

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07842

研究課題名(和文)線虫glod-4/GLD1遺伝子のエピジェネティックな発現調節機構の解明

研究課題名(英文)Mechanisms of epigenetic regulation of glod-4/GLD1 gene in *C. elegans*

研究代表者

原田 真市 (Shin-ichi, Harada)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：90272955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症患者の一部にはメチルグリオキサールの代謝酵素であるグリオキサラーゼ遺伝子GLD1の変異が報告されている。そこで、ヒトGLD1遺伝子と線虫*C. elegans*のグリオキサラーゼをコードするglod-4遺伝子の転写調節領域の解析を行なった。その結果、GLD1/glod-4遺伝子双方の発現調節領域に相同性の高い複数の領域が見つかったが、転写調節因子とされるSKN-1がglod-4遺伝子発現に関与するかは特定できなかった。また、線虫*C. elegans*の表現形の一つ、寿命を指標として薬剤ライブラリーのスクリーニングからglod-4変異体の寿命延長に関与すると推定される化合物Xを見つけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内では糖質が代謝されることによりグリオキサール(GO)やメチルグリオキサール(MG)などの中間体が生成する。これら中間体の細胞毒性は非常に強く、加齢や糖尿病状態により蓄積することで糖尿病合併症の発症・進展に関与するだけでなく、神経変性疾患などの多様な疾患にも深くかかわっている。これら代謝物は、解毒酵素と呼ばれるGlyoxalase(GLD1)により酵素的に代謝され反応性の低い乳糖に変換される。近年、MGによる精神疾患への関与が指摘され、MGの代謝、解毒に関与するGLD1とさまざまな精神疾患との関連や、GLD1遺伝子の分子基盤を明らかにすることは精神疾患治療薬開発にも極めて重要である。

研究成果の概要(英文)：Mutations in the glyoxalase gene, GLD1 which encode a methylglyoxal metabolizing enzyme, have been reported in some patients with schizophrenia. To understand the transcriptional mechanisms of GLD1, we analyzed the transcriptional regulatory regions of the glod-4 gene, which encodes the human GLD1 gene homolog in the nematode *C. elegans*. As a result, multiple highly homologous regions were found in the upstream regulatory regions of both the GLD1 / glod-4 gene, but it was not possible to identify the binding activity of SKN-1/Nrf2, which is one of the transcription factor, that binds the ARE motif identified in the upstream region of GLD1 gene. In addition, we found the compound X, which is presumed to be involved in the life extension of the glod-4 mutant by using the screening of the drug library.

研究分野：生化学

キーワード：Glyoxalase

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Glyoxalase1 (GL01)は、グリオキサラーゼ系酵素で、特にメチルグリオイサル (MG) の解毒代謝経路で機能している。MG は、主に解糖中間体、ヒドロキシアセトンリン酸とグリセルアルデヒド-3-リン酸の分解によって形成される。糖尿病では、慢性的な高血糖状態により MG の形成が加速し、直ちにタンパク質や核酸を修飾して後期糖化反応生成物 (Advanced Glycation End-products, AGEs) を形成し活性酸素、及びアポトーシスを誘導することが知られている。しかし、MG の形成は高血糖状態だけではなくその他の要因として老化、炎症、尿毒症や酸化ストレスによっても誘導されることが知られている。これらの対抗措置として細胞内では、GL01 は MG を酵素的に反応性の低い物質 D-Lactose に変換する。

近年、MG は統合失調症、躁うつ、自閉症、不安障害といった精神疾患への関与が指摘されている。このことから MG の代謝・解毒に関与する GL01 が注目されその酵素活性や転写発現調節機構のメカニズムの解明が、これら疾患発症の機序を明らかにすることは治療戦略の上で非常に重要となる。すでに重篤な統合失調症家系において GL01 の酵素活性が全くないフレームシフト変異が同定・報告されている。また統合失調症患者の中にはミスセンス変異の存在も明らかにされている。

これら精神疾患は遺伝的要因と環境的要因に起因することが多く、統合失調症に代表される精神疾患は多因子遺伝病として位置付けられる。多因子遺伝病の発症にはヒストンのアセチル化・メチル化やゲノム刷り込み、X染色体不活化といったエピジェネティクスの関与が示唆され、新たなゲノム分野の研究が展開され多くの報告がなされている。

ヒストンはクロマチン構成のための構造タンパク質で、立体構造に乏しい N 末端の修飾パターンにより、クロマチン構造の変化に関与する。この変化がダイナミックに遺伝子発現をし、発生・分化の制御をしているとされている。したがって、ヒストンの N 末端のアセチル化・メチル化がエピジェネティクス機構において重要な役割を果たしていると考えられる。

