

細胞内サイクリック GMP のシグナル格差を介した 食塩感受性の可逆性解明と治療応用

中村 太志

熊本大学病院医療情報経営企画部

概要 一酸化窒素やナトリウム利尿ペプチドは、サイクリック GMP (cGMP) の生成を介し、ナトリウム利尿や血管弛緩作用を発揮する。PKG1 α は、cGMP のエフェクター分子であり、cGMP の結合により活性化するホモ二量体のリン酸化酵素である。しかし、cGMP 結合ドメインの近位端に位置する 42 番目のシステイン (C42) が酸化されると、ホモ二量体にジスルフィド架橋が形成され機能が変化する。この PKG1 α レドックス制御機構は抵抗血管レベルの平滑筋弛緩に関わり、C42 の酸化が体血圧を下げることで報告されている。しかし、食塩感受性における PKG レドックス制御機構の意義は不明である。

まず、高食塩飼育したマウス腎組織内に PKG1 α ジスルフィド二量体が発現することを確認した。次に、C42 をセリンに置換したレドックス非感受性 PKG1 α (PKG1 α ^{C42S}) マウスにテレメリー送信器を埋込み、高食塩飼育後の血圧反応性を連続計測し野生型マウスと比較した。通常食飼育時における血圧は、Tail-cuff 法の結果と同様、野生型と比べて軽度高値を呈し、低塩食飼育時も同様であった。しかし、高塩食に切り替えると、野生型で暗期優位に血圧が上昇したのに対し、PKG1 α ^{C42S} マウスでは変化を認めなかった。圧-ナトリウム利尿曲線の解析により、C42 の酸化を防ぐと食塩に対する感受性が低下することが示唆された。ナトリウム排泄に関わる尿細管レベルのチャネル発現を確認したところ、Na⁺-Cl⁻共輸送体や Na⁺-K⁺-2Cl⁻共輸送体、ミネラルコルチコイド受容体、上皮型 Na⁺チャネルの発現は両遺伝子間で変わらなかった。また肺の湿重量や水分含量、血漿アルドステロン濃度にも差を認めなかった。ナトリウム排泄障害ではなく血管機能不全に起因した食塩感受性機序を疑い、心拍変動の周波数解析と血圧変動解析により交感神経の関与について検討した。野生型における低周波/高周波の比は、高食塩飼育で暗期優位に上昇した一方、PKG1 α ^{C42S} マウスでは変化を認めなかった。この反応は血圧変動解析でも同様であり、野生型における血圧上昇に交感神経賦活化の関与が示唆された。

C42 を介した PKG ジスルフィド二量体の存在を腎臓で初めて確認した。腎臓内ジスルフィド PKG 二量体の増加は、交感神経系の賦活化を介し食塩感受性の亢進に寄与していると考えられた。

1. 研究目的

食塩摂取による血圧上昇の起点とその遷延化の機序に、腎臓におけるナトリウム排泄障害と抵抗血管レベルでの機能不全が指摘されている⁽¹⁻³⁾。一酸化窒素 NO やナトリウム利尿ペプチドは、細胞内二次伝達物質であるサイクリック GMP (cGMP) の生成を介し、ナトリウム利尿や血管弛緩の生理作用を発揮する。そのため、細胞内 cGMP レベルの増加は食塩感受性高血圧における有効な治療戦略として期待される。実際、内皮型の NO 合成酵素を欠失

させたマウスでは、余剰のナトリウムを尿中へ排泄するためにより高い血圧の上昇が不可欠(食塩感受性)になることが知られている^(4,5)。一方で、ナトリウム利尿ペプチドの受容体である膜型のグアニル酸シクラーゼを欠失 (NPR-A) させた場合には、予想に反して食塩に抵抗性⁽⁶⁾となり、cGMP レベルの増加だけでは決して一貫した表現型が得られず、解明されていない部分が多い。

