

食塩感受性高血圧におけるサイクリック GMP 依存性プロテインキナーゼ (PKG1 α) の新規レドックス制御機構の役割

中村 太志

熊本大学医学部附属病院循環器内科

概要 サイクリック GMP (cGMP) の主要なエフェクター分子である PKG1 α は, cGMP の結合により活性調節を受ける。しかし, cGMP 結合ドメインの近位端で, かつタンパク相互作用に関わる N 端ロイシンジッパーの下流に位置する 42 番目のシステイン (C42) 酸化でも, ジスルフィド架橋による二量体化を介し制御されることがわかってきた。この cGMP 非依存性の PKG1 α 活性化は, 抵抗血管レベルの血管平滑筋弛緩により降圧作用に関与する一方で, PKG 本来の抗肥大作用は損なわれることが報告されている。しかし, 食塩感受性や腎障害における PKG レドックス制御機構の意義は不明である。

我々は, C42 をセリンに置換させることで PKG1 α だけが酸化されないレドックス非感受性 PKG1 α (PKG1 α ^{C42S}) を発現したマウスを用いて, 高食塩飼育後の血圧反応性を野生型マウス (PKG1 α ^{WT}) と比較した。ウエスタンブロットングおよび免疫組織学的な検討により, PKG1 α は腎臓の皮質や髄質にびまん性に発現し, 食塩負荷やアンジオテンシンII刺激で腎臓でも C42 の酸化を介しジスルフィド二量体化することを世界で初めて確認した。そこで, Tail-cuff により収縮期血圧を測定したところ, 既報同様に PKG1 α ^{C42S} の血圧は PKG1 α ^{WT} と比べ高値を示したが, 食塩摂取による血圧上昇効果は野生型と比べ有意に抑制されることがわかった。また, 飲水量や尿量, 1 日ナトリウム排泄量は食塩負荷で経時的に増加するが, いずれも野生型と同程度であり, 血漿アルドステロン濃度も両マウス間に差を認めなかった。そこで, 横軸に血圧, 縦軸にナトリウム排泄をプロットし圧利尿曲線の相関をみると, その傾きは PKG1 α ^{C42S} と比べ野生型で緩やかなことから, PKG1 α の酸化は食塩感受性を正に制御していることが示唆された。

NO/cGMP のシグナル伝達を司る PKG 新規レドックス制御機構の腎臓での役割を初めて確認した。酸化ストレスの増加を介した腎臓内 PKG ジスルフィド結合の増加は, 腎臓のナトリウム排泄機能の低下に深く関与し, 食塩感受性の新たな調節因子であると考えられる。

1. 研究目的

NO/酸化ストレスは食塩感受性に深く関与している⁽¹⁻²⁾。細胞内サイクリック GMP (cGMP) は, NO やナトリウム利尿ペプチドの重要な細胞内二次伝達物質であり, その薬理作用は主要なエフェクター分子である PKG1 α の活性化を介していることが知られている。PKG1 α は, cGMP の結合によって惹起される構造変化を受け活性化される⁽³⁻⁴⁾。しかし, cGMP 結合ドメインの近位側で, タンパク質間相互作用に関わる N 末端ロイシンジッパーの遠位側に位置する 42 番目のシステイン (C42) 酸化修飾でも, ジスルフィド

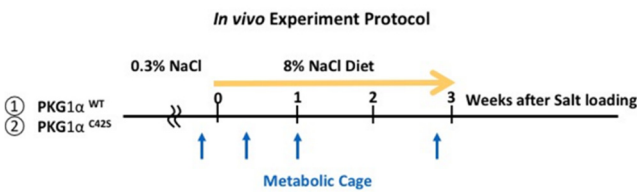
架橋による二量体形成を介し制御されることがわかってきた⁽⁵⁾。この cGMP 非依存性の PKG1 α 活性化の意義は, 抵抗血管レベルの末梢の血管平滑筋を弛緩することで降圧作用に関与する⁽⁶⁾。一方で, PKG 本来の肥大抑制作用は, 受容体活性型カルシウムチャネル (TRPC6) のリン酸化機序による活性化により, 損なわれることがわかっている⁽⁷⁾。しかし, 食塩感受性や腎臓における PKG1 α レドックス制御機構の役割は不明である。

