

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450121

研究課題名(和文)可溶型(プロ)レニン受容体産生機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of soluble (pro)renin receptor generation.

研究代表者

中川 寅(Nakagawa, Tsutomu)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：10281049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円

研究成果の概要(和文)：Site-1 protease (S1P)が可溶型プロレニン受容体(可溶型PRR)を産生する可能性を検証した。ヒトPRRを発現させたCHO細胞の内在性S1PをsiRNAで減少させると可溶型PRR産生は抑制された。逆に、遺伝子導入してS1Pを過剰発現させると可溶型PRR産生は増加した。S1P阻害剤PF429242はCHO細胞とHeLa細胞で可溶型PRR産生を抑制したが、ADAM阻害剤GM6001は抑制しなかった。Furin阻害剤Iは可溶型PRR量には影響しなかったが、そのサイズを増加させた。これらの結果から、可溶型PRRはS1Pとfurinの段階的プロセッシングによって産生されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether site-1 protease (S1P) is responsible for cleaving (pro)renin receptor (PRR) to generate soluble PRR. Reduction of endogenous S1P with siRNA attenuated soluble PRR generation in CHO cells exogenously expressing human PRR; conversely, overexpression of S1P by transient transfection increased soluble PRR generation. The S1P inhibitor PF429242 suppressed soluble PRR generation in CHO and HeLa cells; however, the ADAM inhibitor GM6001 had no effect. Moreover, furin inhibitor I had no effect on the amount of soluble PRR, but caused an increase in its size. Taken together, these results suggest that soluble PRR is generated by sequential processing by S1P and furin.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：(プロ)レニン受容体 プロセッシング酵素 site-1 protease furin バイオマーカー 可溶型受容体 A
TP6AP2

1. 研究開始当初の背景

(1) 国内外の研究動向及び位置付け

可溶型(プロ)レニン受容体の発見と研究動向

(プロ)レニン受容体(PRR)は、血圧調節を司る酵素レニンとその不活性前駆体プロレニンを結合する1回膜貫通型受容体で(Nguyen G, et al. J Clin Invest. 2002)、腎障害や心血管疾患の発症・進展に関わることが知られている。2009年、Cousinらによって可溶型 PRR が発見された(Cousin C, et al. Hypertension 2009)。可溶型 PRR は、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生成する(図1)。可溶型 PRR は血中や尿中で検出され、PRR が関与する臓器障害の予測因子になり得る可能性が指摘された(Watanabe N, et al. Hypertension 2012)。続く2~3年の間に、可溶型 PRR が糖尿病網膜症、妊娠高血圧、下垂体腺腫(癌)などの疾病で増加することが相次いで報告され、臓器障害の新規バイオマーカー候補として注目を集めている。

国内外の可溶型 PRR 研究は、病態との相関性を示そうとする医学的研究が主流であり、可溶型 PRR の産生機構に関して分子レベルの見解は乏しい。

(2) 本研究の着想に至った経緯

前出の Cousin らは、細胞内プロテアーゼ furin が、全長型 PRR を RKTR↓部位(図1、Furin↓)で切断して可溶型 PRR を産生しており、furin 活性欠損細胞 LoVo では可溶型 PRR が産生されないと報告している。しかし、LoVo細胞においても可溶型 PRR は産生されており、ADAM19 が可溶型 PRR を産生する細胞内プロテアーゼであるという矛盾した報告もある(Yoshikawa A, et al. Hypertens Res. 2011)。

私は以下の理由から、furin や ADAM19 でなく、第3のプロテアーゼ site-1 protease(以下、S1P)が可溶型 PRR を産生するプロセシング酵素であるとの仮説を立てた。

(i) Furin による基質タンパク質の切断は通常 R-X-[K/R]-R↓部位で起こるが、Cousin らの言う PRR の切断部位 RKTR↓(図1)は、このコンセンサス配列に合致していない。

(ii) Furin 活性を持たない LoVo 細胞においても可溶型 PRR が産生される(前述)。

(iii) 切断によって生じるC末端断片(図1「M8-9断片」)のN末端アミノ酸配列が、ウシ(bovine)で報告されており、その位置は、furin が切断するとされている位置よりも3残基C末端寄りのETKQ...である(Ludwig J, et al. J Biol Chem. 1998. 図1参照)。

(iv) Site-1 protease (S1P) は基質タンパク質を[R/K]-X-φ-[L/T]↓(φは疎水性アミノ酸)で切断する。S1P が PRR を切断しているなら、M8-9断片のN末端配列(前項)を矛盾なく説明できる。

