

## 熊本大学学術リポジトリ

### Kumamoto University Repository System

Title	プロスタシンを中心としたNa再吸収、血圧調節の分子基盤の解明
Author(s)	脇田, 直樹
Citation	
Issue date	2008-03-25
Type	Thesis or Dissertation
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2298/11101">http://hdl.handle.net/2298/11101</a>
Right	

# 学位論文 Doctor's Thesis

プロスタシンを中心としたNa再吸収、血圧調節の分子基盤の解明  
The molecular basis of Na reabsorption and blood pressure control by serine protease prostaticin

脇田 直樹  
Naoki Wakida

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻腎臓内科学

指導教員

富田 公夫 教授  
熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻腎臓内科学

2008年3月

# 学 位 論 文

## Doctor's Thesis

論文題名 : プロスタシンを中心とした Na 再吸収、血圧調節の分子基盤の解明  
(The molecular basis of Na reabsorption and blood pressure control by serine protease prostaticin)

著 者 名 : 脇田 直樹  
Naoki Wakida

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻腎臓内科学教授  
富田 公夫

審査委員名 :	生体機能薬理学担当教授	光山 勝慶
	機能病理学担当教授	伊藤 隆明
	細胞情報薬理学担当教授	中西 宏之
	微生物学担当教授	赤池 孝章

2008年3月

## 目次

I 要旨	1
II 学位論文の骨格となる参考論文	3
III 謝辞	5
IV 略語一覧	6
V 研究の背景と目的	8
VI 実験方法	13
1. マウス PN-1、ENaC $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットのクローニング	
2. ENaC、プロスタシン、PN-1 を発現させた oocyte における電気生理実験	
3. M-1 細胞の培養	
4. siRNA を用いた PN-1、プロスタシンのノックダウン	
5. 上皮間抵抗測定装置 (EVOM) による $I_{eq}$ (Na 電流) の測定	
6. PN-1 の抗体の作成	
7. Real time PCR による ENaC $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニット、PN-1、 プロスタシンの mRNA の発現量の定量	
8. 蛋白質の抽出と TCA precipitation	
9. イムノブロッティング	
10. 免疫組織化学	
11. 活性型組換えヒトプロスタシンの作成	
12. プロスタシンの活性測定	
VII 実験結果	
第一章 プロスタシンと Protease nexin-1(PN-1)との 相互作用による ENaC の活性調節	24
第二章 NO による Na 利尿作用におけるプロスタシンの役割	43
VIII 考察	71
IX 結語	76
X 参考文献	77

## I 要旨

上皮型 Na チャネル (ENaC) は糸球体で濾過された Na の最終的な排泄量を調節する重要なチャネルである。プロスタシンは ENaC を活性化する重要な調節因子である。これまでの研究によりプロスタシンが生体において高血圧、Na 代謝に関与している可能性が示唆されている。プロスタシンを中心とした Na 再吸収、血圧調節の分子基盤が解明されれば新規作用機序による降圧薬や利尿薬の開発につながる可能性がある。そこでプロスタシンの内因性阻害物質として報告された protease nexin-1 (PN-1) とプロスタシンとの相互作用による ENaC 活性の調節について検討を行った。さらに NO による Na 利尿作用におけるプロスタシンの役割についても検討を行った。

マウス PN-1、ENaC  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  サブユニットをクローニングし、アフリカツメガエルの卵母細胞 (*Xenopus oocyte*) にプロスタシン、PN-1、ENaC を発現させ、2 電極電位固定法によりアミロライド感受性の Na 電流を測定した結果、PN-1 はプロスタシンによる ENaC の活性化を抑制した。さらに PN-1 をノックダウンすることにより ENaC 活性は上昇が確認された。Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) は PN-1 の発現量を増加させ、ENaC の各サブユニットの発現量を減少させた。一方アルドステロンは PN-1 の発現量を減少させ、ENaC の各サブユニットの発現量を増加させた。

EVOM を使用して Na 電流を測定した結果、NO は ENaC 活性を抑制した。合成基質 (QAR-MCA) を用いて NO のプロスタシンの活性に与える影響を検討したが、NO はプロスタシンの酵素活性そのもには影響を与えなかった。一方、NO はプロスタシンの発現を濃度依存的に抑制していた。M-1 細胞においてプロスタシンをノックダウンすると ENaC 活性は約 50% 減少した。NO によるプロスタシンの発現抑制効果はグアニル酸シクラーゼ阻害薬や cGMP アナログの投与に

よって影響を受けなかった。一方、NF- $\kappa$ B 阻害薬は NO と同様にプロスタシンの発現を減少させ、ENaC 活性も抑制した。イムノブロットティングや免疫組織化学の結果、NO は NF- $\kappa$ B の核移行を抑制し、I- $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化を抑制していた。

PN-1 はプロスタシンと相互作用することによって ENaC 活性を調節する可能性が示唆された。また、TGF- $\beta$ 1 やアルドステロンは PN-1、プロスタシン、ENaC の発現を協調的に制御し、それぞれ Na 利尿や Na 再吸収を促進することが推測された。また、NO による Na 利尿作用にはプロスタシンの発現抑制が関与し、その機序はグアニル酸シクラーゼ-cGMP 系非依存性で、I- $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化阻害による NF- $\kappa$ B の核移行阻害を介していることが明らかとなった。

PN-1 はプロスタシンと相互作用して ENaC 活性を調節する新たな因子である。さらにプロスタシンの発現は転写因子である NF- $\kappa$ B によって制御される可能性が示された。プロスタシン-ENaC を中心とした Na 再吸収機構において新たに PN-1 や NF- $\kappa$ B の因子の関与が明らかとなった。Na 代謝異常や高血圧の治療薬の開発において PN-1 や NF- $\kappa$ B はプロスタシン以外の新しいターゲットとして注目される。

## Ⅱ 学位論文の骨格となる参考論文

### ① 関連文献

1. **Wakida N**, Kitamura K, Tuyen DG, Maekawa A, Miyoshi T, Adachi M, Shiraishi N, Ko T, Ha V, Nonoguchi H, Tomita K  
Inhibition of prostasin-induced ENaC activities by protease nexin-1(PN-1) and regulation of PN-1 expression by TGF- $\beta$ 1 and aldosterone  
*Kidney Int.* **70**:1432-1438, 2006
2. **Wakida N**, Kitamura K, Ko T, Maekawa A, Kakizoe Y, Memetimin H, Adachi M, Miyoshi T, Shiraishi N, Tomita K  
Role of prostasin in nitric oxide-mediated natriuresis in the kidney  
*J Am Soc Nephrol.* in submit

### ② その他の文献リスト

1. **Wakida N**, Tuyen DG, Adachi M, Miyoshi T, Nonoguchi H, Oka T, Ueda O, Tazawa M, Kurihara S, Yoneta Y, Shimada H, Oda T, Kikuchi Y, Matsuo H, Hosoyamada M, Endou H, Otagiri M, Tomita K, Kitamura K.  
Mutations in hURAT1 gene in pre-secretory reabsorption defect type of familial renal hypouricemia.  
*J Clin Endocrinol Metab.*, **90**: 2169-74., 2005
2. Tuyen do G, Kitamura K, Adachi M, Miyoshi T, **Wakida N**, Nagano J, Nonoguchi H, Tomita K.  
Inhibition of prostasin expression by TGF- $\beta$ 1 in renal epithelial cells  
*Kidney Int.* **67**: 193-200, 2005.
3. Furuhashi M, Kitamura K, Adachi M, Miyoshi T, **Wakida N**, Ura N, Shikano Y, Shinshi Y, Sakamoto K, Hayashi M, Satoh N, Nishitani T, Tomita K, Shimamoto K.  
Liddle's Syndrome Caused by a Novel Mutation in the Proline-Rich PY Motif of the Epithelial Sodium Channel  $\beta$ -Subunit.  
*J Clin Endocrinol Metab.* **90**: 340-344, 2005.
4. Tanaka M, Itoh K, Matsushita K, Matsushita K, **Wakita N**, Adachi M, Nonoguchi H, Kitamura K, Hosoyamada M, Endou H, Tomita K  
Two male siblings with hereditary renal hypouricemia and exercise-induced ARF

*Am J Kidney Dis.* **42**: 1287-1292



### Ⅲ謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導、御支援頂きました当研究室の富田公夫教授、北村健一郎博士、ならびに腎臓内科学講座の皆様に厚くご御礼申し上げます。また、M-1細胞をご提供頂きました L. Lee Hamm 博士、マウスリコンビナント PN-1 をご提供頂きました Karl X. Chai 博士に感謝いたします。

#### IV略語一覧

ENaC	epithelial sodium channel
GPI	glycosylphosphatidylinositol
NO	nitric oxide
PN-1	protease nexin-1
M-1	mouse cortical collecting duct
PCR	polymerase chain reaction
HEPES	2[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
FBS	fetal bovine serum
siRNA	short interfering RNA
TCA	trichloroacetic acid
NF- $\kappa$ B	nuclear factor- $\kappa$ B
I- $\kappa$ B $\alpha$	inhibitor- $\kappa$ B $\alpha$
p-I- $\kappa$ B $\alpha$	phosphorylated inhibitor- $\kappa$ B $\alpha$
IKK $\beta$	Inhibitor- $\kappa$ B kinase
CAPE	cafferic acid phenethyl ester
PBS	phosphate buffered saline
PMSF	phenylmethysulfonyl fluoride
BSA	bovine serum albumin
SDS	sodium dodecyl sulfate
TGF- $\beta$ 1	transforming growth factor- $\beta$ 1
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinases
nNOS	neuroral nitric oxide synthease

eNOS	endothelial nitric oxide synthase
MCA	4-methylcoumaryl-7-amide
NAC	N-Acetyl cystein
IKK $\beta$	Inhibitor- $\kappa$ B kinase
Sgk	serum and glucocorticoid-inducible kinase
GILZ	glucocorticoid-induced leucine zipper protein
LPS	lipopolysaccharide

## V 研究の背景と目的

腎臓は生体の Na 調節において大切な役割を果たしている。腎臓での Na 再吸収には①近位尿細管における各物質との共輸送系、②ヘンレの太い上行脚における Na/K/2Cl 共輸送系、③遠位尿細管における Na/Cl 共輸送系、④集合尿細管における Na チャネルなどがある (figure 1)。これらの輸送系のなかで高血圧との関連が示唆されているのは集合尿細管における Na チャネルであり、この Na チャネルは上皮型 Na チャネル (以下 ENaC) と呼ばれ糸球体でろ過された Na の最終的な再吸収量を調節するチャネルである。

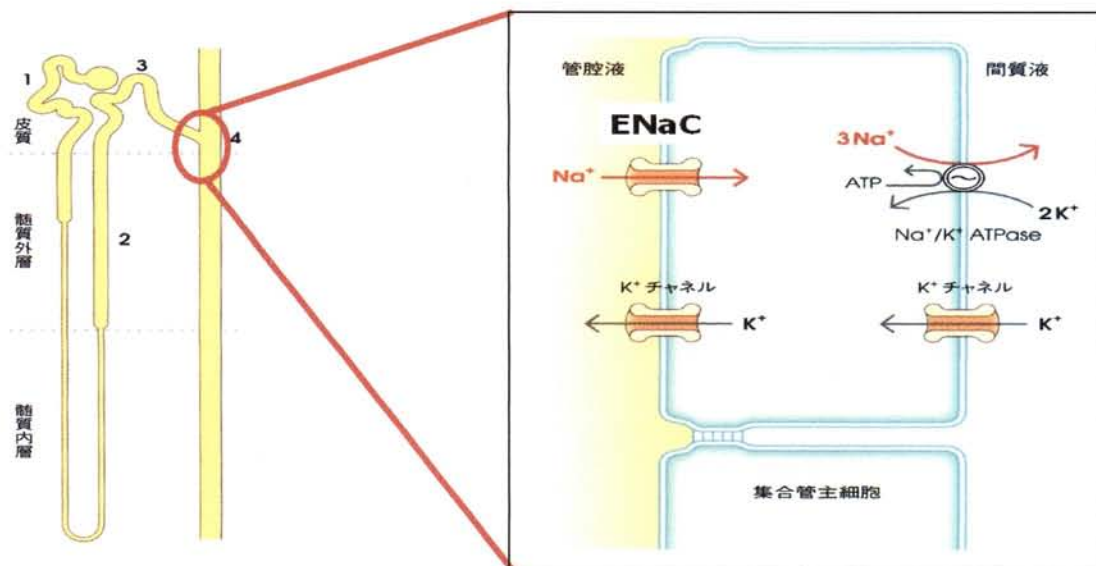


Figure 1

腎臓における Na 再吸収の模式図および集合尿細管の拡大図

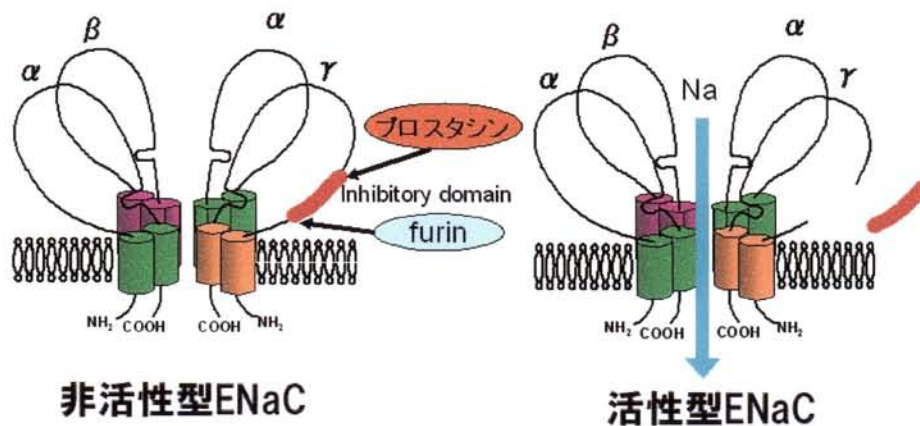
- 1 : 近位尿細管における各物質との共輸送系
- 2 : ヘンレの太い上行脚における Na/K/2Cl 共輸送系
- 3 : 遠位尿細管における Na/Cl 共輸送系
- 4 : 集合尿細管における Na チャネル

ENaC は 1993 年および 1994 年に Canessa らによってラット大腸 cDNA ライブラリーよりクローニングされ、腎臓皮質集合尿細管、下行結腸、外分泌腺、気道での Na 再吸収を制御している重要なイオンチャネルである(1-3)。腎皮質集合尿細管において、尿細管腔側の Na は ENaC を介して細胞内に輸送され、その後 Na-K-ATPase によって血管側に汲み出される。この経上皮 Na 輸送の律速段階は ENaC による管腔側からの Na 再吸収のステップであるため、ENaC の活性がそのままこの部位での Na 再吸収量を決定し、血圧をコントロールしている。ENaC は相同性のある  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の 3 つのサブユニットから構成され、各サブユニットは約 640~700 のアミノ酸残基からなる細胞外に大きなループを持つ 2 回膜貫通型の蛋白質であり、N 末端と C 末端領域は細胞内に存在している。現在、ENaC の  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  サブユニットは 2 : 1 : 1 の構成比で 4 量体を形成して機能していると考えられている。ENaC は  $\alpha$  サブユニット単独でも弱いチャネル機能を示すが、 $\beta$ 、 $\gamma$  サブユニットとともに多量体を形成するとそのチャネル機能は著しく増加する。このことより  $\beta$ 、 $\gamma$  サブユニットは調節的な役割をもっていると考えられている。このチャネルは低濃度のアミロライドにより抑制され ( $K_i < 0.5 \mu\text{M}$ )、Na に対し高選択性をもち ( $P_{\text{Na}}/P_{\text{K}} > 10$ )、チャネルコンダクタンスは小さく (4~5 pS)、ゆっくりとした開閉機構 (平均開口時間 2~5 秒) を持ち、半減期が約 1 時間と短い。遺伝性食塩感受性高血圧症の 1 つである Liddle 症候群において腎皮質集合管に存在する ENaC の活性変異体が発見されたことから腎臓における Na 再吸収と高血圧症との間に強い因果関係が存在することが示唆される(4-6)。

プロスタシンは 1994 年に Julie Chao のグループがヒト精液より精製した分子量 40 kDa のセリンプロテアーゼである(7)。プロスタシンは pI 4.5~4.8 で、トリプシン様の酵素活性をもち、合成基質をもちいた検討ではアルギニン残基の C 末端を選択的に切断することが判明している。酵素活性の至適 pH は 9.0 付近で、

アプロチニン、ベンザミジン、アンチパイン、ロイペプシンなどにより活性は阻害される。組織分布は前立腺、腎臓、大腸、肺、胃、皮膚、脾臓、肝臓、唾液腺、卵巣などに発現が認められる(8)。1995 年にヒト プロスタシンの cDNA がクローニングされ、light chain および heavy chain から構成される GPI-anchored protein であることが判明した(8;9)。また、ヒトではプロスタシン遺伝子は第 16 番染色体に (16p11.2) マップされる(10)。

プロスタシンは ENaC が発現する集合尿細管に強い発現を認め、さらに近位尿細管にも強い発現を認めている。私たちの研究グループはアフリカツメガエル卵母細胞にプロスタシンと ENaC を共発現させたところアミロライド感受性ナトリウム電流が約 2~3 倍に増加することを報告した(11)。そしてこの活性化の現象はセリンプロテアーゼ阻害剤であるアプロチンを前投与することで完全に抑制された。このことはプロスタシンのセリンプロテアーゼとしての作用が ENaC の活性化に関与していることを示唆するものである。ENaC 活性化のメカニズムとして私たちの共同研究者である Kleyman らはプロスタシンが ENaC $\gamma$  サブユニットの細胞外ループの 186 番目を切断し、さらに furin が ENaC $\gamma$  サブユニットの細胞外ループの 143 番目を切断することによって 43 アミノ酸から構成されるインヒビトリードメインを切り出し、開口確率を増加させると報告している (figure 2) (12)。



**Figure 2**

***Activation of ENaC by prostaticin and furin***

アデノウイルスを用いてヒトプロスタシンをラットに過剰発現させると高血圧が発症し、さらには血漿アルドステロン濃度が上昇することが報告されている(13)。これらの知見はプロスタシンが食塩感受性高血圧症の発症に強く関与していること、さらにはプロスタシンがアルドステロンの分泌調節においてポジティブフィードバック作用を有することを示唆するものである。これまでの研究によりプロスタシンが生体において高血圧、Na 代謝に関与していることが想定されるため、血圧調節系ホルモンの重要な柱であるレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系のカスケードがプロスタシンを中心として存在する可能性は高い。プロスタシンはプロスタシン・アルドステロン系といった新たな経路を介して、アルドステロンと相乗的に高血圧発症に関与している可能性がある。従って生体内でプロスタシンの活性を抑制することが可能となれば、食塩感受性高血圧の治療戦略の一つとなり、新規作用機序による降圧薬や利尿薬の開発につながる可能性が示唆される。

このような背景のもと、私たちはプロスタシンを中心とした Na の再吸収、血圧調整の分子基盤を解明するために研究を行ってきた。第一章ではプロスタシンの内因性阻害物質である PN-1 とプロスタシンとの相互作用による ENaC の活性調節について、第二章では Nitric Oxide（以下 NO）による Na 利尿作用におけるプロスタシンの役割および NO によるプロスタシンの発現抑制メカニズムについて論述する。



