

助成番号 0838

## プロテアーゼによるバソプレッシンの血管透過性調節機構に関する研究

宮田 清司

京都工芸繊維大学応用生物学部門生体機能学研究室

**概要** プロテアーゼはペプチド結合加水分解酵素でタンパク質を分解する酵素である。最近、脳神経系においてプロテアーゼが細胞外マトリクスなどを分解することで記憶や学習などの高次機能に重要な役割を果たしていることが報告されつつある。本研究においては、セリンプロテアーゼの一種である tissue plasminogen activator (tPA)-plasminogen システムが下垂体後葉ホルモンであるバソプレッシンの分泌を調節するメカニズムについて調べた。まず、免疫組織化学を用いたレーザー観察より、下垂体後葉において tPA はバソプレッシン神経終末部に、そして plasminogen は血管に局在していることが明らかになった。次に、tPA ならびに plasminogen ノックアウト (KO) マウスを用いてバソプレッシン神経における役割を調べたところ、tPA ならびに plasminogen KO マウスは、いずれも浸透圧調節能力が低いことが分かった。tPA KO マウスは、急性・慢性いずれの浸透圧刺激に対してバソプレッシン放出が野生型に比べ有意に低かった。一方、plasminogen KO マウスは慢性的浸透圧刺激に対してのみバソプレッシン放出が野生型に比べ低かった。リコンビナント tPA を、摘出下垂体後葉に作用させると有意にバソプレッシン分泌を促進した。さらに、慢性浸透圧負荷を課すことで tPA-Plasminogen システムを介して血管細胞外マトリクス laminin が分解されることが明らかになった。以上の結果は、tPA-plasminogen システムが直接的にバソプレッシン終末部に作用しバソプレッシン分泌を促進する短期メカニズムと血管 laminin を分解することでバソプレッシン透過性を亢進する長期メカニズムの二つのメカニズムでバソプレッシンの分泌を調節していると考えられる。

### 1. はじめに

プロテアーゼは、タンパク質を分解する酵素であり、一般的には細胞内で不必要なタンパク質の分解などの機能を担っている。一方、最近細胞外においてもプロテアーゼが働き細胞外基質の分解などに関与し発生や細胞の移動に関与していることが知られている。たとえば、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 類は活性中心に金属イオンが配座しているタンパク質分解酵素群であり、コラーゲンやプロテオグリカン、エラスチンなどから成る細胞外マトリクスの分解をはじめとし、細胞表面に発現するタンパク質の分解、生理活性物質のプロセッシングなどその作用は多岐にわたる。

一方、tissue plasminogen activator (tPA)-plasminogen 系は、セリンプロテアーゼの一種で、種々のタンパク質を分解することが知られている。具体的には血管内に生じた

フィブリン血餅・血栓を分解する線溶系として働き、tPA は脳梗塞時における血栓溶解剤として臨床レベルでも使用されている。一方、脳においては、tPA のプロテアーゼ作用により細胞外マトリクスや成長因子などを分解することで記憶や学習に関与することが報告されている。

tPA は海馬において学習機構の long term potentiation (LTP) を促進するが、ノックアウト (KO) マウスでは逆に LTP が阻害される (Nicole *et al.*, 2001)。さらに、tPA は、大脳皮質視覚野における眼優位可塑性に関与することが報告されている (Mataga *et al.*, 2004)。tPA は、また扁桃体において恐怖ストレスを誘導することが報告されている (Matys *et al.*, 2004)。バソプレッシンは、視床下部の視索上核 (SON) と室傍核 (PVN) で合成され、軸索輸送にて下垂体後葉にある神経終末部に運ばれる。バソプレッシンは、高浸透圧や脱血などの刺激により終末部より放出され

血管基底膜や内皮細胞を透過して血液内へ入る。血液中のバソプレッシンは、腎臓に作用し水分の再吸収を促進することで、体内の塩分/水分バランスを保つ。しかし、神経終末部からのバソプレッシン放出機構についてはほとんど解明されていない(Miyata *et al.*, 2002, 2004)。そこで、本研究においては、セリンプロテアーゼ tPA-plasminogen システムが下垂体後葉ホルモン・バソプレッシンの分泌調節に関与することを報告する。

