、GLO1の転写発現調節機構については、ストレスにより活性化される Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2 p45 subunit-related factor 2) の関与が報告 (*Biochem J* 443, 2012) されただけで、未だその全貌は明らかにされていない。GLO1は生体にとって大変重要な酵素と考えられ、GLO1の転写発現調節機構を解明することは生物学的にも意義あると考えられる。

2. 研究の目的

研究代表者のこれまでの検討により、世界で初めて GLO1 プロモーター領域内の反復配列内に複数の遺伝子多型が見いだされた。これらの遺伝子多型は、個人、患者、細胞群ごとに異なる発現頻度を示すことが明らかとなった。さらに、その中で、著しく転写活性を亢進させる遺伝子多型 (以下、当該遺伝子多型) を見出すことに成功した。当該遺伝子多型に焦点を当て、GLO1の転写発現調節機構の分子メカニズムを解明することが本研究の目的である。さらにヒト疾患と当該遺伝子多型との関連についても明らかにする。

3. 研究の方法

研究代表者は、当該遺伝子多型に特異的に結合するヒストンを同定し、GLO1 遺伝子の転写発現調節機構にエピジェネティックな変化が関与することが重要であるという結果を得た。

また、GLO1 プロモーター内反復配列の遺伝子多型と糖尿病血管合併症の発症進展の関連についてヒト臨床検体を用いて検討を行った。

(1) ヒストン修飾による GLO1 転写発現調節機構の全貌解明

ヒストン修飾と GLO1 遺伝子多型の転写活性の関連性を調べるために、アセチル化修飾に影響を与えるアセチルトランスフェラーゼ阻害剤、脱アセチル化酵素阻害剤を使用した。また、メチル化修飾の解析においてはメチルトランスフェラーゼ阻害剤を使用し検討を行った。

また、ビオチン標識された GLO1 プロモーター領域を Lipofectamine2000 を用いて培養細胞 (293T または HepG2 細胞) に導入し、24 時間後に 1%ホルムアルデヒドを用いてクロスリンクした。その後、細胞を溶解しストレプトアビジンビーズを用いてビオチン標識された DNA をプルダウンし、プルダウンされた GLO1 DNA 量は、PCR 法で確認した。プルダウンされたヒストン修飾 (アセチル化、メチ

ル化) は特異抗体を用いて検出した。

(2) ヒト臨床検体を用いた病態と GLO1 プロモーター反復配列当該遺伝子多型との関連性の検討

GLO1 遺伝子プロモーター領域内の反復配列に存在する遺伝子多型と糖尿病血管合併症の発症進展との関連性についての検討を 1 型糖尿病患者の末梢血ゲノム DNA 臨床検体 (75 症例) を用いて行った。

GLO1 プロモーター反復配列領域を PCR 法によって増幅し制限酵素 (*KpnI* と *XhoI*) 処理しベクター (pGL4.14) に組み込み、得られたクローンの塩基配列を DNA シークエンシング法で決定した。解析では、1 人の患者につき少なくとも 20 個のクローンの塩基配列決定を行うことで GLO1 遺伝子多型発現頻度の解析を行った。また、コントロールとして約 29 名の健常者の末梢血ゲノム DNA も使用し、GLO1 遺伝子多型の発現頻度の解析を行った。

(3) 細胞への各種刺激・ストレス暴露による GLO1 プロモーター遺伝子多型の発現頻度の検討

細胞分裂に伴って GLO1 プロモーター内反復配列の遺伝子多型が出現する可能性が考えられたので、培養細胞を用いた検討を行った。293T 細胞を低酸素 (2% O₂) または高血糖 (グルコース 4.5 g/L) 状態で培養した。その後、ストレスを加えた 293T 細胞からゲノム DNA を抽出し、GLO1 遺伝子多型の発現頻度を経時的に解析した。

4. 研究成果

(1) ヒストン修飾による GLO1 転写発現調節機構の全貌解明

293T 細胞に GLO1 当該遺伝子多型を含むプロモーター領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結させたベクターを過剰発現させ、その後アセチルトランスフェラーゼ阻害剤、脱アセチル化酵素阻害剤またはメチルトランスフェラーゼ阻害剤を作用させ GLO1 の転写活性をルシフェラーゼを指標として解析した。その結果、アセチルトランスフェラーゼ阻害剤の存在下で当該遺伝子多型による転写亢進が著しく抑制された。逆に、脱アセチル化酵素阻害剤では、当該遺伝子多型の転写は、さらに亢進された。

