

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17390199
 研究課題名（和文） 新しい年齢依存性発現遺伝子の分子生物学的解析と法医学的年齢推定への応用
 研究課題名（英文） Molecular biological analysis of age-dependently expressed genes : application to age estimation in legal medicine
 研究代表者
 飯田 礼子 (IIDA REIKO)
 福井大学・医学部・助教
 研究者番号：40139788

研究成果の概要：年齢依存性発現生体分子を“マーカー”とした法医学的年齢推定法を開発するための基礎的研究を行い、以下の成果を得た。(1) マウス肝において年齢依存性発現を示す遺伝子を検索し、6個の既知遺伝子を同定した。(2) 若年者の尿に特異的に見いだされる糖タンパク質 Ugl-Y について解析を行ない、Ugl-Y が fibronectin の一部の配列に完全に一致すること、また、血清に由来することを明らかにした。(3) マウス腎で見いだされた年齢依存性発現生体分子 M-LP はヒトにも存在し、活性酸素の代謝機構に関与していることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	3,100,000	0	3,100,000
2006年度	2,600,000	0	2,600,000
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
総計	9,600,000	1,170,000	10,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：年齢推定・老化・遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

昨今の犯罪の悪質・巧妙化に伴い、被疑者や被害者などを特定するための法医鑑識科学分野における個人識別精度の向上が益々要請されている。近年、分子生物学の進歩に立脚したDNA多型の法医実務への導入により、個人識別精度の飛躍的向上がもたらされた。他方、体液や臓器などの法医学的試料から、その試料の由来する個人の年齢を推定するマーカーに関する研究は内外においてほとんどなされておらず、アスパラギン酸のラセ

ミ化やテロメア長の短縮などを指標とするものなどが散見されるに過ぎない。これらの指標では当該個人の年齢を絞り込むには精度が極めて不十分であり、“年齢推定”は法医鑑識科学分野において盲点になってきた。

我々は長年にわたり、タンパク化学及び免疫学的手法を用いた年齢関連物質についての研究に取り組み、ヒト尿中の若年者特異的糖タンパク質、成人男性特異抗原、成人男女及び少女に共通な抗原、ヒト大脳中に40歳までの若壮年者の大脳に存在する酸性タンパク質などを発見した。また近年は、トラン

スク립トーム解析を新たな方法論として導入し、マウスの年齢依存性発現生体分子の包括的な検索を行うことにより、ユニークな年齢依存性発現パターンを示す既知および未知の生体分子を見出した。このような従前の基礎的研究の成果から、これらの年齢依存性発現生体分子を“バイオマーカー”として、法医学的試料から年齢推定を行うことは十分可能であると考え本研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では以下の2点を達成できるよう研究を推進した。

- ・トランスクリプトーム解析によって年齢依存性発現生体分子を網羅的に検索・同定すること
- ・従前の研究により同定した年齢依存性発現生体分子Ugl-Y (Young age-related urinary glycoprotein) およびM-LP (Mpv17-like protein)の構造・生理的機能を解明する。

3. 研究の方法

(1) マウス肝の年齢依存性発現遺伝子の検索と同定

生後3日ないし15ヶ月を経過したマウス(C57BL/6)の肝からRNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いてRNAを抽出した。蛍光ダイフレンシャルディスプレイ(FDD)解析は、10種類の任意primer(Operon)と3種類の3'-anchored oligo-dT primerの組み合わせによる計30通りのprimer対を用いて実施した。発現様式に年齢依存性変化の見られたcDNAについては、サブクローニング後、塩基配列を決定し、DNAデータベースを利用してホモロジー検索(BLAST)した。各遺伝子の発現量は、Power SYBR Green PCR Master Kit (Applied Biosystems)を使用してreal-time PCR解析装置(Applied Biosystems)により測定した。

