

Title	MR転写共役因子C14orf43の機能解析を通じた高血圧発症機序の解明
Sub Title	Elucidation of hypertension onset mechanism through functional analysis of MR co-regulator C14orf43
Author	横田, 健一 (Yokota, Kenichi)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2019
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	ミネラルコルチコイド受容体 (MR)はアルドステロンをリガンドとする核内受容体型転写因子であり、高血圧や心臓、腎臓、血管の臓器障害に関わることが報告されているが、MR活性化機構の詳細は不明のままであった。我々は生化学的手法を用いて新規MR転写共役因子C14orf43を同定した。そこで、C14orf43の機能解析を通じてMR活性化の分子メカニズムを明らかにすることを本研究の目的とした。In vitroの研究により、CASZ1はMRとアルドステロン依存性に相互作用することが判明した。RNAiによってC14orf43の発現をノックダウンさせると、MRの標的遺伝子の1つであるSGK1のmRNA発現量が増加したことから、C14orf43はMRの転写活性を抑制する転写抑制因子であることが判明した。またアルドステロン処置によりMRやC14orf43はMR標的遺伝子ENaCαのプロモータにリクルートされることがChIPアッセイから確認できた。一方で、C14orf43自体には、転写を直接制御できるHDAC活性やクロマチンリモデリング活性を有するドメインを有さなかった。このことからC14orf43の機能として、MRと何らかの転写抑制性蛋白質複合体とのアダプターとして機能していることが予想された。そこで、C14orf43と相互作用する蛋白質複合体を生成するために、FLAGタグ付きC14orf43安定発現細胞株をレトロウイルスを用いて樹立した。この安定発現細胞株を大量培養し、核抽出液を取得後、FLAG抗体による免疫沈降を行い、C14orf43相互作用因子の精製を行い、得られたサンプルをLS-MS/MS質量分析を用いて同定したところ、HDAC1、HDAC2、CHD4、RBBP4、MTA2、MBD4など多くのエピゲノム制御因子が同定された。以上のデータから、アルドステロンによるMR活性化のメカニズムにおいてC14orf43がエピゲノムを介して転写を抑制していることが示唆された。 Mineralocorticoid receptor (MR) belongs to the nuclear hormone receptor superfamily and serves as an aldosterone-induced transcriptional factor. Although MR has been reported to be involved in hypertension and organ damage in the heart, kidney, and blood vessels, details of the MR activation mechanism remain unknown. We identified novel MR co-regulators C14orf43 by a biochemical approach. Therefore, we aimed to clarify the molecular mechanism of MR activation through functional analysis of C14orf43. In vitro studies revealed that CASZ1 interacts with MR in an aldosterone-dependent manner. Knockdown of C14orf43 expression by RNAi increased the mRNA level of SGK1, which is one of the MR target genes, and found that C14orf43 is a transcriptional repressor that suppresses the transcriptional activity of MR. It was also confirmed by ChIP assay that MR and C14orf43 were recruited to the promoter of the MR target gene ENaCα in an aldosterone-dependent manner. On the other hand, C14orf43 itself do not have a domain having HDAC activity or chromatin remodeling activity that can directly control transcription. So it is predicted that C14orf43 functions as an adapter between MR and some transcription repressible protein complex. Therefore, in order to identify a protein complex that interacts with C14orf43, we generated a FLAG-tagged C14orf43 stable expression cell line using a retrovirus. This stable expression cell line was cultured in a large amount, nuclear extract was obtained, immunoprecipitation was performed with FLAG antibody, C14orf43 interaction factor was purified, and the obtained sample was identified using LS-MS / MS mass spectrometry. As a result, many epigenomic regulators such as HDAC1, HDAC2, CHD4, RBBP4, MTA2, and MBD4 were identified. These data suggest that C14orf43 represses transcription via the epigenome in aldosterone induced MR activation.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2018000005-20180322

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	医学部臨床教室	職名	助教(有期・医学部)	補助額	300 (A) 千円
