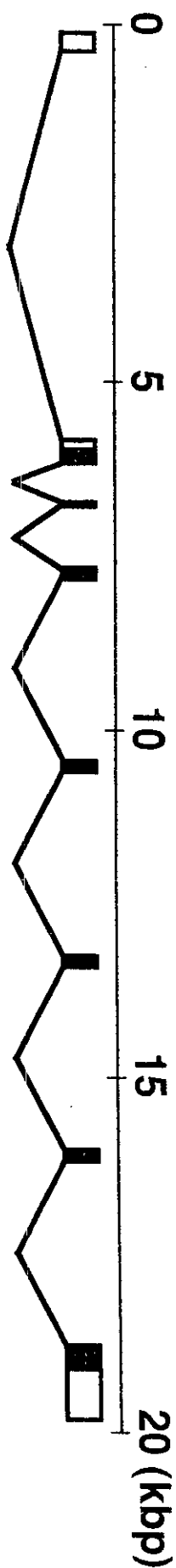


- Sugiyama, F., Yagami, K., Murakami, K., and Fukamizu, A. Renin-dependent cardiovascular and -independent brain functions revealed by renin-deficient mice. **J. Biol. Chem.** 275, 5-8 (2000)
4. Miyagishi, M., Fujii, R., Hatta, M., Yoshida, E., Araya, N., Nagafuchi, A., Ishihara, S., Nakajima, T., and Fukamizu, A. Regulation of Lef-mediated transcription and p53-dependent pathway by associating b-catenin with CBP/p300. **J. Biol. Chem.** 275, 35170-35175 (2000)
 5. Aratani, S., Fujii, R., Oishi, T., Fujita, H., Amano, T., Ohshima, T., Hagiwara, M., Fukamizu, A., and Nakajima, T. Dual roles of RNA helicase A in CREB-dependent transcription. **Mol. Cell. Biol.** 21, 4460-4469 (2001)
 6. Hisada, Y., Sugaya, T., Tanaka, S., Suzuki, Y., Ra, C., Kimura, K., and Fukamizu, A. An essential role of angiotensin II receptor type 1a in recipient kidney, not in transplanted peripheral blood leukocytes, in progressive immune-mediated renal injury. **Lab. Invest.** 81, 1243-1251 (2001)
 7. Massiera, F., Bloch-Faure, M., Ceiler, D., Murakami, K., Fukamizu, A., Gasc, J.M., Quignard-Boulange, A., Negrel, R., Ailhaud, G., Seydoux, J., Meneton, P., and Teboul, M. Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. **FASEB J.** 15, 2727-2729 (2001)
- Review—
1. Fukamizu, A., and Murakami, K. Activated and inactivated renin-angiotensin system in transgenic animals—from genes to blood pressure. **Lab. Anim. Sci.** 47, 127-131 (1997)

表1. ヒトメグジン遺伝子の構造



No.	Exon (bp)	Intron (kbp)	Donor	Acceptor
1	373 (68)	6.5	CTAGCgtgag (CCAGGtat tt)	tctaggCTGC (aaacaATGGA)
2	186 (177)	0.5	ATAAGgtcag (CCAAGgtgag)	tacagTTGCT (tgcagGTGCT)
3	51 (120)	0.7	GTCAGgtaaa (TGCAGgtatc)	aacagTCAGG (tcaaggCACA)
4	117 (129)	3.3	ATAAGgtaag (GGGAAGtaag)	tatagGACTA (aaaagGAATA)
5	118 (118)	2.5	ACATGgtgag (CAAAAggtaaa)	aaaagGCCAAA (tgtagGCCAAA)
6	143 (143)	2.1	CCAAGgtatg (ACTCGgtatg)	ttcagTGCTC (attagGCTCA)
7	147 (165)	3.2	CTGAAGtaag (AGCTGgtaag)	tacagATTGA (tgcagCTGGA)
8	1141 (986)			

カッコ内はヒト PAI-2 のデータを比較のために示す。

□, 非翻訳部位; ■, 翻訳部位

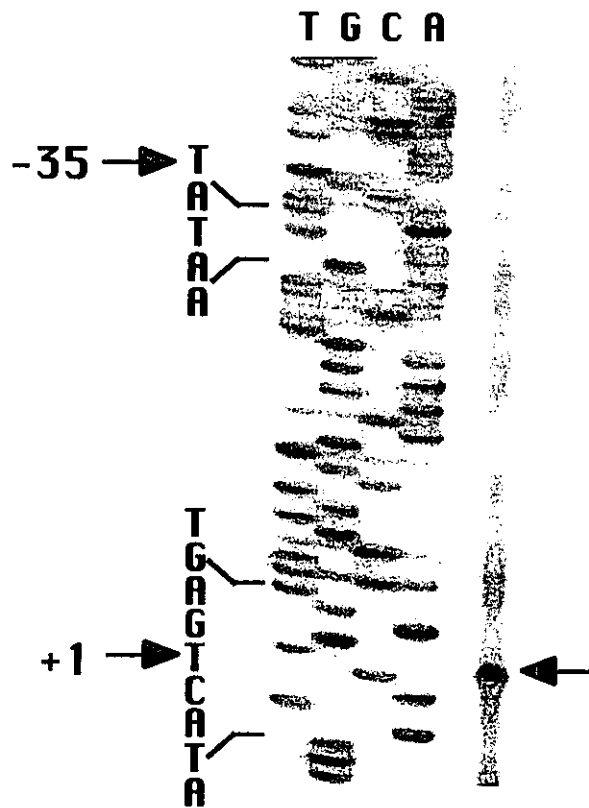


図1. ヒトメグシン転写開始点の同定

培養ヒトメサングウム細胞より調製した $10 \mu\text{g}$ の total RNA を用い primer extension 法により解析した。
 矢印で転写開始点 (+1) 及び TATA box (-35) を示す。



図2. ヒトメグシン遺伝子の座位は染色体18q21.3である

分裂中期の染色体を用いメグシン遺伝子をプローブにして検出された hybridization signalをgreen dot及び矢印で示す。
Red bandは第18染色体のセントロメア特異的probeによるsignalを示す。

