

助成番号 9947

プロスタシンによるNaチャンネル活性化の分子生物学的機序の解明と
Na代謝調節における役割の検討

助成研究者：富田 公夫(熊本大学 医学部 第三内科)
共同研究者：野々口 博史(熊本大学 医学部 第三内科)
北村 健一郎(熊本大学 医学部 第三内科)

高血圧の成因としての腎臓の役割は大きい種々の報告があり絶対的な仮説はない。日本人の高血圧は食塩感受性の割合が高く、腎臓でのNa調節異常の関与が強く考えられている。腎尿細管でのNa再吸収は、近位尿細管での各種物質との共輸送系、ヘンレ係蹄のNa/K/2Cl共輸送系、遠位尿細管のNa/Cl共輸送系とNaチャンネルなどが重要であり、今日、高血圧との関連においては特にNaチャンネルが注目されている。今日まで、Naチャンネルを刺激し、尿細管でのNa再吸収を亢進し高血圧を惹起するホルモンとしてはアルドステロンが良く知られているが、抗利尿ホルモンもNaチャンネルを刺激し、また、アルドステロンと協調的にNaチャンネルを刺激し尿細管でのNa再吸収を亢進する事が知られている。最近、このNaチャンネル機能を亢進する物質(channel-activating protease: CAPI)がアフリカツメガエル細胞よりクローニングされた。この物質はセリンプロテアーゼファミリーに属している。今回、私たちは、Naチャンネルの活性化機序をセリンプロテアーゼファミリーの1つであるトリプシンを用いて検討した。また、このセリンプロテアーゼファミリーに属するが、まだ機能の検討されていないプロスタシンについて機能解析をするためラットプロスタシンをクローニングし検討を加えた。

トリプシンによるNaチャンネルの活性化には γ サブユニットのRKRR配列が重要な役割を持つことが判明した。ラットプロスタシンは、コーディングリージョンは1029bp、5'ノンコーディングリージョンは223bp、3'ノンコーディングリージョンは956bp、全長2208bp,342アミノ酸からなる蛋白である。ヒトのDNAシーケンスから推測すると32アミノ酸からなるシグナルシーケンスを持ち、12アミノ酸のライトチェーンと278アミノ酸のヘビーチェーンからなる。また、ポリA付加シグナルを2カ所に持っている。ラットプロスタシンは胃、大腸、皮膚、前立腺、肺、腎臓の皮質、髄質に発現しており、心臓、肝臓、精巣、脳、膵臓には発現していない。ラットプロスタシンはCCD,OMCD,IMCDに存在することが確認された。ENaCとプロスタシンを共発現させるとアミロライド感受性ナトリウム電流がおよそ2倍に増加した。

集合尿細管でのNaチャンネルの活性化には抗利尿ホルモンとアルドステロンが重要であるが、新たにプロスタシンが関与している可能性が示された。プロスタシンとアルドステロンがリンクしているのか、プロスタシンが独立した系を持っているのかについては今後の検討を要する。

