

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659335

研究課題名(和文)法医学的年齢推定法開発の新しい展開 年齢依存性転写因子からのアプローチ

研究課題名(英文)Development of a new method of age estimation-an approach from transcription factors-

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：TCMK-1およびRPTEC細胞において、M-LPH やRhithの発現抑制によって発現が変化する遺伝子群を検索した結果、酸化ストレス関連遺伝子やアポトーシス関連遺伝子において発現が有意に促進または抑制されるものが多数同定された。Rhith KOマウスについて病理組織学的検査などを行ったが、wild-typeとの顕著な差が認められず、Rhithの機能は、他の転写因子によって補われているものと考えられた。Rhithは、M-LPH遺伝子のintron 1内に存在するTtk binding siteに結合し、Rhith遺伝子の発現には抑制因子FOXD3および促進因子GABPがかかわることが示された。

研究成果の概要(英文)：I have identified a number of genes which were up- or down-regulated by siRNA-mediated knockdown of M-LPH or Rhith. No significant differences in histological appearance were observed between Rhith-/Rhith- mice and wild-mice. It was shown that Rhith binds to the Ttk 69K binding site and functions as a transcriptional repressor in M-LPH expression, and that expression of Rhith gene is transcriptionally regulated by two transcription factors, FOXD3 and GABP.

研究分野：法医学、分子生物学

キーワード：法医学 年齢推定 転写因子

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、被疑者や被害者特定のための個人識別精度の向上が求められている。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。しかし、体液や臓器などの法医学的資料から、年齢を推定する研究は、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や近年ではエピジェネティクスを利用するものなどあるものの実用化には至っておらず、法医鑑定の盲点となってきた。

申請者は、従前より年齢依存性生体分子に関する研究に取り組み、これまでに多数の年齢依存性生体分子を同定した (*Mech Aging Dev*, 113, 135-144, 2000; *Biochem Biophys Res Commun*, 283, 292-296, 2001; *FEBS J*, 274, 3939-3947, 2007 他)。これらの年齢依存性生体分子のうち、Mpv17-like protein (M-LP) はマウスの腎において新規に見出したタンパク質である (*J Biol Chem*, 278, 6301-6306, 2003 他)。また、M-LP 遺伝子の発現調節機構の解析の結果、新規転写因子抑制因子 regulator of heat-induced transcription (Rhit) を同定した。両者の発現パターンは逆相関関係にあり、M-LP の年齢依存性発現は Rhit の発現変化に依存している (*Mol Cell Biol*, 30, 2306-2315, 2010)。したがって、M-LP や Rhit の影響下で発現変動する遺伝子群もまた年齢推定マーカーとなり得る可能性が高いと推測された。そこで、本研究では、法医学における個人識別検査の新たな飛躍を図るため、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を同定し、これらを“年齢推定の指標”として利用することを目的として企画した。

2. 研究の目的

本研究では、以下の3点について研究を推進した。

- (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検索・同定
- (2) ヒト転写抑制因子 Rhit (RhitH) の遺伝子発現機構の解析および年齢依存性発現の分子論的基盤の確立
- (3) RhitH 遺伝子内の非同義置換型 SNP (9 座位) の多集団における分布調査と遺伝子型と活性の相関解析

3. 研究の方法

- (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検索・同定
培養細胞レベルでの解析
マウス腎細胞 (TCMK-1) やヒト正常尿管上皮細胞 (RPTEC) 内に、siRNA を導入し、遺伝子発現を抑制した。導入の48時間

後、細胞から抽出したtotal RNAや逆転写反応により作製したcDNAを用いてmicro array解析やPCR array解析を行い、mRNAレベルで発現変動する遺伝子群を網羅的に検索した。

RhitのKOマウスの作製と表現系の解析

Rhit/Rhit マウスは常法によりC57BL/6CrSliマウスを用いて作製した。遺伝子発現解析、血液生化学的分析および病理組織学的検査を行い、wild-typeと比較した。

- (2) RhitH の遺伝子発現機構の解析および年齢依存性発現の分子論的基盤の確立
M-LP (M-LPH) 遺伝子promotor活性の測定

M-LPH遺伝子のintron 1の上流域を含む様々なDNA断片を、ヒトゲノムDNAを鋳型としてPCR法により増幅し、得られた断片をpGL4.10ベクターのSaclI/BglII サイトにそれぞれ挿入した。RhitHの結合部位内に塩基置換を有するベクターの作製にはKOD-Plus-Mutagenesis kit (Toyobo) を使用した。ヒト乳癌細胞 (MCF-7) 内に各ベクターを導入し、48時間後のpromotor活性を、Dual-Lu3-Basic Reporter Assay Systemを用いて測定した。

