

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860646

研究課題名(和文) 高血圧SNPをもつ新規MR結合因子Evi1の機能解析と高血圧発症予測における意義

研究課題名(英文) Functional Analysis of Novel MR Binding Factor Evi1 and Clinical Significance of its SNP in Prediction of Hypertension Onset

研究代表者

城 理絵 (Rie, Jo)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：30464861

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)：ミネラルコルチコイド受容体(MR)を介した高血圧発症の分子機序を解明するため、LC/MS-MS法を用いて新規MR相互作用因子の探索を行い、その中の候補因子Evi-1の解析を行った。Evi-1はヒストンメチル化活性を有するSETドメインを分子内に持ち、全長のEvi-1cはMR転写を抑制的に制御する一方、SETドメインを欠くもう一つのアイソフォームであるEvi-1aはdominant negativeとして作用し、両者の比率がMR転写活性を調節していることが示唆された。GWASにおいて高血圧発症との関係が示されているSNPタイプとこの発現比率の関係性については、今後の検討課題である。

研究成果の概要(英文)：Mineralocorticoid receptor (MR) is involved in the development of hypertension and its detailed molecular mechanism has been focused. Evi-1 was identified as a candidate for novel MR-interacting protein through LC-MS/MS screening method. Evi-1 has SET domain, which includes histone methylation activity, in the whole molecule "Evi-1c", but another isoform "Evi-1a", which lacks SET domain, is supposed to act as dominant negative for Evi-1c. This study elucidated that Evi-1c functions as corepressor of MR but co-expression of Evi-1a suppresses the activity of Evi-1c. The recent GWAS results revealed that a certain SNP of Evi-1 gene is associated with hypertension or chronic kidney disease. It remains to be investigated whether this SNP might determine the ratio of Evi-1c/Evi-1a, leading to the change of MR sensitivity.

研究分野：内分泌学

キーワード：ミネラルコルチコイド受容体 転写共役因子 GWAS解析 ヒストンメチル化修飾酵素 Evi-1

1. 研究開始当初の背景

近年、先進国成人人口の4人に1人までもが高血圧症に罹患していると報告され、高血圧症発症のメカニズムを解明することは、医学上最大の課題の一つとなっている。なかでも、RALES 研究 (Pitt et al.N.Eng.J.Med.;1999) や EPHEsus 研究 (Pitt et al.N.Eng.J.Med.;2003) を初めとする多くの大規模臨床研究の結果から、循環器系疾患の病態生理にミネラルコルチコイド受容体 (MR) の活性化が非常に重要な役割を担うことが明らかとなっており、MR 活性化を介した高血圧病態形成に高い注目が集まっているが、これまで MR の分子レベルでの作用機構はほとんど研究されておらず、未知のままであった。MR は核内受容体に属し、アルドステロン依存性に ENaC や SGK1 などの標的遺伝子の発現を促進し、腎遠位尿細管においてナトリウムの再吸収を通じ血圧を上昇させる転写制御因子である。転写の場においては、転写共役因子と呼ばれるさまざまな蛋白質が MR と結合し、ヒストン修飾などの酵素活性を発揮することで、転写を調節する中心的な役割を果たすことが知られている。しかしながら、MR に関する転写共役因子はいまだ報告が少なくほとんど未知のままであった。そこで本研究では、FLAG タグ付き MR 安定発現 HEK293 細胞を樹立し、その細胞から各抽出液を取得し、FLAG 抗体によるアフィニティ精製を行い、LC-MS/MS による同定を行うことで、MR の転写共役因子の網羅的同定を試みた。そして得られた複数の新規 MR 転写共役因子候補蛋白の中で、Evi-1 (別名 MECOM) に注目した。Evi-1 は、最近のゲノムワイドな疾患特異的 SNP の探索研究 (Genome-Wide Association Study: GWAS) の結果から、本態性高血圧症 (Ehret et al.Nature;2011、Newton-Cheh et al.Nature Genetics;2009) や腎機能障害 (Okada et al.Nature Genetics;2012) の発症に深く関与することが明らかとなり、MR との関連が示唆された。