## VI実験方法

### 1. マウス PN-1、ENaC $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットのクローニング

4 週齢のマウスの腎臓から TRIzol を用いて total RNA を抽出した。SuperScript III ファーストストランドシステムを使用して、抽出した 1  $\mu$ g の total RNA から first-strand cDNA を合成した。EX Taq<sup>TM</sup> hot start version (TaKaRa) と Table 1 の primer を使用して PCR を行った。PCR の条件は以下に示す。

98°C	10min	——	× 1
98°C	30sec	}	× 35
64°C	30sec		
72°C	5min		
72°C	10min	——	× 1
4°C	$\infty$	——	× 1

それぞれの PCR 産物は 0.8%アガロースゲルで分離し、pcDNA 3.1(+)にサブクローンした。その後 automatic sequencer (ABI model 310 ; Applied Biosystems Inc.)で塩基配列を同定し、マウス PN-1、ENaC $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットの cDNA を得た。

$\alpha$ ENaC	sense	CCTGTCGACGTCGACCGGACGGCCCCATTCTGCCTCC
	anti-sense	GAGGCGGCCGCGCGGCCGCGATGGAACAAGCATTATTGAGTATCTGCC
$\beta$ ENaC	sense	CCTGTCGACGTCGACCTCACACTGGAGCAGCTTCC
	anti-sense	GAGGCGGCCGCGCGGCCGCCTAACAAAGCACGTGTTCCCC
$\gamma$ ENaC	sense	CCTGTCGACGTCGACTGTACACACGCCAGCCGTGACCC
	anti-sense	GAGGCGGCCGCGCGGCCGCCGATTATCAATAAACTTTATTTATAAACAC
PN-1	sense	CCTGAATTCGAATTCGAGTGCAGTGGTTGCACGGGAGTGC
	anti-sense	GAGGTCGACGTCGACATGCCAATCCAAAGAGTACAGACC

Table 1

マウス PN-1、ENaC $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットのクローニングに使用した primer

## 2. ENaC、プロスタシン、PN-1 を発現させた oocyte における電気生理実験

### 1) ENaC、プロスタシン、PN-1 の cRNA の作成

pcDNA 3.1(+)にサブクローンされているマウス ENaC $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニット、マウスプロスタシンおよびマウス PN-1 を制限酵素 Not I で切断した後、mMESSAGE mMACHINE kit (Ambion) を使用して cRNA を合成した。Poly (A)<sup>+</sup> Tailing kit (Ambion)を使用して cRNA の C 末端に Poly (A)<sup>+</sup>を付加し、MEGAclear Purification kit (Ambion)を使用して cRNA を精製した。

### 2) アフリカツメガエル卵母細胞の調整

アフリカツメガエルの雌を 30 分間氷につけて麻酔した後、腹部に 3 mm の切開を加え、卵を取り出し、MBS で洗った後に 1  $\mu$ g/mL の collagenase type I で 1 時間処理を行った。顕微鏡下にステージ V~VI の oocyte を採取し、ピンセットで follicular layer を剥離した。

### 3) oocyte への cRNA の注入

ENaC  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットの cRNA を 0.5ng、プロスタシンの cRNA を 1ng、PN-1 の cRNA を 5 ng ずつ oocyte にマイクロインジェクターを使用して注入した。対照として 50 nL の ddH<sub>2</sub>O を用いた。

### 4) 電流の測定

Oocyte への ENaC、プロスタシン、PN-1 の cRNA 注入 16~24 時間後にアミロライド感受性 Na 電流を 2 電極電位固定法にて測定した。電流は CEZ-1250 voltage clamp apparatus (Nihon Kohden)を使用し、室温で測定した。ホールディングポテンシャルは-100 mV とし、oocyte を 96mM グルコン酸 Na、2 mMグルコン酸 K、1.8mM CaCl<sub>2</sub>、10mM HEPES pH7.2、5mM BaCl<sub>2</sub>、10mM テトラエチルアンモニウムクロライドを含んだ溶液で灌流した。アミロライド感受性 Na 電流は 5  $\mu$ M のアミロライドを灌流液に加える前後の電流の差として測定した。電流のシグナルは CEZ-1250 の内部フィルターを使用し、1 kHz のフィルターをかけた。

## 3. M-1 細胞の培養

M-1 細胞は L. Lee Hamm (Tulane University)博士より提供していただいた。Ham's F-12 (Invitrogen)と low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen)を等量ずつ混ぜた培地に、2 mmol/L L-glutamine, 50 U/mL penicillin, 50 mg/mL streptomycin, 5 % fetal bovine serum (FBS), growth promoting factors (6.25 mg/mL of transferrin, insulin, and sodium selenite), and 100 nmol/L dexamethasone を添加し、M-1 細胞の培養液とした。M-1 細胞は上記の培地を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub>のもと

で培養した。各実験は細胞が 80~90%コンフルエントになった後に FBS と全てのサプリメントを除いた培地 (all free medium) で 24 時間培養することによって FBS やサプリメントを除いた後に行った。本研究では 14~20 の passage の M-1 細胞を用いた。

#### 4. siRNA を用いた PN-1、プロスタシンのノックダウン

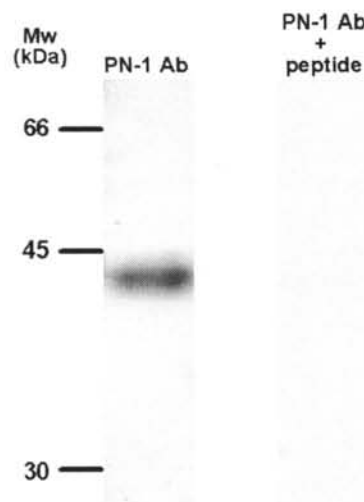
PN-1 またはプロスタシンの siRNA を Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を使用して M-1 細胞にトランスフェクションした。比較対照群にはコントロール siRNA をトランスフェクションした。トランスフェクション 24 時間後に無血清培地に換え、48 時間後に各々の実験に用いた。また、ノックダウン効率は real time PCR およびイムノブロットングにて確認した。

#### 5. 上皮間抵抗測定装置 (EVOM) による $I_{eq}$ (Na 電流) の測定

M-1 細胞を 12well のトランズウェルで培養し、抵抗 ( $R_{te}$ ) が  $500\Omega$  を越えたら、無血清培地に交換し、24 時間培養した。EVOM (World Precision Instruments) を使用して、上皮間の電圧 ( $V_{te}$ ) と抵抗 ( $R_{te}$ ) を測定することにより  $I_{eq}$  (Na 電流) を算出した。( $I_{eq} = V_{te} / R_{te}$ )

## 6. PN-1 の抗体の作成

PN-1 の抗体を作成するために PN-1 に特異的なペプチド (NH<sub>2</sub>-CAKIEVSEDGTKASA-COOH) を作成し、そのペプチドをウサギに免疫してポリクローナル抗体を作成した。Figure 3 に示すようにこの抗体は約 43kDa の組換えマウス PN-1 を認識した (左側)。さらに PN-1 の抗体と免疫に用いたペプチドをプレインキュベートすると組換え PN-1 は認識されなかった (右側)。



*Naoki Wakida, et al., Kidney Int., 2006(70)*

**Figure 3**

### *The peptide absorption test for anti-PN-1 antibody*

Recombinant mouse PN-1 was probed with anti-PN-1 antibody (left panel) or anti-PN-1 antibody preincubated with the immunizing peptide for 16 h (right panel).

## 7. Real time PCR による ENaC $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニット、PN-1、プロスタシンの mRNA の発現量の定量

### 1) Total RNA の回収

各実験において、10cm dish に培養した M-1 細胞から RNeasy kit (QIAGEN) を使用して total RNA を抽出した。

### 2) Real time PCR

M-1 細胞から抽出した 5  $\mu$ g の total RNA を SuperScript III ファーストストランド システムを使用して逆転写を行った。ENaC $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  サブユニット、PN-1、プロスタシン、GAPDH の TaqMan プローブは Applied Biosystems 社から購入した。Real time PCR は ABI PRISM 7900 Sequence Detector System (Applied Biosystems) を使用した。Real time PCR によって得られた各々の Ct 値を GAPDH の Ct 値で補正した ( $Ct_{\text{gene of interest}} - Ct_{\text{GAPDH}}$ )。各サンプルの発現量の変化は GAPDH で補正した  $\Delta Ct$  との差 ( $Ct_{\text{sample}} - Ct_{\text{calibrator}}$ ) より算出した ( $\Delta\Delta Ct$  法)。

## 8. 蛋白質の抽出と TCA precipitation

各実験条件下で M-1 細胞を培養した後、培養液 (10 mL / 10 cm dish) を回収し、1200 $\times$ g で遠心して cell debris を除いた。培養液中の蛋白質は trichloroacetic acid (TCA) (final concentration : 15 %) で沈殿させた後、12000 $\times$ g で遠心し、ice-cold 80 % acetone で 3 回 wash した。沈殿を 1 $\times$ TCA buffer (200 mM unbuffered Tris, 1% SDS, 10% glycerol, 1%  $\beta$ -mercaptoethanol) に溶解し、100 $^{\circ}$ C、5 分間の処理を加えて

サンプルとした。M-1 細胞の細胞膜分画は以下のように採取した。M-1 細胞を phosphate-buffered saline (PBS) で 2 回洗浄したあと、lysis buffer (25mM Tris-HCl pH 7.5, 4  $\mu$ g/mL aprotinin, 4  $\mu$ g/mL leupeptin, 1mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 4  $\mu$ g/mL pepstatin A) を加え、glass Dounce homogenizer で粉砕した。そのホモジネートを 800 $\times$ g の遠心で核を除いたあと、さらに 12000 $\times$ g で遠心し、細胞膜分画を分離した。細胞膜分画は RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % SDS, 0.5% deoxycholate, 1 % (V/V) Triton-X 100, 2 mM EDTA, 4  $\mu$ g/ml aprotinin, 4  $\mu$ g/ml leupeptin, 1 mM PMSF, and 4  $\mu$ g/ml pepstatin A) に溶解した。これらの操作は全て 4℃ 下で行った。核蛋白は Qproteome Cell Compartment Kit (QIAGEN) を使用して、プロトコールを参照しながら抽出した。

## 9. イムノブロッティング

蛋白質は 12% SDS-polyacrylamide gel で分離し、ニトロセルロースメンブレンにトランスファーした。5g/mL の skim milk で 4℃、16 時間ブロッキングした後、Can get signal solution I (TOYOBO) 溶液中で 1 次抗体 (PN-1 : 作成したポリクローナル抗体、プロスタシン : monoclonal antibody prostasin (BD Bioscience)、NF- $\kappa$ B : NF- $\kappa$ B p65 (Santa Cruz Biotechnology)、p-I- $\kappa$ B $\alpha$  : monoclonal antibody against p-I- $\kappa$ B $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology) ) を 1 時間反応させた。続いて、Can get signal solution II (TOYOBO) 溶液中で 2 次抗体を反応させた。その後、Chemiluminescence substrate (ECL; Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) で発光させ、x-ray film に感光させた。バンドはデンスITメトリ (Densitograph 4.0; ATTO) で解析した。

## 10. 免疫組織化学

一辺が 24 mm のカバーガラス上に M-1 細胞を培養する。コンフルエント率が約 70% になったら、培地を無血清培地に交換し、24 時間培養した。その後 NOC18 もしくは CAPE を投与し、さらに 24 時間培養した。24 時間後に培地を取り除き、PBS で 2 回洗浄後、4 % パラホルムアルデヒドで 30 分間固定した。固定後 PBS で 2 回洗浄し、1 % の BSA を含んだ 10 % ヒツジ血清で 2 時間ブロッキングした。10 % ヒツジ血清を取り除き、Can get signal solution I 溶液中で 1 次抗体 (NF- $\kappa$ B p65) を 4℃ で 16 時間反応させた。1 次抗体を取り除き、PBS で 2 回洗浄後、Can get signal solution II 溶液中で 2 次抗体を 2 時間反応させた。2 次抗体を取り除き、PBS で 2 回洗浄後、封入した。

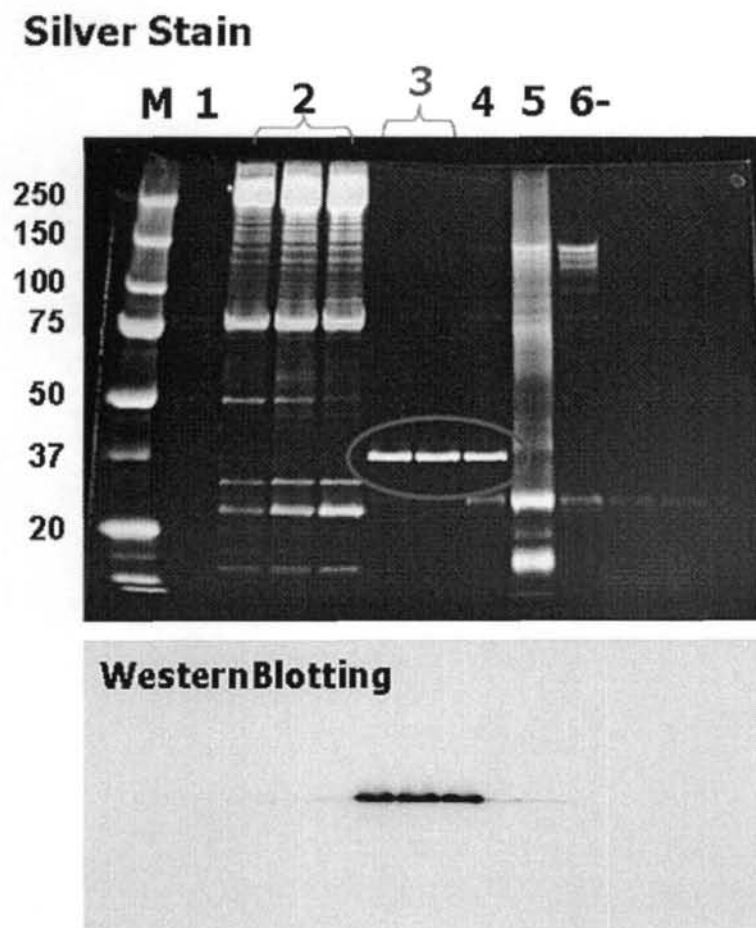
## 11. 活性型組換えヒトプロスタシンの作成

### 1) 組換えヒトプロスタシンの作成

ヒトプロスタシンの cDNA の C 末端に GeneTailor Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen) を使用して His tag (His 6) を付加した (prostasin His)。Prostasin His の light chain と heavy chain の間にエンテロキナーゼ切断部位 (Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) を GeneTailor Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen) を使用して挿入した (prostasin EK His)。作成した prostasin EK His を片倉工業に送り、カイコより組換えヒトプロスタシンを作成するよう依頼した。カイコ体液を Ni Sepharose High Performance column (HisTrap HP: GE healthcare) により 1 次精製した。1 次精製後 16 時間透析を行い、バッファーを交換し、Ion



Exchange column (HiTrap Q : GE healthcare)で2次精製した。2次精製後16時間透析を行って脱塩を行い、Ion Exchange column (Resource Q : GE healthcare)を使用して最終精製を行った。精製後の結果を Figure 4 に示す。



**Figure 4**

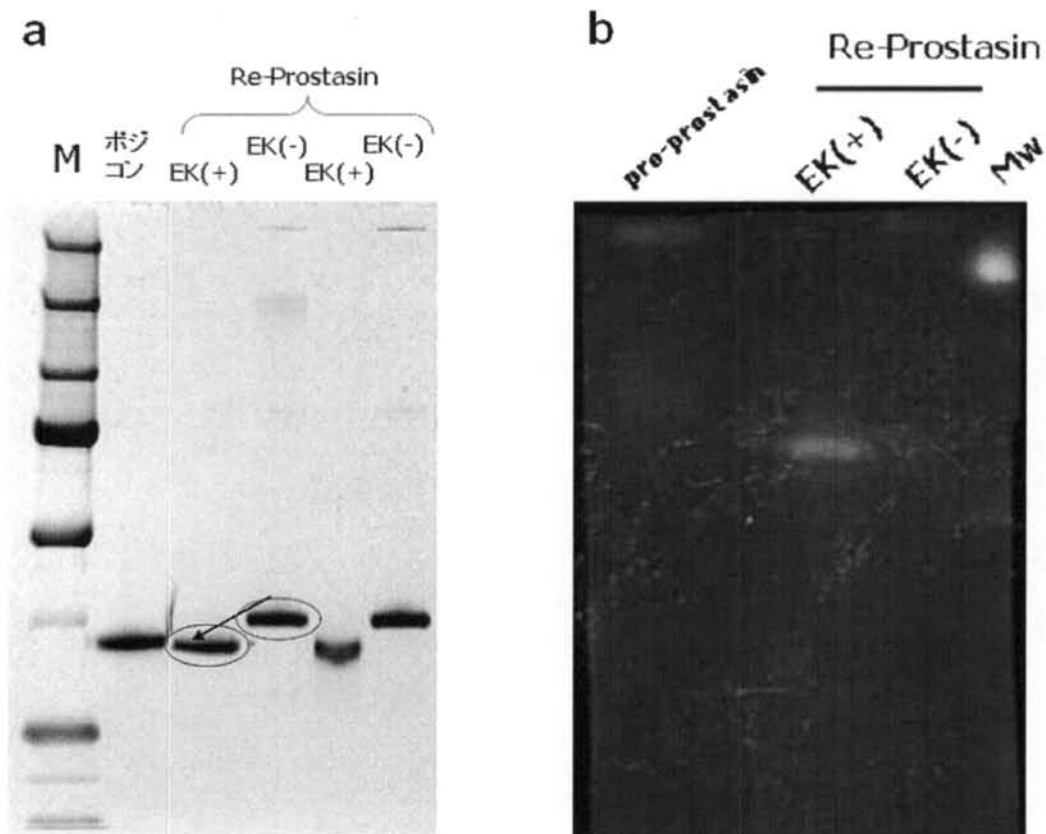
***Purification of recombinant prostatic acid phosphatase***

Upper : silver stain Lower : western blotting

1、2、3、4、5、6 : fraction number

## 2) 組換えヒトプロスタシンの活性化

1) で精製した組換えヒトプロスタシン 50  $\mu\text{g}$  に対して EK Max (Invitrogen) のエンテロキナーゼを 0.1unit 加え、37°Cで 16 時間インキュベートした。16 時間後 0.1unit のエンテロキナーゼに対して anti-enterokinase agarose (Enterokinase removal kit : sigma)を 10  $\mu\text{L}$  加え、45 分間ロータリーミキサーでインキュベートしてエンテロキナーゼを除去した。ウエスタンおよびザイモグラフィーを行い活性化の確認を行った結果を Figure 5 に示す。