(2) 年齢依存性発現生体分子の構造と生理的機能の解明

① 若年者の尿に特異的に存在する糖タンパク質Ugl-Yの解析

尿試料は同意を得た上、男性1名より定期的に採取した。Ugl-Yは、硫酸分画法、疎水性クロマトグラフィーおよびpreparative電気泳動法などを用いて精製した。Ugl-YのN末端配列は、IEF-PAGEで分離したUgl-YをPVDF膜に転写後、プロテインシークエンサーを用いて分析した。内部およびC末端配列は、

PVDF膜上で3種のプロテアーゼで断片化して得られたペプチドをHPLCで分離後、プロテインシークエンサーおよびMALDI-TOF MSを用いて決定した。Ugl-Yの発現は、Y1およびY2に相当する配列をコードする発現ベクターをCOS-7細胞に導入後、細胞抽出液をIEF-PAGEで分析することにより確認した。

② マウスの年齢依存性発現分子M-LPのヒトホモログの遺伝子構造と機能の解析

M-LPH (M-LPヒトホモログ)の全長cDNAのクローニングは、ヒト腎由来poly A⁺ RNAを用いてRACE法により行った。細胞内局在は、GFP標識M-LPH発現用vectorを導入したCOS-7細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察することにより解析した。M-LPH発現細胞における抗酸化酵素のmRNAはreal-time PCR装置を用いて定量した。

4. 研究成果

(1) マウス肝の年齢依存性発現遺伝子の検索と同定

生後3日から15ヶ月のマウス脳について、30通りのprimer対を用いてFDD解析を行い、年齢依存的な発現量変化を示すバンド6本(L1-L6)を見出した。これらすべての塩基配列を決定後、real-time PCR装置による解析を行ったところ、いずれもFDD法と同様な年齢依存的な発現パターンを示すことが確認された(図1)。

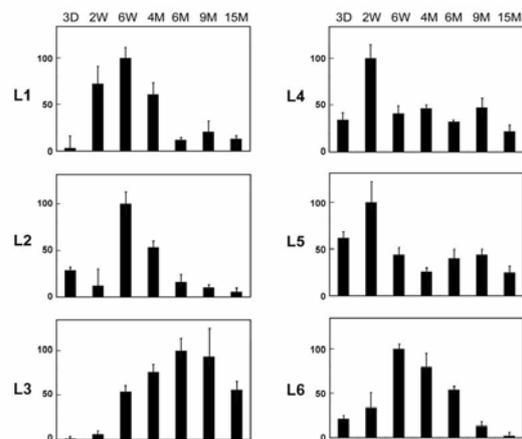


図1 マウス肝の年齢依存性発現遺伝子

ホモロジー検索の結果、L1-L6はそれぞれmouse mitochondrion genome (GenBank DQ106412; 100% identity: 209/209), mouse EST of CWF19-like 1 gene (GenBank AV466254; 99% identity: 109/110), mouse aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily

Al mRNA (GenBank BC054386; 99% identity: 241/243), mouse ESTs of ecotropic viral integration site 5 (GenBank CN530763, BU924136 他; 98% identity: 265/269), mouse cell division cycle 2-like 5 mRNA (GenBank NM001081058; 99% identity: 197/198), mouse complement component 8, alpha polypeptide mRNA (GenBank BC027748; 99% identity: 633/635) との間に高いホモロジーを有し、これらの遺伝子の1部であると考えられた。今回見出した年齢依存性発現パターンはこれらの遺伝子の未知の生理的機能の解明にも役立つものと考えられる。

(2) 若年者の尿に特異的に存在する糖タンパク質 Ugl-Y の構造と生理的機能の解明

① 加齢に伴う Ugl-Y 量の変化

Ugl-Y は、等電点電気泳動法により 17 才までの健康な若年者の尿中に 3 本 1 組のバンド (Y1-Y3) として見いだされた糖タンパク質である。それぞれ 50 名以上の若年者および成人の尿検体の解析から Ugl-Y は若年者に特異的であることが判明していたが、今回、1 個体から定期的に尿を採取し、Ugl-Y 量が加齢とともにどのように変化するかを解析した。3 本 1 組の Ugl-Y のバンド (Y1-Y3) の濃度は 16 才で激減し、17 才以降では検出不可能であったことから、Ugl-Y は個体のレベルにおいても若年期に特有のタンパク質であることが確認された(図 2)。