助成番号 9947

プロスタシンによるNaチャンネル活性化の分子生物学的機序の解明と
Na代謝調節における役割の検討

助成研究者：富田 公夫（熊本大学 医学部 第三内科）

共同研究者：野々口 博史（熊本大学 医学部 第三内科）

北村 健一郎（熊本大学 医学部 第三内科）

【研究目的】

腎臓の異常が高血圧の成因の1つとして考えられているが、それではどのような異常なのかについては研究者の数ほど報告されており、いずれも不十分な結果となっている。

昇圧系のレニン・アンギオテンシン・アルドステロン系、エンドセリン系、抗利尿ホルモン系、降圧系のカリクレイン・キニン系、一酸化窒素系、心房性Na利尿ペプチド系、プロスタグランジン系などNa貯留による高血圧を原因と考えて各分野で検討され、それぞれ異常が指摘されている。腎尿細管でのNa再吸収は、近位尿細管での各種物質との共輸送系、ヘンレ係蹄のNa/K/2Cl共輸送系、遠位尿細管のNa/Cl共輸送系とNaチャンネル、などが重要であり、今日高血圧との関連においては特にNaチャンネルが注目されている。今日まで、Naチャンネルを刺激し、尿細管でのNa再吸収を亢進し高血圧を惹起するホルモンとしてはアルドステロンが良く知られているが、抗利尿ホルモンもNaチャンネルを刺激し、また、アルドステロンと協調的にNaチャンネルを刺激し尿細管でのNa再吸収を亢進する事が知られている。近年、遺伝性的高血圧の一つであるLiddle症候群において、これらホルモン系とは関係なく、尿細管自体のNaチャンネル機能の亢進が原因であることが遺伝子レベルで示された(1, 2, 3, 4)。多くの研究者がこのLiddle症候群にみられたNaチャンネルの異常が本態性高血圧症にも認められるのではないかと検討したが、現在まで黒人においては関与が推察されているが、白人や本邦では確認されていない(5, 6, 7, 8)。それでは何が腎尿細管でのNa再吸収亢進に関与しているのかという問いに対し、最近、このNaチャンネル機能を亢進する物質(channel-activating protease: CAP1)がアフリカツメガエル細胞よりクローニングされた(9)。

生体内でこのCAP1の分布は上皮型Naチャンネルの分布とほぼ類似しており、腎、腸、肺、皮膚、卵巣などに分布している。CAP1はトリプシン、カリクレイン、組織プラスミノゲンアクチベーター、などとおおよそ50%の相同性を持つセリンプロテアーゼファミリーに属することがわかった。

今回、私たちは、Naチャンネルの活性化機序をトリプシンを用いて検討した。また、このセリンプロテアーゼファミリーに属するが、まだ機能の検討されていないプロスタシンについて機能解析をするためラットプロスタシンをクローニングし検討を加えた。