2. 研究方法

我々は、C42をセリンに置換させることでPKG1 α だけが酸化されないレドックス非感受性PKG1 α (PKG1 α ^{C42S})を発現したノックインマウスに高食塩食(8%)を与え、正常食塩食(0.3%)から高食塩食飼育に変更した後の経時的な血圧変化とナトリウム排泄の推移を野生型マウス(PKG1 α ^{WT})と比較した。

2.1 動物: 3ヶ月齢

- ① 野生型 PKG1 α マウス(PKG1 α ^{WT})
- ② PKG1 α ノックインマウス(PKG1 α ^{C42S})



2.2 非還元 SDS-PAGE (Non-reducing SDS PAGE)

サンプル調整中の手技によるチオール基酸化を予防するため、100 mMのN-エチルマレイミド試薬(SIGMA)を添加したLysis buffer(Cell Signaling Technology)を用い、凍結保存した腎臓組織を破碎溶解した。サンプル中のジスルフィド結合を保持するため、DTTなどの還元剤を一切使用せずに SDS sample buffer でタンパク量を調整し、10% Tris-Glycine ゲルでの電気泳動や一連のウェスタンブロットニング操作を非還元状態で行なった⁽⁷⁾。

2.3 代謝ケージ

12時間周期に自動で明暗管理された室温24度の環境で、単独飼育用代謝ケージ(TECNIPLAST)で3日間に渡りマウス飼育を行った⁽⁸⁾。飼育中の飲水量や食餌量を計測し、糞の混入を避けながら24時間の採尿を行なった。

2.4 尿電解質測定

代謝ケージで採尿したサンプルを用い、富士ドライケム生化学分析装置7000と富士ドライケムスライドでNa, K, Clの尿中の電解質を測定した。

2.5 血圧測定

加温装置を必要としない非観血式血圧計(MK-2000ST, Muromachi Kikai Co., Ltd.)を用い、tail-cuff方式で尾動脈の脈波振幅を検出し、マウスの覚醒時血圧を10~15秒ほどで測定した。収縮期血圧と心拍数は、尾動脈血流の十分な改善を待ち、1匹あたり5回測定してその平均値を

求めた。

3. 研究結果

腎臓におけるPKG1 α の発現分布を、ウェスタンブロットニングおよび組織学的免疫染色で検討した。PKG1 α は腎臓の皮質と髄質にびまん性に発現し、食塩負荷やアンジオテンシンII刺激により腎臓でもジスルフィド架橋(システイン酸化)を介し二量体化することを、Non-reducing SDS PAGEで初めて確認した(Fig. 1)。

tail-cuff法でマウスの血圧を測定した。還元型のPKG1 α (PKG1 α ^{C42S})を発現するマウスの収縮期血圧は、酸化型の野生型PKG1 α ^{WT}マウスと比べ有意に高く、既報と同様の結果であった。PKG1 α の酸化が過分極因子として末梢血管の平滑筋弛緩に寄与していることを考慮すると、還元型PKG1 α による血管抵抗の増加作用を反映していると考えられた(Fig. 2)。また、食塩負荷後3日目および1週間、3週間で血圧を測定したところ、PKG1 α ^{WT}の野生型マウスでは食塩摂取により血圧が上昇したのに対し、興味深いことにPKG1 α ^{C42S}マウスでは全く変化しないことがわかった。

同じ実験プロトコールで、マウスを代謝ケージで飼育し、飲水量や食餌摂取量、尿量、ナトリウム排泄量を経時的に測定した。食餌量は食塩負荷に関わらず著明な変化を認めなかったが、飲水量や尿量、ナトリウム排泄量は高食塩飼育後から有意な増加を認めた。また、尿中ナトリウム排泄の増加は、負荷後1週間でプラトーに達し、野生型とPKG1 α ^{C42S}マウス間に有意な差を認めなかった(Fig. 3)。尿中ナトリウム値とカリウム値の比(尿中Na/K)も食塩負荷