次に、ヒストンアセチル化修飾が関与しているのかを明らかにするために検討を行った。プルダウンされたヒストンの修飾をウエスタンブロット (アセチル化特異抗体) を用いて検討したところ、当該遺伝子多型では、他の遺伝子多型に比べて著しくヒストンのアセチル化修飾が増加していることが明らかとなった。

これらの結果より、当該遺伝子多型の転写亢進は、特異的に結合するヒストンの存在とヒストンアセチル化修飾が関与するという、エピジェネティックな発現誘導によることが明らかとなった。

(2) ヒト臨床検体を用いた病態と GLO1

プロモーター反復配列当該遺伝子多型との関連性の検討

当該遺伝子多型と糖尿病血管合併症の発症進展の関連についての検討をヒト臨床検体を用いて行った。1型糖尿病患者75症例、コントロールとして健常者29名の末梢血ゲノムDNAを使用しGLO1遺伝子多型発現頻度の解析を行った。結果、当該遺伝子多型と糖尿病血管合併症の発症進展の間には相関がみられた。この結果より、当該遺伝子多型は糖尿病血管合併症の新たなリスク予測因子、あるいは治療ターゲットまたは診断のマーカーになると考えられた。

(3) 細胞への各種刺激・ストレス暴露によるGLO1プロモーター遺伝子多型の発現頻度の検討

293T細胞を低酸素(2% O₂)で培養したところ当該遺伝子多型の発現頻度が、変化することが明らかとなった。

次に、293T細胞を高血糖条件下(グルコース4.5g/L)または正常血糖で培養し、0、1、2、4、6、8週目で細胞よりゲノムDNAを抽出し、GLO1遺伝子多型の発現頻度を調べた。結果、高血糖状態では、著しく当該遺伝子多型の割合が高くなることが明らかとなった。また、興味深いことに6週間高血糖状態で培養した細胞を正常血糖の状態に培養すると当該遺伝子多型の割合が低下することも明らかになった。

これらの結果より、細胞は培養条件により当該遺伝子多型の割合を変化させて細胞外環境に適応していると考えられた。

この研究により、GLO1は当該遺伝子多型を持つ細胞の割合を高血糖下で増加させることにより、GLO1遺伝子の転写発現を調節しているものと考えられた。

本研究によりGLO1当該遺伝子多型によるこれまでにない新たな転写発現調節機構が明らかとなった。また、このGLO1当該遺伝子多型は、糖尿病血管合併症の発症進展にも関与していることが明らかとなり、糖尿病血管病合併症のリスク予測因子や新しい治療ターゲット分子となりうる。

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7件)

- (1) Higuchi T, Takeuchi A, Munesue S, Yamamoto N, Hayashi K, Kimura H, Miwa S, Inatani H, Shimozaki S, Kato T, Aoki Y, Abe K, Taniguchi Y, Aiba H, Murakami H, Harashima A, Yamamoto Y, Tsuchiya H. Anti-tumor effects of a non-steroidal anti-inflammatory drug zaltoprofen on chondrosarcoma via activating peroxisome proliferator-activated receptor gamma and suppressing matrix metalloproteinase-2

expression. *Cancer Med* in press (2018) (査読有)

- (2) El-Far A, Munesue S, Harashima A, Sato A, Shindo M, Nakajima S, Inada M, Tanaka M, Takeuchi A, Tsuchiya H, Yamamoto H, Shaheen HME, El-Sayed YS, Kawano S, Tanuma S, Yamamoto Y. In vitro anticancer effects of a RAGE inhibitor discovered using a structure-based drug design system. *Oncology Lett* 15(4): 4627-4634 (2018) (査読有)
- (3) Higashida H, Furuhashi K, Yamauchi AM, Deguchi K, Harashima A, Munesue S, Lopatina O, Gerasimenko M, Salmina AB, Zhang JS, Kodama H, Kuroda H, Tsuji C, Suto S, Yamamoto H, Yamamoto Y. Intestinal transepithelial permeability of oxytocin into the blood is dependent on the receptor for advanced glycation end products in mice. *Sci Rep* 11(1): 7883 (2017) (査読有)
- (4) Harashima A, Yamamoto Y. Perception of pathogenic bacteria by pattern recognition receptor RAGE in the frontline. *IMARS Highlights* 12(2): 5-7 (2017) (査読無)
- (5) Aikawa T, Matsubara H, Ugaji S, Shirakawa J, Nagai R, Munesue S, Harashima A, Yamamoto Y and Tsuchiya H. Contribution of methylglyoxal to delayed healing of bone injury in diabetes. *Mol Med Rep* 16: 403-409 (2017) (査読有)
- (6) Yamaguchi T, Fushida S, Yamamoto Y, Tsukada T, Kinoshita J, Oyama K, Miyashita T, Tajima H, Ninomiya I, Munesue S, Harashima A, Harada S, Yamamoto H and Ohta T. Low-dose paclitaxel suppresses the induction of M2 macrophages in gastric cancer. *Oncology Rep* 37: 3341-3350 (2017) (査読有)
- (7) Abouzed TK, Munesue S, Harashima A, Masuo Y, Kato Y, Khailo KKK, Yamamoto H and Yamamoto Y.: Preventive effect of salicylate and pyridoxamine on diabetic nephropathy. *J Diabetes Res* 2016:1786789 (2016) (査読有)