RhitH 遺伝子の転写調節因子の検索

RhitH 遺伝子上流域を含む様々なDNA断片を、ヒトゲノムDNAを鋳型としてPCR法により増幅し、得られた断片をpGL3-BasicベクターのKpnI/HindIII サイトにそれぞれ挿入した。また、FOXD3およびGABPの結合部位内に塩基置換を有するベクターの作製およびRhitH 遺伝子のpromotor活性測定は、上記と同様の方法により行った。また、同定した転写因子を再確認するため、さらに、Gel Shift assay、ChIP assayなどを行った。

胎児および成人の各臓器におけるM-LPHおよびRhitHのmRNA量の定量はリアルタイムPCRにより行った。

- (3) RhitH 遺伝子内の非同義置換型 SNP (9 座位) の多集団における分布調査と遺伝子型と活性の相関解析

RhitH遺伝子内SNPの遺伝子型判定

9座位のSNPすべてについて、PCR-RFLPによる型判定法を開発した。これらの方法によりアジア人、アフリカ人、白人など16集団、計1,752名について解析し、遺伝子型分布を調査した。

SNPにより惹起されるアミノ酸置換と転写抑制活性との相関解析

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RPTEC細胞に導入して過剰発現させたのち、細胞から調製したcell lysateについてWestern Blotting解析を行ってM-LPHを検出した。

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

伝子群の検索・同定

TCMK-1細胞による検索

TCMK-1細胞において、Rhitの発現抑制によって発現が変化する遺伝子群を検索した。microarray解析では140の遺伝子(Galnt13, Olfr1511, Adamts16など)で4倍以上の発現量増加が認められ、399の遺伝子(Arx, Slc5a4b, Lcp1など)で1/4以下の発現量低下が認められた。一方、酸化ストレス関連遺伝子を対象としたPCR array解析では、発現が有意に促進される8遺伝子(Gpx1, Gpx8, Slc38a3など)および発現が有意に抑制される29遺伝子(MPO, Rag2, Aassなど)が同定された。

RPTEC細胞による検索

RPTEC細胞において、M-LPHの発現抑制によって発現が変化する遺伝子群を、アポトーシス関連遺伝子を対象としたPCR arrayを用いて検索した。その結果、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。

RhitのKOマウス表現系解析

Rhit/Rhitマウスでは、遺伝子発現解析、血液生化学的分析および病理組織学的検査においてwild-typeとの顕著な差が認められなかった。したがって、Rhitの機能は、他の転写因子によって補われているものと考えられた。

(2) ヒト転写抑制因子 RhitH の遺伝子発現機構の解析および年齢依存性発現の分子論的基盤の確立

M-LPH遺伝子内のRhitH結合部位の同定

M-LPH遺伝子上流域のPromotor assayの結果、RhitHは、M-LPH遺伝子のintron 1内に存在するTtk binding siteに結合することを明らかにした(図1)。したがって、M-LPHの年齢依存性発現はRhitHが持つ発現抑制効果によるものと考えられた。

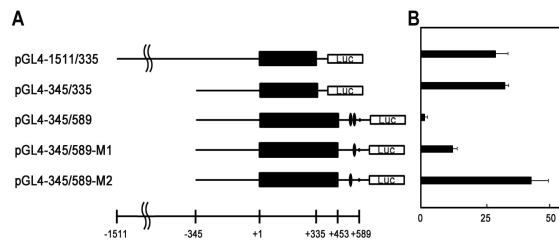


図1 M-LPHのPromotor assay、(A) M-LPHのPromotor領域内のRhitH結合部位を●で示した。+1は転写開始部位を表す。(B) M-LPH遺伝子の5'上流域を含む種々のreporter vectorの転写活性

RhitH遺伝子の転写調節因子の検索・同定 RhitH遺伝子の転写因子を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

子であるFOXD3が結合し、約50 bp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促進因子GABPが結合することが示された(図2)。

