

助成番号 0636

プロスタシンを中心としたプロテアーゼカスケードの網羅的解析による 食塩感受性高血圧発症機序の解明

北村 健一郎, 富田 公夫

熊本大学大学院医学薬学研究部腎臓内科

概要 遺伝性食塩感受性高血圧症の一つである Liddle 症候群において腎臓皮質集合尿細管に存在する上皮型ナトリウムチャンネル (ENaC) の gain-of-function mutation が発見されたことなどから腎臓におけるナトリウム再吸収と高血圧症の強い因果関係が示唆されている。1997 年に Vallet らは A6 細胞からトリプシン様セリンプロテアーゼである Channel-activating protease (CAP-1) を単離し、*Xenopus Oocyte* 上に ENaC と共発現させると ENaC 活性が亢進することを報告した。私たちは CAP-1 の mammalian homologue のクローニングに着手し、セリンプロテアーゼのプロスタシンをラット腎臓 cDNA ライブラリーから単離した。プロスタシンは *Xenopus Oocyte* に ENaC と共発現させるとアミロライド感受性ナトリウム電流を 2~5 倍増加させ、アルドステロンは腎臓においてプロスタシンの発現を増強して ENaC を介したナトリウムの再吸収を増加させた。セリンプロテアーゼは R-A-A 系や凝固線溶系などにおいて重要な生理的意義を担っている。多くの場合、プロテアーゼの活性化にはプロセシングプロテアーゼの存在が必須で、またそのプロセシングプロテアーゼも他のプロセシングプロテアーゼにより活性化される。このようにプロテアーゼは一連のカスケードを形成して機能していることが知られている。したがって、プロスタシンも生体において一連のプロテアーゼカスケードの中に存在して機能を発揮している可能性が推測され、本研究ではプロスタシンのプロセシング機構およびそれに関与する因子の同定を試みた。

本研究では、まず合成セリンプロテアーゼ阻害剤がプロスタシンのプロセシングを抑制することを示し、プロスタシンのプロセシングにセリンプロテアーゼが関与していることを明らかにした。次に、組換え pro-プロスタシンを作製し、ラット腎臓膜分画およびマウス腎臓膜分画を用いて double-layer fluorescent zymography を施行したところ、プロスタシンの活性化因子として少なくとも四つのタンパク質が存在することが明らかとなった。

このようにプロスタシンもプロテアーゼカスケードを形成して機能する可能性が示唆され、今後これらのカスケード構成因子を詳細に検討し、カスケード全体としてプロスタシンが生体においてどのような生理学的機能を担っているかを解明する必要がある。

【研究目的】

自然発症高血圧ラットの腎臓を正常ラットに移植すると、正常ラットに高血圧が発症することや、ヒトの腎移植においてもドナーが高血圧症または高血圧素因を持ち合わせていた場合、レシピエントに高血圧を発症する頻度が高いことなどから高血圧症の成因而として腎臓の果たす役割は重要視されている。また、遺伝性食塩感受性高血圧症の一つである Liddle 症候群において腎臓皮質集合尿細管に存在する上皮型ナトリウムチャンネル (ENaC) の gain-of-function mutation が発見されたことから腎臓におけるナトリウム再吸収と高血圧症の強い因果関係が示唆されている。ENaC は腎臓、肺、大腸、汗腺、味蕾などの上皮細胞に存在し、ナトリウムの再吸収を担っている。ENaC

は α , β , γ の三つのサブユニットが 2α , 1β , 1γ の 4 量体を形成して一つのチャンネルを構成している。この ENaC はアルドステロンや抗利尿ホルモン、インスリンなどのホルモンにより調節を受け、腎臓でのナトリウム再吸収量の最終的な調節を行っている^[1-3]。1997 年に Vallet らはアフリカツメガエルの尿細管細胞 (A6 cell) からトリプシン様セリンプロテアーゼである Channel-activating protease (CAP-1) を単離し、*Xenopus Oocyte* 上に ENaC と CAP-1 を共発現させると ENaC の活性が亢進することを報告した^[4]。

私たちは CAP-1 の mammalian homologue のクローニングに着手し、これまでにセリンプロテアーゼのプロスタシンをラット腎臓 cDNA ライブラリーから単離した。このプロスタシンは *Xenopus Oocyte* に ENaC と共発現させるとアミロラ