## 2. 方法と結果

下垂体後葉における tPA の局在を免疫組織化学にて調べたところ、バソプレッシン神経終末部に特異的に存在していることが明らかになった(Fig. 1)。さらに、高倍率にて観察すると、tPA は、顆粒状に分布しており、恐らく神経分泌顆粒に存在している可能性が示唆された。

そこで、電子顕微鏡レベルで tPA の局在を観察した(Fig. 2)。高電子密度の tPA 免疫反応物は、ペプチド性神経終末部に観察され、神経分泌顆粒に特異的に内在していることが明らかになった。tPA は神経活動に依存してバソプレッシン開口放出とともに神経細胞外へ放出された。

次に、慢性的にマウスに浸透圧負荷を与え、慢性的バソプレッシン分泌状態にすると下垂体後葉における tPA 発現量が顕著に低下することをウエスタンならびに Zymography により検証した(Fig. 3)。

この結果は神経活動依存的に tPA がバソプレッシン神経終末部より放出され、その結果 tPA 発現量が減少したこ

とを意味する。plasminogen は血管系に特異的に発現していることが明らかになった(Fig. 4)。

以上の結果は、tPA は下垂体後葉神経終末部の分泌顆粒に特異的に局在することが明らかになった。さらに、神経活動依存的に放出されることが分かった。一方、plasminogen は、血管系に局在していた。次に、tPA-plasminogen 系がバソプレッシン神経機能に果たす役割について KO マウスを用いて調べた。tPA KO マウスに慢性浸透圧負荷を課すと tPA KO マウスは野生型に比べて顕著な浸透圧上昇が観察された(Fig. 5)。この結果は tPA 遺伝子の欠損が個体レベルでの浸透圧調節異常を引き起こすことを示している。

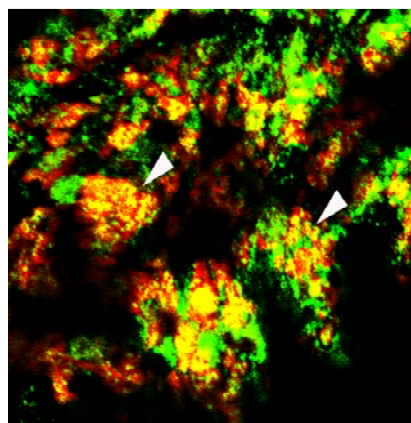


Figure 1. 下垂体後葉における tPA のレーザー顕微鏡による局在観察。FITC による緑の蛍光は tPA、Texas Red による赤の蛍光はバソプレッシンを示している。

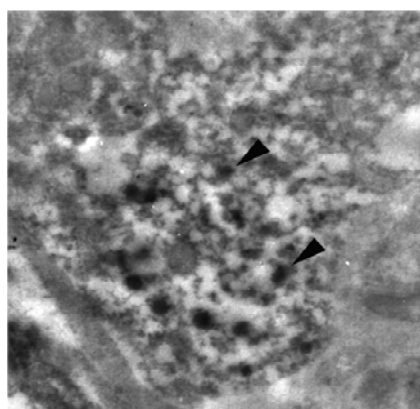


Figure 2. 下垂体後葉における tPA の電子顕微鏡レベルでの局在観察

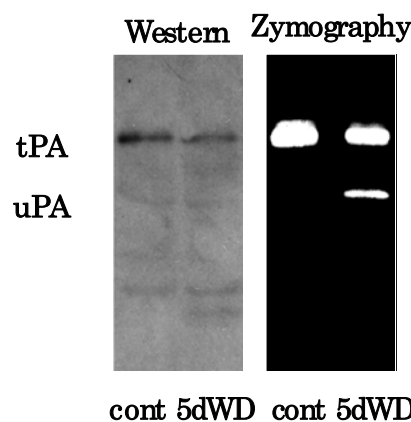
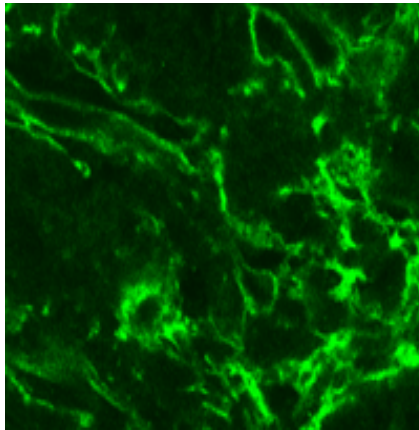
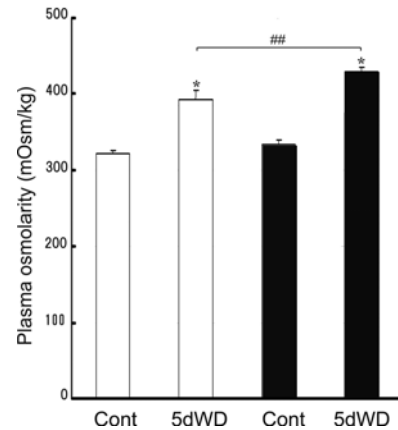


