

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05389

研究課題名（和文）可溶型（プロ）レニン受容体機能の細胞外モジュレーション機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of regulation of the function of soluble (pro)renin receptor by cell surface proteins

研究代表者

中川 寅（Nakagawa, Tsutomu）

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：10281049

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：可溶型（プロ）レニン受容体（sPRR）は種々の疾病で血中濃度が上昇し、臓器障害のバイオマーカー候補として注目されている。sPRRの機能に関する研究は進んでいない。我々はsPRRがヘパリン結合性をもつことを発見した。ヘパリン結合性をもつ増殖因子や形態形成因子は、細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンと相互作用することで、その安定性や細胞間隙での拡散性、受容体との結合が制御されることが知られている。本研究で、sPRRに存在する4か所のヘパリン結合モチーフがヘパリン結合能をもち、また、sPRRがヘパリン結合モチーフ依存的／非依存的に細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンと結合する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

可溶型（プロ）レニン受容体（sPRR）の機能はほとんど明らかにされていない。本研究で得られたsPRRの細胞表面との結合および結合様式に関する知見は、sPRRの機能解明を進める上で学術的意義がある。また、sPRRは種々の疾病で血中濃度が上昇することが知られている。臓器障害の発症・進展とのつながりが明らかになれば、臓器障害を抑制する方法の開発につながるなどが期待されるなど社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：Soluble (pro)renin receptor (sPRR) levels increase in the blood in various diseases, drawing attention as a potential biomarker for organ damage. Research on the function of sPRR is not well-advanced. We discovered that sPRR possesses heparin-binding properties. Growth factors and morphogens with heparin-binding properties are known to interact with cell surface heparan sulfate proteoglycans, which regulate their stability, diffusion in the extracellular space, and binding to receptors. In this study, we found that the four heparin-binding motifs present in sPRR have heparin-binding ability and that sPRR potentially binds to cell surface heparan sulfate proteoglycans in both heparin-binding motif-dependent and independent manners.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：（プロ）レニン受容体 ATP6AP2 プロセシング酵素 furin site-1 protease ヘパリン ヘパラン硫酸プロテオグリカン

1. 研究開始当初の背景

(プロ)レニン受容体 (PRR) は血圧調節酵素レニンおよびその前駆体プロレニンと結合する 1 回膜貫通型受容体で、全身臓器に広く分布している (Nguyen et al. J Clin Invest. 2002)。PRR は細胞内シグナル伝達と (プロ)レニンの酵素活性上昇の 2 つの経路で腎障害や心血管疾患の発症・進展に深く関わっている。PRR は受容体機能だけでなく、胚発生や腫瘍形成に重要な Wnt/ -カテニンシグナル伝達 (Cruciat et al. Science, 2010) やリソソームの酸性化を担う V-ATPase 複合体形成 (Kinouchi et al. Circ Res. 2010) にも関わる多機能タンパク質であることが明らかになった。膜結合型 (全長型) PRR が細胞内プロテアーゼ (プロセシング酵素) によって限定分解されて作られる可溶型 PRR (sPRR) (Cousin et al. Hypertension, 2009) は、慢性腎臓病、妊娠糖尿病、妊娠高血圧腎症、膵臓癌などの疾病で、その血中濃度が上昇し、臓器障害のバイオマーカー候補として注目されている。我々は、site-1 protease (S1P) と furin が触媒する PRR の多段階プロセシングを発見した (Nakagawa et al. J Biochem. 2017)。

sPRR の疫学研究が進む一方で、その機能に関する生化学・分子生物学的研究は進んでいない。わずかな例として、腎臓における水チャネル・アクアポリン 2 (AQP2) を介した sPRR の尿濃縮作用 (Lu et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2016) が挙げられる。この作用は 7 回膜貫通型受容体 Frizzled 8 (Fz8) を介する -カテニン経路の活性化によるが、そのリガンド Wnt に非依存のたと報告されている。

2. 研究の目的

我々は最近、sPRR が硫酸化多糖の一種であるヘパリンに対して結合性を示すことを発見した。ヘパリン結合性を示すタンパク質には、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、血管内皮増殖因子 (VEGF)、肝細胞増殖因子 (HGF) などの細胞増殖因子や、Wnt、骨形成因子 (BMP)、TGF などの形態形成因子がある。これらのヘパリン結合性タンパク質は、細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) と相互作用することで、その安定性や細胞間隙での拡散性、受容体との結合が制御されることが知られている。細胞外に分泌された sPRR の機能も、細胞表面のタンパク質との相互作用によって制御される可能性が考えられる。そこで本研究では、sPRR と結合する細胞表面タンパク質を同定し、sPRR 機能の制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヘパリンおよび細胞との結合における sPRR のヘパリン結合モチーフの重要性

