

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：32692

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23700545

研究課題名（和文） 細胞内糖化物センシング法及び細胞機能制御基盤技術の開発

研究課題名（英文） Development of intracellular glycated products monitoring systems for cellular functional regulation.

## 研究代表者

三上あかね（坂口あかね）(MIKAMI AKANE) (SAKAGUCHI AKANE)

東京工科大学・応用生物学部・助教

研究者番号：70469782

研究成果の概要（和文）：本研究では、糖尿病合併症やアルツハイマー病等の疾病に関与する糖化物（GPs）のモニタリング及び細胞内 GPs 濃度応答性遺伝子発現制御を可能とする技術の開発を目的とし、GPs を認識する転写調節因子の検索及び、構築を行なった。まず細菌由来の GPs 異化機構よりは GPs 応答性の転写調節因子（GprR）様タンパク質を単離し、本タンパク質が GprR 様機能を持つことを示した。更に、本タンパク質を用いて、動物細胞用転写調節因子の構築を行った。

研究成果の概要（英文）：Novel transcriptional regulators for intracellular glycated products monitoring and transcriptional regulation systems in mammalian cells have been investigated. A putative glycated product-responsive regulator (GprR) was cloned and found to function as GprR. A regulator based on the GprR was then designed as novel transcriptional regulator which allows intracellular GPs monitoring in mammalian cells.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：生体情報・計測，細胞機能制御，細胞内計測，糖尿病，糖化物，転写調節因子

## 1. 研究開始当初の背景

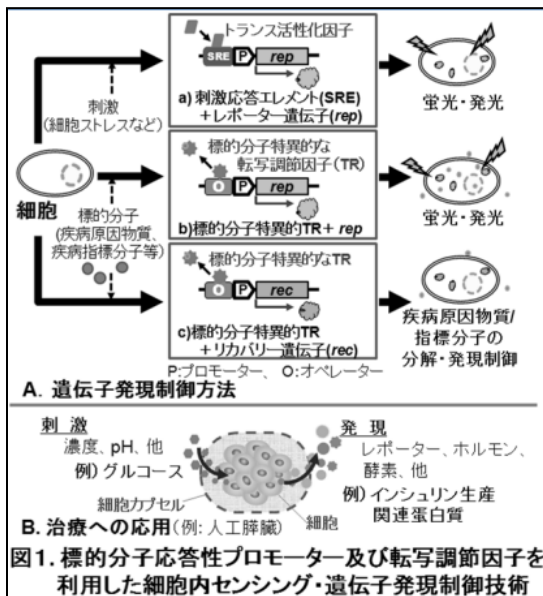
糖化反応は、グルコース等の還元糖とアミンの間で起こる非酵素的な一連の化学反応であり、生体内や細胞内においても普遍的に起こることが知られている。反応初期生成物であるアマドリ化合物や後期生成物（Advanced glycation end products, AGEs）等の糖化物(GPs)の形成は、タンパク質の生

体機能喪失をもたらし、糖尿病合併症や老化を始めアルツハイマー病、癌など多くの疾病に関与するとして注目されている。しかし、生体内における GPs 形成機構および GPs の疾病発症への関与機構は未だ明らかではなく、その解明の為には細胞内 GPs のモニタリングを可能とする技術の開発が望まれる。

センサー細胞技術は細胞内物質のリアル

タイムモニタリングを可能とするとして注目される。刺激応答領域(SRE)と発現プロモーターの下流にレポーター遺伝子を融合して細胞に導入し、レポーターの発現量を指標として刺激を検出する本技術は、細胞内外の刺激に依存して目的遺伝子の発現を制御できることから、レポーターの代わりに酵素等と組み合わせる事で、遺伝子治療への応用も期待される有用な技術である(図1)。しかし、これまでに GPs に特異的な動物細胞由来の SRE は報告されていない。

一方、細菌由来のラクトースリプレッサー(LacI)は、動物細胞内で転写調節因子として機能し、動物細胞内の遺伝子発現制御系に用いられている。又、研究代表者らは、これまでに LacI とグルコースをリガンドとする基質結合タンパク質のキメラタンパク質を作製し、これを転写調節因子として用いることで細胞内のグルコース濃度を検出できることを示した。



## 2. 研究の目的

本研究では、動物細胞内 GPs のセンシング技術の開発を目的とし、GPs を認識する転写調節因子(GprR)または GPs 応答配列の検索及び、動物細胞内 GPs 計測用システムの構築を