	氏名	横田 健一	氏名 (英語)	Kenichi Yokota		
研究課題 (日本語)						
MR 転写共役因子 C14orf43 の機能解析を通じた高血圧発症機序の解明						
研究課題 (英訳)						
Elucidation of hypertension onset mechanism through functional analysis of MR co-regulator C14orf43						
1. 研究成果実績の概要						
ミネラルコルチコイド受容体(MR)はアルドステロンをリガンドとする核内受容体型転写因子であり、高血圧や心臓、腎臓、血管の臓器障害に関与することが報告されているが、MR 活性化機構の詳細は不明のままであった。我々は生化学的手法を用いて新規 MR 転写共役因子 C14orf43 を同定した。そこで、C14orf43 の機能解析を通じて MR 活性化の分子メカニズムを明らかにすることを本研究の目的とした。In vitro の研究により、CASZ1 は MR とアルドステロン依存性に相互作用することが判明した。RNAi によって C14orf43 の発現をノックダウンさせると、MR の標的遺伝子の1つである SGK1 の mRNA 発現量が増加したことから、C14orf43 は MR の転写活性を抑制する転写抑制因子であることが判明した。またアルドステロン処置により MR や C14orf43 は MR 標的遺伝子 ENACα のプロモータにリクルートされることが ChIP アッセイから確認できた。一方で、C14orf43 自体には、転写を直接制御できる HDAC 活性やクロマチンリモデリング活性を有するドメインを有さなかった。このことから C14orf43 の機能として、MR と何らかの転写抑制性蛋白質複合体とのアダプターとして機能していることが予想された。そこで、C14orf43 と相互作用する蛋白質複合体を生成するために、FLAG タグ付き C14orf43 安定発現細胞株をレトロウイルスを用いて樹立した。この安定発現細胞株を大量培養し、核抽出液を取得後、FLAG 抗体による免疫沈降を行い、C14orf43 相互作用因子の精製を行い、得られたサンプルを LS-MS/MS 質量分析を用いて同定したところ、HDAC1、HDAC2、CHD4、RBBP4、MTA2、MBD4 など多くのエピゲノム制御因子が同定された。以上のデータから、アルドステロンによる MR 活性化のメカニズムにおいて C14orf43 がエピゲノムを介して転写を抑制していることが示唆された。						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
Mineralocorticoid receptor (MR) belongs to the nuclear hormone receptor superfamily and serves as an aldosterone-induced transcriptional factor. Although MR has been reported to be involved in hypertension and organ damage in the heart, kidney, and blood vessels, details of the MR activation mechanism remain unknown. We identified novel MR co-regulators C14orf43 by a biochemical approach. Therefore, we aimed to clarify the molecular mechanism of MR activation through functional analysis of C14orf43. In vitro studies revealed that CASZ1 interacts with MR in an aldosterone-dependent manner. Knockdown of C14orf43 expression by RNAi increased the mRNA level of SGK1, which is one of the MR target genes, and found that C14orf43 is a transcriptional repressor that suppresses the transcriptional activity of MR. It was also confirmed by ChIP assay that MR and C14orf43 were recruited to the promoter of the MR target gene ENACα in an aldosterone-dependent manner. On the other hand, C14orf43 itself do not have a domain having HDAC activity or chromatin remodeling activity that can directly control transcription. So it is predicted that C14orf43 functions as an adapter between MR and some transcription repressible protein complex. Therefore, in order to identify a protein complex that interacts with C14orf43, we generated a FLAG-tagged C14orf43 stable expression cell line using a retrovirus. This stable expression cell line was cultured in a large amount, nuclear extract was obtained, immunoprecipitation was performed with FLAG antibody, C14orf43 interaction factor was purified, and the obtained sample was identified using LS-MS / MS mass spectrometry. As a result, many epigenomic regulators such as HDAC1, HDAC2, CHD4, RBBP4, MTA2, and MBD4 were identified. These data suggest that C14orf43 represses transcription via the epigenome in aldosterone induced MR activation.						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			