

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590956
 研究課題名（和文） プロスタシンアクチベーターおよびインヒビターの網羅的解析による血圧調節機構の解明
 研究課題名（英文） Comprehensive analysis of prostasin activators and inhibitors and its application for the elucidation of blood pressure regulation
 研究代表者
 北村 健一郎（KITAMURA KENICHIRO）
 熊本大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号： 10304990

研究成果の概要：

私たちは上皮型 Na チャネル活性化因子であるセリンプロテアーゼのプロスタシンに対するアクチベーターを同定し、プロテアーゼによる血圧調節機構の分子基盤を解明しようと考えた。ラット腎臓組織から zymography 法を用いて、プロスタシンのアクチベーター活性を指標に 30kDa のタンパク質の分離に成功した。LC-MS/MS 法によりカリクレインであることが判明し、現在、カリクレイン - プロスタシンカスケードが上皮型 Na チャネル活性に与える影響を検討中である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：水・電解質代謝学

1. 研究開始当初の背景

自然発症高血圧ラットの腎臓を正常ラットに移植すると、正常ラットに高血圧が発症することや、ヒトの腎移植においてもドナーが高血圧症または高血圧素因を持ち合わせていた場合、レシピエントに高血圧を発症する頻度が高いことなどから高血圧症の成因として腎臓の果たす役割は重要視されている。また、遺伝性食塩感受性高血圧症の 1 つである Liddle 症候群において腎臓皮質集合尿管

管に存在する上皮型ナトリウムチャネル（ENaC）の gain-of-function mutation が発見されたことから腎臓におけるナトリウム再吸収と高血圧症の強い因果関係が示唆されている。ENaC は腎臓、肺、大腸、汗腺、味蕾などの上皮細胞に存在し、ナトリウムの再吸収を担っている。ENaC は、 α 、 β 、 γ の 3 つのサブユニットが 2、1、1 の 4 量体を形成して 1 つのチャネルを構成している。この ENaC はアルドステロンや抗利尿ホルモン、インスリンなどのホルモンにより調節を

受け、腎臓でのナトリウム再吸収量の最終的な調節を行っている。1997年にValletらはアフリカツメガエルの尿細管細胞(A6 cell)からトリプシン様セリンプロテアーゼであるChannel-activating protease(CAP-1)を単離し、Xenopus Oocyte上にENaCとCAP-1を共発現させるとENaCの活性が亢進することを報告した。

私たちはCAP-1のmammalian homologueのクローニングに着手し、これまでにセリンプロテアーゼのプロスタシンをラット腎臓cDNAライブラリーから単離した。このプロスタシンはXenopus OocyteにENaCと共発現させるとアミロライド感受性ナトリウム電流を2~5倍増加させ、ナトリウム代謝においても重要なホルモンの1つであるアルドステロンは腎臓においてプロスタシンの発現を増強してENaCを介したナトリウムの再吸収を増加させるという新しいナトリウム調節機構を証明した。さらにラットにおいてセリンプロテアーゼ阻害剤であるメシル酸ナファモスタットがプロスタシンを抑制し、尿中Na排泄量を増加させること、マウス皮質集合尿細管細胞においてTGF- β がプロスタシンの発現を転写レベルで抑制し、Na再吸収を阻害することを明らかにした。これらの知見はプロスタシンがナトリウム代謝において生理学的に重要な役割を果たしていること、および食塩感受性高血圧症の発症因子の1つである可能性を強く示唆するものである。

2. 研究の目的

セリンプロテアーゼはR-A-A系や凝固線溶系などにおいて重要な生理的意義を担っている。多くの場合、プロテアーゼの活性化にはプロセシングプロテアーゼの存在が必須で、またそのプロセシングプロテアーゼも他のプロセシングプロテアーゼにより活性化される。このようにプロテアーゼの活性化は1連のカスケードを形成して機能していることが知られている。したがって、プロスタシンも生体において一連のプロテアーゼカスケードの中に存在して生理学的機能を発揮している可能性が推測される。本研究ではプロスタシンのプロセシング機構およびそれに関与する因子の同定を試みた。

3. 研究の方法

(1) メシル酸カモスタットによるプロスタシンのプロセシング制御

マウス皮質集合尿細管細胞(M-1細胞)を無血清培地で24時間培養後、10⁻⁶Mのメシル酸ナファモスタットまたはvehicleを含む無血清培地でさらに培養し、24時間後に細胞