統合失調症では、MG の蓄積に伴い AGEs が増加し、GL01 の転写活性減少による発現量の低下が報告されているが、そのメカニズムは明らかでない。したがって統合失調症における GL01 の発現の調節機構が重要であると推測される。これらの事実に基づき研究分担者らは、統合失調症患者の検体から GL01 遺伝子のプロモーター領域内にホモポリマー多型の存在を明らかにした。特筆すべきは、ホモポリマー多型の中でも他の多型に比べ非常に転写活性の高いものを見出したことである。この遺伝子多型では GL01 の酵素活性と正の相関が認められている。さらには、GL01 の転写亢進がエピジェネティクスな発現誘導によることを突き止めているが、その詳細は明らかでない。そして、GL01 遺伝子多型と統合失調症の重症度との相関関係が明らかにされれば精神疾患への治療に大きく前進することとなる。

2. 研究の目的

本研究では、研究分担者らが明らかにした GL01 遺伝子のプロモーター内に存在するホモポリマー遺伝子多型と GL01 の発現量の変化が統合失調症の病態とどのように関連するのかを、線虫 *C. elegans* を用いた遺伝学、生化学、分子生物学及びエピジェネティックな解析から高次機能への影響と神経機能障害のメカニズムを解明し治療薬の開発に繋げることを目的としている。そして、統合失調症で見られる *glod-4/GL01* 遺伝子発現調節機構の解明からその病態形成の分子メカニズムが明らかにし、転写調節機構を標的とした新たな精神疾患治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1)線虫 *C. elegans* Glyoxalase 遺伝子 *glod-4* とヒト *GL01* の転写発現調節領域の解析

哺乳類 *GL01* 遺伝子の転写発現調節機構としては、転写因子の一つ Nrf2 の関与が示唆されている。また、*C. elegans* においてもそのホモログである SKN-1 の関与が示唆されていることから *glod-4* 遺伝子上流域の遺伝子配列を明らかにし、ヒト *GL01* 遺伝子との比較から転写発現調節領域の構造を明らかにする。

まず線虫 *C. elegans glod-4* 遺伝子のプロモーター領域を決定するために *glod-4* 遺伝子上流域 915bp を含む領域において様々な長さの領域を PCR で増幅し GFP をレポーターにもつ発現ベクターにクローニングした。次いで研究分担者らが明らかにした統合失調症患者 *GL01* 遺伝子上流域にホモポリマー配列が挿入された遺伝子多型変異を含む領域を 1,250bp を PCR で増幅した。線虫 *C. elegans* の *glod-4* 遺伝子上流域と先に増幅したヒト *GL01* 遺伝子上流域を交換した GFP 発現ベクターを構築した。これらベクターDNA を精製し、マイクロインジェクションにより導入したトランスジェニック線虫を作製し、遺伝子発現の局在を調べるとともに、表現型である行動解析と寿命解析を行なった。

(2)レポーターアッセイによる *glod-4/ GL01* 遺伝子プロモーター活性

線虫 *C. elegans glod-4* 及びヒト *GL01* 遺伝子が転写因子 SKN-1/Nrf2 による転写調節を受けているかを確認するために、ルシフェラーゼを持つ発現ベクターに PCR で増幅したヒト *GL01* と線虫 *C. elegans glod-4* 遺伝子上流域をクローニングし、HEK293T 細胞に遺伝子導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

(3)*C. elegans* における統合失調症モデル変異体の生化学的検討

野生株 N2、*glod-4* 変異体及び上記で作製したトランスジェニック線虫において生化学的な検討を行なった。MG や Glyoxalase の酵素活性の測定、活性酸素 ROS および AGEs 関連化合物を ELISA 法により定量した。

(4)神経変性疾患治療薬剤のスクリーニング

線虫 *C. elegans* の統合失調症モデルを利用して、GFP の活性を指標にすることで *glod-4/ GL01* 遺伝子の発現を減少または亢進させる薬剤のスクリーニングを行う。薬剤ライブラリーには、約 640 種類の化合物が含まれる FDA Approved Drug Screen-Well Library (BML-J)を使用した。本ライブラリーからの薬剤スクリーニングは 96-well プレート内の液体培地を使用し、線虫 *C. elegans* の寿命を測定することで評価した。

