

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893012

研究課題名(和文) 副腎皮質球状層単離法の確立とそれを応用したCYP11B2遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Establishment of the isolation-method of adrenal zona glomerulosa and the analysis of CYP11B2 gene regulation.

研究代表者

伊藤 亮 (Ito, Ryo)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80733815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：副腎球状層細胞において特異的にGFPを発現するトランスジェニック(Tg)マウスの作製を試みた。具体的には、アルドステロン合成酵素CYP11B2遺伝子座にGFPを組み込んだBacterial artificial chromosomeを用い、4系統のTgマウスの作製に成功した。また、副腎腫瘍に由来するH295R細胞を用いてAngiotensin II (Ang II)に反応する遺伝子を質量分析により探索した。その結果、解糖系関連酵素PFKPの発現がAng II刺激に反応して上昇することが明らかとなった。これらの結果は、副腎細胞においてAng IIが解糖系に影響を与えることを示唆するものであった。

研究成果の概要(英文)：We tried to generate the transgenic mouse which expressed GFP specifically in adrenal zona glomerulosa. Using bacterial artificial chromosome recombined with GFP gene on aldosterone synthase, CYP11B2 gene locus, we succeeded in obtaining four mouse strains. Immunohistochemistry revealed the expression of GFP in adrenal zona glomerulosa of the best GFP expression strain. On the other hand, we carried out the comprehensive analysis using mass spectrometer for search the Angiotensin II (Ang II)-response gene in H295R cells derived from adrenal tumor. As the result, we found phosphofructokinase type platelet (PFKP), which is glycolysis-related enzyme, as a novel Ang II-response gene. These result suggested that Ang II stimulation affect the glycolysis in adrenal cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：内分泌 遺伝子発現制御

1. 研究開始当初の背景

(1) 副腎では主要な鉱質コルチコイドであるアルドステロンを始め様々なホルモン合成が行われる。特に、副腎皮質球状層ではアルドステロン合成酵素 CYP11B2 が特異的に発現している。

(2) アルドステロン合成・分泌、及び CYP11B2 発現は生理活性ペプチドであるアンジオテンシン II (Ang II) により厳密に制御されることが知られている。しかしながら、生体内における Ang II による CYP11B2 発現制御機構は未知なる部分が多く残っていた。

2. 研究の目的

(1) これまでの CYP11B2 発現調節研究は多くが培養細胞を用いたものであった。その原因の一つに、CYP11B2 を発現する副腎皮質の構造が複雑であり、球状層細胞の単離が難しかったことが挙げられる。本研究では、マウスから副腎皮質球状層の単離法を確立し、解析に用いることで CYP11B2 発現制御機構を明らかにすることを目的とする。

(2) 培養細胞、及び初代培養副腎球状層細胞を用いた質量分析による網羅的解析により、CYP11B2 制御因子の解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) 副腎球状層細胞特異的に Green fluorescent protein (GFP) を発現する transgenic (Tg) マウスを作製する。これらのマウスから副腎を摘出し、フローサイトメーターにより副腎球状層細胞を単離する。

(2) ヒト副腎由来培養細胞株である H295R 細胞、もしくは(1)により単離する初代培養副腎球状層細胞を用い、質量分析による Ang II 応答遺伝子の網羅的探索を行う。特に、H295R 細胞を用いた解析では安定同位体を用いた Stable Isotope Labeling using Amino Acids in Cell Culture (SILAC)法を採用することで定量的質量分析を行う。

4. 研究成果

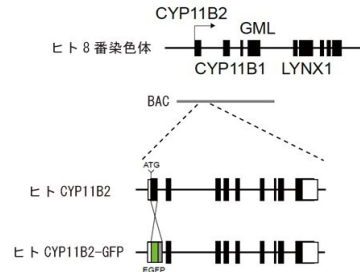
(1) ヒト CYP11B2 遺伝子座を含む Bacterial artificial chromosome (BAC) の CYP11B2 エキソン 1 とエキソン 2 の領域に GFP 遺伝子を挿入した。さらにクローン選択のためのネオマイシン耐性遺伝子カセットを抜き出した。これらの結果はサザンブロッティングにより確認した(図 1)。

(2) マウス受精卵にマイクロインジェクションすることで Tg マウスを作製した。それぞれ独立した 4 系統のマウス系統を得ており、これらの系統は全て生殖系列細胞への挿入が認められた。

(3) (2)で得られた 4 系統において、それぞ

れの系統のヘテロ個体同士を交配させ、ホモ個体の作出を試みた。遺伝子型解析には半定量的リアルタイム PCR を用いた。その結果、1 系統ではメンデル遺伝則に従わずにホモ個体が得られなかったが、残る 3 系統ではホモ個体を得ることができた。

(図 1) 本研究で作製した BAC



(4) 前述の 3 系統から半定量的 PCR により副腎における GFP 発現量の比較を行った。その結果、副腎において特に強く GFP を発現する系統を得た。この系統のホモ個体を出し、免疫組織染色を行ったところ、球状層細胞付近において特異的な GFP の発現が認められた。これらのマウス副腎を用いることで、フローサイトメーターを用いた GFP を発現する副腎球状層細胞単離法の確立が期待される。