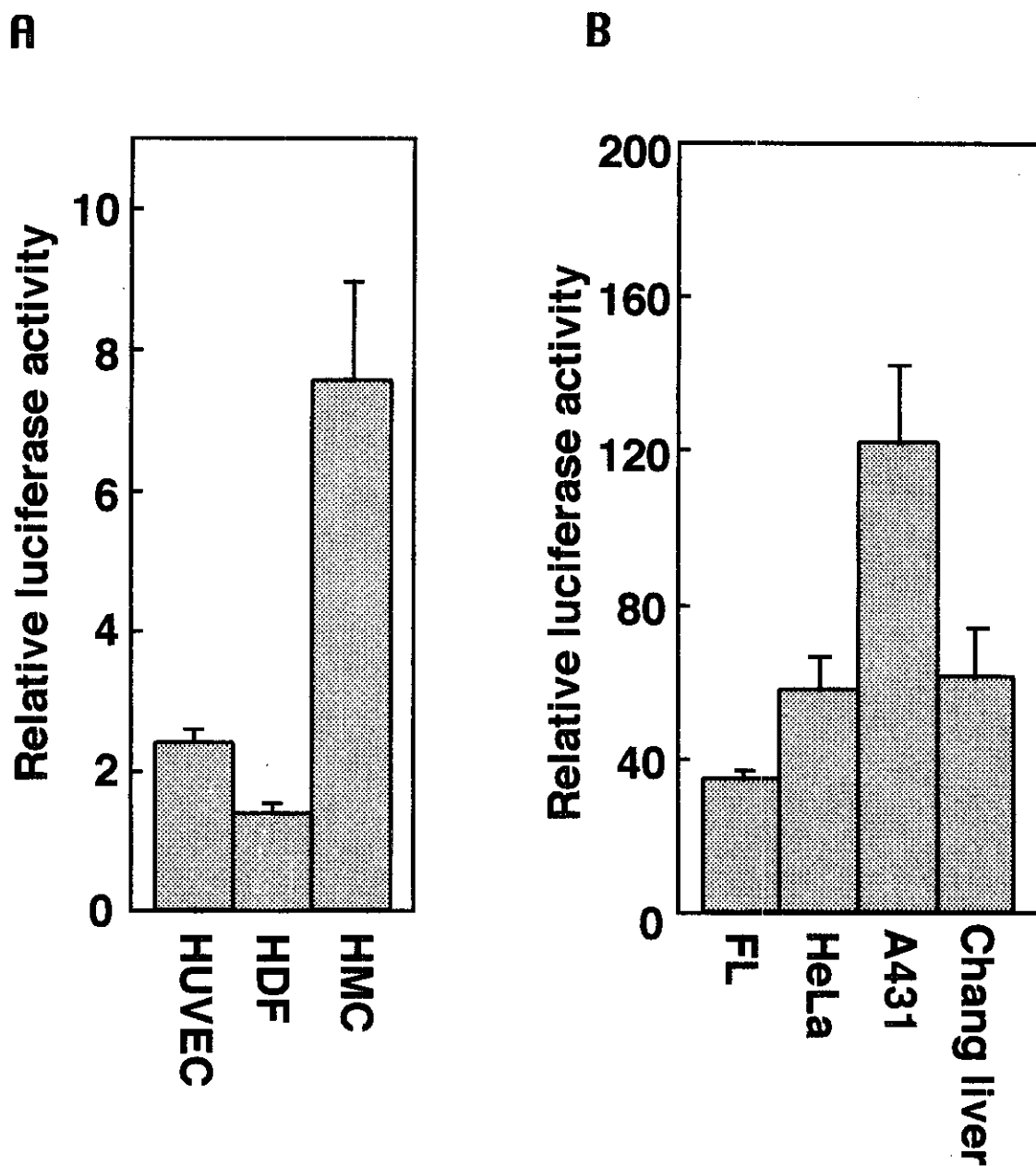


図3. ヒト初代培養細胞 (A) 及び株化細胞 (B) におけるメグシンプロモーター活性

メグシン遺伝子の5'-flanking region (-4021bpから+130bp) を含む4151bpのDNA配列をpGL3-basicベクターに組み込んだコンストラクトを各種細胞にトランスフェクションした。

