

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20175

研究課題名（和文）causal SNV探索を通じたApoA1遺伝子の新たな発現調節機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of ApoA1 gene regulatory mechanism through searching causal single-nucleotide variants

研究代表者

會田 雄一（Aita, Yuichi）

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：60752152

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：まず、2つの異なるルシフェラーゼレポーターベクターの一方にプロモーター領域の参照配列を、もう一方に同じ領域でSNVを1つだけもつ配列を挿入し、これらをヒト細胞株にコトランスフェクションしてルシフェラーゼ活性の比率を評価した。次に、スクリーニングで選出されたSNVのcis-elementに作用するtrans因子を探索するために、転写因子だけをゲノムワイドに網羅した発現ライブラリーTranscription Factor Expression Library (TFEL) を独自に構築し、発現クローニングを行った (TFEL scan法)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血中HDLレベルを規定するcausal SNVの探索を目的に、TFEL scan法を用いてApoA1のプロモーター領域のSNVを解析した。同定された転写因子をヒト細胞株で過剰発現したところ、内因性のApoA1遺伝子の発現が増加した。ApoA1のプロモーター領域にあり、転写活性に影響を与えるSNVと、この部位に結合してApoA1遺伝子の発現を制御する転写因子を同定した。また、同定されたSNVがもたらす肝細胞での効果を検討するために、CRISPR/Cas9による相同組換え修復を利用してSNVを導入する実験系の構築を進めた。

研究成果の概要（英文）：We searched for transcription factors binding to causal single-nucleotide variants (SNVs) to find the mechanism how causal SNVs around ApoA1 gene determine plasma HDL levels. 35 candidates for causal SNVs were selected on the basis of their allele frequency. Among these, SNV #33 nearly doubled the ratio of luciferase activities in HepG2 cells. Next, two rounds of TFEL scan revealed that two transcription factors out of 1588 TFs bound to SNV #33. After assessments of reproducibility, we identified TFEL clone #1193 as a novel transcription factor regulating the gene expression level of ApoA1. Overexpression of TFEL clone #1193 in HepG2 cells increased endogenous ApoA1 expression. We identified not only the causal SNV that affected the transcription of ApoA1 gene but also the transcription factor that bound to this causal SNV and determined the expression level of ApoA1 gene.

研究分野：応用健康科学

キーワード：生活習慣病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサーは世界中で膨大な量の塩基情報を生み出しており、医療のみならずヘルスケアへの応用が期待される。この第一歩は、次世代シーケンサーから得られた塩基情報と、人種や地域、生活習慣など様々な環境下で得られる表現型を組み合わせる解析である。こうした遺伝統計学的な解析によって得られた知見をさらに、生活習慣病の個別化医療や予防医療に役立てるためには、真に機能を有する「疾患関連変異」の機能解析を分子生物学的な実験によって進める必要がある。すなわち遺伝統計学的に疾患との関連が見出された変異が、どのような生物学的メカニズムによって疾患をもたらすのかを証明する研究である。

2. 研究の目的

本研究では、エンハンサーやプロモーターといった遺伝子制御部位に位置する一塩基バリエーション (single-nucleotide variant: SNV) が、血中 HDL レベルを規定するメカニズムを実験的に解明することを目的とした。善玉コレステロールとして知られる HDL コレステロールを血液中で輸送している「高密度リポタンパク質 (HDL)」に着目し、その主要構成タンパク質であるアポリポタンパク質 A-I (ApoA1) を対象とした。

3. 研究の方法

まず、ApoA1 遺伝子のプロモーターに位置する SNV の中から、転写活性に影響を与える causal SNV の探索を試みた。2つの異なるルシフェラーゼレポーターベクターの一方にプロモーター領域の参照配列を、もう一方に同じ領域で SNV を1つだけもつ配列を挿入し、これらをヒト細胞株にコトランスフェクションしてルシフェラーゼ活性の比率を評価した (図1)。次に、転写因子だけをゲノムワイドに網羅した発現ライブラリー「Transcription Factor Expression Library (TFEL)」を独自に構築し、見出された causal SNV が位置する DNA エlement に結合する転写因子の同定を進めた (図2)。