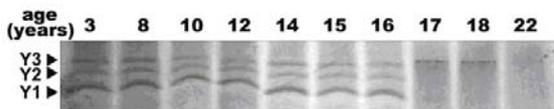


図 2 加齢に伴う Ugl-Y 量の変化

② Ugl-Y の 1 次構造の解析

採取した尿から精製した Ugl-Y を、等電点電気泳動で分離後 PVDF 膜に転写し、N 末端配列を protein sequencer を用いて分析した。その結果、最も陰極側に位置するバンド Y1 の N 末端配列は、fibronectin (FN, 血清や細胞外マトリックスに存在し、細胞の接着、移動、分化や細胞骨格の構築に重要な役割を担うタンパク質) の 723 から 740 番目のアミノ酸残基の配列 (A723-W740) に完全に一致していることが明らかとなった。そこで、PVDF 膜上で 3 種のタンパク分解酵素による断片化を行い、得られた peptide 断片を HPLC で分離後、それぞれの断片の配列を protein sequencer を用いて分析したところ、Y1 および Y2 の N 末端から少なくとも 185 残基は FN の配列と完全に一致することが示された。さ

らに、C 末端ペプチドの MALDI-TOF MS による分析の結果から、Y1 および Y2 の C 末端はそれぞれ FN の 911 番目 (R911) および 903 番目のアルギニン (R903) に相当することが判明した。このように Ugl-Y の完全一次構造の決定により、Ugl-Y は FN の部分タンパク質分解によって生じたものであることが明らかとなった。

③ 培養細胞内での Ugl-Y の発現

決定した 1 次構造 (Y1, A723-R911; Y2, A723-R903) を持つタンパク質を培養細胞内で発現させ、細胞抽出液を等電点電気泳動により分析し、発現タンパク質と尿由来 Y1, Y2 の移動度を比較した。それぞれの発現タンパク質は、尿中の Y1, Y2 と同じ移動度を示したことから、決定した 1 次構造が Ugl-Y の配列に相当することが確認された。また、興味深いことに、Y1 発現細胞からは Y1 のみならず Y2, Y3 が、また Y2 発現細胞からは Y2 のみならず Y3 が検出されたことから、Y2 および Y3 は Y1 の翻訳後修飾によって生じたものと考えられた。

④ 血清からの Ugl-Y の検出

FN は、血清中ばかりでなく、糸球体間質や腎基底膜にも存在することが知られている。そこで、FN 断片である Ugl-Y が血清に由来するのか、あるいは腎臓または尿路に由来するのかを明らかにするために、小児血清からの Ugl-Y の検出を試みた。およそ 1.3 ml の血清を部分精製して得られた標品について、FN に対する特異抗体を使用した免疫ブロット法による検出を行うと、Ugl-Y の 3 本のバンドが検出された。このことから、Ugl-Y は血清由来であることが証明された。

FN は、2 本のポリペプチド鎖 (分子量約 25 万) が S-S 結合により結合した分子であり、それぞれのポリペプチド鎖は 3 種類の繰り返しユニット (タイプ I, II, III) により構成されている。今回判明した Ugl-Y の位置は 2 番目と 3 番目のタイプ III ユニットの領域にほぼ一致していた (図 3)。

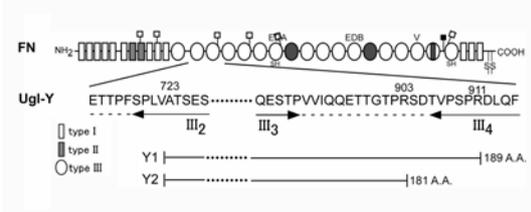


図 3 FN と Ugl-Y の位置関係

(3) マウスの年齢依存性発現分子 M-LP のヒトホモログ (M-LPH) の遺伝子構造と機能の解析

M-LP は、トランスクリプトーム解析による年齢依存性発現生体分子の網羅的検索の過程で見い出されたマウス腎のタンパク質であり活性酸素代謝機構への関与が示唆されている。本研究では、M-LP の分子多様性を検討するために、M-LP のヒトホモログ (M-LPH) を同定し、その遺伝子構造、局在および抗酸化酵素の発現誘導・抑制作用について検討を行った。