イド感受性ナトリウム電流を2~5倍増加させ^[5]、ナトリウム代謝においてもっとも重要なホルモンの一つであるアルドステロンは腎臓においてプロスタシンの発現を増強してENaCを介したナトリウムの再吸収を増加させるという新しいナトリウム調節機構を証明した^[6]。さらにラットにおいてセリンプロテアーゼ阻害剤であるメシル酸ナファモスタットがプロスタシンを抑制し、尿中Na排泄量を増加させること^[7]、マウス皮質集合尿細管細胞においてTGF- β がプロスタシンの発現を転写レベルで抑制し、Na再吸収を阻害すること^[8]を明らかにした。これらの知見はプロスタシンがナトリウム代謝において生理学的に重要な役割を果たしていること、および食塩感受性高血圧症の発症因子の一つである可能性を強く示唆するものである。

セリンプロテアーゼはR-A-A系や凝固線溶系などにおいて重要な生理的意義を担っている。多くの場合、プロテアーゼの活性化にはプロセシングプロテアーゼの存在が必須で、またそのプロセシングプロテアーゼも他のプロセシングプロテアーゼにより活性化される。このようにプロテアーゼの活性化は一連のカスケードを形成して機能していることが知られている。したがって、プロスタシンも生体において一連のプロテアーゼカスケードの中に存在して生理学的機能を発揮している可能性が推測される。

本研究ではプロスタシンのプロセシング機構およびそれに関与する因子の同定を試みた。

【研究方法】

I. メシル酸カモスタットによるプロスタシンのプロセシング制御

1. マウス皮質集合尿細管細胞(M-1細胞)を無血清培地で24時間培養後、 10^{-6} Mのメシル酸ナファモスタットまたはvehicleを含む無血清培地でさらに培養し、24時間後に細胞膜タンパク質を抽出した。この膜タンパク質をSDS-PAGEにより泳動し、抗プロスタシン抗体を用いたウエスタンブロットを行った。

2. 同じタンパク質検体を用いて、プロスタシンの合成基質であるGln-Ala-Arg-MCAを含んだSDS-PAGEを行った。ゲルをTriton-X100で洗浄し、SDSをTriton-X100に置換し、さらにTriton-X100を超純水に置換した後にゲルを37°CのTris緩衝液(100 mM, pH 8.0)に浸し、2時間酵素反応させた。最後に、ゲルにUVを照射して酵素活性のあるバンドを同定した。(In-gel fluorescent zymography)

II. 活性型組換えプロスタシンおよび組換え pro-プロスタシンの作製

1. 活性型組換えプロスタシンの作製のために、ヒトプロスタシンのlight chainとheavy chainの間にenterokinase cleavage siteを挿入し、C末端の膜貫通部位をHis tagに置換したcDNAを作製した。このcDNAをカイコ発現用のベクターに挿入し、片倉工業株式会社に委託してカイコへの感染およびカイコ体液の回収を行った。

2. 組換え pro-プロスタシンの作製のために、ヒトプロスタシンのC末端の膜貫通部位をHis tagに置換したcDNAを作製した。このcDNAをカイコ発現用のベクターに挿入し、片倉工業株式会社に委託してカイコへの感染およびカイコ体液の回収を行った。

3. カイコ体液をTris緩衝液(25 mM, pH 7.5)で24時間透析し、0.22 μ Mフィルター濾過後にHis trapカラムにapplyした。0~250 mMのイミダゾールによるlinear gradientでカラムを溶出し、125 mM付近で溶出される分画を回収する。この分画をPEG濃縮後、再度Tris緩衝液(25 mM, pH 7.5)で24時間透析し、次にresource Qカラムにapplyした。0~500 mMのNaClによるlinear gradientでカラムを溶出し、250 mM付近で溶出されるsingle peakを回収した。この分画を銀染色ならびに抗プロスタシン抗体を用いたウエスタンブロットにより、single bandのプロスタシン分画であることを確認した。

4. 活性型組換えプロスタシンは、得られた組換えタンパク質をenterokinaseと37°Cで16時間反応させ、enterokinase removal kitを用いて反応液からenterokinaseを除去することにより作製した。

5. 1. ~4. のステップで作製した活性型組換えプロスタシンおよび組換え pro-プロスタシンの酵素活性をLys-His-Tyr-Arg-MCAを合成基質として用いて測定した。

III. Double-layer fluorescent zymography

1. ラットおよびマウス腎臓の膜分画を抽出物し、SDS-PAGEにより電気泳動した。その後SDSをTriton-X100に置換し、さらに超純水に置換することで完全に除去した。ゲルをIIで作製したpro-プロスタシン 10^{-6} Mを含むTris緩衝液(100 mM, pH 8.0)で反応させた。プロスタシン特異的合成基質であるLys-His-Tyr-Arg-MCAを浸透させたセルロースアセテート膜をゲルの上に重層し、37°Cで2時間反応させた後にゲル側からUVを照射して合成ペプチド基質と反