**Figure 5**

*Activation of recombinant prostaticin*

a : Western blotting    b : Zymography

## 1 2. プロスタシンの活性測定

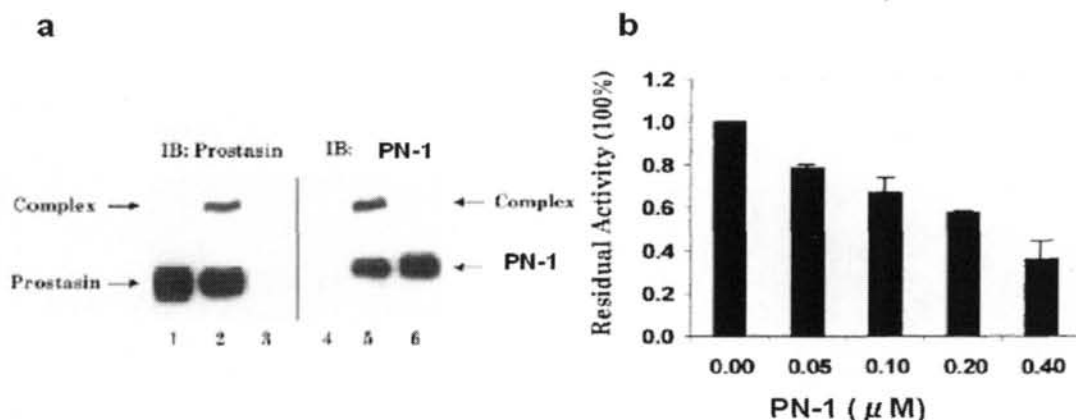
各条件で反応させた組換えヒトプロスタシンの 500 ng を特異的な合成基質である QAR-MCA (Boc-Gln-Ala-Arg-MCA) 反応液 (50 mM Tris-HCl pH 7.6、100  $\mu$ M QAR-MCA) で反応させた。反応後 0、5、10、15、20、25、30 分ごとに  $\lambda_{\text{ex}}$  360 nm、 $\lambda_{\text{em}}$  465 nm の条件で測定した。各時間の測定値をプロットし、傾きから活性を算出した。

## VII実験結果

### 第一章

#### プロスタシンと Protease nexin-1(PN-1)との相互作用による ENaC の活性調節

近年、プロスタシンの内因性阻害物質である protease nexin-1(以下 PN-1)が同定され、プロスタシンと PN-1 は SDS 耐性の複合体を形成することによりプロスタシンの活性を阻害すると報告された(figure 6a,b)(14)。PN-1 は serpin ファミリーに属し、内因性の  $\alpha$ -トロンビン、プラスミン、プラスミノゲンアクチベーターの阻害物質としても知られている(15-17)。私は、プロスタシンは生体内で PN-1 と相互作用することによって ENaC 活性を調節しているという仮説をたてて検討を行った。本章ではプロスタシンと PN-1 との相互作用による ENaC 活性の調節および ENaC 活性を調節することが知られているホルモン (TGF- $\beta$ 1、アルドステロン) の PN-1 の発現に与える影響について検討した結果を論述する。



Li-Mei Chen, *et al.*, *Prostate.*, 2004(14)

Figure 6

PN-1 によるプロスタシンとの複合体形成 (a)

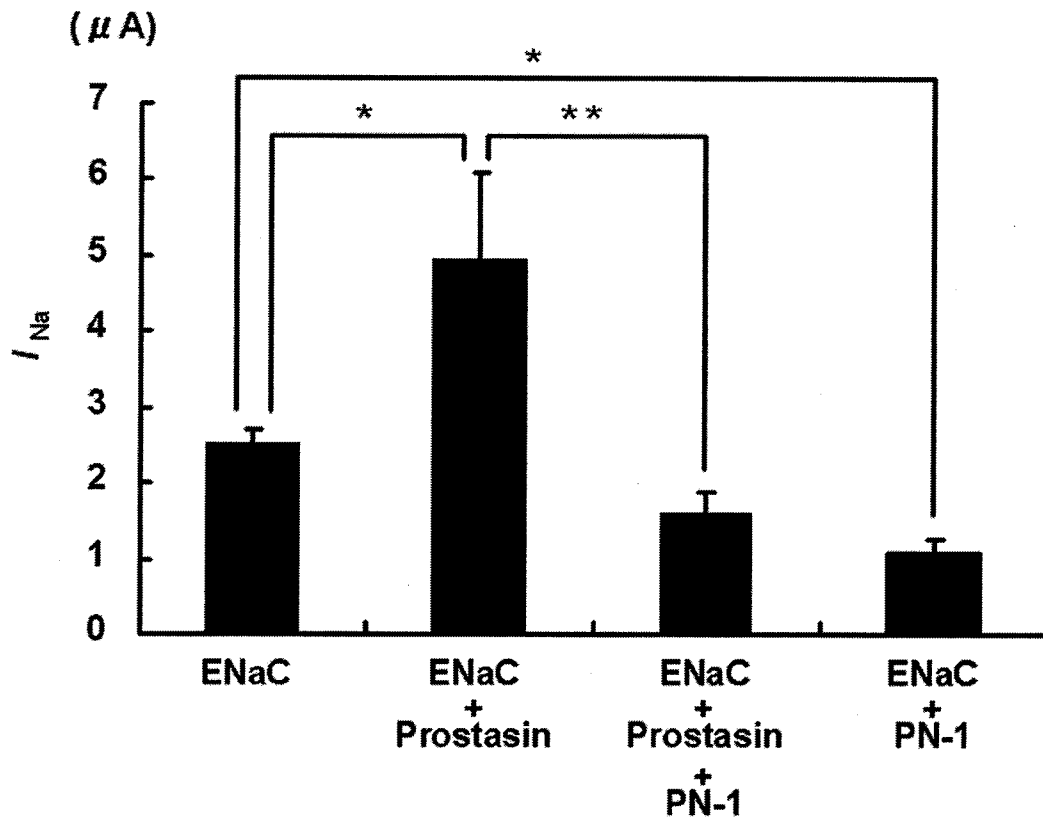
および PN-1 によるプロスタシンの活性抑制 (b)

## プロスタシンによる ENaC 活性化における PN-1 の影響

プロスタシンによって活性化された ENaC が PN-1 によって活性を抑制されるかについて検討を行うためにアフリカツメガエルの卵母細胞 (oocyte) に各種 cRNA をマイクロインジェクションし、2 電極電位固定法にて ENaC 活性を測定した。

Figure 7 に示すように ENaC 単独でのアミロライド感受性 Na 電流は  $2.5 \pm 0.2 \mu\text{A}$  であった。さらにプロスタシンを共発現させるとアミロライド感受性 Na 電流は  $5.0 \pm 1.1 \mu\text{A}$  と有意に増加した。ENaC とプロスタシン、PN-1 の 3 種を共発現させるとアミロライド感受性 Na 電流は  $1.6 \pm 0.3 \mu\text{A}$  と有意に抑制されていた。この結果よりプロスタシンによる ENaC の活性化は PN-1 によって抑制されることが示唆された。

一方 ENaC と PN-1 を共発現させるとアミロライド感受性 Na 電流は  $1.1 \pm 0.2 \mu\text{A}$  と ENaC 単独発現と比べて有意に抑制されていた。この結果より PN-1 は内因性の ENaC のアクチベーターを阻害している可能性も示唆された。



Naoki Wakida, et al., *Kidney Int.*, 2006(70)

**Figure 7**

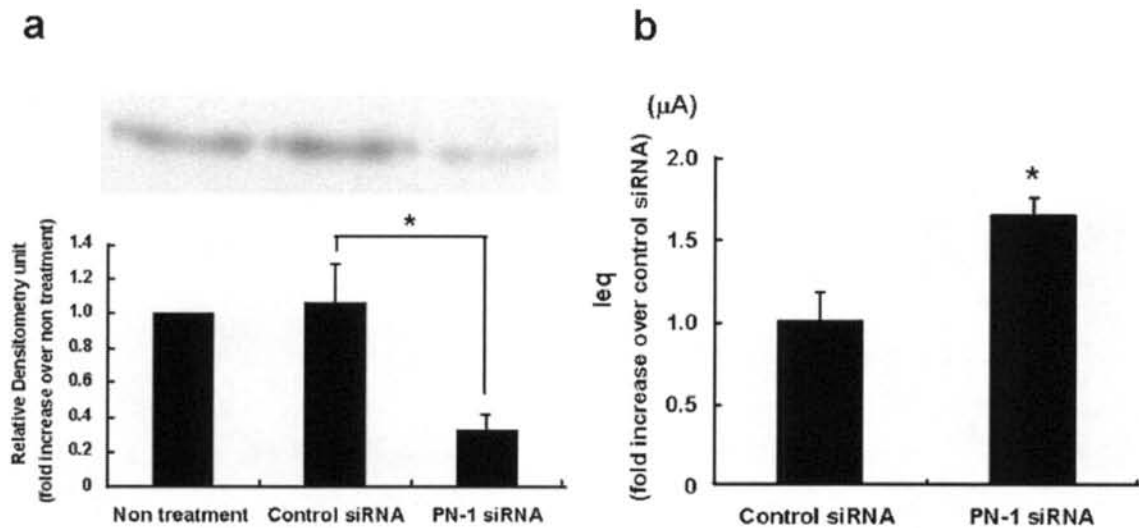
***Inhibition of prostasin-induced ENaC activation by PN-1.***

cRNAs coding for mouse ENaC  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  subunits were injected into *Xenopus* oocytes in the presence or absence of mouse prostasin and PN-1 cRNAs. Twenty-four hours after injection, amiloride-sensitive sodium currents were measured by using the two-electrode voltage clamp system. Data are expressed as mean  $\pm$  SE ( $n = 10$ ).  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ .  $I_{Na}$ : amiloride-sensitive sodium current.

## PN-1 のノックダウンによる ENaC の活性化

Figure 7 より PN-1 はプロスタシンによる ENaC の活性化を抑制することが示唆された。しかし、卵母細胞の実験は強制発現系であるので、生体での ENaC 活性における PN-1 の阻害効果は不明である。生体での PN-1 による ENaC 活性阻害について明らかにするために、M-1 細胞において PN-1 の発現を siRNA を用いてノックダウンすることにより検討を行った。

Figure 8a に siRNA を用いて M-1 細胞の PN-1 をノックダウンしたときの蛋白発現を示す。ネガティブコントロールの siRNA をトランスフェクションした M-1 細胞の PN-1 の発現量は、siRNA をトランスフェクションしなかった M-1 細胞の PN-1 の発現量と変化がなかった。PN-1 の siRNA を M-1 細胞にトランスフェクションすると PN-1 の発現量は  $66.4 \pm 8.2\%$  減少していた。PN-1 の発現が約 66 % 抑制された状態で Na 電流を測定した結果を figure 8b に示す。PN-1 を siRNA でノックダウンすることによって Na 電流は  $1.6 \pm 0.1$  倍に増加していた。これらの結果より M-1 細胞において PN-1 はプロスタシンによる ENaC の活性化を抑制することによって間接的に ENaC の活性を阻害する可能性が示唆された。



Naoki Wakida, et al., *Kidney Int.*, 2006(70)

**Figure 8**

*Effect of PN-1 gene silencing with short interfering RNA on equivalent current in M-1 cells*

(a) Representative immunoblot of PN-1 in the culture medium from M-1 cells 72 h after incubation with PN-1 siRNA. The first 2 lanes, respectively, show protein expression in cells not exposed to siRNA and in cells incubated with control (non-silencing) siRNA. The bands were quantitated with densitometry. The blot shown is representative of 5 separate experiments. Values are expressed as fold increase over non-treated cells. Data are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 5$ ). \*  $P < 0.005$  as compared with control siRNA.

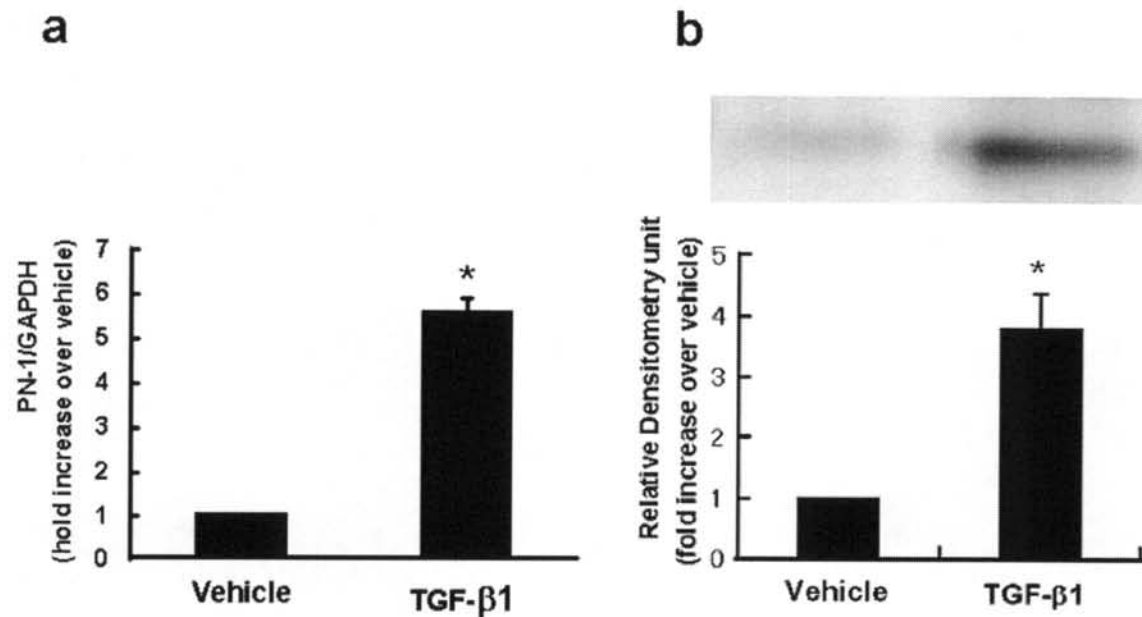
(b) Stimulatory effect of PN-1 siRNA on basal  $I_{eq}$ . Seventy-two hours after transfection with siRNA, the amiloride-sensitive  $I_{eq}$  was measured in M-1 cells. Values are expressed as fold increase over control siRNA. Data are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 12$ ). \*  $P < 0.001$  as compared with control siRNA.



## TGF- $\beta$ 1 の PN-1 の発現に与える影響についての検討

TGF- $\beta$ 1 は腎臓の髄質内層の集合尿細管細胞において Na 輸送を阻害することが知られている(18-21)。以前私たちは M-1 細胞において TGF- $\beta$ 1 がプロスタシンの発現量を減少させ、 $^{22}\text{Na}$  の取り込みを増加させることを報告している(22)。これらの知見に加え、TGF- $\beta$ 1 による ENaC 阻害作用はプロスタシンの発現抑制のみではなく、PN-1 の発現増加を伴うのではないかと考え、TGF- $\beta$ 1 の PN-1 発現に与える影響について検討を行った。

Figure 9a に PN-1 の mRNA 発現量の変化を示す。TGF- $\beta$ 1 を投与することによって PN-1 の mRNA 発現量がコントロールと比較して  $5.6 \pm 0.3$  倍と有意に増加した。Figure 9b に PN-1 の蛋白発現量の変化を示す。TGF- $\beta$ 1 を添加することによって PN-1 の蛋白発現量も  $3.8 \pm 0.5$  倍と増加していた。この結果より TGF- $\beta$ 1 はプロスタシンの阻害物質である PN-1 の発現を増加させることによってプロスタシンによる ENaC の活性化を阻害することが示唆された。



Naoki Wakida, et al., *Kidney Int.*, 2006(70)

**Figure 9**

*Effect of TGF-β1 on the expression of PN-1 in M-1 cells.*

M-1 cells, which were serum-deprived for 24 h, were treated with 20 ng/ml of TGF-β1.

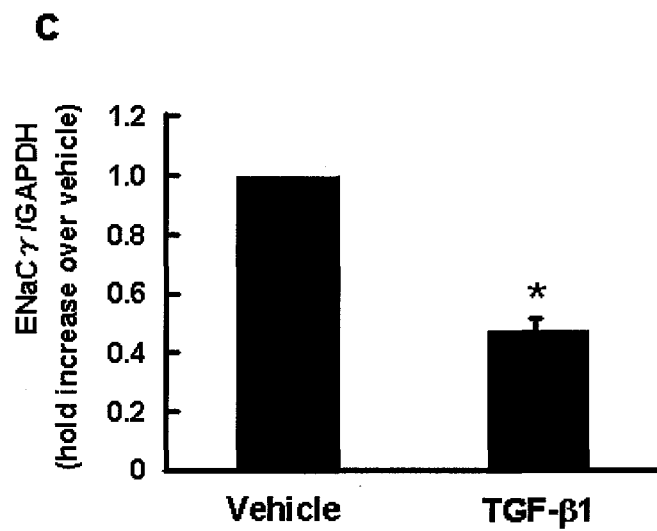
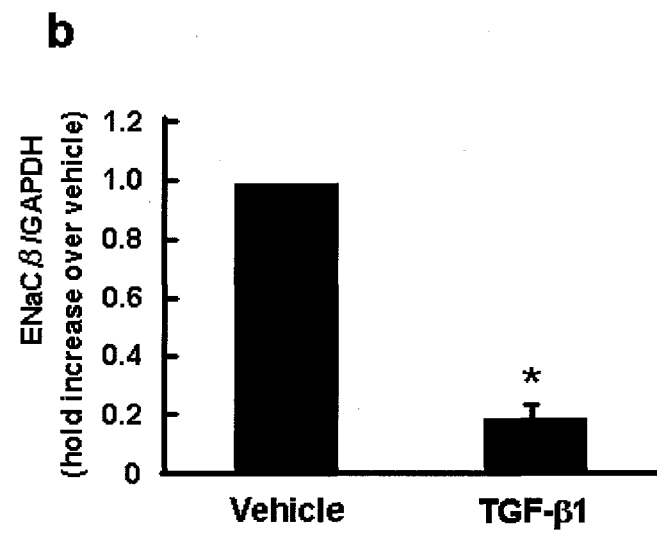
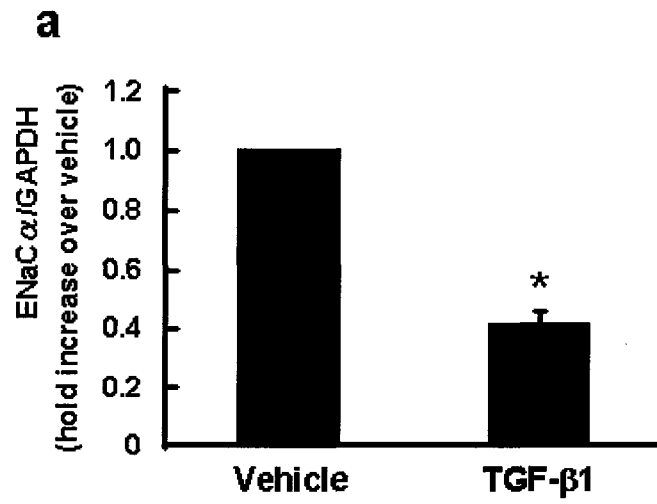
a: Twenty-four hours after treatment, total RNA was extracted from M-1 cells and 5 μg of total RNA was reverse-transcribed to cDNA with oligo(dT) primers. The abundance of each mRNA was normalized for GAPDH and compared with vehicle control. Values are expressed as fold increase over control. Data are expressed as mean ± SD (n = 6). \*P < 0.001 as compared with vehicle.

b: Three milliliters of culture medium were TCA-precipitated and subjected to SDS-PAGE. The expression of PN-1 protein was determined by immunoblotting using the anti-PN-1 antibody. The bands were quantitated with densitometry. The blot shown is representative of 5 separate experiments. Values are expressed as fold increase over control. Data are expressed as mean ± SE (n = 5). \*\*P < 0.01 as compared with vehicle.

