

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791051

研究課題名（和文） 新規 MR 転写共役因子の同定とその機能解析

研究課題名（英文） Identification and functional analysis of novel MR co-regulator

研究代表者

横田 健一 (YOKOTA KENICHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50424156

研究成果の概要（和文）：MR の新規転写共役因子として p150 を同定した。p150 はリガンド依存性に MR と相互作用し、co-repressor として機能する。本態性高血圧症の病態生理において、150 が重要な役割を果たしている可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We identified p150 as a novel MR co-regulator. P150 interacts with MR in a ligand dependent manner and acts as a co-repressor. It is possible that p150 plays an important role in the pathophysiology of essential hypertension.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：アルドステロン、転写

1. 研究開始当初の背景

近年、RALES 研究 (N.Eng.J.Med.341:709-717,1999) や EPHEBUS 研究 (N.Eng.J.Med.348:1309-1321, 2003) を初めとする多くの大規模臨床研究の結果から、心不全や高血圧といった循環器系疾患の病態生理にミネラルコルチコイド受容体 (MR) の活性化が非常に重要な役割を担うことが明らかとなっており、現在これらの疾患を治療する上で MR 作用メカニズムを理解することは必須となっている。MR は、リガンドであるアルドステロンの結合により活性化されると、標的遺伝子のプロモータ内にある MR 応答配列に結

合し、co-regulator と呼ばれる蛋白質複合体を標的遺伝子プロモータに動員し、ヒストンのアセチル化、メチル化修飾や、クロマチン構造調節を起こすことで、ダイナミックに標的遺伝子 ENaC や SGK1 発現量を制御し、血圧を調節していると考えられている。このようなゲノム情報に依らない遺伝子発現制御メカニズムはエピゲノムと呼ばれ、多くの核内受容体 (NR) でその機能を制御する中心的な役割を果たすことが知られているが、MR のエピゲノムを介した標的遺伝子転写活性化の分子メカニズムについては殆ど不明なままであった。

2. 研究の目的

本研究で我々はまず新規 MR 転写共役因子を探索・同定し、その機能解析を行うことで、MR によるエピゲノム制御機構を初めて明らかにすること、さらに最終的には高血圧発症の遺伝的因子を、MR を切り口としたメカニズムで解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) FLAG タグ付き MR 発現 pCDNA ベクターを HEK293F 細胞にリポフェクタミンをもちいて一過性過剰発現させ、G418 耐性を利用して selection を行い、FLAG-MR 安定発現 HEK293 細胞株を樹立した。得られた細胞が MR を発現しているかどうかを確認するために、培養したこの細胞を PBS にて wash の後、TNE バッファーにて回収し、その lysate を FLAG M2 レジンで免疫沈降し、得られた蛋白質をサンプルバッファーで煮沸後、SDS-PAGE に展開し、続いて抗 MR 抗体によるウェスタンブロットにて MR 発現を確認した。

また、この細胞にアルドステロンを投与したのち、ISOGEN を用いて mRNA を回収し、逆転写ののち、MR の標的遺伝子の変動を観察し、MR が機能していることを確認した。

(2) 得られた FLAG-MR 安定発現 HEK293 細胞を大量培養しアルドステロン処置後 2 時間後に回収した。得られたライセートから核抽出液を取得し、FLAG 抗体で免疫沈降を行うことで、MR 相互作用因子を精製し、SDS-PAGE にて展開後、銀染色でその存在を確認した。

(3) 銀染色で認められた相互作用因子のバンドを確認後、メスで切りだし、トリプシン消化を行った後、LC-MS/MS による解析に供した。

(4) 同定された蛋白質のうち、p150 に注目した。Myc タグ付き p150 発現ベクターを作成し、

リポフェクタミンを用いて HEK293 細胞に過剰発現させ、MR 転写活性に与える影響をルシフェラーゼアッセイで観察した。

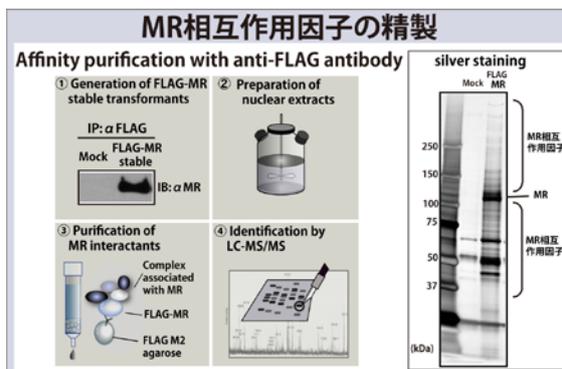
(5) ラットの腎臓における p150 と MR の組織内発現分布を免疫染色法で検討した。