応するバンドを同定した。

【研究結果】

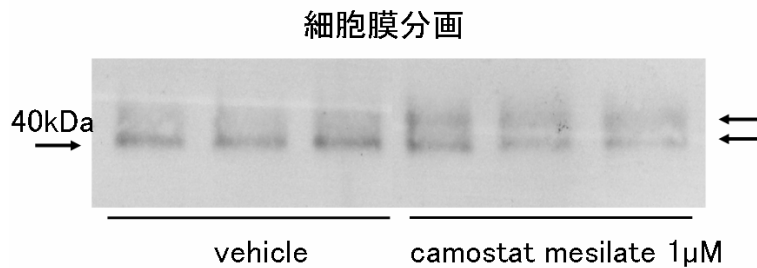
I. メシル酸カモスタットによるプロスタシンのプロセシング制御

M-1 細胞の細胞膜分画を抗プロスタシン抗体でウェスタンブロットをすると、図1に示すように約 40 kDa に強いバンドと約 42 kDa の弱いバンドを認める。40 kDa のバンドは活性型を、42 kDa のバンドは pro 体を反映していると考えられている。M-1 細胞に合成セリンプロテアーゼ阻害剤であるメシル酸カモスタットを作用させると図1に示すように、プロスタシンの pro 体が増えて活性型が減少していることが判明した。すなわち、何らかのセリンプロテアーゼがプロスタシンのプロセシングに関与していることが示唆され

る。

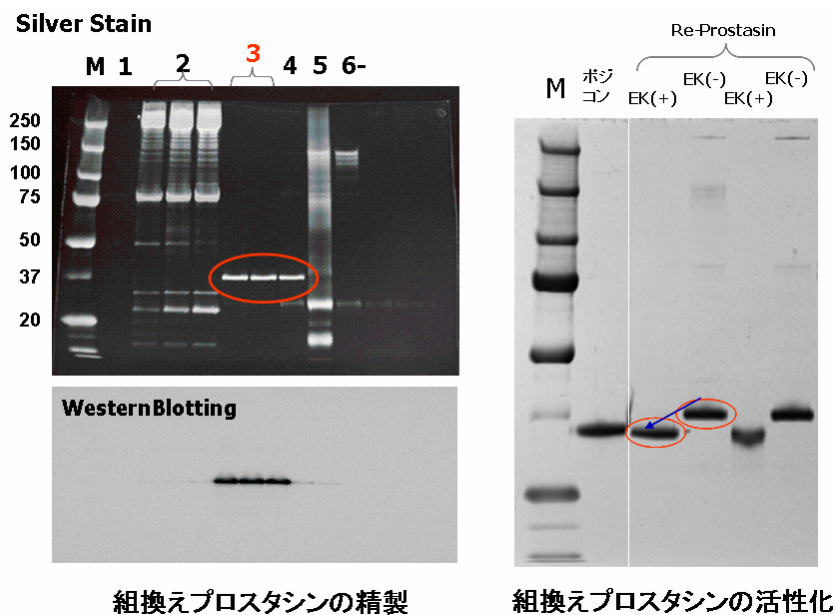
II. 活性型組換えプロスタシンおよび組換え pro-プロスタシンの作製

1. 次に活性型組換えプロスタシンならびに組換え pro-プロスタシンを方法のところでも述べたようにカイコを使用して生産し、2 段階カラムにて精製した。図2左パネルに示すように、プロスタシンは銀染色にて単一バンドとして表れ、そのバンドに一致して抗プロスタシン抗体が反応した。また、活性型組換えプロスタシンを得るために、方法のところでも記載したようにプロスタシンの light chain と heavy chain の間に挿入した cleavage site を enterokinase で切断することにより活性化した。図2左パネルに示すように enterokinase はプロスタシンを切断することにより分子量をシフトさせ、切断が十分に生じていることが証明された。



M-1細胞におけるprostasin発現へのセリンプロテアーゼ阻害剤の影響

図-1



組換えプロスタシンの精製

組換えプロスタシンの活性化

図-2

2. 活性型組換えプロスタシンおよび組換え pro-プロスタシンがプロテアーゼ活性を持つか否かを zymography により確認した。図3に示すように、プロスタシン特異的な合成基質である Lys-His-Tyr-Arg-MCA を用いた zymography では、enterokinase 処理された活性型組換えプロスタシンのみが酵素活性を呈し、enterokinase 処理しなかったものや組換え pro-プロスタシンは全く酵素活性を呈さなかった。