① M-LPH 遺伝子の同定

マウス M-LP のアミノ酸配列を用いてヒトゲノムデータベースの TBLASTN 検索 (NCBI) を行ったところ、M-LP の 1 部に高いホモロジーを有するコンテイング (GenBank no. NT_010393) が同定された。そこで、この配列に基づいて RACE 法による cDNA のクローニングを行った。得られた RACE 産物の塩基配列とヒトゲノム配列との比較から、M-LPH 遺伝子は 16 番染色体 p13.1 領域上にあつて、4 個のエクソンより構成され、196 アミノ酸残基および 147 アミノ酸残基からなるタンパク質、M-LPH1 および M-LPH2、をコードする少なくとも 2 種類の転写産物が発現していることが判明した。M-LPH1 および M-LPH2 は同一の M-LP 遺伝子からの alternative splicing isoform であり、M-LPH2 では exon 2 が欠失していた (図 4)。M-LPH1 と M-LPH2 のアミノ酸配列は、N 末端側から 103 残基までが同一であり、104 残基目以降の C 末端側が完全に異なっていた。M-LPH1 の N 末端側の 188 アミノ酸残基の配列は、マウスのペルオキシソーム局在型 M-LP に対して高い相同性 (79.8% identity, 96.3% similarity) を有していた。

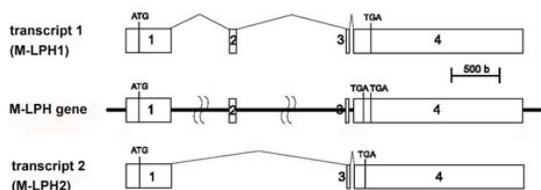


図 4 M-LPH 遺伝子の転写産物

次に、ヒト腎における RNA レベルでの発現を確認するために RT-PCR 解析を行ったところ、M-LPH1、M-LPH2 に相当すると予測される大きさの PCR 産物が検出された。さらに、real-time PCR による解析の結果、M-LPH1 の発現量は、M-LPH2 のおよそ 1/2 であることが明らかとなった。一方、正常ヒト腎細胞タンパク質の Western blot 解析では、M-LPH1 に相当する位置バンドが検出されたが M-LPH2 は検出されなかったことから、生理的

条件下では主として M-LPH1 が産生されていることが示された。

② M-LPH1 の臓器分布および細胞内局在解析

RT-PCR 解析の結果、M-LPH1 の mRNA は主として腎、肝および膵で発現しており、その他、心、脳、肺、骨格筋など広く発現していた (図 5)。マウス M-LP の場合、ペルオキシソーム局在型の発現は腎、脾、心、脳、肺、肝などの多くの臓器で認められ、他方、細胞質局在型の発現は腎に特異的である。したがって、M-LPH1 の分布はマウスのペルオキシソーム局在型に近い。

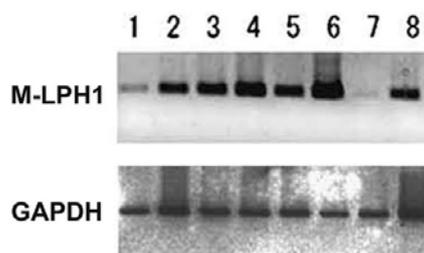


図 5 M-LPH1 の臓器分布

次に、M-LPH1 の細胞内局在を明らかにするため、ペルオキシソームマーカータンパク質の発現 vector と GFP 標識 M-LPH1 の発現 vector を COS-7 細胞内に同時に導入し、両者に由来する蛍光を共焦点顕微鏡を用いて観察した。両者の蛍光シグナルが完全に一致したことから M-LPH1 はペルオキシソームに局在することが示された。従って、これらの結果から、今回同定した M-LPH1 はマウスにおけるペルオキシソーム局在型に相当することが明らかとなった。