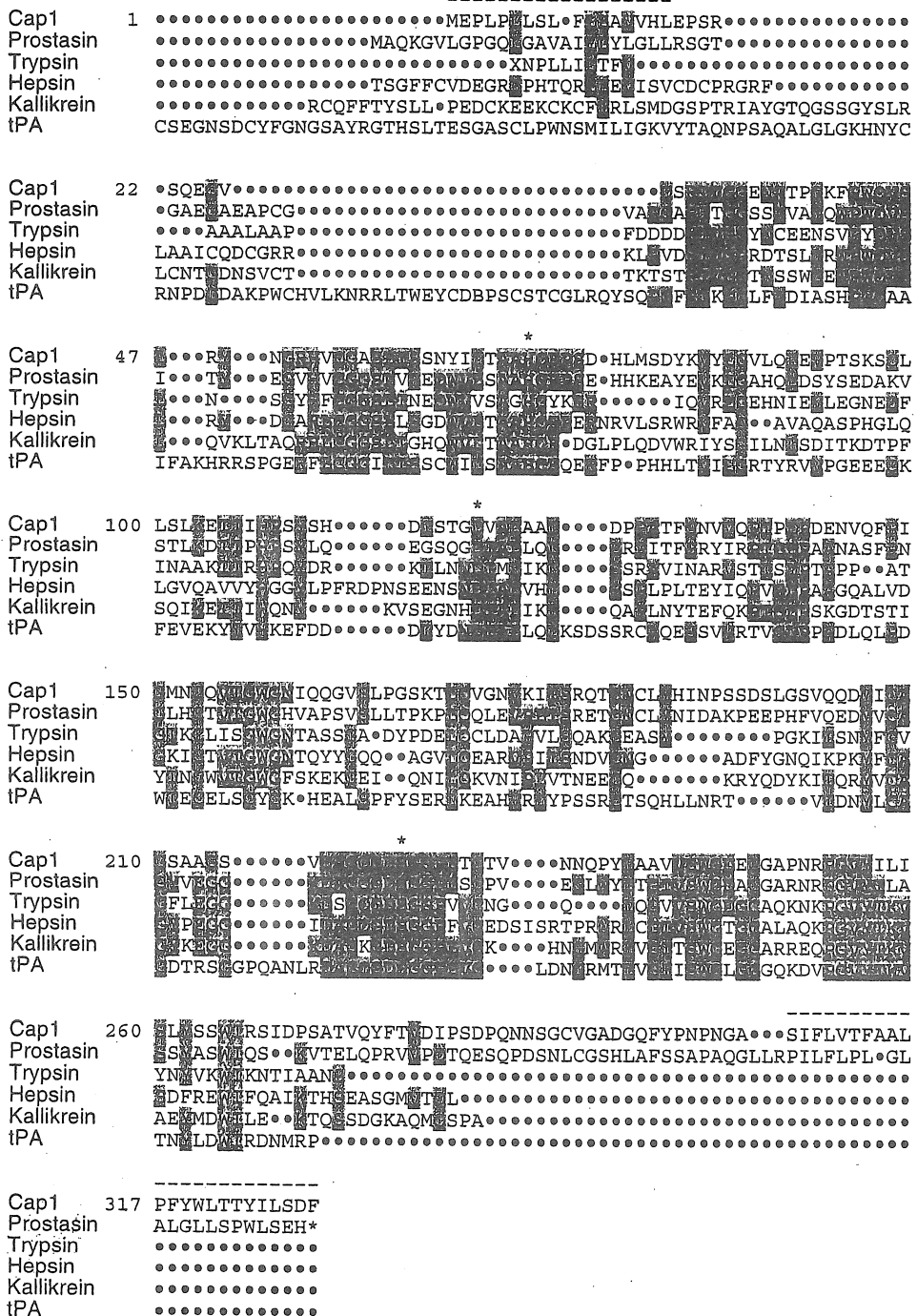


Figure 1. Comparison of the amino-acid sequence of serine protease family(from ref. 9)

【研究方法】

I. トリプシンによる Na チャネルの活性化機序

上皮型 Na チャネルは (ENaC) α 、 β 、 γ 、のサブユニットからなり、それぞれが30%程度のホモロジーを有している。最近の報告では $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ のヘテロマルチマーが、機能的ユニットと考えられている。ラット ENaC は二回膜貫通型の蛋白でその細胞外 loop にはいくつかの種の間で、高度に保存された4連続塩基性アミノ酸配列が2カ所存在している。アルギニン、リシンはトリプシンの基質となりうるアミノ酸でもあり、私たちは、この部位にトリプシンが作用するという仮説をたて、ラット ENaC γ サブユニットのこの部位にいくつかの mutant を作製し、この部位に対するトリプシンの効果をみた。

- 1) トリプシンの ENaC 活性化においてどのサブユニットが重要かの検討のため、 $\alpha \beta$ 、 $\alpha \gamma$ の二つのサブユニットの組み合わせで発現させ、トリプシンの効果をみた。
- 2) ラット ENaC γ サブユニットの、RKRR, RKRK の部位について、deletion mutant および、アラニン置換 mutant を作製した。ラット ENaC の各サブユニットの cRNA を *Xenopus oocyte* に co-injection し、two-microelectrode voltage clamp 法にて whole cell 電流を観察した。single channel 電流は cell-attached mode で測定した。

II. ラットプロスタシンのクローニングと分布

1) ラットプロスタシン cDNA のクローニングには degenerate primer を用いた PCR を施行し、全長をクローニングするため 5', 3' RACE を施行した。電気生理は oocyte を用いた voltage clamp 法でアミロライド感受性ナトリウム電流を測定した。

2) ラットプロスタシンの組織分布を調べるためにプロスタシン全長 cDNA を用いてノーザンブロットを行った。各組織毎に total RNA を 30 μ g づつ泳動した。

【研究結果】

I. トリプシンによる Na チャネルの活性化

1) $\alpha \gamma$ のサブユニットではトリプシンによる活性化がみられたのに対し、 $\alpha \beta$ のサブユニットでは電流の変化はみられなかった。