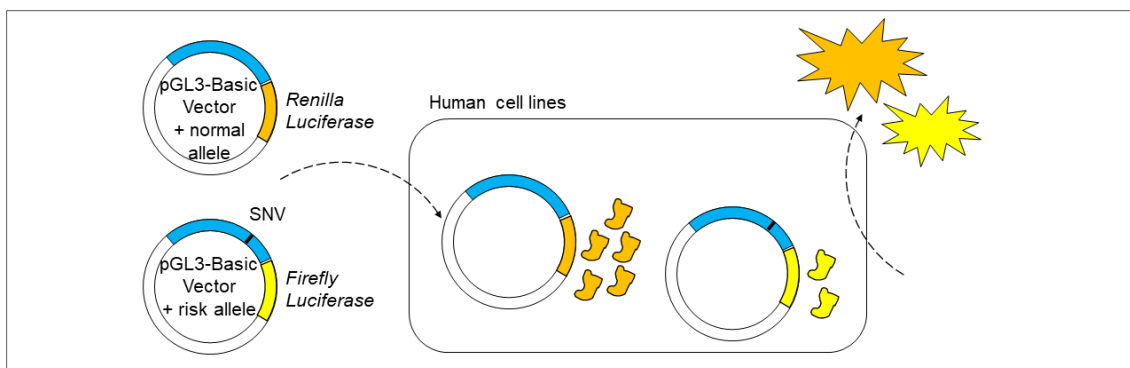


図1 ルシフェラーゼ活性の評価

水色で示された部分が、プロモーター領域の配列。2種類のルシフェラーゼレポーターベクターのうち、片方に SNV をもつプロモーター領域を挿入する。

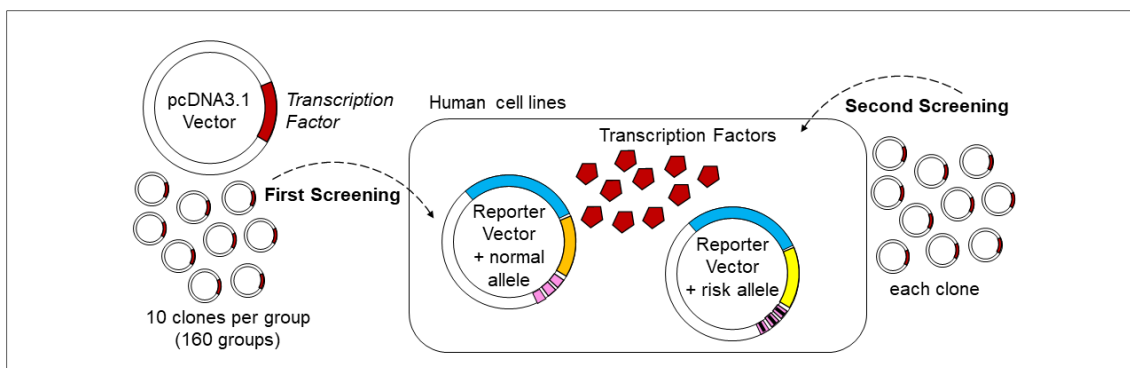


図2 TFEL scan 法

転写因子が、プロモーター領域 (水色) や評価する DNA エlement (ピンク色) に結合し、ルシフェラーゼ (橙色、黄色) が発現する。SNV の有無により、発現量に差が生じうる。

4. 研究成果

HDL の主要アポリタンパクである ApoA1 のプロモーターに位置し転写活性に影響を与える SNV を新たに同定した。そして、この SNV が位置する DNA エlement に TFEL #1193 という転写因子が結合して ApoA1 の転写を正に制御することを明らかにした。これらの結果をもとに、TFEL #1193 の機能解析を進めた。また、同定された SNV がもたらす肝細胞での効果を検討するために、CRISPR/Cas9 による相同組換え修復を利用して SNV を導入する実験系の構築を進めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Mehrazad Saber Z, Takeuchi Y, Sawada Y, Aita Y, Ho MH, Karkoutly S, Tao D, Katabami K, Ye C, Murayama Y, Shikama A, Masuda Y, Izumida Y, Miyamoto T, Matsuzaka T, Sugawara T, Takekoshi K, Kawakami Y, Shimano H, Yahagi N	4. 巻 582
2. 論文標題 High protein diet-induced metabolic changes are transcriptionally regulated via KLF15-dependent and independent pathways	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 35～42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.10.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi Yoshinori, Yahagi Naoya, Aita Yuichi, Mehrazad-Saber Zahra, Ho Man Hei, Huyen Yiren, Murayama Yuki, Shikama Akito, Masuda Yukari, Izumida Yoshihiko, Miyamoto Takafumi, Matsuzaka Takashi, Kawakami Yasushi, Shimano Hitoshi	4. 巻 24
2. 論文標題 FoxO-KLF15 pathway switches the flow of macronutrients under the control of insulin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103446～103446
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.103446	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 會田雄一, 矢作直也, 武内謙憲, 何敏熙, Saber Zahra Mehrazad, 呼延宜人, 村山友樹, 志鎌明人, 升田紫, 泉田欣彦, 関谷元博, 中川嘉, 松坂賢, 川上康, 島野仁
2. 発表標題 causal SNV探索を通じたApoA1遺伝子の新たな発現調節機構の解明
3. 学会等名 第52回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Aita Yuichi, Yahagi Naoya, Takeuchi Yoshinori, Ho Man Hei, Saber Zahra Mehrazad, Huyen Yiren, Murayama Yuki, Shikama Akito, Masuda Yukari, Izumida Yoshihiko, Sekiya Motohiro, Nakagawa Yoshimi, Matsuzaka Takashi, Kawakami Yasushi, Shimano Hitoshi
2. 発表標題 Elucidation of ApoA1 Gene Regulatory Mechanism Through Searching Causal Single-Nucleotide Variants
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学医学医療系ニュートリゲノミクスリサーチグループ
<http://nutrigenomics.umin.jp/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------