

交感神経系の賦活化を介す食塩感受性とシナプス興奮における PKG の意義と機序解明

中村 太志, 徳永 信行

熊本大学病院医療情報経営企画部

概要 細胞内二次伝達物質であるサイクリック GMP (cGMP) は、一酸化窒素やナトリウム利尿ペプチドの生理作用を介在している。PKG1 α はその cGMP の主要なエフェクターであり、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、二量体ドメイン近傍に位置する 42 番目のシステイン (C42) が酸化されると、ジスルフィド架橋化により機能が変化する。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 の特異的な酸化は体血圧の低下に寄与していることが報告されている。一方、筆者らは、高食塩食で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初めて確認し、C42 が酸化されると、予想に反してナトリウムを排泄するためにより高い血圧上昇が必要になることを見出している。さらなる研究により、PKG1 α 酸化による食塩感受性亢進の機序として、腎交感神経系賦活化の関与が示唆され、高塩食飼育で増加する尿中ノルエピネフリン (NE) 値や腎組織内の NE 含有量が腎交感神経除神経や C42 の酸化予防により抑制されることがわかってきた。

本研究では、交感神経系賦活化における PKG1 α レドックス制御機構の意義に焦点を当て、交感神経様細胞モデルを用い、シナプス興奮における詳細な分子機序を検討した。まず、交感神経遠心路のシナプス後終末にあたる腎臓を想定し、HEK-293T 細胞に野生型およびレドックス非感受性 (C42S) の PKG を導入発現させ、NE の反応性を比較したが、両群間に差を認めなかった。次に、交感神経シナプス後膜の興奮およびシナプス前膜へのネガティブフィードバック機構を想定し、PKG1 α を導入した交感神経様細胞で同様に NE の反応性を比較したところ、NE 刺激で神経活動マーカーである最初期遺伝子の発現は上昇したが、同じく両群間に差を認めなかった。以上より、PKG1 α 酸化を介した NE 放出の機序に、NE に対する反応性亢進の関与は否定的だった。

そこで、同じ交感神経様細胞を用い、上流の神経伝達物質アセチルコリンで刺激し、シナプス反応性を比較した。C42S と比べ、野生型の交感神経様細胞ではチロシンヒドロキシラーゼ (TH) の Ser40 におけるリン酸化が特異的に亢進し、NE 放出量も増加することがわかった。カテコラミン合成の律速酵素である TH のリン酸化亢進は、DT3 を添加しても変わらないことから、PKG1 α の活性レベルとは独立した反応と考えられた。PKG1 α 酸化による TH のリン酸化機序については、さらなる解析が必要である。

C42 を介す PKG ジスルフィド二量体の形成は、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。

1. 研究目的

過剰な食塩摂取は、循環血漿量を増加させ、心拍出量の増加により血圧を上昇させる¹。この血行力学的変化に対して血圧の恒常性を保持するために、細小血管レベルでは血管抵抗を減少させる代償機構が働くと考えられて

いる^{2,3}。従来、食塩感受性高血圧では、腎臓におけるナトリウム排泄障害により体液貯留が起こり、血圧が上昇すると考えられてきたが²、近年、血圧上昇に対して血管抵抗を十分に下げられないことに起因する、「抵抗血管機能不全」による機序が注目されている³⁻⁵。

一酸化窒素(NO)やナトリウム利尿ペプチド(NPs)は、細胞内セカンドメッセンジャーであるサイクリック GMP (cGMP)を生成し、ナトリウム利尿や血管平滑筋の弛緩反応に関わっている⁶。そのため、細胞内における cGMP レベルの増加は、食塩感受性高血圧の有用な治療標的として期待される。既報では、血管内皮細胞に分布する内皮型 NO 合成酵素を欠失させたマウスでは、ナトリウム排泄のためにより高い血圧上昇が必要となる食塩感受性を示す^{7,8}のに対し、中枢及び末梢神経組織に発現する神経型 NO 合成酵素を欠失させたマウスでは、高食塩負荷をしても食塩感受性高血圧を示さない⁹ことが報告されている。一方、ナトリウム利尿ペプチドを活性化するプロテアーゼである corin を欠失させたマウスでは、ナトリウム排泄障害を来し、食塩感受性を示す¹⁰のに対し、ナトリウム利尿ペプチドの受容体である膜型グアニル酸シクラーゼを欠失させた場合には食塩抵抗性となることが報告されている¹¹。我々は、NO/cGMP や NPs/cGMP の両シグナル経路でみられる表現型の多様性に、cGMP の主要なエフェクター分子である cGMP 依存性プロテインキナーゼ(PKG1 α)¹²が中心的な役割を果たしていると考え、食塩感受性における意義を継続して検討している。

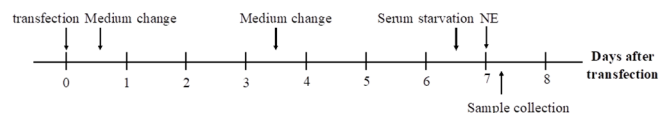
腎交感神経は血管抵抗を調節することで、血圧制御の一端を担っている¹³⁻¹⁴。そのため、交感神経活動の賦活化は、食塩感受性高血圧の発症と密接に関わっていると考えられる。腎交感神経活動の食塩感受性への影響を評価したラット水腎症モデルを用いた動物研究では、高食塩負荷により血圧上昇が認められるが、この食塩感受性は腎交感神経除神経術(RDN)により過剰な交感神経活動を抑制することで緩和されることが知られている¹⁵。一方、内皮細胞のエンドセリン受容体 B 型の活性化は、NO 依存性の血管弛緩と関わるが、エンドセリン受容体 B 型の欠損ラットでは、高食塩による血圧上昇と交感神経過活動が認められるものの、RDN を行っても食塩感受性の緩和は認められず¹⁶、食塩感受性への交感神経活動の関与の大きさは、様々な動物モデルで異なることが報告されている。