2) wild type ではトリプシン 2 μ g/ml 5分間の作用で5.7倍の活性化が得られた。これに対して、 Δ RKRR では basal で wild type 同様の電流が観察されるが、トリプシンによる活性化は認められなかった。 Δ RKRK mutant では basal の電流は小さいが、wild type と同様に、7.8倍の活性化が観察された。

そこで、この RKRR 配列に注目し、これらのアミノ酸をすべてアラニンに置換した AAAA mutant でも同様の実験を行った。AAAA mutant でも、 Δ RKRR と同様に basal の電流には変化はみられなかったが、トリプシンによる活性化も見られなかった。

II. ラットプロスタシン cDNA のクローニング

1) コーディングリージョンは 1029bp、5' ノンコーディングリージョンは 223bp、3' ノンコーディングリージョンは 956bp、全長 2208bp、342 アミノ酸からなる蛋白である。ヒトの DNA シークエンスから推測すると 32 アミノ酸からなるシグナルシークエンスを持ち、12 アミノ酸のライトチェーンと 278 アミノ酸のヘビーチェーンからなる。また、ポリ A 付加シグナルを 2 カ所に持っている。

ラットプロスタシンはヒトプロスタシンと 77% の相同性がある。また、セリンプロテアーゼにおいて高度に保存されているヒスチジン、アスパラギン、セリンからなる活性中心を有している。

1) ラット プロスタシンの組織分布

ラットプロスタシンは 2.3kb のバンドとして確認された。ラットプロスタシンは胃、大腸、皮膚、前立腺、肺、腎臓の皮質、髄質に発現しており、心臓、肝臓、精巣、脳、膵臓には発現していない。特に腎臓の皮質、髄質に強い発現を認めた。また、この分布は ENaC の分布と似ていた。

ENaC は尿細管レベルにおいて CCD, OMCD, IMCD に発現していることが報告されている。そこで集合管でのプロスタシンの発現をた。図 3 は集合管をセグメントごとにマイクロダイセクションし、RT-PCR した写真である。プロスタシンは 376bp のバンドとして確認された。この結果からラットプロスタシンは CCD, OMCD, IMCD に存在することが確認された。プロスタシンは GPI アンカー蛋白であり、尿細管では管腔側に存在する。ENaC も管腔側に存在することより、プロスタシンと ENaC は同一細胞膜上に存在すると考えられる。

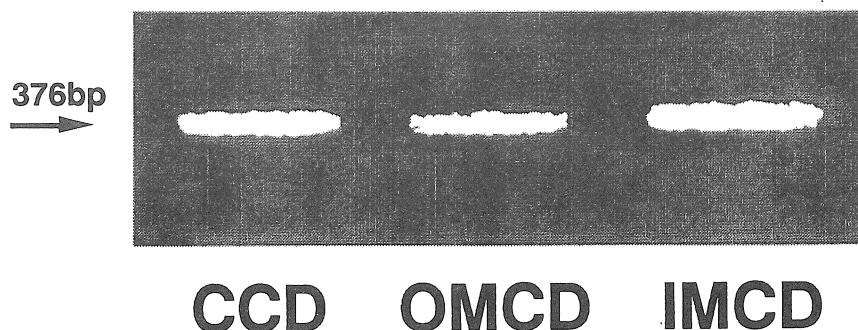


Figure 2. Presence of mRNA of rat prostaticin in CCD, OMCD and IMCD

3) ラット プロスタシンによる Na チャネルの活性化

ENaC の $\alpha \beta \gamma$ サブユニットの cRNA とラットプロスタシン cRNA を oocyte に打ち込み、ENaC のみまたは ENaC とプロスタシンを共発現させ、16 時間後にアミロライド感受性ナトリウム電流を測定した。ENaC のみと比較すると ENaC とプロスタシンを共発現させた方はアミロライド感受性ナトリウム電流がおおよそ 2 倍に増加した。