## TGF- $\beta$ 1 の ENaC $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットの発現に与える影響についての検討

Frank らは 2 型肺胞細胞において TGF- $\beta$ 1 が ERK1/2 を介して  $\alpha$ ENaC の発現量を減少させ、Na の細胞内への取り込みを阻害すると報告している(23)。しかし、これまでに腎臓における TGF- $\beta$ 1 の ENaC 発現に与える影響を検討した報告はない。そこで私たちは M-1 細胞において TGF- $\beta$ 1 の ENaC  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  サブユニットの発現に与える影響について検討を行った。

Figure 10a に ENaC、Figure 10b に  $\beta$ ENaC、Figure 10c に ENaC の mRNA 発現量の変化を示す。 $\alpha$ ENaC は TGF- $\beta$ 1 によって発現量が  $59.0 \pm 4.0\%$  減少していた。 $\beta$ ENaC では非常に強い抑制が見られ、TGF- $\beta$ 1 によって  $80.4 \pm 2.1\%$  減少していた。 $\gamma$ ENaC でも  $\alpha$ 、 $\beta$  と同様に発現抑制が見られ、TGF- $\beta$ 1 によって  $52.7 \pm 3.4\%$  減少していた。これらの結果より TGF- $\beta$ 1 は M-1 細胞においても ENaC  $\alpha$  の発現を抑制することが示唆された。さらに TGF- $\beta$ 1 は ENaC  $\alpha$  だけではなく、ENaC  $\beta$ 、 $\gamma$  も同様に抑制することも示唆された。



*Naoki Wakida, et al., Kidney Int., 2006(70)*

## Figure 10

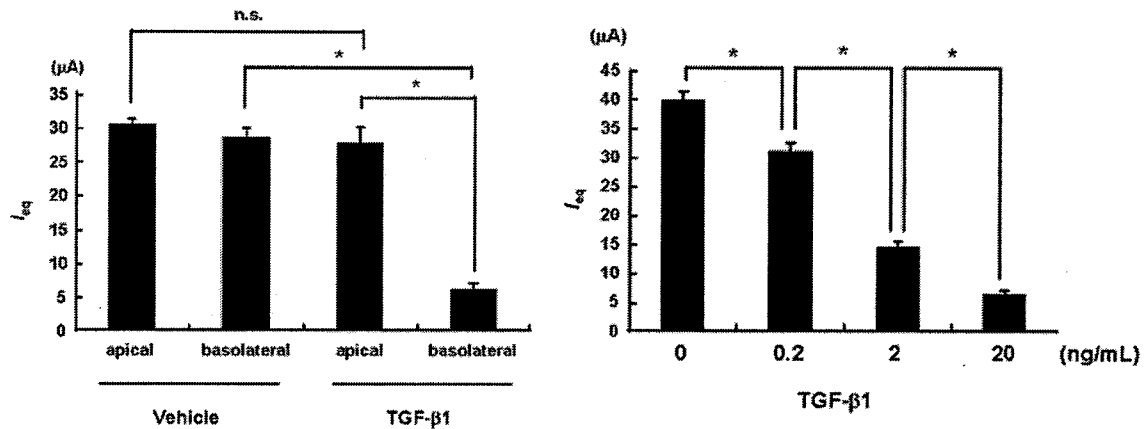
### *Effect of TGF- $\beta$ 1 on mRNA expression of PN-1 and ENaC $\alpha$ , $\beta$ , and $\gamma$ subunits*

M-1 cells, which were serum-deprived for 24 h, were treated with 20 ng/ml of TGF- $\beta$ 1. Twenty-four hours after treatment, total RNA was extracted from M-1 cells and 5  $\mu$ g of total RNA was reverse-transcribed to cDNA with oligo(dT) primers. The abundance of each mRNA was normalized for GAPDH and compared with vehicle control (a:  $\alpha$ ENaC, b:  $\beta$ ENaC, and c:  $\gamma$ ENaC). Values are expressed as fold increase over control. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 6). \*P < 0.001 as compared with vehicle.

## M-1 細胞における TGF- $\beta$ 1 の Na 輸送に与える影響についての検討

私たちは M-1 細胞において TGF- $\beta$ 1 が  $^{22}\text{Na}$  の取り込みを阻害することを報告している(22)。しかし TGF- $\beta$ 1 は管腔側、血管側のどちら側から ENaC 活性に影響を与えるかは不明である。そこで私たちは TGF- $\beta$ 1 を管腔側、または血管側から添加することによって ENaC 活性に与える影響について Na 電流 ( $I_{\text{eq}}$ ) を測定することにより検討を行った。

Figure 11a に管腔側、血管側から TGF- $\beta$ 1 を添加した際の Na 電流 ( $I_{\text{eq}}$ ) の変化を示す。TGF- $\beta$ 1 を管腔側から添加しても Na 電流は全く変化しなかった。一方、TGF- $\beta$ 1 を血管側から添加すると Na 電流は約 40% 抑制されていた。さらに TGF- $\beta$ 1 による Na 電流減少の濃度依存性を検討するために 0、0.2、2、20 ng/mL の TGF- $\beta$ 1 を血管側から添加して Na 電流を測定した。Figure 10b に示すように TGF- $\beta$ 1 による Na 電流の減少には濃度依存性があった。これらの結果より TGF- $\beta$ 1 は血管側から ENaC 活性を抑制することや TGF- $\beta$ 1 による ENaC 活性抑制には濃度依存性があることが示唆された。



Naoki Wakida, et al., *Kidney Int.*, 2006(70)

**Figure 11**

***Effect of TGF- $\beta 1$  on equivalent current in M-1 cells***

(a) Effect of basolateral or apical TGF- $\beta 1$  on amiloride-sensitive equivalent current ( $I_{eq}$ ) in M-1 cells. M-1 cells were deprived of serum for 24 h and 20 ng/ml of TGF- $\beta 1$  or vehicle was applied to either the apical or basolateral side. Twenty-four hours after treatment,  $I_{eq}$  was determined as the ratio of  $V_{te}$  to  $R_{te}$  and was normalized by dividing  $I_{eq}$  by the surface area (1.13 cm) of active membrane. Data are expressed as mean  $\pm$  SE (n = 6). \* $P < 0.001$ .

(b) Dose-dependent effect of TGF- $\beta 1$  on  $I_{eq}$  in M-1 cells. M-1 cells were treated with 0.2 ng/ml to 20 ng/ml of TGF- $\beta 1$  or vehicle for 24 h, and  $I_{eq}$  was measured. Data are expressed as mean  $\pm$  SE (n = 6). \* $P < 0.01$ .

## 集合尿細管における TGF- $\beta$ 1 による Na 再吸収抑制のメカニズム

これまでの報告と今回得られた知見より想定される TGF- $\beta$ 1 による Na 再吸収抑制メカニズムを figure 12 に示す。①TGF- $\beta$ 1 はプロスタシンの発現を抑制することによって Na の再吸収を抑制すると考えられている。②今回得られた知見より TGF- $\beta$ 1 は PN-1 の発現を亢進することによって、増加した PN-1 がプロスタシンの活性をより強く抑制してプロスタシンによる ENaC の活性化を抑制するメカニズムが考えられる。③さらに TGF- $\beta$ 1 は直接 ENaC の発現を抑制する。このように独立した 3 つの系によって TGF- $\beta$ 1 は Na 再吸収を抑制している可能性が示唆される。

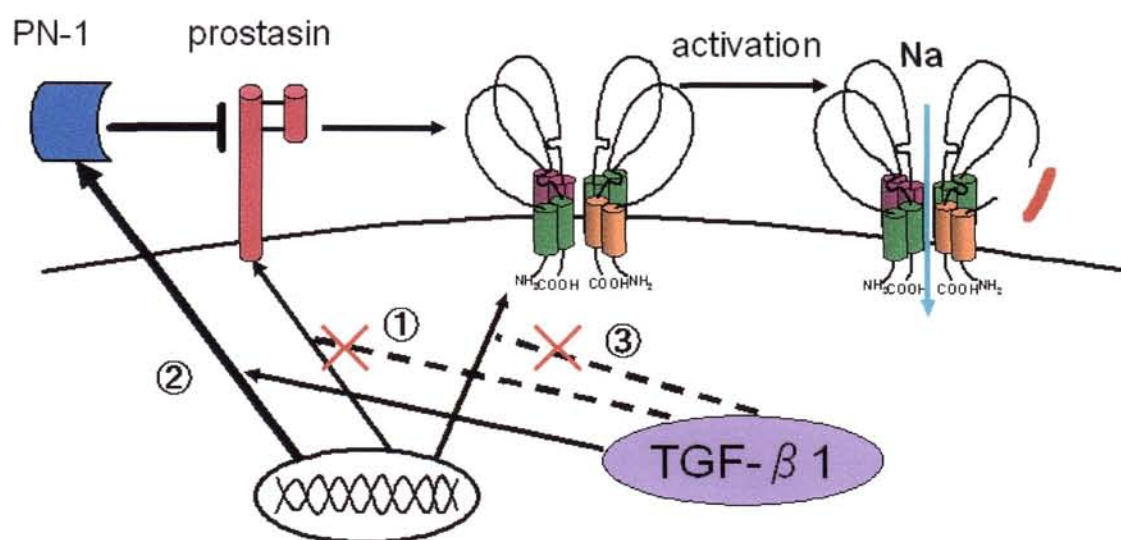


Figure 12

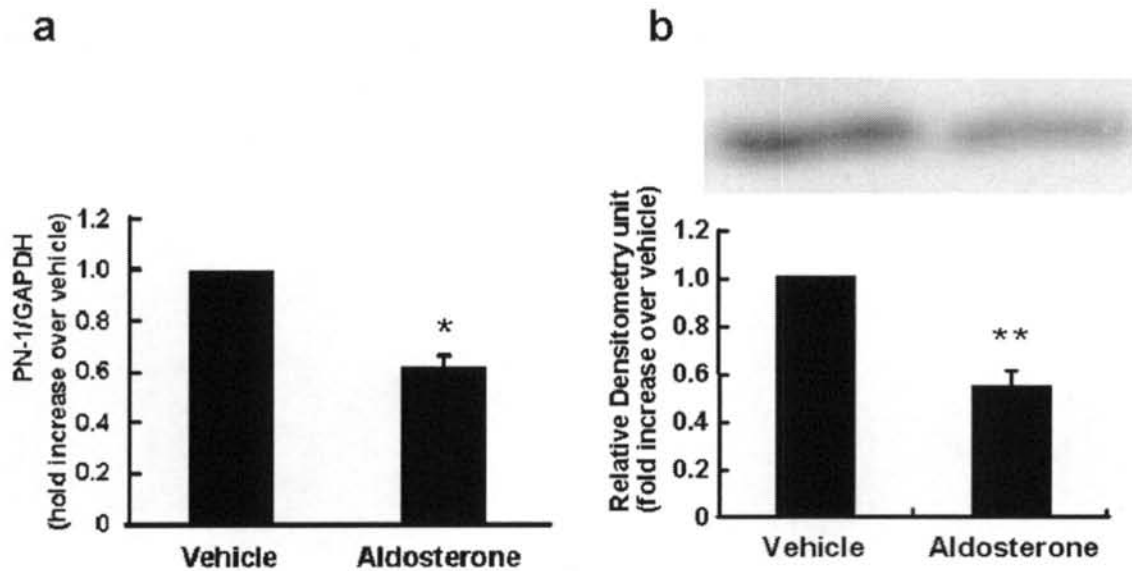
*The mechanism of inhibition of Na reabsorption by TGF- $\beta$ 1*



## アルドステロンの PN-1 の発現に与える影響についての検討

アルドステロンは生体内の体液や電解質バランスを調節する重要なホルモンであり、腎臓において Na 再吸収を促進する。これまで私たちの研究グループはアルドステロンがプロスタシンの発現量を増加させることによって Na の再吸収を促進すると報告している(24)。これらの知見に加え、アルドステロンは PN-1 の発現を抑制することにより ENaC 活性を増強するのではないかと考え、アルドステロンの PN-1 発現に与える影響について検討を行った。

Figure 13a に PN-1 の mRNA 発現量の変化を示す。アルドステロンを作用させることによって PN-1 の mRNA 発現量は  $39.1 \pm 6.0\%$  抑制された。Figure 13b に PN-1 の蛋白発現量の変化を示す。アルドステロンは、PN-1 の蛋白発現量を  $47.3 \pm 6.7\%$  抑制した。この結果よりアルドステロンはプロスタシンの内因性の阻害物質である PN-1 の発現を抑制することによってプロスタシンによる ENaC の活性化を亢進する可能性が示唆された。



Naoki Wakida, et al., *Kidney Int.*, 2006(70)

**Figure 13**

***Effect of aldosterone on expression of PN-1***

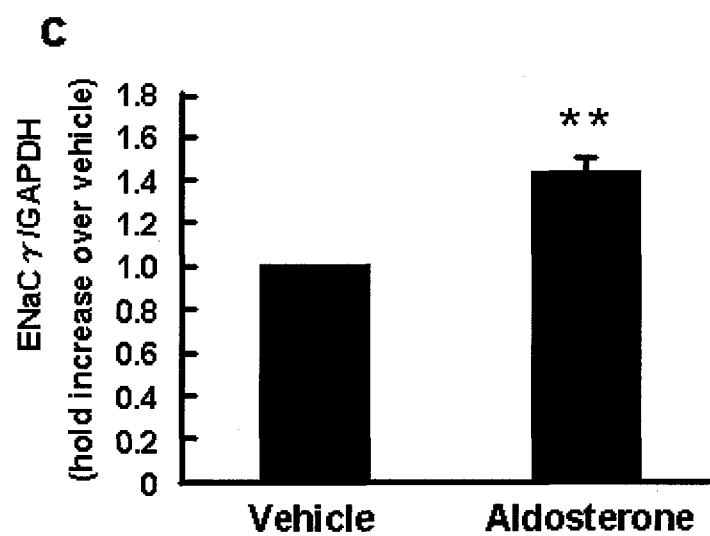
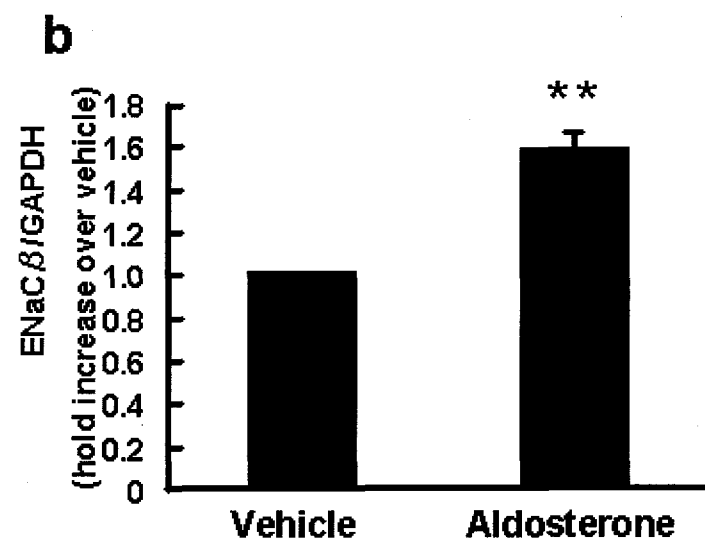
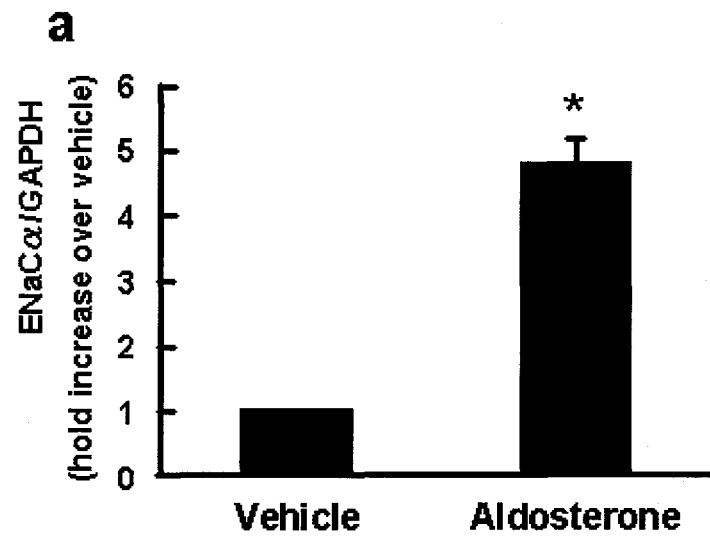
M-1 cells, which were serum-deprived for 24 h, were treated with  $10^{-6}$ M aldosterone and harvested after 24 h of incubation. a: Total RNA was extracted from M-1 cell and 5  $\mu$ g of total RNA was reverse-transcribed to cDNA with oligo(dT) primers. The abundance of each mRNA was normalized for GAPDH and compared with vehicle control. Values are expressed as fold increase over control.

b: Six milliliters of culture medium were TCA-precipitated and subjected to SDS-PAGE. The expression of PN-1 protein was determined by immunoblotting using the anti-PN-1 antibody. The bands were quantitated with densitometry. The blot shown is representative of 6 separate experiments. Values are expressed as fold increase over vehicle-treated cells. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 6). \*  $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.05$  as compared with vehicle.

## アルドステロンの ENaC $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットの発現に与える影響についての検討

アルドステロンは  $\alpha$ ENaC の発現を亢進すると多くの研究者らは報告している (25-27)。しかしながら、ENaC $\beta$  および  $\gamma$  サブユニットについては増加すると報告している研究者もいれば、減少すると報告している研究者もいる (25-27)。そこで M-1 細胞におけるアルドステロンの ENaC $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  サブユニットの発現に与える影響についての検討を行った。

Figure 14a に  $\alpha$ ENaC、Figure 14b に  $\beta$ ENaC、Figure 14c に  $\gamma$ ENaC の mRNA 発現量の変化を示す。 $\alpha$ ENaC はアルドステロンによって発現量が  $4.8 \pm 0.3$  倍に増加していた。 $\beta$ ENaC はアルドステロンによって発現量が  $1.6 \pm 0.1$  倍に増加していた。 $\gamma$ ENaC も  $\beta$  と同様に若干の発現増加がみられ、 $1.4 \pm 0.1$  倍に増加していた。これら結果よりアルドステロンは  $\alpha$ ENaC の発現量を増加させ、若干ではあるが  $\beta$ 、 $\gamma$  の発現も増加させることが示された。



*Naoki Wakida, et al., Kidney Int., 2006(70)*

## Figure 14

### *Effect of aldosterone on mRNA expression of ENaC $\alpha$ , $\beta$ , and $\gamma$ subunits*

M-1 cells, which were serum-deprived for 24 h, were treated with  $10^{-6}$ M aldosterone and harvested after 24 h of incubation. Total RNA was extracted from M-1 cell and 5  $\mu$ g of total RNA was reverse-transcribed to cDNA with oligo(dT) primers. The abundance of each mRNA was normalized for GAPDH and compared with vehicle control (a:  $\alpha$ ENaC, b:  $\beta$ ENaC, and c:  $\gamma$ ENaC). Values are expressed as fold increase over control. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 6). \* $P$  < 0.001, \*\* $P$  < 0.01 as compared with vehicle.

