

高血圧環境におけるレニン遺伝子転写制御機構の解明

2017年1月

牛木 亜季

高血圧環境におけるレニン遺伝子転写制御機構の解明

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生物機能科学専攻
博士（農学）学位論文

牛木 亜季

略語

ACE:	angiotensin converting enzyme (アンジオテンシン変換酵素)
AI:	angiotensin I (アンジオテンシン I)
AII:	angiotensin II (アンジオテンシン II)
BAC:	bacterial artificial chromosome (大腸菌人工染色体)
cAMP:	cyclic adenosine monophosphate (環状アデノシンーリン酸)
Cas9:	CRISPR associated proteins
ChIP:	chromatin immunoprecipitation (クロマチン免疫沈降)
CNRE:	overlapping cAMP-responsive and negative regulatory elements
CRE:	cAMP-responsive element (cAMP 応答性領域)
CRISPR:	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CTCF:	ccctc-binding factor
ctrl:	control (コントロール)
dpc:	days post coitum (交尾後日数)
FRT:	flip recombinase recognition target (フリッパーゼ認識配列)
gRNA:	guide RNA (ガイド RNA)
GWAS:	genome wide association study (全ゲノム関連解析)
hAGT:	human ANGIOTENSINOGEN (ヒト・アンジオテンシノーゲン)
hdE:	human distal enhancer (ヒト遠位エンハンサー)
hREN:	human RENIN (ヒト・レニン)
JG:	juxtaglomerular (傍糸球体の)

mdE: mouse distal enhancer (マウス遠位エンハンサー)

mRen: mouse Renin (マウス・レニン)

mt: mutant (変異型)

nt: nucleotide (ヌクレオチド)

PAH: pregnancy-associated hypertensive mice (妊娠高血圧マウス)

PCR: polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)

PKC: protein kinase C

qRT-PCR: quantitative real-time PCR (リアルタイム定量PCR)

SBP: systolic blood pressure (収縮期血圧)

SNP: single nucleotide polymorphism (一塩基多型)

Tg: transgene (導入遺伝子)

TgM: transgenic mouse (トランスジェニック・マウス)

THM: tsukuba hypertensive mouse (mice) (つくば高血圧マウス)

UTR: untranslated region (非翻訳領域)

wt: wild-type (野生型)

目次

第1章	序論	1
第2章	つくば高血圧マウスにおいて、レニン遺伝子転写は 遠位 <i>cis</i> DNA 配列により制御される	
	要旨	4
	導入	6
	結果	11
	考察	17
	材料と方法	22
第3章	高血圧環境下におけるマウス・レニン遺伝子の転写は、 新規エンハンサーにより制御される	
	要旨	34
	導入	36
	結果	39
	考察	45
	材料と方法	49
第4章	結語	70
謝辞		71
参考文献		72

第 1 章

序論

レニン-アンジオテンシン系は、血圧恒常性維持に重要なシステムの一つである。レニンは RA 系の出発反応において、基質アンジオテンシノーゲンと反応し、アンジオテンシン I (Angiotensin I; AI) を産生する (図 I-1)。AI はさらに、アンジオテンシン変換酵素 (Angiotensin converting enzyme; ACE) により、最終産物であるアンジオテンシン II (Angiotensin II; AII) へと変換される。AII は、AII 受容体に結合することで、血管収縮やアルドステロン産生を介した体液量の増大により、血圧を上昇させる。レニンによる触媒反応は同系の律速段階であることから、その発現は、血圧恒常性維持のために適切なフィードバック制御を受けている。つまり、高血圧時にはその転写が抑制され、低血圧時には活性化される (1-3)。しかしながら、同制御に関与する転写因子や、*cis*-制御配列による分子メカニズムは、まだ完全には明らかとなっていない。

これまでに、培養細胞を用いた研究から、レニン遺伝子転写開始点近傍の領域に、多くの制御領域が発見されている (4)。しかしながら、これらの多くは基本転写活性への寄与は示すものの、応答性制御には必須でないことが報告されている (5)。この理由として、個体にしか存在しない「血圧環境」を、培養細胞を用いた実験で再現することが困難であることが挙げられる。そこで、私は、当研究室で開発された高血圧モデルマウス (つくば高血圧マウス; THM) を用いた *in vivo* の実験系により、応答性 *cis*-DNA 配列の同定を目指すこととした (6)。

第 2 章では、まず、THM の作製に用いた 15-kb ヒト・レニン導入遺伝子が、

高血圧環境下において異常な転写応答を示すことを見出した。さらに、156-kb 及び 13-kb の導入遺伝子を用いることで、THM におけるマウス・レニン遺伝子の転写応答性を検証した。その結果、同遺伝子の高血圧環境応答性領域が、タンパク質コード領域の遠位に存在することが明らかとなった。

次に第 3 章では、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用い、更なる応答性領域の絞り込みを行った。その結果、内在マウス・レニン遺伝子上流約 17-kb の範囲を欠失することで、高血圧環境応答性制御が消失することが明らかとなった。さらに同 17-kb 領域は、正常血圧状態において、エンハンサー活性をもつことを見出した。そこで、同活性のコアとなる領域を、マウス・レニン産生細胞株 As4.1 を用いたレポーターアッセイ、及び DNaseI hypersensitive site mapping により探索し、転写開始点上流約 3~5-kb の領域がコアとなる活性を担うことを示した。そこで、最後に同領域を欠失した遺伝子改変マウスを作製し、高血圧環境における変異アレルの発現を解析した結果、その応答性が著しく鈍化することを明らかとした。以上の結果から、転写開始点上流約 3~5-kb のエンハンサー領域が高血圧環境における、適切な転写制御に重要であることが *in vivo* の実験系で初めて明らかとなった

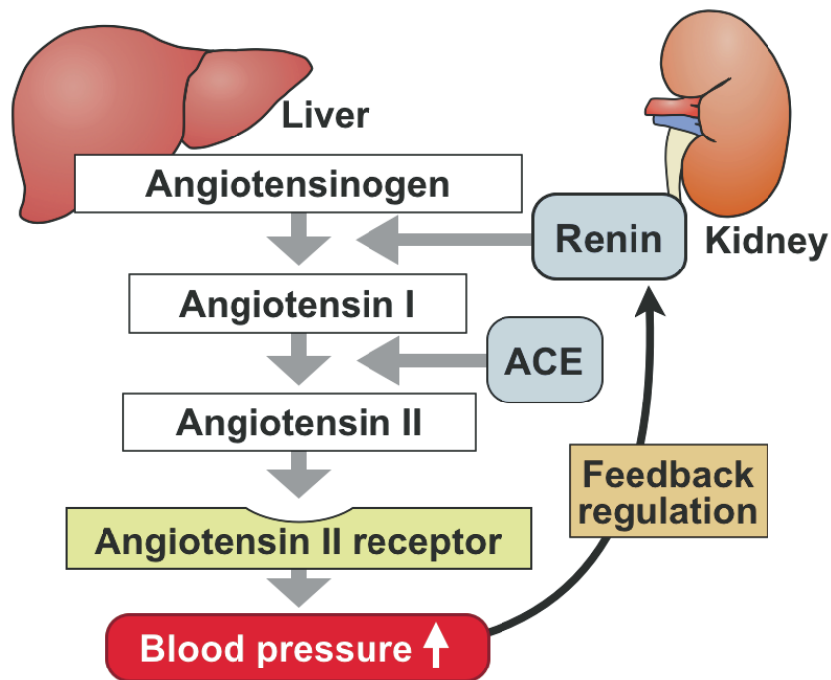


図 I-1 : レニン・アンジオテンシン系

肝臓で産生される基質アンジオテンシノーゲンに対して、腎臓で産生される酵素レニンが作用することで、アンジオテンシン I（デカペプチド）が遊離する。アンジオテンシン I は、アンジオテンシン変換酵素（ACE）により、アンジオテンシン II（オクタペプチド）へと変換される。アンジオテンシン II は、その特異的受容体を介して、血圧を上昇させる。レニンの発現は、血圧の変化によりフィードバック制御を受ける。

第2章 つくば高血圧マウスにおいて、レニン遺伝子転写は

遠位 *cis*-DNA 配列により制御される

要旨

当研究室では、過去に 15-kb のヒト・レニンと 14-kb のヒト・アンジオテンシノーゲン導入遺伝子を持つことで、アンジオテンシン II を過剰に産生し、高血圧を呈するトランスジェニック・マウス（つくば高血圧マウス； THM）を作製した。レニン遺伝子の転写は本来、血圧恒常性を維持するように制御されるにも関わらず、THM が高血圧を呈する理由は不明であった。そこで、THM とヒト・レニン導入遺伝子のみをもつ正常血圧マウスとの間で、レニン遺伝子の発現解析を行った。その結果、内在マウス・レニン遺伝子の発現量は正常に低下していたが（>1.7 倍）、ヒト・レニン導入遺伝子の発現量は上昇していた（>4.2 倍）。次に、マウス・レニン遺伝子について、15-kb ヒト・レニン導入遺伝子と相同な 13-kb の DNA 断片を用いて、遺伝子改変マウスを作製し、発現解析を行った。その結果、13-kb マウス・レニン導入遺伝子でも、THM 環境下において、その発現量が上昇した（>3.1 倍）。以上の結果は、高血圧環境に応答して転写を適切に制御する *cis*-DNA 配列がタンパク質コード領域の遠位に存在することを示唆している。そこで、次に、13-kb マウス・レニン導入遺伝子に含まれない、既知の制御領域であるマウス遠位エンハンサー配列（mouse distal enhancer; mdE）の関与を検討した。mdE を欠失した 156-kb 導入遺伝子は、THM 環境下でその発現が抑制されたことから、mdE 以外の新規制御配列が 13-kb 領域の外側、かつ 156-kb 領域の内側に存在し、レニン遺伝子の高血圧応答性転写を制御していることが示唆された。さらに、十分な制御領域を持たないレニン導入遺伝子

の挙動を胎児/新生児期の THM 腎臓について解析したが、異常な応答は確認されなかった。以上の結果は、十分な制御領域を持たないレニン導入遺伝子の高血圧環境に対する応答異常が、新生児期から成獣期までの期間のどこかで始まっていることを示している。

導入

レニンは、腎臓輸入細動脈血管壁に存在する傍糸球体細胞 (Juxtaglomerular 細胞 ; JG 細胞) で、主に発現・分泌される。その特異な位置から、同産生細胞は血圧の変動を、血管壁の伸展によるメカニカルストレス、遠位尿細管中のナトリウムイオン負荷によるマクラデンサ・シグナル、あるいは、AII 受容体を介したフィードバック制御によって感知していると考えられている (7)。また、転写制御では、レニン遺伝子の活性化に cAMP が重要な役割を果たしており、先に述べた複数の細胞外シグナルを介して細胞内 cAMP 量が調整されている (8, 9)。このようにレニン遺伝子の血圧応答性制御において、生理的シグナルに関する理解は進んでいるものの、転写因子や、*cis*-DNA 配列といった分子メカニズムについては、ほとんど明らかとなっていない。

これまでに、レニン遺伝子の転写制御に重要な役割を果たす *cis*-DNA 配列として、mouse distal enhancer (mdE) が報告されている (10, 11)。同領域はマウス・レニン遺伝子上流約 3-kb に位置し、レニン産生細胞株 As4.1 において、レニン遺伝子の転写活性を約 80 倍以上に活性化する領域として同定された (10)。さらに私達及び他の研究グループによる、遺伝子改変マウスを用いた mdE の機能解析から、同領域は *in vivo* でのレニン遺伝子の基本転写活性において必須の役割を果たすことが明らかとなっている (12, 13)。また、ヒトにおいても相同な領域が転写開始点上流、約 12-kb に位置し、*in vivo* での基本転写活性に寄与する (14, 15)。一方で、応答性制御におけるヒトとマウス・遠位エンハンサーの役割は完全には一致していない。例えば、*in vitro* での解析から、trans-activation 活性は、マウスに比べ、ヒト・遠位エンハンサー (human distal enhancer; hdE) のほうが低いことが報告されて

いる(14)。さらにこの報告と一致するように、遺伝子改変マウスを用いた解析から、ACE阻害剤によるレニン遺伝子の活性化にhdEは必須ではないが(15)、mdEは、最大レベルの活性化に必要であることが報告されており(13, 16)、その役割の種差の理解には更なる解析が必要である。

また、近年のゲノム解析技術の進歩により、DNAのループ構造を介した遠位制御領域とプロモーターとの相互作用により、遺伝子発現が精密に制御されていることが明らかとなりつつある(17)。これまで、レニン遺伝子の転写制御では、主に転写開始点近傍の領域に着目して研究が進められてきたが、その多くは生理的刺激に対する転写応答に必須でないことが我々を含めた複数のグループから報告されている(3, 18, 19)。従って、今後、応答性制御に関わる制御領域を同定するにあたり、遠位の領域にも着目する必要性が増していると考えられる。実際、過去に異なる長さのヒト・レニン導入遺伝子を持つ遺伝子改変マウスが複数作製され、興味深い報告がなされている。Sigmundらは、35-kbの5'制御領域をもつ約140-kbのヒト・レニン導入遺伝子と(18)、900-bpの5'制御領域をもつ約13-kbのヒト・レニン導入遺伝子とを作製し(2)、これらの血圧応答性転写制御を解析した。その結果、AII誘導性高血圧環境下で、140-kbのヒト・レニン導入遺伝子は、マウス内在遺伝子と同様、その転写が抑制されたが、13-kbヒト・レニン導入遺伝子では、逆に上昇していた(18)。この結果は、ヒト・レニン遺伝子の遠位には、高血圧環境下において転写を抑制する領域が存在することを示唆している。しかしながら、一方で、13-kb導入遺伝子のサイズが小さいことで、ゲノム上の挿入箇所による位置効果を受け、異常な応答を示している可能性も否定できない。

当研究室では、これまでに、2.8-kbの5'制御領域をもつ約15-kbのヒト・

レニンと 14-kb のヒト・アンジオテンシノーゲン導入遺伝子の両方を持つことで、慢性的に高血圧を呈するマウス「つくば高血圧マウス (THM)」を作製した(6)。同マウスの高血圧発症機構には、レニンとアンジオテンシノーゲンの酵素基質反応における厳密な種得異性が関与している(20)。つまり、ヒト・レニンまたは、ヒト・アンジオテンシノーゲン導入遺伝子を単独で保持するマウスにおいては、内在マウス・レニン-アンジオテンシン系との交差反応を起こさず、正常血圧を示すが、両方のヒト導入遺伝子を同時に持つ場合には、ヒト・レニンとヒト・アンジオテンシノーゲンが反応し、導入遺伝子由来の AI が産生される。AI はマウスとヒトとでアミノ酸配列が同じであるため、THM では結果として、マウス内在由来に加えて導入遺伝子由来の AI が過剰に産生され、AII に変換されることで高血圧を引き起こす。先に述べたように、レニン遺伝子は、血圧恒常性を維持するように、その転写が制御されている。しかしながら、同マウスは慢性的な高血圧を呈することから、Sigmund らの 13-kb ヒト・レニン導入遺伝子と同様に異常な制御を受けている可能性が考えられた。

そこで、本研究では、レニン遺伝子の応答性転写制御メカニズム解明の第一歩として、ヒト-マウス間での高血圧環境に対する応答性制御の保存性、ならびに、これに関わる *cis*-DNA 配列の解析を行った。まず、THM におけるヒト・レニン導入遺伝子の発現量を解析し、THM におけるその発現が、正常血圧マウスと比較して著しく上昇していることを確認した。次に、マウス・レニン遺伝子においても、ヒトと同様の制御が存在するのかを解析するために、15-kb ヒト・レニン導入遺伝子と相同な領域を保持するマウス・レニン導入遺伝子 (13-kb) を作製し、同導入遺伝子の発現も、THM において上昇することを見出した。さらに、mdE の機能解析を行った。同領

域は、13-kb マウス・レニン導入遺伝子の外側に存在し、ヒトにおける相同領域についても、15-kb ヒト・レニン導入遺伝子の外側に存在することから、同制御に関わる候補領域になり得ると考えた。しかしながら、156-kb のレニン遺伝子座から mdE を欠失した変異型大腸菌人工染色体 (Bacterial artificial chromosome; BAC) 導入遺伝子を用いた解析から、mdE は高血圧環境下におけるマウス・レニン遺伝子の転写抑制に必須でないことが明らかとなった。以上のことから、マウス・レニン遺伝子の高血圧環境応答性領域がヒトと同様にタンパク質コード領域の遠位に存在し、種間で保存された応答性メカニズムが存在する可能性が示唆された。

さらに、当研究室では、ヒト・アンジオテンシノーゲン導入遺伝子をもつメスマウスに、ヒト・レニン導入遺伝子をもつオスマウスを交配させることで、妊娠中に胎児胎盤系由来のレニンが母体に流入し、妊娠後期に高血圧を呈する妊娠高血圧マウス (Pregnancy-associated hypertensive mice; PAH mice) を作製している (21)。本研究のこれまでの結果から、成獣期において、15-kb のヒト・レニン導入遺伝子が高血圧に対して、異常な応答を示したことから、PAH マウスにおいても、胎児が保持するヒト・レニン導入遺伝子が異常に活性化することで、母体の高血圧が引き起こされたのではないかと考えた。そこで、胎児期 (17.5dpc) 及び、新生児期 (生後 1 日齢) におけるレニン導入遺伝子の発現を解析した。その結果、15-kb ヒト・レニン導入遺伝子の発現は THM の遺伝子型をもつ胎児/新生児において、正常に抑制されていた。また、胎児期における 13-kb マウス・レニン導入遺伝子の発現量は、THM とヒト・レニン導入遺伝子のみをもつマウスとの間で差がなかった。以上の結果から、PAH マウスにおける高血圧は、胎児腎臓におけるヒト・レニン導入遺伝子の応答性制御異常によるものではないこと、さらに、THM におけるヒト・レニン導入遺伝

子の異常な発現上昇は、生後から成獣期までのどこかの時期に始まることが明らかとなった。

結果

つくば高血圧マウスにおけるレニン遺伝子の発現解析

高血圧状態の THM において、レニン遺伝子の発現が、血圧恒常性を維持するための制御を正常に受けているのかについて確認するために、以下の実験を行った。まず、THM と正常血圧マウスとの間で、レニン遺伝子の発現を比較するために、ヒト・アンジオテンシノーゲン導入遺伝子をヘテロ (+/-) に持つオスマウスと 15 kb のヒト・レニン導入遺伝子をホモ (+/+) に持つメスマウスとを交配し、ヒト・レニン導入遺伝子のみをもつ正常血圧マウス (ctrl) と、ヒト・アンジオテンシノーゲンとヒト・レニン導入遺伝子をともに持つ高血圧マウス (THM) を得た (図 II-1A)。これらマウス (8 週齢) の腎臓を用いて、RT-qPCR 法による遺伝子発現解析を行った。その結果、THM におけるマウス・レニン内在遺伝子の発現は、正常血圧マウスのそれと比べて低下していた (図 II-1B)。これは血圧恒常性維持の観点から考えると正常な応答である。これに対し、ヒト・レニン導入遺伝子の発現は THM で上昇していた (図 II-1C)。同結果は、ヒト・レニン導入遺伝子の発現制御が正常に機能していないことを示している。