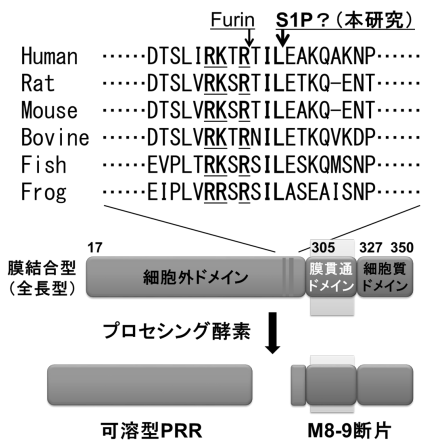


図1 可溶型(プロ)レニン受容体産生機構

(プロ)レニン受容体(PRR)は細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞質ドメインから成る。膜結合型(全長型)PRRは細胞内プロテアーゼ(プロセシング酵素)で切断され、N末端断片の可溶型 PRR と膜結合ドメインを含むC末端断片 M8-9を生じる。Furin および site-1 protease (S1P) による予想切断部位を矢頭で示してある。

2. 研究の目的

本研究では、臓器障害の新しいバイオマーカー候補として近年注目されている可溶型 PRR について、その産生機構を明らかにすることを目的とした。具体的には、膜結合型転写因子やペプチドホルモン前駆体を切断することが知られる細胞内プロテアーゼ S1P が PRR のプロセシング酵素であるという仮説を検証した。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

培養細胞

ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞(RCB0007)は理研 BRC から提供された。ヒト PRR を発現するチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞 CHO/hPRR-10His は、当研究室で樹立された(Suzuki-Nakagawa C. et al. Biochem Biophys Res Commun. 444, 461-466, 2014)。

市販抗体

抗ヒト PRR 抗体(GTX114169)、抗ヒト S1P 抗体(GTX117475)は GeneTex 社から購入した。ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体(#170-6515)はバイオラッド社から購入した。

切断部位特異抗体

S1P 切断によって生じるヒト可溶型 PRR のC末端部-RTIL₂₈₁、および furin 切断によって生じる-RKTR₂₇₈を標的とする抗体の作製は、医学生物学研究所に委託した。

(2) 実験方法

組換え型ヒト可溶型 PRR の生産

ヒト PRR の N17-L281、N17-R278 をコードする DNA 断片をプラスミド pET11a に組み込み、大腸菌 JM109(DE3)で発現させた。不溶性画分に回収された可溶型 PRR を用いた。

S1P のノックダウン

CHO/hPRR-10His 細胞に S1P を標的とする siRNA (Thermo Fisher Scientific, Silencer select, #s488)もしくはネガティブコントロール siRNA (#4390843)をトランスフェクションし、48 時間後に培地を交換した後、さらに 24 時間培養を継続した。細胞溶解液(細胞)と培養上清(培地)を調製し、qRT-PCR によって細胞内 S1P mRNA および β -アクトリン mRNA を定量した。また、SDS-PAGE 後、イムノプロットにより可溶型 PRR 産生を解析した。

S1P の過剰発現

ヒト S1P を組み込んだ発現プラスミド pEBMulti-hS1P を、CHO/hPRR-10His 細胞にトランスフェクションし、24 時間後に培地を交換した後、さらに 24 時間培養を継続した。細胞溶解液(細胞)と培養上清(培地)を調製し、SDS-PAGE 後、可溶型 PRR 産生をイムノプロットにより解析した。

プロテアーゼ阻害剤実験

CHO/hPRR-10His 細胞および HeLa 細胞を 12 穴プレートで培養した。CHO 細胞は通常培地に、HeLa 細胞は Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific 社)に交換した後、DMSO(溶媒)、10 μ M PF429242 (AdoQ BioScience 社)、50 μ M furin 阻害剤 I (Merck Millipore 社)、もしくは 50 μ M GM6001 (Focus Biomolecules 社)で 24 時間処理した。細胞溶解液(細胞)と培養上清(培地)を調製し、SDS-PAGE 後、可溶型 PRR 産生をイムノプロットにより解析した。

Brefeldin A (BFA)処理

CHO/hPRR-10His 細胞および HeLa 細胞を 12 穴プレートで培養した。細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄後、DMSO(溶媒)、10 μ M PF429242、もしくは 50 μ M furin 阻害剤 I を添加した培地で 1 時間処理した。DMSO(溶媒)もしくは BFA (Merck Millipore 社もしくは和光純薬工業株式会社)(10 μ g/mL)を添加してさらに 1 時間処理した。細胞溶解液(細胞)を調製し、SDS-PAGE 後、イムノプロットにより可溶型 PRR 産生を解析した。

