

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09734

研究課題名（和文）MR感受性高血圧の分子メカニズムにおける新規転写共役因子C14orf43の役割

研究課題名（英文）Role of novel transcription cofactor C14orf43 in the molecular mechanism of MR-sensitive hypertension

研究代表者

横田 健一（YOKOTA, Kenichi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：50424156

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ミネラルコルチコイド受容体活性化機構解明のため、生化学的手法とLC-MS/MSを用いたMR相互作用因子の探索で新規転写共役因子であるC14orf43を同定した。C14orf43はMRの新規co-repressorであり、ヒストン脱アセチル化やユビキチン化、DNAメチル化などを介してMRの転写を負に制御していると考えられた。またゲノム編集技術を用いてC14orf43ノックアウトマウスの作成にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MRは核内受容体に属する蛋白であり、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機能を持つ。しかしながら、MR活性化に関わる分子メカニズムは未だ詳細が不明のままである。本研究でC14orf43が高血圧などの病態においてアルドステロン作用増強に寄与している可能性が示唆される。またC14orf43の全身ノックアウトの機能解析を行うことで何等かの表現型が得られ、この表現型が未だ原因不明である既報の疾患の表現型と酷似していた場合新規のコファクター病の報告となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In order to elucidate the mechanism of mineralocorticoid receptor activation, we identified a novel transcription cofactor, C14orf43, by a biochemical approach with LC-MS/MS analysis. C14orf43 is a novel co-repressor of MR, and it is considered that C14orf43 negatively regulates MR transcription through histone deacetylation, ubiquitination, DNA methylation, etc. We also succeeded in creating a C14orf43 knockout mouse using genome editing technology.

研究分野：内分泌学

キーワード：アルドステロン MR ミネラルコルチコイド受容体

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ているが、高血圧症発症のメカニズムは十分に解明されていない。一方、RALES (Pitt et al.:N.Eng.J.Med.;1999) や EPHESSUS (Pitt et al.:N.Eng.J.Med.;2003) などの臨床研究の結果から、ミネラルコルチコイド受容体 (MR) の活性化が高血圧や心血管に及ぼす臓器障害が注目を集めている。さらに近年、糖尿病や肥満、慢性腎臓病などに合併する治療抵抗性高血圧の患者の一部で、高アルドステロン血症を呈さないにも関わらず MR 拮抗薬の併用により血圧のコントロールが得られる症例が存在することから、何等かの MR の病的活性化機構の存在が示唆され、我々はこのような病態を「MR 関連高血圧」という新規概念で提唱している (Shibata et al.:Am.J.Hypertens.;2012)。その分子メカニズムとしては、MR のアルドステロンに対する感受性の亢進が示唆されるがその詳細な分子機構は未知のままである。

MR は核内受容体に属する蛋白であり、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核内受容体と結合し、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、その細胞から核抽出液を取得し、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。その結果、同定された複数の蛋白質のうち、12 ペプチド断片という高い信頼精度で C14orf43 という機能未知因子が MR 相互作用因子候補として同定できた。C14orf43 は ELM2 ドメインや SANT ドメインなどのエピゲノム制御関連のドメインを有する約 120kDa ほどの蛋白質であり、MR の転写共役因子として機能していることが推測されたが、生体での C14orf43 の機能については、これまで一切報告がない。

2. 研究の目的

新規 MR 転写共役因子 C14orf43 について、MR による転写活性化に及ぼす影響を解析する。そして C14orf43 ノックアウトマウスを世界で初めて作成し、血圧や各種生化学、ホルモン値を解析し、MR の標的臓器である心臓、腎臓、血管などを中心とした表現型解析を行うことで、高血圧発症における新規分子メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1)C14orf43 が MR 転写活性化に及ぼす機能を解析するために、MR 安定発現 HEK293 細胞を樹立し siRNA をトランスフェクションした後、アルドステロンを処置した。3 時間後細胞を回収し mRNA を抽出したのち、逆転写反応を行い得られた cDNA において MR の標的遺伝子 SGK1 の発現量を RT-PCR 法にて定量した。

(2)C14orf43 と MR の相互作用を検討するために、HEK293 細胞において MR と C14orf43 の発現ベクターをトランスフェクションし、蛋白を強制発現させたのちリガンド処置を行った。これらの細胞を回収し、共免疫沈降法を行った。

(3)C14orf43 の MR 転写抑制機能をさらに詳細に検討するために、C14orf43 と相互作用する蛋白質の網羅的同定を、FLAG-C14orf43 安定発現細胞株の樹立 大量培養 FLAG 抗体による精製 LS-MS/MS を用いた同様の方法で試みた。