15-kb ヒト・レニン導入遺伝子と相同なマウス・レニン導入遺伝子の作製

ヒト・レニン導入遺伝子が高血圧に正常に応答しなかった理由として、二つの可能性が考えられる。一つ目は、種の違いにより、ヒト導入遺伝子がマウス個体内で、正常に機能できなかった可能性、二つ目は、導入遺伝子として用いたヒト・レニン遺伝子の長さが短いために、高血圧応答に関わる機能領域を欠失している可

能性である。Sigmund らの報告(18)では、140-kb のヒト・レニン導入遺伝子は高血圧環境下で、正常にその発現が抑制されていることから、後者の可能性が高いと考えられる。つまり、ヒトでは、レニン遺伝子の遠位に応答性領域が存在することが示唆される。一方、マウスにおいては、同様の機能領域の存在やその位置は全く分かっていない。また、ヒトとマウスで同じメカニズムにより高血圧環境応答性が制御されているのかについても不明である。

そこで、これらの疑問に答えるための第一段階として、15-kb のヒト・レニン導入遺伝子と相同な制御領域を持つマウス・レニン導入遺伝子を用いて、遺伝子改変マウスの作製を試みた。このために、まず Ensembl ゲノム解析プログラム (<http://www.ensembl.org/>)を用いて、ヒトとマウス・レニン遺伝子の相同性比較を行った(図 II-2A)。その結果、15-kb のヒト・レニン導入遺伝子と相同なマウス・レニン遺伝子の範囲は、約 1-kb の 5' 側上流制御配列を含む、全長約 13-kb の領域であることがわかった。そこで、同 13-kb の領域を RPCI23-240p23+FRT BAC クローンから、リトリービング法によりサブクローニングし(図 II-2B)、レニン遺伝子を含む DNA 断片 (*Bss*HII 断片)をマウス受精卵前核に顕微注入することで遺伝子改変マウスを作製した。同 BAC クローン中のレニン遺伝子 3' 非翻訳領域 (untranslated region; UTR) には、133-bp の FRT 配列 (*Sfi*I/*Pvu*II 認識サイト)が挿入されており、マウス内在のレニン遺伝子と区別することが可能である(図 II-2C)。作製した遺伝子改変マウスについて導入した遺伝子断片の全長が保持されていることを、パルスフィールドゲル電気泳動法を用いたサザンブロット法により確認した(図 II-2D)。また、導入遺伝子のコピー数を、バンドの濃さを定量することで推定した(図 II-2E)。その結果、TgM 系統 244 では、84 コピー、系統 179 では、7 コピーの導入遺伝子を

保持することが分かった。

腎臓における導入遺伝子の基本転写量の解析

作製した遺伝子改変マウスが多コピーの導入遺伝子を保持することから、マウス・レニン遺伝子の過剰発現が予想された。そこで、8週齢の遺伝子改変マウスの腎臓からRNAを抽出し、ノーザンブロット法により、発現解析をおこなった。マウス・レニン遺伝子のcDNAをプローブとして用い、内在と導入レニン遺伝子の発現を同時検出した。その結果、野生型と遺伝子改変マウスとの間で、レニン遺伝子の発現量に大きな差は見られなかった(図II-3A)。そこで次に、レニン導入遺伝子3'UTRに挿入されたFRT配列部分を認識するプライマーをqRT-PCR法に用いることで、導入遺伝子の発現を特異的に検出した(図II-3B)。解析の結果、遺伝子改変マウスでのみ、導入遺伝子の発現が検出され(図II-3C)、ノーザンブロット解析の結果とあわせて考えると、導入遺伝子の転写はそれほど多くないことが分かった。しかしながら、本研究の目的は、導入遺伝子の高血圧環境応答性、つまり発現量の変化を解析することであり、その高発現は必須ではない。逆に、導入遺伝子の高発現により、血圧が上昇してしまうと、血圧環境応答性を解析する実験系としては適切でない。実際に、同遺伝子改変マウスの血圧を測定した結果、野生型マウスと同程度であった(表II-1)。以上のことから、今回作製した遺伝子改変マウスをもちいて、導入遺伝子の高血圧環境応答性発現解析を行うこととした。

高血圧環境における 13-kb マウス・レニン導入遺伝子発現解析

高血圧環境における 13-kb マウス・レニン導入遺伝子の発現を解析するた

めに、13-kb 導入遺伝子を、交配により先に示した正常血圧 (ctrl)、または高血圧 (THM) マウスに導入した (図 II-4A)。これらの遺伝子型をもつ、8 週齢マウスの腎臓を用いて、13-kb マウス・レニン導入遺伝子 (図 II-4BC)、内在マウス・レニン遺伝子 (図 II-4DE)、ヒト・レニン導入遺伝子 (図 II-4FG) の発現を qRT-PCR 法により解析した。その結果、マウス・レニン導入遺伝子の発現は高血圧環境下で上昇していた。また、このとき、THM の場合と同様に、内在レニン遺伝子の発現は正常に低下し、ヒト・レニン導入遺伝子の発現は上昇していることを確認した。従って、THM において、ヒト・レニン導入遺伝子が高血圧環境に正常に応答できなかった理由は、種間の差ではなく、高血圧環境応答性領域が欠失しているためであると考えられる。

高血圧環境における mouse distal enhancer (mdE) の役割の検討

これまでの結果から、マウス・レニン遺伝子の高血圧環境応答性領域は 13-kb の領域の外側に存在すると考えられた。そこで、同領域の候補として、mdE に着目した。mdE はレニン遺伝子上流約 3-kb に存在し、13-kb 導入遺伝子の外側に位置する。また、ヒトにおけるその相同配列はレニン上流約 12-kb に存在し、15-kb ヒト・レニン導入遺伝子の外側に位置する (図 II-2A)。mdE は、cAMP 応答性領域 (cAMP-responsive element; CRE) をはじめとして、多くの転写因子結合配列を持ち、レニン遺伝子の転写制御に重要な役割を果たしている。そこで、以前に当研究室で作製したマウス・レニン BAC 導入遺伝子を保持する遺伝子改変マウスを用いて (13)、高血圧環境応答における同領域の機能を検証することとした。同 BAC 遺伝子改変マウスは、野生型 (mdE-wt) もしくは、欠失型 (mdE-mt) の mdE 配列を含む 156-kb のマウス・レニン導入遺伝子を同一の染色体上の位置に保持するマウスである。こ

これらの遺伝子座について、13-kb マウス・レニン導入遺伝子の場合と同様のストラテジーによって、正常血圧 (ctrl)、もしくは高血圧環境下 (THM) に導入した (図 II-5A)。同マウスについて、BAC 導入遺伝子 (図 II-5B)、内在マウス・レニン (図 II-5C)、ヒト・レニン Tg (図 II-5D) の発現解析を行った結果、まず、mdE-wt と mdE-mut BAC 導入遺伝子の ctrl 群での発現量を比較すると、wt と比較して mut では、その基本発現量が顕著に低下していた。これは先行研究で示された mdE がマウス・レニン遺伝子転写活性の 80% に寄与することと一致する (13)。次に、高血圧環境応答性に着目すると、まず mdE-wt BAC 導入遺伝子は ctrl 群と比べ、THM において、その発現量が顕著に低下していた。さらに、基本転写量が低い mdE-mut BAC 導入遺伝子についても、THM におけるその転写量が、ctrl 群と比べて有意に低下していた。また、このとき、内在マウス・レニン、ヒト・レニン導入遺伝子についてはこれまでと同様の挙動を示すことを確認した。以上の結果から、mdE は高血圧環境下における転写抑制に必須でないこと、また同制御には 156-kb の領域で十分であることが明らかとなった。

胎児/新生児期におけるレニン遺伝子の発現解析

これまでの解析から、十分な制御領域を持たないレニン導入遺伝子は、成獣期の高血圧環境下で異常な制御を受けることが分かった。そこで、次にこの異常な制御が胎児期においても起こっているのかについて調べた。そこで、図 II-4A に示す交配を行い、出産前の胎生 17.5dpc で胎児を帝王切開により摘出し、その腎臓を用いて発現解析を行った。その結果、17.5dpc では、THM の遺伝子型を持つマウス個体におけるマウス・レニン導入遺伝子の発現は、ctrl マウス個体におけるそれと

比べて変化せず（図 II-6AB）、一方ヒト・レニン導入遺伝子（図 II-6EF）の発現は低下していた。また、内在マウス・レニン遺伝子については、成獣の場合と同様に、THM の遺伝子型を持つマウスにおいて、その発現が低下していた（図 II-6CD）。この胎児期における発現解析の結果は、成獣期での結果と大きく異なっていた。そこで次に、胎児期と成獣期での応答性の違いが、子宮内外の違いによるのかを確認するために、新生児期におけるレニン遺伝子の発現を解析した。その結果、内在マウス・レニン、及びヒト・レニン導入遺伝子の発現は、THM の遺伝子型を持つマウスにおいて、有意に低下していた（図 II-6GH）。以上の結果は、十分な制御領域を持たないレニン導入遺伝子の発現が、生後から成獣期の間どこかで、異常に上昇し始めることを示している。

考察

高血圧環境におけるヒトとマウス・レニン遺伝子の転写は遠位領域により制御される

レニンは、血圧恒常性維持の為にその発現（分泌や転写）が厳密に制御される。レニン遺伝子は、血圧の変化を、血管壁への圧付加や、アンジオテンシン II 濃度の変化、マクラデンサを介した遠位尿細管中の NaCl 濃度の変化等として感知すると考えられるが(7)、関与するシグナルや、*cis*-DNA 配列は明らかとなっていない。Sigmund らによる、13-kb と 140-kb ヒト・レニン導入遺伝子を用いたトランスジェニックマウスの解析結果から(2, 3, 18)、ヒト・レニン遺伝子において、遠位に高血圧応答性領域が存在することが示唆されていたが、マウスにおける同領域の位置は全く不明であった（表 II-2）。

本研究では、まず、THM における 15-kb のヒト・レニン導入遺伝子と 13-kb マウス・レニン導入遺伝子の発現解析により、ヒトとマウスの高血圧応答性領域がともにタンパク質コード領域の遠位に存在し、その制御メカニズムが保存されている可能性を示した。さらに、マウスにおける高血圧応答性配列の候補として、mdE に着目し、その機能解析を行った。野生型または mdE 欠失型 156-kb マウス・レニン BAC 導入遺伝子の解析より、同領域は高血圧環境における応答性制御に必須でないことが明らかとなった。最後に、導入遺伝子に含まれる制御配列が十分でなかったことによる高血圧応答性制御の異常が、THM に見られた高血圧の原因となっていることが考えられたため、PAH においても、胎児腎臓における同様の応答性異常が起きている可能性を考えた。そこで、胎児及び、新生児腎臓におけるレニン遺伝子の発現を解

析した結果、興味深いことに、THM の遺伝子型をもつマウスにおいて、ヒトとマウス・レニン導入遺伝子の異常な発現上昇は生じておらず、ヒト・レニン導入遺伝子では、むしろ正常な応答が観察された。これらの結果は、PAH における高血圧の原因が胎児腎臓でのレニン遺伝子応答性異常によるものではないこと、レニン導入遺伝子の発現上昇が生後から成獣期にかけてのどこかの時期で生じていることを示している。

血圧環境応答性転写制御研究における、*in vivo* 解析系の重要性

これまでに、レニン遺伝子の転写制御研究は、マウス・レニン産生細胞株である As4.1 やヒト・肺がん由来レニン産生細胞株である Calu-6 を用いて精力的に行われ、転写開始点近傍に位置する複数の転写制御領域が同定された(4)。しかしながら、これら領域の *in vivo* での解析結果は、培養細胞での結果と必ずしも一致しない。例えば、基本転写、及び、食塩負荷や脱水などの生理的刺激に対する応答に重要であることが示唆されていた CNRE [overlapping cAMP-responsive (CRE) and negative regulatory elements (NRE)] 配列(22)が、当研究室でのマウス・レニン BAC 導入遺伝子を用いた解析では、これらの刺激応答に対して必須でないことが判明した(19)。また、同 CNRE 配列は、今回作製した 13-kb TgM にも含まれていることから、高血圧応答性にも十分でないと考えられる。

mdE は、レニン遺伝子の転写調節において、重要な役割を果たすエンハンサーであるが、同領域の血圧応答性転写制御への関与は完全には分かっていない。他のグループのノックアウト・マウス(16)、及び当研究室の BAC TgM の解析から(13)、同領域は ACE 阻害剤投与におけるレニン遺伝子の転写誘導において、最大レベルの活性化に必要であることが示されている。一方で、ヒトにおける同エンハンサーの

相同配列である hdE は、血圧降下作用をもつ ACE 阻害剤処理による転写誘導、及び高血圧応答性制御に必須でないことが報告されており (15)、血圧応答性制御における、ヒトとマウスでの種間の差が示唆されていた。今回、我々は、mdE 欠失型 BAC 導入遺伝子を用いて、同領域が高血圧応答性に必須でないことを示した。従って、低血圧応答性制御においては、種間の差が存在するものの、高血圧応答性制御においては、種間の差はないと考えられる。

このように、培養細胞を用いて同定されてきた *cis*-DNA 配列の多くが、個体レベルでの応答性制御に重要な意味を持たない理由として、生理的刺激を培養細胞系で再現することが困難であることが挙げられる。JG 細胞は血管や遠位尿細管と隣接し、これら周囲の細胞から、様々なシグナルを受けとること予想される。しかしながら、培養細胞系では、これらの複合的な要素の影響を調べることができないため、結果的に基本転写活性に必要な領域しか見出せていないことが考えられる。従って、真の応答性に関与する領域の同定・検証には、*in vivo* での解析が必須である。

胎児/新生児期 THM では、15-kb ヒト・レニン導入遺伝子は異常な応答性を示さない

本研究における胎児及び、新生児腎臓の解析結果から、THM の遺伝子型をもつ胎児における 15-kb ヒト・レニン導入遺伝子の発現は、同腹のコントロールのそれと同様に、その発現が正常に低下していた。ヒト・アンジオテンシノーゲン導入遺伝子は、少なくとも、胎生 16.5 日から、出生後、成獣にかけて、肝臓や腎臓で十分に発現していることが報告されている (23)。従って、胎児血中でもアンジオテンシン II は産生されていると考えられる。また、羊を用いた解析から、胎児に直接

アンジオテンシン II を投与することで、胎児血圧が上昇し、血中レニン活性は低下することが報告されている(24)。従って、THM 胎児における 15-kb のヒト・レニン導入遺伝子発現は AII の増加や、それに伴う圧付加に応答してその発現が低下していることが予想される。一方で、13-kb マウス・レニン導入遺伝子発現は、ctrl と THM 胎児腎臓との間で有意な違いはみられず、応答性における種間の差があると考えられる。

さらに本研究の結果から、PAH マウスでの高血圧の原因は、胎児腎臓でのレニン転写制御応答の異常ではなく、Takimoto らの報告で示されているように、妊娠後期の胎盤におけるヒト・レニン遺伝子の発現上昇が主な原因であると考えられる(21)。一方で、この胎盤での発現上昇が、15-kb ヒト・レニン Tg の遠位制御領域の欠失により起きている可能性は否定できない。ヒトの胎盤を用いた研究では、内在ヒト・レニン遺伝子の発現は妊娠初期に高く、後期では減少することが報告されており(25)、これは PAH マウスでの実験結果と異なる。実際に、Pinet らは、ヒト・レニン遺伝子上流、-5.8~-5.5-kb の位置に、胎盤絨毛膜エンハンサー領域を同定している(26)。ヒト・レニン導入遺伝子がこの領域を欠失していることで、胎盤での発現制御異常が起こっているのかもしれない。

まとめ

以上、本研究から、ヒトとマウス・レニン遺伝子は、ともに遠位に高血圧応答性領域を持つこと、マウスにおける高血圧応答性領域は、156-kb 領域の内側、かつ 13-kb 領域の外側に存在することが示唆された。さらに mdE を含む近位の制御領域は同制御に必須でないことが明らかとなった。また、十分な制御領域を持たな

いレニン導入遺伝子の、THMにおける発現様態は、胎児/新生児期と成獣期とで大きく異なるが、内在マウス・レニン遺伝子の応答性は常に正常であった。従って、レニン遺伝子の遠位制御領域は、成獣期での高血圧環境における適切な転写制御に重要であると結論できる。

材料と方法

13-kb マウス・レニン遺伝子断片の作製

本研究で用いたマウス・レニン遺伝子 DNA 断片は、マウス *Ren-1c* 遺伝子を保持する BAC クローン、RPCI23-240p23 (GenBank 登録番号 AC068906) から得た。同クローンの 89,006 nucleotide [nt] の位置が *Ren-1c* 遺伝子の転写開始点に相当し、以後、この位置を+1 として表す(図 II-2B 上部; 27)。同 BAC の 3' 側非翻訳領域(+9,482 nt) には、内在レニン遺伝子の配列と区別するために、flip recombinase recognition target (FRT) 配列を含む 133-bp の DNA 断片を、先行研究において挿入してある(図 II-2B 上部; RPCI23-240p23+FRT; 19)。DNA 断片の回収には、defective prophage λ -Red recombineering システムを用いた(28)。まず、pBluescriptII KS(+) の *KpnI/SacI* 部分を、複数の制限酵素認識部位を含む 2 本鎖 DNA 断片 (KSSOMASBS と命名) と入れ替え、pBS-MCS を作製した。同断片は以下に示す 2 種類のオリゴヌクレオチドをアニーリングした後、2 本鎖 DNA の 5' 側末端を、T4 polynucleotid kinase によりリン酸化することで作製した。

KSSOMASBS-S: 5'-C-GGCCAAAAAGGCC (*SfiI*)-ACTAGT (*SpeI*)-CTCGAG (*XhoI*)-AACG-
ACGCGT (*MluI*)-CGAA-CTTAAGGCCAAAAAGGCC (*AflIII/SfiI*)-GCGCGC (*BssHII*)-GAGCT-3'

KSSOMASBS-A: 5'-C-GCGCGC (*BssHII*)-GGCCTTTTGGCCTTAAG (*SfiI/AflIII*)-TTCG-
ACGCGT (*MluI*)-CGTT-CTCGAG (*XhoI*)-ACTAGT (*SpeI*)-GGCCTTTTGGCC (*SfiI*)-GGTAC-3'

