

令和 2 年 6 月 21 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08298

研究課題名(和文)血管形成における新規ALK1シグナル下流因子の分子生物学・生化学的解析

研究課題名(英文)A novel downstream target of ALK1 signaling pathway in angiogenesis

研究代表者

久光 隆 (Hisamitsu, Takashi)

昭和大学・教養部・講師

研究者番号：50327946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：胎生期の血管新生による血管網の構築には、様々なシグナル経路が適切に機能することが必須である。今回は、その様なシグナル経路の中のALK1シグナルに着目し、経路を構成する新たな因子SGK1を発見した。そして、SGK1がALK1シグナルの下流因子としてどのように発現制御されるのか検討し、転写活性を制御する重要な領域を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALK1遺伝子の変異は、難病に指定される遺伝性血管疾患のオスラー病の原因の一つとなる。ALK1シグナルは血管新生過程に必須であり、そのシグナル分子機構を解明することは遺伝性疾患のみならず癌や虚血性疾患の治療戦略の発見にもつながる可能性がある。今回、ALK1シグナルの構成因子を同定し、このことがALK1シグナルの分子機構解明の端緒になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Angiogenesis in the embryonic stage is strictly regulated by many kinds of signaling pathways. The ALK1 signaling pathway is one of the essential pathways in angiogenesis, and BMP9 is known as a ligand for the ALK1 receptor. In this study, we found Serum and glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1) to be a novel downstream target of the ALK1 signaling pathway, which is essential for angiogenesis. and identified a BMP9 responsive enhancer region for SGK1 expression.

研究分野：生化学

キーワード：血管新生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管は、発生初期の脈管形成とそれにつづく血管新生により血管網が構築される。Transforming Growth Factor β (TGF β)シグナルは、血管新生の初期過程に必須である。難病に指定される遺伝性血管疾患のオスラー病では、EndoglinおよびActivin receptor Like Kinase 1 (ALK1)遺伝子に変異が見られる。従って、血管新生に必須なALK1シグナルの分子機構を理解することは、この難病のみならず血管新生制御を介した疾病治療にもつながり重要である。

ALK1受容体は、内皮細胞特異的に発現し、BMP9が結合すると下流の転写因子SMAD1/5/9を直接リン酸化する。リン酸化SMADはSMAD4と複合体を形成し、核内でBMP応答配列へ結合することで遺伝子発現調節に関わる。ALK1ノックアウトマウスは血管新生の異常で胎生11.5日までに死亡する(Urness, *Nat Genet* 2000, Oh, *PNAS* 2000)。しかし、ALK1受容体の欠損がどのようにして血管形成不全に至るのか、生化学的な解析例は少なく、ALK1シグナル経路の分子機構は不明のままである。そのような中で申請者らは、ALK1/SMAD1/5/9経路を介して直接発現制御される遺伝子の候補としてマイクロアレイ解析によりSGK1を見出した。

SGK1(Serum and Glucocorticoid-inducible protein Kinase 1)は、AKT等と類似したAGCファミリーに属するSer/Thrタンパク質リン酸化酵素で、様々な刺激で転写活性化を受けることが特徴であり、SGK1遺伝子の上流配列から多数の転写因子結合が予測されている(Firestone, *Cell Physiol Biochem* 2003)。

SGK1は成体ではほぼ全ての組織に発現する(Waldegger, *PNAS* 1997)が、SGK1ノックアウトマウスの胎仔が死亡する胎生11.5日付近では血管、心内膜に特異的に発現する(Lee, *Mec Dev* 2001)。

SGK1ノックアウトマウスは、血管形成異常で胎生致死(Catela, *Dev Dyn* 2010)であり、SGK1が必須であることは明らかであるがリン酸化標的タンパク質を含め、どのような機構で血管新生に寄与するか不明である。例えばSGK1の既知の基質として知られる転写因子FoxO1のノックアウトマウスは、血管形成異常で胎生致死となり(Furuyama, *JBC* 2004)、実際に胎仔期でSGK1の下流にあるか興味深い。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ本研究は、(1)SGK1がALK1/SMAD経路の下流標的であることを確定し、(2)SGK1の胎生期特異的な内皮細胞発現機構を解明する。さらに、(3)胎仔期におけるSGK1のリン酸化標的の同定とその血管新生機構に及ぼす影響を解明することで、BMP/ALK1/SMAD/SGK1/SGK1リン酸化標的タンパク質が、どのような分子機構で血管新生に寄与するかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) レポータープラスミドの調製