大腸菌を用いた組換え型ヒト sPRR の調製

野生型 (WT) ヒト sPRR および 4 か所のヘパリン結合モチーフ (HB1、HB2、HB3、HB4) を単独で改変した変異型 sPRR (HB1、HB2、HB3、HB4) および 4 か所全てを改変した変異型 sPRR (HB1-4) を大腸菌で生産し、N 末端に付加された His タグを利用してアフィニティー精製した。

ヘパリンカラムクロマトグラフィーによるヘパリン結合能評価

で調製した WT sPRR もしくは変異型 sPRR (HB1、HB2、HB3、HB4、HB1-4) をヘパリンカラムに供し、NaCl の濃度勾配をかけて溶出した。分画前サンプルおよび溶出画分を SDS-PAGE 後、CBB 染色によって sPRR バンドを可視化した。

ヒト培養細胞を用いた組換え型ヒト sPRR の調製

WT sPRR もしくは 4 か所のヘパリン結合モチーフ全てを改変した変異型 sPRR (HB1-4) を緑色蛍光タンパク質 EGFP の C 末端に付加した融合タンパク質 (EGFP-sPRR_WT および EGFP-sPRR_HB1-4) を、ヒト胎児腎臓由来 HEK293-T 細胞 (理研 BRC により提供された RCB2202) で生産した。

sPRR の細胞との結合解析

で調製した融合タンパク質 (EGFP-sPRR_WT もしくは EGFP-sPRR_HB1-4) をヒト乳がん由来 MCF7 細胞 (理研 BRC により提供された RCB1904) の培地に添加し、蛍光顕微鏡を用いて、EGFP の蛍光を指標にして細胞との結合を解析した。また、MCF7 細胞を硫酸化阻害剤である塩素酸ナトリウム NaClO₃ で処理し、同様に解析した。

(2) sPRR のヘパリン結合モチーフ (HB) 部位および非 HB (Non-HB) 部位の役割

大腸菌を用いたヒト sPRR 由来ペプチド融合タンパク質の調製

ヒト sPRR の 4 か所のヘパリン結合モチーフ (HB1、HB2、HB3、HB4) を含む HB 部位のペプチド配列を、緑色蛍光タンパク質 msGFP2 の C 末端に連結させた融合タンパク質 (msGFP2-HBs) を大腸菌で生産した。また、既知のヘパリン結合モチーフをもたないが、上記の結合実験から細胞との結合性をもつ可能性が示唆された Non-HB 部位のペプチド配列を連結させ

た融合タンパク質 (msGFP2-Non-HB) ならびに sPRR 由来ペプチドを付加しない msGFP についても、msGFP2-HBs と同様に生産した。これらタンパク質は N 末端に付加された His タグを利用してアフィニティー精製した。

ヘパリンカラムクロマトグラフィーによるヘパリン結合能評価

で調製した msGFP2-HBs、msGFP2-Non-HB、もしくは msGFP2 をヘパリンカラムに供し、NaCl の濃度勾配をかけて溶出した。分画前サンプルおよび溶出画分を SDS-PAGE 後、CBB 染色によってタンパク質バンドを可視化した。

HB 部位および Non-HB 部位を介した細胞との結合解析

で調製した msGFP2-HBs、msGFP2-Non-HB、もしくは msGFP2 を MCF7 細胞の培地に添加し、蛍光顕微鏡を用いて、msGFP2 の蛍光を指標にして細胞との結合を解析した。また、細胞をアクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D で処理し、msGFP2-HBs および msGFP2-Non-HB の細胞内への取り込みに対する影響を解析した。

(3) HB 部位および Non-HB 部位に結合する細胞タンパク質の同定

MCF7 細胞の細胞溶解液と、(2) で調製した msGFP2-HB、msGFP2-Non-HB、もしくは msGFP2 とを混合し、HB 部位および Non-HB 部位と細胞タンパク質との想定される結合を促した。msGFP2 の N 末端に付加された His タグを利用して、His タグアフィニティー磁気ビーズを用いてタンパク質複合体を精製、結合画分を回収した。結合画分に含まれるタンパク質を SDS-PAGE で分離し、銀染色によって可視化した。msGFP2-HB および msGFP2-Non-HB に特異的なタンパク質バンドを切り出し、質量分析 (LC-MS/MS 解析、外部委託) によってタンパク質を同定した。