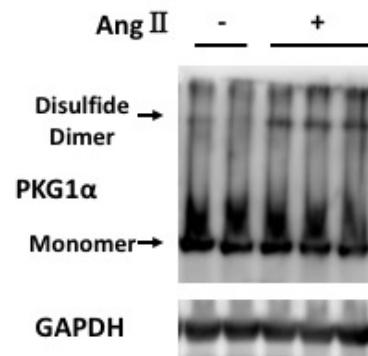


Fig. 1 PKG1 α Oxidation in kidney

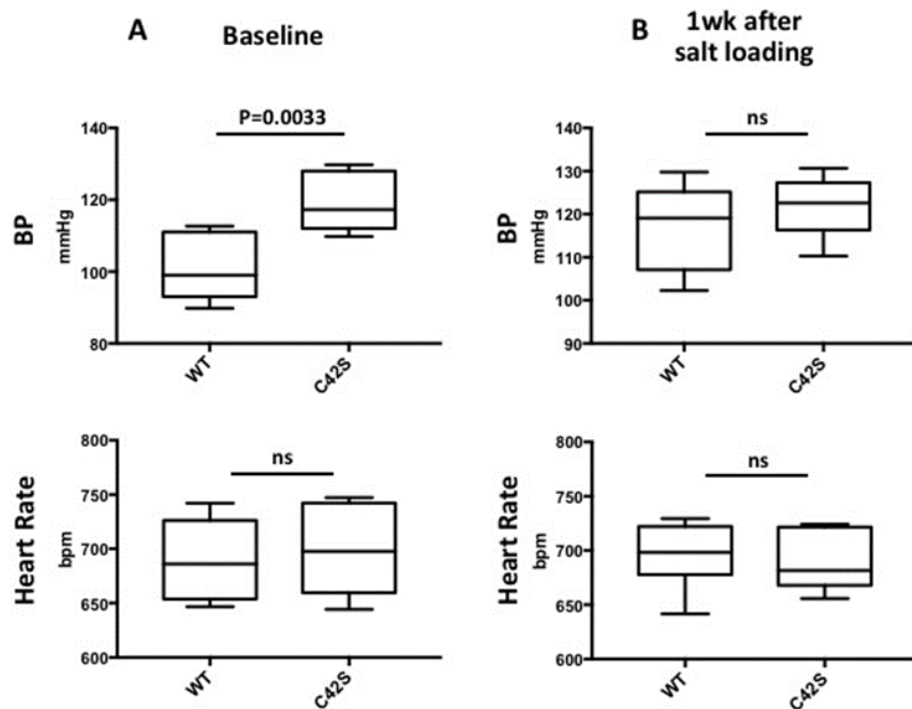


Fig. 2 Blood pressure (BP) response to salt loading
A: BP and Heart rate at baseline
B: BP and Heart rate 1week after salt loading

