

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790814

研究課題名（和文） 血圧と Na-K-ATPase の日内変動：時計遺伝子による制御

研究課題名（英文） Clock genes regulate circadian variation of blood pressure via Na-K-ATPase

研究代表者

中島 歩 (NAKASHIMA AYUMU)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40448262

研究成果の概要（和文）：

抗 DEC1 抗体を用いた ChIP-on-chip の結果から、Na-K-ATPase 遺伝子のプロモーター領域に DEC1 タンパクが結合する領域があることが示唆された。Luciferase assay および ChIP assay を用いて、この配列の転写活性が分子時計の促進因子である CLOCK/BMAL1 で上昇し、抑制因子である CRY, DEC1 で抑制することを確認した。マウスの腎臓および大動脈において、Na-K-ATPase の mRNA および protein レベルは概日リズムを有し、DEC1 knockout mice では発現量の上昇を認めた。また、DEC1 knockout mice は Wild type mice と比較して血圧の低下を認めた。一方、CLOCK mutant mice では Na-K-ATPase の発現量が低下しており、wild type mouse と比較して血圧は上昇していた。以上より、血圧の日内変動が、Na-K-ATPase を介して時計遺伝子によって調節されていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To identify target genes of DEC1, we utilized genome-wide chromatin immunoprecipitation (ChIP)-on-chip assay and found that DEC1 bound to the regulatory region of one of Na/K-ATPase genes. ChIP and luciferase reporter assays revealed that an E-box on the Na/K-ATPase gene promoter is a functional element governed by clock components. Since Na/K-ATPases are involved in the blood pressure regulation, we focused on a functional role of DEC1 in homeostasis and circadian regulation of blood pressure. In both kidney and aorta, robust circadian rhythms of the Na/K-ATPase expression were observed at mRNA and protein levels. DEC1^{-/-} mice showed higher expression of Na/K-ATPase than wild type mice. In addition, DEC1^{-/-} mice showed lower blood pressure than wild-type mice. In contrast, CLOCK mutant mice showed a lower expression level of Na/K-ATPase and higher blood pressure. We conclude that DEC1 regulates circadian variation of blood pressure via Na/K-ATPase gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：内科系臨床医学・腎臓内科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓、尿細管、血管、血圧、時計遺伝子、Na-K-ATPase

1. 研究開始当初の背景

地球上で生きていくためには自転の周期である 24 時間のリズムに従う必要がある。概日時計は全ての生物が持つ重要な機構であり、時計遺伝子を中心とした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, Dec などの時計遺伝子プロモーター上の 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分子時計系の仕組みである。

DEC1 は主要な時計遺伝子の一つであり (Honma S, et al. Nature. 419: 841-4, 2002)、PER や CRY が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て、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、時計遺伝子が直接制御している遺伝子 (時計関連遺伝子) を網羅的に選定できないかと考え、抗 DEC1 抗体を用いて ChIP-on-chip を行ったところ、Na-K-ATPase 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。

2. 研究の目的

腎臓はエネルギー代謝が盛んな臓器であるが、腎臓で生成される ATP の 90% 以上は $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ が消費している。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ は、尿細管細胞から毛細管 (血液内) へナトリウムを移動させ、尿細管細胞のナトリウムを低濃度に保ち、細胞内へのナトリウムの受動的な流入をもたらすのに好都合な電気化学的勾配を作っている。さらに、

Na-K-ATPase は本態性高血圧症の主要な成因の一つであることが示されており (DeFronzo RA, et al. Diabetes Care. 14: 173-94, 1991、Chang YP, et al. Am J Hum Genet. 80: 253-64, 2007)、Na-K-ATPase の発現量に 24 時間の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はないかと考えられた。

本研究では、Na-K-ATPase が時計遺伝子によって直接的に制御されることを明らかにするとともに、時計遺伝子変異マウスを用いて、時計遺伝子変異した際の Na-K-ATPase の発現量の変化について検討する。さらに、時計遺伝子の変異マウスを用いて、血圧の日内変動が時計遺伝子によって調節されているか検討する。