[学会発表](計9件)

- (1) 原島 聖、棟居聖一、Tarek Kamal Abouzed、河野修平、田中麻莉子、増尾友佑、加藤将夫、山本 博、山本靖彦、抗炎症薬サリチル酸と抗糖化薬ピリドキサミンによるマウス糖尿病腎症予防効果の検討、第90回日本生化学会大会、2017年12月6日-12月9日
- (2) 棟居聖一、ALI HAFEZ ALI MOHAMMED EL-FAR、

- 原島 愛**、武内章彦、河野修平、田中麻莉子、佐藤 聡、中島楨吾、田沼靖一、山本靖彦、新規 RAGE 阻害薬による線維肉腫細胞腫瘍悪性の抑制効果の検討、第 90 回日本生化学会大会、2017 年 12 月 6 日 -12 月 9 日
- (3) 河野修平、宮澤英恵、棟居聖一、**原島 愛**、Duong Thi Minh Thoa、Nontaphat Leerach、山本靖彦、RAGE 切断を誘導する薬剤スクリーニングと疾患の制御、第 27 回メイラード学会 2017 年 11 月 18 日
- (4) 棟居聖一、**原島 愛**、武内章彦、田中麻莉子、河野修平、佐藤 聡、新藤実香、中島楨吾、稲田 愛、田沼 靖一、山本靖彦、線維肉腫細胞の悪性化形質に及ぼす新規 RAGE 阻害薬の効果の検討、第 27 回メイラード学会、2017 年 11 月 18 日
- (5) 棟居聖一、Tarek Kamal Abouzed、**原島 愛**、山本博、山本靖彦、抗炎症薬サリチル酸と抗糖化薬ピリドキサミンによるマウス糖尿病腎症予防効果の比較検討、第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会、2017 年 5 月 18 日-5 月 20 日
- (6) **Ai Harashima**, Seiichi Munesue, Junnosuke Miura, Yasuko Uchigata, Hiroshi Yamamoto, Yasuhiko Yamamoto, Novel polymorphisms in promoter region of human glyoxalase 1 regulate its transcription and are associated with aging-related diseases, Keystone Symposia Conference Aging and Mechanisms of Aging-Related Disease, 20170515-0519
- (7) 棟居聖一、**原島 愛**、武内章彦、佐藤 聡、中島楨吾、田沼靖一、山本靖彦、RAGE 阻害薬の腫瘍悪性形成に及ぼす効果の検討、第 26 回日本メイラード学会年会、2016 年 11 月 11 日~12 日
- (8) **原島 愛**、棟居聖一、山本靖彦、ヒト Glyoxalase1 (GL01) の新規ホモポリマー遺伝子多型による転写調節機構、第 26 回日本メイラード学会年会、2016 年 11 月 11 日~12 日
- (9) **原島 愛**、棟居聖一、山本 博、山本靖彦、抗糖化酵素 Glyoxalase 1 のプロモーター遺伝子多型による転写調節機構、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25 日~27 日

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: GL01 の発現が関与する疾患の存在の検出方法、該検出方法に使用するマーカー、GL01 酵素活性向上剤及び GL01 酵素活性低減剤

発明者: 山本靖彦、棟居聖一、**原島 愛**、山本 博、伏田奈津美、山村優果、高山秀雄、横山理菜、内潟安子、三浦順之助

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2016-96027

出願年月日: 2016 年 5 月 12 日

国内外の別: 国内

名称: 乳児の社会脳発達促進用栄養組成物
発明者: 東田陽博、山本靖彦、**原島 愛**、出口喜三郎

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2017-49151

出願年月日: 2017 年 3 月 14 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://biochem2.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原島 愛 (HARASHIMA Ai)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号: 50705522