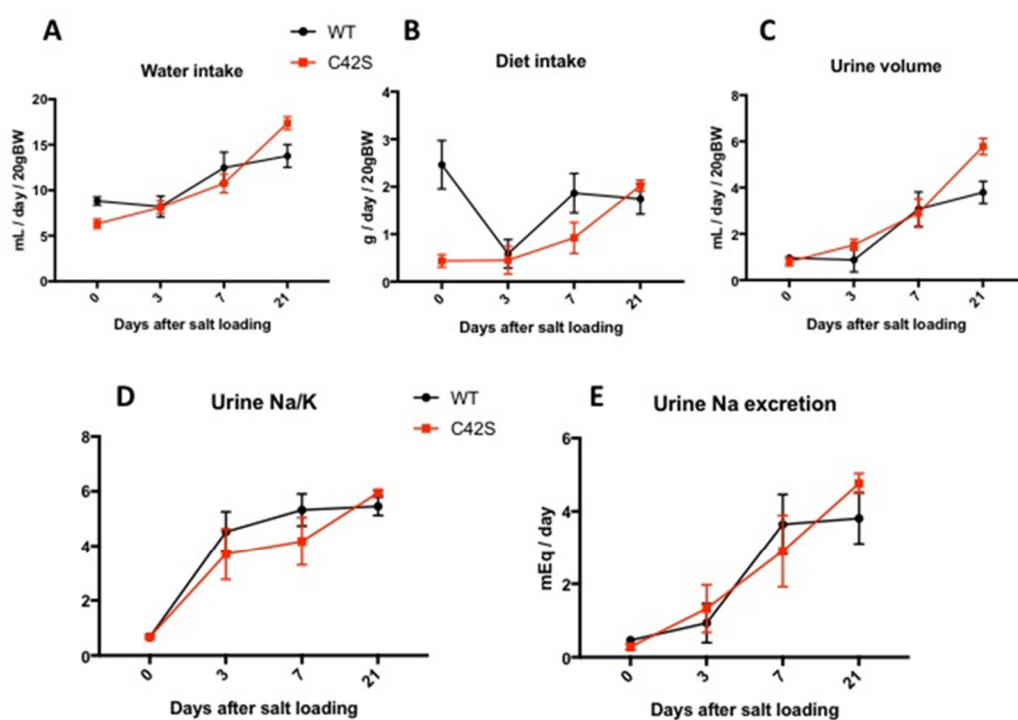


Fig. 3 Comparison of A) water intake, B) diet intake, C) urinary volume, and D-E) urinary sodium excretion between WT and C42S

後に著明に増加したが、両マウス間に差はなく、過剰な食塩摂取に伴って生じるナトリウム利尿というよりは、圧利尿の設定閾値への影響が示唆された。

また、食塩負荷後の血漿アルドステロン濃度も、野生型と PKG1 α ^{C42S} マウスの間に差を認めなかった (Fig. 4)。アルドステロン異常によるナトリウム排泄能の影響は考えにくかった。

そこで、横軸を血圧、縦軸に 1 日ナトリウム排泄量の値をそれぞれプロットすると、血圧とナトリウム排泄機能が示す相関曲線の傾きは PKG1 α ^{C42S} マウスと比べ野生型マウスで緩やかなことから、PKG1 α が酸化されると十分なナトリウム排泄のためにより高い血圧が必要であることが示唆された (Fig. 5)。

以上より、NO/cGMP およびナトリウム利尿ペプチド/cGMP の両シグナル経路を制御している PKG1 α は、腎臓でも酸化修飾を受けることでジスルフィド二量体を形成し、食塩感受性の発症機序に貢献していることがわかった。

4. 考察

食塩感受性高血圧の発症進展メカニズムとして、PKG1 α のシステイン酸化が重要な役割を果たしていることが明らかになった。長期的に血圧を規定する調節機構は、血管の抵抗性だけでなく、腎臓におけるナトリウム排泄や体液量の調節も重要であり、高血圧患者の多くは本態性高血圧患者でさえも実はその原因が腎臓にあると考えられるようになってきている。PKG1 α 酸化に関する既報⁶⁾の

知見を合わせて推察すると、PKG1 α の酸化は、腎臓小葉間動脈などの抵抗血管をより弛緩することで輸入細動脈や糸球体内の圧が高くなりやすいと考えられる。今回の研究成果は、PKG1 α レドックス制御機構が、食塩負荷による体液量増加のため上昇する血圧が尿細管における水・ナトリウムの再吸収を抑制して利尿を起こす、いわゆる「圧利尿」の調節機能に深く関与していることを示す初めての報告である。食塩感受性における NO/酸化ストレスのアンバランス説は、本研究で新たに提唱された PKG1 α レドックス制御機構の概念がその理論的根拠になりえ、食塩感受性高血圧に対する有用な治療標的として期待される。

