

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：84404

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20751

研究課題名(和文)SGK1リン酸化酵素の血管発生制御・内皮細胞シグナル伝達における機能メカニズム

研究課題名(英文)Mechanisms of endothelial specific expression and downstream signaling of SGK1 protein kinase in embryonic vascular development

研究代表者

原田 恭弘 (HARADA, Yukihiro)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・リサーチフェロー

研究者番号：70911402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：SGK1上流のシグナル伝達経路については、SGK1遺伝子周囲の種間保存性やヒストン修飾などをin silicoで解析し、lacZレポーターマウスで検証を行い、近位と遠位に内皮細胞特異的転写活性を持つエンハンサーを同定した。さらに、エンハンサー領域を数百bpまで絞り込み、両エンハンサーに共通して存在するETS転写因子コンセンサス結合エレメントが転写活性に必須であることを明らかにした。SGK1下流のシグナル伝達経路については、活性欠損型・恒常活性型SGK1を発現させた培養内皮細胞のリン酸化プロテオーム解析を行い、内皮細胞制御や心血管発生に重要なことが知られる因子を含む複数の新規基質候補を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心血管発生・形態形成を制御するシグナル伝達系の異常は遺伝性血管病や先天性心疾患などの難病の原因となるが、血管内皮におけるSGK1の上流・下流シグナルの研究はほとんど進んでいない。近年、血管内皮におけるSGK1の機能解析は本研究を除くとMEK/ERK・細胞増殖における意義の報告があるのみであり、成人循環器疾患において既に創薬ターゲットとして開発が進むことと対比的である。したがって、本研究により明らかにされたSGK1の血管内皮細胞における上流および下流シグナル伝達経路は国内外を問わず新規性があり、臨床的にも重要な知見をもたらすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：For SGK1 upstream signaling pathways, I analyzed conservation among species and histone modifications around the SGK1 gene and validated them in lacZ reporter mice, and identified proximal and distal enhancers with endothelial specific transcriptional activity. I further narrowed down these enhancer regions to a few hundreds bp and identified ETS transcription factor consensus binding elements, which are common to both enhancers, and are essential for their transcriptional activities.

For signaling pathways downstream of SGK1, I performed phosphoproteomic analysis of cultured endothelial cells expressing inactive or constitutively active SGK1. I identified several novel substrate candidates, including factors known to be important for endothelial cell regulation and cardiovascular development.

研究分野：発生生物学

キーワード：心血管発生 内皮細胞 リン酸化酵素 SGK1

## 1. 研究開始当初の背景

心血管発生において様々なリン酸化酵素が必須の役割を有し、正常発生あるいは病態におけるリン酸化プロテオーム制御の意義が注目されている。SGK1 は PKA・PKG・PKC を含む AGC スーパーファミリーに属するリン酸化酵素であり、その欠損マウスは内皮細胞機能低下と血管形成異常による胎生致死性を示す (Catela et al. Dev Dyn 2010; Zarrinpashneh et al. PLoS One 2013)。SGK1 はマウス胚において内皮特異的に発現する (Lee et al. Mech Dev 2001)。最近申請者はマウス・ヒト・ゼブラフィッシュなどのシングルセル RNA-seq (Cao et al. Nature 2019 など) の再解析を行い、SGK1 が種を超えて発生期を問わず高い内皮発現を示すことを明らかにした。これらより、SGK1 が血管内皮細胞において重要な役割を果たすことは明白である。本研究課題の学術的「問い」は、SGK1 の血管内皮細胞における上流および下流シグナル伝達経路を同定し、血管発生制御および成熟機能調節における SGK1 の機能様式と意義を明らかにすることである。

SGK1 は心血管系を含む様々な臓器で重要な機能を有し、非内皮細胞においてグルココルチコイドを筆頭に様々な刺激による発現制御が報告されていた。内皮細胞における SGK1 の上流制御機構は全く不明であったが、申請者らは最近 ALK1 シグナルが SGK1 発現を亢進させることを明らかにした (Araki et al. Angiogenesis 2018)。一方、申請者は SGK1 発現の内皮特異性は ALK1 シグナルのみで説明できないと考え、*in silico* データベース解析とトランスジェニックマウス転写レポーター解析を組み合わせた SGK1 内皮エンハンサー探索を行う。さらに、SGK1 の血管内皮における意義は明らかであるが、どのような基質の活性制御を介して働いているかには不明な点が多い。そこで申請者は、網羅的リン酸化プロテオーム解析によって新規の内皮細胞 SGK1 基質を同定し、SGK1 の内皮細胞機能制御メカニズムの解明を試みる。

今回の目的は、血管発生・形態形成における必須リン酸化酵素 SGK1 について、上流因子による内皮発現制御メカニズムと基質制御を介した下流シグナル様式を明らかにすることである。胎生期血管における SGK1 の重要性は明らかであるが、CRISPR/Cas9 法などを用いた動物モデル・網羅的プロテオーム解析・*in silico* データベース解析等を組み合わせた検討の例は無く、本研究は SGK1 の上流・下流ネットワーク、さらに血管内皮におけるリン酸化酵素シグナル伝達機構全体を明らかにする一助となると期待される。