近年、PKG1 α の活性調節機構として、cGMP に依存しないレドックス制御機構が報告され¹⁷⁻¹⁹、その意義が注目されている。ホモ二量体のリン酸化酵素である PKG にはヒトにおいて PKG1 と PKG2 の 2 つのアイソフォームがあり、PKG1 にはスプライスバリエントにより PKG1 α と PKG1 β が

存在する。心血管組織に豊富に存在している PKG1 α に特異的な配列で、N 末端から 42 番目のシステイン残基(C42)が酸化されると、分子内にジスルフィド架橋が形成され、ジスルフィド二量体化することが知られている。この PKG1 α ジスルフィド二量体は、腸間膜動脈などの単離された細小血管を cGMP 非依存性に弛緩させることが報告されている²⁰。

筆者らの研究により、高食塩飼育されたマウス腎臓内でも PKG1 α ジスルフィド二量体が発現していることが確認され、さらに C42 酸化が交感神経系過活動を介して食塩感受性の発症に寄与している新たな表現型がわかってきた。交感神経活動の神経伝達物質であるノルエピネフリン(NE)の尿中や腎臓組織中への分泌放出に C42 酸化の関与が示唆されており、PKG1 α の酸化と交感神経活動におけるシナプス興奮を結ぶ機序の解明が必要である。本研究では、C42 をセリンに置換したレドックス非感受性 PKG1 α を導入発現させた細胞モデルを用い、交感神経過活動における NE 分泌放出のメカニズムと PKG1 α レドックス制御機構の意義を解析する。自身の一連の研究結果に基づいた独創的な研究であり、食塩感受性高血圧の新規の機序解明と PKG の標的有用性の明確化を図る研究である。

2. 研究方法



2.1 交感神経様細胞を用いた実験プロトコール

10% horse serum (HS, 26050088, GibcoTM), 5% FBS (SV30014.03, Hyclone) と 1% Penicillin-Streptomycin (168-23191, 富士フィルム和光 純薬株式会社)を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 11885092, GibcoTM) で PC12 細胞 (European Collection of Authenticated Cell Cultures, Salisbury, UK)を培養した。2.2 の実験ではポリ-L-リジンコート 12well プレート(4815-040, IWAKI), 2.4, 2.5 の実験ではポリ-L-リジンコート 6well プレート (4810-040, IWAKI) に PC12 細胞 (1.0×10^6 /ml)を播種した。24 時間後にアデノウイルスベクターを用いて FLAG タグを融合したヒトの PKG1 α_{WT} または PKG1 α_{C42S} (1×10^9 vp/ml)を PC12 細胞に遺伝子導入し¹⁷, 6 時間後に neuronal growth factor 2.5S Native Mouse

Protein (NGF, 50 ng/ml, Thermo Fisher Scientific) を添加した DMEM (10% HS+5% FBS) で培地交換した。以後 3 日おきに DMEM (10% HS+5% FBS + 50 ng/ml NGF) で培地交換し、6 日後に PC12 細胞の神経突起伸張と交感神経様細胞への分化を確認した。

2. 2 交感神経様細胞における遺伝子発現解析

交感神経様細胞に分化後、serum starvation し、12 時間後に 100 nM のノルエピネフリン NE (A7257, Sigma-Aldrich) で 30 分間刺激し、Buffer RLT Lysis Buffer (79216, QIAGEN) で細胞を回収した。

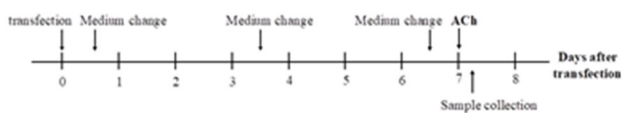
2. 3 RNA 抽出, リアルタイム PCR

交感神経様細胞から RNeasy Fibrous Mini Kit (74704, Qiagen) を用いて total RNA を抽出した。精製した RNA は PrimeScript RT-PCR システムで逆転写し、鋳型 DNA は下記の特異的な相補塩基配列プライマーと SYBR Green を用いて増幅させ、PCR 反応中の増幅産物をモニタリングした。発現量は 18S で補正し、相対的に定量した。

Rat c-fos Forward; 5'-AGC CGA CTC CTT CTC CAG CA-3', Reverse; 5'-AAG TTG GCA CTA CAG ACG GAC AGA T-3',

Rat 18S Forward; 5'-AAG TTT CAG CAC ATC CTG CGA GTA-3', Reverse; 5'-TTG GTG AGG TCA ATG TCT GCT TTC-3'

2. 4 交感神経様細胞の NE 放出量測定



in vitro Experimental Protocol

交感神経様細胞に分化後、2% HS を含む DMEM に培地交換し、12 時間後に 100 μ M のアセチルコリン Ach (A6625, Sigma-Aldrich) で 10 分間刺激し、上清を回収した。回収した上清に 0.01 M の塩酸 (1 mM エチレンジアミン四酢酸 (343-01861, 富士フィルム和光純薬株式会社), 4 mM メタ亜硫酸ナトリウム (197-02365, 富士フィルム和光純薬株式会社)) を添加し、Noradrenaline Research ELISA (BA E-5200, LDN 社) を用いて、上清中に放出されたノルエピネフリン NE 濃度を測定した。交感神経様細胞は回収し、マルチモードマイクロプレートリーダー (SpectraMax i3x, Molecular Devices, Silicon Valley, CA, USA) で蛋白量を測定した。NE 放出量は、ELISA で得られた NE 濃度を交