(6) p150 の shRNA ベクターを作成し、p150 の内因性の発現を抑制させた状態で、MR 転写活性に及ぼす影響を、HEK293 細胞において MR 標的遺伝子である ENaC や sgk-1 の q-PCR を行うことで検討した。

4. 研究成果

(1) G418 耐性となった HEK293 細胞を回収し、MR 抗体を用いたウェスタンブロットにて MR 安定発現細胞株であることを確認した。また、アルドステロン投与の有無にて細胞の mRNA を回収し、逆転写したうえで、MR の標的遺伝子 ENaC の発現量をリアルタイム PCR にて定量したところ、アルドステロンにより ENaC の発現が 3 倍程度増強することが確かめられた。以上の結果から、MR 安定発現 HEK293 細胞において、過剰発現した MR は内因性の標的遺伝子発現に機能することが確かめられた。

(2) 銀染色にて、MR のバンド以外にも無数のバンドが確認でき、複数の MR 相互作用因子の存在が示唆された。



(3)LC-MS/MS による同定の結果、100 以上の既報の co-regulator が同定できたことから、精製の手法がうまくいっていることが示唆された。また 10 以上の機能未知遺伝子も同定できた。この中で我々は特に p150 に注目した。

p150 は、その遺伝子内に高血圧発症と強く関連する SNP が存在することが近年複数の GWAS で報告され、注目されている蛋白質であるが、分子機能は不明である。そこで p150 の機能解析を進めることとした

(4)Eco-R I および Xho- I による制限酵素を利用したサブクローニングにより、pCDNA-myc-p150 発現ベクターを作出した。ルシフェラーゼアッセイにおいて、p150 過剰発現により、リガンド依存性 MR 転写活性が減少したことから、p150 は MR の co-repressor として機能することが示唆された。

(5)p150 と MR はラット腎臓の遠位尿細管から集合管にかけての細胞核において、両者ともに局在していることが明らかになった。このことから、両者が生体内において、機能を及ぼしあっていることが強く示唆された。

(6)shRNA によって、p150 の内因性発現を減少させた状態では、アルドステロン依存性の ENaC や sgk-1 の mRNA 発現上昇を認めた。このことから、p150 は MR の co-repressor として機能することが示唆された。

これまでの結果と合わせると、p150 は腎臓において MR と遠位尿細管から集合管にかけて今日局在し、アルドステロンによる MR 転写活性化において MR の co-repressor として働き、ひいては ENaC や SGK-1 の発現量を調節することで血圧調節に重要な役割を果たす因子であることが推測された。

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 2 件)

1. Baba, F Ohtake, Y Okuno, K Yokota, M Okada, Y Imai, Ni M, CA Meyer, K Igarashi, J Kanno, M Brown, S Kato. PKA-dependent regulation of the histone lysine demethylase complex PHF2-ARID5B. Nature Cell Biology 13(6):668-75, 2011. 査読あり

Doi:10.1038/ncb2228

2. N Suda, H Shibata, I Kurihara, Y Ikeda, S Kobayashi, K Yokota, A Murai-Takeda, K Nakagawa, M Oya, M Murai, WE Rainey, T Saruta, H Itoh. Coactivation of SF-1-mediated transcription of steroidogenic enzymes by Ubc9 and PIAS1. Endocrinology. 152(6):2266-77, 2011. 査読あり

Doi:10.1210/en.2010-1232

[学会発表] (計 2 件)

1. 横田健一, 新規 MR 転写共役因子の探索とその機能解析 2011 年日本ステロイドホルモン学会(福岡)にて招待講演, 2011 年 11 月 26 日

2. 横田健一, 新規 MR 転写共役因子の探索とその機能解析 2011 年核内受容体研究会(東京)にて招待講演, 2011 年 3 月 11 日

〔図書〕（計 2 件）

1. 横田健一, 柴田洋孝 副腎不全
medicina 49(9):1588-1592, 2012 査読なし

2. 横田健一, 柴田洋孝, 伊藤裕. ミネラル
コルチコイド受容体の活性化による心血
管障害 原発性アルドステロン症診療マニ
ュアル. 166-168, 2011. 査読なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横田 健一 (YOKOTA KENICHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50424156