

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860187

研究課題名(和文) 解毒酵素グリオキサレーズIの新規転写発現調節機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of novel transcription regulation mechanism of glyoxalase 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

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)：これまでの研究により、glyoxalase 1(GL01)遺伝子プロモーター領域近傍に新規遺伝子多型が存在することを新たに見出した。この新規遺伝子多型が、GL01の転写を著しく亢進させることが明らかとなり、遺伝子多型の存在とGL01酵素活性とは正の相関をしていた。また、この遺伝子多型DNAと特異的に結合するたんぱくタンパク質の同定にも成功し、当該タンパク質の存在が遺伝子多型の示す転写亢進に不可欠であることも明らかとなった。当該タンパク質の存在によってヒストンがアセチル化されることも明らかとなり、遺伝子多型による転写亢進にはエピゲノム調節が重要な働きをしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A gene polymorphism in human glyoxalase 1 (GL01) promoter region was newly identified and was found to significantly induce transcriptional expression of the GL01 gene. The gene polymorphism was also positively correlated with the GL01 enzyme activity. Furthermore, we identified associated proteins with the GL01 gene polymorphism in the nuclear extracts, which is essential for transcriptional upregulation of GL01 gene. Taken together, these results suggested that epigenetic regulation could play an important role in human GL01 gene expression.

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

Glyoxalase 1 (GL01)は、後期糖化反応生成物 (advanced glycation end-products, AGE) を形成する前駆体で反応性の高い $\alpha$ -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、GL01 は糖尿病、がん、統合失調症などさまざまな疾患の発症や、寿命に関わっていることが報告されている。GL01 のプロモーター領域には AREs (antioxidant-response element) 配列が3カ所 (-10~-19、-261~-252、-1060~-1051) 存在しており、この AREs に結合する転写因子としてストレスにより活性化される Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2 p45 subunit-related factor 2) が報告されているが、転写発現調節機構の詳細については未だ明らかにされていない部分も多い (*Biochem J* 443, 2012)。GL01 の転写発現がどのように調節されているのか、GL01 の転写調節と病態・生命現象との関わりについては依然として不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

新たに我々が同定したヒト GL01 遺伝子多型に特異的に結合すると考えられるタンパク質と GL01 の転写発現調節機構の関連性を探求することで、GL01 転写発現調節機構を解明することが目的である。本遺伝子多型は、研究代表者が世界で初めて発見したものであり本研究に類する研究は、国内外を問わず他になく、GL01 の転写発現調節機構の解明は、医学・生物学的にも極めて重要な意義をもつと考えられる。

### 3. 研究の方法

研究代表者は予備実験から既に GL01 遺伝子プロモーター領域近傍に新規遺伝子多型 A、B、C が存在することを発見し、その GL01 遺伝子多型 A を持つ DNA に特異的に結合するタンパク質を同定した。本研究によりタンパク質による GL01 遺伝子転写発現調節機構を明らかにするため以下の研究を行った。

(1) 遺伝子多型と GL01 の mRNA・タンパク質発現・酵素活性の関連性についての検討を行った。健康者の末梢血より採取した白血球細胞よりゲノム DNA、mRNA、タンパク質を抽出し用いた。

(2) 同定したタンパク質が遺伝子多型に及ぼす影響について検討した。タンパク質を siRNA を用いてノックダウンし、その後に遺伝子多型の転写活性を測定した。

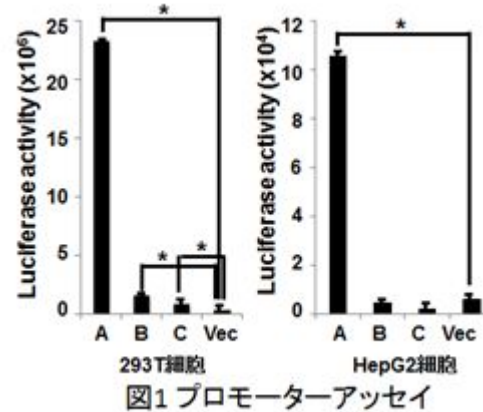
(3) タンパク質はエピジェネテクスな制御、DNA のメチル化を抑制していると考えられるので、GL01 プロモーター領域中のメチル化レベルを調べた。

(4) 同定されたタンパク質によるエピジェネテクスな変化、アセチル化レベルについても調べた。

可能であれば、GL01 遺伝子多型と糖尿病合併症の発症進展について1型糖尿病患者を用いた検討を行う計画を立て、本研究により GL01 遺伝子の転写発現調節機構が解明された場合、様々な疾患に対する新規治療薬の開発・臨床応用に繋がる可能性がある。

### 4. 研究成果

培養細胞である 293T 細胞を用いた検討により、研究代表者によって新たに見出された遺伝子多型 A は B、C に比べ約 100 倍ルシフェラーゼ活性が高いことが分かった (図 1)。また、ヒトの HepG2 細胞を用いた検討でも遺伝子多型 A は B、C に比べて活性が高いことも分かった (図 1)。



新規遺伝子多型と GL01 発現との関連を調べた。末梢血より採取した白血球細胞から、ゲノム DNA、mRNA、タンパク質を抽出して検討を行った。その結果、GL01 新規遺伝子多型と GL01 mRNA 発現、GL0 酵素活性は相関していることが明らかとなった。