3. 研究の方法

① Na-K-ATPase 遺伝子上流のプロモーター配列に、複数の種族間で保存された E-box が 2 ヶ所存在した。これらの E-box が時計エレメントとして機能しているか luciferase assay を用いて検討した。

② Na-K-ATPase 遺伝子の遺伝子上流のプロモーター配列にある E-box を含むプライマーを作成し、抗 DEC1 抗体および抗 CLOCK 抗体を用いた ChIP assay を行い、これらの E-box を含む領域に DEC1 が結合することを生理的な条件で検討した。

③ Wild type mice および DEC1 knockout mice, CLOCK mutant mice における Na-K-ATPase の経時的な発現量の変化を比較する。

④ Wild type mice および DEC1 knockout mice, Clock mutant mice の 24 時間血圧を測定し比

較する。

4. 研究成果

① Na-K-ATPase 遺伝子上流の二箇所の E-box の転写活性を Luciferase assay を用いて検討したところ、CLOCK+BMAL1 で 7-11 倍上昇した。CLOCK+BMAL1 で上昇した転写活性は DEC1 または CRY1 によってほぼ完全に抑制された。

② Na-K-ATPase の E-box-1 および E-box-2 に対する DEC1 および CLOCK の結合を Chip assay で検討したところ、DEC1 および CLOCK は、Na-K-ATPase promoter 領域の E-box-1 および E-box-2 領域に直接結合した。これらの知見と一致して、ヒト大動脈平滑筋細胞に Dec1 アデノウイルスを感染させると、MOI に依存して Na-K-ATPase の mRNA レベルは低下した。

③ マウスの大動脈・心臓および腎臓で、Na-K-ATPase の発現レベルは夕方ピークとする概日リズムを示した。DEC1 knockout mice でも同位相の概日リズムを示したが、Wild type mice と比較して、昼間の Na-K-ATPase の発現が有意に高値となった。一方、CLOCK mutant mice では、Na-K-ATPase の発現上昇が抑えられ概日リズムが消失した。

④ マウスの 24 時間の血圧は夜間にピークとなり昼間に最低値となる概日リズムを示した。DEC1 knockout mice でも同位相のリズム形成は保たれていたが、昼間の血圧が大きく低下した。一方、CLOCK mutant mice では、以前の報告と一致して、夜間の血圧が高いままとなり、血圧の概日リズムが消失した。

診察時血圧と比較して 24 時間血圧計で測定した血圧は、心血管死亡とより密接に相関しており、夜間に血圧下降が十分でない non-dipper 型の血圧サーカディアンリズム障害では、正常 dipper と比較して心血管イベントおよび心血管死亡リスクが高い。本研究によって、時計遺伝子が Na-K-ATPase を介して血圧の日内変動を調節している仕組みの一部を解明できた。本研究で得られた知見を発展させ、血圧サーカディアンリズム障害における治療法・予防法を分子時計系の視点から提唱したい。

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 2 件)

1. 中島歩、河本健、加藤幸夫. Clock genes regulate circadian variation of blood pressure. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (ワークショップ) 2010 年 12 月 7-10 日 神戸

2. Nakashima A, Kawamoto T, Noshiro M, Honda K, Ozaki N, Ueno T, Taniguchi Y, Tanaka J, Yorioka N, Kato Y. Dec1 regulates circadian variation of blood pressure: 43rd Annual Meeting of American Society of Nephrology: 18-21 Nov, 2010. Denver USA.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 非ヒト動物、細胞、血圧調節物質の評価方法、血圧調節条件の評価方法および血圧の調節方法

発明者：加藤幸夫、河本健、能城光秀、中島
歩

権利者：広島大学

種類：特許

番号：特願 2010-236891 号

出願年月日：平成 22 年 10 月 21 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 歩 (NAKASHIMA AYUMU)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40448262

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：