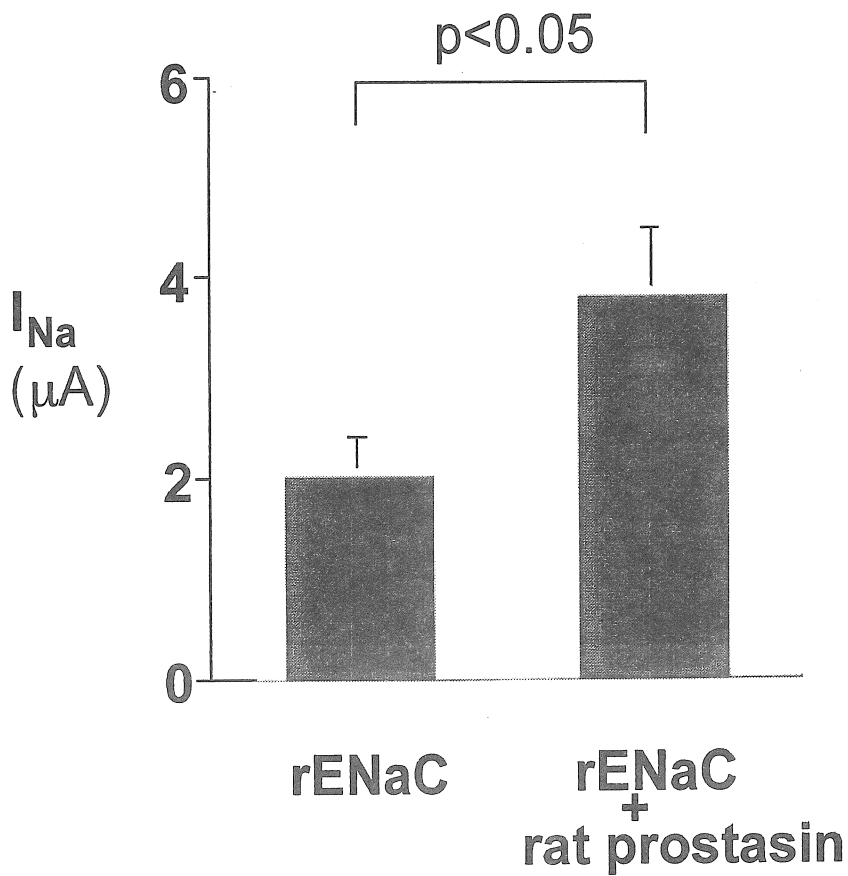


Figure 3. Activation of epithelial sodium channel by rat prostasin

【考察】

Liddle 症候群の Na チャネル遺伝子の異常の発見により高血圧の原因遺伝子の研究は非常に活性化され多くの興味ある研究がなされつつある。この Na チャネル遺伝子の異常がなぜ Na チャネル活性を亢進させるのかについて、ユビキチン蛋白結合 Nedd4 の WW domain が重要な役割を持っていることが示されているが、この調節因子に関しては細胞内 Na イオン濃度が重要で、G 蛋白が関与することが示唆されている。

CAP1 はアフリカツメガエル細胞からクローニングされたものでヒトの生理的意義を検討するには発生学的に遠いと考え、まずラットにおいて検討を始めた。ヒトプロスタシンは 1995 年にカリクレインファミリーの一つとしてクローニングされていた (10) が、機能は全く不明でその後放置されていた。

セリンプロテアーゼであるラットプロスタシンは Na チャネルと同様の分布を示し、一回膜貫通型で、尿細管の管腔側に存在すると考えられる。トリプシンの実験結果からすると、Na チャネルには γ サブユニットが重要な役割を持つことが判明した。また、RKRR 配列を除いたり、他のアミノ酸に置換すると、Na チャネルの活性化がおこらず、この部位が重要な役割を持っているものと推測された。当初の報告では CAP1 は Na チャネルを切断していないと記載されていたが、膜表面には多量の Na チャネルが存在しており CAP1 による効果が少量であれば断片の検出は難しい可能性もあり、まだ結論は出せないと思われる。また、アルドステロン投与により Na チャネルの γ サブユニットのバンドが 2 本出現しており、 γ サブユニットが切断されている可能性が指摘されている。集合尿細管での Na チャネルの活性化には抗利尿ホルモンとアルドステロンが重要である。アルドステロンは細胞内受容体に結合した後核内に移動し aldosterone-induced protein を介して Na-K-ATPase やを活性化すると考えられているが、新たにプロスタシンが関与している可能性が示された。プロスタシンとアルドステロンがリンクしているのか、プロスタシンが独立した系を持っているのかについては今後の検討を要する。