試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) GprR 及び GPs 応答配列の検索

DNA データベースを用いて遺伝子配列及び微生物の GPs 資化能を指標に、GprR または GPs 応答配列の検索を行い、検索された遺伝子のクローニング及び、大腸菌発現用ベクターの構築を行った。また、これらを用いて大腸菌を形質転換し、組換え生産及び精製を行った。

### (2) GprR の機能評価

大腸菌組換え GprR 様タンパク質と GPs を混合後、透析法あるいは、リガンドの結合に伴う GprR 様タンパク質の構造変化にともなう自家蛍光強度変化率を測定し、*in vitro* における GprR 様タンパク質の特性検討を行った。

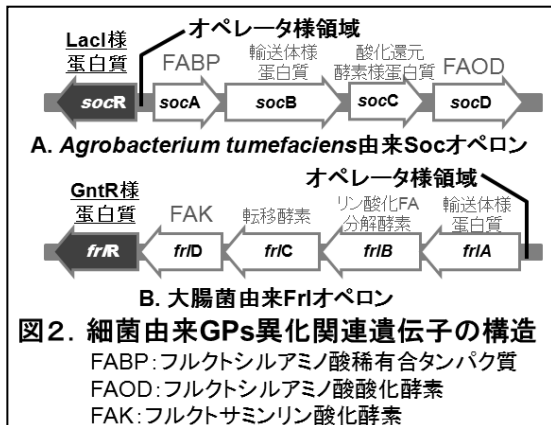
### (3) 動物細胞発現用 GprR 及びレポーター遺伝子発現ベクターの構築

得られた GprR の動物細胞発現用ベクター並びにレポーター遺伝子発現用ベクターの構築を行った。また、GprR のリガンド結合ドメイン様領域に LacI の DNA 結合ドメイン及び複合体形成ドメインを付加したキメラタンパク質の立体構造モデルを作製し、これを基に、キメラ転写調節因子動物細胞発現用ベクター及びレポーター発現用ベクター(Lac オペレーターの下流にレポーター遺伝子を挿入したベクター)の構築を試みた。

## 4. 研究成果

(1) これまでに、糖化物特異的に誘導発現する真核生物由来のタンパク質の報告はない。一方、細菌の GPs 資化能及び遺伝子配列を元に、GprR の検索を行ったところ、GPs 資化能を有す細菌の GPs 誘導性 GPs 異化機構の上流に存在する LacI 様蛋白質(SocR)および GntR 様蛋白質(FriR)の遺伝子は GprR である

ことが示唆された (図 2)。そこで、PCR を用いて GPs 資化細菌のゲノムより SocR 遺伝子及び FrlR のクローニングを行った。また、His-tag 融合大腸菌発現用ベクターを構築し、SocR および FrlR の組換え生産及び His-Tag アフィニティーカラムを用いた精製を行い、それぞれの予測される分子量である約 40 kDa、29 kDa の精製タンパク質が得られた。

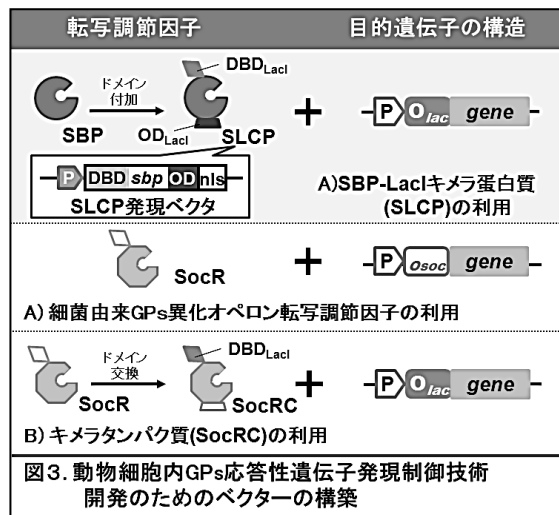


(2) 得られた精製 His-tag 融合 GprR 様タンパク質を用いて、*in vitro*における GprR 様タンパク質の特性検討を行った。まず透析法を用いて、糖化アミノ酸であるフルクトシルアミノ酸 ( $\alpha$ -フルクトシルバリン、FV) に対する結合能の検討を行ったところ、SocR が FV と結合することが示唆された。そこで、SocR のより詳細なりガンド特性を自家蛍光変化率測定法を用いて検討したところ、SocR は、FV に対しては結合能を示し、その解離定数は  $10 \mu\text{M}$  程度だったのに対し、糖及びアミノ酸に対する結合能は示さなかった。また、SocR は  $\epsilon$  位が糖化された  $\epsilon$ -フルクトシルリジン ( $\epsilon$ -FK) に対しても結合が見られた。