ヒトSGK1およびその近傍のゲノム領域はBacterial Artificial Chromosome(細菌人工染色体)から得た。これを鋳型にPCR法により目的配列を増幅し、ルシフェラーゼレポーターアッセイ用またはLacZレポーターアッセイ用のベクターに挿入した。また、変異導入、DNA配列の確認およびレポータープラスミドの取得などは、基本的な遺伝子工学的手法により行った。

(2) 細胞培養

HUAEC(Human Umbilical Artery Endothelial Cells; ヒト臍帯動脈内皮細胞)を用いた。細胞の増殖、維持は提供元であるLonzaの手法に従った。また、培養内皮細胞MS1はDMEMを用いた一般的な条件で培養した。

(3) ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイ

レポータープラスミドは、エレクトロポレーション法によりHUAECに導入した。増殖期にあるHUAECを栄養飢餓培地(0.1%BSA, 0.1%ウシ胎仔血清)で16時間処置した後、細胞懸濁液の状態レポータープラスミドをエレクトロポレーション法により導入し、アッセイ用培養プレートに播種した。その4時間後にBMP9で刺激し、細胞を回収した。回収した細胞の可溶性画分を用いてルシフェラーゼ活性を発光で測定し、挿入配列のプロモーター活性の指標とした。

(4) LacZを用いたレポーターアッセイ(in vivoプロモーターアッセイ)

ヒトSGK1遺伝子近傍の配列にLacZ遺伝子をつないだレポータープラスミドを、マウス受精卵に導入し、仮親へ移植した。移植後、胎生9.5日に胎仔プロモーター活性があるかを、gal染色で検出し、遺伝子発現の体内分布を調べた。

(5) 免疫プロットによるタンパク質発現およびタンパク質リン酸化の検出

ALK1ノックアウトマウスの胎仔の遺伝子型はPCR法で検証し、その1個体の全身の可溶化

物をサンプルとした。その可溶化物のタンパク定量し、SDS-PAGE、免疫プロットをおこなった。サンプルのローディング対照として アクチンの発現量を指標とした。また、BMP9 刺激した HUAEC をサンプルとし、SDS-PAGE、免疫プロットにより SGK1 の発現を検討した。

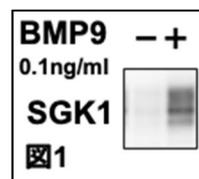
(6) ChIP (クロマチン免疫沈降) -PCR 解析

BMP9 刺激した HUAEC をサンプルとして用いた。常法に従いサンプルを調製し、抗リン酸化 Smad1/5/9 抗体を用いて免疫沈降を行った。沈降物に標的ゲノム領域が存在するか、その配列を PCR 法により検出した。

4. 研究成果

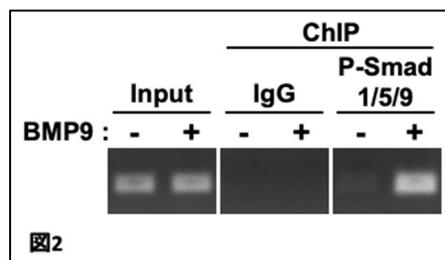
本研究は、BMP9/ALK1/SMAD シグナル下流の新規標的遺伝子として SGK1 を同定することにつながった。ALK1 のノックアウトマウスのはも接合体は、血管新生不全により胎生致死となるが、詳細は不明である。今回の発見は、血管新生に必須の ALK1 シグナル経路を構成する因子として SGK1 が加わり、その分子機構解明の端緒になるかもしれない。また、BMP9 応答性の SGK1 の発現亢進には、Smad1/5/9 以外の転写因子の関与可能性も浮上してきた。SGK1 ノックアウトマウスも胎生致死となるが、SGK1 は発生途中のその時期にリン酸化酵素として何らかの基質のリン酸化を介して重要な役割を持つことが考えられるが、その時の SGK1 の下流ターゲットを含め、役割は不明である。興味深いことに予備試験のマイクロアレイの結果から、SGK1 以外に BMP/ALK1/SMAD の直接の下流標的と考えられる他の AGC ファミリーメンバーは見出せなかった。ファミリーメンバーの一つである AKT は血管新生に寄与することが知られるが、このことは血管新生に寄与する AKT とは重複しない SGK1 特異的な新規ターゲットが存在する可能性を示している。今後は、胎生致死に至る直前の SGK1 のリン酸化標的を同定し、ALK1 シグナルの下流因子としての SGK1 の血管新生における分子メカニズムを解明することが人為的な血管新生制御方法の可能性を広げ、遺伝性血管疾患、癌および虚血性疾患の治療戦略に有益な情報を与えると期待される。