次に、pBS-MCS の *MluI/XhoI* 部位に、RPCI23-240p23+FRT BAC 由来 *MluI-XhoI* 断片 (94,530-105,069 nt) を挿入した。同プラスミドを *AfeI* と *XhoI* で消化後、Klenow 断片によって末端を平滑化し、セルフライゲーションさせた (pmRen-3' fr)。同配

列はリトリービングの際、3' 側相同配列 (図 II-2B 上部; *Mlu*I-*Afe*I [94, 530-100, 425 nt]) となる。5' 側相同配列は、下記のプライマーセットを用いて、BAC DNA を鋳型として PCR により増幅した。

REN-RET-5' Short-5s: 5'-aaag-gcgcgc (*Bss*HII)-cGAGGTTAGA-ctcgAG (*Xho*I)-

GTTACTTTTCCA-3'、REN-RET-5' Short-3a: 5'-tttcg-acgcgt (*Mlu*I)-

CCAAGCTAGGTAGGTATAGGATAAGCA-3'

同配列を *Bss*HII と *Mlu*I で消化した後、pmRen-3' fr の *Mlu*I 部位にクローニングした。

同プラスミドを *B*lpI/*Mlu*I で線状化した後 (図 II-2B 中部)、240P23+FRT BAC を保持する大腸菌 (EL250) の形質転換に用いた。アンピシリン耐性による薬剤選択の後、目的の形質転換体を制限酵素処理、及び塩基配列決定により同定した。

遺伝子改変マウスの作製

リトリービング後のプラスミドを *Bss*HII で消化し、導入用遺伝子断片を精製した。同断片を CD1 マウス (日本チャールス・リバー、神奈川、日本) より得た受精卵の前核に顕微注入した。得られた仔の尻尾から DNA を抽出し、PCR 法とサザンブロット法によって遺伝子改変マウスを選別した。

動物実験

実験に用いたマウスは、SPF 飼育室にて、12 時間明期/12 時間暗期の明暗サイクルで飼育した。成獣期 (8 週齢)、新生児期 (1 日齢) のマウスそれぞれについて、頸椎脱臼、断頭による安楽死後、即座に腎臓を摘出、液体窒素により凍結し、-80°C で保管した。胎児期マウス (17.5 days of gestation [dpc]; 臍栓がついた日

を 0.5dpc とする) についても、腎臓を摘出後、液体窒素により即座に凍結し、-80℃で保管した。すべての動物実験は、国立大学法人筑波大学動物実験取扱規程に基づき、動物実験委員会の承認を得て実施した。

導入遺伝子のコピー数及び構造の解析

アガロース包埋された高分子胸腺ゲノム DNA を *Sfi*I で処理し、パルスフィールドゲル電気泳動法によって展開後、ナイロン膜 (PerkinElmer, Waltham, MA) に転写した。これを、 α -³²P 標識した DNA プローブ (98, 147-98, 713 nt [AC068906]) とハイブリダイゼーションした後、X線フィルムによってオートラジオグラムを得た。コピー数解析については、野生型マウスゲノムに対して、レニン遺伝子配列を含む既知濃度のプラスミドを様々な濃度で混ぜ、検出されたバンドを定量し、検量線を作製することで決定した。バンドの定量には、Phosphorimager と ImageQuant (GE Healthcare, Princeton, NJ) を用いた。

ノーザンブロット法を用いた導入遺伝子の発現解析

マウス腎臓より ISOGEN (ニッポンジーン、東京、日本) を用いて、トータル RNA を抽出し、既報に倣ってノーザンブロット解析をおこなった (19)。 α -³²P 標識したマウス・レニンの cDNA プローブ (GenBank 登録番号 NM031192、303-1, 123 nt)、あるいは、マウス・*GAPDH* の cDNA プローブ (GenBank 登録番号 M32599、565-1, 017 nt) を用いてハイブリダイゼーションをおこない、X線フィルムによってオートラジオグラムを作製した。

Quantitative RT-PCR

トータル RNA を鋳型として、ReverTraAce qPCR RT Master mix with gDNA Remover (TOYOBO、大阪、日本) により、cDNA を合成した。定量 PCR には、SYBR Premix EX Taq II (TaKaRa Bio、滋賀、日本)、Thermal Cycler Dice (TaKaRa Bio) を用いた。PCR プライマー配列は以下の通りである。

内在マウス・レニン遺伝子検出用プライマーセット、

ER_n-RRTPCR5S: 5'-GCCCTCTGCCACCCAGTAA-3' and

ETR_n-RRTPCR3A: 5'-CAAAGCCAGACAAAATGGCCC-3'.

導入マウス・レニン遺伝子検出用プライマーセット、

TR_n-RRTPCR5S-N1: 5'-CATCCACCGGATCTAGATAAC-3' and

ETR_n-RRTPCR3A: 5'-CAAAGCCAGACAAAATGGCCC-3'.

導入ヒト・レニン遺伝子検出用プライマーセット、

hREN-RTPCR-5S: 5'-GCTTTCTCAGCCAGGACATC-3' and

hREN-RTPCR-3A: 5'-TGCCAATGGCCTGTTCAATG-3'.

内在 GAPDH 遺伝子検出用プライマーセット、

GAPDH-5S: 5'-AAAATGGTGAAGGTCGGTGTG-3' and

GAPDH-3A: 5'-TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT-3'.

血圧測定

収縮期血圧は自動血圧測定装置 (Programmable sphygmomanometer BP-200、Softron、東京、日本) を用いて、文献に倣い(1)、Tail-cuff 法により測定した。

表 II-1: 13-kb マウス・レニン導入遺伝子を保持するマウスにおける収縮期血圧 (SBP)

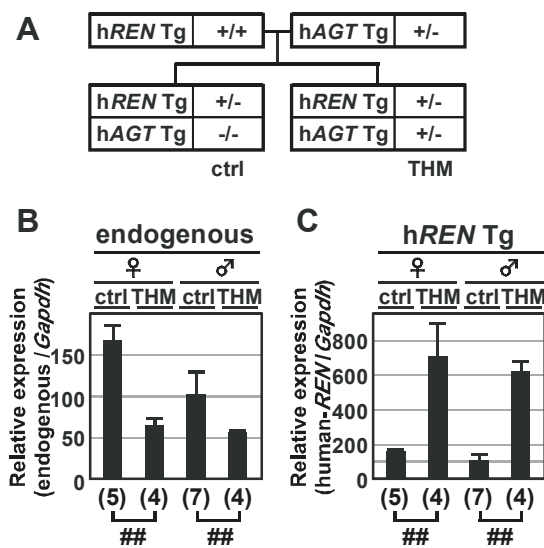
	Female			Male		
	non-TgM	mRen TgM		non-TgM	mRen TgM	
		line 244	line 179		line 244	line 179
n	6	4	4	7	3	4
SBP (mmHg)	109.5 ± 4.3	114.3 ± 5.5	115.4 ± 16.7	109.2 ± 5.5	104.3 ± 2.6	106.0 ± 10.8

n : 各群における解析個体数 TgM : 遺伝子改変マウス (Transgenic mice)

表 II-2: THM におけるヒトとマウス・レニン導入遺伝子の発現応答

<i>Renin</i> gene expression in hREN/hAGT double TgM (THM)				
		Adult	Fetus	
13-kb Tg	human	↑	N.D.	Thompson <i>et al.</i> ²
15-kb Tg	human	↑	↓	This study
140-kb Tg	human	↓	N.D.	Sinn <i>et al.</i> ¹⁸
13-kb Tg	mouse	↑	→	This study
156-kb Tg	mouse	↓	N.D.	This study
endo. wild-type	mouse	↓	↓	This study
endo. 5'-large-del	mouse	→	N.D.	This study

Tg, transgene; endo., endogenous; ↓, 抑制; ↑, 活性化; →, 不変; N.D., not determined.



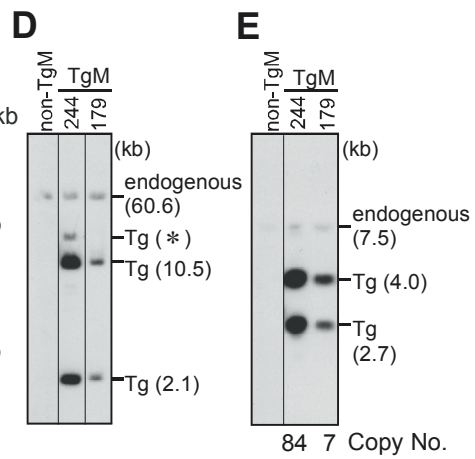
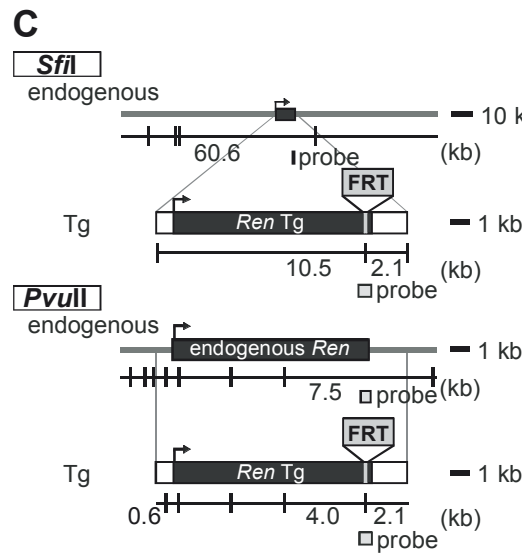
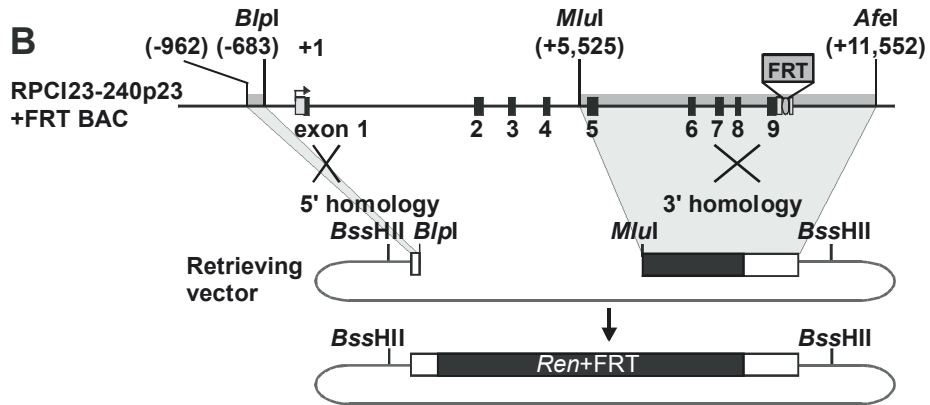
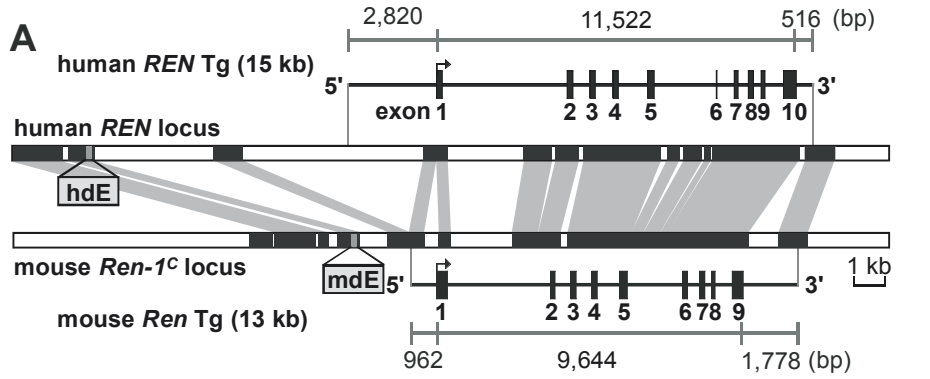
図II-1：つくば高血圧マウス（THM）におけるレニン遺伝子の発現解析

(A) 正常血圧マウスとつくば高血圧マウスとを得るための交配。ヒト・レニン（*hRen*）導入遺伝子（Tg）をホモ（+/+）に持つマウスと、ヒト・アンジオテンシノーゲン（*hAgt*）導入遺伝子をヘテロ（+/-：保持している場合を+、しない場合を-で示す）に持つマウスとを交配することで、ヒト・レニン導入遺伝子のみを持つ正常血圧マウス（ctrl）と、ヒト・レニン/アンジオテンシノーゲン遺伝子をともに持つ、つくば高血圧マウスを得た。

(B) qRT-PCR 法による、マウス・レニン内在（endogenous）遺伝子の発現解析。マウス *GAPDH* 遺伝子の発現量を内部標準として補正を行った。

(C) qRT-PCR 法による、ヒト・レニン導入遺伝子（*hREN Tg*）の発現解析。（B）と同様に解析を行った。

括弧内：解析個体数。##： $P < 0.01$ 。



図II-2 : マウス・レニン遺伝子 (13-kb) 導入マウスの作製

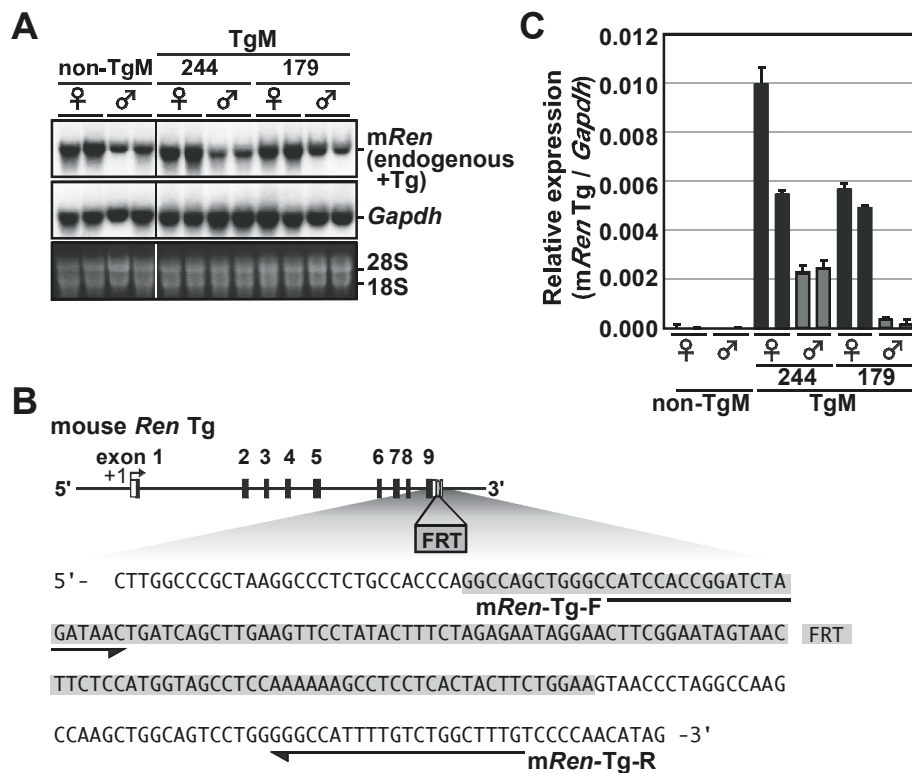
(A) Ensembl ゲノム解析プログラムによるヒトとマウス・レニン遺伝子の相同性比較。ヒトとマウスのレニン遺伝子座間で相同性が高い領域を灰色のバーで連結してある。hdE と mdE (灰色のボックス) は、それぞれヒトとマウスの遠位エンハンサー領域である。導入遺伝子の 5' 側と 3' 側制御領域、およびタンパク質コード領域の長さ (bp) を数字で示す。

(B) マウス・レニン BAC クローン (RPCI23-240p23+FRT) 内で、リトリービングベクターに用いた相同配列の位置を灰色の太線で示す (上段)。3' 側相同配列は、制限酵素により切り出し (*Mlu*I-*Afe*I断片)、5' 側相同配列 (-962~-683 nt) は、PCR により作製した (中段)。リトリービング反応後、*Bss*HII 制限酵素により DNA 断片を回収し、マイクロインジェクションに用いた。タンパク質コード領域を黒、5'、および3' 側制御領域を白の四角形で示す (下段)。

(C) マウス・レニン内在、及び、導入遺伝子の制限酵素地図。導入遺伝子では、FRT 配列の挿入により、*Sfi*I と *Pvu*II 認識部位を新たに生じ、内在遺伝子と区別することが可能となる。*Sfi*I と *Pvu*II 部位を縦線で示す。各制限酵素でゲノム DNA が完全に消化された場合に生じることが予想される DNA 断片の大きさ (kb) を数字で示す。(D) と (E) で用いたプローブの位置を灰色の四角で示す。

(D) *Sfi*I を用いたサザンブロット解析の結果。TgM の下に系統番号、パネルの右側に、予想されるバンドの大きさ (kb) を示す。アスタリスクは、部分的に切断されたDNA断片の位置を示す。以降、図中の線は、同じゲル上で泳動したが、隣接したレーンではないことを示す。

(E) *Pvu*II を用いたサザンブロット法の結果。図の説明は (D) と同じ。バンドの濃さを定量することで、各 TgM 系統の導入遺伝子のコピー数を推定し、パネルの下に示した。

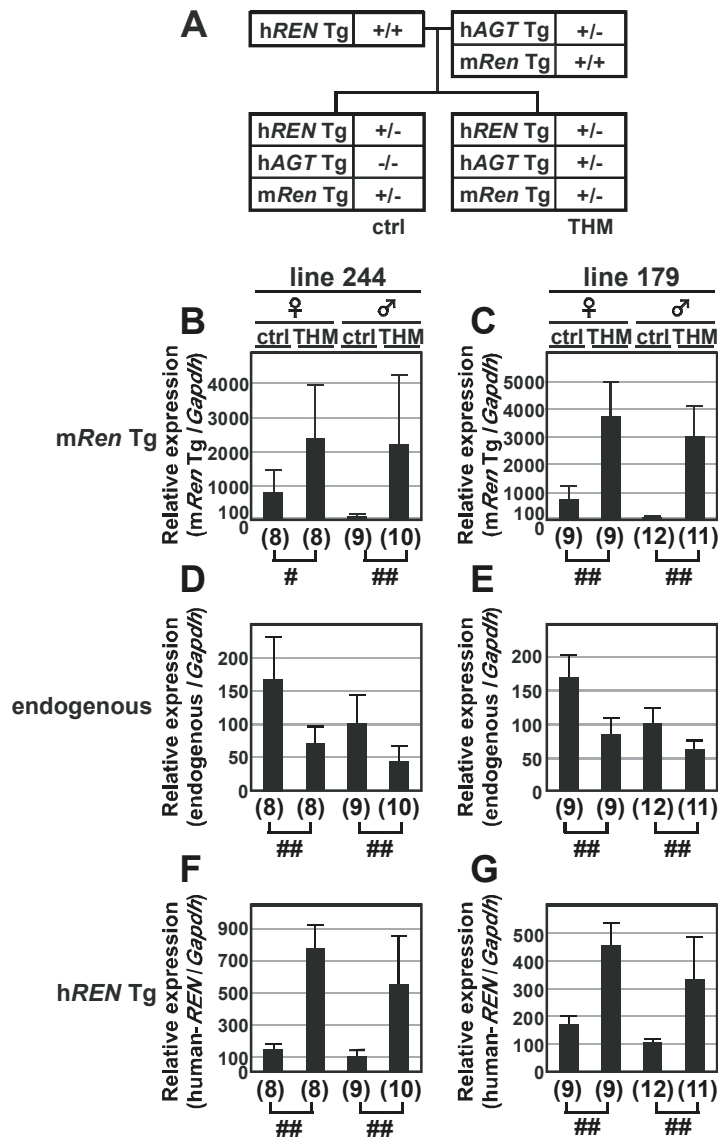


図II-3 : マウス・レニン導入遺伝子 (13-kb) の基本転写量の解析

(A) 非遺伝子改変マウス (non-TgM) 、および遺伝子改変マウス (TgM) における、レニン遺伝子発現量のノーザンブロット法による解析。腎臓由来のトータル RNA (20 g) を、1.2% アガロースで泳動し、ノーザンブロットを行った。マウス・レニン cDNA 断片をプローブとして用い、内在と導入遺伝子由来のレニン mRNA を同時に検出した。non-TgM、および、各 TgM 系統において、メス、オス各 2 匹ずつ解析した。上段から、マウス・レニン遺伝子とマウス *GAPDH* 遺伝子の発現、および、エチジウムブロマイドによる RNA の染色結果を示す。