(4)ゲノム編集技術を用いて C14orf43 のノックアウトマウスの作出を試み、作出されたマウスにつきその機能解析を行った。

4. 研究成果

(1)C14orf43 の siRNA はコントロール siRNA と比較して MR の標的遺伝子 SGK1 の発現を上昇させた。(図 1)

(2)共免疫沈降法の結果、HEK293 細胞において MR と C14orf43 はリガンド依存性に相互作用することが判明した(図 2)。

(1)および(2)の結果から、C14orf43 は MR の新規の転写抑制因子であることが示唆された。ところが、C14orf43 のドメイン構造を解析すると、転写を直接制御するドメインを有さないことが判明した。このことから C14orf43 が MR 転写抑制能を発揮する際には、何らかの転写抑制能を有する蛋白質と複合体を形成していることが示唆された。

図 1 C14orf43 の RNAi による MR 標的遺伝子への影響 (RT-PCR)

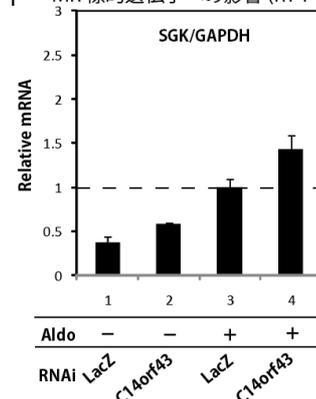
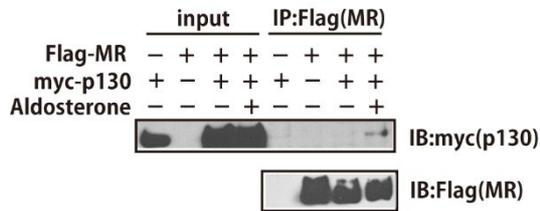


図 2



(3)そこで C14orf43 と相互作用する蛋白質を、生化学的手法を用いて網羅的に精製し、得られたサンプルを SDS-PAGE にて展開後、銀染色を行った。その結果を図 3 に示す。この結果、多数の蛋白質が C14orf43 と結合していることが判明したため、これらのバンドを切り出し、LS-MS/MS で蛋白質の同定を行った。その結果を表 1 に示す。C14orf43 の相互作用因子として HDAC1 や HDAC2、RPD3、SEN3、TdlF1、CHD4、RBBP4、MTA2、MBD4 などのエピゲノム制御因子蛋白質を同定できた。以上の結果から C14orf43 がヒストン脱アセチル化やユビキチン化、DNA メチル化などを介して MR の転写を負に制御している可能性が示唆された。

図 3

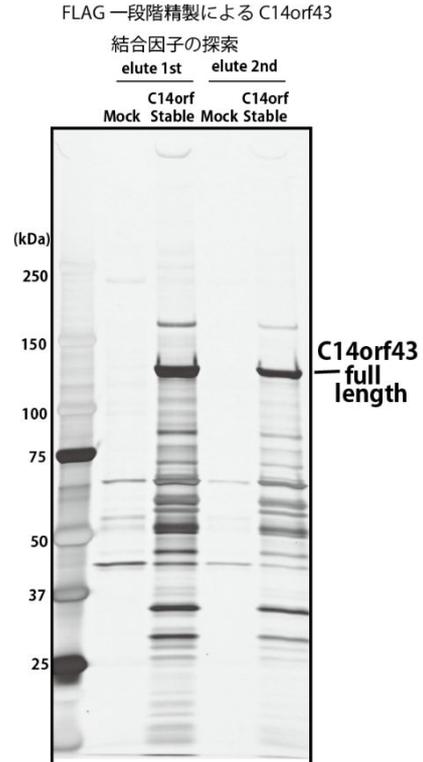
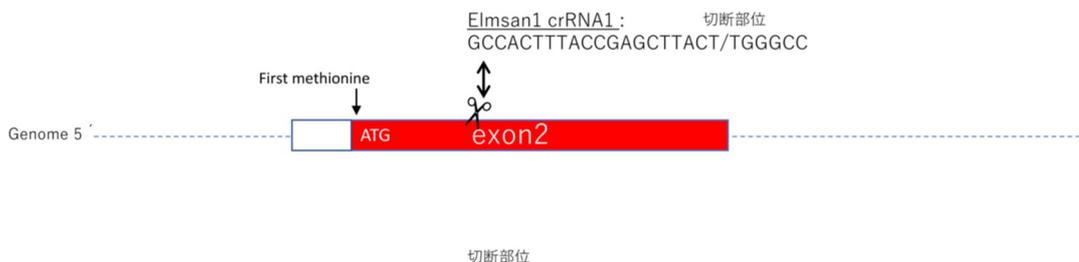