(1) HUAEC を BMP9 刺激すると SGK1 遺伝子が上昇することをアレイ解析により突き止めていたが、実際に SGK1 タンパク質の発現が上昇するか不明であった。そこで、アレイ解析と同様の条件で HUAEC を刺激し、抗 SGK1 抗体による免疫プロットを行った。その結果、SGK1 の発現は BMP9 刺激がある場合に、無刺激に対して著しい上昇を示した(図1)。このことにより、BMP9 刺激は SGK1 mRNA のみならずタンパク質レベルにおいても発現を亢進させることが明らかとなった。

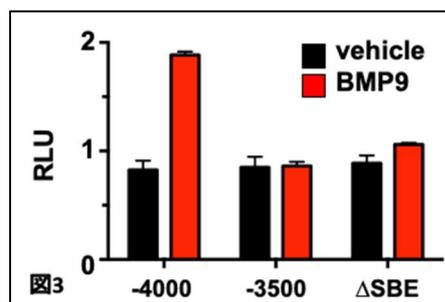


(2) BMP9 は ALK1 受容体のリガンドであり、BMP9 が ALK1 に結合すると下流の転写因子 Smad1/5/9 をリン酸化し、活性化することが知られている。その活性化は更に下流のターゲット遺伝子の発現を調節する。そこで、HUAEC における BMP9 刺激による SGK1 の発現亢進が、ALK1 受容体を介するか検討した。その結果、BMP9 は濃度依存的に Smad1/5/9 のリン酸化を上昇させた。一方、BMP9 刺激による Smad1/5/9 のリン酸化程度の上昇は、BMP9 のファミリーである TGF の刺激では起こらなかった。これらのことは、BMP9 刺激による SGK1 の発現亢進が ALK1 受容体を介することを示唆している。

(3) 転写因子の Smad は、ゲノム上のモチーフ配列を認識しターゲット遺伝子の発現を調節する。そこで、ヒト SGK1 遺伝子の近傍に Smad1/5/9 のモチーフ配列が存在するか、ゲノム情報を調べたところ、転写開始点の約 3500bp 上流に GGCGGC モチーフを見いだした。この配列にリン酸化 Smad1/5/9 が結合するか、BMP9 刺激した HUAEC を用いて ChIP PCR 解析を行った。その結果、抗リン酸化 Smad1/5/9 抗体との免疫沈降物には、推定したモチーフ配列を含む領域が含まれていることが明らかとなった(図2)。このことは、BMP9 刺激により活性化した Smad1/5/9 が推定したモチーフ配列への結合を介して、SGK1 の発現を制御する可能性を示している。

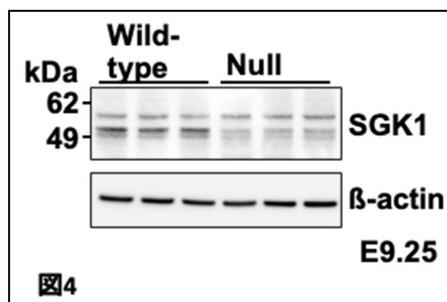


(4) ChIP 解析により明らかとなった Smad1/5/9 結合配列が、細胞の中で BMP9 応答性を持つかどうか、ルシフェラーゼを用いたレポーター解析を行った。まず、SGK1 の転写開始点から上流の 4000bp をルシフェラーゼレポータープラスミドに挿入したものを HUAEC に導入して BMP9 の効果を検討した。その結果、BMP9 刺激がない場合に比べて約 3 倍のレポーター活性の上昇が認められた(図3)。この活性の上昇は、Smad1/5/9 結合モチーフ配列を含む前後 500bp を除いたレポーター (-3500) および Smad1/5/9 結合モチーフのみを欠失させたレポーター (SBE) のいずれでも抑制された(図3)。更に、Smad1/5/9 モチーフ配列を含む



前後 400bp ずつの領域は、この活性化に十分であった。これらのことは、SGK1 の上流 3500bp の Smad1/5/9 結合モチーフが BMP9 応答性に重要であることを示唆している。

(5) 個体レベルで SGK1 の発現が BMP9/ALK1 シグナルで制御されるか、ALK1 のノックアウトマウスを用いて SGK1 のタンパク質発現量を調べた。ALK1 ノックアウトマウスのホモ接合体は胎生致死となるので、胎仔 (E9.25) を免疫ブロッティング解析に用いた。異腹の野生型およびノックアウトホモ接合体の胎仔 3 匹ずつを比較した結果、全てのノックアウト胎仔において Sgk1 タンパク質の発現は減少していた (図 4)。この結果は、実際に *in vivo* において ALK1 シグナルの下流で Sgk1 の発現が制御されることを示唆している。