プロスタシンは精液中に多量に存在しているためプロスタシンと命名されたが、尿中にも多量に排泄されている。しかも、女性にも同様に認められており、尿中プロスタシンが前立腺由来である可能性は少ない。ラットプロスタシンは CCD, OMCD, IMCD に存在すること、プロスタシンは GPI アンカー蛋白であり、尿細管では管腔側に存在すると考えられ、尿中プロスタシンは腎尿細管由来の可能性が高い。今までプロスタシンの機能はわかっていなかったが今回の研究により Na チャネルの活性化が確認され尿中に排泄されることより、尿中プロスタシンの測定により Na 代謝との関係が検討可能であり興味深い。

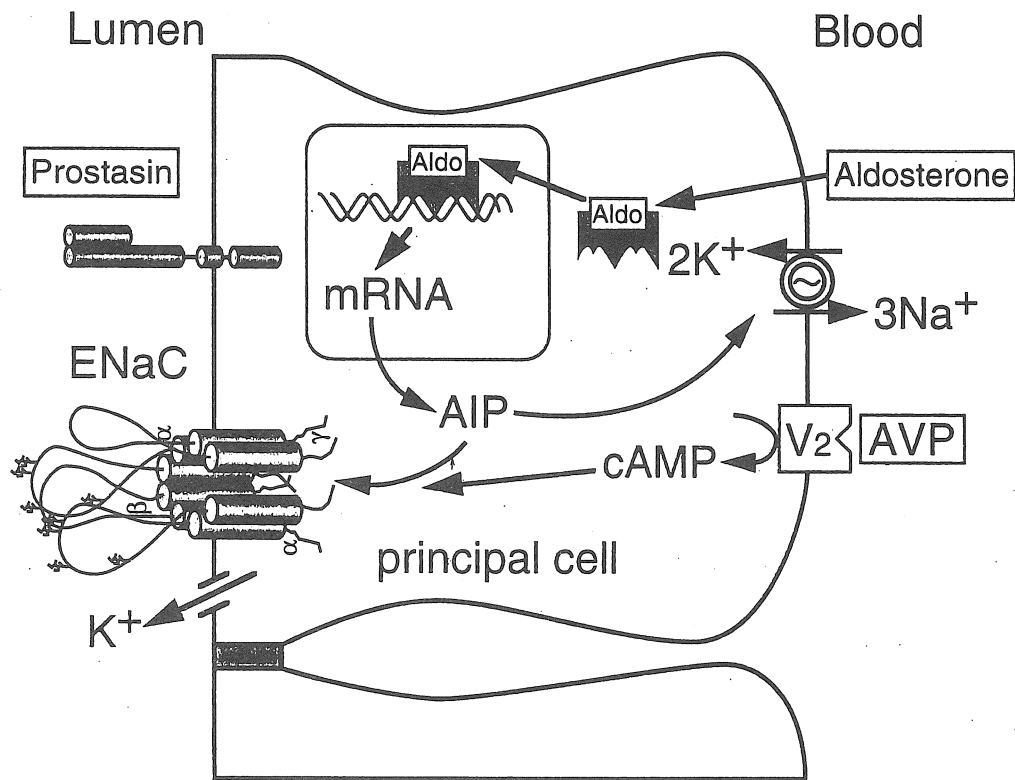


Figure 4. Schematic representation of epithelial sodium channel activation

【今後の課題】

プロスタシンの調節因子についてはいまのところ報告がみられないが、このプロスタシンが生理的に重要であれば、他のNa調節因子との間もしくはNaを変動させた場合に何らかの反応をするはずである。今後、レニン・アンギオテンシン・アルドステロン系、エンドセリン系、抗利尿ホルモン系、カリクレイン・キニン系、一酸化窒素系、心房性Na利尿ペプチド系、プロスタグランジン系などとの相互関係の有無についての検討が残されている。また、自然発症高血圧ラットや食塩感受性ラットであるDahlラットにおける動態、さらには、本態性高血圧におけるプロスタシンの役割についての検討が残っている。

