

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：32692

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26882046

研究課題名(和文)糖化関連疾病機構解析に向けた細胞内活性炭素種由来糖化経路モニタリング技術の開発

研究課題名(英文)Development of monitoring system for intracellular reactive carbon species-related glycation

研究代表者

三上 あかね(坂口あかね)(MIKAMI (SAKAGUCHI), Akane)

東京工科大学・医療保健学部・講師

研究者番号：70469782

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文):糖化関連物質応答性転写調節因子様タンパク質(GpTR)の遺伝子を単離後,組換えGpTRオペレーター様領域(Op)-レポーター融合遺伝子(p0-Rluc),及び無細胞レポーターアッセイを用いて本GpTRが,新規糖化関連物質応答性転写調節因子であることを示した.また,ヒト細胞内モニタリング系の構築を行った.GpTR発現ベクター,およびp0-Rlucを導入したヒト細胞のレポーターの発現量は細胞内の糖化関連物質の濃度に依存して制御されていることが示唆された.このことから,本研究により構築されたGpTRに基づく細胞内モニタリングシステムは細胞内糖化経路のモニタリングを可能とすると期待される.

研究成果の概要(英文):Glycation is a series of intra-/extracellular non-enzymatic reactions and its resulted products, GPs, leads to diabetic complications and are implicated in the pathology of several diseases as well as aging process. However, detail mechanisms for intracellular glycation and for pathogenesis of the diseases are still unrevealed. In this study, we demonstrated the construction of intracellular GP-monitoring system employing a novel TR for GPs (GpTR).A putative GpTR was first characterized using in vitro reporter assay system and identified as a novel GP-TR for the first time. The GpTR-based intracellular GP-monitoring system for mammalian cells was then constructed and GPs in HepG2 was monitored. The reporter expression level increased with the increase of media sugar concentration, showing that the system has a potential to allow the intracellular GP monitoring and expected to contribute to the elucidation of intracellular GP mechanisms and the pathogenesis of GP-related diseases.

研究分野:生体情報・計測

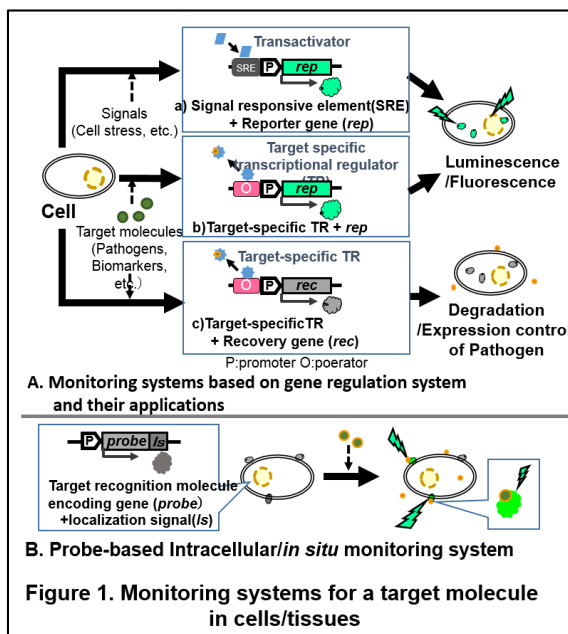
キーワード:糖化 細胞内モニタリング

1. 研究開始当初の背景

糖化反応は、Glc 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、生体内外において普遍的に起こる。反応初期生成物である AC や後期生成物(Advanced glycation end products, AGEs)等の糖化物(glycated products, GPs)の形成は、蛋白質の生体機能喪失をもたらす、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 形成機構及び GPs の疾病発症への関与機構は未だ明らかではなく、その解明の為に細胞内糖化のモニタリングを可能とする技術の開発が望まれる。

近年、GPs として、AC や AC 由来 AGEs の他、Glc から生成するグリオキサル(Gloxal, GO)やメチルグリオキサル(Methylgloxal, MG)などの RCS に由来する GPs(RCS-GPs)が細胞内に存在することが明らかとなった。また、血中 RCS 濃度が糖尿病患者において高くなること、RCS が GPs 関連疾病の進行に関連することなどが報告されている。このため、GPs 形成機構及び GPs 関連疾病発症機構の解明のためには、Glc や AC に由来する糖化経路の他、RCS 及び RCS-GPs など、GO/MG 糖化経路のモニタリングを可能とする技術の開発が求められる。

細胞内物質のリアルタイムモニタリング法として、レポーターアッセイを利用したセンサー細胞技術(Figure1 A-a,b)や、蛍光プローブを用いる技術(Figure1 B)などが報告されている。



センサー細胞技術は、標的物質に反応する遺伝子発現制御機構と発現プロモーター(P)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技術であり、レポーター遺伝

