

## 42

助成番号 0042

## プロスタシンによるNaチャンネル活性化部位の同定と調節機構に関する研究

助成研究者：富田 公夫(熊本大学 医学部 第3内科)  
共同研究者：野々口 博史(熊本大学 医学部 第3内科)  
北村 健一郎(熊本大学 医学部 第3内科)

高血圧の成因としての腎臓の役割は大きくが種々の報告がある。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インスリン、抗利尿ホルモン、アルドステロンなどが重要である。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。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。前回、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つであるラットプロスタシンをクローニングし検討を加え、Naチャンネルを活性化することを示した。

今回、プロスタシンがアルドステロンにより刺激分泌されることを明らかにした。集合尿細管でのNaチャンネルの活性化にはインスリン、抗利尿ホルモンおよびアルドステロンが重要であり、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 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。尿細管内での存在様式はプロスタシンは GPI-anchored protein であることが示唆された。プロスタシンの発現調節が、すべてアルドステロンによるものか、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が新しいNa調節系として興味を持たれる。

プロスタシンの高血圧における動態はまだ検討されておらず、今後、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する必要がある。



## 7

助成番号 0042

プロスタシンによる Na チャネル活性化部位の同定と調節機構に  
関する研究

助成研究者：富田 公夫 (熊本大学 医学部 第3内科)

共同研究者：野々口 博史 (熊本大学 医学部 第3内科)

北村 健一郎 (熊本大学 医学部 第3内科)

## 【研究目的】

自然発症高血圧ラット (SHR) の腎臓を正常ラットに移植することにより、高血圧も移植されることや、ヒトの腎移植においても高血圧者から腎臓を移植された場合や、高血圧素因のあるヒトからの腎臓を移植された場合には、そうでない腎臓を移植された場合に比べ高血圧の発症頻度が高いことより、高血圧の成因の1つとして腎臓の役割が強く考えられている。しかし、どのような異常なのかについては膨大な数の報告がなされているが、重要な成果は得られていない。

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 代謝から各分野で検討され、それぞれ多くの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 チャネルが注目されている。現在まで、Na チャネルを刺激し、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、抗利尿ホルモンやインスリンも Na チャネルを刺激し、また、抗利尿ホルモンはアルドステロンと協調的に Na チャ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 チャネル活性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)。最近、Na チャ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 5.0 % 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。

昨年度、私たちは、トリプシンによる Na チャネルの活性化機序について検討し、 $\gamma$ サブユニットが関与している可能性を示唆する成績を得た。また、ラットおよびマウスプロスタシンをクローニングし、尿細管レベルにおいて CCD, OMCD, IMCD に発現していること、ENaC とプロスタシンとの共発現によりアミロライド感受性ナトリウム電流がおおよそ2倍に増加することを報告した。

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調節因子との間に、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。今回、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した。また、細胞内での存在形式、分泌様式についても検討した。

#### 【研究方法】

##### I. マウスプロスタシンのクローニング

マウス集合尿細管培養細胞を用いてプロスタシンの調節因子を検討するため、まずマウスプロスタシン cDNA のクローニングを 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。

##### II. ホルモンによる調節因子の検討

マウス集合尿細管培養細胞において、アンギオテンシン II, アルドステロン, エンドセリン, 抗利尿ホルモン, キニン, 一酸化窒素, 心房性Na利尿ペプチド, プロスタグランジンなどのプロスタシン mRNA, 培養液中への分泌動態について検討した。

##### III. SD ラットにおけるアルドステロン持続投与による尿中プロスタシン排泄動態の検討

オスSDラット（160-170 g）にオスモテックミニポンプを植え込みアルドステロンを持続投与する。メタボリックケージにて飼育し、尿中電解質、クレアチニン、プロスタシンなどを測定する。