また、アルドステロン以外にも、カテコラミンやナトリウム利尿ペプチド、インスリンなど、腎臓ナトリウム排泄機能に関わる多くの因子が存在する。今後、これらの因子と PKG1 α の関係を明確にすることで、食塩感受性高血圧の分子メカニズムを詳細に検討していく必要がある。

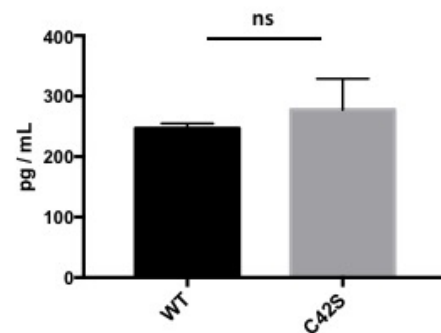


Fig. 4 Plasma Aldosterone Concentration

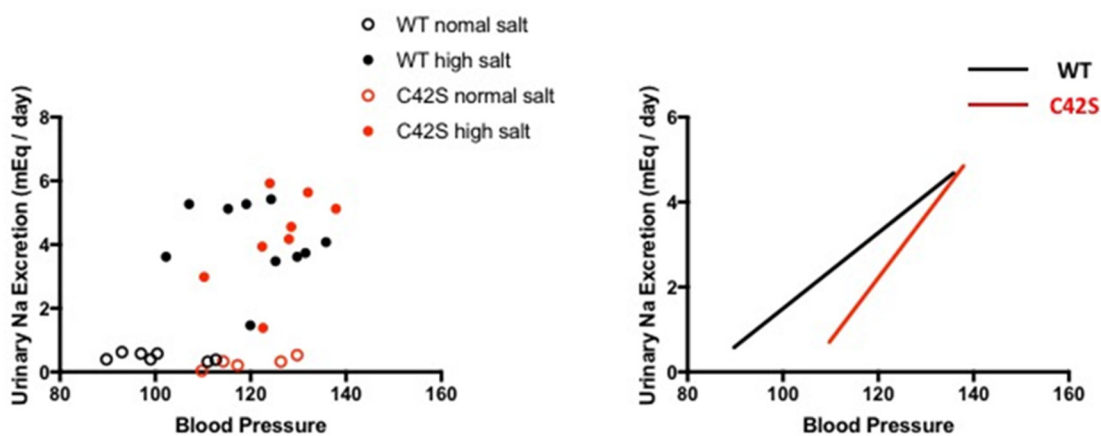


Fig. 5 Pressure – Natriuresis Relationship

5. 今後の課題

食塩感受性は、交感神経の緊張やレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系を介し、高血圧だけでなく、心血管病や慢性腎臓病進展などの様々な病態と関連している⁽⁹⁾。PKG1 α レドックス制御機構の腎臓での役割と治療応用に関する研究は、本研究の成果により、今まさに幕を開けたばかりである。レドックス非感受性の PKG1 α モデルを用い、食塩感受性や血圧と関連が深いアルブミン尿を解析し、食塩/アルドステロンによる腎障害進展への関与についても検討を進めていく必要がある。また、腎臓や心臓、血管に発現している PKG1 α の新規レドックス制御機構を介した臓器連関、血圧の日内変動、ナトリウム排泄を調節するナトリウム利尿ペプチドやカテコラミン(ノルアドレナリンやドパミン)のホルモンの反応性変化など、PKG1 α を中心とした多くの課題が山積している。

我々は、PKG1 α レドックス機構をモニタリングできるバイオマーカーの確立とその臨床応用を目指し、並行して研究を進めている。今後、治療標的としての PKG1 α の重要性を示しながら、cGMP/PKG 治療薬の確立を目指す重要なトランスレーショナルリサーチへと進展していくことが期待される。