感神経様細胞の蛋白量で補正した。

2. 5 交感神経様細胞におけるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) のリン酸化評価

交感神経様細胞に分化後、serum starvation した。12 時間後に 10 μ M のプロテインキナーゼ A 阻害薬である H89 (B1427, Sigma-Aldrich) を添加し、30 分間後に 100 μ M の ACh で刺激した。また、PKG1 α WT の ACh 刺激群は、1 μ M の選択的 PKG1 α 阻害薬である DT3 (D052, BIOLOG Life Science Institute) を添加し、10 分後に細胞を回収した。

2. 6 腎交感神経除神経術 (RDN) モデルにおける TH リン酸化と PKG1 α 酸化二量体の比較検討

野生型 PKG1 α マウス (PKG1 α WT) と 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) のノックインマウスを高食塩 (8%) で 3 週間飼育した後、RDN または偽手術 (Sham) を行った。降圧効果が持続する手術後 2 週間の時点で解剖し、腎臓組織を用いてウェスタンブロッティングを行った。

2. 7 ウェスタンブロッティング

細胞の溶解には NP40 cell lysis buffer (FNN0021, Invitrogen), 腎臓組織の溶解には T-PERTM Tissue Protein Extraction Reagent (78510, Thermo Fisher Scientific) を用いた。プロテアーゼ阻害剤カクテル (cOmpleteTM, 4693159001, Sigma-Aldrich) 1 タブレットと 1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド (93482, Sigma-Aldrich) を添加した NP40 cell lysis buffer 10 ml または T-PERTM Tissue Protein Extraction Reagent 10 ml を調製。これらの溶解バッファーには、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法ではホスファターゼ阻害剤 (PhosSTOP, 4906837001, Sigma-Aldrich) 1 タブレットを添加、非還元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法では 100 mM の N-エチルマレインミド (E3876, Sigma-Aldrich) を添加した。100 V で電気泳動後、セミドライ式ブロッティング装置 (トランスブロット[®] TurboTM 転写システム, #1704150, Bio-Rad) を用いてポリフッ化ビニリデン膜 (Amersham Hybond P 0.45 PVDF blotting membrane, GE10600023, cytiva) に転写した。1 次抗体はそれぞれ下記を使用し、化学発光検出試薬 (AmershamTM ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent, RPN2232, cytiva) とルミノ・イメージアナライザー (ImageQuant LAS 4000mini, 富士フィルム株式会社) を用いて現像した。Phospho-Tyrosine Hydroxylase (Ser40) Antibody (2791S,

Cell signaling), Anti-phospho-Tyrosine Hydroxylase (pSer19) antibody produced in rabbit (3671S, Cell signaling), Tyrosine Hydroxylase Antibody (2792S, Cell signaling), Monoclonal Anti-FLAG antibody produced in rabbit (F2555, Sigma-Aldrich), PKG1 α (D10G2), Rabbit mAb (13511S, Cell signaling), GAPDH Rabbit mAb (14C10, Cell signaling)

2.8 統計解析

データはすべて平均値 \pm 標準偏差で表示。また、PC12細胞の c-fos 発現量, NE 放出量, TH リン酸化の定量データは、Two-way ANOVA にて NE 刺激, ACh 刺激による影響と PKG1 α 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。各群の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、有意水準 5% で検定した。

3. 研究結果

3.1 PKG1 α を導入した交感神経様細胞を NE で刺激すると、c-fos の発現が増加したが、両遺伝子型間で差を認めなかった

交感神経活動が起こり、腎交感神経遠心路の節前線維から分泌されたアセチルコリン (ACh) が節後線維のニコチン性 ACh 受容体に結合すると、節後線維のシナプス前終末からノルエピネフリン (NE) が分泌される (Fig. 1a)。分泌された NE は、腎臓や心臓、血管などの末梢臓器のアドレナリン性受容体を介して作用する一方、節後線維シナプ

ス前終末の α_2 受容体にも結合し、NE の分泌を抑制するネガティブフィードバック機構を働かせる²¹。In vivo の実験では、NE の放出が PKG1 α ^{WT} と PKG1 α ^{C42S} の間で差が生じることが分かっている。このメカニズムを探るためにシナプス間隙における神経伝達に注目し、シナプス前終末とシナプス後終末に分けて検討した。

ラット副腎褐色細胞腫由来の神経細胞である PC12 細胞は、神経成長因子 (NGF) を作用させると、交感神経様細胞に分化することが知られる。交感神経様細胞は、ACh の刺激により NE の放出を認めるため、シナプス前ニューロンのモデルとして有用と考えられる。交感神経におけるシナプス後膜の興奮やシナプス前膜を介したネガティブフィードバック機構を想定し、交感神経様細胞を NE で刺激し、神経活動マーカーである c-fos の発現を評価した。NE 刺激後の c-fos の発現と PKG1 α 酸化の関係を比較するために、PC12 細胞にアデノウイルスベクターを用いてヒトの FLAG タグ融合 PKG1 α (PKG1 α ^{WT} または PKG1 α ^{C42S}) を導入し、NE の刺激有り無しで比較した。交感神経様細胞での比較を目的としたため、PC12 細胞はインフェクション後に NGF を添加した。交感神経様細胞は NE 刺激により有意に c-fos の発現を増加させたが、PKG1 α ^{WT} と PKG1 α ^{C42S} の両遺伝子型間で差を認めなかった (Fig. 1b)。この結果は HEK293T でも同様だったことから、PKG1 α 酸化による交感神経過活動の機序として、シナプス前ニューロン及びシナプス後終末における NE の反応性亢進は関与していないことが示唆された。