## 2. 研究の目的

SGK1 リン酸化酵素はマウス胚において内皮細胞特異的に発現し、Sgk1 欠損マウスは血管発生異常のため胎生致死となるが、内皮細胞における SGK1 の上流・下流シグナル伝達経路はほとんどわかっていない。そこで本研究では、SGK1 の血管内皮細胞における上流および下流シグナル伝達経路を同定し、血管発生制御および成熟機能調節における SGK1 の機能様式と意義を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### SGK1 上流のシグナル伝達経路

マウス・ヒトを含む生物種の SGK1 遺伝子周囲ゲノム領域における種間保存性や各種エピゲノムデータを *in silico* で解析することでエンハンサー候補領域を選出する。さらに、トランスジェニックマウス胎仔 lacZ レポーターで候補領域の検証を行うことで内皮特異的転写活性を持つエンハンサーを同定する。また、培養細胞を用いた *in vitro* の解析や転写因子のコンセンサス結合配列の探索を *in silico* で行うことでエンハンサー活性を制御する転写因子を明らかにする。

### SGK1 下流のシグナル伝達経路

活性欠損型・恒常活性型 SGK1 を発現させた培養内皮細胞 HUVEC の Mass Spectrometry リン酸化プロテオーム解析によって、内皮細胞における新規 SGK1 基質の網羅的探索を行う。また、基質候補の *in vitro* リン酸化実験を個別に行って、SGK1 による直接の基質であることを確認する。さらに、新規基質の SGK1 リン酸化コンセンサス配列の変異マウス・ゼブラフィッシュモデルを作製し、血管形成異常の可能性を組織学解析・ライブイメージング・内皮分化/増殖マーカー

一解析などによって検討する。また、HUVEC を用いた培養内皮細胞の遊走・管腔形成・増殖解析も合わせて、内皮 SGK1 下流因子としての意義を明らかにする。

#### 4 . 研究成果

##### SGK1 上流のシグナル伝達経路

マウス・ヒトを含む生物種の SGK1 遺伝子周囲ゲノム領域における種間保存性、クロマチン開放性 (DNase-seq)、転写制御分子相互作用 (RNA Pol II・p300)、ヒストン修飾 (H3K27ac・H3K4me1) などを *in silico* で解析することで 10 か所のエンハンサー候補領域を選出した。それらの候補領域に対してトランスジェニックマウス胎仔 lacZ レポーターで検証を行うことによって、近位 (転写開始点近傍) と遠位 (500kbp 上流) に内皮細胞特異的転写活性を持つエンハンサーを同定した。また、ChIP や luciferase レポーターを用いた解析も組み合わせることによってエンハンサー領域を数百 bp まで絞り込み、両エンハンサーに共通して存在する ETS 転写因子コンセンサス結合エレメントが内皮特異的な転写活性に必須であることを明らかにした。

##### SGK1 下流のシグナル伝達経路

活性欠損型・恒常活性型 SGK1 を発現させた培養内皮細胞のリン酸化プロテオーム解析を行い、内皮細胞制御や心血管発生に重要なことが知られる因子を含む複数の新規基質候補を同定した。また、基質候補のいくつかに対して *in vitro* リン酸化実験を個別に行い、SGK1 による直接の基質であることが確認できた。しかしながら、今回同定された基質は HUVEC を用いた培養内皮細胞の遊走・管腔形成・増殖解析では有意な差を見出すことが出来なかった。現在の基質候補リストの中からの探索を続けるとともに、他のスクリーニングの系を組み合わせることでより効率的な系を確立することは今後の課題である。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Harada Yukihiko, Tanaka Toru, Arai Yuji, Isomoto Yoshie, Nakano Atsushi, Nakao Shu, Urasaki Akihiro, Watanabe Yusuke, Kawamura Teruhisa, Nakagawa Osamu | 4. 巻<br>26              |
| 2. 論文標題<br>ETS dependent enhancers for endothelial specific expression of serum/glucocorticoid regulated kinase 1 during mouse embryo development                 | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Genes to Cells  | 6. 最初と最後の頁<br>611 ~ 626 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/gtc.12874  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>原田恭弘、田中亨、荒井勇二、浦崎明宏、渡邊裕介、川村晃久、中川修       |
| 2. 発表標題<br>SGK1リン酸化酵素の胎生期血管内皮特異的エンハンサー探索と活性制御機構解析 |
| 3. 学会等名<br>CVMW2021                               |
| 4. 発表年<br>2021年                                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>原田恭弘、田中亨、荒井勇二、浦崎明宏、渡邊裕介、川村晃久、中川修       |
| 2. 発表標題<br>SGK1リン酸化酵素の胎生期血管内皮特異的エンハンサー探索と活性制御機構解析 |
| 3. 学会等名<br>第44回日本分子生物学会年会                         |
| 4. 発表年<br>2021年                                   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|