生成された cGMP は、cGMP を基質としたホスホジエステラーゼの活性化により加水分解され、細胞内で緻密な

調節と区画化が行われている。この巧妙な仕組みにより NO や NPR のシグナル経路は層別化され、血管拡張やナトリウム利尿の生理的作用が調節されていると考えられる。cGMP の主要なエフェクター分子であるプロテインキナーゼ(PKG1 α)は、cGMP の結合で活性化するリン酸化酵素で、血管平滑筋の弛緩や抗肥大・抗繊維化作用をもつ⁽⁷⁻⁹⁾。昨今、N 端に位置するアミノ酸配列 42 番目のシステイン(C42)が酸化され、ジスルフィド結合による二量体化を介しても cGMP に関係なく抵抗血管レベルの小血管を弛緩させることが報告された^(10,11)。また、筆者の研究により、このジスルフィド二量体化は腎臓でもみられ、C42 酸化を予防するだけで食塩抵抗性の表現型を示すことがわかってきた。本研究は、一連の研究結果に基づき、レドックス制御機構による cGMP/PKG シグナルの層別化に焦点をあて、食塩感受性高血圧の可逆性解明と治療応用を目指す研究である。

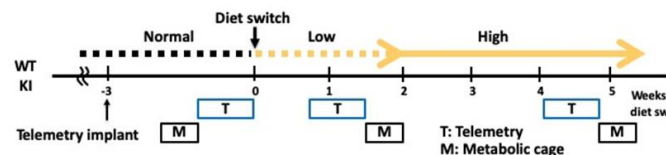
2. 研究方法

2.1 動物マウス:

野生型 PKG1 α マウス(PKG1 α ^{WT})

C42S ノックイン PKG1 α マウス(PKG1 α ^{C42S})

2.2 動物実験プロトコール:



C42 をセリンに置換させた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食塩濃度の異なる食餌を与え、正常食塩食(0.3%)から低塩食(0.003%)、高塩食(8%)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。本研究は、熊本大学動物実験計画の審査承認(A30-083)を得て、熊本大学動物資源開発施設CARDにてヘテロのC42Sノックインマウス同士で上記のホモマウスを繁殖し、3ヶ月齢時のマウスを用いて行なった。

2.3 テレメトリーシステムによる血圧と心拍変動の観察,

Tail-cuff 法による血圧測定:

イソフルレン吸入麻酔下に頸動脈アプローチで送信器カテーテル(TA11PA-C10; 米国 Data Sciences International

社)を挿入。カテーテル先端を胸部大動脈レベルに留置し、モニターで動脈圧波形が綺麗にとれていることを確認した。カテーテルを挿入固定した後、送信器本体は背部皮下に埋込んで手技を終了した。送信器から送られる信号は受信機(RPC-1)で受け取り、データ変換マトリックスMX2に接続しサンプリングデータを取得した⁽¹²⁾。テレメトリー送信器の埋込み術後から2週間以上の回復期間を経て、12時間毎に明暗管理された環境下でマウスを単独飼育しながら、自由行動下にて5分間隔のパラメーター(動脈圧、心拍数)を連続的に3日間モニタリングした。テレメトリーで得られた心拍変動の周波数を解析し、低周波LFや高周波HF、およびその比LF/HFを経時的に評価することで交感神経系活動を評価した。また、非観血式血圧計(MK-2000ST, Muromachi Kikai Co., Ltd.)を用い、tail-cuff法により尾動脈の脈波振幅を検出し、マウスの覚醒時血圧を測定した。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。

2.4 代謝ケージ:

室温24度の換気設定にて12時間周期に自動で明暗管理された環境で、マウスを単独飼育用代謝ケージ(TECNIPLAST)で飼育した⁽⁴⁾。2-3日間に渡って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時間採尿を行なった。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で尿中の電解質を測定した。

2.5 非還元 SDS-PAGE:

サンプル調整中でのチオール基の酸化を防ぐため、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)でマウスの腎組織を破碎溶解した。遠心後に上清のタンパク質濃度を測定し、サンプル中のジスルフィド結合を保持するため還元剤を添加しない条件下で、蛋白濃度を調整した上清をSDS sample bufferで調整した⁽⁸⁾。非還元化サンプルは10% Tris-Glycineゲルで電気泳動を行ない、PVDFメンブレンに転写した後、PKG1 α に特異的な抗体を用いてウェスタンブロッティングを行なった。