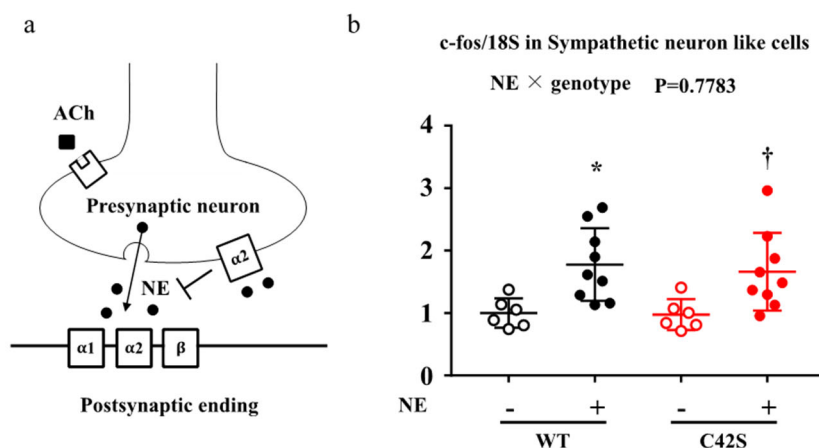


Fig. 1 a; Neurotransmission between pre- and post-synaptic neuron, b; NE stimulation similarly upregulated c-fos expression in sympathetic neuron like cells transfected with either PKG1 α ^{WT} or PKG1 α ^{C42S}. P values show 2-way ANOVA interaction. NE \times genotype, interaction between norepinephrine stimulation and genotype. *P=0.0127, †P=0.0288 vs each control by posthoc test.

3. 2 PKG1 α 導入交感神経様細胞を ACh で刺激すると、PKG1 α_{WT} でのみ NE 放出量が増加した

NE 放出量と PKG1 α 酸化の関連を検討するため、PC12 細胞に PKG1 α を導入し、ACh の刺激有り無しで NE 放出量を比較した。PKG1 α_{WT} を導入した交感神経様細胞では、NE 放出量が著明に増加したにもかかわらず、PKG1 α_{C42S} では NE 放出が抑制され、PKG1 α_{WT} と PKG1 α_{C42S} を発現する細胞間に ACh による NE 放出量に差を認めた (Fig. 2)。ACh 刺激による NE 放出の増加に酸化型 PKG1 α の関与が示唆され、交感神経活動における興奮に差を生んでいる機序と考えられた。

3. 3 ACh 刺激により、PKG1 α_{WT} を導入した交感神経様細胞で TH のリン酸化が亢進した

カテコールアミン合成の律速酵素とされるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) は、NE の放出と密接に関わり、L-チロシンを L-DOPA に変換し、NE やドパミンの前駆体を合成する。また、TH の酵素活性はリン酸化機序により調節され²²、Ser8 や Ser19, Ser31, Ser40 のリン酸化部位が様々なプロテインキナーゼによって翻訳後修飾を受けていることが知られている。中でも、Ser40 のリン酸化は TH の活性化に最も大きく影響しており、同リン酸化部位は PKG や PKA, PKC の基質として制御されていることがわかっている。

そこで、TH リン酸化における PKG1 α 酸化の意義を検討するため、PC12 細胞に PKG1 α を導入し、ACh の刺激有り無しで交感神経様細胞における TH のリン酸化をウェスタンブロットティングで評価した (Fig. 3)。また、関与を無視できない PKA による Ser40 リン酸化の影響を排除するため、PKA 阻害薬の H89 を添加した上で、選択的 PKG1 α 阻害薬である DT3 添加による Ser40 リン酸化への影響を検討した。結果、ACh 刺激は PKG1 α_{WT} を導入した交感神経様細胞において Ser40 の TH リン酸化を有意に増加させたが、PKG1 α_{C42S} を導入した交感神経様細胞ではリン酸化の増強がみられなかった。また、PKG1 α_{WT} で亢進した TH Ser40 リン酸化は、DT3 の有無で変化を示さないことがわかった。一方、TH Ser19 のリン酸化は ACh 刺激で変化を認めなかった。これより、TH Ser40 のリン酸化亢進には PKG1 α の酸化型が必要であり、PKG1 α の酸化を予防することにより TH Ser40 のリン酸化を抑制できることがわかった。また PKG1 α 酸化による TH リン酸化は、PKG1 α の活性レベルとは独立して起こる修飾反応であることが示唆された。

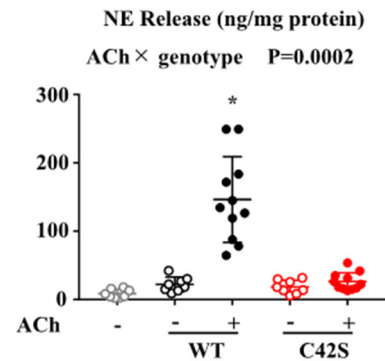


Fig. 2 ACh increased NE release in sympathetic neuron like cells transfected with PKG1 α_{WT} . P values show 2-way ANOVA interaction. ACh \times genotype, interaction between acetylcholine stimulation and genotype. *P<0.0001 vs WT control by posthoc test.