BFA 処理によって生成した可溶型 PRR の、BFA 除去後の様子を解析するため、12 穴プレートで培養した CHO/hPRR-10His 細胞を、10 μ g/mL BFA を添加した培地で 2 時間処理した。細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄後、DMSO(溶媒)、10 μ M PF429242、50 μ M furin 阻害剤 I、もしくは 10 μ M furin 阻害剤 II を含む培地に交換し、4 時間処理した。細胞溶解液(細胞)と培養上清(培地)を調製し、SDS-PAGE 後、イムノプロットにより可溶型 PRR 産生を解析した。

4. 研究成果

(1) S1P 遺伝子ノックダウンの影響

我々は以前、遺伝子導入によってヒト PRR (C 末端に 10His タグが付加されている)を外

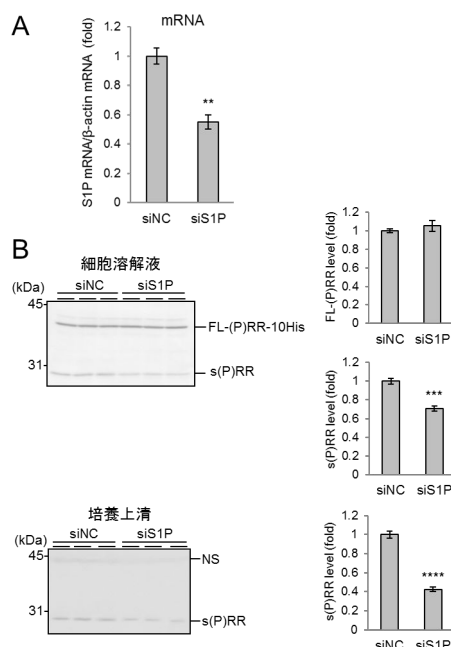


図2 S1P 遺伝子ノックダウンが CHO/hPRR-10His 細胞における全長型 PRR の切断に及ぼす影響

来性に発現させた CHO 細胞(CHO/hPRR-10His)において、内在性のプロテアーゼによって膜結合型(全長型)PRR が切断されて可溶型 PRR が産生されることを報告している(Suzuki-Nakagawa C, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2014)。S1P が全長型 PRR を切断するかどうか検証するために、この細胞で、siRNA を用いて S1P を減少させ、その影響を調べた。S1P を標的とする siRNA 処理によって、S1P mRNA はネガティブコントロールの約 50%に減少した(図 2A)。イムノプロット解析の結果、細胞と培地中の可溶型 PRR 量はコントロールと比較して、それぞれ 0.7 倍、0.4 倍に低下した(図 2B)。これらの結果は、S1P が全長型 PRR の切断に必要であることを示唆している。

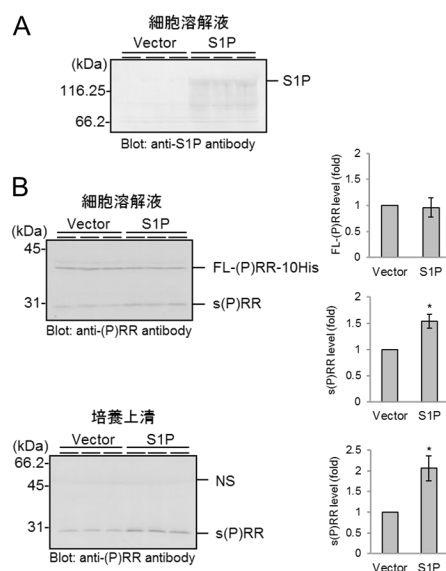


図3 S1P の過剰発現が CHO/hPRR-10His 細胞における全長型 PRR の切断に及ぼす影響

(2) S1P 過剰発現の影響

同細胞に、遺伝子導入によってさらにヒト S1P を過剰発現させた(図 3A)。その結果、細胞と培地中の可溶性 PRR 量は S1P 遺伝子を組み込んでいないベクターを導入した場合と比較して、それぞれ 1.5 倍、2 倍に増加した(図 3B)。このことから、S1P が PRR を切断して可溶性 PRR を産生する可能性が支持された。