##### IV. GPI-anchored protein についての検討

293 細胞を用いて、プロスタシンの膜結合状態を検討した。アミノ酸配列上 GPI（グリコシルホスファチジルイノシトール）アンカー蛋白が推定され、ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼC（PIPLC ; phosphatidylinositol-specific phospholipase C）により分解されると、アンカーとしての機能を失い、膜に繋がっていたタンパク質を遊離させるのでこれを用いて、細胞上清中への遊離について検討した。

【研究結果】

I. マウスプロスタシン cDNA のクローニング

コーディングリージョンは 1020bp、5'ノンコーディングリージョンは 212bp、3'ノンコーディングリージョンは 609bp、339 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 29 アミノ酸からなるシグナルシークエンスを持ち、15 アミノ酸のライトチェーンと 295 アミノ酸のヘビーチェーンからなる (Genbank/EMBL/DDBL accession number AB038244)。

マウスプロスタシン cDNA を oocyte に ENaC とともに共発現させるとアミロライド感受性ナトリウム電流の 3 倍の活性が認められた。

II. ホルモンによる調節因子の検討

マウス集合尿管培養細胞を  $10^{-6}M$  で 24 時間処理すると、プロスタシン mRNA はおよそ 2 倍増加した。細胞上清中へのプロスタシンは同様の条件でおよそ 3.5 倍の増加が認められた。

III. SD ラットにおいてのアルドステロン持続投与による尿中プロスタシン排泄動態の検討

アルドステロン持続投与により、尿中プロスタシン排泄は徐々に増加し、7 日目にはコントロール期にくらべ、およそ 5 倍の増加を認めた。

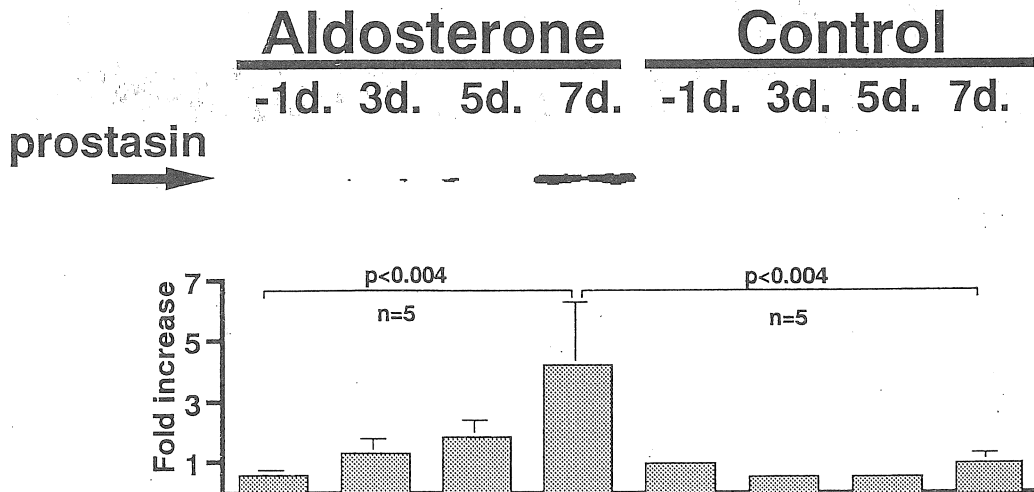


図 1. アルドステロン持続投与による尿中プロスタシン排泄

#### IV. GPI-anchored protein についての検討

細胞膜上に発現した分子量約40kDaのプロスタシンはPI-PLC 0.2~0.4単位の投与で濃度依存性に膜上から遊離し培養上清中へ分泌されました。これに対応して、細胞膜上のプロスタシン発現はPI-PLC処理により減少しました。この結果からプロスタシンはGPI-anchored protein であることが示唆されました。