4. 研究成果

(1) ヘパリンおよび細胞との結合における sPRR のヘパリン結合モチーフの重要性

我々は sPRR のヘパリン結合候補部位として、そのアミノ酸配列中に 4 か所のヘパリン結合モチーフ (HB1、HB2、HB3、HB4) を見出した。そこで、これらのヘパリン結合モチーフを単独で、もしくは全てを改変した sPRR (それぞれ、HB1、HB2、HB3、HB4、HB1-4) を調製し、ヘパリンカラムクロマトグラフィーによりヘパリン結合能を評価した。その結果、HB1、HB2、HB3、HB4 は WT sPRR に比べてヘパリン結合能が低下したものの、いずれもヘパリン結合性が認められた。一方、HB1-4 はヘパリン結合性を示さなかった。このことから、sPRR のこれら 4 か所のヘパリン結合モチーフ全てがヘパリン結合能をもち、かつ、これら 4 か所のヘパリン結合モチーフのみで sPRR のヘパリン結合性が説明付けられることが明らかになった。

次に、緑色蛍光タンパク質 EGFP を融合させた WT および HB1-4 sPRR を用いて、EGFP の蛍光を指標に、ヒト乳がん由来 MCF7 細胞との結合性を解析したところ、どちらの sPRR も細胞に結合した。このことから、ヘパリンカラムとの結合様式と異なり、細胞との結合には 4 か所のヘパリン結合モチーフは必須でないことが明らかになった。すなわち、sPRR はヘパリン結合モチーフ (HB) 部位に加えて、既存のヘパリン結合モチーフを含まない非 HB (Non-HB) 部位を介して細胞表面に結合する可能性が示唆された。また、MCF7 細胞を硫酸化阻害剤で処理すると、WT および HB1-4 sPRR のどちらも結合量が減少した。これらの結果から、sPRR がヘパリン結合モチーフ依存的 / 非依存的に細胞表面の HSPG と結合する可能性が示唆された。

(2) sPRR のヘパリン結合モチーフ (HB) 部位および非 HB (Non-HB) 部位の役割

sPRR のヘパリン結合性における 4 か所の HB 部位 (HB1、HB2、HB3、HB4) ならびに非 HB (Non-HB) 部位の役割を個別に評価するため、各々のペプチド配列を緑色蛍光タンパク質 msGFP2 に付加した融合タンパク質 (msGFP2-X) を調製した。ヘパリンカラムクロマトグラフィーによって HB 部位および Non-HB 部位のヘパリン結合性を評価した結果、予想通り、msGFP2-HB1、HB2、HB3、HB4 (msGFP2-HBs) はヘパリン結合性を示し、msGFP2-Non-HB はヘパリン結合性を示さなかった。一方で、MCF7 細胞に対して結合解析を行ったところ、msGFP2-HBs および msGFP2-Non-HB とともに細胞に結合した。

msGFP2-HBs および msGFP2-Non-HB が細胞内に取り込まれたことから、取り込み機構に関する知見を得る目的で、msGFP2-HB4 および msGFP2-Non-HB の結合、取り込みに与えるアクチン重合阻害剤の影響を解析した。その結果、msGFP2-HB4 の細胞内取り込みが低下したことから、msGFP2-HB4 がマクロピノサイトーシスによって取り込まれることが示唆された。

(3) HB 部位および Non-HB 部位に結合する細胞タンパク質の同定

MCF7 細胞から調製した細胞溶解液を用いて、HB 部位および Non-HB 部位に結合するタンパク質の同定を試みた。質量分析の結果、予想していた HSPG は含まれていなかった。しかしながら、HSPG と相互作用することが知られる複数のタンパク質が同定されたことから、HSPG を介した分子複合体の構成タンパク質が同定された可能性が考えられる。これら候補タンパク質の生化学的解析を継続中である。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1．発表者名 中村みのり，林里央菜，鵜飼亮伍，中川千春，橋本美涼，中川寅
2．発表標題 可溶型（プロ）レニン受容体に存在するヘパリン結合モチーフのヘパリン結合性と細胞内取込み
3．学会等名 第88回日本生化学会中部支部例会
4．発表年 2024年

1．発表者名 林里央菜，中村みのり，中川千春，宮地和，橋本美涼，中川寅
2．発表標題 可溶型（プロ）レニン受容体のC末端切断部位の違いは結合する細胞表面の標的分子を変化させる
3．学会等名 第88回日本生化学会中部支部例会
4．発表年 2024年

1．発表者名 鵜飼亮伍，中川千春，上村葉月，橋本美涼，海老原章郎，中川寅
2．発表標題 可溶型（プロ）レニン受容体のヘパリン結合部位依存のおよび非依存的な細胞表面との結合
3．学会等名 日本生化学会 第95回日本生化学会大会
4．発表年 2022年

1．発表者名 鵜飼亮伍，中川千春，上村葉月，深津萌々花，橋本美涼，海老原章郎，中川寅
2．発表標題 可溶型（プロ）レニン受容体のヘパリン結合性と細胞表面への結合
3．学会等名 第85回日本生化学会中部支部例会
4．発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------