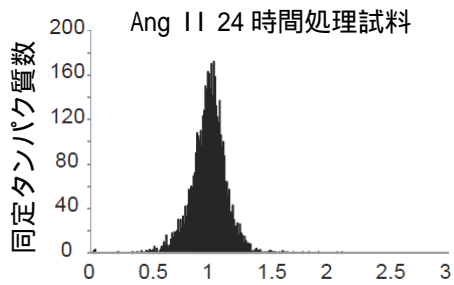
(5) Ang II に応答し、CYP11B2 の発現を制御するタンパク質を同定するため、質量分析による網羅的解析を試みた。具体的には SILAC 法による定量比較を行った。はじめに、H295R 細胞を通常のリジン、アルギニンを含む培地、もしくは安定同位体を含むリジン ($^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$)、及びアルギニン ($^{13}\text{C}_6$) を含む培地でそれぞれ培養した。培養後、2、7、14 日後のタンパク質の標識効率を検証したところ、それぞれ 54.8%、85.2%、91.5%であった。さらに培養を 14 日間続けた細胞を用いて定量比較を行うことにした。

(6) これまでの申請者の実験において H295R 細胞は培養条件の違いで Ang II 応答性が失われることがあった。そこで、SILAC 法の培養条件で Ang II 応答性が残っているかどうかを検証した。(5)の条件で培養した細胞に $0.1\mu\text{M}$ Ang II 処理を行い、6 時間後に細胞を回収し RNA 抽出を行った。これらの RNA を元に逆転写反応を行い、既知の Ang II 応答遺伝子である Nurr1 (NR4A2) 遺伝子⁽¹⁾の発現量を PCR 法により解析した。その結果、Nurr1 発現は Ang II 刺激により有意に上昇し、SILAC 条件下における H295R 細胞は Ang II 応答性を保持していることが明らかとなった。

(7) SILAC 条件で培養した H295R 細胞を $0.1\mu\text{M}$ Ang II で 6、12、24 時間処理し、細胞抽出液を得た。通常培地条件の細胞は対照試料として Ang II 処理を行わず抽出液を得た。これ

らの試料を混合し SDS-PAGE にてアクリルアミドゲルへ展開し、各試料から 30 片程度の断片を得た。これらのゲル片はそれぞれ還元、アルキル化、及びトリプシン消化を行い、ペプチド断片を得た。これらの試料を質量分析に供し、マススペクトル結果を得た。それぞれの処理時間のスペクトル結果はタンパク質検索エンジンである Mascot を用いて解析し、定量比較を行った。その結果、6、12、24 時間処理試料からそれぞれ 3464 種、4145 種、4653 種のタンパク質の発現量比較結果を得ることができた(図 2)。

(図 2) タンパク質発現量比較結果の例



発現量比 (Ang II 刺激/無刺激)

(8) (7)の結果では既知の Ang II 応答タンパク質である RhoB、LDLR⁽²⁾などを同定することができた。この大規模データを元にさらに解析を進めるため、クラスター解析を行った。その結果、有意に発現量が変化していたタンパク質群を 4 つのクラスターに分類することができた。これらクラスターの内、処理時間と共に発現量が上昇していた群に着目し Gene ontology 解析を行ったところ、解糖系関連酵素の発現が Ang II に応答して上昇していることが明らかとなった(図 3)。最近、副腎におけるステロイド合成と糖代謝の関係性が示唆されている⁽³⁾。そこで本研究では解糖系関連酵素が副腎細胞における Ang II 応答に、さらには CYP11B2 遺伝子発現にどのように寄与しているかの解明を目指した。

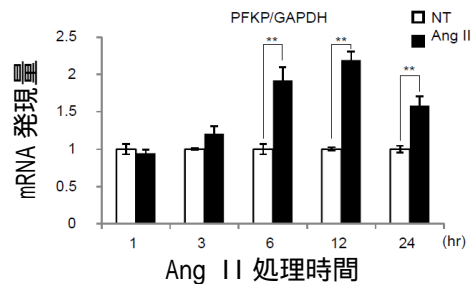
(図 3) GO 解析結果

GO term	P value
fructose 1,6-bisphosphate metabolic process	0.013
macromolecular complex assembly	0.024
macromolecular complex subunit organization	0.031
fructose metabolic process	0.042
Golgi vesicle transport	0.043

(9) 本研究で明らかとなった Ang II 応答性の解糖系関連酵素の内、最も応答が顕著であった Phosphofructokinase type platelet (PFKP)に着目し解析を進めた。まず、質量分析で得られた結果の妥当性を抗 PFKP 抗体によるウエスタンブロットング法により検証した。その結果、質量分析結果と同様に Ang II に応答して PFKP の発現量が上昇する事が明らかとなった。また、RT-PCR 法により PFKP