2. 研究の目的

MR 転写共役因子候補 Evi-1 については、SET ドメインと呼ばれるヒストンメチル化酵素活性ドメインを有することから、MR 転写調節の場において、標的遺伝子プロモーター領域において何らかのヒストンメチル化修飾を行うことで、MR 標的遺伝子の発現を制御していると考えられる。そこで本研究では、Evi-1 の機能について、in vitro アッセイ系を用いて、Evi-1 を介した MR 転写調節のエピゲノム制御メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) MR と Evi-1 の相互作用の確認

HEK293 細胞において MR と Evi-1 を過剰発現させた条件下でアルドステロンを処置した後、細胞を回収し、両者の相互作用の有無を共免疫沈降法を用いて検討する。

(2) Evi-1 が MR 転写活性に及ぼす機能の検討

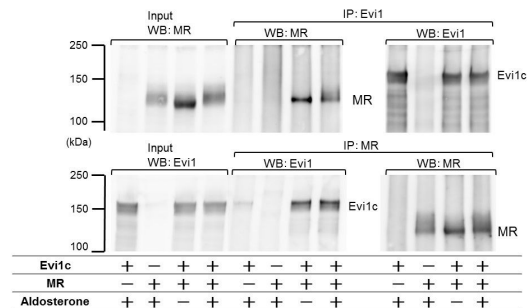
HEK293 細胞において Evi-1 発現ベクターをトランスフェクションし、MR 転写活性に及ぼす影響をルシフェラーゼアッセイで評価する。さらに、MR 標的遺伝子である ENaC、SGK1 などの遺伝子発現量のリアルタイム qPCR 法により評価する。反対に、siRNA もしくは shRNA を用いた RNAi により、内因性に発現している Evi-1 のノックダウンを行い、MR 転写活性に及ぼす影響を同様にルシフェラーゼアッセイやリアルタイム qPCR 法により確認する。

4. 研究成果

(1) MR と Evi-1 の相互作用の確認

共免疫沈降法により、MR と Evi-1 の結合を評価したところ、リガンド存在下・非依存下いずれにおいても特異的に結合していることが確認された (図 1)。

図1 Evi1cとMRの共免疫沈降

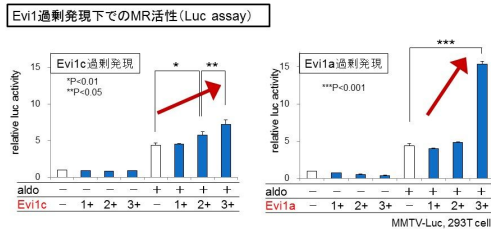


(2) Evi-1 が MR 転写活性に及ぼす機能の検討

Evi-1 はその分子内に、ヒストンメチル化修飾酵素活性を有する SET ドメインを持つため、MR 転写活性に対し、抑制的に作用することが予想された。Evi-1 発現ベクターを作製し、MR 転写活性に対する影響を、Luciferase を用いたレポーターアッセイおよび内因性 MR 標的遺伝子発現 (SGK1、ENaC) で確認したところ、予想に反して、MR 転写活性の増強を認めた。Evi-1 には、全長を有する Evi-1c と SET ドメインを欠く Evi-1a の 2 つのアイソフォームが存在し、Evi-1c 過剰発現下においては、Evi-1a も共に生成され、それが dominant negative として作用するため、Evi-1 本来の機能と正反対の方向に MR 転写活性を調節すると考えられた。

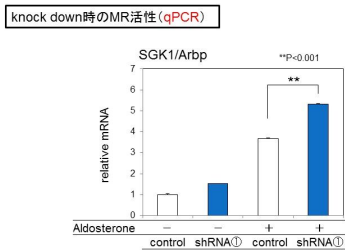
その結果、Evi-1c および Evi-1a いずれの過剰発現下においても、MR 転写活性の増強が見られたが、Evi-1a の過剰発現下の方がより強い増強活性が認められた (図 2)。