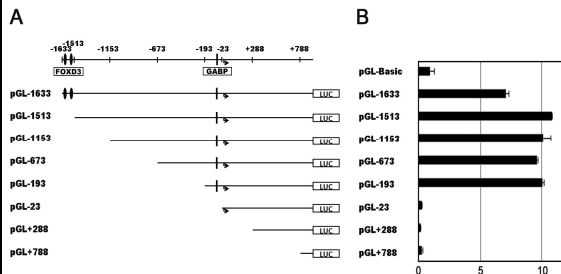


図2 RhitHのPromotor assay (A) RhitHのPromotor領域内のシスエレメント +1は転写開始部位を表す。(B) RhitH遺伝子の5'上流域を含む種々のreporter vectorの転写活性

M-LPHおよびRhitHのmRNAレベルでの発現量

M-LPHは、肝、腎、脳などATP産生が活発な臓器で多く発現し、成人における発現量は胎児での発現量を大きく上回っていた(1.3-6.9倍)。一方、RhitHは胎児と成人ともに種々の臓器で広く発現していたが、胎児と成人の発現量に大きな差は認められなかった。

(3) RhitH遺伝子内の非同義置換型SNP(9座位)の多集団における分布調査と遺伝子型と活性の相関解析

RhitH遺伝子内SNPの遺伝子型判定

RhitHの遺伝子発現抑制に關与する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のそれぞれについてPCR-RFLPによる遺伝子型判定法を開発し、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。

SNPにより惹起されるアミノ酸置換と転写抑制活性との相関解析

図3に示すように、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。

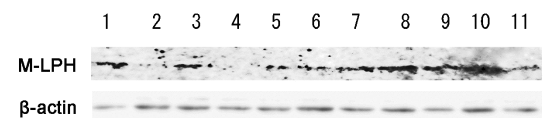


図3 RhitHの各SNPのminor alleleに相当するアミノ酸置換型の発現ベクターを導入したRPTEC細胞におけるM-LPHの検出 Lane 1, pcDNA3.1; lane 2, pcDNA3.1/RhitH (wild type); lane 3, p.Leu133Val; lane 4, p.Arg135Trp; lane 5, p.Arg135Gln; lane 6, p.Arg309Gln; lane 7, p.Ser461Cys; lane 8,

p.Ala465Thr; lane 9, p.Leu491Phe; lane 10,
p.Gln495Leu; lane 11, p.Ser517Thr.

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計6件)

R. Iida, 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。

DOI: 10.1089/biores.2013.0042

M. Ueki, K. Kimura, H. Takeshita, J. Fujihara, R. Iida, R. Sano, T. Nakajima, Y. Kiominato, Y. Kawai, T. Yasuda, Evaluation of all non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes encoding human deoxyribonuclease I and I-like 3 as a functional SNP potentially implicated in autoimmunity, *FEBS J*, 281, 376-390, 2014, 査読有。

DOI: 10.1111/febs.12608

M. Ueki, K. Kimura, J. Fujihara, H. Takeshita, R. Iida, H. Kato, T. Yasuda, Seven non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the gene encoding human deoxyribonuclease II may serve as a functional SNP potentially implicated in autoimmune dysfunction, *Electrophoresis*, 34, 3361-3369, 2013, 査読有。

DOI: 10.1001/elps.201200415

M. Ueki, J. Fujihara, K. Kimura, H. Takeshita, R. Iida, T. Yasuda, Five non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the gene encoding human deoxyribonuclease I-like 2 implicated in terminal differentiation of keratinocytes reduce or abolish its activity, *Electrophoresis*, 34, 456-462, 2013, 査読有。

DOI: 10.1001/elps.201200415

H. Takeshita, J. Fujihara, M. Ueki, R. Iida, Y. Koda, M. Soejima, I. Yuasa, H. Kato, T. Nakajima, Y. Kominato, T. Yasuda, Nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms of the human apoptosis-related endonuclease-DNA fragmentation factor beta polypeptide, endonuclease G, and Flap endonuclease 1-genes show a low degree of genetic heterogeneity, *DNA Cell Biol*, 31, 36-42, 2012, 査読有。

DOI: 10.1089/dna.2011.1293

R. Iida, 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。

DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.003

〔学会発表〕(計3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、パシフィコ横浜(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、ロイトン札幌(札幌)

R. Iida 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、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡)

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: 4 0 1 3 9 7 8 8

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

植木 美鈴 (UEKI, Misuzu)
福井大学・医学部・助手
研究者番号: 0 0 1 6 5 6 5 6