膜タンパク質を抽出した。この膜タンパク質をSDS-PAGEにより泳動し、抗プロスタシン抗体を用いたウエスタンブロットを行った。

同じタンパク質検体を用いて、プロスタシンの合成基質であるGln-Ala-Arg-MCAを含んだSDS-PAGEを行った。ゲルをTriton-X100で洗浄し、SDSをTriton-X100に置換し、さらにTriton-X100を超純水に置換した後にゲルを37のTris緩衝液(100 mM, pH 8.0)に浸し、2時間酵素反応させた。最後に、ゲルにUVを照射して酵素活性のあるバンドを同定した。(In-gel fluorescent zymography)

(2) 活性型組換えプロスタシンおよび組換え pro-プロスタシンの作製

活性型組換えプロスタシンの作製のために、ヒトプロスタシンのlight chainとheavy chainの間にenterokinase cleavage siteを挿入し、C末端の膜貫通部位をHis tagに置換したcDNAを作製した。このcDNAをカイコ発現用のベクターに挿入し、片倉工業株式会社に委託してカイコへの感染およびカイコ体液の回収を行った。

組換え pro-プロスタシンの作製のために、ヒトプロスタシンのC末端の膜貫通部位をHis tagに置換したcDNAを作製した。このcDNAをカイコ発現用のベクターに挿入し、片倉工業株式会社に委託してカイコへの感染およびカイコ体液の回収を行った。

カイコ体液をTris緩衝液(25 mM, pH 7.5)で24時間透析し、0.22 μ Mフィルター濾過後にHis trapカラムにapplyした。0~250 mMのイミダゾールによるlinear gradientでカラムを溶出し、125 mM付近で溶出される分画を回収する。この分画をPEG濃縮後、再度Tris緩衝液(25 mM, pH 7.5)で24時間透析し、次にresource Qカラムにapplyした。0~500 mMのNaClによるlinear gradientでカラムを溶出し、250 mM付近で溶出されるsingle peakを回収した。この分画を銀染色ならびに抗プロスタシン抗体を用いたウエスタンブロットにより、single bandのプロスタシン分画であることを確認した。

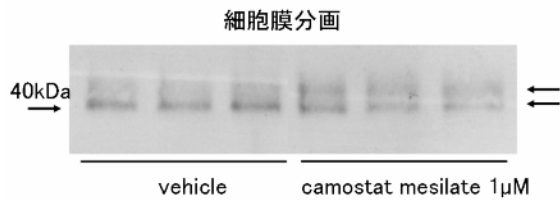
活性型組換えプロスタシンは、得られた組換えタンパク質をenterokinaseと37で16時間反応させ、enterokinase removal kitを用いて反応液からentokinaseを除去することにより作製した。

~のステップで作製した活性型組換えプロスタシンおよび組換え pro-プロスタシンの酵素活性をLys-His-Tyr-Arg-MCAを合成基質として用いて測定した。

(3) Double-layer fluorescent zymography

ラットおよびマウス腎臓の膜分画を抽出物し、SDS-PAGEにより電気泳動した。その後SDSをTriton-X100に置換し、さらに超純

水に置換することで完全に除去した。ゲルを
で作製した pro-プロスタシン 10-6M を含む
Tris 緩衝液 (100 mM, pH 8.0) で反応させた。
プロスタシン 特異的 合成 基質 である
Lys-His-Tyr-Arg-MCA を浸透させたセルロー
スアセート膜をゲルの上に重層し、37 で
2時間反応させた後にゲル側から UV を照射し
て合成ペプチド基質と反応するバンドを同
定した。



