

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17565

研究課題名(和文) 内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)制御における時計遺伝子DEC1の役割の解明

研究課題名(英文) Role of a clock gene DEC1 in the regulation of endothelial NO synthase

研究代表者

丸橋 達也 (Maruhashi, Tatsuya)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号：10727069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：抑制的時計遺伝子DEC1が、LKB1/AMPK伝達を介して、内皮型NO合成酵素(eNOS)制御にかかわっているかどうかを検討した。野生型マウスとDEC1ノックアウトマウスから血管内皮細胞を単離し、LKB1とAMPK、eNOSのリン酸化と発現についてウエスタンブロット法にて検討した。DEC1ノックアウトマウス内皮細胞では、野生型マウス内皮細胞と比較して、LKB1とAMPK、eNOSの発現に差は認めなかったが、LKB1とAMPK、eNOSのリン酸化の亢進が認められた。DEC1の発現を抑制することにより、LKB1/AMPKリン酸化亢進を介して、eNOSリン酸化が亢進する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、DEC1抑制がeNOSリン酸化亢進に関与している可能性が示された。eNOSリン酸化にはさまざまなシグナリングが関わっているが、DEC1がeNOSリン酸化制御に関わっていることはこれまで報告されておらず、eNOS制御の新規機序の解明につながる可能性がある。抑制的時計遺伝子Dec1は、時計遺伝子系からの調整だけでなく、光照射や食事、低酸素による調整も受けており、シフトワーカーや睡眠障害者の血圧上昇・心血管疾患発症リスク成因の一部を説明できる可能性があり、さらに血管機能障害に対する予防法や治療法を分子時計系の視点から提唱できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether DEC1, one of the clock proteins, is associated with the regulation of the phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) through LKB1/AMPK pathway. Endothelial cells were isolated from male Dec1^{-/-} mice and wild-type mice at 6 weeks of age. Phosphorylation and expression of LKB1, AMPK, and eNOS were investigated using Western blot analysis. Western blot analyses revealed that the LKB1 phosphorylation, AMPK phosphorylation, and eNOS phosphorylation were significantly increased in endothelial cells of Dec1^{-/-} mice than in endothelial cells of wild-type mice, whereas there were no significant differences in the LKB1 protein expression, AMPK protein expression, or eNOS protein expression. These findings suggest that DEC1 inhibition increases the eNOS phosphorylation through the increase in LKB1/AMPK phosphorylation.

研究分野：血管内皮機能

キーワード：時計遺伝子 DEC1 内皮型NO合成酵素 AMPK

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

概日時計は、個体の生存や種の保存に必要であり、数種の時計遺伝子産物によって形成されている。分子時計の促進因子である circadian locomotor output cycles kaput/brain and muscle arnt-like protein-1 (CLOCK/BMAL1)ヘテロ二重体は、抑制的時計遺伝子である period (Per)、cryptochrome (Cry)、Dec1 の遺伝子プロモーター上の E-box あるいは E'-box に結合して転写を促進する。合成されたこれらのタンパクは核に移行して、CLOCK/BMAL1 の転写抑制を引き起こす。このフィードバックループによる、転写の促進と抑制の繰り返しが 24 時間の周期を作り出す仕組みである。抑制的時計遺伝子の一つである DEC1 の発現は、時計遺伝子系からの調整だけではなく、光照射や低酸素・食事などの外的要因からの調整も受ける。光照射は、視交叉上核において DEC1 を誘導することから、DEC1 は体内時計の光同調に関与していると考えられている。また、食事により、肝臓などの末梢組織において、DEC1 は他の時計遺伝子よりも早くかつ顕著に誘導される。これらの知見より、夜間の光照射や深夜の食事、睡眠障害による DEC1 上昇が生活習慣病や動脈硬化に関与しており、DEC1 は夜型社会における動脈硬化進展や心血管疾患発症の標的因子となりうる可能性が示唆されている。

内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS: endothelial nitric oxide synthase) から産生される一酸化窒素 (NO: nitric oxide) は、血管拡張や平滑筋細胞増殖抑制・抗凝固・抗炎症・酸化などの抗動脈硬化作用を有しており、動脈硬化進展抑制において重要な役割を果たしている。NO 合成に直接関与する eNOS の発現/活性は、血管内皮機能のみならず動脈硬化進展や心血管疾患発症に影響する。

AMPK は、人から酵母まで真核細胞に高度に保存されているセリン・スレオニンキナーゼの一種である。基礎実験により、DEC1 は AMPK リン酸化に関与することが示されている。また動物実験により、マウスの肝臓では DEC1 発現亢進に伴い AMPK リン酸化が低下すること、また、ヒト線維芽細胞株やヒト乳癌細胞株などを用いた細胞実験では、DEC1 過剰発現により liver kinase B1 (LKB1)リン酸化/発現と AMPK リン酸化が抑制され、DEC1 発現抑制により、LKB1 リン酸化/発現が亢進し、AMPK リン酸化も亢進することが示されている¹。AMPK は eNOS をリン酸化することより^{2,3}、DEC1 の発現抑制により、LKB1/AMPK 伝達を介して eNOS リン酸化が亢進する可能性がある。しかし、これまで血管内皮細胞において、DEC1 が eNOS 活性に及ぼす影響については不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、DEC1 が eNOS 活性に及ぼす影響および、その機序について検討することである。

3. 研究の方法

DEC1 発現抑制が、LKB1 のリン酸化/発現亢進、AMPK リン酸化亢進を介して、eNOS リン酸化亢進に関与しているかどうかを検討する。6 週齢の野生型マウスと DEC1 ノックアウトマウスから血管内皮細胞の単離・培養を行い、大気下 (20%酸素)野生型マウス内皮細胞、低酸素下 (1%酸素)野生型マウス内皮細胞、大気下 DEC1 ノックアウトマウス内皮細胞、低酸素下 DEC1 ノックアウトマウス内皮細胞において、LKB1、AMPK、eNOS それぞれのリン酸化/発現について比較検討を行った。