(B) マウス・レニン導入遺伝子 3' 側非翻訳領域の配列。FRT 配列を網がけして表示した。(C) の qRT-PCR 解析に用いたプライマー配列を矢印で示す。

(C) qRT-PCR 法による、マウス・レニン導入遺伝子の発現解析。マウス *GAPDH* 遺伝子の発現量を内部標準とし、補正を行った。各サンプル、3回の PCR 反応を行い、平均値と標準偏差を示した。

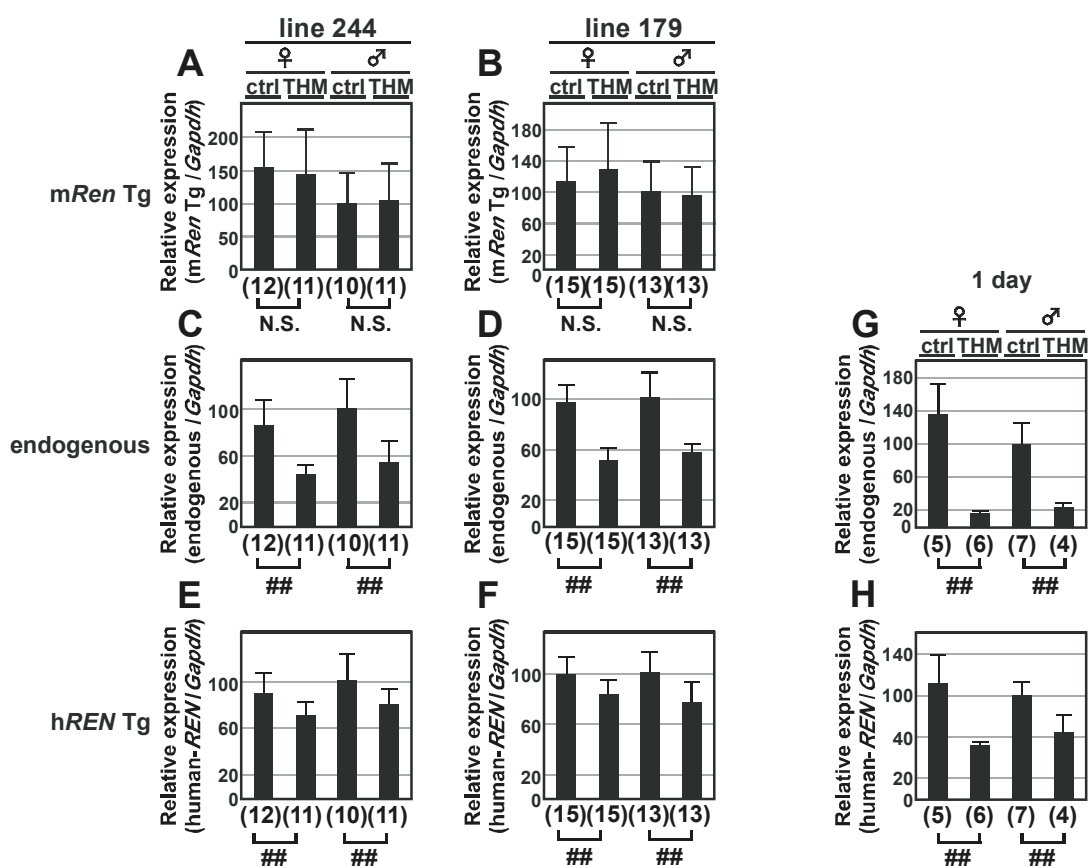


図II-4 : THM におけるマウス・レニン導入遺伝子 (13-kb) の発現解析

(A) マウス・レニン導入遺伝子を正常血圧 (ctrl)、あるいは高血圧 (THM) マウス環境下に導入するための交配計画。

(B-G) 8週齢の正常血圧 (ctrl)、あるいは高血圧 (THM) マウス腎臓からトータル RNA を抽出し、qRT-PCR を行った。マウス・レニン導入遺伝子 (mRen Tg line 244; B, line 179; C)、マウス・内在レニン (endogenous; DとE)、ヒト・レニン導入遺伝子 (hREN; FとG)、GAPDH 遺伝子 (data not shown) について発現量を解析し、マウス GAPDH 遺伝子の発現量を内部標準として補正を行った。各グラフにおいて、オスの ctrl 群の値を 100 とした。各グループにおいて、解析した個体数をグラフ下の括弧中に示し、平均値と標準偏差を表示した。ctrl と THM 群間での統計学的有意差は二標本 t 検定法により検定した (# : $P < 0.05$; ## : $P < 0.01$)。

17.5 dpc



図II-6：胎児/新生児 THM におけるレニン遺伝子の発現解析

(A-F) ヒト・レニン導入遺伝子のみを持つマウス (ctrl)、あるいは、ヒト・レニンとヒト・アンジオテンシノーゲンの両導入遺伝子を持つマウス (THM) の胎児期 (17.5-dpc) 腎臓からトータル RNA を抽出し、qRT-PCR を行った。マウス・レニン導入遺伝子 (mRen Tg line 244; A, line 179; B)、内在マウス・レニン (endogenous; CとD)、ヒト・レニン導入遺伝子 (hREN; EとF)、GAPDH 遺伝子 (data not shown) について発現量を解析し、マウス GAPDH 遺伝子の発現量を内部標準として補正を行った。各グラフにおいて、オスの ctrl 群の値を 100 とした。各グループにおいて、解析した個体数を各グラフ下の括弧中に表示し、平均値と標準偏差を表示した。ctrl と THM 群間での統計学的有意差は二標本 t 検定法により検定した (N.S., not significant; ##: $P < 0.01$)。

(GとH) ctrl、または THM 新生児 (1日齢) の腎臓からトータル RNA を抽出し、qRT-PCR を行った。内在マウス・レニン (endogenous; G)、ヒト・レニン導入遺伝子 (hREN; H)、GAPDH 遺伝子 (data not shown) について発現量を解析した。データ解析と統計処理は、(A-F) と同様に行った。

第3章 高血圧環境下におけるマウス・レニン遺伝子の転写は、 新規エンハンサーにより制御される

要旨

第2章の研究結果から、マウス・レニン遺伝子の高血圧応答性領域は、13-kb 導入遺伝子の外側、かつ 156-kb 導入遺伝子の内側に存在していると考えられる。そこで、まず CRISPR/Cas9 ゲノム編集法を用いて、同領域の位置を大まかに同定した。その結果、内在マウス・レニン遺伝子の下流側約 78-kb を欠失した「3'-large-del」においては、正常な応答性が確認された。一方で、上流約 63-kb を欠失した「5'-large-del」及び、上流約 17-kb を欠失した「5'-short-del」において、その高血圧応答性が消失した。以上の結果から、高血圧応答性領域は、レニン遺伝子の上流約 17-kb の範囲に存在することが明らかとなった。さらに、興味深いことに、17-kb の領域を欠失したアレルでは、レニン遺伝子の基本転写活性が約 2.5 倍低下していることが明らかとなり、同領域は正常血圧状態において、エンハンサーとして機能することが明らかとなった。そこで次に、エンハンサー活性を指標として、高血圧環境応答性領域の更なる絞り込みを行った。マウス・レニン産生細胞株 As4.1 を用いたレポーターアッセイの結果、転写開始点上流約 -20~-17-kb と -5~-3-kb の領域がエンハンサー活性に大きく寄与していることが明らかとなった。また、As4.1 細胞を用いた DNaseI hypersensitive site mapping の結果、転写開始点上流約 -5~-3-kb の領域中に新規の hypersensitive site が存在することが明らかとなった。そこで、最後に、同高感受性部位を含む約 2-kb の領域を欠失した遺伝子改変マウスをゲノム編集により作製し、高血圧環境応答性への関与を検証した。その結果、同領域は、

高血圧環境におけるマウス・レニン遺伝子の適切な転写制御に大きく貢献していることが明らかとなった。以上の結果は、転写開始点上流約-5~-3-kb に存在するエンハンサー活性が高血圧時に抑制されることで、レニン遺伝子の転写が低下することを示唆した。

導入

エンハンサーは、転写制御において根幹をなす *cis*-配列であり、その制御の破綻は発生異常や疾患の原因になり得る。近年の次世代シーケンサーによる網羅的ゲノム解析から、一つの細胞種あたり 10,000 から 150,000 もの推定エンハンサー領域が存在することが明らかとなった(29)。しかしながら、そのほとんどの機能は未だ明らかになっていない。この理由の一つとして、エンハンサーと標的遺伝子との距離が離れているために、その連関を推定できず、機能検証が困難であることが挙げられる。また、ヒト疾患と 1 塩基多型 (SNP) との全ゲノム関連解析 (Genome Wide Association Study; GWAS) において、多くの SNPs がノンコーディング領域に存在することが判明している(30)。この中には、これまで未同定であった遠位エンハンサー領域も数多く含まれており、最近、これらエンハンサー領域を対象とした治療薬の報告もあることから(31)、疾患の原因を探る上で、コーディング領域だけでなく、遠位の制御領域にも着目する重要性が増している。

レニン-アンジオテンシン系は血圧恒常性維持に重要なシステムの一つである。同系は、腎臓で産生される酵素レニンによる、基質アンジオテンシノーゲンの切断反応を出発点とし、血管収縮作用を持つアンジオテンシン II を最終産物とする昇圧系である。レニンは同系の律速段階で作用し、その触媒反応は最終的に血圧上昇を引き起こす。このためレニン遺伝子の発現は、血圧恒常性維持のために適切なフィードバック制御を受けており、高血圧時には転写が抑制され、低血圧時には活性化される(1-3)。第2章で示したように、我々は複数の遺伝子改変マウスを用いた解析から、高血圧環境応答性制御領域が、13-kb マウス・レニン遺伝子領域の外側、かつ 156-kb 領域の内側にあることを示した。しかしながら、その具体的な位置につ

いては未知である。レニン遺伝子座には、上流に隣接する *kiss1* 遺伝子まで約 20-kb の遺伝子間領域が存在している。しかしながら、これまでのレニン遺伝子の転写制御研究の多くは、転写開始点の近傍領域に着目しており、遠位領域については、候補となる制御配列すら同定されていない(7)。一方で、過去に 45-kb のヒト・レニン導入遺伝子を用いた興味深い結果が報告されている。同導入遺伝子は、上流に隣接する *kiss1* 遺伝子までの遺伝子間領域を完全に保持する。興味深いことに、同ヒト・レニンと 14-kb のヒト・アンジオテンシノーゲン導入遺伝子の両方をもつマウスは、第 2 章で述べた THM と同様にヒト・レニン-アンジオテンシン系を持つにも関わらず、高血圧を呈さない(32)。この理由として、45-kb のヒト・レニン導入遺伝子が高血圧環境に対して適切な応答を示しており、これに *kiss1* 遺伝子までの約 20-kb の遺伝子間領域が関わる可能性を示唆している。

そこで、我々は、近年開発された CRISPR/Cas9 ゲノム編集法(33)を用いて、高血圧応答性領域の絞り込みを行うこととした。同ゲノム編集法では、マウス受精卵に Cas9ヌクレアーゼと、これを標的ゲノム領域に導く guide (g) RNA とを共発現するプラスミドをインジェクションすることで、簡便にノックアウト・マウスを作製することが可能である(34, 35)。加えて、ドナー配列を共にインジェクションすることで、相同組換えを介したノックイン・マウスの作製も可能である(36)。

本研究では、同技術を用いて、レニン遺伝子上流 17-kb の領域が高血圧応答性に必要であること、更に同領域がエンハンサーとして機能することを *in vivo* において示した。また、マウス・レニン産生細胞 As4.1 を用いた *in vitro* の実験でも同領域がエンハンサーとして機能することを確認し、同活性を指標として、エンハンサーコア領域を約 2-kb の範囲に絞り込んだ。最後に再び、ゲノム編集をおこな

うことで、同コア領域が、高血圧環境下でのレニン転写制御に大きく寄与することを示した。これらの結果は、高血圧環境応答性エンハンサーにより、レニン遺伝子の転写応答が制御されていることを示唆した。

結果

CRISPR/Cas9 ゲノム編集法による、変異型マウス内在レニン遺伝子座の作製

第2章において、新規の *cis*-制御配列がレニン遺伝子座 13-kb 領域の外側、かつ 156-kb 領域の内側に存在する可能性を示した。そこで、同制御領域の位置をおおまかに決定するために、以下の3種類の欠失遺伝子座を作製した（図 III-1A）。

「3'-large-del」遺伝子座は 13-kb 領域の 3' 端から、156-kb 領域 3' 端までの約 78-kb の領域を欠失した遺伝子座である。「5'-large-del」遺伝子座は 156-kb 領域の 5' 端から、mdE 上流までの約 63-kb の領域を欠失した遺伝子座である。「5'-short-del」遺伝子座は *Kiss1* 遺伝子の 3' 端から、mdE 上流までの約 17-kb の領域を欠失した遺伝子座である。同遺伝子座において欠失した 17-kb の遺伝子間領域は、45-kb ヒト・レニン遺伝子の 5' 側相同領域の大部分を含んでおり、かつ上流に隣接した *Kiss1* 遺伝子は無傷な状態で残してある。以上の3種類の欠失遺伝子座を CRISPR/Cas9 ゲノム編集法を用いて作製した。欠失予定領域の両端を標的とする gRNA、及び Cas9 を発現するプラスミド2種類をマウス受精卵前核に顕微注入し、遺伝子改変マウスを作製した。正しい組み換え反応の確認は、サザンブロット法、及び変異箇所の塩基配列を決定することでおこなった（図 III-1BCD）。また、これら欠失遺伝子座と野生型遺伝子座由来のレニン遺伝子発現を同一個体内で見分けるために、内在野生型レニン遺伝子の 3' UTR に FRT 配列を挿入した疑似野生型遺伝子座（pseudo-WT）を作製した（図 III-A 下部）。同遺伝子座についても、サザンブロット法、及び、挿入部位の塩基配列決定により、正しい組み換えが起こっていることを確認した（図 III-1BC）。

高血圧環境下における変異型レニン遺伝子座の発現解析

交配により欠失型、及び疑似野生型レニン遺伝子座を、正常血圧 (ctrl)、及び高血圧マウス (THM) に導入後 (図 III-2A)、腎臓よりトータル RNA を抽出し、cDNA 合成、qRT-PCR による発現解析を行った。pseudo-WT アリルのレニン遺伝子発現は、予想通り、高血圧環境下で低下していた (図 III-2CFIL)。同じサンプル中で、3'-large-del の発現も正常に低下していた (図 III-2B)。一方、5'-large-del、5'-short-del における遺伝子発現は、高血圧時に抑制されず、正常血圧マウスと同程度の発現量であった (図 III-2EHK)。また、ヒト・レニン導入遺伝子は、どの変異マウスにおいても高血圧環境下で上昇していた (図 III-2DGJM)。以上の結果は、高血圧環境下において、レニン遺伝子の発現を適切に制御する *cis*-DNA 配列が、欠失した 17-kb の領域中に存在することを示している。

5'-short-del アリルにおいて欠失した 17-kb の領域は、正常血圧環境下においてエンハンサーとして機能する

次に、5'-short-del アリルをホモに持つマウスを作製し、正常血圧環境下における機能を検証することとした。同変異アリルをホモにもつマウス、および野生型マウスの腎臓からトータル RNA を抽出し、cDNA 合成後、qRT-PCR を行った (図 III-3A)。その結果、変異アリルをホモに持つマウス (KO) と野生型遺伝子座をホモに持つマウス (WT) との間で、内在マウス・レニン遺伝子の発現量に有意差は見られなかった (図 III-3B)。また、血圧についても、両者で有意差は見られなかった (表 III-2)。レニン遺伝子は血圧上昇に重要な酵素であり、その発現量の変化は血圧の変動を招く。従って、仮に 17-kb 領域の欠失により、レニン遺伝子発現量が

変化しても、血圧恒常性を維持するために、他の転写制御領域によりその発現量が補償され、17-kb 領域の機能を検証できていない可能性がある。そこで、マウスの内在レニン遺伝子座の片方を pseudo-WT アリルとすることでこの潜在的な問題を回避することとした（図 III-3C）。5'-short-del アリル、および FRT 配列でマークされていない野生型アリルにおけるレニン遺伝子の発現を、両者に共通の PCR プライマーセットを用いて比較した。その結果、5'-short-del アリルの発現量は、野生型と比べて約 2.5 倍低下していた（unmarked-allele、図 III-3D）。次に、FRT でマークされた pseudo-WT アリルでのレニン遺伝子発現を解析した結果、pseudo-WT/5'-short-del マウス群において、pseudo-WT レニンの発現量が、5'-short-del アリルでの発現量の低下を補償するように上昇していた（FRT-marked-allele、図 III-3E）。以上の結果から、欠失させた 17-kb 領域は正常血圧環境下においては、エンハンサーとして機能し、同活性が高血圧環境下で抑制されることでレニン遺伝子の発現量が低下すると考えられた。