2.6 RNA抽出,リアルタイムPCR:

腎臓皮質と髄質に分けた組織から、Qiagen RNeasy Fibrous Mini Kitを用いてそれぞれにtotal RNAを抽出。精製したRNAはPrimeScript RT-PCRシステムで逆転写

した。鋳型 DNA は以下の特異的な相補塩基配列プライマーと SYBR Green を用いて増幅し、PCR 反応中の増幅産物をリアルタイムにモニタリングした。発現量解析は最終的に GAPDH で補正し相対的に定量した。

Mouse NCC 5'-AGGGTCAAGGGCACGGTTGGC-3' (forward),
5'-GGTAAAGGGAGCGGGTCCGAGG-3' (reverse);

Mouse NKCC2 5'-GCTCTTCATTCGCTCTCCT-3' (forward),
5'-AGCCTATTGACCCACCGAAC-3' (reverse); Mouse ENaCa
5'-GCTTCATCTTTACCTGTCGTTTC-3' (forward),
5'-CCAGAGATTGGAGTTGTTCTTGT-3' (reverse);

Mouse ENaCβ 5'-CAGTGGGGAGTCTTCATCC-3' (forward),
5'-TCCTGGTGGTGTGCTGT-3' (reverse); Mouse ENaCγ

5'-CTGCTTCTTCGATGGGATG-3' (forward),
5'-GACACCAGGAAGGGGTTGT-3' (reverse); Mouse MR

5'-ATGGAAACCACACGGTGACCT-3' (forward),
5'-AGCCTCATCTCCACACACAAG-3' (reverse).

2.7 統計解析:

Figure データはすべて平均値±標準偏差で表示。Tail-cuff 法による血圧の定点測定値や遺伝子発現量の PKG1α^{WT} と PKG1α^{C42S} マウス間の二群比較は、対応のない独立2群として t 検定を行った。テレメリーシステムにより同じマウスで観測したバイタルデータ(血圧や心拍数)の日内変動は、対応のある検定としてパラメトリック検定を行った。また、連続した血圧の推移や代謝ケージから得た飲水量や尿量などの経時変化は、Two-way ANOVA にて高塩食飼育による影響と PKG の遺伝子型の影響に交互作用があるか検定し、交互作用が有意な場合は群間で比較を行った。サンプルサイズはそれぞれの Figure 内に記載した。統計解析は GraphPad Prism Version 7 を用いて行い、有意水準 5% で検定した。

3. 研究結果

3.1 高塩食飼育およびアンジオテンシン II 持続投与により腎臓内にジスルフィド PKG1α 二量体が形成される

tail-cuff 法でマウスの血圧を測定すると、還元型 PKG1α を発現する PKG1α^{C42S} マウスの収縮期血圧は、酸化型の野生型 PKG1α^{WT} マウスと比べ軽度だが高いことが報告されている。これは、PKG1α 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ため、還元型

PKG1α による血管抵抗の増加作用を反映していると考えられている⁽¹¹⁾。しかしながら、食餌の塩分濃度を変えながら代謝ケージで尿中のナトリウム排泄量を観察したところ、興味深いことに、野生型マウスにおける圧ナトリウムの相関曲線は PKG1α^{C42S} マウスと比べ緩やかになり、PKG1α 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わかってきた。

我々は、アンジオテンシンIIを持続投与したマウス腎臓組織において PKG1α のジスルフィド酸化が増加することをこれまでに確認している。そこで今回、高塩食で飼育したマウス腎臓内でも、ジスルフィド酸化を介した PKG1α の二量体が同様に発現しているか、PKG1α^{WT} およびレドックス非感受性 PKG1α^{C42S} を用いて Non-reducing SDS PAGE で検討した。高塩食で飼育した PKG1α^{WT} 腎臓内でジスルフィド二量体を初めて確認した (Figure 1)。またこのジスルフィド二量体は、PKG1α^{C42S} の腎臓では見られないことから、C42 の特異的な酸化により形成されたジスルフィド二量体であることがわかった。腎臓における PKG1α ジスルフィド二量体の報告はこれまでになく、本研究はその意義を明らかにする先駆的な研究である。