トランスフェクション効率はpRLCMV *Renilla* ルシフェラーゼベクターをコトランスフェクションし、normalizeした。

HMC, ヒトメサンギウム細胞; HDF, ヒト皮膚繊維芽細胞; HUVEC, ヒト臍帯静脈血管内皮細胞

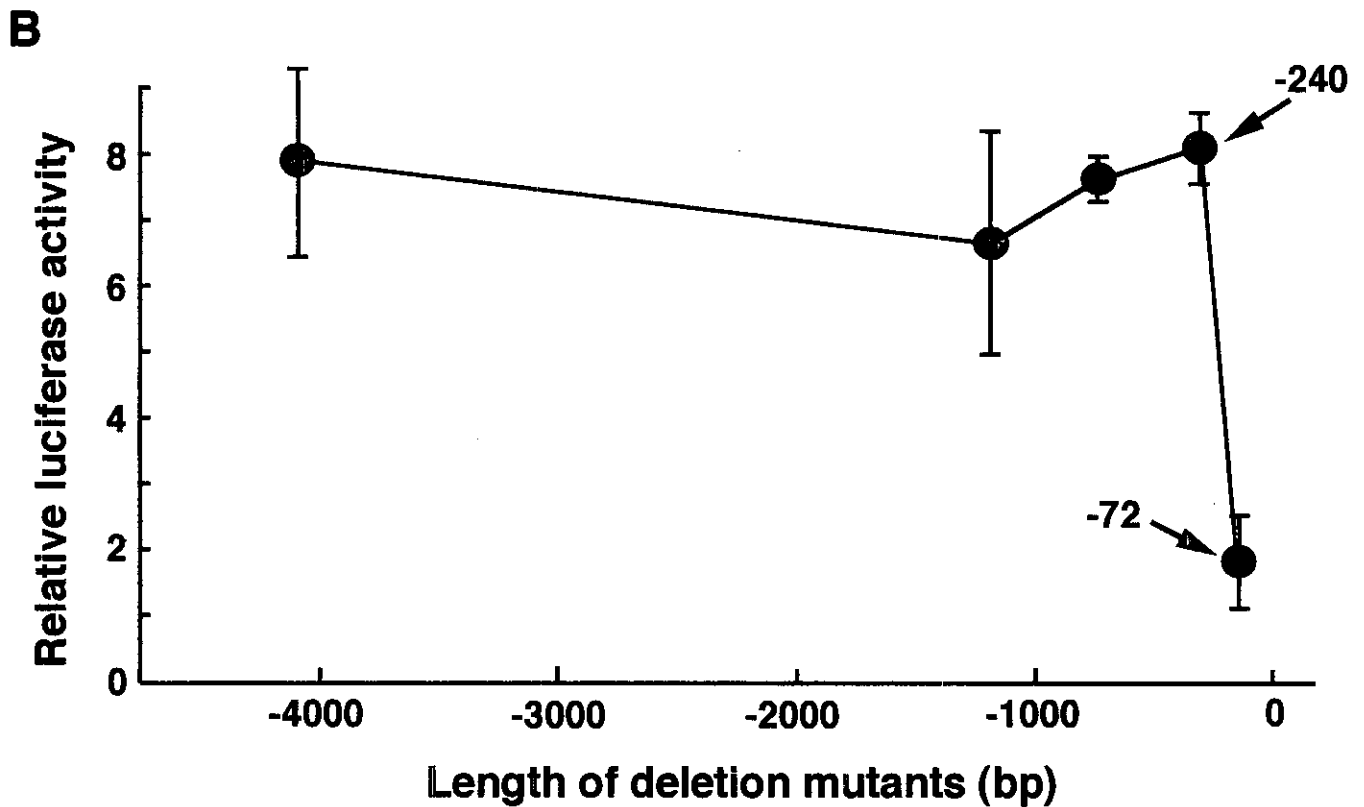
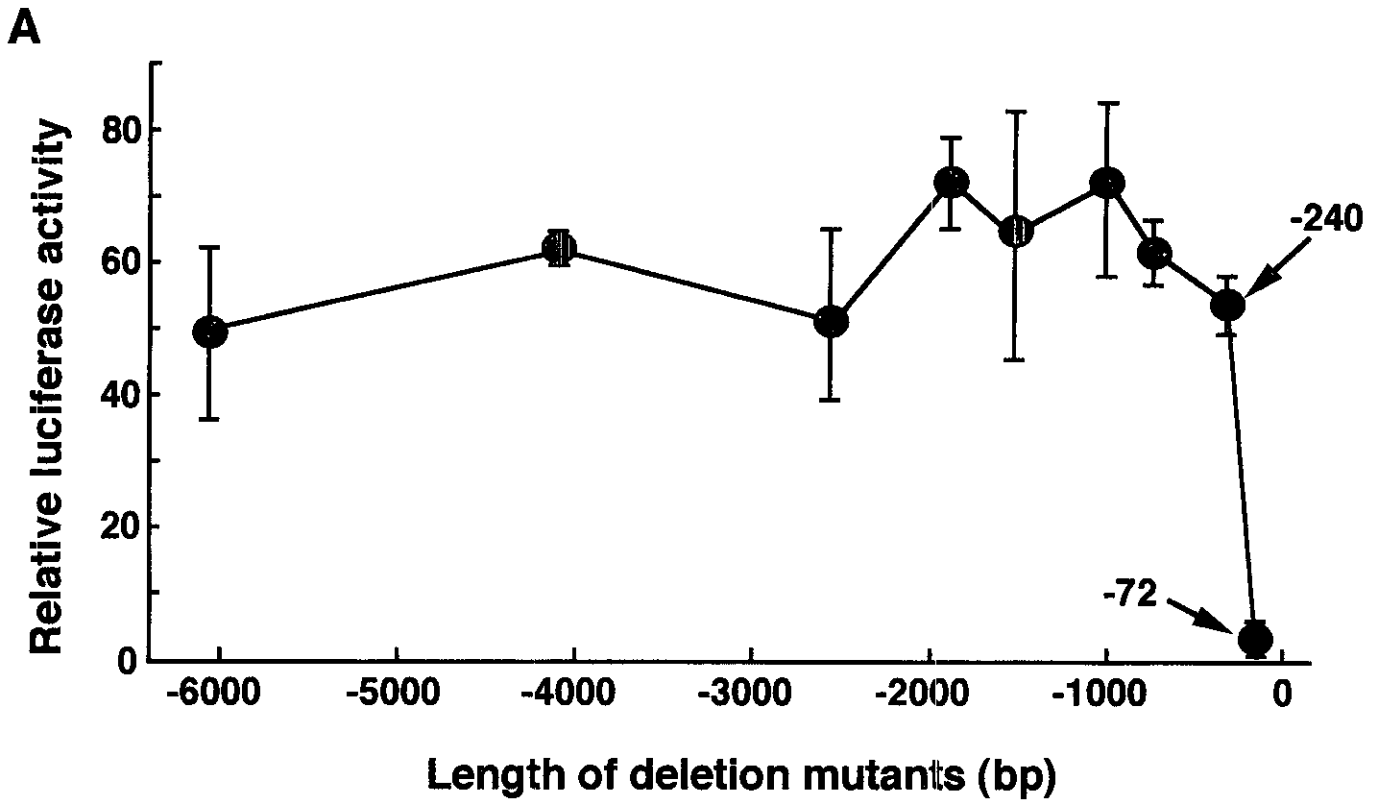


図4. 5'欠失変異株におけるメグシンプロモーター活性

メグシン遺伝子の5'-flanking region (-4021 bpから+130 bp)を含む4151 bpのDNA配列をpGL3-basicベクターに組み込んだコンストラクトをA431 (A) 及びヒトメサンギウム細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション効率はpRL CMV *Renilla* ルシフェラーゼベクターをコトランスフェクションし、normalizeした。

A

consensus AP-1 motif	N T G A G / C T C A G
incomplete AP-1 motif of megsin	C T G A T T C A C