エンハンサーコア領域の同定

次に 17-kb エンハンサー中のコア領域を同定することとした。このために、マウス・レニンプロモーター5' 欠失変異体（p20.1-kb~p3.1-kb_mRen_Luc）をマウス・レニン産生細胞株 As4.1 に一過性にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、20.1-kb マウス・レニンプロモーターは、3.1-kb のものと比較して約 6 倍の転写活性を示した（図 III-4A）。また、この活性の大部分は、転写開始点上流 20.1-kb から 17.4-kb、および、5.4-kb から 3.1-kb の範囲に局在することが明らかとなった（図 III-4A）。そこで、これらのエンハンサーコア領域を、

それぞれ-20 kb エンハンサー (-20E)、-5 kb エンハンサー (-5E) と名付けた (図 III-4A 下部)。古典的エンハンサーは、距離や方向に依存せず、転写活性化能をもつ DNA 断片であると定義されている (29)。そこで、-20E、-5E について、その方向依存性を検証した。マウス・レニン 3.1-kb プロモーターレポーターコンストラクトに対して、プロモーター上流、またはルシフェラーゼ遺伝子下流に、これらエンハンサー断片を正方向、あるいは負方向でそれぞれ挿入した (図 III-4BC 左)。解析の結果、-20E 断片は、プロモーター上流に付加した場合、方向非依存的に、約 1.5 倍の転写活性化能をもつが、ルシフェラーゼ遺伝子下流に付加した場合は、十分な活性を示さなかった (図 III-4B)。一方、-5E 断片は、上流、下流どちらに付加した場合でも、方向非依存的に約 2~2.5 倍の転写活性化能をもつことが分かった (図 III-4C)。また、最後にこれらエンハンサーにプロモーター選択性があるのかを調べるために、SV40 プロモーターの上流に連結し、転写活性を調べた (図 III-4D)。その結果、これらのエンハンサーは SV40 プロモーターの転写を活性化したことから、プロモーター選択性の無いエンハンサーであることが分かった。

エンハンサーコア領域の細胞特異性

次に、エンハンサーコア領域の細胞特異性について検証した。内在マウス・レニン遺伝子の発現量が非常に低い細胞として、マウス線維芽細胞 (Mouse embryonic fibroblast: MEF) を使用した (図 III-5A)。MEF に、20.1、5.4、3.1-kb マウス・レニンプロモーター・コンストラクトを一過性にトランスフェクションし、その転写活性を検証した (図 III-5B)。その結果、As4.1 での結果とは異なり、MEF では、十分な転写活性が検出できなかった。この理由として、MEF において、エンハンサー

が活性をもたない可能性と、レニン最小プロモーターが活性を持たないために、エンハンサーの活性を検出できない可能性が考えられた。そこで次に、細胞種を問わずに活性をもつ SV40 プロモーターに、エンハンサーコア断片を付加し、MEF での転写活性を検証した (図 III-5C)。その結果、-20E、-5E 断片は As4.1 での結果と同様に、SV40 プロモーターを活性化した。従って、マウス・レニンプロモーターと連結したコンストラクトが、MEF において十分な転写活性をもたなかった理由は、同細胞中でマウス・レニン最小プロモーター領域が活性を持たないためであると考えられた。また、-20E と -5E エンハンサー断片自体には、細胞特異性が無いことが明らかとなった。

As4.1 及び MEF を用いた DNaseI hypersensitive (HS) site mapping

エンハンサーやプロモーターなど、転写因子が結合する DNA 領域は、開いたクロマチン構造をとることが知られている (37)。そこで、As4.1 細胞の内在レニン遺伝子座上流領域について、DNaseI 超感受性部位 (DNaseI HS site) の有無を検証した (図 III-6A)。複数の制限酵素とプローブとを組み合わせた解析の結果、レニン遺伝子転写開始点上流、約 -20~-17 kb 及び、-17~-8 kb 領域には HS サイトは検出されなかった (図 III-6BC)。一方、転写開始点上流、-7~+1 kb の領域については、2ヶ所の HS サイトが検出された (図 III-6D)。1ヶ所は、レニン遺伝子の既知のエンハンサーである mdE の領域に相当した。もう 1ヶ所は、本研究で、エンハンサー活性をもつことが明らかとなった -5E 領域に相当した。そこで次に、これらの HS サイトの細胞特異性を検証するために、MEF を用いて DNaseI HS mapping を行った結果、転写開始点の -7~+1 kb の領域に HS サイトは検出されなかった (図 III-6E)。従っ

て、これらの HS サイトは As4.1 細胞に特異的であることが明らかとなった。

-5E エンハンサー欠損遺伝子座の作製

-5E エンハンサー領域の高血圧環境下での機能を検証するために、CRISPR/Cas9 ゲノム編集法を用いて、同領域を欠損する遺伝子座 (-5E-del) を作製した。欠失予定領域の両端を標的とする gRNA、及び Cas9 を発現するプラスミド 2 種類をマウス受精卵前核に顕微注入し、遺伝子改変マウスを作製した (図 III-7A)。正しい組み換え反応が起きたことを、サザンブロット法、及び変異箇所の塩基配列を決定することで確認した (図 III-7BCD)。

高血圧環境における-5E-del 遺伝子座の発現解析

-5E-del 遺伝子座、及び疑似野生型遺伝子座 (pseudo-WT) を、図 III-2A と同様に正常血圧、及び高血圧マウスの内在遺伝子座に導入し、発現解析を行った。腎臓よりトータル RNA を抽出し、cDNA 合成、qRT-PCR を行った。pseudo-WT アリルにおけるレニン遺伝子の発現は、予想通り、高血圧環境下で低下した (図 III-8BE)。一方、同じサンプル中で、-5E-del アリルの転写抑制応答は著しく減弱していた (図 III-8AD)。以上の結果は、高血圧環境下におけるレニン転写抑制に、-5E 領域が重要な役割を果たすことを示している。また、プライマーの増幅効率を補正後、pseudo-WT と-5E-del アリルの発現を、同一グラフ上で表示すると、正常血圧状態において、-5E-del アリルの発現量は既に顕著に低下していた。従って、-5E 領域は *in vivo* でもエンハンサーとして機能し、高血圧環境下では、同領域の活性が抑制されることで、レニン遺伝子の転写量が低下すると考えられる。

考察

エンハンサー領域の種間保存性と疾患との関係

第2章では、13-kbのヒト・レニンと14-kbのヒト・アンジオテンシノーゲン導入遺伝子をともに保持し、高血圧を呈するTHMにおいて、13-kbヒト・レニン導入遺伝子の発現が異常に上昇することを示した。一方で、それぞれ25-kbおよび、8-kbの5'および、3'制御領域を保持する45-kbのヒト・レニン導入遺伝子を用いて、同様の遺伝子改変マウスを作製すると、正常血圧を呈し、さらに同ヒト・レニン導入遺伝子のみを持つマウスと比較して、血漿ヒト・レニン濃度も低下することが報告されている(32)。同結果は、45-kbヒト・レニン導入遺伝子中に、血圧恒常性維持に必要な制御領域が含まれることを示唆するが、その実体は未解明であった。本論文では、45-kbヒト・レニン導入遺伝子の5'上流制御領域と相同なマウス・レニン遺伝子配列、つまり約17-kbの領域を内在遺伝子座から欠失するマウス

(5'-short-del)を解析し、同領域中に血圧恒常性維持に関わる新規制御領域が存在することを示した。同結果は、ヒトとマウスの間で、種を超えて保存された*cis*-制御配列が、欠失した17-kb中に存在することを示唆している。実際に、レポーターアッセイにより同定したエンハンサー・コア領域である-20E、-5E配列は、ヒトとマウスの間で特によく保存されており(Ensemblより)、これらエンハンサーがヒトにおいても重要な役割を果たすことが予想される。また、近年の次世代シーケンサーの網羅的解析により、疾患と関連のある一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism; SNP)の93%がタンパク質非コード領域に存在し、64%はエンハンサー近傍に存在することが報告されている(30)。ヒト・レニン遺伝子座においても、転

写開始点上流約 12.5-kb の位置に高血圧と関連のある SNP (Reference SNP Cluster Report; rs11240692) が報告されており(38)、同 SNP の相同領域は、本研究で同定したマウス-5E エンハンサー領域中に存在することから、同配列に作用する転写因子やシグナル伝達経路が、新規の治療ターゲットとなることが期待される。今後更に、ヒト・レニン導入遺伝子を用いた詳細な解析が必要になると考えられる。

高血圧環境での応答性メカニズム

本研究では、THM を用いて、高血圧環境下におけるレニン遺伝子の転写応答を解析したが、具体的にどのような刺激が転写応答に関与しているのかについては、明らかにできていない。高血圧環境下で働く刺激としては、血管壁への圧付加、アンジオテンシン II、マクラデンサ・シグナルなどが存在する(7)。過去の 140-kb ヒト・レニン導入遺伝子を用いた解析から、圧付加を生じない低濃度のアンジオテンシン II 投与でも、ヒト・レニン導入遺伝子及び、内在マウス・レニン遺伝子の発現が抑制されることが報告されており(18)、少なくともアンジオテンシン II 刺激は、レニン遺伝子の転写を抑制すると考えられる。今後、THM を用いた実験系においても、血管拡張剤を用いて血圧を正常に戻した際のレニン遺伝子の転写応答を調べることで、同転写制御における圧負荷刺激の関与の有無を明らかにできると考えている。また、本論文の結果から、応答性モデルとして、レニン遺伝子上流に存在する-5E を中心としたエンハンサーの活性が抑制されることで、受動的に転写量が減少するのではないかと考えている(図 III-9)が、同制御に関与する転写因子については、本研究では明らかにできていない。アンジオテンシン II シグナルは、Protein kinase C (PKC) を介してレニン遺伝子の転写を抑制することが報告されているため(39)、THM

においても、レニン遺伝子の転写抑制に、PKC 経路が関与する可能性がある。この他に
関与する可能性のある転写因子の候補として、CTCF (CCCTC-binding factor) が
考えられる。-5E 領域中 DNaseI 超感受性部位には、同因子の結合配列が存在し、CTCF
は、ゲノムの高次構造形成に重要な役割を果たすことから(40)、同因子を介した-5E
エンハンサーとプロモーターの直接相互作用が存在する可能性があり、さらなる検
証が必要である。

レニン遺伝子転写制御における mdE と-5E の役割

今回新たに見出した-5E エンハンサーは、レポーターアッセイにおいては、
細胞特異性を示さなかったにも関わらず、DNaseI hypersensitive site mapping で
は、As4.1 細胞特異性を示した。この理由として、mdE の細胞種特異性が関与してい
る可能性がある。過去の報告から、mdE はレニン非産生細胞である JEG3 細胞 (ヒト
妊娠性絨毛がん細胞) では十分な転写活性化能を示さないことが報告されている(11)。
また、mdE は、複数の報告から、レニン遺伝子転写活性の強さを調整するエンハンサ
ーではなく、むしろ転写のオンオフを決定するような強力なエンハンサーであると
考えられている(5, 12, 41)。従って、mdE の活性が無いと予想される MEF では、レニン
遺伝子座のクロマチン構造が閉じた状態になっており、-5E の DNaseI 超感受性部位
も検出できなかったのではないかと予想される。また、このように、同じレニン遺
伝子のエンハンサーでも、転写のオンオフを決定する mdE や、転写量の調節に関与
する-5E (-5E 含む 17-kb 領域) など、役割の違いがあることは興味深い。今後更に、
-5E の他の刺激への応答性や、組織特異性への寄与を検証し、その特性を理解するこ
とが重要であろう。

まとめ

以上、本研究から、マウス・レニン遺伝子上流約 17-kb の領域が高血圧環境下における転写抑制応答に必須であり、同領域は通常血圧時にはエンハンサーとして機能することが明らかとなった。さらに、同エンハンサー活性の大部分は、転写開始点上流 20.1~17.4-kb (-20E) 及び、5.4~3.1-kb (-5E) の領域に局在すること、-5E 領域には細胞種特異的な DNaseI HS site が存在することを見出した。また、-5E 領域を欠失するレニン遺伝子座は、高血圧環境下における転写抑制応答が鈍化することから、同領域が応答性制御に重要な役割を担うことを示した。これらの結果から、-5E 領域をコアとするエンハンサーの活性が高血圧時に抑制されることで、レニン遺伝子の転写量が減少するというモデルが考えられる (図 III-9)。

材料と方法

CRISPR/Cas9 システム

Human Cas9 及び、sgRNA を発現するプラスミドは、標的配列の 2 本鎖オリゴヌクレオチドを、pX330 (Feng Zhang 博士より供与。Addgene plasmid # 42230、(33)) の *BbsI* サイトに挿入することで作製した。使用したオリゴヌクレオチドの配列を表 III-1 に示した。FRT 配列挿入のためのドナー DNA 断片は、13-kb マウス・レニン遺伝子断片 (レニン遺伝子 3' UTR に FRT 配列が挿入されている) を保持するプラスミドを鋳型とし、以下のプライマーを用いて、PCR により増幅した。

mRN-FRTdonor-ver2-F: 5'-GGCTGGGATTTAGGATAGG-3'

Ren1pA-100bp-down-R: 5'-ACTTTACTAACAAACCTCCATCTC-3'

遺伝子改変マウスの作製

先述のプラスミドを C57BL/6J マウス (日本チャールス・リバー、神奈川、日本) より採取した受精卵の前核に顕微注入した。得られた仔の尻尾から DNA を抽出し、PCR 法とサザンブロット法によって遺伝子改変マウスを選別した。

サザンブロット法による変異遺伝子座の構造解析

「5'-short-del」、 「3'-large-del」、 「pseudo-WT」 遺伝子座の解析には、アガロース包埋された高分子胸腺ゲノム DNA を用いた。「5'-short-del」と 「3'-large-del」 両アレルの解析については *NcoI*、 「pseudo-WT」 については、 *PvuII* を用いた。「5'-large-del」と 「-5E-del」 遺伝子座の解析には、マウス尾から採取したゲノム DNA を用い、それぞれ、 *EcoRV*、 *AseI* により処理した。これらの DNA をア

ガロースゲル電気泳動法により展開後、ナイロン膜 (PerkinElmer, Waltham, MA) に転写した。これを、 α - ^{32}P 標識した DNA プローブとハイブリダイゼーションした後、X線フィルムによってオートラジオグラムを得た。各遺伝子座の解析に用いた DNA プローブの配列は以下の通りである。

5'-large-del: nt 86,373-86,793 (GenBank 登録番号 AC068906)

5'-short-del/ TSS-5del: nt 87,271-87,783 (GenBank 登録番号 AC068906)

3'-large-del/ pseudo-WT: nt 98,147-98,713 (GenBank 登録番号 AC068906)

qRT-PCR

第2章と同様の方法を用いて行った。

血圧測定

第2章と同様の方法を用いて行った。

レポータープラスミドの構築

マウス・レニン遺伝子 3.1-kb、20.1-kb プロモーター DNA 断片の回収には、defective prophage λ -Red recombineering システムを用いた。まず、pGV-B2 (東洋インキ、東京、日本) の *MluI/XhoI* 部分に、大腸菌内相同組換え時の相同領域となる DNA 断片を挿入した。

3.1-kb プロモーターDNA断片用の 5' 及び 3' 側の相同配列は、マウス BAC クローン (RPCI23-240P23+FRT) を鋳型とし、それぞれ以下のプライマーにより増幅した。

「3.1-kb プロモーター用 5' 側相同配列」

REN-RET-5' Long-5s: 5'-AAAGGCGCGC (*Bss*HII) CGCAACCACTCTCGAG (*Xho*I)

CAGCAATGGCAG-3'

mRN-RET-3kb-Bam-R: 5'-CCAGGATCC (*Bam*HI) AGGTATCAAGTAATAAGGAG-3'

「3.1-kb (/20.1-kb) プロモーター用 3' 側相同配列」

mRN-RET-TSS-Bam-F: 5'-AGTGGATCC (*Bam*HI) GGCAGACAGCAGGGGAAGG-3'

mRN-RET-TSS-Xho-R: 5'-TCAGCTCGAG (*Xho*I) CTTTCTAAGAGCTGTGTAG -3'

これらの断片をそれぞれ、*Bss*HII/*Bam*HI、*Bam*HI/*Xho*I により消化後、pGV-B2 に挿入した (p3.1-kb_mRen_Luc)。

20.1-kb プロモーターDNA断片用の5'側の相同配列については、マウスBACクローン (RPCI23-240P23+FRT) を鋳型とし、以下のプライマーにより増幅した。

mRN-RET-20kb-Mlu-F: 5'-TTCTACGCGT (*Mlu*I) AAAGGCGTGTGTTCCACCA-3'

mRN-RET-20kb-Bam-R: 5'-CTCGGATCC (*Bam*HI) TATCGGTCCCCCAGAGCAG-3'

また、3'側の相同配列については、3-kb プロモーターに用いたものと共通である。

この断片を *Mlu*I/*Bam*HI により消化後、3'側の相同配列 (*Bam*HI-*Xho*I) とともに pGV-B2 に挿入した (p20.1-kb_mRen_Luc)。

これらプラスミドを内在配列部分に存在する *Pvu*II で線状化した後、240P23+FRT BAC を保持する大腸菌 (EL250) の形質転換に用いた。アンピシリン耐性による薬剤選択の後、目的の組み換えを生じた形質転換体を制限酵素処理、及び塩基配列決定により同定した。

マウス・レニンプロモーターの5'欠失変異体をもつレポータープラスミド

は、内在制限酵素認識部位を利用することで作製した。p20.1-kb_mRen_Luc プラスミドを、プラスミドの 5' 端に存在する *Mlu*I に加えて、それぞれ以下の制限酵素によって消化し、平滑末端処理後、ライゲーションした。*Sna*BI (17.4-kb)、*Afl*III (15.8-kb)、*Pac*I (10.8-kb)、*Nde*I (7.5-kb)、*Nhe*I (5.4-kb)。5.8-kb DNA 断片は、15.8-kb DNA 断片を構築する際に、偶然、取得できた。

mRen プロモーターの下流にエンハンサーDNA断片を配したレポータープラスミドは、以下の手順で作製した。まず、p20.1-kb_mRen_Luc を *Mlu*I/*Sna*BI で処理し、レニン遺伝子転写開始点上流-20.1~-17.4 kb の DNA 断片 (-20E ; 2716-bp) を回収した。同断片を平滑末端処理後、以下の *Eco*RI-*Not*I-*Bam*HI アダプター (TaKaRa Bio、滋賀、日本) を連結した。

5'-AATTCGGCGGCCGCGGATCC-3' / 5'-GGATCCGCGGCCGCC-3'

連結産物を *Bam*HI で消化した後、p3.1-kb_mRen_Luc の *Bam*HI 部位に挿入した

(p3.1-kb_mRen_Luc/-20E(+)と(-))。

レニン遺伝子転写開始点上流-5.4~-3.1 kb の DNA 断片 (-5E) については、以下のプライマーを用いて、増幅した。

MB-mRNTSS-5kb-F : 5'-CACAACGCGT (*Mlu*I) AGATCT (*Bgl*III) GCTAGCCCAGAGACATCTGAC-3'