の Ang II 応答が転写レベルで起こることが明らかとなった(図 4)。興味深いことに、同じ PFK ファミリーに属する Phosphofructokinase type muscle (PFKM)や Phosphofructokinase type liver (PFKL)では発現量の変化は見られなかった。これらの結果は Ang II に応答して PFKP 遺伝子の転写量が上昇し PFKP タンパク質量が増加することを示唆している。

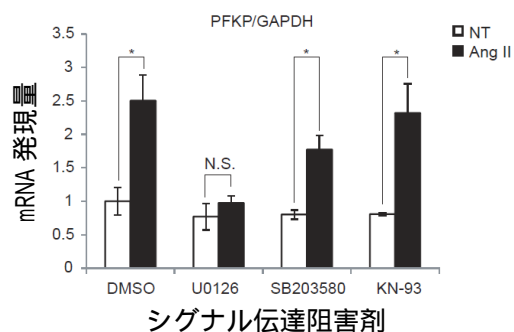
(図 4) PFKP mRNA の Ang II 応答



(10) Ang II は副腎細胞において、MAP キナーゼ経路や Ca²⁺/CaMK 経路など様々なシグナル伝達経路を活性化することが知られている。そこで、本研究で示唆された PFKP の Ang II 応答がどのようなシグナル経路の下流に位置するかを調べた。種々の阻害剤の存在下で PFKP の Ang II 応答性を RT-PCR 法により解析した結果、MAP キナーゼである ERK1/2 阻害剤により応答性が顕著に失われることが明らかとなった(図 5)。この結果より Ang II は ERK シグナル伝達経路を介して PFKP の発現を上昇させる事が明らかとなった。

(図 5) PFKP の Ang II 応答に対する

ERK 阻害剤の影響

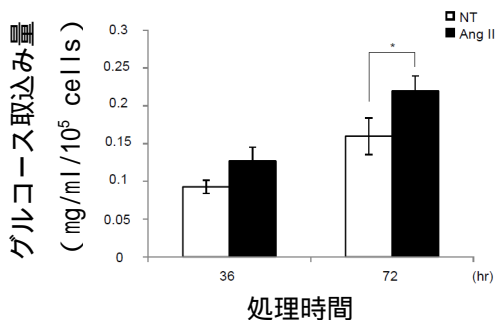


(11) Ang II に応答して上昇する PFKP の生理的意義を解析した。PFKP の発現上昇は解糖系の活性化を意味し、細胞のグルコース消費量が上昇する事が予想された。そこで Ang II 処理条件下で H295R 細胞の培養上清中のグルコース濃度を調べた結果、Ang II 存在条件下では、非存在下に比べて有意にグルコース濃度が減少していた。この結果は Ang II 処理により細胞のグルコース消費が亢進していることを示唆するものである(図 6)。

(12) PFKP の発現上昇が CYP11B2 の発現に与える影響を解析した。H295R 細胞に PFKP 発現ベクターを導入した後、Ang II 刺激を行い

CYP11B2 遺伝子の発現量比較を RT-PCR 法により行った。その結果、PFKP の過剰発現による CYP11B2 遺伝子の発現応答への影響は見られなかった。以上の結果より、Ang II 刺激による PFKP の発現上昇は直接的に CYP11B2 の発現に影響を与えるものではないが、例えば糖代謝物などの作用を介して、間接的に副腎細胞のステロイド合成に影響を与えている可能性が考えられた。

(図5) Ang II によるグルコース取込みの亢進



< 引用文献 >

(1) Bassett MH, Suzuki T, Sasano H, White PC, Rainey WE., The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFI1B regulate adrenal aldosterone production., Molecular Endocrinology, 18 巻, 2004, 279-90

(2) Romero DG, Plonczynski M, Vergara GR, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE., Angiotensin II early regulated genes in H295R human adrenocortical cells., Physiological Genomics, 19 巻, 2004, 106-16

(3) Baba T, Otake 1, Sato 2, Miyabayashi K, Shishido Y, Wang CY, Shima Y, Kimura H, Yagi M, Ishihara Y, Hino S, Ogawa H, Nakao M, Yamazaki T, Kang D, Ohkawa Y, Suyama M, Chung BC, Morohashi K., Glycolytic genes are targets of the nuclear receptor Ad4BP/SF-1., Nature communications, 5 巻, 2014, 3634

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) 伊藤亮、島弘季、増田晃士、佐藤郁子、白髭克彦、五十嵐和彦、横山敦、菅原明、副腎におけるアンジオテンシン II の新規生理作用の探索、第 33 回内分泌代謝学サマーセミナー、柳川藩主立花邸御花(福岡県柳川市)ポスター発表、2015 年 7 月 9 日

(2) 伊藤亮、アルドステロン合成酵素遺伝子 CYP11B2 の発現抑制化合物の探索、創薬等技

術支援基盤プラットフォーム事業東北大拠点第二回公開シンポジウム、東北大学(宮城県仙台市)、口頭発表、2015 年 11 月 21 日

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
伊藤 亮 (ITO, Ryo)
東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号：80733815

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：