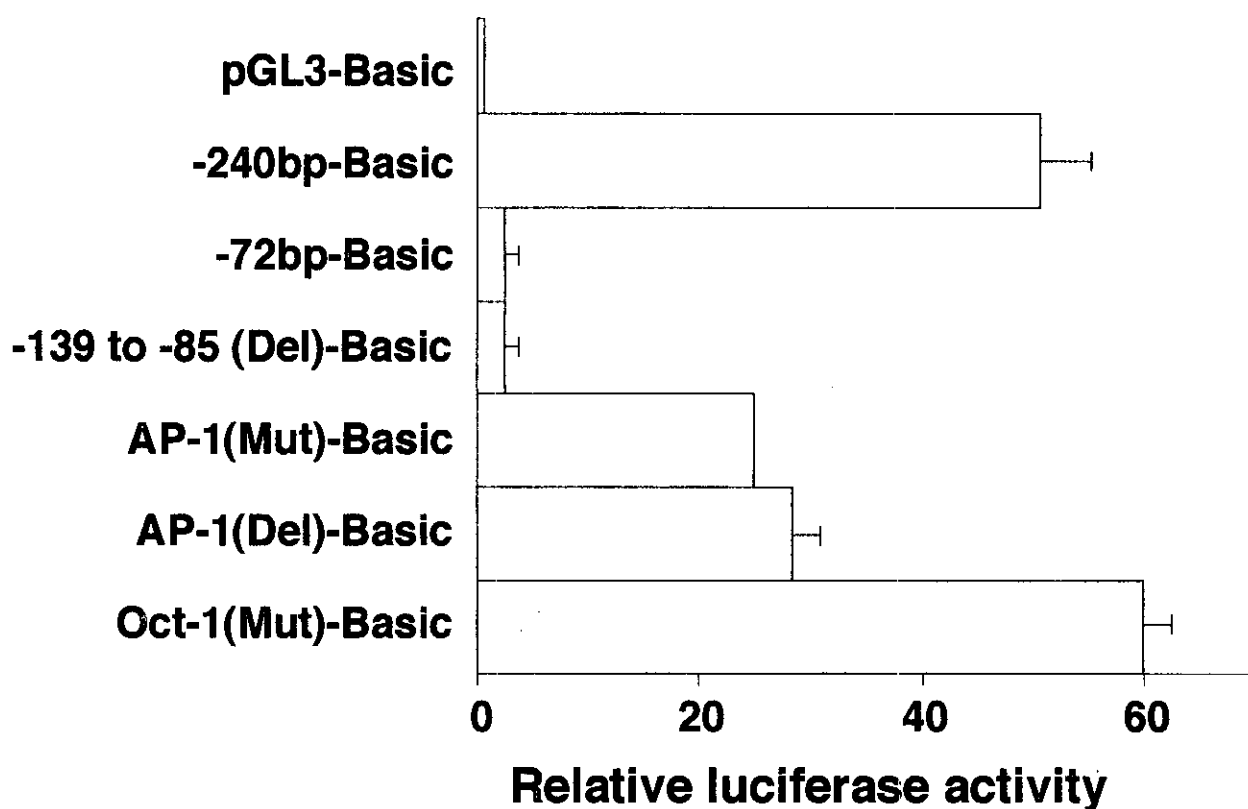
B

図5. メグシン遺伝子の転写におけるcis-acting elementの同定

(A) メグシン遺伝子の-120~-112部位とAP-1 binding motifとの塩基配列の比較。(B) AP-1及びOct-1 binding motifの変異体を作成し、A431におけるプロモーター活性について検討を行った。pGL3-Basic,ルシフェラーゼベクター単独;-240bp-Basic,370bpの長さのメグシン遺伝子(-240~+130bp)を含むpGL3-Basic;-72bp-Basic,202bpの長さのメグシン遺伝子(-72~+130bp)を含むpGL3-Basic;-139 to -85(Del)Basic, -240bp-Basicから-139bp~-85bpを除いた欠失変異体;AP-1(Mut)-Basic,-240bp-Basic中のAP-1モチーフ部位特異的変異体;Oct-1(Mut)-Basic,-240bp-Basic中のOct-1モチーフ部位特異的変異体;AP-1(Del)-Basic,-240bp-Basic中のAP-1モチーフ部位欠失変異体