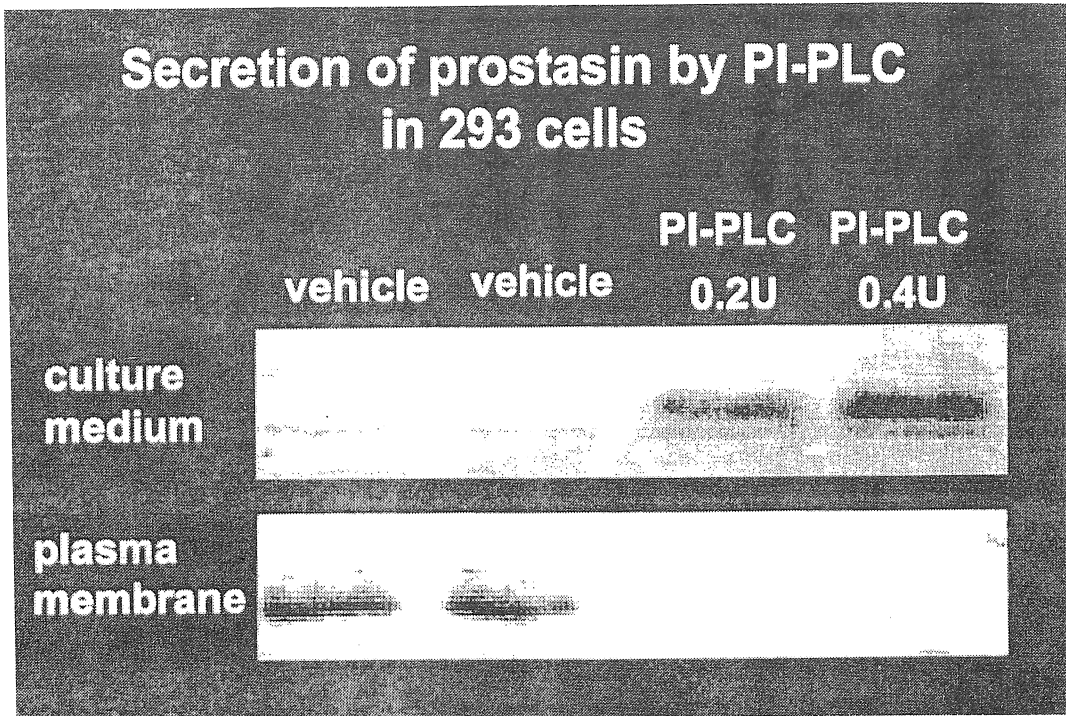


図2. PI-PLCによるプロスタシンの細胞上清中への遊離

## 【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検討されていなかった。

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、尿細管のみに存在すると考えられる。この分泌様式に関し、アミノ酸配列上 GPI (グリコシルホスファチジルイノシトール) アンカー蛋白が推定され、ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C (PIPLC) により分解され、アンカーとしての機能を失い、膜から離れ培養上清中に遊離することが明らかとなった。尿中にプロスタシンが排泄されることより、尿細管の管腔側に存在することが推測される。

今回私たちは、アルドステロンにより刺激されることを明らかにした。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。プロスタシンの発現調節が、すべてアルドステロンによるものか、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が新しい Na 調節系として興味を持たれる。

生体内における Na 代謝へのセリンプロテアーゼの関与についての報告は少ないが、臨床上、DIC にフサン (メシル酸ナファモスタット:セリンプロテアーゼ抑制薬) を使用し、高K血症を経験することがある。多くの場合、腎機能が低下しているので腎不全による可能性が高く、臨床的には原因が明確でないことが多い。これに関しメシル酸ナファモスタットが、amiloride sensitive Na チャネルを抑制するという成績がある (11, 12)。メシル酸ナファモスタットを管腔側に流すと、管腔内の陰性電位 ( $V_t$ ) は減少する。この効果は管腔内への Ba では影響ないが、amiloride の存在により消失する。従って、セリンプロテアーゼ抑制薬であるメシル酸ナファモスタットが amiloride sensitive Na チャネルを抑制したということになる。メシル酸ナファモスタットの作用がセリンプロテアーゼであるプロスタシンを抑制することにより、Na 代謝に関与している可能性が考えられる。