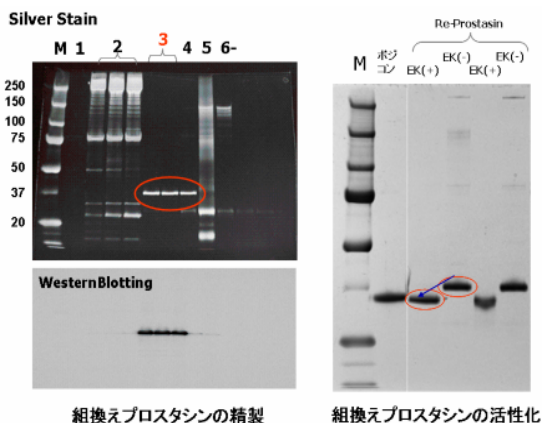
M-1細胞におけるprostasin発現へのセリンプロテアーゼ阻害剤の影響

4. 研究成果

(1) メシル酸カモスタットによるプロスタシンのプロセシング制御

M-1 細胞の細胞膜分画を抗プロスタシン抗体でウエスタンブロットをすると、下図に示すように約 40 kDa に強いバンドと約 42 kDa の弱いバンドを認める。40 kDa のバンドは活性型を、42 kDa のバンドは pro 体を反映していると考えられている。M-1 細胞に合成セリンプロテアーゼ阻害剤であるメシル酸カモスタットを作用させると下図に示すように、プロスタシンの pro 体が増えて活性型が減少していることが判明した。すなわち、何らかのセリンプロテアーゼがプロスタシンのプロセシングに関与していることが示唆される。

(2) 活性型組換えプロスタシンおよび組換え pro-プロスタシンの作製

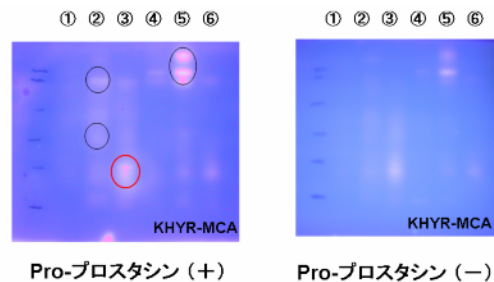


次に活性型組換えプロスタシンならびに組換え pro-プロスタシンを方法のところで述べたようにカイコを使用して生産し、2段階カラムにて精製した。上図左パネルに示すように、プロスタシンは銀染色にて単一バ

ンドとして表れ、そのバンドに一致して抗プロスタシン抗体が反応した。また、活性型組換えプロスタシンを得るために、方法のところで記載したようにプロスタシンの light chain と heavy chain の間に挿入した cleavage site を enterokinase で切断することにより活性化した。上図右パネルに示すように enterokinase はプロスタシンを切断することにより分子量をシフトさせ、切断が十分に生じていることが証明された。

活性型組換えプロスタシンおよび組換え pro-プロスタシンがプロテアーゼ活性を持つか否かを zymography により確認した。プロスタシン 特異的 な 合成 基質 である Lys-His-Tyr-Arg-MCA を用いた zymography では、enterokinase 処理された活性型組換えプロスタシンのみが酵素活性を呈し、enterokinase 処理しなかったものや組換え pro-プロスタシンは全く酵素活性を呈さなかった。

(3) Double-layer fluorescent zymography
プロスタシンのプロセシングエンザイムや活性化因子を同定するために double-layer fluorescent zymography を施行した。まず、ラット腎臓膜分画およびマウス腎臓膜分画を精製し、それぞれのサンプルについて zymography を行った。下図右パネルが示すように、ラットおよびマウス腎臓中に内因性のプロスタシンによる酵素活性を認めた。つづいて、上記 で作製した組換え pro-プロスタシンを用いた double-layer fluorescent zymography を施行し、下図左パネルに示したような結果が得られた。ラット腎臓膜分画を用いた double-layer fluorescent zymography では、内因性プロスタシンのサイズとは異なるバンドが 4 つ観察され、4 種類のプロスタシンプロセシングエンザイムまたは活性化因子の存在が明らかになった。マウス腎臓膜分画を用いた検討では、1 つのバンドが明らかとなった。このバンドはラット腎臓においても同じサイズのものが認められていた。



ラット腎臓細胞膜分画: ① 硫酸 0~30% ② 硫酸 30~50% ③ 硫酸 50~70%
ラット腎臓細胞質分画: ④ 硫酸 0~30% ⑤ 硫酸 30~50% ⑥ 硫酸 50~70%

(4) これらの4つのセリンプロテアーゼをイオン交換カラム、ベンザミジンアフィニティークラム、ゲルろ過クロマトグラフィー、等電点電気泳動などを用いて分離を試みた。その結果、30kDa および 20kDa のタンパク質の分離に成功し、LC-MS/MS 法によりタンパク質を同定した。30kDa のタンパク質はカリクレインであることが判明し、カリクレインと Pro 体の組換えプロスタシンを反応させると、プロスタシンを in vitro でプロセシングし、活性体へと変換することが明らかとなった。現在、カリクレイン - プロスタシンカスケードが上皮型 Na チャネル活性に与える影響を検討中である。