3.2 高塩食飼育で暗期優位に上昇した血圧は PKG1α^{C42S} でのみ有意に抑制された

正常食塩食および低塩食、高塩食で飼育中に、tail-cuff 法およびテレメリーシステムで血圧の日内変動や心拍数を測定し、両マウス系統間で比較した。正常食塩食飼育時に tail-cuff 法で測定した PKG1α^{C42S} の血圧は、PKG1α^{WT} と比べ軽度だが高値を呈した。テレメリーで日

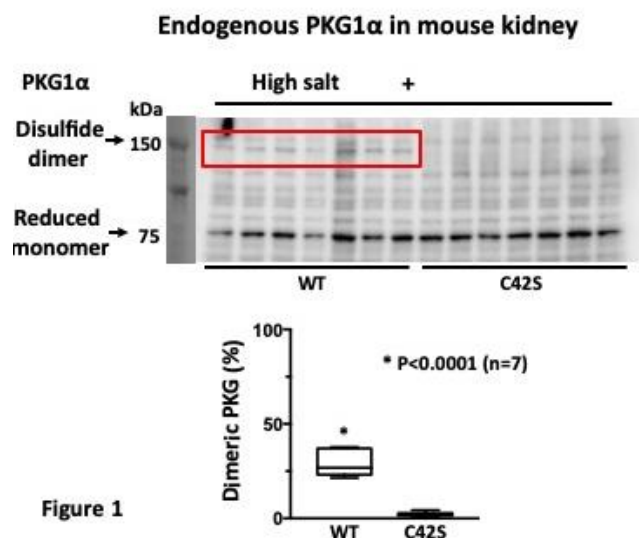


Figure 1

内変動を確認したところ、昼夜を問わず同様の傾向を呈すことがわかった (Figure 2)。また、低塩食 (LS) 飼育中の血圧は正常食塩 (NS) 食と比べ変化は見られなかった。しかし、高塩食 (HS) 飼育に切り替えると $PKG1\alpha^{WT}$ では暗期優位に血圧が上昇し dipper 型を呈したのに対し、 $PKG1\alpha^{C42S}$ では変化がみられず抵抗性を示した (Figure 3)。食塩濃度に対する血圧の変動は心拍数でも同様であり、高塩食飼育で $PKG1\alpha^{WT}$ のみ暗期優位に増加した (not shown)。

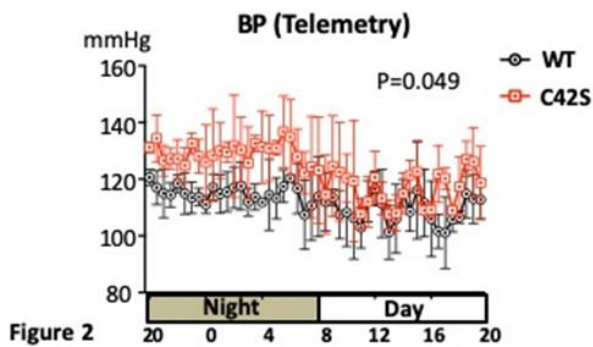


Figure 2

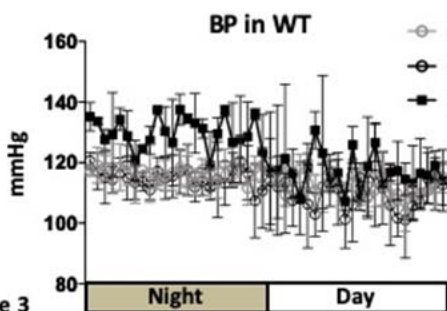


Figure 3

高食塩負荷と同時に抗酸化作用のあるN-アセチルシステイン (NAC) を投与し、NAC 飲水により酸化型 $PKG1\alpha^{WT}$ の表現型が変化するか検討した。しかし、高塩食飼育 + NAC 投与群の血圧は高塩食飼育群と比べて変わらず、食塩摂取による血圧上昇に変化を認めなかった (not shown)。NAC 投与は、 $PKG1\alpha$ だけではなく、Na利尿に関わる全てのタンパク質を非選択的に還元化するため、 $PKG1\alpha$ 以外の作用による影響と考えられた。

