

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461248

研究課題名(和文) Non-dipper型高血圧の発症における時計遺伝子の役割

研究課題名(英文) The role of clock genes in non-dipper hypertension

研究代表者

中島 歩 (Nakashima, Ayumu)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・特任助教

研究者番号：40448262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：経時的にサンプリングしたマウスの腎臓・大動脈・心臓におけるNa-K-ATPase 1のmRNAおよびタンパクレベルは、24時間の日内変動を認めた。DEC1ノックアウトマウスでは野生型マウスよりもNa-K-ATPase 1の発現量が上昇したが、CLOCKミュータントマウスでは、Na-K-ATPase 1の発現量が低下していた。また、テレメトリ自動血圧測定器を用いた血圧測定では、野生型マウスと比較して、DEC1ノックアウトマウスでは収縮期血圧および拡張期血圧が低下していた。逆に、CLOCKミュータントマウスでは、野生型と比較して、血圧が上昇し、血圧の日内変動が消失していた。

研究成果の概要(英文)：The Na-K-ATPase beta 1 (Atp1b1) mRNA and protein levels in mouse kidney, aorta and heart showed a circadian rhythm. Furthermore, Dec1-deficient mice showed enhanced Atp1b1 expression in these tissues and reduced blood pressure. In contrast, Clock-mutant mice showed reduced Atp1b1 expression and elevated blood pressure.

研究分野：腎臓内科

キーワード：時計遺伝子 血圧 DEC1 CLOCK 日内変動 Na-K-ATPase

## 1. 研究開始当初の背景

概日時計は全ての生物が持つ重要な機構であり、複数の時計遺伝子による分子時計系によって作られている。分子時計の促進因子である CLOCK/BMAL1 ヘテロ二重体は、PER, CRY, DEC1 などの時計遺伝子プロモーター上の転写調節領域 (E-box) に結合して転写を促進し、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。PER および CRY が分子時計の転写調節領域である E-box に直接結合できないのに対し、DEC1 は E-box に直接結合できる (Nakashima A, et al. Mol Cell Biol. 28: 4080-92, 2008)。そこで、DEC1 が直接制御している遺伝子を網羅的に選定するため、ヒト胚性腎臓細胞株で、抗 DEC1 抗体を用いて ChIP-on-chip assay を行ったところ、Na-K-ATPase 1 遺伝子のプロモーター領域に DEC1 タンパクが結合することを見出した。

Na-K-ATPase 1 は本態性高血圧症の主要な成因の一つであり (Nature 300: 650-2, 1982; Am J Hum Genet. 80: 253-64, 2007)、Na-K-ATPase 1 の発現量に 24 時間周期のリズム (サーカディアンリズム) を持つことが、血圧が日内変動をきたす原因の一つであると考えられる。

## 2. 研究の目的

時計遺伝子が分子時計の調節に働くだけでなく様々な役割を果たしていることが報告されている。我々は時計遺伝子 DEC1 が分子時計の転写調節領域 (E-box) に直接結合できるという自身の研究を応用して (Mol Cell Biol. 28: 4080-92, 2008) DEC1 が直接制御している遺伝子を網羅的に選定するため、Genome-wide chromatin immunoprecipitation (ChIP)-on-chip assay を行ったところ、Na-K-ATPase 1 遺伝子のプロモーター領域

に DEC1 タンパクが結合することを見出した。これまでの実験から、Na-K-ATPase 1 が時計遺伝子による制御を受けること、生体内における Na-K-ATPase 1 の発現レベルには 24 時間周期のリズムを有することを明らかにしており、時計遺伝子変異マウスを用いて時計遺伝子が Na-K-ATPase 1 を介して血圧のサーカディアンリズムを調節するメカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 生体内における Na-K-ATPase 1 の発現は時計遺伝子によって制御されていたが、DEC1 および CLOCK の Na-K-ATPase 1 を介した血圧への作用は十分には解明できていない。テレメトリー自動血圧測定器を用いて、野生型マウスおよび時計遺伝子変異マウスにおける自由行動下の血圧を測定し、Na-K-ATPase 1 の発現量が変化することによる血圧への影響を検討する。

(2) 現代の社会生活では日中に活動して夜間に就寝するリズムが乱れがちである。夜間に光刺激を受けると DEC1 が増加するため、血管平滑筋細胞における Na-K-ATPase 1 の発現が抑えられ、血管拡張が妨げられることが示唆される。この状態にナトリウムの過剰摂取が加わり non-dipper 型高血圧を発症することが考えられる。高ナトリウム含有食を与えた野生型マウスおよび DEC1 ノックアウトマウスへ夜間に光刺激を行い、non-dipper 型高血圧の発症に DEC1 がどのように関与しているか検討する。

## 4. 研究成果

これまでの研究から、Na-K-ATPase 1 は時計遺伝子によって直接的な制御を受けることを明らかにした。経時的にサンプリングしたマウスの腎臓・大動脈・心臓における Na-K-ATPase 1 の mRNA およびタンパクレ

ベルは、臓器間でほぼ同位相のサーカディアンリズムを示した。DEC1 ノックアウトマウスでは野生型マウスよりも Na-K-ATPase 1 の発現量が上昇したが、CLOCK ミュータントマウスでは、Na-K-ATPase 1 の発現量が低下し、さらにサーカディアンリズムも消失したことから、生体内における Na-K-ATPase 1 の発現レベルにはサーカディアンリズムを認め、Na-K-ATPase 1 の発現量は時計遺伝子によって直接的に調節されていることが確認された。また、テレメトリー自動血圧測定器を用いた血圧測定では、野生型マウスと比較して、DEC1 ノックアウトマウスでは収縮期血圧および拡張期血圧が低下していた。逆に、CLOCK ミュータントマウスでは、野生型と比較して、血圧が上昇し、血圧の日内変動が消失していた。DEC1 は光刺激や低酸素によって発現が上昇することが知られており、我々もヒト血管平滑筋細胞およびヒト近位尿管上皮細胞株(HK-2 cell)を用いて、通常酸素下と比較して、1%酸素下ではDEC1 の発現が10倍以上になり、Na-K-ATPase 1 の発現は約半分程度に減少していることを確認した。現在、低酸素状態でワイルドタイプマウスおよび時計遺伝子変異マウスを飼育し、血圧への変化を検討中である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

第 58 回 日本腎臓学会総会 会長賞講演

「時計遺伝子による Na/K-ATPase 1 を介した血圧日内変動の調節」

中島 歩

2015 年 6 月 5-7 日 名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

中島 歩 (NAKASHIMA AYUMU)

広島大学原爆放射線医科学研究所 特任助教

研究者番号: 40448262

##### (2)研究分担者

東 幸仁 (HIGASHI YUKIHITO)

広島大学原爆放射線医科学研究所 教授

研究者番号: 40346490

正木 崇生 (MASAKI TAKAO)

広島大学病院 教授

研究者番号: 30397913

河本 健 (KAWAMOTO TAKESHI )  
広島大学 社会産学連携室 特任教授  
研究者番号： 50224861