4. 研究成果

(1) 低酸素刺激に対する反応

DEC1 は低酸素刺激にて発現が増加する。したがって、低酸素刺激にて DEC1 が増加し、eNOS リン酸化が低下すると予想したが、低酸素刺激では DEC1 のみならず、HIF1- も増加し(図 1)、eNOS 活性化因子である VEGF など、様々な因子が影響を受けると考えられる。低酸素刺激にて、DEC-1 が eNOS 活性に及ぼす影響を検討することは困難と考え、以下、大気下(20%酸素)野生型マウス内皮細胞と大気下 DEC1 ノックアウトマウス内皮細胞の比較検討(解析)のみ行った。

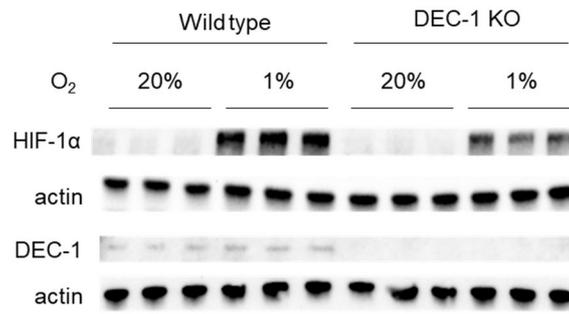


図 1

(2) LKB1 のリン酸化/蛋白発現

大気下 DEC1 ノックアウトマウス内皮細胞において、LKB1 リン酸化は、大気下野生型マウス内皮細胞と比較して有意に増加していた(図 2、3)。LKB 蛋白発現は、2 群間で有意差を認めなかった。

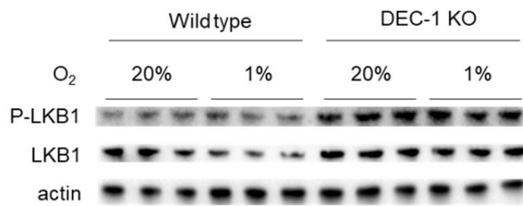


図 2

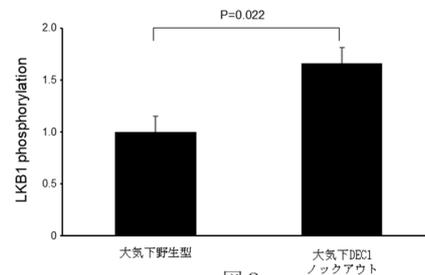


図 3

(3) AMPK のリン酸化/蛋白発現

大気下 DEC1 ノックアウトマウス内皮細胞において、AMPK リン酸化は、大気下野生型マウス内皮細胞と比較して有意に増加していた(図 4、5)。AMPK 蛋白発現は、2 群間で有意差を認めなかった。

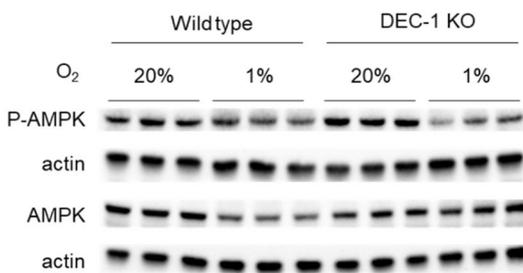


図 4

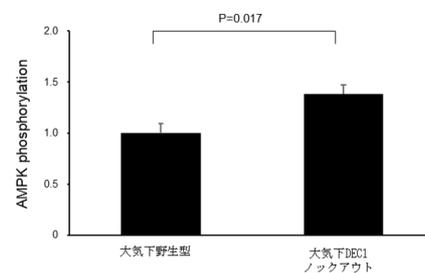


図 5

(4) eNOS のリン酸化/蛋白発現

大気下 DEC1 ノックアウトマウス内皮細胞において、eNOS リン酸化は、大気下野生型マウス内皮細胞と比較して有意に増加していた(図 6、7)。eNOS 蛋白発現は、2 群間で有意差を認めなかつた。

った。

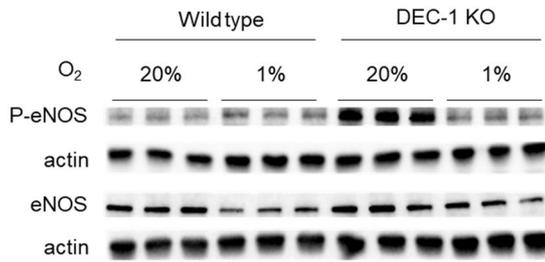


図 6

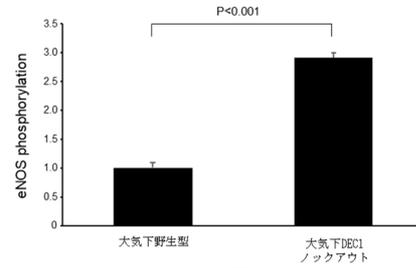


図 7

以上より、以上より、DEC1 の発現を抑制することにより、LKB1/AMPK リン酸化亢進を介して eNOS リン酸化が亢進する可能性が示唆された。抑制的時計遺伝子である DEC1 が eNOS 制御を介して血管内皮機能に関与している可能性が示された。

< 引用文献 >

1. Sato F, et al. Biochem Biophys Res Commun. 467: 711-716, 2015.
2. Butt E, et al. J Biol Chem. 275: 5179-5518, 2000,
3. Chen ZP, et al. FEBS Lett. 443: 285-289, 1999.

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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|