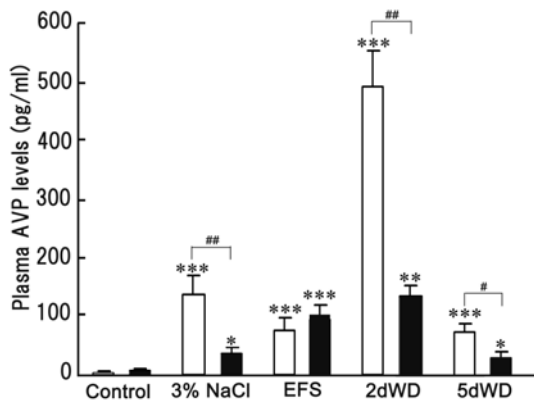
Figure 3. 下垂体後葉における神経活動依存的 tPA 発現量減少。5dWD, 5 day water deprivation: 5 日脱水。



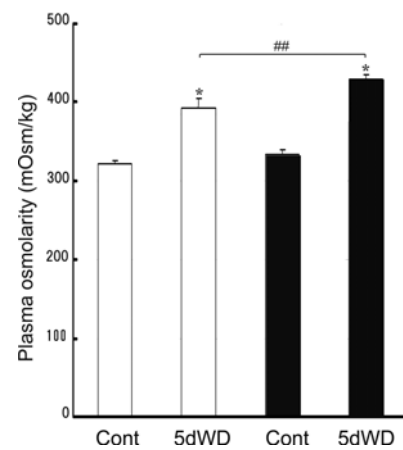
**Figure 4.** 下垂体後葉における plasminogen のレーザー顕微鏡による局在観察。FITC による緑の蛍光は plasminogen の局在を示す。



**Figure 5.** 血液浸透圧; 白(tPA 野生型)、黒(tPA KO)。5dWD, 5日脱水。



**Figure 6.** 白(tPA 野生型)、黒(tPA KO)。3% NaCl 腹腔内注射1時間; EFS, electrical foot shock 5分; 2dWD, 2日脱水; 5dWD, 5日脱水。



**Figure 7.** 血液浸透圧; 白(野生型)、黒(plasminogen KO)。5dWD, 5日脱水。

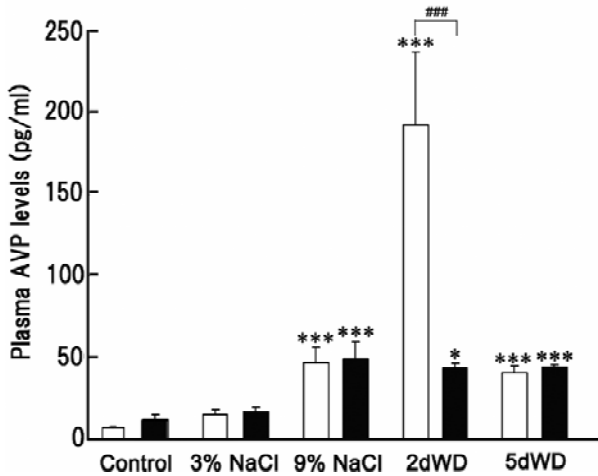
そこで、tPA KO マウスに浸透圧負荷を課し血液内バソプレッシン濃度をRIAで測定した(Fig. 6)。3% NaCl 溶液腹腔内注射による急性浸透圧刺激ならびに2-5日脱水による慢性浸透圧刺激に対するバソプレッシン分泌量はtPA KO マウスが野生型に比べて有意に低い値であった。一方、電気刺激ショックに対しては有意な差が認められなかった。plasminogen KO マウスにおいてもtPAと同様に慢性浸透圧負荷を課すと野生型に比べて有意に高い血液浸透圧上昇を示した(Fig. 7)。さらに、血液内バソプレッシン濃度を測定したところ、tPA KO マウスは慢性浸透圧刺激に対して野生型に比べて有意な低下が認められた(Fig. 8)。しかし、3ならびに9% NaCl 腹腔内注射による急性浸

