

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2013

課題番号：21390215

研究課題名(和文) 年齢依存性発現生体分子の網羅的検索・同定と法医学的年齢推定への展開

研究課題名(英文) Screening, identification and forensic application of age-related biomolecules

研究代表者

飯田 礼子 (IIDA, REIKO)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：40139788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円、(間接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：1. 年齢依存性生体分子M-LPおよびRhithの発現変動によって影響を受ける計64遺伝子を同定した。2. 年齢依存性生体分子M-LPおよびRhithの機能解析・・・ヒトRhithはヒトM-LP遺伝子の転写調節因子であることを確認した。ヒトRhith遺伝子の転写調節因子を同定した。RhithおよびM-LPは細胞の防御機構に関わることを示した。ヒトGpxおよびRhith遺伝子のSNPのタイピング法を開発し、遺伝子頻度を解析した。M-LP分子と相互作用するタンパク質を同定した。3. ヒトM-LPおよびRhithのmRNAの定量法を確立し、胎児と成人の臓器における発現解析を行った。

研究成果の概要(英文)：1. To search for age-dependently expressed genes, cells were transfected with siRNA duplexes targeting either Rhith or M-LP. Statistically significant alteration was observed in the expression of sixty four genes. 2. Rhith was confirmed to be involved in transcriptional regulation of M-LP. 3. Cis-regulatory elements in the Rhith gene were searched, and two transcription factors were identified: FOXD3 as a negative regulatory element, and GABP, one of the key regulators of the mitochondrial electron transport system, as a positive regulatory element. 4. M-LP functions to protect cells from oxidative stress and/or initiation of the mitochondrial apoptotic cascade under stressed conditions. 5. Simple methods for genotyping of SNPs in the Gpx and Rhith genes were established. 6. The mRNA levels of Rhith and M-LP in adult and fetal tissues were analyzed. The M-LP levels in adult tissues were much higher than those in fetal tissues.

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：法医学 遺伝子発現 年齢推定

1. 研究開始当初の背景

昨今の犯罪の悪質・巧妙化に伴い、法医鑑識科学分野において、被疑者や被害者などを特定するための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。現在のところ、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いる。報告者はこれまで、年齢関連物質についての研究に取り組み、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、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、トランスクリプトーム解析(mRNAの発現解析)およびプロテオーム解析(タンパク質の発現・構造・機能解析)などの新しい手法によって同定した「成長・発達・老化の各ステージに特異的な生体分子」を年齢推定マーカーとして利用し、法医学領域において長年盲点であった年齢推定法を開発することである。期間中に以下の3点を達成できるように研究を推進した。

- (1)「成長・発達・老化の各ステージに特異的な生体分子」の網羅的に検索および同定
- (2)「成長・発達・老化の各ステージに特異的な生体分子」の生理的機能や加齢・老化・疾患との関連の解析
- (3)「成長・発達・老化の各ステージに特異的な生体分子」の定量法の開発と法医学的年齢推定マーカーとしての有用性についての検討

3. 研究の方法

(1)「成長・発達・老化の各ステージに特異的な生体分子」の網羅的に検索および同定
報告者が従前の研究において同定した新規タンパク質M-LPおよびRhitは年齢依存性生体分子である。M-LPの年齢依存性遺伝子発現は転写因子抑制因子Rhitに依存している。したがって、M-LPやRhitなどの年齢依存性生体分子の増減に伴って発現が変動する遺伝子群にコードされた生体分子は、年齢推定マーカーとなる可能性が高いと考えられる。そこで、マウス腎細胞(TCMK-1)やヒト正常尿管上皮細胞(RPTEC)内に、RhitまたはM-LPの発現に対する抑制効果のあるsiRNAを導入したのち、RNAを抽出し、mRNAレベルでの発現が変動する遺伝子群をmicroarray解析やPCR array解析によって網羅的に解析した。