MB-mRNTSS-3kb-R : 5'-CACAACGCGT (*Mlu*I) AGATCT (*Bgl*III) CTCACCTACTTTATTTCTCCCTC-3'

増幅産物を *Bgl*III で消化後、p3.1-kb_mRen_Luc の *Bam*HI 部位に挿入した

(p3.1-kb_mRen_Luc/-5E(+)と(-))。

mRen プロモーターの上流にエンハンサーDNA断片を配したレポータープラ

スミドは、以下の手順で作製した。まず、以下の手順で p3.1-kb_mRen_Luc のプロモーター上流に *Mlu*I サイトを作出した。p3.1-kb_mRen_Luc プラスミド中には、3.1-kb プロモーター5' 端近傍のベクター部分と、マウス・レニンプロモーター配列中の 2 ヶ所に *Kpn*I サイトが存在する。ベクター側に存在する *Kpn*I サイトを *Mlu*I サイトに変換するために、p3.1-kb_mRen_Luc を *Sac*I (認識部位がプロモーター中の *Kpn*I サイトを挟む位置に 2 カ所存在) で消化、プロモーター断片の一部を除去・回収した後、セルフライゲーションを行った。次に、同プラスミドを *Kpn*I で消化し、平滑末端処理後、以下の *Af*III リンカーを連結した。

*Af*III linker: 5'-GCTCTTAAGAGC-3'

同プラスミドを再び *Sac*I で消化し、先ほど回収した *Sac*I プロモーター断片を挿入した (p3.1-kb_mRen_Luc+*Af*III)。同プラスミドを *Af*III で消化し、平滑末端後、以下の *Mlu*I リンカーをライゲーションした (p3.1-kb_mRen_Luc+*Mlu*I)。

*Mlu*I linker: 5'-CACAAACGCGTTGTG-3'

先に述べた-20E 断片 (*Bam*HI 断片) を平滑末端化し、上記の *Mlu*I リンカーとライゲーションした後、*Mlu*I で消化した。また、これも先に述べた-5E PCR 断片 (MB-mRNTSS-5kb-F/MB-mRNTSS-5kb-R により増幅) を *Mlu*I で消化した。これらエンハンサー断片を、p3.1-kb_mRen_Luc の *Mlu*I サイトに挿入し、p-20E(+) or (-)/3.1-kb_mRen_Luc、あるいは、p-5E(+) or (-)/3.1-kb_mRen_Luc を作製した。

SV40 プロモーターの上流にエンハンサーDNA 断片を配したレポータープラスミドについては、以下の手順で作製した。pGV-P2 (東洋インキ、東京、日本) の *Mlu*I サイトに、p-20E(-)/3.1-kb_mRen_Luc を *Mlu*I で消化することで調製した-20E

DNA 断片、あるいは、-5E 断片 (*Mlu*I 断片) を挿入し、p-20E(+)or(-)/SV40_Luc、あるいは、p-5E(+)or(-)/SV40_Luc を作製した。

細胞培養とトランスフェクション

As4.1 細胞は、American Type Culture Collection より入手した (CRL-2193) (42)。細胞培養には、10%FBS、ペニシリン (100U/mL)、ストレプトマイシン (100 μ g/mL) を含む高グルコース D-MEM (和光純薬工業、東京、日本) を用いた。トランスフェクション 12 時間前に、24-well プレートに 0.4×10^5 cells/well となるように細胞を播種した。合計 250 ng のプラスミド DNA に対し、0.75 μ L の Gene Juice Transfection Reagent (Millipore、MA、US) を用いた。レポータープラスミドは、全てのコンストラクトで同じモル数となるようにし、DNA 量の不足分を PUC19 プラスミドを加えることで、全ての well で 225 ng となるようにした。また、トランスフェクション効率の違いを補正するために、25 ng の CMV- β gal プラスミドを同時にトランスフェクションした。トランスフェクション後、48 時間で細胞を回収し、その溶解液を用いて、ルシフェラーゼ及び、 β ガラクトシダーゼ活性を検出した。ルシフェラーゼ活性の測定には、ピッカジーン発光キット (東洋インキ、東京、日本) と Centro XS³ LB960 発光マイクロプレートリーダー (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) を用いた。

MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) は、BALB/C 系統のマウス胎児から採取し、As4.1 と同様の培養、トランスフェクション条件で実験を行った。

DNaseI Hypersensitive site mapping

細胞核の抽出は、既報に倣って行った(43)。核を異なる濃度の DNaseI (20、30、40、60、80、120 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で 37°C、5 分処理した後、DNA を抽出した。DNA を制限酵素で消化し、電気泳動、サザンブロットィングに供した。

解析に用いた各 DNA プローブの配列は以下の通りである。

ProbeI: nt 67,922-68,205 (GenBank 登録番号 AC068906)

ProbeII: nt 72,762-72,968 (GenBank 登録番号 AC068906)

ProbeIII: nt 82,815-83,227 (GenBank 登録番号 AC068906)

表 III-1: 本研究で使用した gRNA 用オリゴ DNA 配列

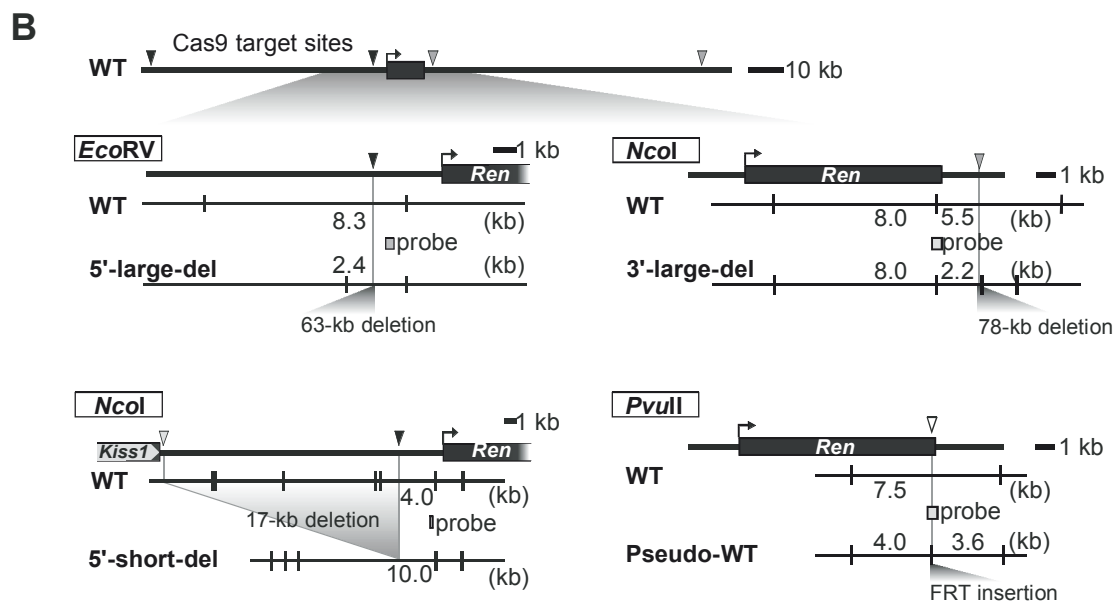
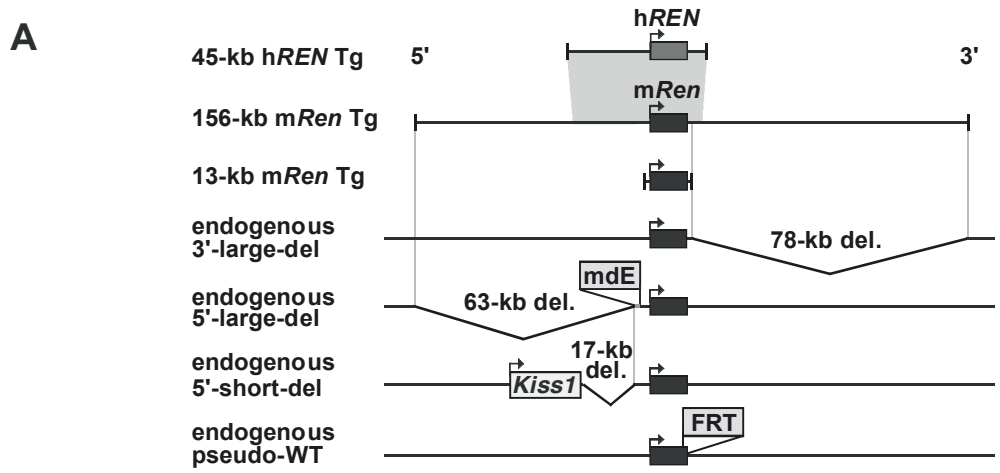
変異アリル	標的部位	オリゴ DNA 配列 (from 5' to 3')
5'-large-del	156-kb 5' 端	caccGTCATGTCTAGGCTGTTCGAA
		aaacTTCGAACAGCCTAGACATGAC
	13-kb 上流	caccGAGGGAGAAATAAAGTAGGTG
		aaacCACCTACTTTATTTCTCCCTC
5'-short-del	<i>kiss1</i> 下流	caccGCTCTCAAATTCTGGGATTAA
		aaacTTAATCCCAGAATTTGAGAGC
	13-kb 上流	caccGAGGGAGAAATAAAGTAGGTG
		aaacCACCTACTTTATTTCTCCCTC
3'-large-del	156-kb 3' 端	caccGAGGCAGAGGCAAGAAGGATC
		aaacGATCCTTCTTGCCTCTGCCTC
	13-kb 3' 端	caccGTCCTACAGATACCAAGCGCT
		aaacAGCGCTTGGTATCTGTAGGAC
-5E-del	<i>Ren</i> TSS-5kb	caccGGGCTAGCCCGCTTTCTGCT
		aaacAGCAGAAAGCGGGCTAGCCC
	13-kb 上流	caccGAGGGAGAAATAAAGTAGGTG
		aaacCACCTACTTTATTTCTCCCTC
pseudo-WT	<i>Ren</i> 3'UTR	caccGCTTGGCCTAGGGTTACTGGG
		aaacCCCAGTAACCCTAGGCCAAGC

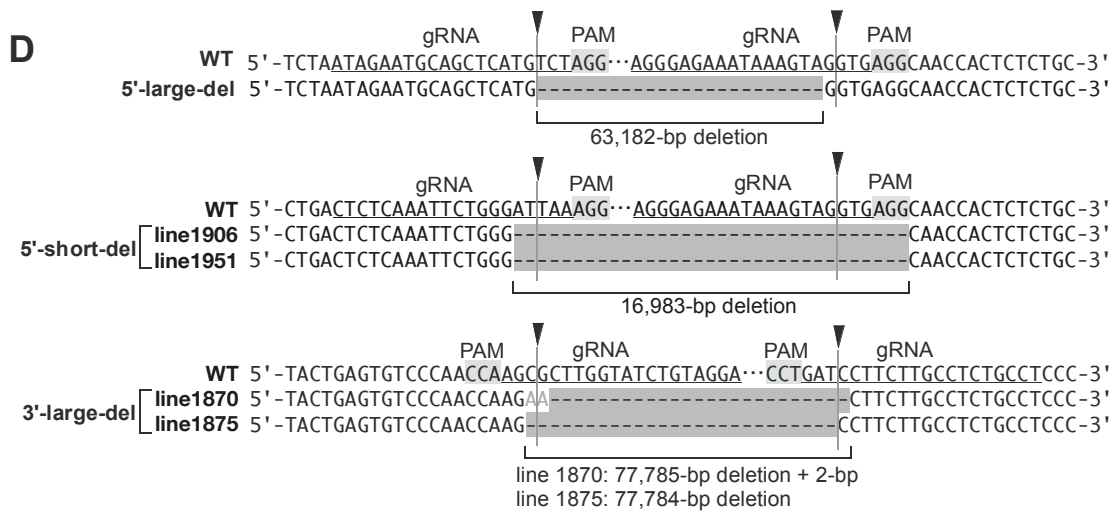
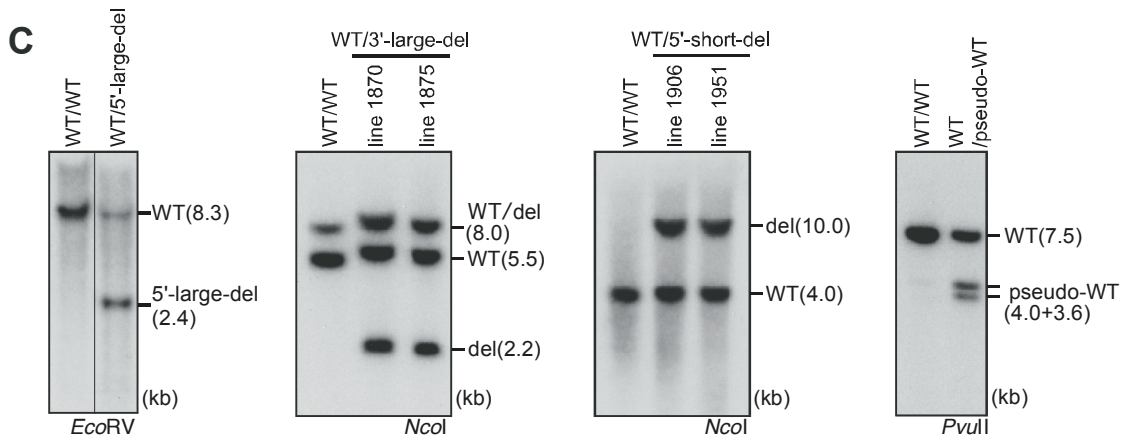
TSS: 転写開始点

表 III-2: 5' -short-del ホモ欠損マウスの収縮期血圧 (SBP)

Genotype	Wild-type	Knock-out (5'-short-del homo)
n	4	5
SBP (mmHg)	101.1 ± 5.0	100.1 ± 6.0

n: 各群における解析個体数





図III-1：変異型マウス・レニン内在遺伝子座の作製

(A) レニン導入遺伝子、及び変異型マウス・レニン内在遺伝子座の模式図。45-kb ヒト・レニン (*hREN*) 導入遺伝子と相同なマウス・レニン (*mRen*) 遺伝子座領域を灰色のバーで連結した。mdE、*Kiss1* 遺伝子、FRT 配列の位置を灰色の四角で示す。

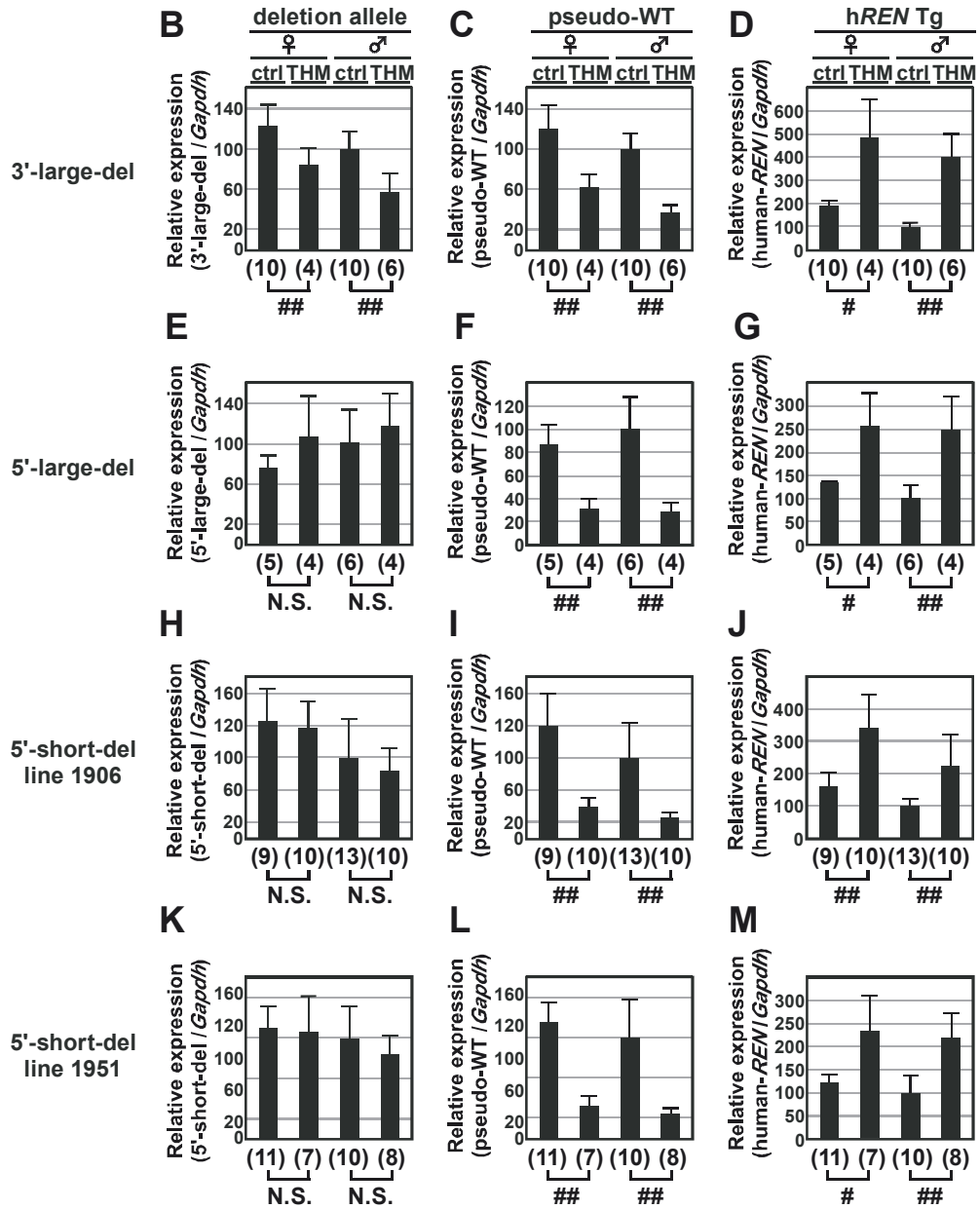
(B) 野生型及び、変異型内在遺伝子座の制限酵素地図。変異型遺伝子座作製のための Cas9 標的部位を矢頭で示す。5'-large-del、3'-large-del、5'-short-del、Pseudo-WT の各遺伝子座について、*EcoRV*、*NcoI*、*NcoI*、*PvuII* 制限酵素認識部位を縦線で示す。各制限酵素でゲノム DNA が完全に消化された場合に生じることが予想される DNA 断片の大きさ (kb) を数字で示す。また、(C) で用いたプローブの位置を灰色の四角で示す。5'-large-del 遺伝子座では、レニン遺伝子上流 63-kb の領域が欠失することで、2.4-kb の *EcoRV* 断片が生じる。3'-large-del 遺伝子座では、レニン遺伝子下流 78-kb の領域が欠失することで、2.2-kb の *NcoI* 断片が生じる。5'-short-del 遺伝子座では、レニン遺伝子上流 17-kb の領域が欠失することで、10-kb の *NcoI* 断片が生じる。Pseudo-WT 遺伝子座では、レニン遺伝子 3' UTR に FRT 配列を挿入することで、新たに *PvuII* 認識部位が生じ、4.0-kb と 3.6-kb の *PvuII* 断片が生じる。