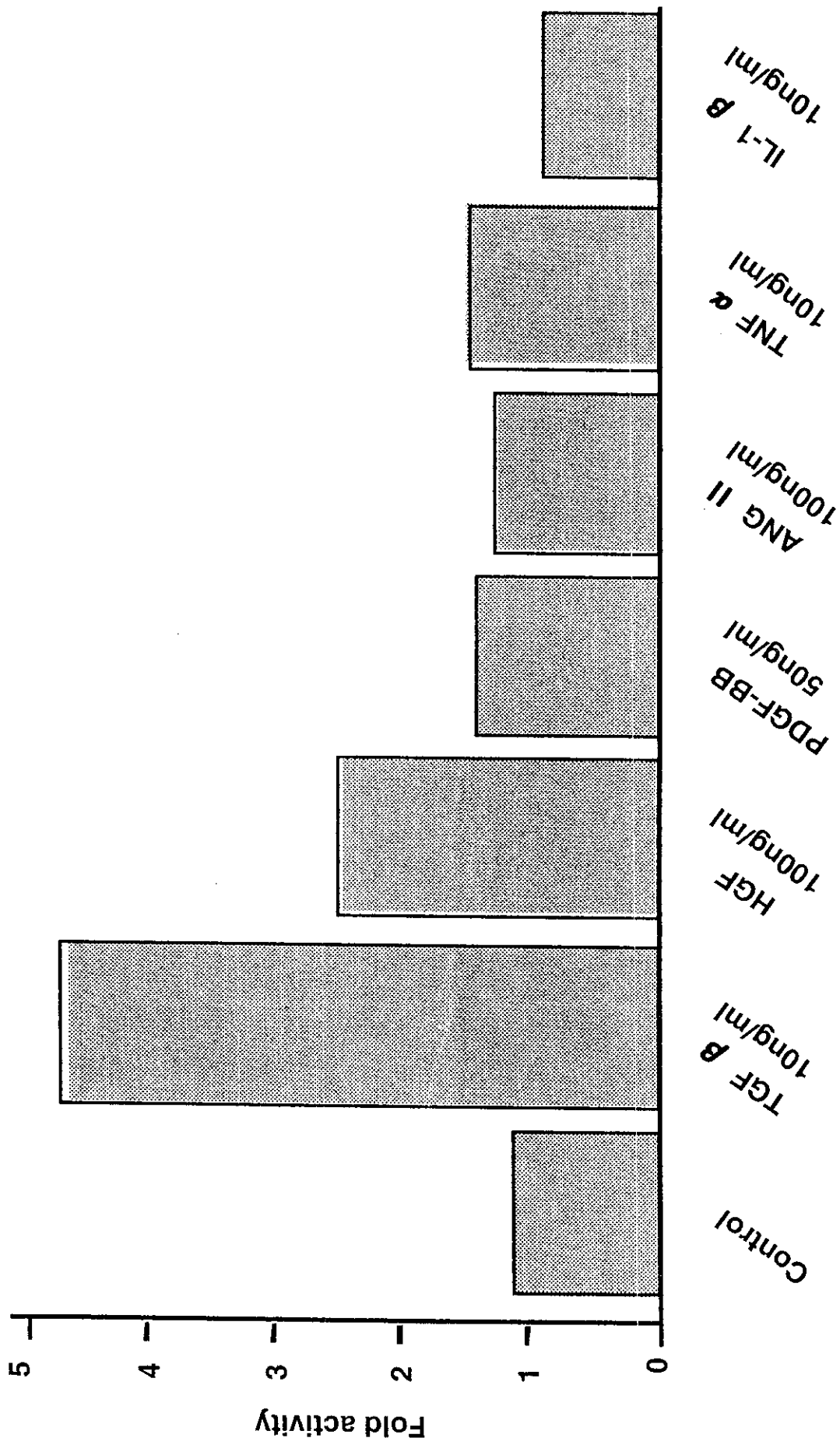


図6. メダシンの発現を誘導するサイトカイン

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

遺伝子改変マウスを用いた新規腎炎モデル動物の確立

分担研究者 南学 正臣 東京大学医学部腎臓内科学 助手

研究要旨

本研究では、メサンギウム特異的な新しいセリンプロテアーゼインヒビター（SERPIN）として発見されたメグシンが同定された。そのリガンドを同定することは、メサンギウム細胞の生物学的性質の解明、メサンギウム細胞に関連する腎疾患の原因の究明と診断法、治療法の開発などに結びつくと考えられる。今年度は、メグシンとメグシンリガンドの結合に干渉する活性を評価する方法を確立し、メグシンとメグシンリガンドの結合に干渉する活性を有する化合物のスクリーニング方法を提供した。

研究組織

研究協力者

和田 健彦

東京大学大学院医学研究科内科学専攻腎臓内科学

A. 研究目的

メサンギウム細胞は、腎系球体の重要な構成細胞であり、ヒトの代表的な腎不全の原疾患である IgA 腎

症、糖尿病性腎症などにおいては著明なメサンギウムの障害が認められる。我々はメサンギウム障害の病態生理に対する理解を深めこれらの疾

患を克服するため、大規模ランダムシーケンス法によりメサンギウム細胞の遺伝子プロファイルを作成し、これを他の細胞や臓器の遺伝子プロファイルと比較することにより、ヒトメサンギウムに発現する新しいセリンプロテアーゼインヒビター (SERPIN) であるメグシンのクローニングに成功した。

メグシンの機能を解明するためには、そのリガンドの同定が必須である。今年度は、メグシンとメグシンリガンドの結合に干渉する活性を評価する方法を確立し、メグシンとメグシンリガンドの結合に干渉する活性を有する化合物のスクリーニング方法を提供した。

B. 研究方法

1. 組み替えメグシン

N末端に c-Myc と His のタグを付加したメグシンをトランスフェクトしたチャイニーズハムスター卵巣細胞の培養上清から、アフィニティークラムを用いて、組み替えメグシンを精製した。

2. メグシン-セリンプロテアーゼ複合体形成試験

メグシンの P 1 7 - P 8 配列は、阻害性 SERPIN のコンセンサス配列として知られている。そこで、精製メグシンを、リン酸緩衝液中で種々のセリンプロテアーゼと 3 7℃ で 3 0 分間インキュベートし、非還元状態で SDS - PAGE 分析を施行した。また、反応混合液を、逆相チップに供し、風乾後に表面改良型 / 飛行時間型質量分析計により質量分析した。

3. MCAアッセイ

プラスミン活性へのメグシンの阻害活性を評価するため、精製メグシンを様々なモル比のプラスミンと 3 7℃ で 3 0 分間インキュベートし、合成蛍光プラスミン基質と反応させ、ペプチド-MCA から AMC への切断の蛍光測定を行った。

C. 研究結果

SDS - PAGE 分析では、組み替えメグシンに対して、プラスミンまたはトリプシンを混合した時に、

複合体の形成を示す新たなバンドが出現した (図 1)。しかし、他のセリンプロテアーゼでは、新たなバンドは認められなかった。

メグシンのプラスミンへの結合は、SELDI-TOF 質量分析によっても確認された (図 2)。すなわち、メグシンとプラスミンの反応混合液において、ピークは分子量 120,163.7 Da の位置に同定され、それはメグシン (47,061.4 Da) およびプラスミン (73,264.7 Da) の複合体と推定された。

複合体形成は、組み替えメグシンが熱により不活化された時には観察されなかった。

更に、MCAアッセイを用いたプラスミンの酵素活性に対するメグシンの阻害作用を図 3 および表に示す。オボアルブミンおよびアルブミンがプラスミン活性を阻害しなかったのに対し、メグシンは特異的にプラスミン阻害活性を示した。また、不活化されたメグシンはプラスミン阻害活性を示さなかった。