(2)「成長・発達・老化の各ステージに特異的な生体分子」の生理的機能や加齢・老化・疾患との関連の解析

ヒトRhit (RhitH)のcDNAのクローニングはRACE法により行った。年齢依存性生体分子M-LPおよびRhitの遺伝子発現調節の解析および転写調節因子の同定は、Promotor assay、Gel Shift assay、ChIP assayなどにより行った。RhitHおよびM-LPH発現の抑制や促進がミトコンドリア機能に及ぼす効果についての解析にはヒト乳癌細胞(MCF-7)を使用した。ヒトM-LP(M-LPH)と相互作用する分子群は、抗M-LP抗体を固定した磁気ビーズを用いた免疫沈降法により精製したのちLC-MSMS分析することにより同定した。ヒトRhitおよびGpx遺伝子内の一塩基置換多型(SNP)のタイピングは、multiplex single base extension法およびPCR-RFLP法により行った。さらに、各SNPにより惹起されるアミノ酸置換による効果は、各SNPのminor alleleに相当するアミノ酸置換型の発現ベクターを培養細胞に導入したのちWestern Blottingなどにより解析した。

(3)「成長・発達・老化の各ステージに特異的な生体分子」の定量法の開発

M-LPおよびRhitのmRNA量はリアルタイムPCR法(TaqMan Probe法)により定量した。胎児および成人の各臓器由来のcDNAは、BD Bioscience社より購入した。

4. 研究成果

(1) 年齢依存性生体分子 M-LP および Rhit の発現変動によって影響を受ける遺伝子群の同定

TCMK-1細胞におけるRhit遺伝子の発現をsiRNAにより抑制し、発現量に変化の見られる遺伝子群をmicroarray解析およびPCR array解析により検索した。その結果、発現が有意に促進される6遺伝子(Gpx1, Gpx8, Slc38a1など)と発現が有意に抑制される29遺伝子(MPO, Rag2, Aassなど)を同定した。同様の手法によりRPTEC細胞におけるM-LPH遺伝子の発現を抑制し、発現量に変化の見られる遺伝子群を検索したところ、発現が有意に促進される10遺伝子(TNF, TRAIL, Fasなど)と発現が有意に抑制される19遺伝子(TRAF3, AKT1, CASP2など)を同定した。

(2) 年齢依存性生体分子M-LPおよびRhitの生理的機能の解析

マウスで見い出されたRhitの配列を用いてデータベースを検索したところ、Rhitのヒトホモログに相当する遺伝子が見出された。そこで、ヒト乳ガン細胞株(MCF-7)を用いて、RhitHのfull-length cDNAをクローニングした。クローニングされたcDNAは1,665bpのORF(554アミノ酸に相当)を含み、転写抑制に關与するKRABドメインを有するzinc finger型抑制因子に属するタンパク質をコードしていた。RhitHの発現抑制によってM-LPH発現量が増

加したことから、Rhithもマウスと同様に M-LPH遺伝子発現の転写抑制因子として作用することが予測された。そこで、M-LPH遺伝子上流域についてPromotor assayを行い、Rhithの結合部位はintron1内のTtk binding siteであることを明らかにした。

Rhith 遺伝子の転写調節に関与する転写因子を Promotor assay、Gel Shift assay、ChIP assay などにより精査した。転写開始点の約 1.5 kb 上流には抑制因子である FOXD3 が結合し、約 50 上流にはミトコンドリア電子伝達系の主要な制御因子である GABP が結合することが明らかとなった。

M-LP の過剰発現によって SOD や Gpx など酸化ストレス関連酵素の発現が誘導または抑制されることから、M-LP や Rhith が酸化ストレス防御機構に関与することが示唆されてきた。そこで、Rhith および M-LPH 発現の抑制や促進がミトコンドリア機能に及ぼす効果についての解析を行った。ミトコンドリア電子伝達系の阻害剤 Antimycin A (AMA) は、活性酸素の産生やミトコンドリア膜の脱分極を誘発し、アポトーシスを誘導する作用をもつ。このような AMA による効果は、Rhith 遺伝子の抑制あるいは M-LPH 遺伝子の過剰発現によって緩和されることが示された(図 1、図 2)。

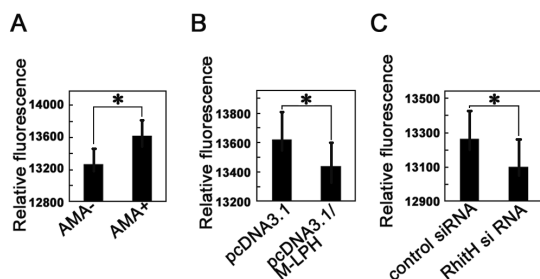


図 1 M-LPH 発現の抑制や促進が細胞内過酸化水素濃度に及ぼす効果 (A) MCF-7 細胞に HyPer-cyto vector (過酸化水素のバイオセンサー) をトランスフェクションしたのち 0.05 μ M AMA で 1 時間処理し、HyPer に由来する蛍光を測定した。(B) および (C) M-LPH 発現促進細胞では過酸化水素濃度の低下が認められた。