(C) 野生型及び、変異型マウスのゲノム DNA を制限酵素で消化し、アガロースゲル電気泳動後、サザンブロットを行った。パネルの右側に、予想されるバンドの大きさ (kb) を示す。

(D) 野生型及び、変異型マウス塩基配列のアラインメント。PAM と gRNA 配列をそれぞれ、うすい網掛け及び下線により示す。PAM の位置から予測される切断箇所を矢頭により示す。実際に欠失した配列を濃い網掛けで示す。

A

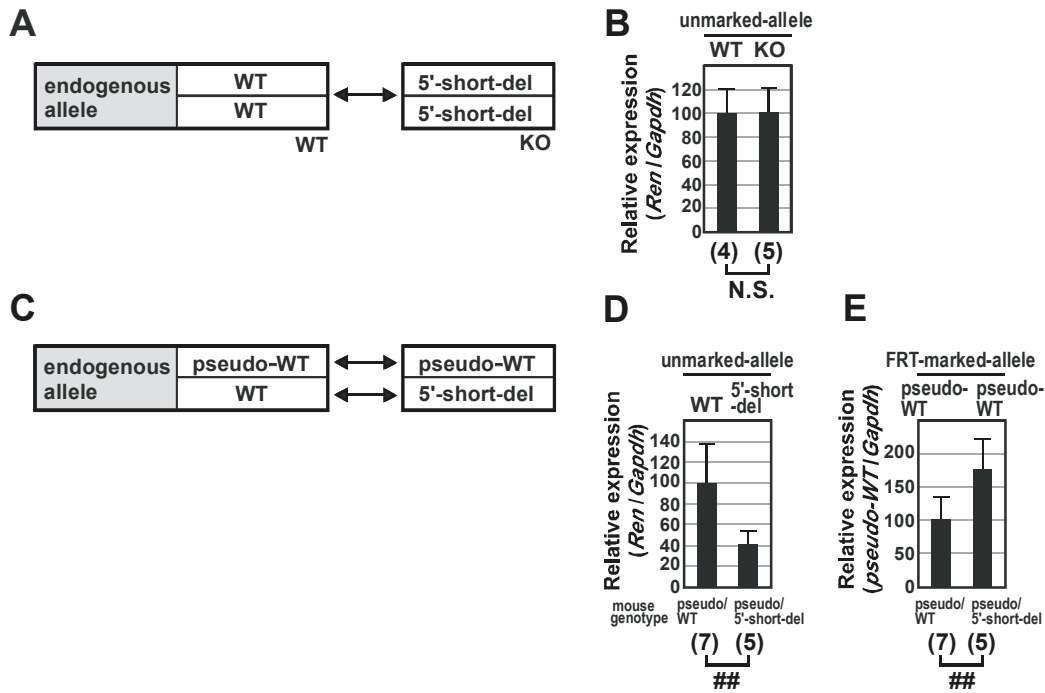
Transgene	hREN Tg	+/-	↔	hREN Tg	+/-
	hAGT Tg	-/-		hAGT Tg	-/-
endogenous allele	pseudo-WT	+/-	↔	pseudo-WT	+/-
	deletion allele	+/-		deletion allele	+/-
			ctrl	THM	



図III-2： THM における変異型マウス・レニン内在遺伝子の発現解析

(A) 内在遺伝子座として、マウス・レニン pseudo-WT、及び deletion allele を正常血圧 (ctrl)、あるいは高血圧 (THM) マウス環境下に導入し、発現解析を行った。

(B-M) 8週齢の正常血圧 (ctrl)、あるいは高血圧 (THM) マウス腎臓からトータル RNA を抽出し、qRT-PCR を行った。マウス deletion allele (B、E、H、K)、マウス pseudo-WT allele (C、F、I、L)、ヒト・レニン導入遺伝子 (hREN Tg; D、G、J、M)、*GAPDH* 遺伝子 (data not shown) について発現量を解析した。マウス *GAPDH* 遺伝子の発現量を内部標準として補正を行った。各グラフにおいて、オスの ctrl 群の値を 100 とした。各グループにおいて、解析した個体数を各グラフ下の括弧中に表示し、平均値と標準偏差を表示した。ctrl と THM 群間での統計学的有意差は二標本 t 検定により検定した (N.S., not significant; #: $P < 0.05$; ##: $P < 0.01$)。

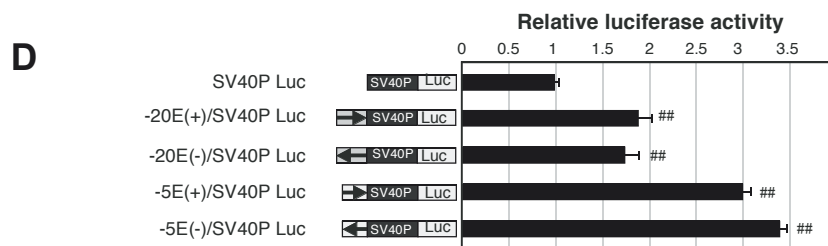
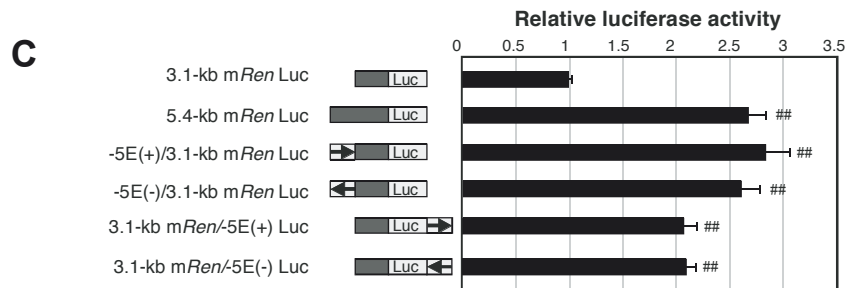
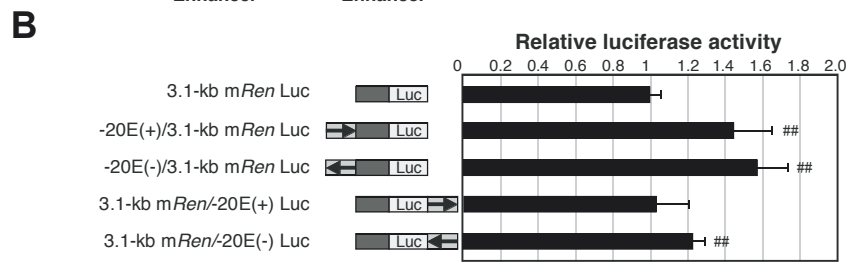
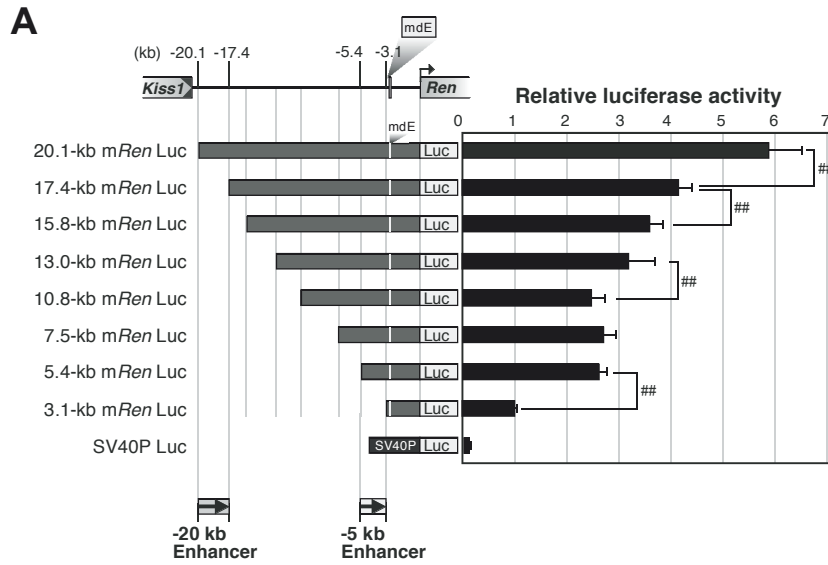


図III-3：正常血圧状態における 5'-short-del 遺伝子座の発現解析

(A) 内在マウス・レニン遺伝子座に野生型アリル、または、5'-short-del アリルをホモにもつマウスを用いて発現解析を行った。

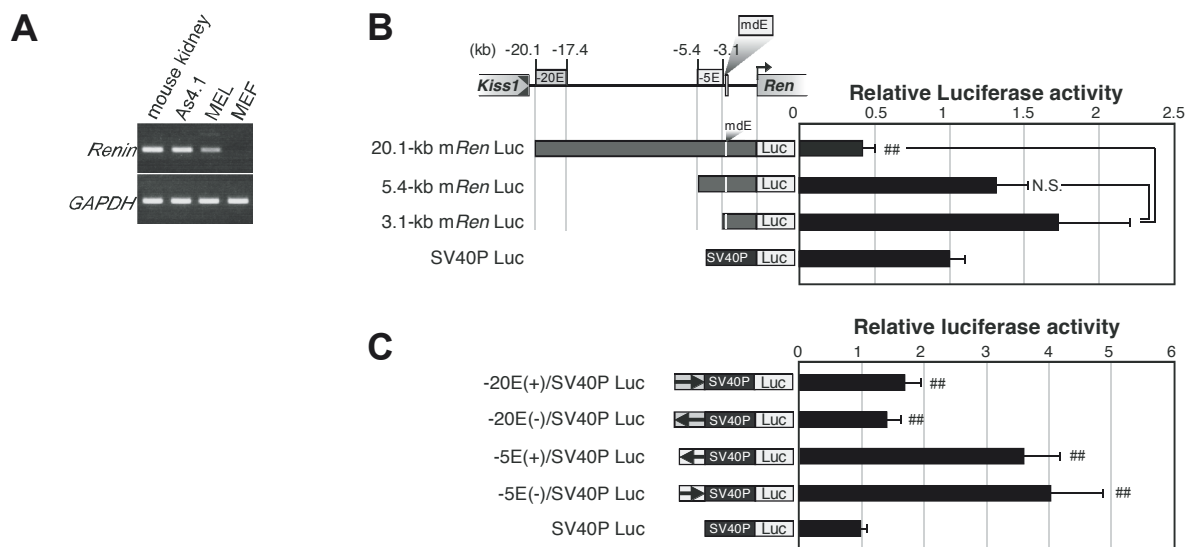
(B, D, E) 8 週齢のマウス腎臓からトータル RNA を抽出し、qRT-PCR を行った。内在マウス・レニン遺伝子 (unmarked-allele; BとD)、pseudo-WT (FRT-marked-allele; E)、GAPDH 遺伝子 (data not shown) について発現量を解析した。マウス GAPDH 遺伝子の発現量を内部標準として補正を行った。各パネルで、WT/WT、もしくは pseudo-WT/WT マウス群の値を 100 とした。解析した個体数を各グラフ下の括弧中に表示し、平均値と標準偏差を表示した。ctrl と THM 群間での統計学的有意差は二標本 t 検定により検定した (N.S., not significant; #: $P < 0.05$; ##: $P < 0.01$)。

(C) 内在マウス・レニン遺伝子座に pseudo-WT アリルに加え、野生型アリル、あるいは、5'-short-del アリルをヘテロにもつマウスを用いて発現解析を行った。



図III-4 : As4.1 細胞株を用いたマウス・レニン遺伝子エンハンサーコア領域の同定

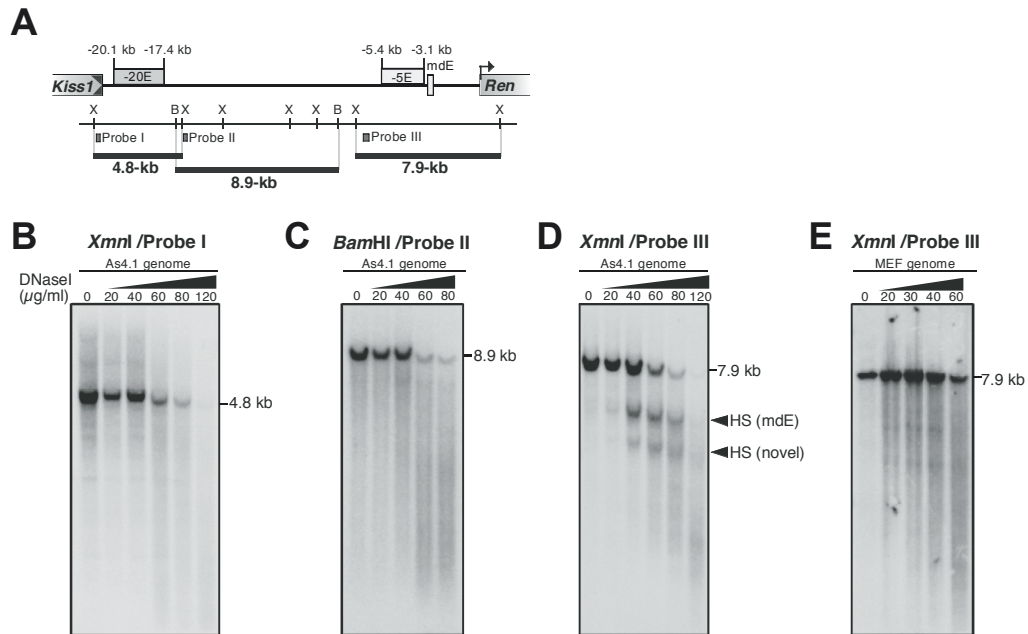
(A-D) レニン遺伝子転写開始点から、20.1-kb 上流までの領域 (A上段) について、レポーターアッセイによりエンハンサーコア領域を同定した。マウス・レニン (*mRen*) 遺伝子 5' 欠失変異体、あるいは SV40 プロモーター (SV40P) をルシフェラーゼ (*luciferase*; *luc*) レポーター遺伝子に連結した。これらコンストラクトを CMV- β -gal コントロール・レポーターコンストラクトとともに、As4.1 細胞に一過性に共導入した。ルシフェラーゼ活性を β -gal 活性により除することで、トランスフェクション効率の補正を行った。各パネルで、3.1-kb_*mRen*_Luc、あるいは SV40P_Luc の活性を 100 とした。それぞれのコンストラクトについて少なくとも 2 セット以上の実験をおこなうことで、計 6 連以上のデータを確保し、平均値と標準偏差を求めた。統計学的有意差は二標本 *t* 検定により検定した (##: $P < 0.01$)。 (B) と (C) では、3.1-kb_*mRen*_Luc の値に対して、 (D) では、SV40P_Luc の値に対して各値の有意差を検定した。



図III-5 : MEF 細胞を用いた、マウス・レニン遺伝子エンハンサー活性細胞特異性の検証

(A) マウス腎臓と各種培養細胞から調製したトータル RNA を用い、RT-PCR により、内在マウス・レニン遺伝子と GAPDH 遺伝子の発現量を解析した。増幅産物を 2% アガロース電気泳動に供した。

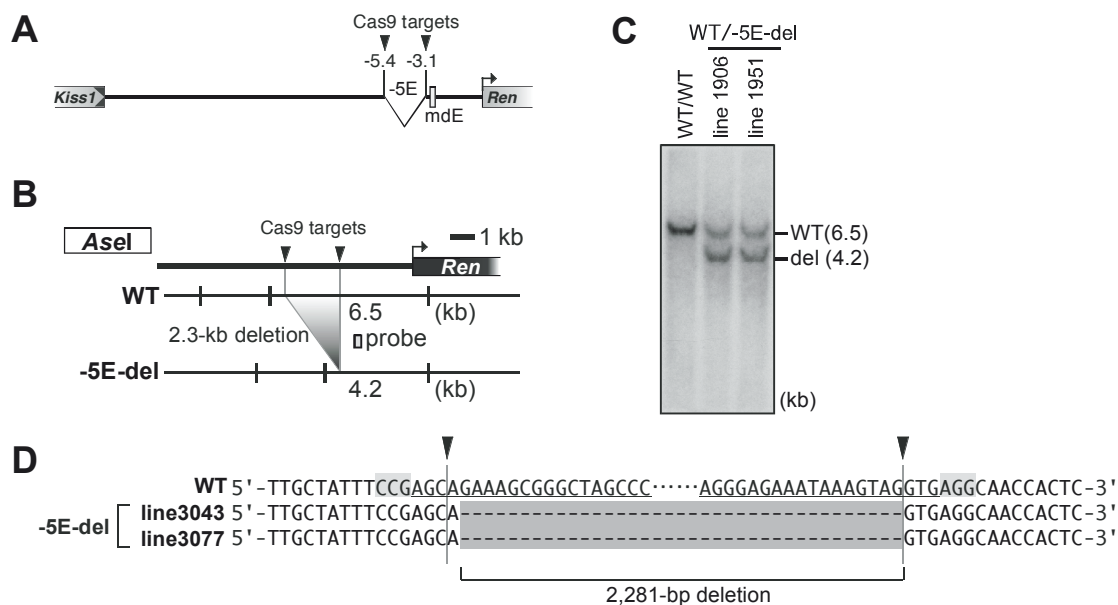
(BとC) マウス・レニン (mRen) 遺伝子 5' 制御領域、SV40 プロモーター (SV40P)、あるいはその両方をルシフェラーゼ (luciferase; luc) レポーター遺伝子に連結した。これらのコンストラクトを CMV- β -gal コントロール・レポーターコンストラクトとともにMEF細胞に一過性に共導入した。ルシフェラーゼ活性を β -gal 活性により除することで、トランスフェクション効率の補正を行った。各パネルで SV40P_Luc の活性を 100 とした。2 回の独立した実験により、計 6 連のデータを確保し、平均値と標準偏差を求めた。統計学的有意差は二標本 t 検定により検定した (N.S., not significant; ##: $P < 0.01$)。 (C) では、SV40P_Luc の値に対して各値の有意差を検定した。



図III-6 : As4.1 と MEF 細胞を用いたレニン遺伝子座の DNaseI hypersensitive site mapping

(A) マウス・レニン遺伝子 5' 上流領域の構造と制限酵素地図。制限酵素 (*Xmn*I; X, *Bam*HI; B) 消化により生じるDNA断片を太い横線で示した。また、(B-E) で用いたプローブの位置を灰色の四角で示した。