透圧刺激ならびに5日脱水慢性浸透圧に対しては、tPA KO マウスの分泌量は野生型と比べて有意な差が認められなかった。

KO マウスを用いた実験結果より、急性浸透圧刺激によるバソプレッシン分泌低下は、plasminogen を介することなくtPAが短時間で直接的にバソプレッシン分泌を促進している可能性が考えられた。そこで、リコンビナント tPA を摘出下垂体後葉に作用させ、バソプレッシン分泌促進の有無を調べた(Fig. 9)。33 mM KCl による脱分極刺激は、コントロールに比べて有意なバソプレッシンを分泌させた。リコンビナント tPA も同様に有意なバソプレッシン分泌作用があった。しかし、この分泌促進作用は tPA receptor

LRP-1 受容体の antagonist である RAP により抑制されないことより、LRP-1 を介した作用でないことが明らかになった。

Plasminogen KO マウスを用いた実験結果より、慢性浸透圧刺激によるバソプレッシン分泌低下は、tPA が plasminogen を活性化することによる可能性が考えられた。そこで、慢性浸透圧刺激によりバソプレッシン分泌が促進されるメカニズムとして血管構成タンパクの分解を調べた (Fig. 10)。その結果、慢性浸透圧刺激負荷を課すと下垂体後葉の laminin 細胞外マトリクスが顕著に減少すること

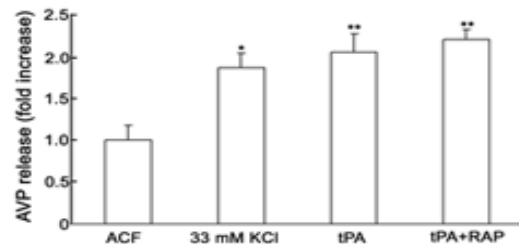


**Figure 8.** 白 (tPA 野生型)、黒 (plasminogen KO)。3 & 9% NaCl 腹腔内注射 1 時間; 2dWD, 2 日脱水; 5dWD, 5 日脱水。

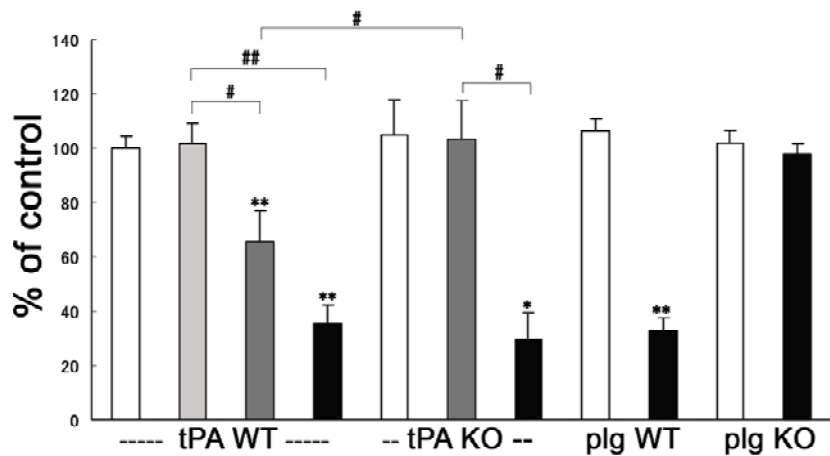
が明らかになった。tPA KO マウスでは laminin 分解が遅れること、さらに Plasminogen KO では全く分解が生じないことが分かった。この結果は、tPA-Plasminogen システムによる laminin 分解がバソプレッシン透過性を制御している可能性がある。

### 3. 考察

tPA-plasminogen システムは、記憶・ストレス・可塑性などの脳機能において極めて重要な役割を果たすことが証明されつつある (Nicole *et al.*, 2001; Mataga *et al.*, 2002; Matys *et al.*, 2004)。本研究においては、下垂体後葉のバソプレッシン神経終末部特異的に tPA が局在していることが観察された。tPA は、バソプレッシン神経活動に依存して神経細胞外に放出され、生理作用を示すと考えられる (Miyata *et al.*, 2005)。しかし、メカニズムは短期と長期の