(6) 個体レベルで、(3) で検討した SGK1 遺伝子の転写開始点上流の 4000bp がプロモーター活性を持つか、トランスジェニックマウス胎仔の LacZ レポーター解析を行った。内皮細胞特異的な発現が確認されている ALK1 の LacZ ノックインマウスと比較したところ、似た組織発現を示した。しかし、複数のトランスジェニックマウスの解析を行ったところ、ALK1 ノックインマウスと似た内皮細胞発現を示すマウスは LacZ 陽性胎仔のうち 63% であった。Smad1/5/9 モチーフを欠失した場合には、25% であった。これらの結果は、今回着目している転写開始点の約 3500bp 上流の Smad1/5/9 モチーフ領域が BMP9 応答性に十分ではない可能性を示している。

(7) 胎仔期の SGK1 の発現制御に、Smad1/5/9 に加えて他の転写因子が関与する可能性を確かめるために、SGK1 転写開始点の約 3500bp 上流の Smad1/5/9 モチーフ領域近傍の配列を調べたところ、内皮細胞に特異的に発現するある転写因子の結合モチーフがごく近傍あることが判明した。この領域が、BMP9 応答性に影響するか、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。その結果、プロモーター活性は著しく減少した。この結果は、メカニズムは不明であるが、BMP9 に応答して Smad1/5/9 と相互に SGK1 の発現を制御する可能性を示している。

(8) SGK1 の胎生期のリン酸化標的は不明であるが、SGK1 の基質として基底のタンパク質のリン酸化を、ALK1 ノックアウトマウスを用いて、免疫プロットで検討した。FoxO1、および NDRG1 の抗リン酸化抗体を用いて調べたところ、野生型とリン酸化程度に差はなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Araki M, Hisamitsu T, Kinugasa-Katayama Y, Tanaka T, Harada Y, Nakao S, Hanada S, Ishii S, Fujita M, Kawamura T, Saito Y, Nishiyama K, Watanabe Y, Nakagawa O	4. 巻 21
2. 論文標題 Serum/glucocorticoid-regulated kinase 1 as a novel transcriptional target of bone morphogenetic protein-ALK1 receptor signaling in vascular endothelial cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Angiogenesis	6. 最初と最後の頁 415-423
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10456-018-9605-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Mutsumi ARAKI, Yusuke WATANABE, Takashi HISAMITSU, Yumi KINUGASA-KATAYAMA, Toru TANAKA, Yukihiro HARADA, Teruhisa KAWAMURA, Osamu NAKAGAWA
2. 発表標題 Serum/glucocorticoid regulated kinase 1 as a novel transcriptional target of bone morphogenetic protein-ALK1 signaling in vascular endothelial cells
3. 学会等名 The 8th TAKAO International Symposium on Molecular Mechanism of Cardiopulmonary Disease (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 荒木睦、渡邊裕介、久光隆、田中亨、原田恭弘、片山由美、川村晃久、中川修
2. 発表標題 BMP-ALK1シグナル伝達系の新しい下流遺伝子としてのSerum/glucocorticoid regulated kinase 1 (SGK1) の意義
3. 学会等名 第25回日本血管生物学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 片山由美、富松彩佳、渡邊裕介、久光隆、瀬谷大貴、荒井勇二、磯本祥恵、斎藤義彦、中川修
2. 発表標題 胎生期血管内皮遺伝子Tmem100の心血管形成における発現制御機構
3. 学会等名 第25回日本血管生物学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 片山由美、富松彩佳、渡邊裕介、久光隆、荒井勇二、磯本祥恵、斎藤義彦、中川修
2. 発表標題 胎生期血管内皮遺伝子Tmem100の心血管形態形成における発現制御機構の解析
3. 学会等名 "ConBI02017 (2017年度生命科学系学会合同年次大会)"
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Osamu NAKAGAWA, Yusuke WATANABE, Yumi KINUGASA-KATAYAMA, Yukihiro HARADA, Toru TANAKA, Takashi HISAMITSU, Ayaka TOMIMTSU, Koichi NISHIYAMA, Teruhisa KAWAMURA, Yoshihiko SAITO
2. 発表標題 Transcriptional regulation and physiological significance of novel downstream target genes of BMP-ALK1 signaling in embryonic vascular endothelial cells
3. 学会等名 Weinsein Cardiovascular Development and Regeneration Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中川 修、原田恭弘、田中 亨、久光 隆、片山由美、川村晃久、渡邊裕介
2. 発表標題 BMP-ALK1シグナル伝達の新しい下流遺伝子としてのSerum/glucocorticoid regulated kinase 1 (SGK1)の意義
3. 学会等名 第22回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔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
研究分担者	渡邊 裕介 (Watanabe Yusuke) (20562333)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長 (84404)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	中川 修 (Nakagawa Osamu) (40283593)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長 (84404)	