6. 文献

- (1) Feng W, Dell'Italia LJ, Sanders PW. Novel Paradigms of Salt and Hypertension. *J Am Soc Nephrol.* 2017 28(5):1362-1369
- (2) Whaley-Connell A, Sowers JR. Oxidative stress in the cardiorenal metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep.* 2012 14(4):360-5
- (3) Alverdi V, Mazon H, Versluis C, Hemrika W, Esposito G, van den Heuvel R, Scholten A, Heck AJ. cGMP-binding prepares PKG for substrate binding by disclosing the C-terminal domain. *J Mol Biol.* 2008 375(5):1380-93
- (4) Huang GY, Kim JJ, Reger AS, Lorenz R, Moon EW, Zhao C, Casteel DE, Bertinetti D, Vanschouwen B, Selvaratnam R, Pflugrath JW, Sankaran B, Melacini G, Herberg FW, Kim C. Structural basis for cyclic-nucleotide selectivity and cGMP-selective activation of PKG1. *Structure.* 2014 22(1):116-24.
- (5) Burgoyne JR, Madhani M, Cuello F, Charles RL, Brennan JP, Schröder E, Browning DD, Eaton P. Cysteine redox sensor in PKG1 α enables oxidant-induced activation. *Science.* 2007 7;317(5843):1393-7
- (6) Pryszazhna O, Rudyk O, Eaton P. Single atom substitution in mouse protein kinase G eliminates oxidant sensing to cause hypertension. *Nat Med.* 2012 15;18(2):286-90
- (7) Nakamura T, Ranek MJ, Lee DI, Shalkey Hahn V, Kim C, Eaton P, Kass DA. Prevention of PKG1 α oxidation augments cardioprotection in the stressed heart. *J Clin Invest.* 2015 125(6):2468-72
- (8) Nakamura T, Kataoka K, Tokutomi Y, Nako H, Toyama K, Dong YF, Koibuchi N, Yamamoto E, Yasuda O, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Novel mechanism of salt-induced glomerular injury: critical role of eNOS and angiotensin II. *J Hypertens.* 2011 29(8):1528-35
- (9) He J, Ogden LG, Vupputuri S, Bazzano LA, Loria C, Whelton PK. Dietary sodium intake and subsequent risk of cardiovascular disease in overweight adults. *JAMA.* 1999 282(21):2027-34

The Novel Redox Regulation of cGMP-Dependent Protein Kinase (PKG1 α) in Salt Sensitive Hypertension

Taishi Nakamura

Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University

Summary

Background : Substantial studies have accumulated the evidence that intracellular cyclic GMP and the main effector of cGMP-dependent protein kinase 1 α (PKG1 α) exert protective effects against pathological stresses. PKG1 α is activated primarily by cGMP binding, but it can be also stimulated with oxidant by forming disulfide bond between C42, where is located just proximal to cGMP binding sites and downstream from a protein interaction domain of leucine zipper. This oxidation is prevalent to relax resistant vessels, while it's detrimental in the heart, failing to prevent maladaptive hypertrophic responses. However, its significance on renal function especially in salt sensitive hypertension remains unknown.

Objectives : We tested the hypothesis that PKG oxidation, which impairs its capacity to counter renal injury, increases the salt sensitivity and thus induces hypertension.

Methods and Results : We compared BP response to salt loading, using cysteine redox insensitive PKG1 α mice (PKG1 α^{C42S}) and the littermate controls (PKG1 α^{WT}). Western blotting and immunohistochemistry analyses showed PKG is diffusely expressed in renal cortex and medulla and that PKG forms intermolecular disulfide bond in kidney expressing PKG1 α^{WT} only, which indicates PKG can be oxidized at C42 in kidney as well. As previously reported, we observed greater systolic BP in mice expressing PKG1 α^{C42S} at baseline than PKG1 α^{WT} . However, salt loading didn't alter BP in PKG1 α^{C42S} , whereas it increased BP much in PKG1 α^{WT} . Importantly, this was accompanied by similar increases after salt loading in water intake, urinary volume, and urinary Na excretion regardless of the PKG1 α genotypes. We also confirmed there was no difference in level of plasma aldosterone concentration between the two genotypes.

Conclusions : We revealed first evidence that PKG1 α disulfide bond is observed in kidney and also that the redox regulation appears to be involved in salt sensitive hypertension.