(3) プロテアーゼ阻害剤の影響

可溶性 PRR を産生する細胞内プロテアーゼとして、これまでに furin (Cousin ら、2009 年)と ADAM19 (Yoshikawa ら、2011 年)の異なる 2 つが報告されている。そこで、S1P ならびに furin および ADAM19 の関与について、プロテアーゼ阻害剤実験により検証した。

CHO/hPRR-10His 細胞において、S1P 阻害剤 PF429242 によって細胞内の可溶性 PRR の割合が減少し、培地中の可溶性 PRR が顕著に減少した(図 4A)。ADAM 阻害剤 GM6001 の影響は認められなかった。Furin 阻害剤 I は可溶性 PRR 量には影響しなかったが、培地の可溶性 PRR バンドの移動度がわずかに低下した(見掛けの分子量が増加した)(図 4A)。

HeLa 細胞において内在性に発現している PRR を解析したところ、同様に、PF429242 によって細胞内可溶性 PRR の割合が減少し、furin 阻害剤 I によって培地の可溶性 PRR バンドの移動度がわずかに低下した(図 4B)。

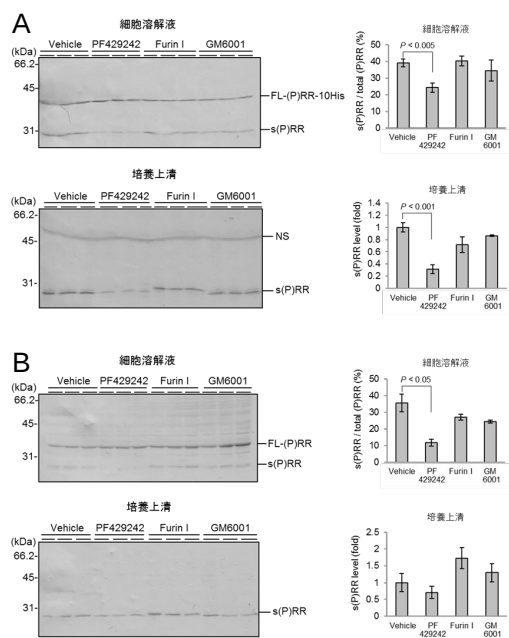


図 4 プロテアーゼ阻害剤が可溶性 PRR 産生に及ぼす影響

(A)CHO/hPRR-10His 細胞、(B)HeLa 細胞

細胞内の可溶性 PRR のバンドの移動度は、培地中の可溶性 PRR のバンドの移動度よりわずかに低かった(図 5A)。Furin 阻害剤 I によって、培地の可溶性 PRR のバンドは高分子量側にシフトし、細胞内の可溶性 PRR とバンドの移動度が同じになった。

細胞内の可溶性 PRR と培地中の可溶性 PRR のバンドの移動度は、組換え型ヒト可溶性 PRR N17-L281 および N17-R278 と、それぞれ一致した(図 5B)。

以上の結果は、S1P は全長型(膜結合型)PRR から高分子量型の可溶性 PRR を産生し、furin は高分子量型から低分子量型の可溶性 PRR への変換(さらなる切断)に関わることを示唆している。

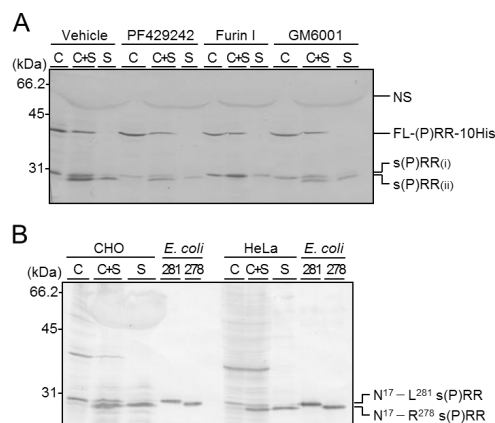


図 5 SDS-PAGE で異なる移動度を示す可溶性 PRR (A)図 4A で用いた細胞溶解液(C)および培養上清(M)、ならびにそれらを混合したもの(C+M)を、ゲルの隣接するレーンで泳動した。(B)CHO/hPRR-10His 細胞および HeLa 細胞の C、M、C+M を、組換え型ヒト可溶性 PRR N17-L281(*E. coli* 281)および N17-R278(*E. coli* 278)とゲルの隣接するレーンで泳動した。

(4) 細胞内輸送阻害剤 BFA の影響

S1P はシス・中間ゴルジ嚢に局在している。一方 furin は、トランスゴルジネットワークに局在し、細胞表面との間をリサイクルしている。細胞内輸送阻害剤 BFA は、小胞体とシス、中間、トランスゴルジ嚢の融合を引き起こす一方で、トランスゴルジネットワークは小胞体とは融合させずに微小管形成中心へと集合させる。