3. 4 高食塩食で飼育されたマウス腎組織において Ser40 の TH リン酸化は亢進しており、高食塩で増加した PKG1 α ジスルフィド二量体は腎交感神経系賦活化による TH リン酸化に先行した。

交感神経様細胞で認めた PKG1 α 酸化を介する TH Ser40 リン酸化が腎組織でも再現されるのか、高食塩食で飼育した PKG1 α_{WT} マウスおよび PKG1 α_{C42S} マウスの腎組織を用いて評価し、腎交感神経除神経術 (RDN) により腎交感神経系亢進と TH リン酸化の関連性を検討した。高食塩食により PKG1 α_{WT} の腎組織では TH Ser40 のリン酸化が有意に増加したが、PKG1 α_{C42S} の腎組織では高食塩により変化を認めなかった。また、高食塩食による腎組織での Ser40 リン酸化は、RDN により PKG1 α_{WT} と PKG1 α_{C42S} の両遺伝子でもともに著明に減弱した。一方、Ser19 における TH リン酸化は高食塩食により変化を認めなかった (Fig. 4a)。高食塩食により PKG1 α_{WT} の腎臓で誘導される PKG1 α ジスルフィド二量体は、RDN により変化を認めなかった (Fig. 4b)。以上より、交感神経様細胞で認めた PKG1 α 酸化を介する TH Ser40 リン酸化は腎組織でも再現されることがわかった。また、PKG1 α 酸化は、腎交感神経系亢進による TH Ser40 リン酸化に先行し、上流に位置することが示唆された。

4. 考察

NO/cGMP や NPs/cGMP の両経路におけるエフェクター分子 PKG1 α は、血管平滑筋の弛緩や病的な心肥大抑制などの心血管系の機能調節において重要な働きをしている。筆者は、cGMP 結合による従来の PKG 活性機構とは

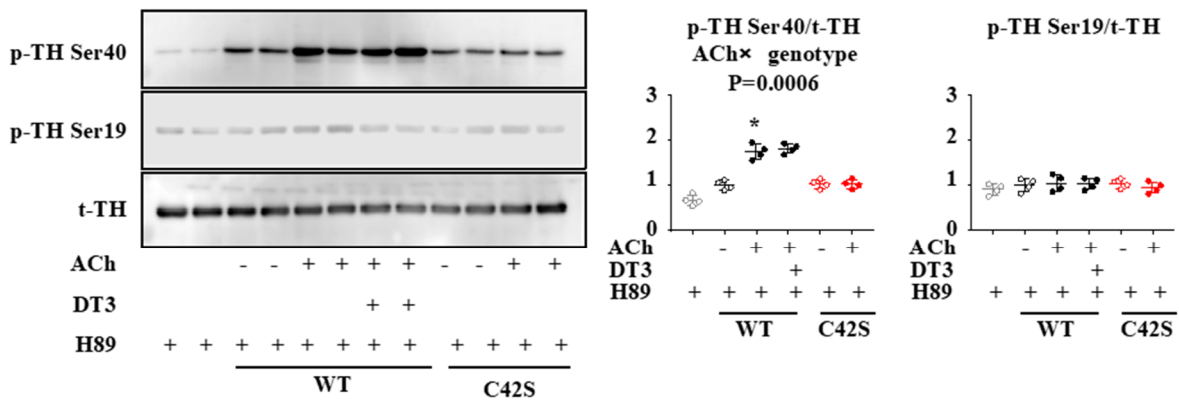


Fig. 3 ACh enhanced TH phosphorylation at Ser40 in sympathetic neuron like cells transfected with PKG1a^{WT}. *P<0.0001 vs WT control by 2-way ANOVA, with main effect of ACh stimulation and genotype.