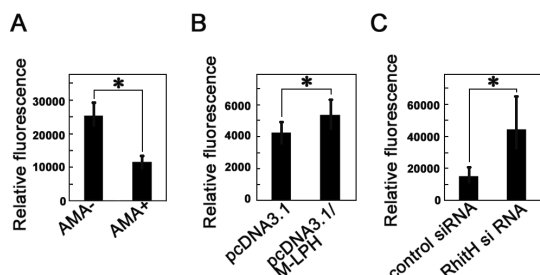


図 2 M-LPH 発現の抑制や促進がミトコンドリア膜電位に及ぼす効果 (A) MCF-7 細胞を 0.05 μ M AMA で 24 時間処理したのち JC-1 で染色し、蛍光を測定した。(B) および (C) M-LPH 発現促進細胞では、AMA によるミトコンドリア膜電位の低下に対する抑制効果が認められた。

これらの結果から、Rhith や M-LPH は酸化ス

トレスやアポトーシスに対する細胞の防御機構に関わるものと考えられた。

M-LP によって発現調節を受ける Gpx 遺伝子内 (Gpx1, Gpx2, Gpx3, Gpx4) の計 11 個の非同義置換型 SNP (アミノ酸置換を惹起する SNP) を同時に解析するためのタイピング法の開発を行った。この方法を用いて日本人を含む 3 民族における SNP の遺伝子頻度の解析を行なった結果、Gpx1 P200L ではすべての民族において多型性が認められ、民族による遺伝子頻度の相違が明らかになった。一方、Gpx2 R146C, Gpx2 P126L, Gpx1 A194T および Gpx4 S2N においては若干のヘテロ接合性が認められた。

Rhith の遺伝子発現抑制に関与する KRAB ドメインや zinc finger ドメイン内のアミノ酸置換を惹起する計 9 個の非同義置換型 SNP に着目し、遺伝子型 活性相関解析を実施した。zinc finger ドメイン内の 3 アミノ酸置換 C461S, T465A および L495Q では M-LPH 発現量の増加が認められ、これらのアミノ酸置換によって転写抑制効果が減弱することが示された。次に、9SNP を解析するためのタイピング法を開発し、日本人を含む 16 民族 (n=1,752) における頻度分布調査を行った。その結果、すべての SNP が mono-allelic であったことから、Rhith 遺伝子はよく保存されており、遺伝的多様性に乏しいことが明らかとなった。

M-LPH の生理的機能を明らかにするため、M-LPH 分子と相互作用するタンパク質の単離を行った。精製試料を LC-MSMS により分析した結果、M-LPH と生理的条件下で相互作用すると予測される 4 つのタンパク質を同定した。

(3) M-LPH および Rhith の mRNA 量の定量

M-LPH および Rhith の mRNA 量のリアルタイム PCR による定量法を確立し、胎児および成人の各臓器における両分子の発現解析を行った。

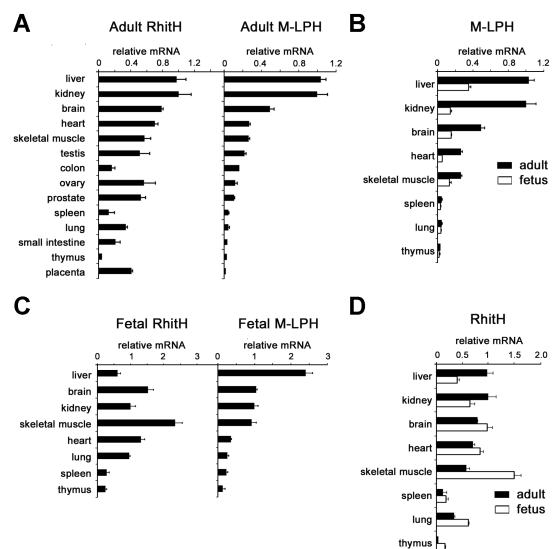


図 3 成人 (A) および胎児 (C) における Rhith および M-LPH の各臓器における発現 (B) および (D) では成人と胎児における発現量を比較した。