表 1

Accession	Score	Coverage	Peptide	MW	Description	Information
118600725	703.16	49.37	39	112.6		beit
1665723	518.52	39.83	16	55.0	RPD3 protein(HDAC1)	HDAC
119568638	487.48	43.67	16	52.0	histone deacetylase 2, isoform CRA_a	HDAC
26400504	150.85	50.76	14	37.0	Deoxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein 1	negativeTdT regulator
239787844	100.10	32.86	20	103.8	testis-expressed sequence 10 protein isoform 2	MLL1_MOF complex
115502553	71.92	19.73	15	119.6	PELP1	NR cofactor
119625807	52.06	26.64	13	81.2	LAS1-like (S. cerevisiae), isoform CRA_b	MLL1_MOF complex
194385276	50.20	21.28	14	109.7	UTX	H3K27 demethylase
119370525	49.50	29.27	11	65.0	SUMO-1-specific protease 3	
197692395	38.02	30.04	9	50.2	RuvB-like 1	MLL1_MOF complex
28201890	36.54	34.77	11	51.1	RuvB-like 2	HDAC complex
3025445	30.58	23.67	7	47.3	WDR18	
11513329	24.51	20.54	5	37.9	Chain O, Insights Into Scf Ubiquitin Ligases From The Structure Of The Skp1-Skp2	Ubiquitin ligase
193785938	23.90	3.45	5	215.1	CHD4	remodeler
4760291	21.48	1.28	1	177.5	dJ597B2.1 (transcription factor 20 (AR1, KIAA0292))	coactivator
190016329	18.26	24.88	5	46.5	RBBP4	HDAC complex
12001954	11.57	4.77	1	43.0	EPM2A1P1	
23342591	11.49	7.35	3	85.3	unnamed protein product	
119593011	10.70	4.56	2	75.8	tripartite motif-containing 28, isoform CRA_a	BROMO PHD

(4) これら vitro の結果から、C14orf43 は HDAC などエピゲノム制御因子と複合体を形成し、MR の転写を負に制御する転写抑制因子であることが強く示唆されたため、個体での機能解析を行うべくノックアウトマウスの作出を行うこととした。相同組み換えを起こした ES 細胞によるアグリゲーションからキメラマウスの作出を目指したが、誕生したキメラマウス 2 匹のうち、キメラ率が低いオス個体では、野生型マウスとの交配で出生するマウスが全て野生型マウスであり、このキメラマウスからのノックアウトマウスの作出は困難であった。また、キメラ率が高いキメラマウスのオス個体では、野生型メスとの交配で不妊を呈した。そこで、オスキメラマウスの精巣上体から精子を取得する体外受精を試みたが、開腹したところオスキメラマウスの精巣上体がないことが判明し、本個体からもヘテロマウスの作出が不可能であることが判明した。以上の結果から、得られた ES 細胞の質の低下が考えられた。そこで次に別のアプローチからのノックアウトマウス作出を試みることにした。すなわち、C57BL/6 マウスの受精卵に CAS9 蛋白、crRNA、tracrRNA を導入することにより、C14orf43 の exon2 のゲノム DNA 切断場所に indels を挿入し、遺伝子機能が失われることによりノックアウトマウスを作出する方法である (図 4)。

図 4



crRNA1 を設計し、マウス受精卵に遺伝子を導入し、この受精卵をメスマウスの子宮に移植したところ 2 匹のオスマウスが誕生した。このマウスの tail から DNA を抽出し、ダイレクトシーク

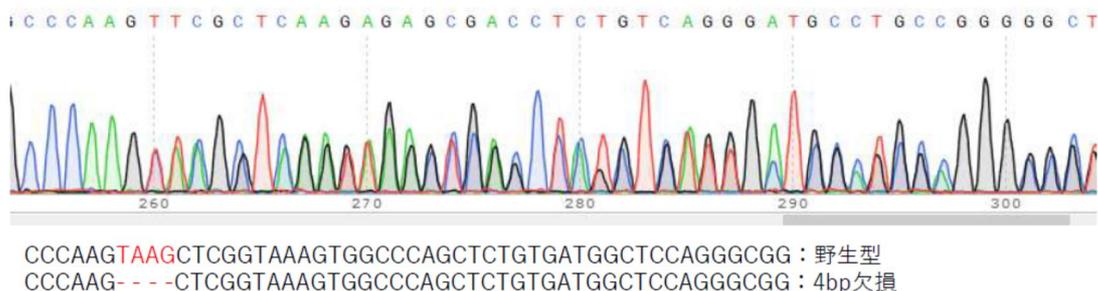
エンシングを行ったところ、1bp 挿入配列、4bp 欠損配列、9bp (4+5) 欠損配列を含むモザイクを同定した (図 5)。