③ M-LPH1 遺伝子導入による抗酸化酵素遺伝子発現の変化

M-LPH1 を過剰発現させた細胞における各抗酸化酵素 (SOD1, SOD2, SOD3, Gpx1, Gpx3, CAT) の mRNA 量を real-time PCR 解析装置を用いて測定したところ、Gpx3 および CAT の mRNA 量の有意な減少が認められた。従前のマウスのペルオキシソーム局在型 M-LP に関する同様の解析では、SOD2 発現の誘導が認められ、細胞質局在型では SOD2 発現の誘導と Gpx1 および Gpx3 の抑制が認められた。これらの結果を今回と比較すると、マウスとヒトにおいて M-LP によってその発現が変動する酵素の種類がそれぞれ異なっていた。しかし、SOD は過酸化水素合成の主要な酵素であり Gpx と CAT はいずれも過酸化水素を分解する酵素であることを考慮すると、これらの結果はいずれも生体内の過酸化水素濃度を上昇させる変化である点で一致しており、M-LP の

生理的機能解明の1つの手がかりになるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

- ① R. Iida, E. Tsubota, I. Yuasa, H. Takeshita, T. Yasuda: Simultaneous genotyping of eleven non-synonymous SNPs in the four glutathione peroxidase genes using the multiplex single base extension method. Clin. Chim. Acta, in press, 査読有
- ② R. Iida, E. Tsubota, H. Takeshita, T. Yasuda: Multiplex single base extension method for simultaneous genotyping of non-synonymous SNPs in the three human *SOD* genes. Electrophoresis, 29, 4788-4794, 2008, 査読有
- ③ E. Tsubota, T. Yasuda, R. Iida: Identification of age-dependently expressed genes in mouse liver by differential display-PCR analysis. Comparative Biochem. Physiol. D Proteomics, 3, 91-95, 2008, 査読有
- ④ R. Iida, T. Yasuda, K. Kishi: Identification of novel fibronectin fragments detected specifically in juvenile urine. FEBS J., 274, 3939-3947, 2007, 査読有
- ⑤ Y. Kominato, R. Iida, T. Nakajima, Y. Tajima, R. Takagi, C. Makita, K. Kishi, M. Ueki, Y. Kawai, T. Yasuda: Hypoxia induces up-regulation of the deoxyribonuclease I gene in the human pancreatic cancer cell line QGP-1. Biochim. Biophys. Acta, 1770, 1567-1575, 2007, 査読有
- ⑥ M. Ueki, H. Takeshita, J. Fujihara, G. Ueta, T. Nakajima, Y. Kominato, K. Kishi, R. Iida, T. Yasuda: Susceptibility of mammalian deoxyribonucleases I (DNases I) to proteolysis by proteases and its relationships to tissue distribution: biochemical and molecular analysis of equine DNase I. Comparative Biochem. Physiol. B, 148, 93-102, 2007, 査読有
- ⑦ K. Kominato, M. Ueki, R. Iida, Y. Kawai, T. Nakajima, C. Makita, M. Itoi, Y. Tajima, K. Kishi, T. Yasuda: Characterization of human deoxyribonuclease I gene (DNASE1) promoters reveals the utilization of two transcription-starting exons and the involvement of Sp1 in its transcriptional regulation. FEBS J, 273, 3094-105, 2006, 査読有
- ⑧ R. Iida, T. Yasuda, E. Tsubota, H. Takatsuka, T. Matsuki, K. Kishi: Human Mpv17-like protein is localized in peroxisomes and regulate expression of antioxidant enzymes. Biochem. Biophys. Res. Commun., 344, 948-54, 2006, 査読有

- ⑨ M. Masuyama, R. Iida, H. Takatsuka, T. Yasuda, T. Matsuki: Quantitative change in mitochondrial DNA content in various mouse tissues during aging. Biochim. Biophys. Acta, 1723, 302-308, 2005, 査読有
- ⑩ R. Iida, T. Yasuda, E. Tsubota, H. Takatsuka, M. Masuyama, T. Matsuki, K. Kishi: A novel alternative spliced Mpv17-like protein isoform localizes in cytosol and is expressed in a kidney-specific and adult-specific manner. Exp. Cell Res., 302, 22-30, 2005, 査読有