文献

1. Shimkets RA., et al : Liddle's syndrome : Heritable human hypertension caused by mutations in the β subunit of the epithelial sodium channel. *Cell* 79:407-414, 1994
2. Schild L. et al : A mutation in the epithelial sodium channel causing Liddle disease increases channel activity in the *Xenopus laevis* oocyte expression system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 92: 5699-5703, 1995
3. Snyder PM., et al : Mechanism by which Liddle's syndrome mutations increase activity of a human epithelial Na channel. *Cell* 83: 969-978, 1995
4. Schild L. et al : Identification of PY motif in the epithelial Na channel subunits as a target sequence for mutations causing channel activation found in Liddle syndrome. *EMBO J.* 15: 2381-2387, 1996
5. Chang H., T. Fujita : Lack of mutations in epithelial Na channel β -subunit gene in human subjects with hypertension. *J. Hypertens.* 14: 1417-1419, 1996
6. Persu A. et al : Genetic analysis of the β -subunit of the epithelial Na channel in essential hypertension. *Hypertension* 32:129-137, 1998
7. Baker EH., et al : Association of hypertension with T594M mutation in β subunit of epithelial Na channels in black people resident in London. *Lancet* 351: 1388-1392, 1998
8. Su YR., et al : A novel variant of the β -subunit of the amiloride-sensitive sodium channel in African Americans. *J. Am. Soc. Nephrol.* 7: 2543-2549, 1996
9. Vallet V., et al : An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature* 389: 607-610, 1997
10. Yu JX. Chao L. Chao J. Molecular cloning, tissue-specific expression, and cellular localization of human prostaticin mRNA. *J. Biol. Chem.* 270(22): 13483-9, 1995
11. Masilamani S. Kim GH. Mitchell C. Wade JB. Knepper MA. Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J. Clin. Invest.* 104:R19-R23, 1999

The mechanism of the activation of sodium channel by serine protease and the cloning of rat prostaticin

Kimio Tomita, Hiroshi Nonoguchi, Kenichiro Kitamura
Third Department of Internal Medicine,
School of Medicine, Kumamoto University

Summary

Abnormal renal physiology plays a central role in virtually all sustained hypertensive states. In Japan, the population of salt-sensitive hypertension is relatively high. There are several mechanisms in the kidney to reabsorb Na from the luminal fluid, for examples, Na co-transporter systems in the proximal tubule, Na/K/2Cl co-transporter in the loop of Henle, Na/Cl co-transporter and Na channel in the distal nephron. Recent report has given strong impact on the pathogenesis of essential hypertension. Liddle syndrome, in which patients develop a form of genetic hypertension, has been shown to have mutations within the cytoplasmic COOH terminal of the β - and γ -subunits of the epithelial Na channel lead to a hyperactivity of the channel. In patients with essential hypertension, however, significant relation has not detected. Recently, a new Na channel activator, channel-activating protease(CAP1), has been cloned from a *Xenopus* kidney epithelial cell line. We investigated the mechanism of the activation of Na channel by serine protease using trypsin, and cloned the rat prostaticin.

RKRR sequence of γ -subunit is essential for the activation of Na channel by trypsin. We have cloned a 342-residue protein belonging to the serine protease family. A major mRNA expression is highly expressed in kidney, stomach, intestine, skin, prostate, and lung, all epithelial tissues that express epithelial Na channel mRNA. Coexpression of rat prostaticin together with the $\alpha \beta \gamma$ epithelial Na channel subunits led to a 2-fold increase in the amiloride-sensitive Na current.

Our data suggest that prostaticin, a serine protease, stimulates Na channel. Further studies are necessary to clarify whether prostaticin and other Na regulatory hormone systems are closely linked or not.