

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790664
 研究課題名(和文) 酸化ストレスによるミネラルコルチコイド受容体のユビキチン化修飾の変化と心血管障害
 研究課題名(英文) Oxidative stress induced change of Ubiquitin modification in Mineralocorticoid receptor and cardiovascular disorder
 研究代表者
 横田 健一 (YOKOTA KENICHI)
 東京大学・分子細胞生物学研究所・特任研究員
 研究者番号：50424156

研究成果の概要 (和文)：ミネラルコルチコイド受容体 MR は、リガンドであるアルドステロンにより、ユビキチン化修飾を受け、プロテアソームにより分解される。酸化ストレスにより、この MR のユビキチン化修飾が変化し、その結果、MR 転写活性も変化する可能性がある。MR の分解を制御するユビキチン E3 リガーゼは UBR2 である可能性があり、酸化ストレス条件下で UBR2 が MR の分解も変化させる可能性がある。

研究成果の概要 (英文)：Mineralocorticoid receptor (MR) is ubiquitinated and then led to proteasome mediated degradation by its ligand, Aldosterone. It is possible that oxidative stress may modify MR ubiquitination and thus change MR mediated transcription. The E3 ligase that regulates MR degradation is possibly UBR2 and it may modify MR degradation under oxidative stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：MR、アルドステロン、ユビキチン、転写

1. 研究開始当初の背景

ミネラルコルチコイド受容体 MR はアル

ドステロン依存性に転写を活性化する核内受容体であり、主に腎臓遠位尿細管や集合管に発現している。健常者では、ACTH や Angiotensin2 などの刺激により副腎球状層からアルドステロンが血中に分泌され、腎尿細管に発現している MR と結合する。すると MR は核に移行し、転写因子として機能し上皮性 Na チャネル ENaC の発現を促進することで尿細管における Na の再吸収から血圧の上昇をたらし。ところが、RALES 研究や EPHEBUS 研究などの大規模臨床研究において、MR 拮抗薬の投与がうっ血性心不全患者の罹患率や死亡率を有意に減少させたことから、MR は心臓、血管などの非上皮組織における炎症や線維化に関与することが示された。近年、原発性アルドステロン症は、高血圧症の 10-15% を占める二次性高血圧として注目されており、同程度に血圧をコントロールした本態性高血圧症と比べて、明らかに脳卒中、虚血性心疾患、蛋白尿などの発生率が高い。さらに、Dahl 食塩感受性ラットなどの動物モデルに食塩負荷を行うと、血中のレニン、アルドステロン濃度は抑制されるにもかかわらず、酸化ストレスが上昇し、腎臓などの炎症をきたし、MR 拮抗薬により改善することが報告されている。これらの報告から、MR は、血中アルドステロン濃度が高値の状態に加えて、アルドステロン濃度がむしろ低値であっても、食塩負荷などの酸化ストレスによっても活性化されることが示唆されている。

リガンド以外の因子（酸化ストレス）による MR 活性化機構として、MR の蛋白修飾の変化が重要であると考えられる。しかし、MR のユビキチン化および SUMO 化修飾の調節機構はほとんど不明である。

一方、アルドステロン産生腫瘍などのアルドステロン過剰状態のみならず、肥満、糖尿病をはじめとするいくつかの疾患においては、未知のメカニズムで MR 作用が過剰になり、Na の再吸収から高血圧が惹起されると考え

られている。そのメカニズムの一つとして、酸化ストレスなどで MR のユビキチン化修飾の変化がoccurそれに伴い MR 活性化メカニズムも変化すると考えられている。

MR の活性化は、リガンドであるアルドステロン高値と、MR の蛋白修飾の変化によるアルドステロン感受性の亢進の 2 つが重要と考えられる。前者は、アルドステロン高値を示す、原発性アルドステロン症やうっ血性心不全などの二次性アルドステロン症では、MR 活性化による臓器障害が明らかである。一方、後者の酸化ストレスによる MR の蛋白修飾の変化についてはほとんど不明である。本研究では、MR のユビキチン化に着目して、酸化ストレスによる MR からのユビキチンの解離（脱ユビキチン化）が MR 活性を上昇させることを証明しようとするものである。

2. 研究の目的

MR のユビキチン-プロテアソーム系による分解制御機構を明らかにし、糖尿病や肥満における酸化ストレス条件下でアルドステロンによる臓器障害メカニズム解明の糸口とする。

3. 研究の方法

(1) FLAG タグ付き MR 発現 pCDNA ベクターを HEK293F 細胞にリポフェクタミンをもちいて一過性過剰発現させ、G418 耐性を利用して selection を行い、FLAG-MR 安定発現 HEK293 細胞株を樹立した。得られた細胞が MR を発現しているかどうかを確認するために、培養したこの細胞を PBS にて wash の後、TNE バッファーにて回収し、その lysate を FLAG M2 レジンで免疫沈降し、得られた蛋白質をサンプルバッファーで煮沸後、SDS-PAGE に展開し、続いて抗 MR 抗体によるウェスタンブロットにて MR 発現を確認した。