## 集合尿細管におけるアルドステロンによるプロスタシン、PN-1 を中心とした Na 再吸収抑制のメカニズム

アルドステロンによる Na 再吸収促進のメカニズムについて PN-1 の知見を加えて Figure 15 に示す。アルドステロンは以前の報告により、①直接 ENaC の発現を増加させたり、②プロスタシンの発現量を増加させたりすることによって Na の再吸収を促進されると考えられている。今回得られた知見によって、③アルドステロンが PN-1 の発現量を減少させ、減少した PN-1 がプロスタシン活性を十分に抑制できずに、Na 再吸収を促進するメカニズムが考えられる。このように独立した3つの系によってアルドステロンは Na 再吸収を促進している可能性が示唆された。

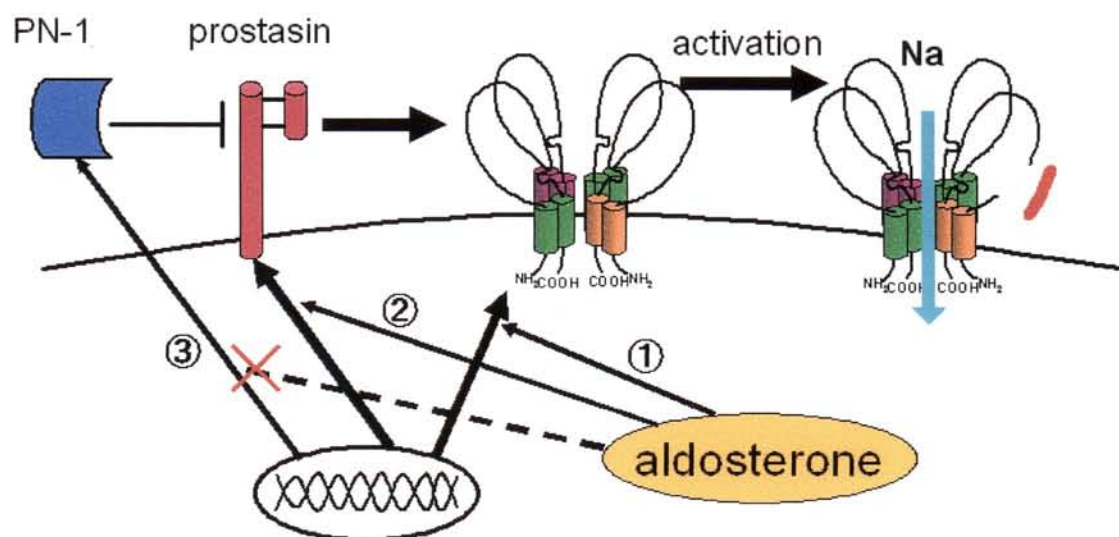


Figure 15

*The mechanism of stimulation of Na reabsorption by aldosterone*

## 第二章

### NO による Na 利尿作用におけるプロスタシンの役割

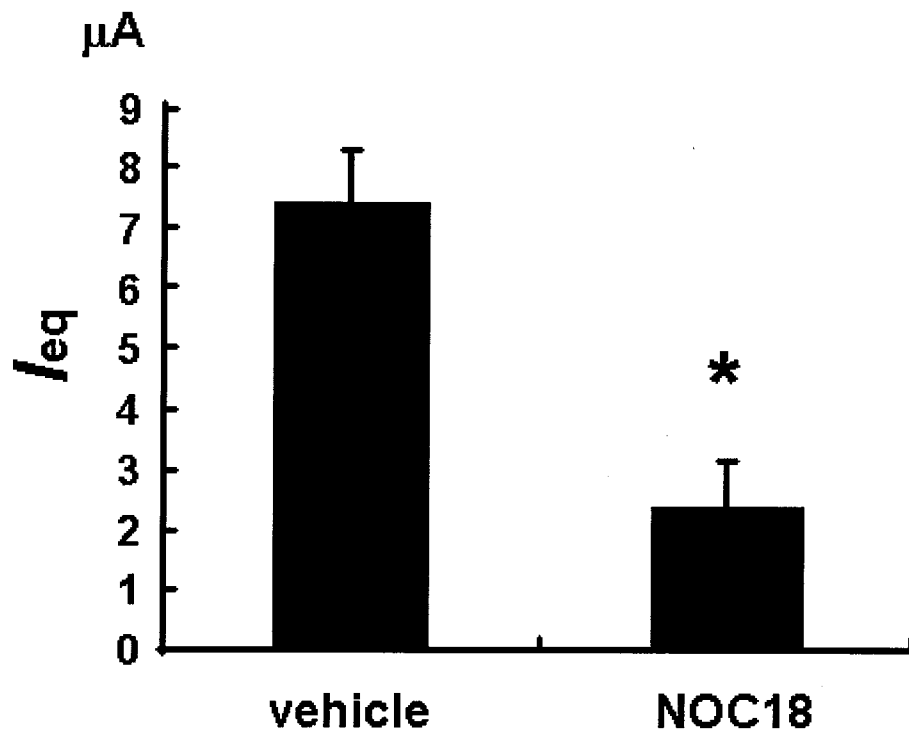
腎臓において nitric oxide (NO)は尿細管に直接作用して、水や電解質輸送の調節にも関与しており、Na 利尿作用があることが知られている(28-30)。腎臓には eNOS は血管内皮細胞のみならず集合尿細管にも存在しており、nNOS も集合尿細管に発現している。Stoos らは集合尿細管において NO は  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase を抑制するのではなく、ENaC を抑制することによって Na の再吸収を阻害すると報告している(31-33)。また別の研究者は、NO が ENaC の開口確率を減らすことを報告している(34)が、NO による ENaC 活性抑制メカニズムについては不明な点が多い。私たちは NO による ENaC の活性抑制に ENaC のアクチベーターであるプロスタシンが関与しているのではないかと考え、検討を加えた。本章では NO のプロスタシン発現に与える影響および NO によるプロスタシン発現抑制メカニズムについて検討を行った結果について論述する。

## NOC18 の Na 電流に与える影響についての検討

これまでに腎臓において NO は ENaC 活性を抑制することによって Na 利尿作用を生じることが知られている(31-33)。しかしながら、これまでの報告はすべて NO の短時間作用を検討したもので、長時間の作用を検討したものはない。本研究では NO を長時間（24 時間）作用させたときの ENaC に与える影響を検討するために、半減期が約 20 時間と長い NO ドナーである NOC18 を用いて検討を行った。

Figure 16 に管腔側から 500 $\mu$ M の NOC18 を添加したときの結果を示す。NOC18 を作用させることによって Na 電流は有意に抑制されていた(Vehicle:  $7.38 \pm 0.84 \mu\text{A}$ , NOC18:  $2.36 \pm 0.75 \mu\text{A}$ )。この結果より NO を長時間作用させても短時間作用させたときと同様に ENaC 活性を抑制することが明らかとなった。





*Naoki Wakida, et al., J Am Soc Nephrol. in submit*

**Figure 16**

***Effect of NOC18 on sodium transport in M-1 cells***

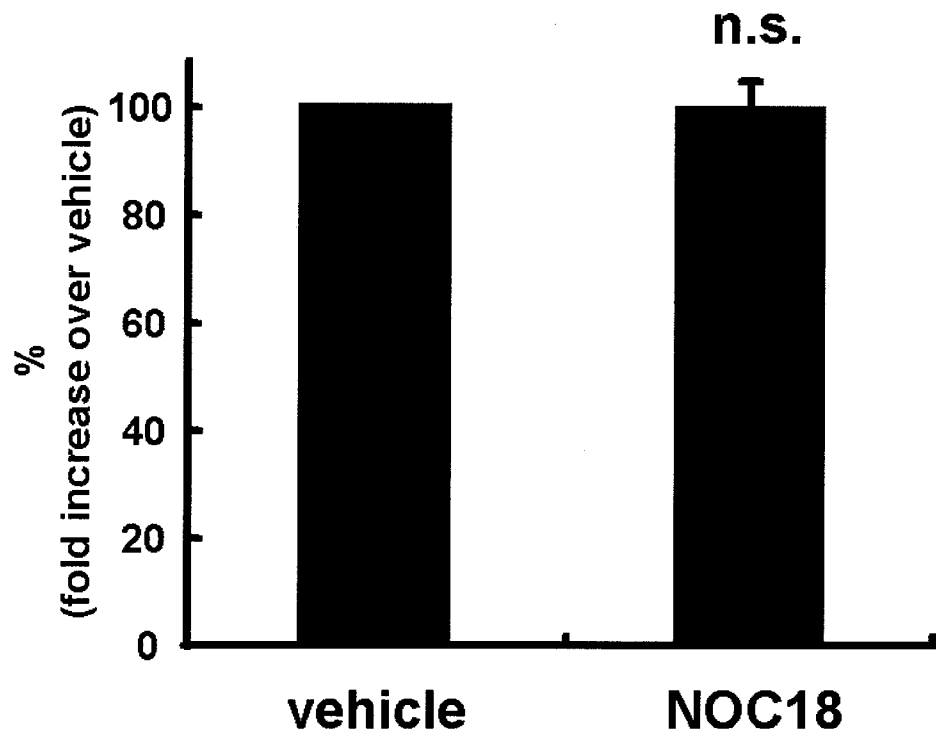
M-1 cells were deprived of serum for 24 h and 500  $\mu M$  of NOC18 or vehicle was applied to apical side. Twenty-four hours after treatment,  $I_{eq}$  was determined as the ratio of  $V_{te}$  to  $R_{te}$  and was normalized by dividing  $I_{eq}$  by the surface area (1.13 cm) of active membrane. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 12). \* $P < 0.001$ .

## NO がプロスタシンに与える影響についての検討

Figure 15 より NOC18 は ENaC 活性を抑制することが示された。NOC18 による ENaC 活性抑制のメカニズムをプロスタシンの観点から考えると、①ENaC のアクチベーターであるプロスタシンの活性抑制、②プロスタシンの発現抑制の 2 通りが考えられる。そこで NOC18 による ENaC 活性抑制におけるプロスタシンの関与を解明するために以下の検討を行った。

### ① プロスタシン活性に与える影響

NOC18 はプロスタシンをニトロ化もしくはニトロソ化してプロスタシンの活性を抑制する可能性が考えられるので、活性型のリコンビナントプロスタシンを作成し、500 $\mu$ M の NOC18 と反応させた。NOC18 と反応させたプロスタシンの活性を特異的な合成基質である QAR-MCA を用いて活性を測定した。figure 17 に示すように NO はプロスタシンの活性を変化させなかった。



*Naoki Wakida, et al., J Am Soc Nephrol. in submit*

**Figure 17**

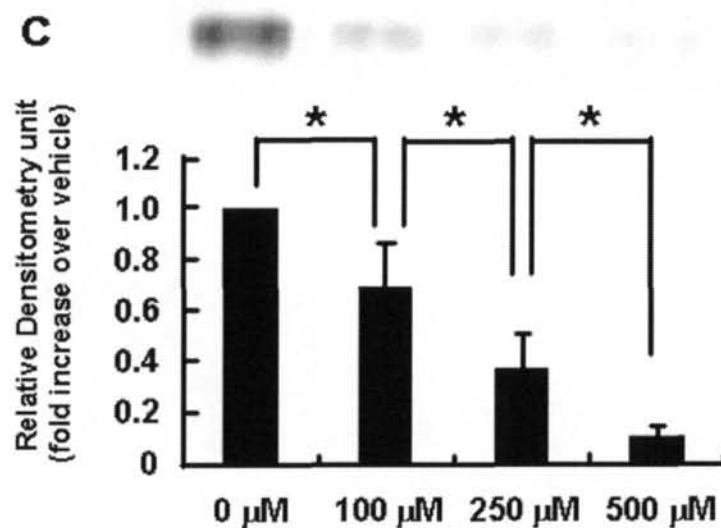
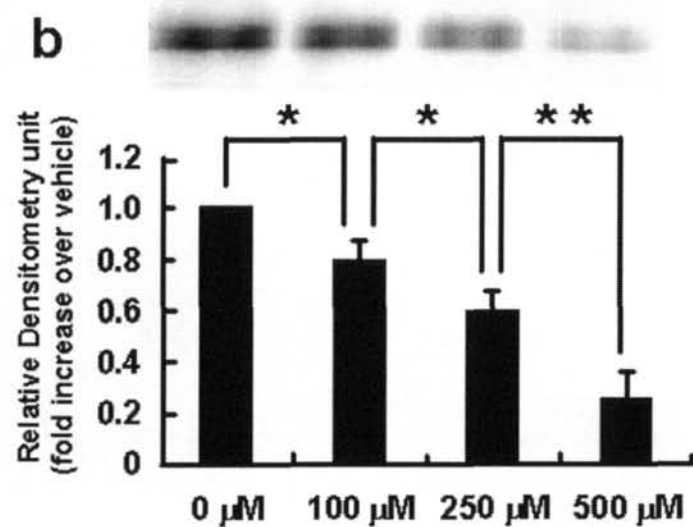
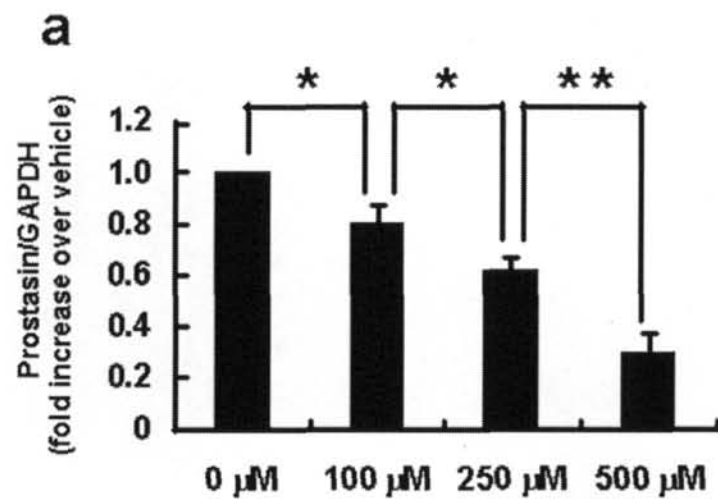
***Effect of NOC18 on the activities of prostasin***

Activated-recombinant prostasin was incubated with 500  $\mu$ M of NOC18 or vehicle at 37 °C for 2 hours. Two hours after incubation, the activities of prostasin were measured using a synthetic substrate, Boc-Gln-Ala-Arg-7-amido-4-methyl coumarin (QAR-MCA) as described in “Methods”. The residual prostasin activities were determined by the function of velocity of prostasin incubated with NOC18 versus the velocity of untreated prostasin. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 4).

## ② プロスタシンの発現に与える影響

次に、NOC18 がプロスタシンの発現を抑制する可能性について検討した。M-1細胞において NOC18 の濃度を 0、100、250、500 $\mu$ M と変化させたときのプロスタシンの発現量を real time PCR および immunoblotting で評価した。Figure 18a に NOC18 によるプロスタシンの mRNA の変化を示す。NOC18 はプロスタシンの mRNA 発現を抑制し、NOC18 によるプロスタシンの発現抑制には濃度依存性があった。プロスタシンは GPI アンカー型のセリンプロテアーゼであり(9)、GPI アンカー型として膜に結合しているタイプ（膜結合型）と GPI アンカーが切断されて分泌されているタイプ（分泌型）の 2 種類として存在している。Figure 18b に膜結合型のプロスタシンの蛋白発現量の変化を示す。NOC18 はプロスタシンの蛋白発現も抑制し、mRNA と同様に濃度依存性があった。Figure 18c に示すように分泌型のプロスタシンも減少し、濃度依存性があった。データは示さないが他の NO ドナーである SNAP、GSNO でも同様の傾向が見られた。

これらの結果より NOC18 による ENaC 活性抑制作用にはプロスタシンの発現抑制も関与している可能性が示唆された。



Naoki Wakida, et al., *J Am Soc Nephrol*. in submit

## Figure 18

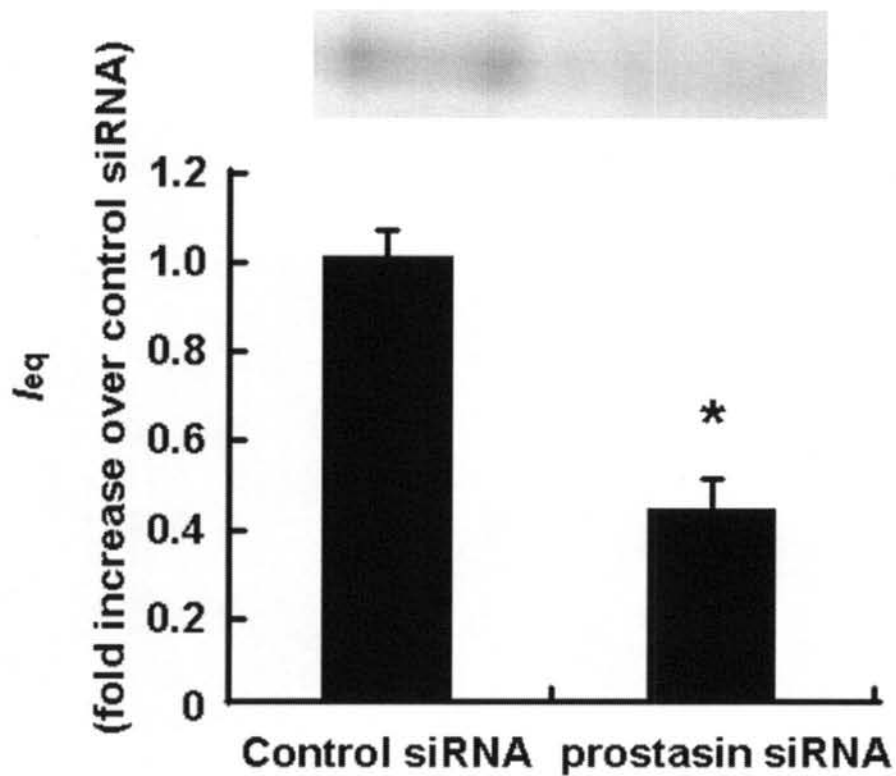
### *Effect of NO on mRNA expression of prostasin*

M-1 cells, which were serum-deprived for 24 h, were treated with 0, 100, 250, 500  $\mu$ M of NOC18. (a: mRNA expression of prostasin) Twenty-four hours after treatment, total RNA was extracted from M-1 cells and 1  $\mu$ g of total RNA was reverse-transcribed to cDNA with oligo dT and random primers. The abundance of each mRNA was normalized for GAPDH and compared with vehicle control. Values are expressed as fold increase over 0  $\mu$ M of NOC18. (b: membrane expression of prostasin, c: secretion of prostasin) Twenty-four hours after treatment, five milliliters of culture medium were TCA-precipitated and 10  $\mu$ g of membrane fraction were subjected to SDS-PAGE. The secretion and membrane expression of prostasin was determined by immunoblotting using the anti-prostasin antibody. The bands were quantitated with densitometry. Values are expressed as fold increase over vehicle. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (N = 8). \*  $P < 0.05$ . \*\*  $P < 0.01$

## プロスタシンのノックダウンによる ENaC 活性に与える影響

NOC18 によってプロスタシンの発現が抑制されることが示されたが、腎臓において、NO によるプロスタシンの発現抑制が ENaC の活性に影響を与えるかは明らかになっていない。今回私たちは M-1 細胞においてプロスタシンの siRNA を用いてプロスタシンをノックダウンしたときの ENaC 活性に与える影響について検討を行った。

Figure 19 にプロスタシンを siRNA でノックダウンし、EVOM にて Na 電流を測定した結果を示す。プロスタシンをノックダウンすると Na 電流が約 50% 抑制された (vehicle :  $17.1 \pm 1.9 \mu\text{A}$ 、prostasin siRNA :  $8.4 \pm 1.5 \mu\text{A}$ )。この結果よりプロスタシンの発現抑制によって ENaC 活性が抑制されることが明らかとなり、NOC18 による ENaC 活性抑制作用にはプロスタシンの発現抑制が一部関与していることが示唆された。