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 9 件)

1. Kakizoe, Y., Kitamura, K., Wakida, N., Ko, T., Maekawa, A., Miyoshi, T., Shiraishi, N., Adachi, M., Zhang, Z., Masilamani, S. and Kimio Tomita
Aberrant ENaC activation in Dahl salt-sensitive rats
J. Hypertens., in press, 2009 査読有
2. Koda, A., Wakida, N., Toriyama, K., Yamamoto, K., Iijima, H., Tomita, K., and Kitamura, K.
Urinary prostaticin in humans: relationships among prostaticin, aldosterone and epithelial sodium channel activity
Hypertens. Res., **32**: 276-281, 2009 査読有
3. Maekawa, A., Kakizoe, Y., Miyoshi, T., Wakida, N., Ko, T., Shiraishi, N., Adachi, M., Tomita, K., and Kitamura, K.
Camostat mesilate inhibits prostaticin activity, and reduces blood pressure and renal injury in salt-sensitive hypertension
J. Hypertens., **27**: 181-189, 2009 査読有
4. Kitamura, K., Anraku, M., Shintomo, R., Takeuchi, K., Ikeda, H., Nagano, J., Ko, T., Mera, K., Tomita, K., and Otagiri, M.
Effect of intravenous iron administration frequency on oxidative stress in chronic hemodialysis patients
Clin. Biochem., **41**: 1168-1174, 2008 査読有
5. Anzai, N., Ichida, K., Jutabha, P., Kimura, T., Babu, E., Jin, C.J., Srivastava, S., Kitamura, K., Hisatome, I., Endou, H., and Sakurai, H.
Plasma urate level is directly regulated by a voltage-driven urate efflux transporter URATV1 (SLC2A9) in humans
J. Biol. Chem., **283**: 26834-26838, 2008 査読有
6. Iwao, Y., Nakajou, K., Nagai, R., Kitamura, K., Anraku, M., Maruyama, T., and Otagiri, M.
CD36 is one of important receptors promoting renal tubular injury by advanced oxidation protein products
Am. J. Physiol. (Renal Physiol.), **295**: F1871-F1880, 2008 査読有
7. Nonoguchi, H., Kiyama, S., Kitamura, K., Naruse, M., Tomita, M., Tazoe, N., Tajiri, M., Nakayama, Y., Kohda, Y., Inoue, T., and Tomita, K.
Long-term plasma levels and dose modulation of alacepril in patients with chronic renal failure
Hypertens Res., **31**: 29-36, 2008 査読有
8. Shimoishi, K., Anraku, M., Kitamura, K., Tasaki, Y., Taguchi, K., Hashimoto, M., Fukunaga, E., Maruyama, T., and Otagiri, M.
An oral adsorbent, AST-120 protects against the progression of oxidative stress by reducing the accumulation of indoxyl sulfate in the systemic circulation in renal failure
Pharm. Res., **24**: 1283-1289, 2007 査読有
9. Kadowaki, D., Anraku, M., Tasaki, Y., Kitamura, K., Wakamatsu, S., Tomita, K., Gebicki, J. M., Maruyama, T., and Otagiri, M.
Effect of Olmesartan on Oxidative Stress in Hemodialysis Patients
Hypertens. Res., **30**: 395-402, 2007 査読有

[学会発表](計 2 件)

1. 北村 健一郎
プロテアーゼとプロテアーゼインヒビターの相互作用による生体 Na 代謝制御の分子基盤 日本腎臓学会学術総会 2007 年 5 月 25 日 アクトシティ浜松
2. Kakizoe, Y., et al
Camostat mesilate attenuates hypertension and kidney injury in Dahl salt-sensitive rats American Society

〔図書〕(計 1件)

1. 北村 健一郎

医歯薬出版株式会社
医学のあゆみ 2007年4頁

6. 研究組織

(1)研究代表者

北村 健一郎 (KITAMURA KENICHIRO)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10304990

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

富田 公夫 (TOMITA KIMIO)(平成19年度
は研究分担者)
熊本大学・大学院医学薬学研究部・教授
研究者番号：40114772