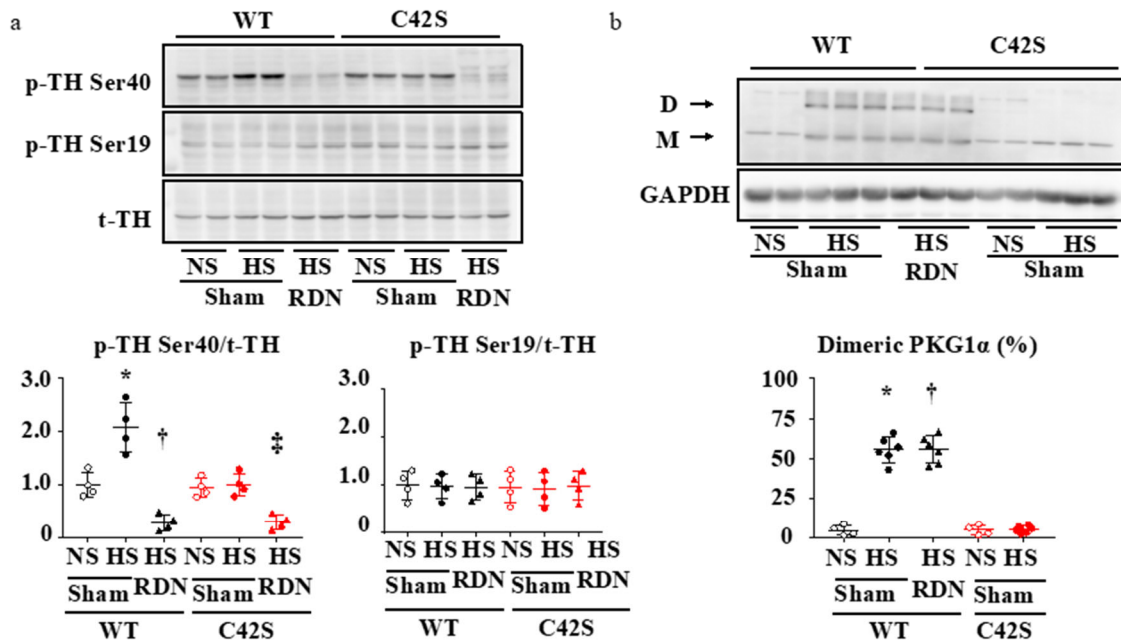


Fig 4. Salt-induced PKG1 α oxidation enhanced TH phosphorylation at Ser40 and preceded renal sympathetic overactivity. a; P=0.0024 for high salt and genotype interaction, P=0.0009 for RDN and genotype interaction. *P<0.0001 vs WT NS sham, †P<0.0001 vs WT HS sham, ‡P<0.0001 vs C42S HS sham by posthoc test. b; *P<0.0001 vs WT NS sham, C42S NS sham, and C42S HS sham, †P<0.0001 vs WT NS sham, C42S NS sham, and C42S HS sham by 1-way ANOVA.

異なり, 1 α アイソフォームに特異的なアミノ酸配列である C42 の酸化修飾を介したレドックス制御に注目し, その表現型解析を進めている。C42 酸化による PKG1 α ジスルフィド二量体は腎組織でも発現しており, 腎交感神経の過活動を介し食塩感受性の惹起に関与していることが我々の研究によりわかってきている。また, C42 の特異的な酸化により, 尿中や腎組織中において神経伝達物質であるノルエピネフリン (NE) の分泌放出が増加している結果が得

られ, PKG1 α における C42 を治療標的とした応用研究が期待される。ラット副腎褐色細胞腫由来の神経細胞である PC12 細胞は, 神経成長因子 NGF により交感神経様細胞に分化し, ナトリウム利尿ペプチド²³や cGMP アナログ²⁴, 酸化ストレス²⁵ の刺激で NE を放出することが知られている。これより, cGMP より下流のシグナル伝達の違いや酸化ストレスが NE 放出に格差を生んでいることが示唆されるが, NE 放出における PKG1 α レドックス制御機構の意義は不明である。

今回の研究助成では、自身の研究結果でわかってきた PKG1 α _{WT} と PKG1 α _{C42S} の間で見られる NE 放出の格差の機序に焦点をあて、さらなる検討を行った。具体的には、交感神経遠心路の節後線維をシナプス前膜およびシナプス後終末に分け、シナプス興奮の反応性を PKG1 α _{WT} と PKG1 α _{C42S} で比較した。まず、交感神経遠心路のシナプス後終末にあたる腎臓を想定し、HEK-293T 細胞に PKG を導入した上で NE 刺激による反応性を比較したところ、PKG1 α _{WT} と PKG1 α _{C42S} の間で差を認めなかった。次に、交感神経のシナプス後膜の興奮およびシナプス前膜へのネガティブフィードバック機構を想定し、交感神経様細胞に PKG1 α を導入し同様に比較検討した。HEK-293T 細胞と同じく、NE 刺激により神経活動マーカーである最初期遺伝子 *c-fos* の発現が上昇したが、両遺伝子型間で差を認めなかった。これより、PKG1 α 酸化が関与する NE 放出には、シナプス前ニューロンやシナプス後終末における NE の反応性亢進が関与していることは否定的であった。そこで、PKG1 α を導入した交感神経様細胞を神経伝達物質であるアセチルコリン ACh で刺激し、シナプス反応性を比較した。PKG1 α _{WT} を発現する交感神経様細胞では、PKG1 α _{C42S} と比べ、チロシンヒドロキシラーゼ (TH) の Ser40 におけるリン酸化が亢進し、NE 放出量が増加することがわかった。この TH Ser40 のリン酸化亢進は、DT3 添加により PKG1 α の活性を抑制しても変化がみられないことから、PKG1 α の活性レベルとは独立した現象と考えられた。C42 を介した PKG1 α 酸化による TH リン酸化 (Ser40) の機序については、さらなる解析が必要である。

TH の活性は、リン酸化機序により調節され、Ser40 におけるリン酸化が最も重要と考えられている。実際、ラットにリポ多糖の腹腔内投与^{26, 27} や肢電撃²⁸ を加えたモデルの副腎髄質では TH Ser40 のリン酸化が亢進し、TH の活性上昇を認めている。終脳吻側に位置する嗅球は嗅覚情報処理に関わるが、視床下部などの心血管機能に関わる領域とつながっており、血圧調節への関与が知られている。また、DOCA-Salt 高血圧ラットではコントロールと比較して、嗅球における TH Ser40 リン酸化が亢進しており^{29, 30}、TH Ser40 リン酸化と食塩感受性高血圧の関連性が示唆される。