Naoki Wakida, et al., *J Am Soc Nephrol. in submit*

**Figure 19**

***Effect of prostasin gene silencing with short interfering RNA on equivalent current in M-1 cells***

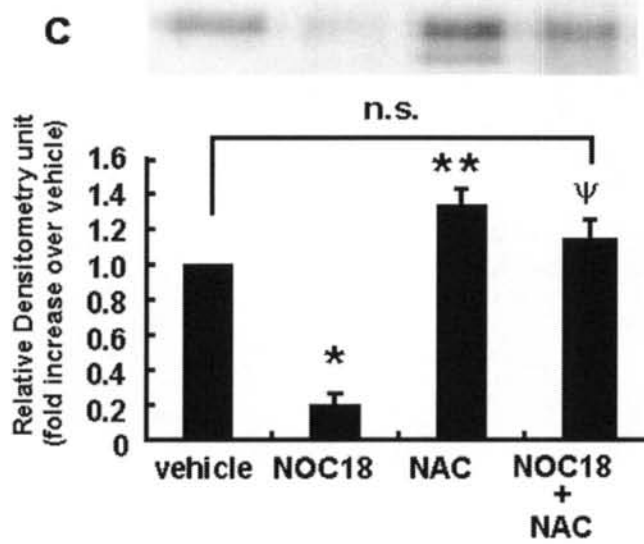
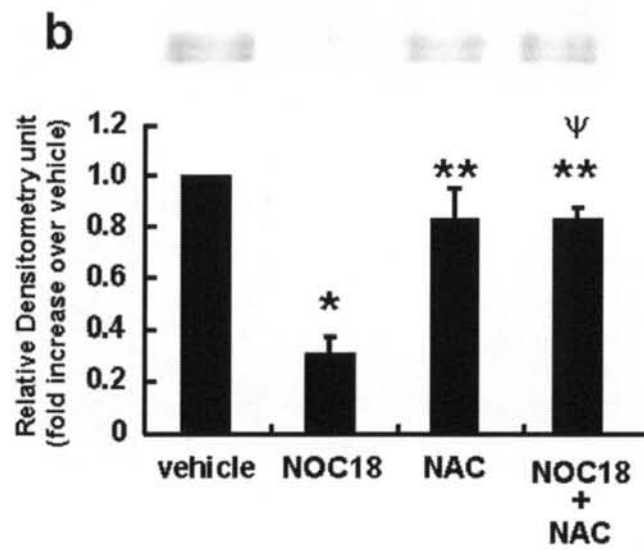
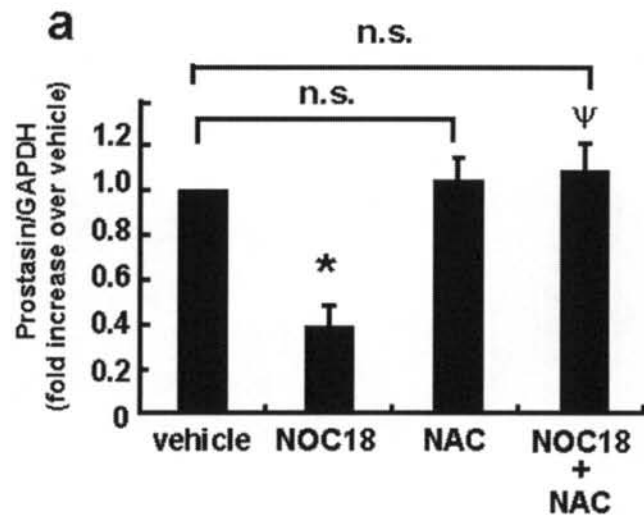
Stimulatory effect of prostasin siRNA on basal  $I_{eq}$ . Seventy-two hours after transfection with siRNA, the amiloride-sensitive  $I_{eq}$  was measured in M-1 cells. Values are expressed as fold increase over control siRNA. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 8). \*  $P < 0.01$  as compared with control siRNA.



## NOC18 によるプロスタシンの発現抑制における N-アセチルシステイン (NAC) の影響

これまでの結果より NO ドナーである NOC18 による ENaC 活性の抑制には、プロスタシンの発現抑制が関与することが示唆されたが、NOC18 による作用が直接 NO の作用であるとは断定できない。そこで NOC18 による作用が NO によるものであるかを確認するために、抗酸化物質であり、NO 消去剤である N-アセチルシステイン (NAC) を使用して NOC18 によるプロスタシン発現抑制に与える影響について検討を行った。

Figure 20a にプロスタシンの mRNA 発現量の変化を示す。1mM の NAC 単独ではプロスタシンの発現に影響を与えなかったが、1mM の NAC を作用させると NOC18 によるプロスタシンの発現抑制は打ち消された。Figure 20b に示すように NOC18 による膜結合型のプロスタシン発現抑制は NAC によって打ち消されていた。同様に分泌型のプロスタシンの発現抑制も打ち消されていた (figure 20c)。これらの結果より NOC18 によるプロスタシンの発現抑制は NO による作用であることが示された。



Naoki Wakida, et al., *J Am Soc Nephrol*. in submit

## Figure 20

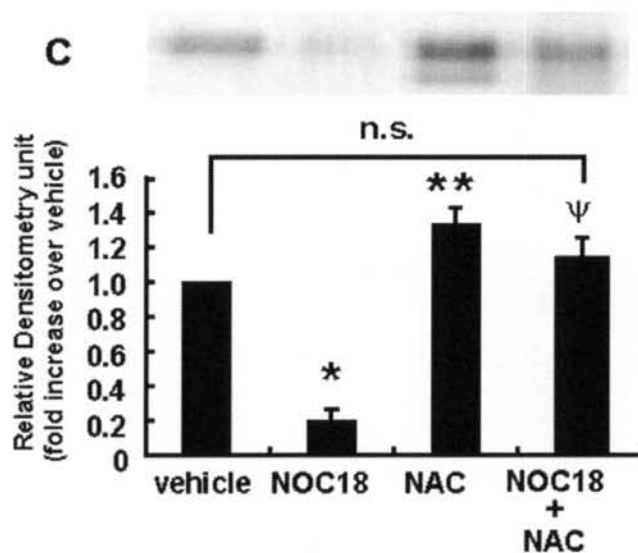
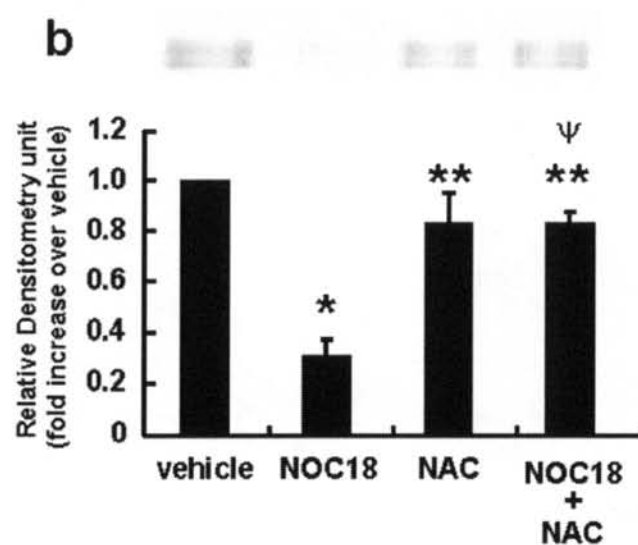
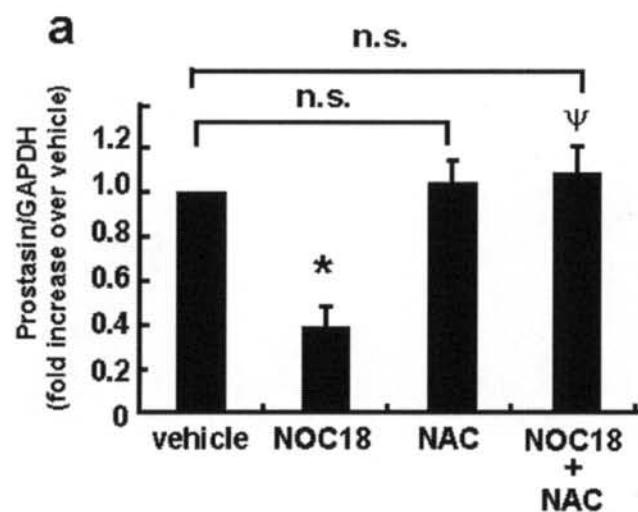
### *Effect of N-Acetyl cystein on the suppression of prostasin expression mediated by NO*

M-1 cells, which were serum-deprived for 24 h, were treated with 500  $\mu$ M of NOC18, 1 mM of N-Acetyl cystein (NAC), and both NOC18 and NAC. (a: mRNA expression of prostasin) Twenty-four hours after treatment, total RNA was extracted from M-1 cells and 1  $\mu$ g of total RNA was reverse-transcribed to cDNA with oligo dT and random primers. The abundance of each mRNA was normalized for GAPDH and compared with vehicle control. Values are expressed as fold increase over vehicle. (b: membrane expression of prostasin, c: secretion of prostasin) Twenty-four hours after treatment, five milliliters of culture medium were TCA-precipitated and 10  $\mu$ g of membrane fraction were subjected to SDS-PAGE. The secretion and membrane expression of prostasin was determined by immunoblotting using the anti-prostasin antibody. The bands were quantitated with densitometry. The blot shown is representative of 5 separate experiments. Values are expressed as fold increase over vehicle. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (N = 5). \*  $P$  < 0.05 (v.s. vehicle). \*\*  $P$  < 0.001 (v.s. vehicle).  $^{\Psi}$   $P$  < 0.005 (v.s. NOC18)

## NO によるプロスタシン発現抑制メカニズムの解明

生体においてNOはグアニル酸シクラーゼ-cGMP系を介して様々な作用をしていることが知られている。NOによるプロスタシン発現抑制作用もグアニル酸シクラーゼ-cGMP系を介しているのではないかと考え、グアニルシクラーゼ阻害薬であるODQを用いてNOによるプロスタシン発現抑制に与える影響について検討を行った。

Figure 21a に 5 $\mu$ M の ODQ を作用させたときのプロスタシンの mRNA 発現量の変化を示す。5 $\mu$ M の ODQ 単独ではプロスタシンの発現量に変化はなかった。ODQ は NO によるグアニル酸シクラーゼの活性を抑制しているにもかかわらず、ODQ は NO によるプロスタシンの発現抑制に全く影響を与えなかった。Figure 21b、21c に示すように ODQ はプロスタシンの膜発現および分泌に影響を与えず、NO によるプロスタシン発現抑制にも影響を与えなかった。



Naoki Wakida, et al., *J Am Soc Nephrol*. in submit

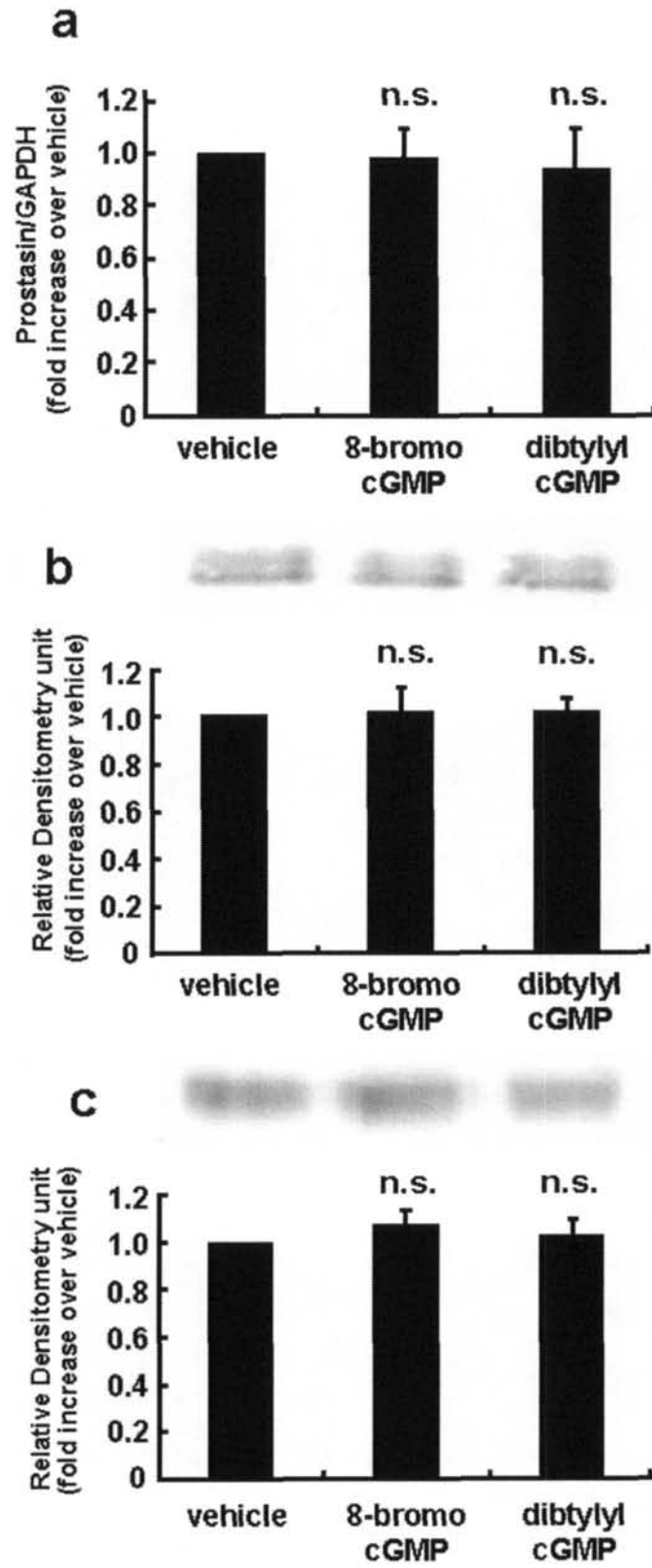
## Figure 21

### *Effect of ODQ, a guanylate cyclase inhibitor, on the expression of prostasin in M-1 cells*

M-1 cells, which were serum-deprived for 24 h, were treated with 500  $\mu$ M of NOC18, 5  $\mu$ M of ODQ, and both NOC18 and ODQ. (a: mRNA expression of prostasin) Twenty-four hours after treatment, total RNA was extracted from M-1 cells and 1  $\mu$ g of total RNA was reverse-transcribed to cDNA with oligo dT and random primers. The abundance of each mRNA was normalized for GAPDH and compared with vehicle control. Values are expressed as fold increase over vehicle. (b: membrane expression of prostasin, c: secretion of prostasin) Twenty-four hours after treatment, five milliliters of culture medium were TCA-precipitated and 10  $\mu$ g of membrane fraction were subjected to SDS-PAGE. The secretion and membrane expression of prostasin was determined by immunoblotting using the anti-prostasin antibody. The bands were quantitated with densitometry. The blot shown is representative of 6 separate experiments. Values are expressed as fold increase over control. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (N =5). \*  $P < 0.001$  (v.s. vehicle).

さらに cGMP についても検討を行うために、cGMP アナログである 8-bromo cGMP と dibutylyl cGMP の 2 種を使用した。

Figure 22a に 500 $\mu$ M の 8-bromo cGMP または dibutylyl cGMP を M-1 細胞に負荷したときのプロスタシンの mRNA の発現量の変化を示す。2 種の cGMP アナログはプロスタシンの mRNA の発現量を変化させなかった。さらに figure 22b、22c に示すようにプロスタシンの膜発現量および分泌量に cGMP アナログは影響を与えなかった。これらの結果より NO によるプロスタシンの発現抑制はグアニル酸シクラーゼ-cGMP 系を介さずに別の経路を介している可能性が示唆された。



Naoki Wakida, et al., *J Am Soc Nephrol*. in submit



## Figure 22

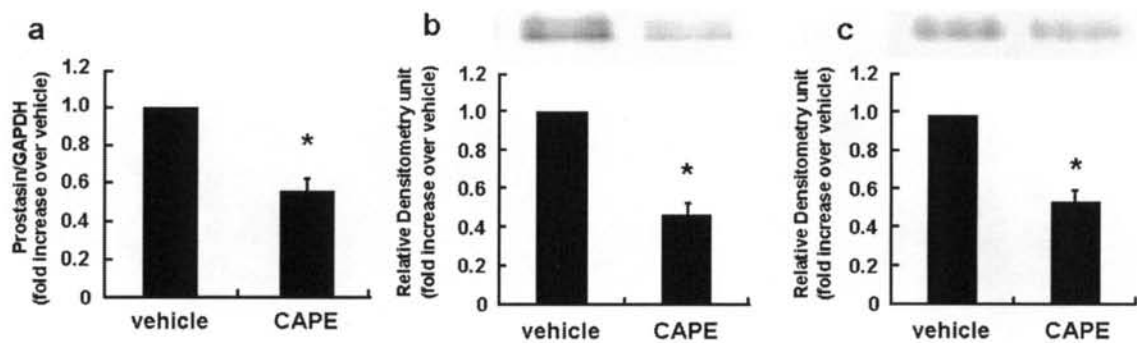
### *Effect of cGMP analogue on the expression of prostasin in M-1 cells*

M-1 cells, which were serum-deprived for 24 h, were treated with 500  $\mu$ M of 8-bromo cGMP and 500  $\mu$ M of dibutyl cGMP. (a: mRNA expression of prostasin) Twenty-four hours after treatment, total RNA was extracted from M-1 cells and 1  $\mu$ g of total RNA was reverse-transcribed to cDNA with oligo dT and random primers. The abundance of each mRNA was normalized for GAPDH and compared with vehicle control. Values are expressed as fold increase over vehicle. (b: membrane expression of prostasin, c: secretion of prostasin) Twenty-four hours after treatment, five milliliters of culture medium were TCA-precipitated and 10  $\mu$ g of membrane fraction were subjected to SDS-PAGE. The secretion and membrane expression of prostasin was determined by immunoblotting using the anti-prostasin antibody. The bands were quantitated with densitometry. The blot shown is representative of 5 separate experiments. Values are expressed as fold increase over control. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (N = 5).