図2 Evi1a,cのMR活性に対する作用



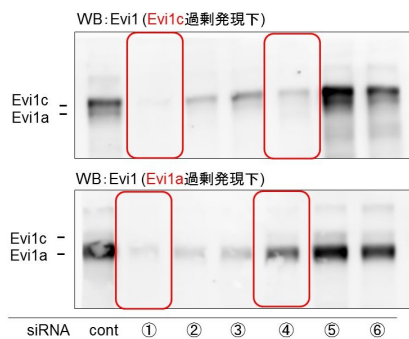
一方、Evi-1c を特異的にノックダウンする shRNA を作成し、その MR 転写活性に対する影響を確認したところ、内因性 MR 標的遺伝子発現の上昇がみられ、この結果からは、予想どおり Evi-1c は MR の抑制性転写共役因子 (コリプレッサー) であることが示唆された (図 3)。

図3 Evi1cのshRNAによるknock down



アイソフォーム別の MR 転写活性への影響を検討するために、6 種類の siRNA を作成し、それぞれのアイソフォーム別ノックダウン効率を比較したところ、siRNA は、Evi-1c と Evi-1a 双方を高い効率でノックダウンすることが確認され、また siRNA は、Evi-1c のみ高い効率でノックダウンし、Evi-1a のノックダウン効率は低いことが確認された (図 4)。

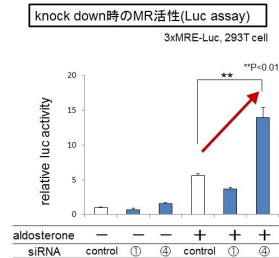
図4 Evi1 siRNAのアイソフォーム特異性



そこでこの siRNA と siRNA を用いて、MR 転写活性への影響を検討したところ、siRNA では、MR 転写活性の増強はみられなかったのに対し、siRNA では、MR 転写

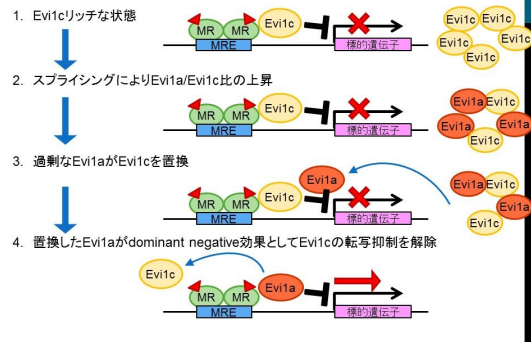
活性の増強がみられ、このことから Evi-1c は MR のコリプレッサーとして作用し、その一方で Evi-1a は dominant negative として作用し、Evi-1c の作用を打ち消していることが確認された (図 5)。

図5 siEvi1a, siEvi1c効率によるMR活性の比較



以上から MR 活性調節における Evi-1 の機能として、下記のようなモデルを想定している。Evi-1c リッチな状態では、Evi-1c は MR のコリプレッサーとして作用し、MR 転写を抑制している。何らかの理由でスプライシングが進み、Evi-1a/Evi-1c の発現比率が上昇すると、dominant negative に作用する Evi-1a の影響で、抑制されていた MR 転写が活性化される方向に転じる (図 6)。

図6 想定されるEvi1cのMR活性調節機能



Evi-1 の SNP タイプと Evi-1a/Evi-1c の発現比率との関連については、現在検討中であるが、Evi-1c の発現比率を上昇させる SNP タイプでは高血圧になりやすく、Evi-1a の発現比率を上昇させる SNP タイプでは、MR 感受性が亢進し、高血圧を呈しやすくなることが予測される。今後、さらなる検討により、Evi-1 の高血圧発症への関与を明らかにしていきたい。

また Evi-1 は、そのアイソフォームにより、MR 転写活性を負にも正にも調整する分子であり、新しいタイプの転写共役因子としても、その機能が注目される。高血圧発症との関連が疫学的に強く示唆されている SNP の部位が、スプライシング部位に重なっていることは非常に興味深く、さらなる検討により、転写共役因子による MR 活性調節の新しい機序についても明らかにしていきたい。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

中村 俊文、城 理絵、栗原 勲、小林
佐紀子、横田 健一、伊藤 裕、新規 MR
相互作用因子 Evi1 の MR 活性調節におけ
る意義、第 34 回内分泌代謝学サマーセミ
ナー、2016 年 7 月 15 日、久山温泉ホテル
夢家(福岡県久山町)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

城 理絵 (JO, Rie)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：30464861