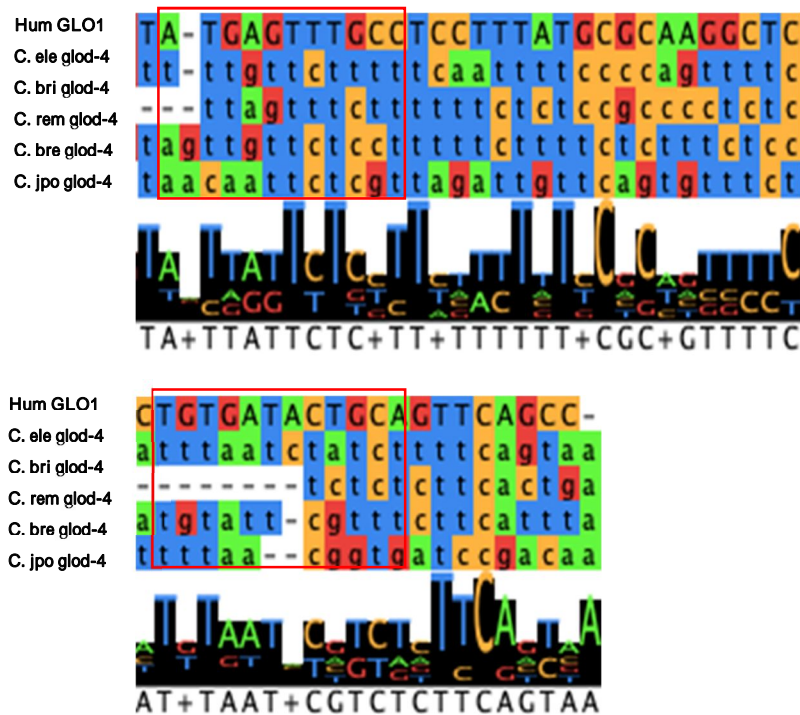
4 . 研究成果

(1)ヒト *GL01* 及び線虫 *Caenorhabditis* 亜種における *glod-4* 遺伝子制御因子の探索

線虫 *C. elegans glod-4* 遺伝子が持つ上流域は、Worm Base によると、その上流に位置する別遺伝子の間隔は狭くゲノムシーケンスの結果からは大凡 1Kb 以内に制御領域があると推定された。そこで、この領域内における種々のプライマーを作製し PCR によるゲノム DNA の増幅とクローニングを行なった。また、増幅した領域のシーケンスと全ゲノム配列が明らかとなりつつある *Caenorhabditis* 亜種の *C. briggsae*、*C. remanei*、*C. brenneri* と *C. jaonica* の *glod-4* 遺伝子上流域配列を、マルチプルシーケンスアライメント MAFFT を使用して比較、検討した。

ヒト *GL01* 遺伝子と線虫 5 亜種の *glod-4* 遺伝子上流域の比較からは、ヒト *GL01* 遺伝子と線虫 5 亜種共に相同性の高い 14 の領域が確認された。また、ヒト *GL01* 遺伝子にはなく、線虫 5 亜種に共通する相同性の高い領域が 6 領域確認できた。さらに保存されていると考えられるこれら領

域について転写調節因子結合サイトのデータベースである JASPA による検索を行なった。ヒト *GLO1* 遺伝子上流域に存在するとされている NF-E2 binding motif は、antioxidant-response element (ARE)ともいわれ Nrf2 タンパクが結合するとされている。



しかしながら、このモチーフにおいてはこれまで線虫 *C. elegans* で報告されている SKN-1 結合サイトとはそれほど相同性は高くはなかった。哺乳類 *GLO1* 遺伝子における ARE には、他に Maf タンパク質の結合も知られており高度に保存されたこの領域には SKN-1/Nrf2 と Maf の線虫ホモログの結合が推測される。

C. elegans glod-4 遺伝子の機能は MG を解毒することにより ROS 産生を抑えることで寿命延長にも関与するともされていることから、*glod-4* 遺伝子が DAF-16/FOXO 依存性経路による制御を受けているとも考えられ、同様に JASPA による DAF-16 結合サイトの検索を行なった。これまでに明らかにされた DAF-16 結合サイトと推定される T(G/A)TTTAC 配列に一致する配列は見当たらず、決定には至っていない。