以上より、SocR は LacI 様の構造を有し、GPs に結合して構造変化を起こす新規の GprR であることが示唆された。GPs モニタリング用転写調節因子としての SocR の利用が期待される他、本研究によって得られた GprRs の更なる特性検討を行うことによつて、土壌微生物における GPs 分解機構の解明

に寄与すると期待される。

(3) そこで、次に動物細胞内 GPs モニタリング用の動物細胞発現用 SocR 及びレポーター遺伝子発現ベクターの構築を行った。まず、SocR の動物細胞用発現ベクター及び SocR の結合領域(オペレーター)様 DNA 断片の下流にレポーター遺伝子を挿入したベクターの構築を行った (図 3 (A))。また、以前構築した動物細胞内発現制御用転写調節因子として用いられている LacI と基質結合タンパク質のキメラ転写調節因子構築技術を用いて、新規 GprR の構築を試みた。まずコンピューターシミュレーションを用いて、SocR 立体構造モデル、及び SocR のリガンド(GP) 結合ドメインに LacI の DNA 結合ドメイン及び複合体形成ドメインを付加したキメラタンパク質(SocR chimeric protein, SocRC)の立体構造モデルを作製した。これを基に、SocRC 大腸菌及び動物細胞発現用ベクターの構築 (図 3 (B)) を行い動物細胞における転写調節因子としての機能評価を試みた。今後、動物細胞内における GprR 機能を示すことで、細胞内 GPs 濃度応答性遺伝子発現制御技術の構築が可能になると期待される。



## 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 3 件)

(1) Sakaguchi-Mikami A, Ferri S, Katayama S, Tsugawa W, Sode K. Identification and functional analysis of fructosyl amino acid-binding protein from Gram-positive bacterium *Arthrobacter* sp.. J Appl Microbiol, 査読有. 114(5), 2013, 114(5):1449-56

doi:10.1111/jam.12152

(2) Sakaguchi-Mikami A, Kameya M, Ferri S, Tsugawa W, Sode K. Cloning and Characterization of Fructosamine-6-Kinase from *Arthrobacter aurescens*. Appl Biochem Biotechnol, 査読有. 2013 Apr 23 Epub print, doi:10.1007/s12010-013-0229-8

(3) Sakaguchi-Mikami A, Yamazaki T, Taniguchi A, Sode K, Karube I. Construction of a novel glucose-sensing molecule based on a substrate-binding protein for intracellular sensing. Biotechnology and Bioengineering, 査読有. 2011 108: 725-33, doi:10.1002/bit.23006

[学会発表] (計 5 件)

(1) 三上あかね、大矢修一、山崎智彦、軽部征夫. 細胞内糖化物応答性転写調節因子の検索. 第 93 日本化学会春季年会, 2013 年 03 月 22 日~2013 年 03 月 25 日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス、滋賀

(2) 大矢修一、軽部征夫、三上あかね. 新規糖化物応答性転写調節因子様タンパク質 SocR のクローニング及び特性検討. 第 22 回日本メイラード学会年会, 2012 年 12 月 21 日~2012 年 12 月 22 日, 東京農工大学、東京

(3) 三上あかね. 糖化タンパク質計測用新

規分子認識素子の探索と計測. 第 22 回日本メイラード学会年会 (招待講演) 2012 年 12 月 21 日~2012 年 12 月 22 日, 東京農工大学、東京

(4) T.Yamazaki, A. Mikami, K. Sode, A. Taniguchi, N. Hanagata. Intracellular sensing and gene regulation using engineered transcriptional regulators. Japan-China International Forum of Advanced Research on Biotechnology 2011 年 11 月 10 日 東京海洋大学 品川キャンパス(東京)

(5) 三上あかね、工藤芳、綾野晃一、山崎智彦、軽部征夫, 細胞内糖化物測定用転写調節因子の設計, 第 92 回日本化学会春季年会, 2012 年 3 月 25 日, 慶応大学 矢上・日吉キャンパス (神奈川)

[図書] (計 1 件)

1. 軽部征夫、編著 (3 章 1 1 節 執筆担当 三上あかね) 『バイオセンサーのはなし』第 3 章 11 節 'センサー細胞を用いた毒性評価' 総ページ数 216 (担当ページ 142-146) 日刊工業新聞社 2012

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

三上あかね (坂口あかね) (MIKAMI AKANE)  
(SAKAGUCHI AKANE)

東京工科大学・応用生物学部・助教

研究者番号 : 70469782