## NF- $\kappa$ B 阻害によるプロスタシンの発現抑制

NOは nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)を介してサイトカインの発現量を調節していることも知られている。これまでに NO は NF- $\kappa$ B の核移行を阻害するということが報告されている(35-37)。これらの知見より NO によるプロスタシンの発現抑制は NO による NF- $\kappa$ B の核移行阻害によるのではないかと考えた。NF- $\kappa$ B の核移行阻害によるプロスタシンの発現変化について検討するために、NF- $\kappa$ B の核移行阻害薬である caffeic acid phenethyl ester (CAPE)を使用してプロスタシンの発現量変化について検討を行った。

Figure 23a にプロスタシンの mRNA 変化を示す。1 $\mu$ M の CAPE を作用させるとプロスタシンの mRNA 発現量が  $44.0 \pm 6.6\%$  減少した。Figure 23b に示すように、プロスタシンの膜発現量は CAPE によって  $52.7 \pm 7.4\%$  減少した。さらにプロスタシンの分泌量も同様に  $46.2 \pm 4.5\%$  減少した(figure 23c)。この結果より NO によるプロスタシンの発現抑制は NO による NF- $\kappa$ B の核移行阻害による可能性が示唆された。



Naoki Wakida, et al., *J Am Soc Nephrol*. in submit

**Figure 23**

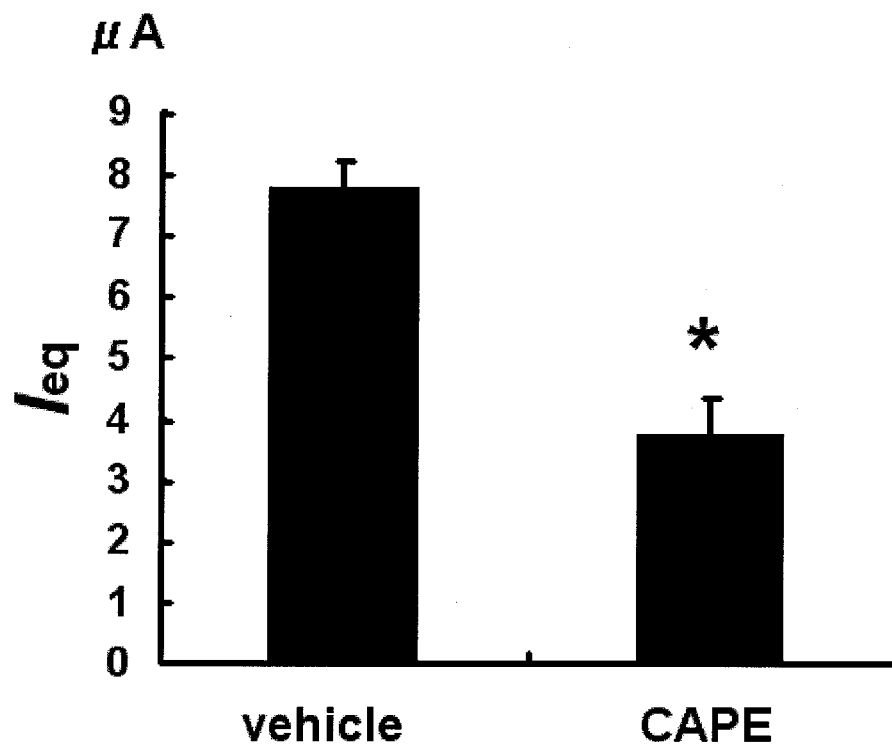
***Effect of CAPE, a nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), on the expression of prostasin in M-1 cells***

M-1 cells, which were serum-deprived for 24 h, were treated with 1  $\mu$ M of CAPE. (a: mRNA expression of prostasin) Twenty-four hours after treatment, total RNA was extracted from M-1 cells and 1  $\mu$ g of total RNA was reverse-transcribed to cDNA with oligo dT and random primers. The abundance of each mRNA was normalized for GAPDH and compared with vehicle control. Values are expressed as fold increase over vehicle. (b: membrane expression of prostasin, c: secretion of prostasin) Twenty-four hours after treatment, five milliliters of culture medium were TCA-precipitated and 10  $\mu$ g of membrane fraction were subjected to SDS-PAGE. The secretion and membrane expression of prostasin was determined by immunoblotting using the anti-prostasin antibody. The bands were quantitated with densitometry. Values are expressed as fold increase over control. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (N = 5). \*  $P < 0.01$ .

## NF- $\kappa$ B 阻害による ENaC 活性の抑制

Figure 23 より NF- $\kappa$ B の核移行阻害によってプロスタシンの発現が抑制され、それに伴って ENaC 活性を抑制している可能性が示唆された。そこで私たちは M-1 細胞に 1 $\mu$ M の CAPE を投与して、ENaC 活性を測定した。

Figure 24 に Na 電流の変化を示す。1 $\mu$ M の CAPE は有意に Na 電流を抑制し、ENaC 活性が約 50%抑制されていた(Vehicle:  $7.8 \pm 0.4 \mu\text{A}$ , CAPE:  $3.8 \pm 0.6 \mu\text{A}$ )。これらの結果よりプロスタシンの発現抑制と同様に、NF- $\kappa$ B の核移行阻害も ENaC 活性を抑制することが示唆された。



*Naoki Wakida, et al., J Am Soc Nephrol. in submit*

**Figure 24**

***Effect of CAPE on sodium transport in M-1 cells***

M-1 cells were deprived of serum for 24 hours and 1  $\mu M$  of CAPE or vehicle was applied to apical side. Twenty-four hours after treatment,  $I_{eq}$  was determined as the ratio of  $V_{te}$  to  $R_{te}$  and was normalized by dividing  $I_{eq}$  by the surface area (1.13 cm) of active membrane. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 12). \* $P < 0.005$ .

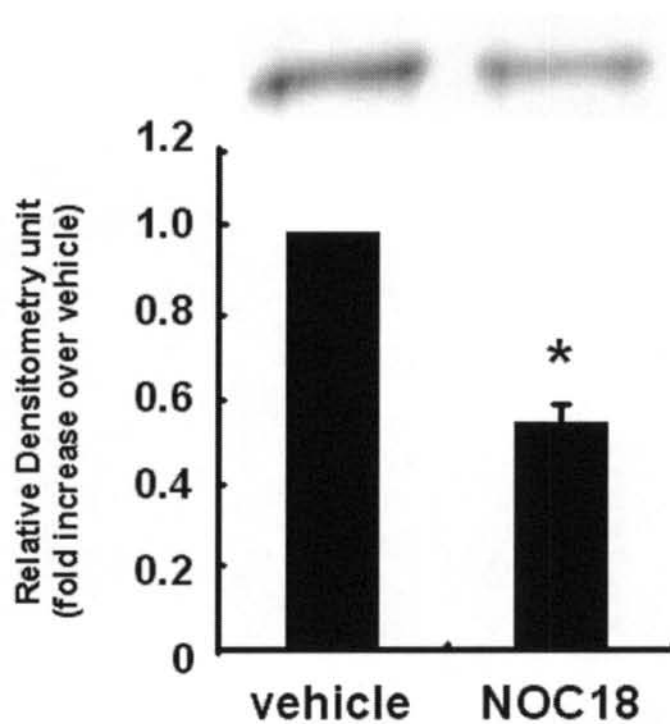
## M-1 細胞における NO による NF- $\kappa$ B の核移行阻害

CAPE も NO と同様にプロスタシンの発現を抑制することによって ENaC 活性を抑制することが示唆された。これまでに NO は NF- $\kappa$ B の核移行を阻害するということが報告されているが、腎臓における NO の NF- $\kappa$ B の核移行に与える影響については検討されていない。今回私たちは M-1 細胞において NO による

NF- $\kappa$ B の核移行についてイムノブロットィングおよび免疫組織化学の手法を用いて検討を行った。

Figure 25 に M-1 細胞の核蛋白を NF- $\kappa$ B の p65 の抗体を用いてイムノブロットィングした結果を示す。500 $\mu$ M の NO を M-1 細胞に投与することによって、核内の NF- $\kappa$ B (p65) の量が有意に減っていた ( $p<0.005$   $n=5$ )。

Figure 26 に M-1 細胞を免疫組織化学の手法を用いて NF- $\kappa$ B (p65) の抗体で NF- $\kappa$ B を染めた結果を示す。Vehicle (左側) では NF- $\kappa$ B は核内にも細胞質内にも染まっていた。しかし NO を負荷することによって NF- $\kappa$ B の核内移行が抑制され、細胞質の染まりが強くなっていた (中央)。さらにポジティブコントロールとして CAPE を負荷することによって NF- $\kappa$ B の染色を行った (右側)。NO と同様に NF- $\kappa$ B の核内移行が抑制され、細胞質の染まりが強くなっていた。これらの結果より M-1 細胞において NO は NF- $\kappa$ B の核移行を抑制することが示唆された。

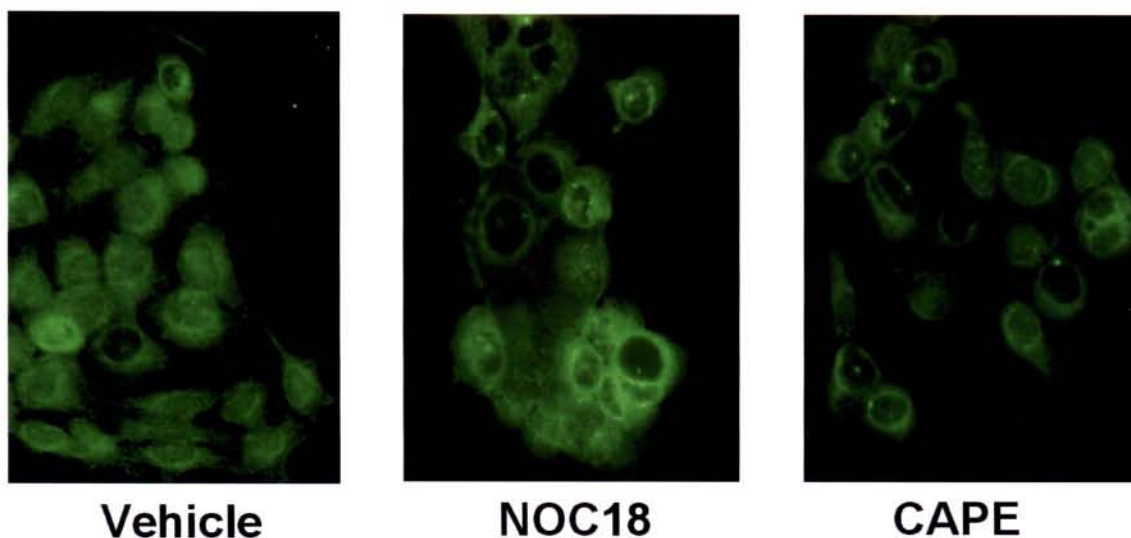


Naoki Wakida, et al., *J Am Soc Nephrol. in submit*

**Figure 25**

***Effect of NO on nuclear translocation of NF- $\kappa$ B in M-1 cells using western blot***

M-1 cells, which were serum-deprived for 24 hours, were treated with 500  $\mu$  M of NOC18. Twenty-four hours after treatment, nuclear proteins were extracted from M-1 cells and 10  $\mu$ g of nuclear proteins were subjected to SDS-PAGE. The nuclear translocation of NF- $\kappa$ B was determined by immunoblotting using rabbit polyclonal antibody against NF- $\kappa$ B p65. The bands were quantitated with densitometry. The blot shown is representative of 5 separate experiments. Values are expressed as fold increase over vehicle. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (N = 5). \*  $P < 0.005$ .



*Naoki Wakida, et al., JAm Soc Nephrol. in submit*

**Figure 26**

***The translocation of NF- $\kappa$ B to the nucleus using immunocytochemistry***

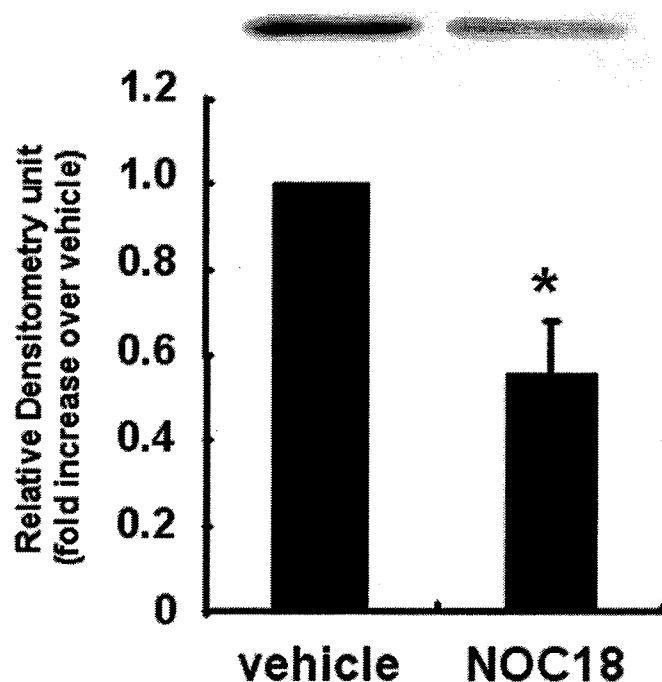
M-1 cells were incubated with vehicle, 500  $\mu$ M NOC18, and 1  $\mu$ M CAPE for 24 hours. Twenty-four hours after treatment, M-1 cells were washed two times with phosphate buffered saline (PBS), and fixed 4 % paraformaldehyde for 30 min at room temperature. The nuclear translocation of NF- $\kappa$ B in M-1 cells was determined by immunocytochemistry using rabbit polyclonal antibody against NF- $\kappa$ B p65.



## M-1 細胞における NOC18 (NO) による NF- $\kappa$ B の核移行阻害の解明

NF- $\kappa$ B は高親和性の阻害因子である inhibitor- $\kappa$ B $\alpha$  (I- $\kappa$ B $\alpha$ )と結合することにより細胞質中にとどめられている。これまでの研究により I- $\kappa$ B $\alpha$ が IKK $\beta$ によってリン酸化され、ユビキチン・プロテアソーム系によって分解されることにより NF- $\kappa$ B は活性化され、核内に移行することが知られている。NO による NF- $\kappa$ B の核移行の阻害メカニズムとして2通り報告されている。1つ目は I- $\kappa$ B $\alpha$ のリン酸化を抑制し、ユビキチン化による消失を抑制する(37;38)。2つ目は S-ニトロソチオール類の NO ドナーなどによって NF- $\kappa$ B をニトロソ化することによって NF- $\kappa$ B の核移行を阻害する(36)。NOC18 は S-ニトロソチオール類の NO ドナーではなく、NONOate 類の NO ドナーであるので、I- $\kappa$ B $\alpha$ のリン酸化について検討を行った。

Figure 27 に M-1 細胞において細胞質中のリン酸化 I- $\kappa$ B $\alpha$ の量をイムノブロッティングによって検討を行った結果を示す。NO を負荷することによってリン酸化 I- $\kappa$ B $\alpha$ の量が有意に減っていた。この結果より NO は I- $\kappa$ B $\alpha$ のリン酸化を抑制することによって I- $\kappa$ B $\alpha$ の遊離、分解を抑制し NF- $\kappa$ B の核移行を阻害する可能性が示唆された。



*Naoki Wakida, et al., J Am Soc Nephrol. in submit*

**Figure 27**

***Effect of NO on phosphorylation of I- $\kappa$ B $\alpha$  in M-1 cells***

M-1 cells, which were serum-deprived for 24 hours, were treated with 500  $\mu$ M of NOC18. 10  $\mu$ g of cytosolic fraction was subjected to SDS-PAGE. The phosphorylation of I- $\kappa$ B $\alpha$  was determined by immunoblotting using the anti-p-I- $\kappa$ B $\alpha$  antibody. The bands were quantitated with densitometry. The blot shown is representative of 4 separate experiments. Values are expressed as fold increase over control. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (N = 4). \*  $P < 0.01$ .

## Ⅷ 考察

Hughey らは ENaC の  $\alpha$  や  $\gamma$  サブユニットがセリンプロテアーゼによってプロセシングされることによって活性型の ENaC となることを報告した(39;40)。Kleyman らはプロスタシンが ENaC  $\gamma$  サブユニットの細胞外ループの 186 番目のアミノ酸を切断し、さらに furin が同サブユニットの細胞外ループの 143 番目のアミノ酸を切断することによって、43 アミノ酸より構成されるインヒビトリードメインを切り出し、開口確率を増加させると報告している(12)。プロスタシンは ENaC のアクチベーター（調節因子）であるので、プロスタシンは Na バランスや体液の保持、血圧の調節において重要な役割を果たしている。私たちはプロスタシンを中心とした Na の再吸収、血圧調整の分子基盤を解明するために、PN-1 とプロスタシンとの相互作用による ENaC の活性調節と NO による Na 利尿作用におけるプロスタシンの役割および NO によるプロスタシンの発現抑制メカニズムについて研究を行った。

第一章の研究により私たちは oocyte において PN-1 がプロスタシンによる ENaC の活性化を抑制することを示した。この結果より PN-1 はプロスタシンによる ENaC の活性化を抑制することによって間接的に ENaC 活性を抑制することが示唆された。さらに M-1 細胞において siRNA を用いて PN-1 をノックダウンすることによって ENaC 活性が上昇することも示した。この結果は M-1 細胞において PN-1 が ENaC の重要なネガティブレギュレーターあることが示唆された。

TGF- $\beta$ 1 は腎臓の集合尿細管細胞において Na の再吸収を抑制することが知られている(18-21)。以前私たちは M-1 細胞において TGF- $\beta$ 1 はプロスタシンの発現を減少させることによって Na の再吸収を抑制すると報告した(22)。肺胞細胞

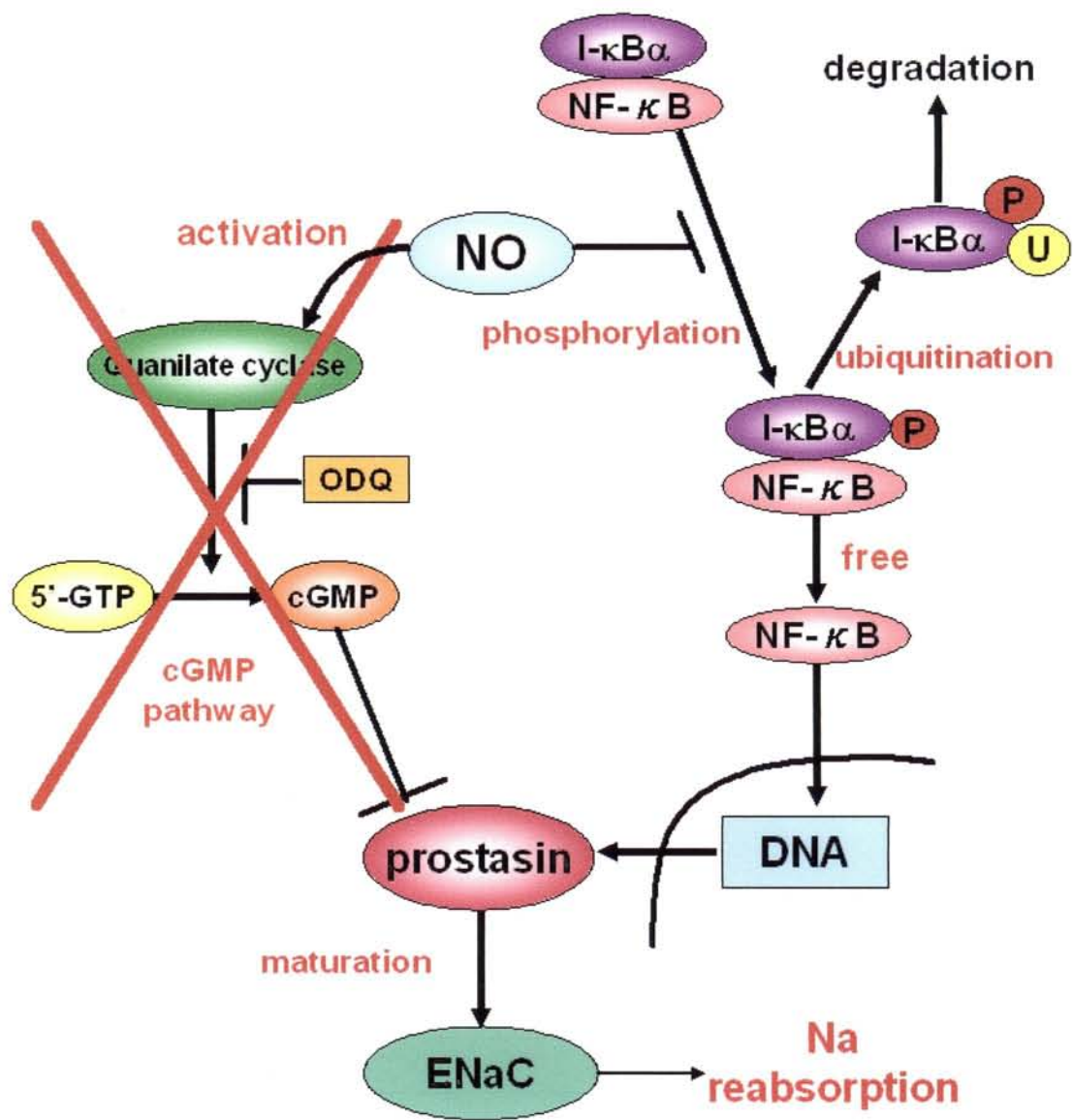
において TGF- $\beta$ 1 は ENaC  $\alpha$  の発現を減少させるという報告はあるが、腎臓 (M-1 細胞) における検討は行われていない(23)。今回私たちは M-1 細胞において TGF- $\beta$ 1 は PN-1 の発現を増加させ、ENaC  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の発現を抑制することを示した。TGF- $\beta$ 1 による Na 再吸収抑制のメカニズムは①プロスタシンの発現の抑制、②PN-1 の発現の、③直接 ENaC の発現の抑制の 3 通りが示唆された。このように独立した 3 つの系によって TGF- $\beta$ 1 はナトリウムの再吸収を抑制している可能性が示唆された (figure 12)。