3.3 Na 排泄障害や体液貯留の差を機序とする血圧変動の影響は否定的であった

腎皮質集合管に存在する上皮型 Na チャンネル (ENaC) やミネラルコルチコイド受容体 (MR)、Henle ループや遠位尿細管にある Na-Cl 共輸送体 (NCC)、NaK2Cl 共輸送体 (NKCC2) を介した水電解質の異常により、体液貯留と心拍出量の増加に伴った血圧上昇の関与について検討するため、それぞれの遺伝子発現を $PKG1\alpha^{WT}$ と $PKG1\alpha^{C42S}$ で比較評価した。腎臓皮質および髄質における ENaC (α , β , γ), NCC, NKCC2, MR の発現の差は、両群間でみられなかった (Figure 4)。また、肺湿重量や肺

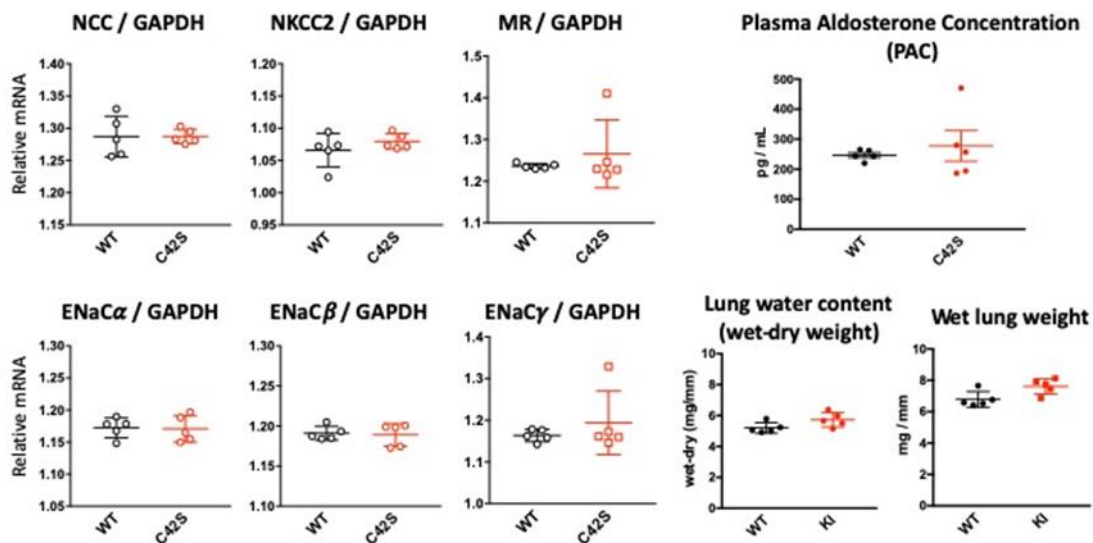
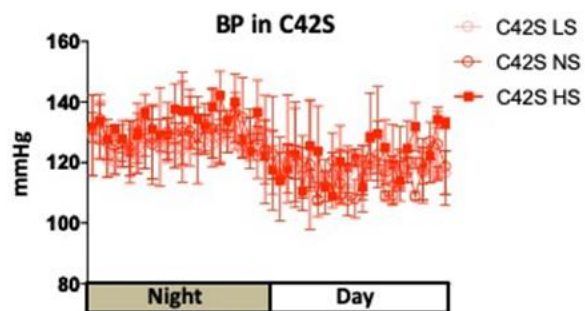