本研究を通じ、PKG1 α は腎臓や交感神経における TH の活性化と関わっており、特異的な C42 酸化修飾により、

NE の生合成が促進される機序がわかってきた。マウスから単離された腸間膜動脈などの抵抗血管を用いた研究では、PKG1 α の酸化自体が細小血管における血管弛緩に寄与しているとされてきた。しかし、生体内の局所血管レベルでは、交感神経系やレニン・アンジオテンシン系の上流から実質的な二重支配を受けていると考えられ、精巧に細小血管の収縮弛緩バランスが調節されていることが伺える。さらなる研究発展により、PKG1 α レドックス制御機構を介す食塩感受性高血圧への治療応用が期待される。

5. 今後の課題

食塩過剰摂取によって惹起される PKG1 α の特異的な酸化が、チロシンヒドロキシラーゼのリン酸化を介してノルエピネフリンの放出と密接に関わっていることがわかってきた。交感神経系過活動や食塩感受性の亢進における PKG1 α レドックス制御機構の標的有用性が注目される。PKG1 α 酸化によるチロシンヒドロキシラーゼのリン酸化機序について解析を進めているが、これまでの研究により C42 を介すレドックス制御機構は、活性レベルに依らず、タンパク質間相互作用や細胞内局在化に重要な働きをしていることがわかっている。今後は、PKG1 α とチロシンヒドロキシラーゼの親和性に着目した詳細な検討を予定している。また、タンパク質間相互作用は DNA 複製や輸送機構、シグナル伝達等の広範囲な細胞プロセスを調節しているため、酸化型 PKG1 α の基質との相互作用についても、交感神経様細胞を用い網羅的に解析する必要がある。筆者らの研究により明らかになってきた腎交感神経系賦活化による抵抗血管機能不全は、食塩感受性の惹起と遷延化を来す機序の一部であると考えられる。食塩感受性高血圧における PKG1 α 酸化とチロシンヒドロキシラーゼリン酸化の再現性とその意義を、食塩感受性高血圧のモデルであるダール食塩感受性ラットでも確認する予定である。

6. 文献

1. Grillo A, Salvi L, Coruzzi P, Salvi P and Parati G. Sodium Intake and Hypertension. *Nutrients*. 2019;11.
2. Hall JE. Renal Dysfunction, Rather Than Nonrenal Vascular Dysfunction, Mediates Salt-Induced Hypertension. *Circulation*. 2016;133:894-906.
3. Feng W, Dell'Italia LJ and Sanders PW. Novel Paradigms of Salt and Hypertension. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28:1362-1369.

4. Morris RC, Jr., Schmidlin O, Sebastian A, Tanaka M and Kurtz TW. Vasodysfunction That Involves Renal Vasodysfunction, Not Abnormally Increased Renal Retention of Sodium, Accounts for the Initiation of Salt-Induced Hypertension. *Circulation*. 2016;133:881-93.
5. Kurtz TW, DiCarlo SE, Pravenec M and Morris RC. Functional foods for augmenting nitric oxide activity and reducing the risk for salt-induced hypertension and cardiovascular disease in Japan. *J Cardiol*. 2018;72:42-49.
6. Nakamura T and Tsujita K. Current trends and future perspectives for heart failure treatment leveraging cGMP modifiers and the practical effector PKG. *J Cardiol*. 2021.
7. Kopkan L, Hess A, Huskova Z, Cervenka L, Navar LG and 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:F656-63.
8. Nakamura T, Kataoka K, Tokutomi Y, Nako H, Toyama K, Dong YF, Koibuchi N, Yamamoto E, Yasuda O, Ogawa H and Kim-Mitsuyama S. Novel mechanism of salt-induced glomerular injury: critical role of eNOS and angiotensin II. *J Hypertens*. 2011;29:1528-35.
9. Sallstrom J, Carlstrom M, Jensen BL, Skott O, Brown RD and Persson AE. Neuronal nitric oxide synthase-deficient mice have impaired renin release but normal blood pressure. *Am J Hypertens*. 2008;21:111-6.
10. Wang W, Shen J, Cui Y, Jiang J, Chen S, Peng J and Wu Q. Impaired sodium excretion and salt-sensitive hypertension in corin-deficient mice. *Kidney Int*. 2012;82:26-33.
11. Lopez MJ, Wong SK, Kishimoto I, Dubois S, Mach V, Friesen J, Garbers DL and Beuve A. Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature*. 1995;378:65-8.
12. Takimoto E, Champion HC, Li M, Belardi D, Ren S, Rodriguez ER, Bedja D, Gabrielson KL, Wang Y and Kass DA. Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med*. 2005;11:214-22.
13. Averina VA, Othmer HG, Fink GD and Osborn JW. A new conceptual paradigm for the haemodynamics of salt-sensitive hypertension: a mathematical modelling approach. *J Physiol*. 2012;590:5975-92.
14. Sata Y, Head GA, Denton K, May CN and Schlaich MP. Role of the Sympathetic Nervous System and Its Modulation in Renal Hypertension. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:82.
15. Peleli M, Al-Mashhadi A, Yang T, Larsson E, Wahlin N, Jensen BL, AE GP and Carlstrom M. Renal denervation attenuates NADPH oxidase-mediated oxidative stress and hypertension in rats with hydronephrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;310:F43-56.
16. Becker BK, Feagans AC, Chen D, Kasztan M, Jin C, Speed JS, Pollock JS and Pollock DM. Renal denervation attenuates hypertension but not salt sensitivity in ETB receptor-deficient rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2017;313:R425-R437.
17. Nakamura T, Ranek MJ, Lee DI, Shalkey Hahn V, Kim C, Eaton P and Kass DA. Prevention of PKG1alpha oxidation augments cardioprotection in the stressed heart. *J Clin Invest*. 2015;125:2468-72.
18. Nakamura T, Zhu G, Ranek MJ, Kokkonen-Simon K, Zhang M, Kim GE, Tsujita K and Kass DA. Prevention of PKG-1alpha Oxidation Suppresses Antihypertrophic/Antifibrotic Effects From PDE5 Inhibition but not sGC Stimulation. *Circ Heart Fail*. 2018;11:e004740.
19. Burgoyne JR, Madhani M, Cuello F, Charles RL, Brennan JP, Schroder E, Browning DD and Eaton P. Cysteine redox sensor in PKGIa enables oxidant-induced activation. *Science*. 2007;317:1393-7.
20. <Cysteine Redox Sensor in PKGIa Enables Oxidant-Induced Activation.pdf>.
21. Gilsbach R and Hein L. Are the pharmacology and physiology of alpha(2) adrenoceptors determined by alpha(2)-heteroreceptors and autoreceptors respectively? *Br J Pharmacol*. 2012;165:90-102.