CHO/hPRR-10His 細胞を BFA で処理すると、可溶性 PRR の割合が増加した(図 6A)。この増加は、S1P 阻害剤 PF429242 で抑えられたが、furin 阻害剤 I は阻害効果を示さなかった(図 6A)。培地中には PRR は検出されなかった(data not shown)。HeLa 細胞の内在性 PRR に対しても同様の結果が得られた(図 6B)。

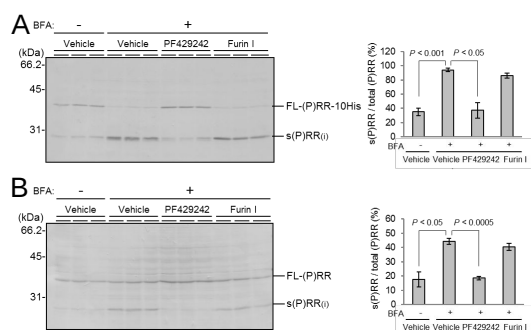


図 6 BFA が可溶性 PRR 産生に及ぼす影響

(A)CHO/hPRR-10His 細胞、(B)HeLa 細胞

BFA による輸送阻害作用は可逆的であることが知られている。CHO/hPRR-10His 細胞を BFA 処理後、BFA を洗浄除去して培養を継続したところ、培地中に低分子量型の可溶型 PRR が検出された(図 7)。BFA 処理によって細胞内に生成した高分子量型の可溶型 PRR が、BFA 除去によって輸送が再開されたことにより、低分子量型へと変換されたと考えられる。この変換は、細胞膜透過性をもつ furin 阻害剤 I で阻害されたが、S1P 阻害剤 PF429242 や細胞膜非透過性の furin 阻害剤 II では阻害されなかった。このことは、高分子量型から低分子量型の可溶型 PRR への furin による変換は、細胞表面や細胞外でなく、細胞内で起こることを示唆している。

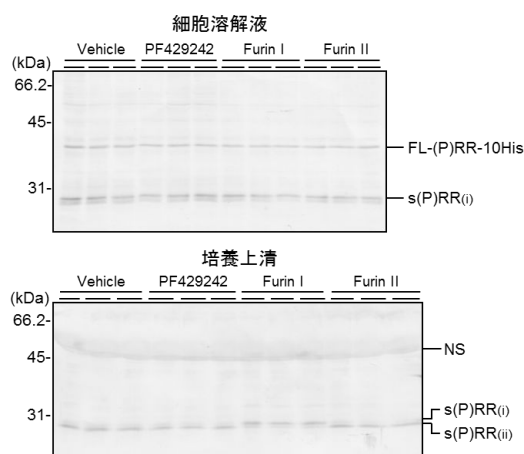


図 7 BFA 処理によって生成した高分子量型可溶型 PRR の BFA 除去後の挙動
(A) CHO/hPRR-10His 細胞、(B) HeLa 細胞

(5) 可溶型 PRR 産生機構(新しいモデル)

本研究では、細胞内プロテアーゼ S1P が可溶型 PRR を産生するプロセッシング酵素であるという仮説を検証する実験を行い、その仮説を支持する以下の結果を得た。第 1 に、ヒト PRR を外来性に発現させた CHO/hPRR-10His 細胞において、siRNA によって内在性の S1P を減少させると、可溶型 PRR 産生が抑制された。第 2 に、この細胞に、遺伝子導入によってヒト S1P を一過性に過剰発現させたところ、可溶型 PRR 産生が増加した。第 3 に、S1P 阻害剤 PF429242 は可溶型 PRR 産生を抑制した。第 4 に、細胞内の可溶型 PRR は、組換え型ヒト可溶型 PRR N17-L281 と同じサイズであり、S1P の予想切断部位-RTIL₂₈₁↓で切断されている可能性が支持された。このことは、さらに-RTIL₂₈₁部位を標的とする抗体との交叉性によって確認された。

本研究で得られた結果に基づいて、可溶型 PRR 産生機構の新しいモデルを提唱する(図 8)。これまでのモデルでは、furin (Cousin ら、2009 年)もしくは ADAM19 (Yoshikawa ら、2011 年)が全長型 PRR を切断して可溶型 PRR を産生するというものであった。図 8 に示す我々の新しいモデルでは、小胞体において 1 回膜貫通型タンパク質(全長型)として生合