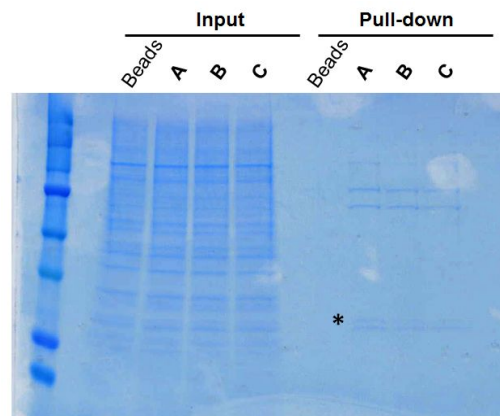


図2 Coomassie Brilliant Blue(CBB)染色

また、この遺伝子多型 A に特異的に結合する因子の同定にも成功した (図 2)。見出された当該タンパク質による GL01 の転写活性への影響を検討するため siRNA を用いたノックダウン実験を行った、その結果、当該タンパク質の発現低下によって著しく遺伝子多型の示す転写活性は抑制された (図 3)。

しかし、GL01 遺伝子プロモーター近傍のメ

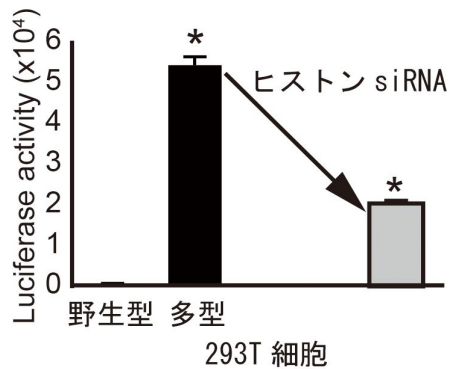


図3 プロモーターアッセイ

チル化は抑制されていないかった。そこで、ヒストンのアセチル化レベルを調べた。GL01 遺伝子多型に結合するヒストンは、アセチル化されていることが明らかとなった。また、当該タンパク質をノックダウンした場合、ヒストンのアセチル化レベルも低下することが明らかとなった。これらの結果より、GL01 遺伝子多型の示す転写亢進には、見出された当該タンパク質が不可欠であること、また、当該タンパク質の存在によってヒストンがアセチル化されることで転写が亢進することが明らかとなった。

以上の研究により、ヒト GL01 遺伝子多型による転写亢進はエピジェネティクスな変化によることが考えられた。

このように遺伝子多型による転写発現調節の分子機構が解明されたことで、今後、様々な疾患における病態の解明やそれを応用した予防・治療法の開発に役立つ可能性があると考えられた。今後のさらなる研究が必要である。

#### 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2件)

(1) 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, Ohta T. Tumor-associated macrophages of the M2 phenotype contribute to progression in gastric cancer with peritoneal dissemination. *Gastric Cancer*, 1-14 (2015)

(2) Motoyoshi S, Yamamoto Y, Munesue S, Igawa H, Harashima A, Saito H, Han D, Watanabe T, Sato H, Yamamoto H. cAMP ameliorates inflammation by modulation of macrophage receptor for advanced glycation end-products. *Biochem J*, **463**, 75-82 (2014)

##### [学会発表](計5件)

(1) 原島 愛、糖化ストレス除去酵素の転写調節機構、脳・肝インターフェースメディシン研究センター生体統御部門外部評価シンポジウム、2016年3月18日、金沢大学十全スタジオ

(2) 清水 有、山本靖彦、原島 愛、棟居聖一、大石正博、林 康彦、中田光俊、北尾康子、堀 修、山本 博、内在性分泌型 RAGE は脳虚血から神経細胞を保護する、第30回日本糖尿病合併症学会、2015年11月27~28日、愛知県産業労働センターウインク愛知

(3) 清水 有、山本靖彦、原島 愛、棟居聖一、林 康彦、北尾康子、堀 修、山本 博、内在性分泌型 RAGE は血液脳関門を越えて神経細胞を保護する、第24回日本メイラード学会年会、2014年11月7日~8日、熊本市国際交流会館

(4) 清水 有、山本靖彦、原島 愛、棟居聖一、大石正博、林 康彦、北尾康子、堀 修、山本 博、内在性分泌型 RAGE は血管脳関門を越えてデコイ受容体としての神経細胞保護作用を発揮する、第87回日本生化学会大会、2014年10月15日~18日、国立京都国際会館

(5) 棟居聖一、山本靖彦、原島 愛、漆原涼太、齋藤英仁、本吉 創、渡辺琢夫、山本 博、食品由来 AGE による AGE-RAGE シグナルの阻害効果、第57回日本糖尿病学会年次学術集会、2014年5月22日~24日、大阪国際会議場、リーガロイヤルホテル、ホテル NCB、堂島リバーフォーラム

##### [産業財産権]

出願状況(計2件)

名称: オキシトシントランスポーター  
 発明者: 東田陽博、山本靖彦、山本 博、棟居聖一、原島 愛、堀 修、出口喜三郎  
 権利者: 同上  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2014-255721  
 出願年月日: 2014年12月18日  
 国内外の別: 国内

名称: オキシトシン検出のためのサンプル前処理方法  
 発明者: 東田陽博、山本靖彦、棟居聖一、原島 愛、出口喜三郎  
 権利者: 同上  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2014-255756  
 出願年月日: 2014年12月18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・医薬保健研究域医学系・助教

研究者番号：50705522