## ENaCの活性化機構

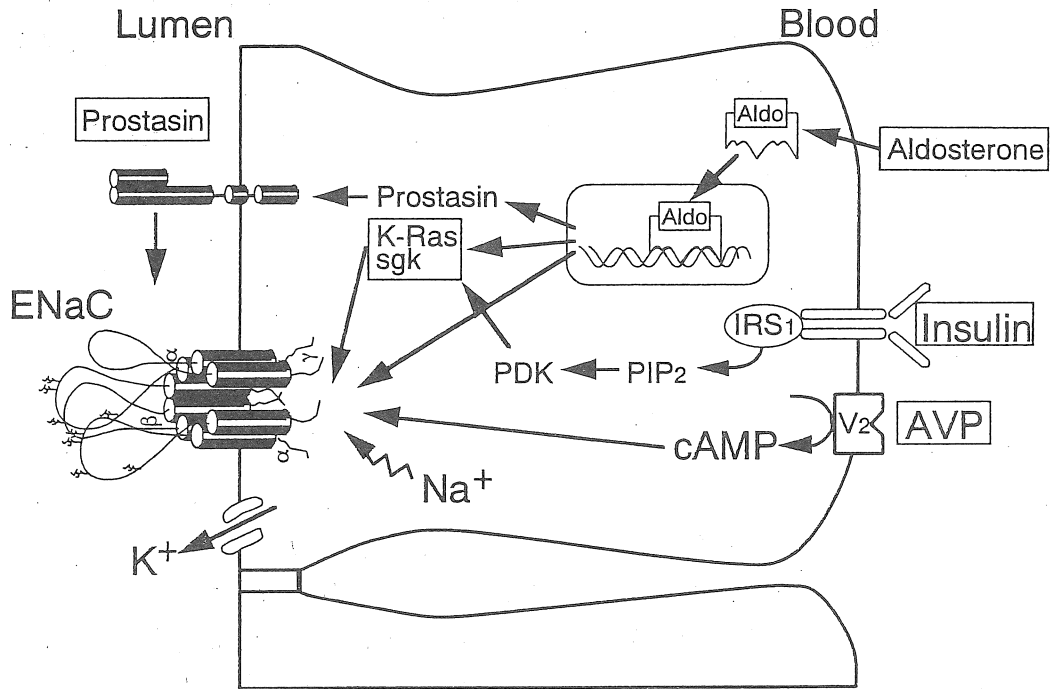


図3. ENaC 発現調節の模式図

### 【今後の課題】

プロスタシンの高血圧における動態はまだ検討されていない。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  $\beta$  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  $\beta$ -subunit gene in human subjects with hypertension. *J. Hypertens.* 14: 1417-1419, 1996
6. Persu A. et al : Genetic analysis of the  $\beta$ -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  $\beta$  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  $\beta$ -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. Muto S, Imai M, Asano Y. Mechanisms of the hyperkalaemia caused by nafamostat mesilate: effects of its two metabolites on  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  transport properties in the rabbit cortical collecting duct. *Br J Pharmacol.* 111(1):173-8, 1994
12. Muto S, Imai M, Asano Y. Effect of nafamostat mesilate on  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  transport properties in the rabbit cortical collecting duct. *Br J Pharmacol.* 109(3):673-8, 1993

## The mechanism of the activation of sodium channel by serine protease and the regulation of rat prostasin

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 a 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  $\beta$ - and  $\gamma$ -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 and the regulation of rat prostasin.

Phosphatidylinositol-specific phospholipase C clearly separated the prostasin protein. This result suggested that prostasin is glycosylphosphatidylinositol - anchored ptoein. Prostasin is secreted into incubation medium in cultured M-1 cell line. Urinary prostasin secretion was stimulated when rat was given aldosterone by osmotic mini-pump.

Our data suggest that prostasin, a serine protease, was stimulated by aldosterone. Further studies are necessary to clarify whether prostasin and other Na regulatory hormone systems are closely linked or not. It is also interesting whether prostasin is involved in the pathogenesis in essential hypertension.