子の代わりに、酵素などを組み合わせることによって、細胞機能制御技術としても応用が可能であり遺伝子治療技術としても注目されている(Figure1 A-c)。遺伝子発現制御技術機構としては、一般的に、刺激応答領域(SRE)を利用したセンサー細胞技術(Figure1 A-a)が多く報告されている。一方、動物細胞において対応する SRE が存在しない標的分子のモニタリングを可能とする技術として、研究代表者は、これまでに、標的分子を認識する転写調節因子(TR)を設計し、これらを遺伝子発現制御機構として用いたセンサー細胞の開発を行ってきた(Figure1 A-b)。まず、Glc や AC に由来する糖化経路のモニタリング技術の開発を目的として、大腸菌由来 TR と、Glc 結合タンパク質(GBP)のキメラ蛋白質を設計し、これを用いた動物細胞内 Glc モニタリング技術を開発した。

また、微生物由来の Glc や AC の結合蛋白質や認識酵素を検索し、これらの基質認識能を利用し、蛍光・発光タンパク質と融合することで蛍光プローブの開発を行ってきた。

一方、これまでに Glyoxalase や Aldoketo reductase (AKR)などの RCS 認識蛋白質及び、大腸菌由来 RCS 応答性 TR(RcsR)の報告がある。また *Pseudomonas* 属の細菌由来アルデヒド脱水素酵素の発現が RCS 発現誘導性を示すことから、RcsR の存在が示唆された。更に、Pyrazines などの RCS-GP を資化する細菌の単離が報告されており、RCS-GP 認識蛋白質及び TR の存在が示唆されている。これまで開発してきたセンサー細胞技術及び蛍光プローブ作製技術を用いることで、これら細菌由来 RcsR 及び RCS・RCS-GP 認識蛋白質に基づく細胞内 RCS・RCS-GP センシング法が開発が可能であると期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、糖尿病合併症やアルツハイマー病などの糖化関連疾病への関与が示唆される RCS 及び糖化関連物質の認識分子及び細胞内糖化経路モニタリング技術の開発を行うことを目的とする。まず、微生物由来 RCS 及び糖化関連物質応答性転写調節因子を用いて、細胞内 RCS または糖化関連物質の濃度に特異的に依存してレポーター遺伝子発現が誘導される動物細胞内糖化経路モニタリング技術の構築を、また、RCS 糖化物質化菌より、RCS 糖化物質応答性タンパク質を単離し、これを用いた細胞内 RCS 糖化物質検出法の開発を試みることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)新規 RSC 及び糖化関連物質応答性転写調節因子の単離及び同定

糖化関連物質代謝能などを指標に、ゲノムデータベースを用いて、新規 RSC 及び糖化関

連物質応答性転写調節因子の検索を行った。また、検索された新規糖化関連物質応答性転写調節因子様遺伝子を単離し、発現用ベクターの構築および大腸菌を用いた組み換え生産を行った。また、本糖化関連物質応答性転写調節因子様タンパク質(GpTR)の結合領域と予測される領域を含む約 0.3 kbp の DNA 配列(Putative Operator;Op)を検索し、単離後、T7 promoter 領域とレポーター遺伝子(Renilla luciferase gene, *Rluc*)の間に挿入し、Op-レポーター融合遺伝子コンストラクト(pT7-Op-*Rluc*)の構築を行った(Figure 2 上)。次に、得られた組換え GpTR および pT7-Op-*Rluc* を用いて、T7 無細胞レポーターアッセイシステム(Figure 2 下)による本糖化関連物質応答性転写調節因子様タンパク質のリガンドの同定および認識 DNA 配列の同定を試みた。

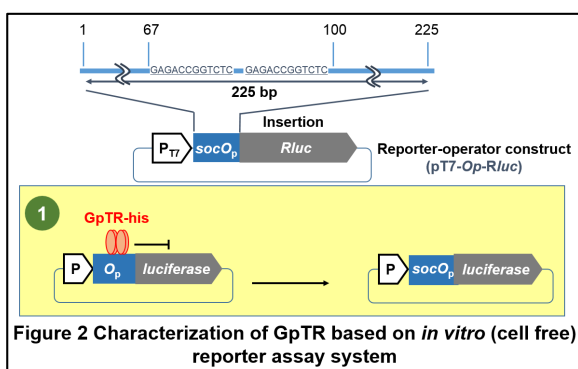


Figure 2 Characterization of GpTR based on *in vitro* (cell free) reporter assay system

(2) ヒト細胞内糖化関連物質モニタリングシステムの構築

GpTR の動物細胞発現ベクター(pCMV-GpTR)、およびレポーター遺伝子(Firefly luciferase gene, *luc*)上流に Op を挿入した Op-レポーター融合遺伝子コンストラクト(pCMV-Op-*luc*)を構築した。次に、ヒト肝癌培養細胞(HepG2)に、pCMV-GpTR、pCMV-Op-*luc*、及び内部標準レポーター用 pTK-Rluc を共導入した後、異なる濃度の Glucose(0, 4, 20 mM) 含む培地で細胞を培養した。その後、レポータータンパク質の活性を指標に、その発現量の測定を行った。また、細胞破砕液中に含まれる糖化関連物質の濃度の評価を試みた。