データベース検索からは、DAF-16 に機能的に類似する数種の Fork head/winged helix factor (FOX) の結合サイトとの相同性が認められたことで *glod-4* 遺伝子の制御に DAF-16 が関与する可能性は残されている。グルコースの投与により DAF-16/FOXO、HSF-1 のシグナル伝達はダウンレギュレートし、グリオキシラーゼ活性が低下する。逆に、DAF-16/FOXO、HSF-1、SKN-1/Nrf2 のシグナル伝達ネットワークが活性化されることで寿命の延長が起きている事実から、*glod-4* は DAF-16 または SKN-1 経路の下流で機能していると推定されるが、遺伝子制御機構に関しての全貌は明らかではない。また、DAF-16 は *skn-1* 遺伝子に結合し、転写を活性化することはわかっている。*daf-2* および *daf-16* 遺伝子によって調整される遺伝子の大部分が腸で発現しているとの報告があり、*glod-4* にもそれぞれに共通する DNA 結合エレメントの存在が示唆される。

GLO1 遺伝子プロモーターには、金属応答エレメント(MRE)、インスリン応答エレメント(IRE)、early gene 2 factor isoform(E2F)、活性型エンハンサー結合タンパク質 2 (AP-2)の存在が知られており、これら結合ドメインが線虫 *glod-4* 遺伝子に存在するかは今後の検討課題である。また、同時に複数存在する相同性の高い領域の機能と遺伝子発現との関連を調べる必要がある。

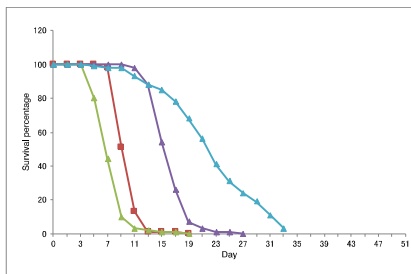
(2) *GL01/glod-4* 遺伝子プロモーター活性

線虫 *C. elegans* *glod-4* 遺伝子上流域と *GL01* 遺伝子上流域の転写活性及び制御機構を調べるために、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターに持つ発現ベクターにヒト *GL01* のノーマル遺伝子、ホモポリマー多型遺伝子と *glod-4* 遺伝子上流域を組み込み、プロモーター活性を測定した。

その結果、トランジェント系でのホモポリマー多型遺伝子上流域はノーマルに比べ約 10 倍ルシフェラーゼ活性が高かった。*C. elegans glod-4* 遺伝子上流域を持つ発現ベクターでは活性は見られたものの数倍レベルであった。このことから、HEK293T 細胞内においても *glod-4* 遺伝子のプロモーター活性が示されたが *GL01* 遺伝子とは遺伝子制御機構が異なることが推定される。

線虫 *C. elegans* の *glod-4* 遺伝子が、アルツハイマー病やパーキンソン病と同様な統合失調症のモデル動物になりうるかは現段階では結論付けられないが、線虫 *C. elegans* への *GL01* 遺伝子の導入による発現局在の差異や生化学的測定により詳細な検討が必要となる。

(3) 薬剤ライブラリーの寿命延長に関わる薬剤のスクリーニング



薬剤ライブラリーのスクリーニングから MG 負荷において線虫 *C. elegans* 野生株 N2 と *glod-4* 変異体の 50% 寿命が約 1.4 倍延長する薬剤 X を 1st スクリーニングで同定した。この薬剤 X による効果は、酸化ストレスマーカーである ROS 等の測定は実行できていないため暫定的ではあるが、*glod-4* 遺伝子トランスジェニック線虫をもちいた薬剤効果のさらなる解析が必要である。

GL01/glod-4 遺伝子の発現と活性の調節は複雑であり、まだ全貌の理解には至っていない。MG 代謝および酸化ストレス耐性に関連するいくつかの遺伝子は、SKN-1/Nrf2 経路の制御下にあると推測されているが、*GL01* と *glod-4* 遺伝子が同一の遺伝子制御機構を持つかの疑問が残る。これは、ARE に Nrf2 タンパク質が結合するが、*glod-4* 遺伝子において、ARE と相溶性が高いエレメントに SKN-1 が結合するかの結果は得られていない。いくつかの研究では、Nrf2 が *GL01* 活性を高め、細胞内 MG ストレスを軽減することを明らかにしている。したがって、薬剤スクリーニングによる薬剤 X による *GL01* 活性の調節は、MG およびジカルボニル化合物の減少効果が認められる可能性を秘めている。

また、今回のデータベースの検索からは、Glyoxalase 活性を持つ *GL0D-4* の線虫ホモログ DJ-1.1 及び 1.2 と異なる遺伝子 F33G12.7 を発見した。線虫において S-Lactoylglutathione から D-Lactate の代謝に関わる *GL02* の存在は明らかになっていないことから、F33G12.7 が *GL02* の候補になりうるかを明らかにし、MG 代謝の詳細な遺伝子発現メカニズム解明を行いたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	原島 愛 (Harashima Ai) (50705522)	金沢大学・医学系・助教 (13301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関