図 5



そのため、この個体を野生型のメスマウスと交配し、同様に tail から DNA を抽出し、ダイレク トシークエンシングを行ったところ、誕生したマウスは様々な欠損、挿入配列をヘテロに有する 個体であることが証明され、すなわちヘテロノックアウトマウスの作出に成功した (図 6)。

図 6



ヘテロノックアウトマウスは成長や発達、血圧、摂餌量などにおいて野生型のマウスと相違を 認めなかった。そのため現在ヘテロノックアウトマウス同士を交配させ、ホモノックアウトマ ウスの作出をおこなっている。

本研究において我々はC14orf43がリガンド依存性にMRと結合し、HDACなどのエピゲノム制御因 子とも複合体を形成し、MR転写を負に制御する新規MR転写抑制因子であることを証明した。ま たゲノム編集技術を用いてC14orf43ノックアウトマウスの作出にも成功した。今後ホモノック アウトにおいて妊娠能力、体格、体長の変化、内分泌系や血圧などを含む系統的な解析を行 い、C14orf43の個体におけるMR活性化、血圧調節に関わる機能を解明することができれば高血 圧診療における新規治療ターゲットを解明することにもつながると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakamura Toshifumi, Kurihara Isao, Kobayashi Sakiko, Yokota Kenichi, Murai Takeda Ayano, Mitsuishi Yuko, Morisaki Mitsuha, Kohata Nao, Oshima Yosuke, Minami Yukiko, Shibata Hirotaka, Itoh Hiroshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Intestinal Mineralocorticoid Receptor Contributes to Epithelial Sodium Channel-Mediated Intestinal Sodium Absorption and Blood Pressure Regulation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.117.008259	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Takeshi, Shibata Hirotaka, Kurihara Isao, Yokota Kenichi, Mitsuishi Yuko, Ohashi Kennosuke, Murai-Takeda Ayano, Jo Rie, Ohyama Takako, Sakamoto Masaya, Tojo Katsuyoshi, Tajima Naoko, Utsunomiya Kazunori, Itoh Hiroshi	4. 巻 58
2. 論文標題 High Glucose Stimulates Mineralocorticoid Receptor Transcriptional Activity Through the Protein Kinase C Signaling	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int Heart J	6. 最初と最後の頁 794 ~ 802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1536/ihj.16-649	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mitsuishi Yuko, Shibata Hirotaka, Kurihara Isao, Kobayashi Sakiko, Yokota Kenichi, Murai-Takeda Ayano, Hayashi Takeshi, Jo Rie, Nakamura Toshifumi, Morisaki Mitsuha, Itoh Hiroshi	4. 巻 473
2. 論文標題 Epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinase pathway enhances mineralocorticoid receptor transcriptional activity through protein stabilization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 89 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.01.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Motoko Nomura, Isao Kurihara, Sakiko Kobayashi, Kenichi Yokota, Hiroshi Itoh
2. 発表標題 Comparison of the Efficacy of Laparoscopic Partial Adrenalectomy and Total Adrenalectomy in the Surgical Treatment of Primary Aldosteronism -Emerging Usefulness of Segmental Adrenal Venous Sampling
3. 学会等名 International Aldosterone Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Motoko Nomura, Sakiko Kobayashi, Isao Kurihara, Kazutoshi Miyashita, Kenichi Yokota, Hiroshi Itoh
2. 発表標題 Usefulness of Dexamethasone Suppression Test in the Diagnosis of Primary Aldosterone Subtypes
3. 学会等名 International Aldosterone Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naohiro Kohata, Isao Kurihara, Sakiko Kobayashi, Kenichi Yokota, Hiroshi Itoh
2. 発表標題 Adrenal Cysts with High Aldosterone Levels in Cystic Fluid: A Clinicopathological Study of 5 Adrenal Cyst Cases Using CYP11B2 immunohistochemistry
3. 学会等名 International Aldosterone Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 齋藤洸平 横田健一	4. 発行年 2018年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 104
3. 書名 成人病と生活習慣病	

〔産業財産権〕

〔その他〕

副腎内分泌グループ
<http://keio-emn.jp/research/group5/>
副腎内分泌
keio-emn.jp/research/group5/

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
--	---------------------------	-----------------------	----