Rhithは種々の臓器で広く発現しており、胎児と成人の発現量に大きな差は認められなかった(図3)。一方、M-LPHは、肝、腎、脳などミトコンドリア代謝が活発な臓器で多く発現し、成人における発現量は胎児における発現量を大きく上回っていた(平均3.09倍)。胎児は、エネルギー産生のほとんどを解糖系に依存しているが、成人では解糖系とミトコンドリア電子伝達系の両方に依存していることが知られている。M-LPHは、ミトコンドリア電子伝達系が活発な成人で多く発現し、活性酸素の発生を抑制する働きを担っている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

R.lida, M.Ueki, J.Fujiwara, H. Takeshita, K.Kimura-Kataoka, T.Yasuda, Three non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the Rhith gene cause reduction of the repression activity that leads to up-regulation of M-LPH, a participant in mitochondrial function, *BioResearch Open Access*, 2, 440-447, 2014, 査読有。

R.lida, M.Ueki, T.Yasuda, Identification of Rhith as a novel transcriptional repressor of human Mpv17-like protein with a mitigating effect on mitochondrial dysfunction, and its transcriptional regulation by FOXD3 and GABP, *Free Rad Biol Med*, 52, 1413-1422, 2012, 査読有。

飯田 礼子, 安田 年博, 植木 美鈴, 竹下 治男, ヒト SOD1、SOD2 および SOD3 遺伝子内の非同義置換型 SNP の同時解析-血清 SOD 活性と多型性 SNP との相関について, *DNA 多型*, 19, 275-280, 2011, 査読有。

R.lida, M.Ueki, T.Yasuda, A novel transcriptional repressor, Rhit, is involved in heat-inducible and age-dependent expression of Mpv17-like protein, a participant in reactive oxygen species metabolism, *Mol Cell Biol*, 30, 2306-2315, 2010, 査読有。

R.lida, E.Tsubota, I.Yuasa, H.Takeshita, T.Yasuda, Simultaneous genotyping of 11 non-synonymous SNPs in the 4 glutathione peroxidase genes using the multiplex single base extension method, *Clin Chim Acta*, 402, 79-82, 2009, 査読有。

[学会発表](計8件)

飯田 礼子他、転写因子 Rhith 遺伝子における非同義置換型 SNP の遺伝的解析と転写抑制に及ぼす効果、第 86 回日本生化学会大会、平成 25 年 9 月 12 日、横浜

安田 年博, 飯田 礼子他、ヒト年齢依存性転写抑制因子 Rhith の同定とその転写調節機構、第 97 次日本法医学会学術全国集会、平成 25 年 6 月 27 日、札幌

R.lida et al., Identification of a novel transcriptional repressor, Rhith, involved in expression of human Mpv17-like protein, and its transcriptional regulation by FOXD3 and GABP, 第 85 回日本生化学会大会、平成 24 年 12 月 16 日、福岡

R.lida et al., Identification of a novel transcriptional repressor, Rhit, involved in heat-inducible and age-dependent expression of Mpv 17-like protein, 第 84 回日本生化学会大会、平成 23 年 9 月 24 日、京都

安田 年博, 飯田 礼子他、年齢依存性を示す新規なマウス転写抑制因子 Rhit の同定、第 95 次日本法医学会学術全国集会、平成 23 年 6 月 17 日、福島

安田 年博, 飯田 礼子他、ヒト SOD1、SOD2 および SOD3 遺伝子内の非同義置換型 SNP の同時解析、日本 DNA 多型学会第 19 回学術集会、平成 22 年 11 月 18 日、三島

R.lida et al., Multiplex single base extension method for simultaneous genotyping of non-synonymous SNP in the four human glutathione peroxidase genes, 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会、平成 22 年 12 月 9 日、神戸

R.lida et al., Simultaneous genotyping of ten non-synonymous SNPs in the three human SOD genes, 第 82 回日本生化学会大会、平成 21 年 10 月 23 日、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 礼子 (IIDA, Reiko)
福井大学・医学部・准教授
研究者番号：40139788

(2) 連携研究者

竹下治男 (TAKESHITA, Haruo)
島根大学・医学部・教授
研究者番号：90292599