22. Dunkley PR and Dickson PW. Tyrosine hydroxylase phosphorylation in vivo. *J Neurochem.* 2019;149:706-728.
23. Chan NY, Robador PA and Levi R. Natriuretic peptide-induced catecholamine release from cardiac sympathetic neurons: inhibition by histamine H3 and H4 receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;343:568-77.
24. Chan NY, Seyedi N, Takano K and Levi R. An unsuspected property of natriuretic peptides: promotion of calcium-dependent catecholamine release via protein kinase G-mediated phosphodiesterase type 3 inhibition. *Circulation.* 2012;125:298-307.
25. Peixoto-Neves D, Soni H and Adebisi A. Oxidant-induced increase in norepinephrine secretion from PC12 cells is dependent on TRPM8 channel-mediated intracellular calcium elevation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;506:709-715.
26. Ong LK, Sominsky L, Dickson PW, Hodgson DM and Dunkley PR. The sustained phase of tyrosine hydroxylase activation in vivo. *Neurochem Res.* 2012;37:1938-43.
27. Ong LK, Page S, Briggs GD, Guan L, Dun MD, Verrills NM, Dunkley PR and Dickson PW. Peripheral Lipopolysaccharide Challenge Induces Long-Term Changes in Tyrosine Hydroxylase Regulation in the Adrenal Medulla. *J Cell Biochem.* 2017;118:2096-2107.
28. Ong LK, Guan L, Damanhuri H, Goodchild AK, Bobrovskaya L, Dickson PW and Dunkley PR. Neurobiological consequences of acute footshock stress: effects on tyrosine hydroxylase phosphorylation and activation in the rat brain and adrenal medulla. *J Neurochem.* 2014;128:547-60.
29. Guil MJ, Scholler MI, Cassinotti LR, Biancardi VC, Pitra S, Bianciotti LG, Stern JE and Vatta MS. Role of endothelin receptor type A on catecholamine regulation in the olfactory bulb of DOCA-salt hypertensive rats: Hemodynamic implications. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019;1865:165527.
30. Guil MJ, Soria C, Seijas M, Bianciotti LG and Vatta MS. Central endothelin ETB receptor activation reduces blood pressure and catecholaminergic activity in the olfactory bulb of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2020;885:173543.

The Role of PKG in Salt Sensitivity and the Excitatory Synapse through Activation in Sympathetic Nervous System

Taishi Nakamura, Nobuyuki Tokunaga

Department of Medical Information Science, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University

Summary

PKG1 α can be stimulated by oxidation at cysteine42 (C42), which leads to elicit vasorelaxation in resistance arteries. However, the significance of C42 oxidation in salt sensitivity remains unknown. We compared blood pressure changes to salt loading and fluid balance in mice harboring either wild-type (WT) PKG1 α or the C42S mutant that is redox insensitive PKG1 α . We found in non-reducing SDS-PAGE that disulfide dimer of PKG1 α via C42 can be observed in kidney subjected to salt loading. Despite equivalent fluid retention between genotypes, BP increase for sodium excretion was required in WT greater than C42S. Intriguingly, low/high frequency ratio in BP variability, a sympathetic indicator, was elevated in WT during dark period, whereas was suppressed in C42S. Sympathetic activation in WT compared to C42S was recapitulated in urinary norepinephrine (NE) and renal NE content. Renal denervation (RDN) suppressed those NE levels and improved a decreased slope of pressure-natriuresis relationship in WT, while the slope didn't change much in C42S. The suppression of NE spillover by RDN corroborates PKG1 α oxidation-related renal sympathetic activation gets involved in NE biogenesis. To assess the underlying mechanism, we checked neurotransmission between pre/post-synaptic neurons, using HEK293T or PC12 sympathetic neuron-like cells both transfected with either PKG1 α _{WT} or PKG1 α _{C42S}. NE induced comparable c-fos upregulation between genotypes in both cells, suggesting neither NE reactivity in post-synaptic neuron nor the negative feed-back to pre-synaptic neuron appeared the mechanism of PKG oxidation-mediated sympathetic activation. Importantly, the upstream neurotransmitter acetylcholine increased NE release especially in PC12 cells expressing PKG1 α _{WT}. C42 oxidation activated tyrosine hydroxylase, a rate-limiting enzyme in NE biogenesis, by phosphorylating at ser40 in PC12 cells and mouse kidney as well. We reveal that PKG1 α oxidation exacerbates salt sensitivity through sympathetic tone and propose that C42 redox sensor of is a useful therapeutic target for salt sensitive hypertension.