(B-E) 培養細胞より単離した核を異なる濃度の DNaseI で処理した。ゲノム DNA の抽出後、*Xmn*I (B、D、E)、または、*Bam*HI (C) で消化、アガロースゲル電気泳動後、ナイロンメンブレンに転写し、I (B)、II (C)、III (DとE) のいずれかのプローブとハイブリダイゼーションをおこなった。



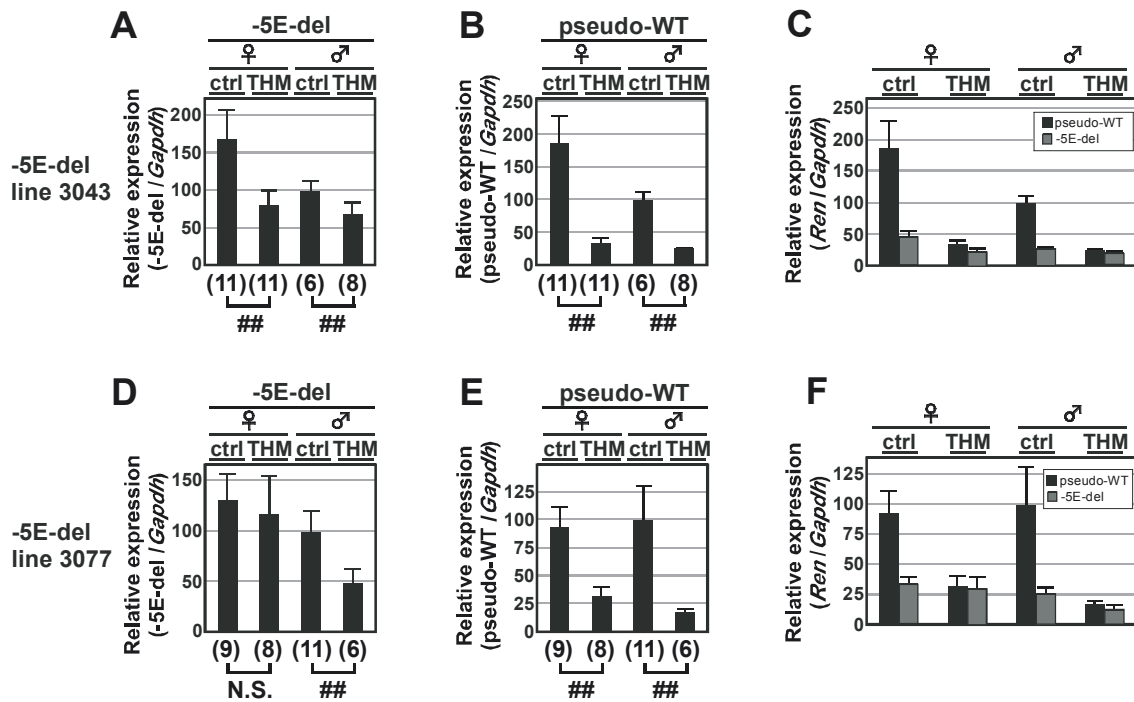
図III-7: -5E-del 遺伝子座の作製

(A) -5E-del 遺伝子座の模式図。変異遺伝子座作製のための Cas9 標的部位を矢頭で示す。

(B) 野生型、及び -5E-del 内在遺伝子座の制限酵素地図。Cas9 標的部位を矢頭で示す。AseI 制限酵素認識部位を縦線で示す。各制限酵素でゲノム DNA が完全に消化された場合に生じることが予想される DNA 断片の大きさ (kb) を数字で示す。また、(C) で用いたプローブの位置を灰色の四角で示す。レニン遺伝子上流 2.3-kb の領域を欠失することで、4.2-kb の AseI 断片を新たに生じる。

(C) 野生型、及び変異型マウス由来のゲノム DNA を制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動後、サザンブロット解析を行った。パネルの右側に、予想されるバンドの大きさ (kb) を示す。

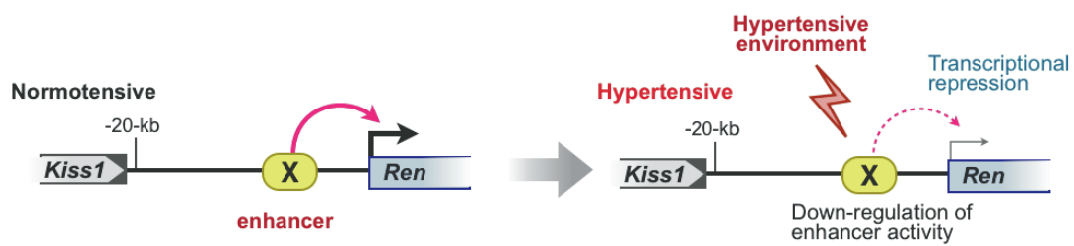
(D) 野生型及び、変異型塩基配列のアラインメント。PAM と gRNA 配列をそれぞれ、うすい網掛け、及び下線により示す。PAM の位置から予測される切断箇所を矢頭により示す。実際に欠失した配列を濃い網掛けで示す。



図III-8 : THM における -5E-del 遺伝子座の発現解析

(A, B, D, E) 8 週齢の正常血圧 (ctrl)、あるいは、高血圧 (THM) マウスの腎臓からトータル RNA を抽出し、qRT-PCR を行った。-5E-del (A と D)、pseudo-WT (B と E)、*GAPDH* 遺伝子 (data not shown) について発現量を解析し、マウス *GAPDH* 遺伝子の発現量を内部標準として補正を行った。各グラフにおいて、オスの ctrl 群の値を 100 とした。解析した個体数を各グラフ下の括弧中に表示し、平均値と標準偏差を表示した。ctrl と THM 群間での統計学的有意差は二標本 t 検定により検定した (N.S., not significant; ##: $P < 0.01$)。

(CとF) *GAPDH* 遺伝子で補正した pseudo-WT (黒のバー) と -5E-del (灰色のバー) の発現量について、プライマー増幅効率の違いを補正した値を同一グラフ上に示した。



図III-9 : マウス・レニン遺伝子座における高血圧環境応答性転写制御モデル

正常血圧環境では、エンハンサーが基本転写活性に寄与するが（左）、高血圧環境では、エンハンサーの活性が抑制され、結果として、レニン遺伝子の発現量が減少する（右）。

第 4 章

結語

レニン遺伝子は、血圧恒常性維持に必須の酵素であり、その発現は血圧の変化によりフィードバック制御を受ける。しかしながら、血圧が個体にしか存在しない刺激であることから、その転写制御メカニズムの解明は十分には進んでいなかった。当研究室では、過去に 15-kb のヒト・レニンとヒト・アンジオテンシノーゲン導入遺伝子を共に遺伝学的に保持することで、慢性的な高血圧を示す THM を作製した(6)。第 2 章において、THM におけるヒト・レニン導入遺伝子の発現を解析した結果、同遺伝子の発現が異常に上昇することを見出した。そこで、遠位の制御領域がレニン遺伝子の応答性を制御するのではないかと考え、156-kb、13-kb マウス・レニン導入遺伝子を用いた解析を行い、ヒト及び、マウス・レニン遺伝子座における遠位制御領域の重要性を示した。さらに、第 3 章においては、近年開発された CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を取り入れ、応答性領域の絞り込みを行い、主要な役割を果たす約 2-kb の新規制御領域を同定した。さらに、同領域がエンハンサー活性を持つことを *in vivo* 及び *in vitro* で証明し、高血圧環境下で、同活性が抑制されることで、転写抑制応答が制御される可能性を見出した。

近年、エンハンサー機能の破綻が、疾患原因となり得る例が複数報告され、エンハンサーと疾患との関係が着目されている(30, 31)。本研究は、レニン遺伝子エンハンサーの機能異常が血圧恒常性の破綻を招く可能を示すものであり、基礎研究だけでなく臨床研究においても重要な知見を提供できる。今後更に、エンハンサーに結合する転写因子や、関与するシグナル経路を明らかにすることで、高血圧発症メカニズムの解明や創薬シーズの提供にも貢献できるものと期待する。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導を頂きました筑波大学生命環境系教授 谷本啓司先生に厚く御礼申し上げます。また、あらゆる面において助言を頂きました同教授 深水昭吉先生、同講師 石田純治先生、同助教 松崎仁美先生、医学医療系教授 杉山文博先生、そして、谷本研究室と深水研究室の皆様にご心より感謝申し上げます。最後に、支えて下さった家族、及び友人達に感謝申し上げます。

なお、本論文第 2 章、及び第 3 章の一部結果は、下記の公表論文の内容に基づいています。

Ushiki A *et al.* (2016)

Long-Range Control of Renin Gene Expression in Tsukuba Hypertensive Mice.

PLoS One 11(11): e0166974. doi: 10.1371/journal.pone.0166974.

参考文献

1. Tanimoto, K., Sugiyama, F., Goto, Y., Ishida, J., Takimoto, E., Yagami, K., Fukamizu, A. and Murakami, K. (1994) Angiotensinogen-deficient mice with hypotension. *J Biol Chem*, 269, 31334-31337.
2. Thompson, M.W., Smith, S.B. and Sigmund, C.D. (1996) Regulation of human renin mRNA expression and protein release in transgenic mice. *Hypertension*, 28, 290-296.
3. Keen, H.L. and Sigmund, C.D. (2001) Paradoxical regulation of short promoter human renin transgene by angiotensin ii. *Hypertension*, 37, 403-407.
4. Pan, L. and Gross, K.W. (2005) Transcriptional regulation of renin: an update. *Hypertension*, 45, 3-8.
5. Castrop, H., Hocherl, K., Kurtz, A., Schweda, F., Todorov, V. and Wagner, C. (2010) Physiology of kidney renin. *Physiol Rev*, 90, 607-673.
6. Fukamizu, A., Sugimura, K., Takimoto, E., Sugiyama, F., Seo, M.S., Takahashi, S., Hatae, T., Kajiwara, N., Yagami, K. and Murakami, K. (1993) Chimeric renin-angiotensin system demonstrates sustained increase in blood pressure of transgenic mice carrying both human renin and human angiotensinogen genes. *J Biol Chem*, 268, 11617-11621.
7. Bader, M. and Ganten, D. (2000) Regulation of renin: new evidence from cultured cells and genetically modified mice. *J Mol Med (Berl)*, 78, 130-139.
8. Sequeira Lopez, M.L. and Gomez, R.A. (2010) Novel mechanisms for the control of renin synthesis and release. *Curr Hypertens Rep*, 12, 26-32.
9. Schnermann, J. and Briggs, J.P. (2012) Synthesis and secretion of renin in mice with induced genetic mutations. *Kidney Int*, 81, 529-538.
10. Petrovic, N., Black, T.A., Fabian, J.R., Kane, C., Jones, C.A., Loudon, J.A., Abonia, J.P., Sigmund, C.D. and Gross, K.W. (1996) Role of proximal promoter elements in regulation of renin gene transcription. *J Biol Chem*, 271, 22499-22505.
11. Pan, L., Black, T.A., Shi, Q., Jones, C.A., Petrovic, N., Loudon, J., Kane, C., Sigmund, C.D. and Gross, K.W. (2001) Critical roles of a cyclic AMP responsive element and an E-box in regulation of mouse renin gene expression. *J Biol Chem*, 276, 45530-45538.
12. Adams, D.J., Head, G.A., Markus, M.A., Lovicu, F.J., van der Weyden, L., Kontgen,

- F., Arends, M.J., Thiru, S., Mayorov, D.N. and Morris, B.J. (2006) Renin enhancer is critical for control of renin gene expression and cardiovascular function. *J Biol Chem*, 281, 31753-31761.
13. Tanimoto, K., Kanafusa, S., Ushiki, A., Matsuzaki, H., Ishida, J., Sugiyama, F. and Fukamizu, A. (2014) A mouse renin distal enhancer is essential for blood pressure homeostasis in BAC-rescued renin-null mutant mice. *J Recept Signal Transduct Res*, 34, 401-409.
 14. Yan, Y., Jones, C.A., Sigmund, C.D., Gross, K.W. and Catanzaro, D.F. (1997) Conserved enhancer elements in human and mouse renin genes have different transcriptional effects in As4.1 cells. *Circ Res*, 81, 558-566.
 15. Zhou, X., Davis, D.R. and Sigmund, C.D. (2006) The human renin kidney enhancer is required to maintain base-line renin expression but is dispensable for tissue-specific, cell-specific, and regulated expression. *J Biol Chem*, 281, 35296-35304.
 16. Markus, M.A., Goy, C., Adams, D.J., Lovicu, F.J. and Morris, B.J. (2007) Renin enhancer is crucial for full response in Renin expression to an in vivo stimulus. *Hypertension*, 50, 933-938.
 17. Dekker, J., Marti-Renom, M.A. and Mirny, L.A. (2013) Exploring the three-dimensional organization of genomes: interpreting chromatin interaction data. *Nat Rev Genet*, 14, 390-403.
 18. Sinn, P.L., Davis, D.R. and Sigmund, C.D. (1999) Highly regulated cell type-restricted expression of human renin in mice containing 140- or 160-kilobase pair P1 phage artificial chromosome transgenes. *J Biol Chem*, 274, 35785-35793.
 19. Tanimoto, K., Sugiura, A., Kanafusa, S., Saito, T., Masui, N., Yanai, K. and Fukamizu, A. (2008) A single nucleotide mutation in the mouse renin promoter disrupts blood pressure regulation. *J Clin Invest*, 118, 1006-1016.
 20. Hatae, T., Takimoto, E., Murakami, K. and Fukamizu, A. (1994) Comparative studies on species-specific reactivity between renin and angiotensinogen. *Mol Cell Biochem*, 131, 43-47.
 21. Takimoto, E., Ishida, J., Sugiyama, F., Horiguchi, H., Murakami, K. and Fukamizu, A. (1996) Hypertension induced in pregnant mice by placental renin and maternal angiotensinogen. *Science*, 274, 995-998.
 22. Tamura, K., Chen, Y.E., Horiuchi, M., Chen, Q., Daviet, L., Yang, Z., Lopez-Illasaca,

- M., Mu, H., Pratt, R.E. and Dzau, V.J. (2000) LXRalpha functions as a cAMP-responsive transcriptional regulator of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 8513-8518.
23. Yang, G. and Sigmund, C.D. (1998) Developmental expression of human angiotensinogen in transgenic mice. *Am J Physiol*, 274, F932-939.
 24. Siegel, S.R., Oaks, G. and Palmer, S. (1981) Effects of angiotensin II on blood pressure, plasma renin activity, and aldosterone in the fetal lamb. *Dev Pharmacol Ther*, 3, 144-149.
 25. Pringle, K.G., Tadros, M.A., Callister, R.J. and Lumbers, E.R. (2011) The expression and localization of the human placental prorenin/renin-angiotensin system throughout pregnancy: roles in trophoblast invasion and angiogenesis? *Placenta*, 32, 956-962.
 26. Germain, S., Bonnet, F., Philippe, J., Fuchs, S., Corvol, P. and Pinet, F. (1998) A novel distal enhancer confers chorionic expression on the human renin gene. *J Biol Chem*, 273, 25292-25300.
 27. Field, L.J., Philbrick, W.M., Howles, P.N., Dickinson, D.P., McGowan, R.A. and Gross, K.W. (1984) Expression of tissue-specific Ren-1 and Ren-2 genes of mice: comparative analysis of 5'-proximal flanking regions. *Mol Cell Biol*, 4, 2321-2331.
 28. Lee, E.C., Yu, D., Martinez de Velasco, J., Tessarollo, L., Swing, D.A., Court, D.L., Jenkins, N.A. and Copeland, N.G. (2001) A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics*, 73, 56-65.
 29. Pott, S. and Lieb, J.D. (2015) What are super-enhancers? *Nature Genetics*, 47, 8-12.
 30. Hnisz, D., Abraham, B.J., Lee, T.I., Lau, A., Saint-Andre, V., Sigova, A.A., Hoke, H.A. and Young, R.A. (2013) Super-Enhancers in the Control of Cell Identity and Disease. *Cell*, 155, 934-947.
 31. Vahedi, G., Kanno, Y., Furumoto, Y., Jiang, K., Parker, S.C.J., Erdos, M.R., Davis, S.R., Roychoudhuri, R., Restifo, N.P., Gadina, M. *et al.* (2015) Super-enhancers delineate disease-associated regulatory nodes in T cells. *Nature*, 520, 558-+.
 32. Catanzaro, D.F., Chen, R., Yan, Y., Hu, L., Sealey, J.E. and Laragh, J.H. (1999) Appropriate regulation of renin and blood pressure in 45-kb human renin/human angiotensinogen transgenic mice. *Hypertension*, 33, 318-322.
 33. Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X.,

- Jiang, W., Marraffini, L.A. *et al.* (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339, 819-823.
34. Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F. and Jaenisch, R. (2013) One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 153, 910-918.
35. Mashiko, D., Fujihara, Y., Satouh, Y., Miyata, H., Isotani, A. and Ikawa, M. (2013) Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Scientific Reports*, 3.
36. Yang, H., Wang, H.Y., Shivalila, C.S., Cheng, A.W., Shi, L.Y. and Jaenisch, R. (2013) One-Step Generation of Mice Carrying Reporter and Conditional Alleles by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell*, 154, 1370-1379.
37. Tuan, D. and London, I.M. (1984) Mapping of Dnase I-Hypersensitive Sites in the Upstream DNA of Human-Embryonic Epsilon-Globin Gene in K562 Leukemia-Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 81, 2718-2722.
38. Ehret, G.B., O'Connor, A.A., Weder, A., Cooper, R.S. and Chakravarti, A. (2009) Follow-up of a major linkage peak on chromosome 1 reveals suggestive QTLs associated with essential hypertension: GenNet study. *European Journal of Human Genetics*, 17, 1650-1657.
39. Muller, M.W., Todorov, V., Kramer, B.K. and Kurtz, A. (2002) Angiotensin II inhibits renin gene transcription via the protein kinase C pathway. *Pflugers Arch*, 444, 499-505.
40. Ong, C.T. and Corces, V.G. (2014) CTCF: an architectural protein bridging genome topology and function. *Nat Rev Genet*, 15, 234-246.
41. Morris, B.J. (2008) Fluorescence activated cell sorting of transiently transfected As4.1 cells shows renin enhancer directs on/off switching of renin promoter in vitro. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 35, 367-371.
42. Sigmund, C.D., Okuyama, K., Ingelfinger, J., Jones, C.A., Mullins, J.J., Kane, C., Kim, U., Wu, C.Z., Kenny, L., Rustum, Y. *et al.* (1990) Isolation and characterization of renin-expressing cell lines from transgenic mice containing a renin-promoter viral oncogene fusion construct. *J Biol Chem*, 265, 19916-19922.
43. Tanimoto, K., Liu, Q.H., Bungert, J. and Engel, J.D. (1999) The polyoma virus enhancer cannot substitute for DNase I core hypersensitive sites 2-4 in the human

beta-globin LCR. *Nucleic Acids Research*, 27, 3130-3137.