これらの実験結果は、メグシンとプラスミンが複合体を形成することを示唆している。

D. 考察

本研究では、メサンギウム特異的な新しいセリンプロテアーゼインヒビター (SERPIN) として発見されたメグシンと、メグシンリガンドの結合に干渉する活性を評価する方法を確立し、メグシンとメグシンリガンドの結合に干渉する活性を有する化合物のスクリーニング方法を提供した。

既に示されている他の SERPIN の機能としてはプロテアーゼインヒビターとして PAI-1 が組織の線維化に重要な役割を果たしていることが示されている以外にも、アポトーシス関連分子としての機能、また血管新生阻害因子としての機能などがある。糸球体硬化における重要な組織学的変化は、糸球体の細胞死と細胞外基質蓄積であるが、昨年度の動物実験の結果とその他の SERPIN の機能から考えると、メグシンはメサンギウム基質の蓄積、あるいは糸球体細胞の増殖と細胞死に重要な役割を果たしていると考えられる。メグシンリガンドを同定することは、メサンギ

ウム細胞の生物学的性質の解明、メ
サンギウム細胞に関連する腎疾患の
原因の究明と診断法、治療法の開発
などに結びつくと考えられる。

E. 結論

メグシンリガンドを同定することは、メサンギウム細胞の生物学的性質の解明と腎疾患の原因の究明と診断法、治療法の開発などに結びつくと考えら、今年度の研究ではメグシンと、メグシンリガンドの結合に干渉する活性を評価する方法を確立し、メグシンとメグシンリガンドの結合に干渉する活性を有する化合物のスクリーニング方法を確立した。

F. 研究発表

論文発表

—国外—

1. Miyata T, Inagi R, Nangaku M, Imasawa T, Sato M, Izuhara Y, Suzuki D, Yoshino A, Onogi H, Kimura M, Sugiyama S, Kurokawa K. Overexpression of the serpin megsin induces progressive mesangial cell proliferation and expansion. **J Clin Invest.** 2002 Mar 1;109(5):585-593.
2. Hanafusa N, Yatomi Y, Yamada K, Hori Y, Nangaku M, Okuda T, Fujita T, Kurokawa K, Fukagawa M: Paracrine effects of sphingosine 1-phosphate on renal mesangial cells. **Nephrol Dial Transplant** in press.
3. Miyata T, de Strihou CvY, Imazawa T, Yoshino A, Ueda Y, Ogura H, Kominami K, Inagi R, Nangaku M, Kurokawa K: Glyoxalase I deficiency is associated with an unusual level of advanced glycation end products in a hemodialysis patients. **Kidney Int** 60, 2351-2359, 2001.
4. Inagi R, Miyata T, Suzuki D, Toyoda M, Wada T, Ueda Y, Izuhara Y, Sakai H, Nangaku M, Kurokawa K: Characterization of megsin, a novel serpin predominantly expressed in mesangial cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 286, 1098-1106, 2001.
5. Shao J, Miyata T, Yamada K, Hanafusa N, Wada T, Gordon KL, Inagi R, Kurokawa K, Fujita T, Johnson RJ, Nangaku M: A Protective Role of Nitric Oxide in a Model of Thrombotic Microangiopathy in Rats. **J Am Soc Nephrol** 12, 2088-2097, 2001.
6. Nangaku M, Miyata T, Suzuki D,

Umezono T, Hashimoto T, Wada T, Yagi M, Nagano N, Inagi R, Kurokawa K: Cloning of rodent megsin revealed its up-regulation in mesangioproliferative nephritis. **Kidney Int** 60, 641-652, 2001.

7. Yamada K, Hori Y, Hanafusa N, Okuda T, Nanago N, Choi-Miura N-H, Couser WG, Miyata T, Kurokawa K, Fujita T, Nangaku M: Clusterin is up-regulated in glomerular mesangial cells in complement-mediated injury. **Kidney Int** 59, 137-146, 2001,
8. Wada T, Miyata T, Inagi R, Nangaku M, Wagatsuma M, Suzuki D, Wadzinski BE, Okubo K, Kurokawa K: Cloning and characterization of a novel subunit of protein serine/threonine phosphatase 4 from mesangial cells. **J Am Soc Nephrol** 12, 2601-2608, 2001.

—国内—

1. 花房規男、南学正臣：糸球体内皮細胞障害。Annual Review 腎臓 2002 (中外医学社) in press
2. 加藤秀樹、南学正臣：HUS, TTP. 日本臨床 in press
3. 田中哲洋、南学正臣：膜性腎症と膜性増殖性糸球体腎炎の診かた。Medicine in press
4. 上條敦子、南学正臣：腎疾患はな

ぜ進行するか。Mebio 18, 32-36, 20

5. 大瀬貴元、南学正臣：HUS. 専門医のための腎臓病学 in press
6. 南学正臣：医療現場のニーズ 腎不全治療。日薬理誌 118, 71-73, 2001.
7. 南学正臣：遺伝子組替蛋白による治療。医学のあゆみ in press

学会発表

—国外—

1. Inagi R, Miyata T, Imasawa T, Kurokawa K, Nangaku M. Mesangial cell-predominant gene, megsin. **The 3rd Japanese-European Nephrology Forum.** in Hakone (Japan). March 2- 4, 2001.
2. Miyata T, Inagi R, Nangaku M, Suzuki D, Sugiyama S, Kurokawa K. Progressive mesangial matrix expansion and hypercellularity in transgenic mice of mesangial cell-predominant serpin, megsin. **ASN/ISN World Congress of Nephrology.** in San Francisco (USA). October 12-19, 2001.