4. 研究成果

ゲノムデータベースを用いて、新規 RcsR の検索を行い、その 1 つである糖化関連物質資化能を有する土壌細菌より新規糖化関連物質応答性転写調節因子様遺伝子を単離した。また、本 GpTR の発現用ベクターの構築および大腸菌を用いた組み換え生産を行い、約 38 kDa の水溶性タンパク質として精製 GpTR が得られた。精製 GpTR の糖関連物質結合能を、蛍光強度変化率を用いて測定したところ、GpTR は、糖化関連物質特異的に結合能を有することが示唆された。

次に、Op-レポーター融合遺伝子コンストラクト及び無細胞レポーターアッセイシステムを用いて GpTR 存在/非存在下における

レポーター発現量を測定したところ、レポーター発現量は、GpTR 濃度依存的に減少することが示され、Op の GpTR に対する K_d 値は 10^{-8} M であった。本 GpTR 存在下における最大レポーター発現量は、GpTR 非存在下の発現量の 8 倍程度であり、同じファミリーに属すると考えられる大腸菌由来 LacI と同等であった。また、Op-レポーター融合遺伝子コンストラクト及び GpTR を混合し、糖化関連物質の存在/非存在下におけるレポーター発現量を同様に測定したところ、レポーター発現量は、糖化関連物質の濃度依存的に増加することが示され、GpTR の糖化関連物質に対する K_d 値は 10^{-7} M であった。また糖及びアミノ酸などの添加に因るレポーター発現量の違いは見られなかった。

本結果より、GpTR が、糖化関連物質に特異的に応答する転写調節因子であることが示され、また、本タンパク質が認識する DNA 配列領域が明らかとなった。一方、Op 由来の断片を挿入した数種類の Opf-レポーター融合遺伝子コンストラクトを作製し、無細胞レポーターアッセイシステムを用いて GpTR 存在下でのレポーター発現量を測定したところ、Op-レポーター融合遺伝子コンストラクトを用いた場合と比べて明確な発現量の違いが見られず、最小転写調節領域の同定には至らなかった。そこで以下の実験では、引き続き全長 Op を GpTR の転写調節領域として用いた。

次に、GpTR の動物細胞発現ベクター、および Op-レポーター融合遺伝子コンストラクトを導入したヒト細胞を培養した後、レポーターの発現量を測定した結果、培地内の糖濃度に依存して、レポーター遺伝子の発現が制御されていることが示唆された。細胞内での糖化関連物質は培地内の糖濃度に依存して増加すると考えられる。これらのことから、細胞内糖化関連物質の濃度に依存して、レポーター遺伝子の発現が制御されていることが示唆された。一方、無細胞系を用いて細胞破砕液中に含まれる糖化関連物質の濃度の評価を試みたが、夾雑物質の影響が大きく、濃度の同定には至らなかった。今後、酵素法など他の方法を用いて同定を行う予定である。

以上、本研究により新規糖化関連物質応答性転写調節因子が単離され、これを用いることでヒト細胞内糖化関連物質のモニタリングが可能であることが示唆された。本 GpTR に基づく細胞内モニタリングシステムは今後、最小転写調節領域の同定を行う、また検量範囲の同定あるいは改変、などを行うことで細胞内糖化関連物質のリアルタイムモニタリングを可能とし、他の RCS 及び RCS-GPs 認識分子と共に、糖化細胞内糖化経路の解明に寄与すると期待される。

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 2件)

1. Miho Kameya, Akane Sakaguchi-Mikami, Stefano Ferri, Wakako Tsugawa, Koji Sode, "Advancing the development of glycosylated protein biosensing technology: next-generation sensing molecules", Journal of diabetes science and technology, 査読有, 2015, 9(2):183-191, DOI: 10.1177/1932296814565784

2. Akane Sakaguchi-Mikami, "ヘモグロビン A1cのPOCT測定法の現状と展望", 臨床化学, 査読無, 2015, 44(2)119-125, http://www.jbcc-jp.gr.jp/?page_id=1685

〔学会発表〕(計 2件)

1. Akane Sakaguchi-Mikami, Yani Faozani Alli, Isao Karube, "Development of a transcriptional factor for intracellular glycation monitoring system", BMB2015(第38回日本分子生物学会) 2015年12月1日, 兵庫県神戸市(神戸ポートアイランド)

2. 三上あかね, "糖化タンパク質バイオセンシング法の開発", 第22回日本臨床化学会関東支部総会, 2015年5月30日, 東京都大田区(東京工科大学)

6. 研究組織

(1)研究代表者

三上 あかね(坂口 あかね)(MIKAMI (Sakaguchi), Akane)

東京工科大学・医療保健学部・講師

研究者番号: 70469782