アルドステロンは生体内の体液や電解質バランスを調節する重要なホルモンである。アルドステロンは K-Ras(41;42)、serum and glucocorticoid-inducible kinase (sgk)(43;44)、glucocorticoid-induced leucine zipper protein (Gilz)(45;46)によって腎臓における Na 再吸収を促進することが知られている。以前私たちの研究グループはアルドステロンがプロスタシンの発現量を増加させることによって Na の再吸収を促進すると報告した(24)。今回私たちは M-1 細胞においてアルドステロンは PN-1 の発現を減少させ、ENaC の発現を増加させることを示した。プロスタシンを中心としたアルドステロンによる Na 再吸収促進のメカニズムは①直接 ENaC の発現の増加、②プロスタシンの発現量の増加、③PN-1 の発現量の減少の 3 通りが示唆された (figure 15)。アルドステロンはこれまで知られていた K-Ras、sgk、Gilz とは別の独立した 3 つの系によって Na の再吸収を促進している可能性が示唆された。

第二章の研究より M-1 細胞に NO を 24 時間作用させることによって ENaC 活性を抑制することを示した。その ENaC 活性抑制は NO によるプロスタシンのニトロ化もしくはニトロソ化ではなくプロスタシンの発現抑制によることも示した。さらにプロスタシンの発現抑制はグアニル酸シクラーゼ阻害薬である ODC

や cGMP アナログなどによって変化を認めなかったので、プロスタシンの発現抑制はグアニル酸シクラーゼ-cGMP 系ではなくて別の経路によって抑制されることが示唆された。NO の非グアニル酸シクラーゼ-cGMP 系の作用として NF- $\kappa$ B の核移行を阻害する作用が知られている。NF- $\kappa$ B の阻害物質である CAPE はプロスタシンの発現や ENaC 活性を有意に抑制したことより、NO によるプロスタシンの発現抑制は NF- $\kappa$ B の核移行阻害を介している可能性が示唆された。さらに NF- $\kappa$ B の p65 に対する抗体を使用してイムノブロットィングおよび免疫組織化学の手法により NO による NF- $\kappa$ B の核移行について検討を行った結果、NO は NF- $\kappa$ B の核移行を抑制していた。NO による NF- $\kappa$ B の核移行阻害はこれまでに 2 通りが報告されている。1 つ目は I- $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化を抑制し、ユビキチン化による消失を抑制する(37;38)。2 つ目は S-ニトロソチオール類の NO ドナーなどによって NF- $\kappa$ B をニトロソ化することによって NF- $\kappa$ B の核移行を阻害する(36)。NOC18 は S-ニトロソチオール類の NO ドナーではなく、NONOate 類の NO ドナーであるので、I- $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化について検討を行った。NO は I- $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化を有意に抑制したので、NO による NF- $\kappa$ B の核移行阻害は I- $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化抑制によることが示された。

今回の研究より得られた知見を figure 28 にまとめる。NO はグアニル酸シクラーゼ-cGMP 系を活性化させることによってプロスタシンの発現を抑制するのではなく、I- $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化を抑制する。I- $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化が抑制されることにより、ユビキチン・プロテアソーム系によって I- $\kappa$ B $\alpha$  が分解されないで、NF- $\kappa$ B の核移行が抑制される。NF- $\kappa$ B の核移行が抑制されることによってプロスタシンの発現量が抑制される。プロスタシンの発現が抑制されることによって ENaC を十分に活性化できないので Na の再吸収が抑制される。



**Figure 28**

*The mechanism of NO-mediated suppression of prostatic expression and inhibition of Na reabsorption*

Li らはアルドステロンが I- $\kappa$ B $\alpha$ の消失を促進させることによって NF- $\kappa$ B の核移行を促進すると報告している(47)。さらにアルドステロンは NO の産生を抑制する報告もある(34;48)。NF- $\kappa$ B はプロスタシンの発現を調節することより、以前私たちが報告したアルドステロンによるプロスタシンの発現の亢進は NF- $\kappa$ B を介している可能性が示唆される。つまりアルドステロンは NF- $\kappa$ B の核移行を促進作用と NO による NF- $\kappa$ B の核移行阻害作用の抑制によってプロスタシンの発現を亢進する可能性が示唆される。一方ヒトプロスタシン過剰発現マウスにおいて lipopolysaccharide (LPS)によって誘導される iNOS の発現が抑制されるという報告がある(49)。NO はプロスタシンの発現を抑制することにより、NO とプロスタシンの間にはポジティブフィードバックが存在する可能性がある。

私たちは M-1 細胞において TGF- $\beta$ 1 がプロスタシンの発現量を減少させ、 $^{22}$ Na の取り込みを増加させることを報告している(22)。上皮細胞やリンパ球において TGF- $\beta$ 1 は NF- $\kappa$ B /cRel の活性を I- $\kappa$ B を介して阻害する報告がある(50;51)。また私たちは TGF- $\beta$ 1 は I- $\kappa$ B の発現を増やすことより cRel 活性を抑制すると報告している。TGF- $\beta$ 1 は I- $\kappa$ B の発現を増やすことにより NF- $\kappa$ B の核移行を阻害してプロスタシンの発現を抑制している可能性が示唆された。

PN-1 は ENaC のネガティブレギュレーターであることが明らかとなり、プロスタシンと PN-1 との相互作用による ENaC 活性の調節という新たな機序を明らかにした。さらにプロスタシンの発現は転写因子である NF- $\kappa$ B によって制御されていることも明らかとなった。プロスタシンを中心とした集合尿細管の Na 再吸収において新たに PN-1 や NF- $\kappa$ B の因子が明らかとなった。Na 代謝異常や高血圧の治療薬の開発において PN-1 や NF- $\kappa$ B はプロスタシン以外の新しいターゲットとして注目されることが考えられる。

## IX 結語

これまでセリンプロテアーゼによる ENaC の活性化については報告されていたが、セリンプロテアーゼ（プロスタシン）とセリンプロテアーゼインヒビター（PN-1）との相互作用によって ENaC 活性を調節することを明らかにしたのは初めてである。また、NO による Na 利尿においてプロスタシンの発現抑制による ENaC の活性抑制の関与が明らかになった。NO によるプロスタシン発現抑制は従来のグアニル酸シクラーゼ-cGMP を介さず、NF- $\kappa$ B を介す非常にめずらしいメカニズムであった。本研究によってプロスタシンを中心とした Na 再吸収、血圧調節の分子基盤が解明されつつある。しかし、プロスタシンの活性化に関わるプロテアーゼカスケードにおいて、プロ体のプロスタシン(pro 型)を活性型のプロスタシン(mature 型)に変換させるプロセシングエンザイムについては未解明である。このプロセシングエンザイムを同定することにより、このプロスタシンを中心としたプロテアーゼカスケードが解明されれば ACE 阻害薬のようなプロテアーゼ活性阻害による降圧治療薬の標的が明らかとなり、新規作用機序による降圧薬の開発に大きな貢献をもたらす可能性がある。プロスタシンのプロテアーゼカスケードを明らかにしていくために今後プロスタシンのプロセシングエンザイムを同定する必要があると考えられる。



## X参考文献

- (1) Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, Rossier BC. Amiloride-sensitive epithelial Na<sup>+</sup> channel is made of three homologous subunits. *Nature* 1994 February 3;367(6462):463-7.
- (2) Canessa CM, Horisberger JD, Rossier BC. Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature* 1993 February 4;361(6411):467-70.
- (3) Garty H, Palmer LG. Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev* 1997 April;77(2):359-96.
- (4) Schild L, Canessa CM, Shimkets RA, Gautschi I, Lifton RP, Rossier BC. A mutation in the epithelial sodium channel causing Liddle disease increases channel activity in the *Xenopus laevis* oocyte expression system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 June 6;92(12):5699-703.
- (5) Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, Nelson-Williams C, Hansson JH, Schambelan M, Gill JR, Jr., Ulick S, Milora RV, Findling JW, . Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell* 1994 November 4;79(3):407-14.
- (6) Tamura H, Schild L, Enomoto N, Matsui N, Marumo F, Rossier BC. Liddle disease caused by a missense mutation of beta subunit of the epithelial sodium channel gene. *J Clin Invest* 1996 April 1;97(7):1780-4.
- (7) Yu JX, Chao L, Chao J. Prostaticin is a novel human serine proteinase from seminal fluid. Purification, tissue distribution, and localization in prostate gland. *J Biol Chem* 1994 July 22;269(29):18843-8.
- (8) Yu JX, Chao L, Chao J. Molecular cloning, tissue-specific expression, and cellular localization of human prostaticin mRNA. *J Biol Chem* 1995 June 2;270(22):13483-9.
- (9) Chen LM, Skinner ML, Kauffman SW, Chao J, Chao L, Thaler CD, Chai KX. Prostaticin is a glycosylphosphatidylinositol-anchored active serine protease. *J Biol Chem* 2001 June 15;276(24):21434-42.

- (10) Yu JX, Chao L, Ward DC, Chao J. Structure and chromosomal localization of the human prostaticin (PRSS8) gene. *Genomics* 1996 March 15;32(3):334-40.
- (11) Adachi M, Kitamura K, Miyoshi T, Narikiyo T, Iwashita K, Shiraishi N, Nonoguchi H, Tomita K. Activation of epithelial sodium channels by prostaticin in *Xenopus* oocytes. *J Am Soc Nephrol* 2001 June;12(6):1114-21.
- (12) Bruns JB, Carattino MD, Sheng S, Maarouf AB, Weisz OA, Pilewski JM, Hughey RP, Kleyman TR. Epithelial Na<sup>+</sup> channels are fully activated by furin- and prostaticin-dependent release of an inhibitory peptide from the gamma-subunit. *J Biol Chem* 2007 March 2;282(9):6153-60.
- (13) Wang C, Chao J, Chao L. Adenovirus-mediated human prostaticin gene delivery is linked to increased aldosterone production and hypertension in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003 April;284(4):R1031-R1036.
- (14) Chen LM, Zhang X, Chai KX. Regulation of prostaticin expression and function in the prostate. *Prostate* 2004 April 1;59(1):1-12.
- (15) Baker JB, Low DA, Simmer RL, Cunningham DD. Protease-nexin: a cellular component that links thrombin and plasminogen activator and mediates their binding to cells. *Cell* 1980 August;21(1):37-45.
- (16) Gronke RS, Bergman BL, Baker JB. Thrombin interaction with platelets. Influence of a platelet protease nexin. *J Biol Chem* 1987 March 5;262(7):3030-6.
- (17) Scott RW, Bergman BL, Bajpai A, Hersh RT, Rodriguez H, Jones BN, Barreda C, Watts S, Baker JB. Protease nexin. Properties and a modified purification procedure. *J Biol Chem* 1985 June 10;260(11):7029-34.
- (18) Husted RF, Sigmund RD, Stokes JB. Mechanisms of inactivation of the action of aldosterone on collecting duct by TGF-beta. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000 March;278(3):F425-F433.
- (19) Husted RF, Matsushita K, Stokes JB. Induction of resistance to mineralocorticoid hormone in cultured inner medullary collecting duct cells by TGF-beta 1. *Am J Physiol* 1994 November;267(5 Pt 2):F767-F775.

- (20) Husted RF, Stokes JB. Separate regulation of Na<sup>+</sup> and anion transport by IMCD: location, aldosterone, hypertonicity, TGF-beta 1, and cAMP. *Am J Physiol* 1996 August;271(2 Pt 2):F433-F439.
- (21) Stokes JB. Physiologic resistance to the action of aldosterone. *Kidney Int* 2000 April;57(4):1319-23.
- (22) Tuyen dG, Kitamura K, Adachi M, Miyoshi T, Wakida N, Nagano J, Nonoguchi H, Tomita K. Inhibition of prostatic expression by TGF-beta1 in renal epithelial cells. *Kidney Int* 2005 January;67(1):193-200.
- (23) Frank J, Roux J, Kawakatsu H, Su G, Dagenais A, Berthiaume Y, Howard M, Canessa CM, Fang X, Sheppard D, Matthay MA, Pittet JF. Transforming growth factor-beta1 decreases expression of the epithelial sodium channel alphaENaC and alveolar epithelial vectorial sodium and fluid transport via an ERK1/2-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2003 November 7;278(45):43939-50.
- (24) Narikiyo T, Kitamura K, Adachi M, Miyoshi T, Iwashita K, Shiraishi N, Nonoguchi H, Chen LM, Chai KX, Chao J, Tomita K. Regulation of prostatic expression by aldosterone in the kidney. *J Clin Invest* 2002 February;109(3):401-8.
- (25) Asher C, Wald H, Rossier BC, Garty H. Aldosterone-induced increase in the abundance of Na<sup>+</sup> channel subunits. *Am J Physiol* 1996 August;271(2 Pt 1):C605-C611.
- (26) Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA. Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest* 1999 October;104(7):R19-R23.
- (27) May A, Puoti A, Gaeggeler HP, Horisberger JD, Rossier BC. Early effect of aldosterone on the rate of synthesis of the epithelial sodium channel alpha subunit in A6 renal cells. *J Am Soc Nephrol* 1997 December;8(12):1813-22.
- (28) Lahera V, Salom MG, Fiksen-Olsen MJ, Raij L, Romero JC. Effects of NG-monomethyl-L-arginine and L-arginine on acetylcholine renal response. *Hypertension* 1990 June;15(6 Pt 1):659-63.
- (29) Lahera V, Salom MG, Miranda-Guardiola F, Moncada S, Romero JC. Effects of

- NG-nitro-L-arginine methyl ester on renal function and blood pressure. *Am J Physiol* 1991 December;261(6 Pt 2):F1033-F1037.
- (30) Yun JC, Oriji G, Gill JR, Jr., Coleman BR, Peters J, Keiser H. Role of muscarinic receptors in renal response to acetylcholine. *Am J Physiol* 1993 July;265(1 Pt 2):F46-F52.
  - (31) Stoos BA, Carretero OA, Farhy RD, Scicli G, Garvin JL. Endothelium-derived relaxing factor inhibits transport and increases cGMP content in cultured mouse cortical collecting duct cells. *J Clin Invest* 1992 March;89(3):761-5.
  - (32) Stoos BA, Carretero OA, Garvin JL. Endothelial-derived nitric oxide inhibits sodium transport by affecting apical membrane channels in cultured collecting duct cells. *J Am Soc Nephrol* 1994 May;4(11):1855-60.
  - (33) Stoos BA, Garcia NH, Garvin JL. Nitric oxide inhibits sodium reabsorption in the isolated perfused cortical collecting duct. *J Am Soc Nephrol* 1995 July;6(1):89-94.
  - (34) Helms MN, Yu L, Malik B, Kleinhenz DJ, Hart CM, Eaton DC. Role of SGK1 in nitric oxide inhibition of ENaC in Na<sup>+</sup>-transporting epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005 September;289(3):C717-C726.
  - (35) De CR, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr., Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995 July;96(1):60-8.
  - (36) Okamoto T, Valacchi G, Gohil K, Akaike T, van d, V. S-nitrosothiols inhibit cytokine-mediated induction of matrix metalloproteinase-9 in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002 October;27(4):463-73.
  - (37) Peng HB, Libby P, Liao JK. Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem* 1995 June 9;270(23):14214-9.
  - (38) Katsuyama K, Shichiri M, Marumo F, Hirata Y. NO inhibits cytokine-induced iNOS expression and NF-kappaB activation by interfering with phosphorylation and degradation of IkappaB-alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998

November;18(11):1796-802.

- (39) Hughey RP, Bruns JB, Kinlough CL, Harkleroad KL, Tong Q, Carattino MD, Johnson JP, Stockand JD, Kleyman TR. Epithelial sodium channels are activated by furin-dependent proteolysis. *J Biol Chem* 2004 April 30;279(18):18111-4.
- (40) Hughey RP, Mueller GM, Bruns JB, Kinlough CL, Poland PA, Harkleroad KL, Carattino MD, Kleyman TR. Maturation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel involves proteolytic processing of the alpha- and gamma-subunits. *J Biol Chem* 2003 September 26;278(39):37073-82.
- (41) Mastroberardino L, Spindler B, Forster I, Loffing J, Assandri R, May A, Verrey F. Ras pathway activates epithelial Na<sup>+</sup> channel and decreases its surface expression in *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell* 1998 December;9(12):3417-27.
- (42) Stockand JD, Spier BJ, Worrell RT, Yue G, Al-Baldawi N, Eaton DC. Regulation of Na(+) reabsorption by the aldosterone-induced small G protein K-Ras2A. *J Biol Chem* 1999 December 10;274(50):35449-54.
- (43) Chen SY, Bhargava A, Mastroberardino L, Meijer OC, Wang J, Buse P, Firestone GL, Verrey F, Pearce D. Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 March 2;96(5):2514-9.
- (44) varez de la RD, Canessa CM. Role of SGK in hormonal regulation of epithelial sodium channel in A6 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003 February;284(2):C404-C414.
- (45) Bhalla V, Soundararajan R, Pao AC, Li H, Pearce D. Disinhibitory pathways for control of sodium transport: regulation of ENaC by SGK1 and GILZ. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006 October;291(4):F714-F721.
- (46) Soundararajan R, Zhang TT, Wang J, Vandewalle A, Pearce D. A novel role for glucocorticoid-induced leucine zipper protein in epithelial sodium channel-mediated sodium transport. *J Biol Chem* 2005 December 2;280(48):39970-81.
- (47) Li X, Meng Y, Jiang B, Yang XS, Wang WW, Guo D, Lai ZS, Zhang ZS. [Effects of angiotensin II and aldosterone on NF-kappaB binding activity in

- hepatic stellate cells]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005 February 16;85(6):374-80.
- (48) Ikeda U, Kanbe T, Nakayama I, Kawahara Y, Yokoyama M, Shimada K. Aldosterone inhibits nitric oxide synthesis in rat vascular smooth muscle cells induced by interleukin-1 beta. *Eur J Pharmacol* 1995 July 18;290(2):69-73.
- (49) Chen LM, Wang C, Chen M, Marcello MR, Chao J, Chao L, Chai KX. Prostatin attenuates inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide-induced urinary bladder inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006 September;291(3):F567-F577.
- (50) Arsura M, Wu M, Sonenshein GE. TGF beta 1 inhibits NF-kappa B/Rel activity inducing apoptosis of B cells: transcriptional activation of I kappa B alpha. *Immunity* 1996 July;5(1):31-40.
- (51) Sovak MA, Arsura M, Zanieski G, Kavanagh KT, Sonenshein GE. The inhibitory effects of transforming growth factor beta1 on breast cancer cell proliferation are mediated through regulation of aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression. *Cell Growth Differ* 1999 August;10(8):537-44.