3. Nangaku M, Yamada K, Garipey CE, Yanagisawa M, Gordon KL, Inage R, Miyata T, Kurokawa K, Fujita T, Johnson RJ. ETB receptor protects the tubulointerstitium in experimental thrombotic microangiopathy. **ASN/ISN World Congress of Nephrology**. in San Francisco (USA). October 12-19, 2001.
4. Ueyama H, Inagi R, Miyata T, Nangaku M, Kurokawa K. Transcriptional regulation of a mesangium-predominant gene, megsin. **ASN/ISN World Congress of Nephrology**. in San Francisco (USA). October 12-19, 2001.
2. 和田健彦, 宮田敏男, 南学正臣, 稲城玲子, 鈴木大輔, 堺秀人, 黒川清. ヒト培養メサンギウム細胞よりのプロテインホスファターゼ新規サブユニットのクローニングと解析. 第43回日本腎臓学会学術総会. 講演. 2001.5.27~5.29. 東京.
3. 稲城玲子, 宮田敏男, 南学正臣, 黒川清. メサンギウム細胞高発現遺伝子メグシンのポストゲノム研究. 第2回腎不全病態治療研究会. 2001.12.8. 東京.

-国内-

1. 宮田敏男, 稲城玲子, 南学正臣, 鈴木大輔, 杉山敏, 堺秀人, 黒川清. ヒトメサンギウム細胞高発現遺伝子改変マウスにおけるメサンギウム増殖性腎炎. 第43回日本腎臓学会学術総会. 講演. 2001.5.27~5.29. 東京.

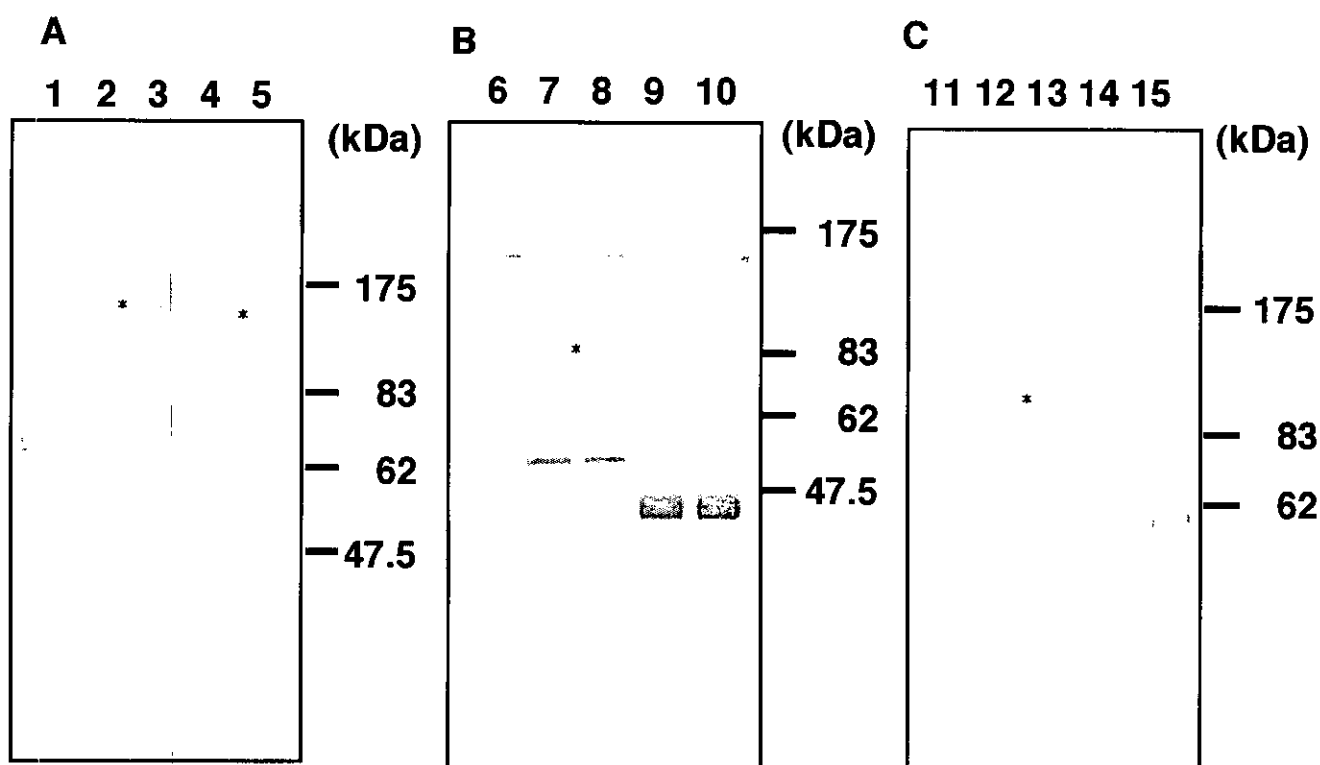


図1 メグシンと各酵素の複合体形成の確認

A: プラスミンとの反応 (CBB染色)

B: トロンピンとの反応 (CBB染色)

C: 組織プラスミノゲンアクチベータ(tPA)との反応 (ウエスタンブロッティング)

レーン1. プラスミン、2. アンチプラスミン、3. プラスミンとアンチプラスミン、
 4. メグシン、5. プラスミンとメグシン、6. トロンピン、7. アンチトロンピン、
 8. トロンピンとアンチトロンピン、9. メグシン、10. トロンピンとメグシン、
 11. tPA、12. プラスミノゲンインヒビター1 (PAI-1)、13. tPAとPAI-1、
 14. メグシン、15. tPAとメグシン、*は複合体の位置を示す