〔学会発表〕(計10件)

- ① 飯田礼子, 安田年博. Identification of novel Fibronectin fragments detected specifically in Juvenile urine. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会, 2008年12月11日, 神戸.
- ② 小湊慶彦, 中島たみ子, 田島裕, 高木利恵, 竹下治男, 藤原純子, 飯田礼子, 安田年博. 核酸分解酵素DNASEI遺伝子の転写調節機構の解明. 第92次日本法医学会総会, 2008年4月24日, 長崎.
- ③ 飯田礼子, 松木孝澄, 安田年博. マウスの年齢依存性発現分子M-LPのヒトホモログの遺伝子構造. 第92次日本法医学会総会, 2008年4月24日, 長崎.
- ④ 飯田礼子, 安田年博. Identification and characterization of a human homolog of the M-LP (M-LPH) gene. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会, 2007年12月14日, 横浜.
- ⑤ 飯田礼子, 坪田悦子, 松木孝澄, 安田年博. マウス腎の年齢依存性発現分子M-LPのヒトホモログの同定日本DNA多型学会第16回学術集会, 2007年11月15日, 大阪.
- ⑥ 飯田礼子, 坪田悦子, 松木孝澄, 安田年博. マウス腎新規タンパク質M-LPの細胞局在型イソフォームの同定. 第91次日本法医学会総会, 2007年5月18日, 秋田.
- ⑦ R. Iida, T. Yasuda, T. Matsuki, E. Tsubota. Age-dependently expressed genes in mouse tissues revealed by the fluorescence differential display-PCR technique. European Conference of Aging 2006, November 29, 2006, Innsbruck, Austria.
- ⑧ R. Iida, T. Matsuki, T. Yasuda. A cytosolic isoform of Mpv17-like protein is expressed in an adult-specific manner. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June 21, 2006, Kyoto.
- ⑨ 飯田礼子, 安田年博, 岸絏一郎. ヒト尿

中に検出される若年者特異的タンパク質 (Ugl-Y) の化学構造. 第 90 次日本法医学学会総会, 2006 年 4 月 28 日, 福岡.

- ⑩ 飯田礼子, 高塚尚和, 坪田悦子, 松木孝澄, 安田年博, 岸紘一郎. マウスの年齢依存性発現分子, M-LP, の細胞質局在型イソフォーム. 日本DNA多型学会第 14 回学術集会, 2005 年 11 月 24 日, 前橋.

[図書] (計 3 件)

- ① 飯田礼子, 坪田悦子, 松木孝澄, 安田年博: マウス腎の年齢依存性発現分子M-LP のヒトホモログの同定. DNA多型 第 16 巻, 213-216, 東洋書店, 2008.
- ② 飯田礼子, 坪田悦子, 高塚尚和, 松木孝澄, 安田年博, 岸紘一郎: マウスの年齢依存性発現分子, M-LP, の細胞質局在型イソフォーム. DNA多型 第 14 巻, 160-163, 東洋書店, 2006.
- ③ 安田年博, 植木美鈴, 飯田礼子, 河合康幸, 小湊慶彦, 中島たみ子, 岸紘一郎: ヒトDNaseIの分子多様性と心疾患. DNA多型 第 14 巻, 11-17, 東洋書店, 2006.

[その他]

新規塩基配列の GenBank への登録

M-LPs cDNA: AY513273, M-LPH1: DQ004255,
M-LPH2: DQ004256, mouse liver novel
EST: ES452733, ES452734

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 礼子 (IIDA REIKO)

福井大学・医学部・助教

研究者番号: 4 0 1 3 9 7 8 8

(2) 研究分担者

松木 孝澄 (MATSUKI TAKASUMI)

福井大学・医学部・教授

研究者番号: 1 0 1 2 6 6 1 7