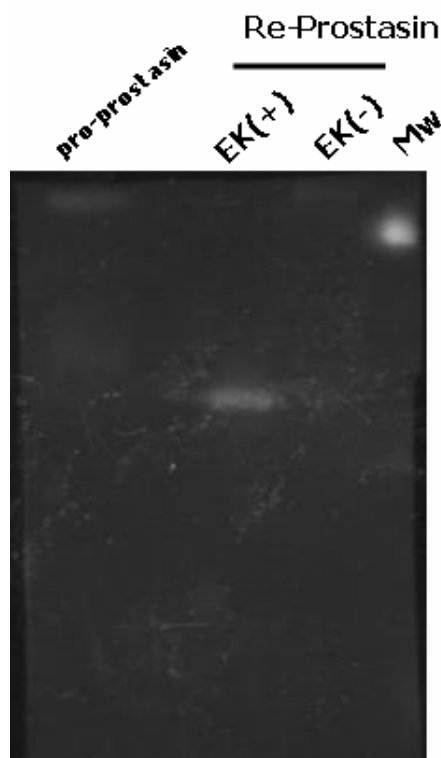


図-3

Ⅲ. Double-layer fluorescent zymography

1. プロスタシンのプロセシングエンザイムや活性化因子を同定するために double-layer fluorescent zymography を施行した。まず、ラット腎臓膜分画およびマウス腎臓膜分画を精製し、それぞれのサンプルについて zymography を行った。図4左パネルが示すように、ラットおよびマウス腎臓中に内因性のプロスタシンによる酵素活性を認められた。つづいて、上記Ⅱで作製した組換え pro-プロスタシンを用いた double-layer fluorescent zymography を施行し、図4右パネルに示したような結果が得られた。ラット腎臓膜分画を用いた double-layer fluorescent zymography では、内因性プロスタシンのサイズとは異なるバンドが四つ観察され、4種類のプロスタシンプロセシングエンザイムまたは活性化因子の存在が明らかになった。マウス腎臓膜分画

を用いた検討では、一つのバンドが明らかとなった。このバンドはラット腎臓においても同じサイズのものが認められていた。

以上の結果より、少なくとも四つの新しいプロスタシンプロセシングエンザイムの候補タンパク質が同定できた。今後、これらのタンパク質のアミノ酸解析を行い、タンパク質の構造決定を行うとともに機能解析や in vitro でのプロセシングの再構成実験等を行う予定である。

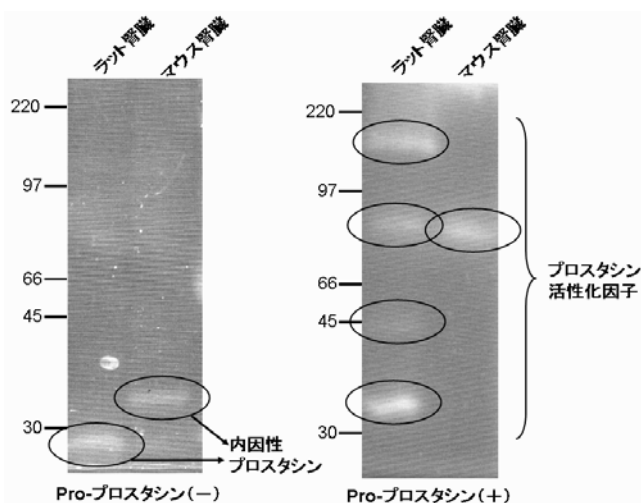


図-4

【考察】

生体においてセリンプロテアーゼは R-A-A 系や凝固線溶系、食物の消化系など多彩な機能を担っている。通常、これらのセリンプロテアーゼは pro 体として産生され、その活性化にはプロセシングプロテアーゼの存在が必須である。そのプロセシングプロテアーゼも多くの場合、pro 体として産生され、何らかのプロセシングプロテアーゼにより活性化される。このように、セリンプロテアーゼをはじめとしたプロテアーゼは一連のタンパク分解による活性化カスケードを形成し、生体の生理学的機能を発揮すると考えられている。

これまでに私たちはセリンプロテアーゼのプロスタシンが ENaC を活性化することを報告してきたが、このプロスタシンの作用も一連のプロテアーゼカスケードの中に位置付けられる可能性が高く、プロスタシンを中心としたプロテアーゼカスケードを明らかにし、そのカスケードがどのような生理的機能に向けて協調的な相互作用をおこなっているかを理化学することがプロスタシンの生体での機能を解明する上で重要であると考えている。