**Figure 9.** 33 mM KCl ならびに tPA はバソプレッシン分泌を促進した。



**Figure 10.** 血管 laminin の慢性浸透圧刺激による分解。白 (control, 刺激なし)、灰 (3 NaCl 腹腔内注射 1 時間)、濃灰 (2dWD, 2 日脱水)、黒 (5dWD, 5 日脱水)。

二種類が存在する。短期調節メカニズムとしては、神経終末部に直接作用することによりバソプレッシンの分泌を促進するものと考えられた。一方、tPA は長期的には血管系に存在する plasminogen を plasmin に変換し血管構成成分である laminin を分解する。Laminin の変化は血管透過性に大きく影響を与えられられており (Hallmann *et al.*, 2005)、下垂体後葉においてもバソプレッシンの血管透過性に寄与するものと考えられる。

#### 引用文献

- Nicole, O., Docagne, F., Ali, C., Margaiil, I., Carmeliet, P., MacKenzie, E.T., Vivien, D., Buisson, A., 2001. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nature Med.* 7, 59-64.
- Mataga, N., Ngai, N., Hensch, T.K., 2004. Permissive proteolytic activity for visual cortical plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 7717-7721.
- Matys, T., Pawlak, R., Matys, E., Pavlides, C., McEwen, B.S., Strickland, S., 2004. Tissue plasminogen activator promotes the effects of corticotrophin-releasing factor on the amygdale and anxiety-like behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 16345-16350.
- Hallmann, R., Horn, N., Selg, M., Wendler, O., Pausch, F., Sorokin, L.M., 2005. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol. Rev.* 85, 979-1000.
- Miyata, S., Takamatsu, N., Maekawa, S., Matsumoto, N., Watanabe, K., Kiyohara, T., Hatton, G.I. 2001. Plasticity of neurohypophysial terminals with increased hormonal release during dehydration; ultrastructural and biochemical analyses. *Journal of Comparative Neurology* 434: 413-427.
- Miyata, S., Akagi, A., Hayashi, N., Watanabe, K., Oohira, A. 2004. Activity-dependent regulation of a chondroitin sulfate proteoglycan 6B4 phosphacan/RPTP $\beta$  in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Brain Research* 1017:163-171.
- Miyata, S., Nakatani, Y., Hayashi, N., Nakashima, T. 2005. Matrix-degrading enzymes tissue plasminogen activator and matrix metalloprotease-3 in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Brain Research* 1058: 1-9.

No. 0838

## Control of Vasopressin Permeability across Blood Vessels by Proteases

Seiji Miyata

Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology,  
Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585

### Summary

Systemic osmotic homeostasis is regulated mainly by neuroendocrine system of arginine-vasopressin (AVP) in mammals. AVP is synthesized within the hypothalamic nuclei, transported into the neurohypophysis (NH) via axonal terminals, and released into blood circulation upon osmotic stimulation. In the present study, we investigated whether or not the serine proteases, tissue plasminogen activator and plasminogen, are responsible for AVP release and permeability in the NH. Confocal laser microscopic observation revealed that the immunoreactivity of tissue plasminogen activator (tPA) was seen specifically at neurosecretory granules of AVP-positive magnocellular terminals and that of plasminogen was seen at microvessels in the mouse NH. Electron microscopic immunohistochemistry further showed specific localization of tPA at neurosecretory granules of magnocellular terminals. tPA knockout (KO) mice but not plasminogen ones revealed lower ability in secreting AVP into the blood circulation upon an acute osmotic stimulation by using hypertonic 3% NaCl. The recombinant tPA was able to release AVP from isolated NH. Both tPA and plasminogen KO animals showed lower ability in secreting AVP into the blood circulation upon a chronic osmotic stimulation or water deprivation. Morphometric quantitative analysis demonstrated that chronic osmotic stimulation degraded laminin of neurohypophysial microvessels in WT mice but not in plasminogen KO ones. Laminin is known to be a critical modulator for vessel permeability of various substances. In conclusion, we suggest that AVP secretion is critically regulated by tPA- dependent receptor mediated processes of AVP release from terminals as rapid regulatory mechanism, and AVP permeability across blood vessels is regulated by plasminogen-dependent laminin degradation.