Figure 4

内水分含量も二群間で差はなく、ナトリウム排泄障害や体液量増加に伴った血圧上昇の機序は否定的であった。

3. 4 高食塩飼育により野生型マウスでのみ交感神経活動の増加を暗期に認めた

血管反応性障害による食塩感受性亢進に着目し、血管トーンスの調節を上位で制御していることが予想される交感神経系の活動を、テレメトリーの心拍変動 HRV を周波数解析することで検討した。心臓交感神経系活動の指標である低周波 LF と高周波 HF の比 (LF/HF) を比較すると、野生型では高食塩飼育で暗期優位に優位な増加を認めたのに対し、 $PKG1\alpha^{C42S}$ では変わらなかった (Figure 5)。また、この結果は血圧変動における周波数解析でも同様であり (not shown), PKG の酸化が血管における交感神経過活動に関与していることが示唆された。

NO やナトリウム利尿ペプチド経路で生成される cGMP のシグナルを制御している $PKG1\alpha$ は、過剰な高食塩摂取やアンジオテンシン II 刺激により酸化修飾を受け、特異的な C42 酸化により腎臓でジスルフィド二量体を形成することがわかってきた。ジスルフィド $PKG1\alpha$ 二量体の発現は、交感神経過活動を介し食塩感受性の発症に寄与していると考えられ、食塩感受性高血圧の有用な治療標的として期待できる。

4. 考 察

サイクリック GMP の主要なエフェクター分子である $PKG1\alpha$ は心血管保護効果を有し、NO やナトリウム利尿ペプチドの生理作用を仲介している。しかし、cGMP 結合による $PKG1\alpha$ の活性レベルとは独立し、 $PKG1\alpha$ 上の特異的なチオール基が酸化修飾されるだけで食塩感受性が惹起される新たな機構がわかってきた。従来、食塩感受性

高血圧は、腎臓におけるナトリウム排泄障害が先行するとされ、血液循環量の増加と心拍出量の増加を契機に発症することが指摘されている。そのため長期的には血圧の恒常性を保つためにフィードバック制御機構が働き、通常であれば末梢血管レベルの血管抵抗を下げるために代償的に弛緩反応が起こっていると考えられている。しかし実際には、本研究で示されたように、過剰食塩摂取による血圧上昇にナトリウム排泄障害を伴わない場合は多く、逆に血管抵抗が増加しているケースに遭遇する。昨今、食塩感受性高血圧の代替的な機序として、「抵抗血管における機能不全」^(1,3) を主体としたメカニズムが注目されている。本研究でも、 $PKG1\alpha^{WT}$ と $PKG1\alpha^{C42S}$ の間で体液貯留やナトリウム排泄量に差を見いだせないため、PKG の酸化が抵抗血管の機能不全により食塩感受性を惹起していると考えられ、その機序に腎交感神経系過活動の関与が示唆される。

腎交感神経系に関わる求心路および遠心路における PKG の生理的な役割については、不明な点が多い。腎臓の小葉間動脈などの抵抗血管や輸入細動脈、糸球体内圧における圧上昇を契機とした圧受容体刺激は、求心性神経のインパルスとして L1~3 腰椎レベルの後根神経節に収束したあと脊髄の後角に入ると想定される。脊髄後角に入力されたシグナルは、交叉して脊髄視床路を上行し血管運動中枢の脳幹部へと伝達されるが、交感神経も一緒に同じ経路を辿り情報が送られる。延髄からの血管運動神経は胸腰髄の側柱から出た神経繊維が直接か途中で神経細胞を変えて全身の血管に分布しており、交感神経の血管収縮神経は常時活動し、細動脈の血管緊張を恒常的に調整している。興味深いことに、PKG は求心性神経が脊髄に入る手前の後根神経節に発現していることが報告されているが、その意義は不明である⁽¹³⁾。