成された PRR は、ゴルジ体に輸送され、S1P に-RTIL₂₈₁↓部位で切断されて可溶型 PRR(高分子量型)と M8-9 断片を生じる。トランスゴルジネットワーク(TGN)に輸送された高分子量型可溶型 PRR は furin によって-RKTR₂₇₈↓部位で切断され、低分子量型可溶型 PRR として細胞外へ分泌される。

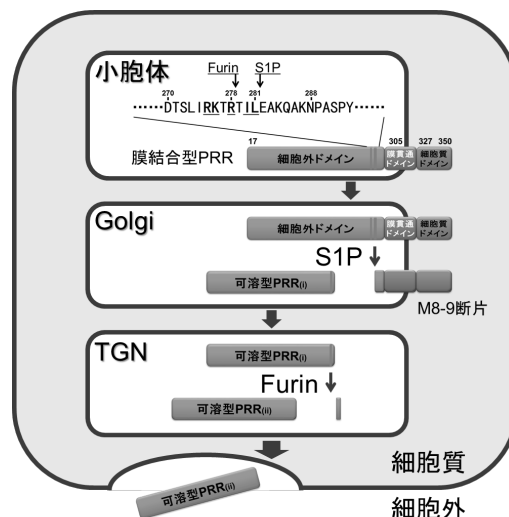


図 8 本研究で提唱する可溶型 PRR 産生機構
PRR は小胞体において 1 回膜貫通型タンパク質(全長型)として生合成される。ゴルジ体(Golgi)に輸送された全長型 PRR は S1P によって-RTIL₂₈₁↓部位で切断され、可溶型 PRR(高分子量型)と M8-9 断片を生じる。トランスゴルジネットワーク(TGN)に輸送された高分子量型可溶型 PRR は furin によって-RKTR₂₇₈↓部位で切断され、低分子量型可溶型 PRR として細胞外へ分泌される。

(6) 展望

可溶型 PRR は血中や尿中に検出され、臓器障害の新しいバイオマーカー候補として注目されている。本研究によって、可溶型 PRR は、S1P と furin が段階的に作用して細胞外へ分泌されることが明らかになった。また、細胞の状態によっては、furin による切断を経ずに分泌されることが示された(図 4、7)。このことは、疾病の種類や病態によって、血中(や尿中)可溶型 PRR の量だけでなく、各分子型が占める割合が異なっている可能性を示唆している。これらの知見が今後の可溶型 PRR 研究に活かされることを期待する。

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 1 件)

Nakagawa T, Suzuki-Nakagawa C, Watanabe A, Asami E, Matsumoto M, Nakano M, Ebiara A, Uddin MN and Suzuki F: Site-1 protease is required for the generation of soluble (pro)renin receptor. J Biochem. 161(4): 369-379, 2017. 査読あり

〔学会発表〕(計5件)

浅野菜奈、中川千春、松井咲豊子、上村葉月、牧田玲奈、海老原章郎、鈴木文昭、中川寅：切断部位特異抗体を用いた可溶型(プロ)レニン受容体各分子型の個別検出．第81回日本生化学会中部支部例会、2017年5月20日、名古屋市立大学薬学部(名古屋)．

中川千春、渡辺晃子、浅見映理子、海老原章郎、鈴木文昭、中川寅：Site-1 protease と furin による段階的な可溶型(プロ)レニン受容体産生機構．第89回日本生化学会大会、2016年9月26日、仙台国際センター(仙台)．

Nakagawa, T.：A mechanism for the generation of soluble (pro)renin receptor. International Society of Hypertension 2016 Satellite Symposium Renin-Angiotensin-Aldosterone System. 2016年9月23日、コングレスクエア日本橋(東京)．(招待講演)

野村健太、田中美帆、中川千春、都築文弥、丹羽嵩志、海老原章郎、鈴木文昭、中川寅：小胞体ストレス誘導剤が可溶型(プロ)レニン受容体産生に及ぼす影響．第80回日本生化学会中部支部例会、2016年5月21日、三重大学(三重)．

中川寅、中川千春、渡辺晃子、浅見映理子、海老原章郎、鈴木文昭：可溶型(プロ)レニン受容体の産生機構．血压とホルモン科学協会第8回(プロ)レニン受容体フォーラム、2016年3月19日、岐阜大学医学部記念会館(岐阜)．

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.abios.gifu-u.ac.jp/nakagawa/>

6．研究組織

(1)研究代表者

中川 寅 (NAKAGAWA TSUTOMU)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：10281049