今回の私たちの検討により、まずプロスタシンがセリンプロテアーゼによりプロセッシングを受けて活性化される可能性が明らかになった。また、カイク体液で産生させた組換えプロスタシンはカイク内因性のプロテアーゼによる活性化を受けずに pro 体として産生され、プロセッシングエンザイム同定のために非常に有力なツールになることが判明した。さらに、この組換え pro-プロスタシンを用いて、ラットおよびマウス腎臓膜分画を材料にプロスタシンのプロセッシングエンザイムが少なくとも四つ以上存在することが明らかとなった。

このようにプロスタシンもプロテアーゼカスケードを形成して機能する可能性が示唆されたので、今後これらのカスケード構成因子を詳細に検討し、カスケード全体としてプロスタシンが生体においてどのような生理学的機能を担っているかを解明する必要がある。

【今後の課題】

今回の研究により、プロスタシンを中心としたプロテアーゼカスケードの上流のプロセッシングエンザイム候補として四つのタンパク質が同定できた。今後は、これらのタンパク質のアミノ酸解析を行い、構造決定を行うと共にプロスタシンとの相互作用の検証やそれらのタンパク質の生体での意義の検討を行っていく必要がある。また、これらのタンパク質の機能を解析しつつ、新規降圧利尿薬の創薬ターゲットとしての target validation を行っていく必要がある。

【文献】Reference List

1. Canessa CM, Schild L, Buell G *et al.*: Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367: 463-467, 1994
2. Canessa CM, Horisberger JD, Rossier BC: Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature* 361: 467-470, 1993
3. Garty H, Palmer LG: Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev* 77: 359-396, 1997
4. Vallet V, Chraïbi A, Gaeggeler HP *et al.*: An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature* 389: 607-610, 1997
5. Adachi M, Kitamura K, Miyoshi T *et al.*: Activation of epithelial sodium channels by prostaticin in *Xenopus* oocytes. *J Am Soc Nephrol* 12: 1114-1121, 2001
6. Narikiyo T, Kitamura K, Adachi M *et al.*: Regulation of prostaticin by aldosterone in the kidney. *J Clin Invest* 109: 401-408, 2002
7. Iwashita K, Kitamura K, Narikiyo T *et al.*: Inhibition of prostaticin secretion by serine protease inhibitors in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 14: 11-16, 2003
8. Tuyen DG, Kitamura K, Adachi M *et al.*: Inhibition of prostaticin expression by TGF- β 1 in renal epithelial cells. *Kidney International* 67: 193-200, 2005
9. Chen LM, Zhang X, Chai KX: Regulation of prostaticin expression and function in the prostate. *Prostate* 59:1-12, 2004

No. 0636

Comprehensive Analysis of Protease Cascade Involving Prostasin in Salt-Sensitive Hypertension

Kenichiro Kitamura and Kimio Tomita

Department of Nephrology,
Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences

Summary

Identification of gain-of-function mutation in epithelial sodium channel (ENaC) in Liddle's syndrome patients, a hereditary form of salt-sensitive hypertension, indicates the importance of the sodium reabsorption through the kidney in the pathogenesis of salt-sensitive hypertension. In 1997, Vallet et al isolated a channel-activating protease (CAP-1), a trypsin-like serine protease, from A6 cell line and demonstrated that co-expression of CAP-1 and ENaC in *Xenopus* oocytes increased ENaC activity. We isolated a serine protease prostasin, a mammalian CAP-1 homologue, from rat kidney cDNA library and demonstrated that co-expression of prostasin and ENaC increased the amiloride-sensitive sodium current in *Xenopus* oocytes. We also found that aldosterone increases sodium reabsorption through ENaC by increasing the expression of prostasin.

Serine proteases play important roles in human body such as R-A-A system, blood coagulation system, and digestive system. In most cases, the activation of proteases requires proteolytic processing by upstream proteases and the upstream proteases also need to be cleaved by further upstream proteases. Thus, proteases form "a proteolytic cascade" to execute their physiological function. Therefore, we hypothesized that prostasin is involved in a certain proteolytic cascade and in the current studies we tried to identify possible candidates for the processing enzymes for prostasin.

First, we showed that camostat mesilate, a synthetic serine protease inhibitor, inhibited the proteolytic activation prostasin, suggesting that a certain serine protease(s) is/are involved in the activation of prostasin. Then, we performed double-layer fluorescent zymography by using recombinant pro-prostasin and membrane fractions from rat and mouse kidney. We found at least four different candidates for prostasin processing enzymes and we are now in the middle of identifying the amino acid sequences of these proteins.