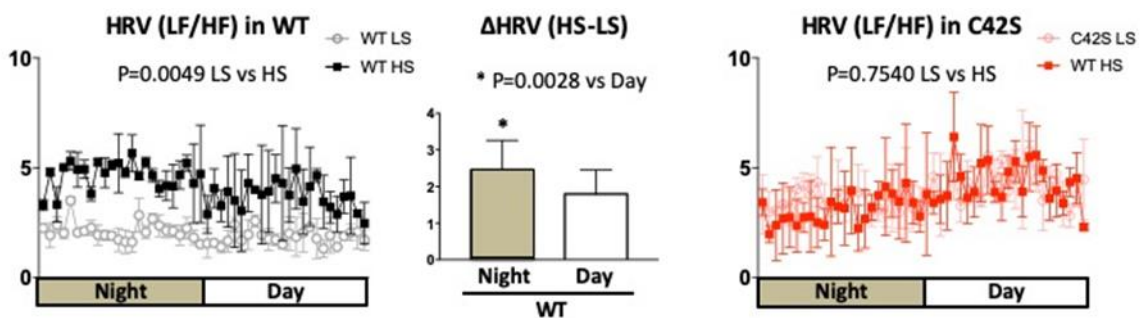


Figure 5

血圧を規定する長期的な機構として、腎臓におけるナトリウム排泄や体液量の調節が重要視され、高血圧患者の多くは本態性高血圧患者でさえもその原因が腎臓にあると指摘されている。腎交感神経系におけるPKGとそのレドックス制御機構の役割と分子機序を解明することで、食塩感受性高血圧における腎交感神経活動の重要性が明らかになり、PKGを分子標的とした新たな治療戦略の確立が期待される。

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・アルドステロン系の賦活化を介し、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密接に関連している^(14,15)。食塩感受性および腎臓におけるPKG1 α レドックス制御機構の役割と治療応用に関する研究は、PKG1 α 上の特異的なC42酸化が腎交感神経系の過活動と深く関わっている可能性が示されたのを契機に、食塩感受性高血圧の治療戦略に新たな展開を生んでいる。今後は、PKG1 α 酸化を介した食塩感受性亢進における腎交感神経系過活動の意義を検討するため、腎除神経術(RDN)による効果をレドックス非感受性のPKG1 α ^{C42S}マウスと比較し、RDNモデルで食塩感受性の可逆性について検討を進める予定である。また、腎臓内および神経経路におけるPKGの分布局在は不明である。マウス組織を用いた免疫組織学的検査を通じ、心腎血管に加え神経を含めた臓器連関についての検討が必要である。さらに、食塩感受性のモデルとして確立しているダールラットや細胞実験でも、PKG酸化の重要性が種を超えて再現されるか確認する予定である。

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、PKG構造変化に関する共同研究を工学部とも進めている。本研究は、バイオマーカーとしての確立だけでなく、cGMP/PKGを標的とした新たな治療戦略の確立を目指す重要なトランスレショナルリサーチへさらに発展することが期待される。

6. 文献

- (1) Morris RC Jr, Schmidlin O, Sebastian A, Tanaka M, Kurtz TW. Vasodysfunction that involves renal

vasodysfunction, not abnormally increased renal retention of sodium, accounts for the initiation of salt-induced hypertension. *Circulation*. 2016 133(9):881-93

- (2) Hall JE. Renal dysfunction, rather than nonrenal vascular dysfunction, mediates salt-induced hypertension. *Circulation*. 2016 133(9):894-907
- (3) Kurtz TW, DiCarlo SE, Pravenec M, Morris RC. Changing views on the common physiologic abnormality that mediates salt sensitivity and initiation of salt-induced hypertension: Japanese research underpinning the vasodysfunction theory of salt sensitivity. *Hypertens Res*. 2019 42(1):6-18
- (4) 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
- (5) Kopkan L, Hess A, Huskova Z, Cervenka L, Navar LG, Majid DS. High-salt intake enhances superoxide activity in eNOS knockout mice leading to the development of salt sensitivity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 299(3):F656-63
- (6) Lopez MJ, Wong SK, Kishimoto I, Dubols S, Mach V, Friesen J, Garbers DL, Beuve A. Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature*. 1995 378(6552):65-8
- (7) Takimoto E, Champion HC, Li M, Belardi D, Ren S, Rodriguez ER, Bedja D, Gabrielson KL, Wang Y, Kass DA. Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med*. 2005 11(2):214-22
- (8) 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
- (9) Nakamura T, Zhu G, Ranek MJ, Kokkonen-Simon K, Zhang M, Kim GE, Tsujita K, Kass DA. Prevention of