また、この細胞にアルドステロンを投与したのち、ISOGEN を用いて mRNA を回収し、逆転写ののち、MR の標的遺伝子の変動を観察し、MR が機能していることを確認した。

(2) 得られた MR 安定発現 HEK293 細胞にアルドステロンや各種生理活性物質や MG132 を投与し、MR 蛋白質の発現量の変化と転写活性の変化を、ウェスタンブロットおよびルシフェラーゼアッセイ、リアルタイム PCR 法を用いて観察した。

(3) MR のユビキチン化修飾を制御するユビキチン E3 酵素を同定するために、FLAG-MR 安定発現 HEK293 細胞を大量に培養し、生化学的手法を用いて核抽出液を取得した。このサンプルを FLAG-M2 レジンで免疫沈降することで、MR と結合する因子を回収した。これらの因子は SDS-PAGE 上に展開し、銀染色で相互作用因子のバンドを確認後、メスで切りだし、トリプシン消化を行った後、MALDI TOF MS による解析に供した。

4. 研究成果

(1) G418 耐性となった HEK293 細胞を回収し、MR 抗体を用いたウェスタンブロットにて MR 安定発現細胞株であることを確認した。また、アルドステロン投与の有無にて細胞の mRNA を回収し、逆転写したうえで、MR の標的遺伝子 ENaC の発現量をリアルタイム PCR にて定量したところ、アルドステロンにより ENaC の発現が 3 倍程度増強することが確かめられた。以上の結果から、MR 安定発現 HEK293 細胞において、過剰発現した MR は内因性の標的遺伝子発現に機能することが確かめられた。

(2) MR 安定発現 HEK293 細胞においてアルドス

テロンを処置すると、MR 蛋白質はウェスタンブロットで蛋白量の減少を認めた。そしてこの作用はプロテオソーム阻害剤である MG132 を投与することで阻害されることから、アルドステロン投与による MR の分解にはユビキチン-プロテオソーム系が関与していることが推測された。またアルドステロンによる MR 転写を増強する因子のスクリーニングとして、MR 安定発現 HEK293 細胞にインスリン、IGF-1、TNF α 、IL-1 β 、過酸化水素、糖、VEGF、TGF β 、アンジオテンシン II、酸化 LDL、ANP、ブラジキニン、インドメタシン、L-NAME などに加え、ルシフェラーゼアッセイおよびリアルタイム PCR による標的遺伝子の観察を行った。しかしこれらの因子においては有意なアルドステロンによる MR 転写活性の増強作用を認めなかった。

(3) MALDI TOF MS を使用することにより、FLAG-M2 レジンを用いた MR 相互作用因子候補の中で、UBR2 が同定できた。UBR2 は zf-UBR ドメインと C1pS ドメインを持つ 1755 アミノ酸からなる蛋白質で、細胞核に存在するユビキチン E3 リガーゼであることが知られている。この因子がリガンド依存性に MR タンパクのユビキチン-プロテオソーム系による分解を制御している可能性がある。さらに、酸化ストレスなどさまざまな生体内条件下で、UBR2 の発現や活性が変化することで、MR の分解の程度を変化させ、その結果 MR 転写活性を変化させている可能性がある。したがって、今後は MR 安定発現 HEK293 細胞において UBR2 を過剰発現させたときに MR 蛋白質の分解が亢進するか、もしくは UBR2 を RNAi でノックダウンしたときに MR 蛋白質の分解が抑制されるかを観察する。また同様に、UBR2 の発現を増加させたり減少させたとき n、MR 転写活性化に及ぼす影響をルシフェラーゼアッセイやリアルタイム PCR を用いて観察する。

また、各種疾患でみられる酸化ストレスを、細胞にも与えた時に、この UBR2 蛋白の発現や活性にどのような影響を与えるかも、ウェスタンブロットや in vitro ubiquitin 化アッセイで観察する。以上の検討から、酸化ストレス条件下などで、MR の病的活性化を起こすメカニズムを明らかにする。

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)

[学会発表] (計 2 件)

① 横田 健一、大竹史明、加藤茂明
Functional analysis of a novel MR co-activator p120 国際内分泌学会 平成 22 年 3 月 29 日 京都

② 横田 健一、大竹史明、加藤茂明 ミネラルコルチコイド受容体 (MR) による未知臓器障害メカニズムの解析 日本内分泌学会学術総会 平成 21 年 4 月 25 日 群馬

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横田 健一 (YOKOTA KENICHI)
東京大学 分子細胞生物学研究所 特任
研究員
研究者番号 : 50424156

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号 :