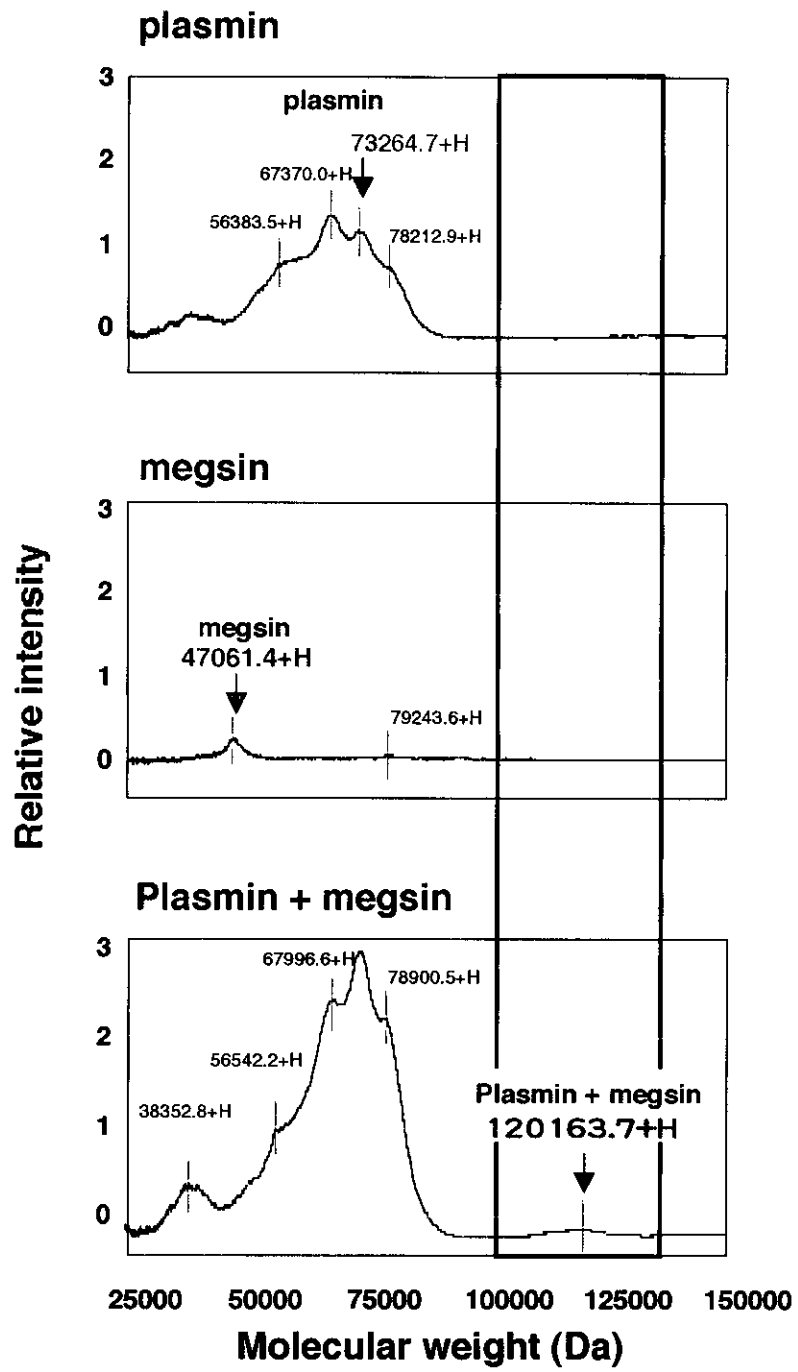


圖 2 SELDI-TOF質量分析

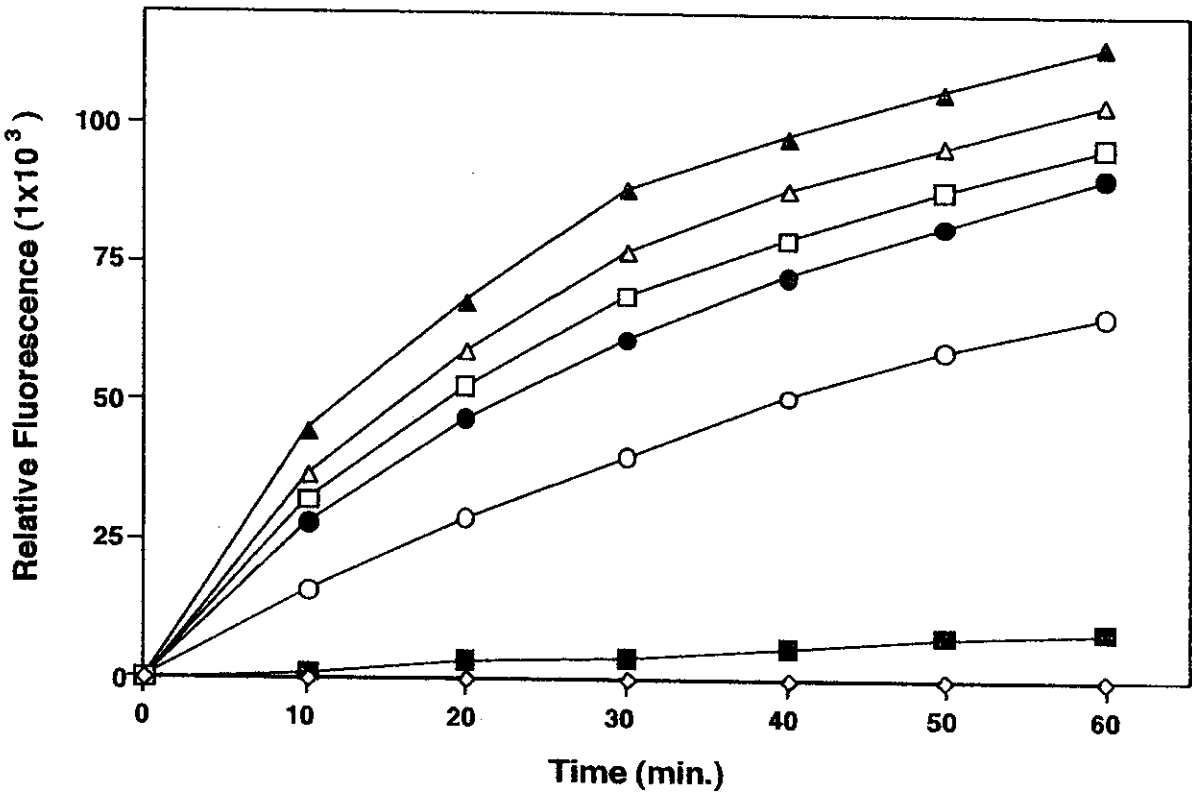


図3 プラスミンの酵素活性に対するメグシンの阻害作用
 ◇ 基質、□ プラスミン、■ プラスミンとアンチプラスミン(1:2)、
 ○ プラスミンとメグシン(1:10)、● プラスミンと不活化メグシン
 (1:10)、△ プラスミンとオブアルブミン(1:10)、▲ プラスミンと
 アルブミン(1:10)