PKG-1 α oxidation suppresses antigypertrophic/antifibrotic effects from PDE5 inhibition but not sGC stimulation. *Circ Heart Fail*. 2018 11(3):e004740

- (10) Burgoyne JR, Madhani M, Cuello F, Charles RL, Brennan JP, Schroder E, Browning DD, Eaton P. Cysteine redox sensor in PKG1 α enables oxidant-induced activation. *Science*. 2007 317(5843):1393-7
- (11) Pryszyzhna O, Rudyk O, Eaton P. Single atom substitution in mouse protein kinase G eliminates oxidant sensing to cause hypertension. *Nat Med*. 2012 18(2):286-90
- (12) Hasegawa Y, Nakagawa T, Matsui K, Kim-Mitsuyama S. Renal denervation in the acute phase of ischemic stroke provides brain protection in hypertensive rats. *Stroke*. 2017 48(4):1104-1107
- (13) Gangadharan V, Wang X, Luo C. Cyclic GMP-dependent protein kinase-1 localized in nociceptors modulates nociceptive cortical neuronal activity and pain hypersensitivity. *Mol Pain*. 2017 13:1744806917701743
- (14) 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
- (15) Feng W, Dell'Italia LJ, Sanders PW. Novel Paradigms of Salt and Hypertension. *J Am Soc Nephrol*. 2017 28(5):1362-1369

The Reversible Salt Sensitivity Mediated through a Disparity of cGMP Signaling and the Therapeutic Application

Taishi Nakamura

Department of Medical Informatics Science and Administration Planning, Kumamoto University Hospital

Summary

Background Both nitric oxide and natriuretic peptide mediate natriuresis and vascular relaxation through cyclic GMP (cGMP) synthesis. PKG1 α , a main effector of cGMP, is activated principally by cGMP binding, but it can be regulated with oxidant by forming an intermolecular disulfide bond across adjacent cysteine 42 residues (C42), where located at proximal end of each cGMP binding site. The redox mechanism is prevalent to relax resistant vessels and thus lessen blood pressure. However, the significance on salt sensitivity remains unclear.

Objective/Method We tested if C42 redox sensor in PKG1 α controls salt sensitivity and renal pressure natriuresis, both which have long-term effects on sodium/water balance. Mice harboring either cysteine redox insensitive PKG1 α (PKG1 α^{C42S}) or the littermate controls (PKG1 α^{WT}) were used to compare BP response to salt loading by means of telemetry system.

Results Non-reducing SDS-PAGE showed PKG forms disulfide dimer in kidney expressing PKG1 α^{WT} only, indicating C42 locates in a key position to form an intermolecular disulfide bond. We confirmed in telemetry system that mice expressing PKG1 α^{C42S} shows a modest hypertension when mice were fed with normal salt or low salt diet. However, salt loading didn't change BP at all in PKG1 α^{C42S} , while significantly increased the levels in PKG1 α^{WT} predominantly during dark period. Importantly, we confirmed no differences in increased levels after salt loading such as water intake, urinary volume, and urinary sodium excretion regardless of PKG1 α genotypes. Low frequency/high frequency ratio evaluated with heart rate variability in telemetry system, a marker of sympathetic nervous system (SNS), showed BP elevation in PKG1 α^{WT} was accompanied with an activation in SNS.

Conclusions PKG1 α disulfide dimer can be observed in kidney. The redox regulation in PKG1 α appears to be involved in salt sensitive hypertension through renal sympathetic nervous system.