

予 備 審 査 の 学 位 論 文 の 要 旨
（ 又 は ， 学 位 論 文 の 要 旨 ）

No.....

論文題名：キニノーゲンノックアウトマウスにおけるキニノーゲンの機能解析	
氏 名 大中佑介	学籍番号若しくは 9420101 所 属 機 関 名
主 論 文 Ohnaka Y, Tsukamoto S, Iwai Y, Hamada-Kanazawa M, Kariya R, Takano M. Bradykinin deficiency causes high blood pressure in mice. Biochem Biophys Res Commun. 2023 Sep 22;681:73-79. doi: 10.1016/j.bbrc.2023.09.059.	

要 旨

【研究目的】

高血圧症は脳血管障害、慢性腎不全など重篤な病態へ移行させるリスクであり、適切な血圧調節はこれら重篤な病態への移行を抑制する。しかしながら、高血圧症の約 80 %は原因不明の本態性高血圧症であり、高血圧症はいまだに十分理解されているとはいえない。また急激な血圧低下も末梢循環不全により致命的な状態を引き起こすため、適切な血圧調節が重要である。血圧を上昇させる物質としてアンジオテンシンがよく知られている¹。一方、血圧を下げる物質としてブラジキニン(BK)が知られている²。BK の前駆タンパク質はキニノーゲン(Kng)と呼ばれ、高分子 Kng (H-Kng)と低分子 Kng (L-Kng)の 2 種類が存在する³。BK の遊離は酵素である血漿カリクレインが基質の H-Kng を限定分解することで起こるとされるため、血漿中 BK は H-Kng 由来であると考えられてきた。一方、L-Kng は血漿中に H-Kng の 4 倍以上含まれているにもかかわらず⁴、血漿カリクレインによってほとんど分解されないため血漿における BK の遊離には重要ではないと考えられてきた⁵。しかし、一部の組織では局所的に組織カリクレインが L-Kng を分解することが知られており⁶、L-Kng が BK を遊離し機能している可能性は否定できない。そこで我々はマウスにおいて Kng 遺伝子を改変し、正常血圧の調節およびエンドトキシンショックにおける Kng、BK の機能を検討した。

【方法】

マウスの心臓、肝臓、腎臓、肺における Kng1 および Kng2 mRNA の発現を RT-PCR 法によって検出した。CRISPR/Cas9 法を用い、C57BL/6J マウス受精卵中のゲノムに存在する *Kng1* 遺伝子と *Kng2* 遺伝子に対しゲノム編集を行なった。作出された BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウス血漿に含まれる総 Kng 量を ELISA 法によって測定した。BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウス血漿に発現している H-Kng および L-Kng をウェスタンブロッティングにより検出した。BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスの外因系血液凝固能(プロトロンビン時間:PT)および内因系血液凝固能(活性化部分トロンボプラスチン時間:APTT)を測定した。BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスの心拍数および血圧を Tail-Cuff 法を用いて測定した。個別収容型代謝ケージ内でマウスを 24 時間飼育し、食餌量、飲水量、尿量を測定した。マウスの尿を 24 時間蓄尿し、24 時間あたりの尿中 Na⁺、K⁺、クレアチニン排泄量を測定した。BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスに LPS(O111:B4)を 10.8 mg/kg (i.p.)投与し、投与後 1 時間後から 2 時間後の 1 時間血圧を測定した。血圧測定後、7 日間観察し、生存率を求めた。

【結果】

マウスの肝臓において H-Kng1、L-Kng1 および L-Kng2 が発現していた。CRISPR/Cas9 法を用いたゲノム編集によって Kng1 遺伝子 exon 10 において 8 bp の欠損が生じた BK^{del}K1 マウスと Kng2 遺伝子 exon 10 において 1 bp の挿入が生じた BK^{del}K2 マウスが作出できた。これらのマウスのキニノーゲンのアミノ酸配列はそれぞれ BK の 2 番目、3 番目のアミノ酸以降がフレームシフト変異によって正常に産生されないことが予測された。これらのマウス血漿における総 Kng 量は BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスにおいて有意に減少していた。ウェスタンブロッティングによって BK^{del}K1 マウス血漿には H-Kng が検出されず、L-Kng は検出された。BK^{del}K2 マウス血漿においては H-Kng および L-Kng ともに検出された。BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスの PT に変化は見られなかった。また、APTT は BK^{del}K1 マウスにおいて有意に延長していたのに対し、BK^{del}K2 マウスにおいては有意な差は見られなかった。Tail-Cuff 法により測定した心拍数および血圧測定の結果、BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスにおいて血圧は WT マウスに比べ有意に上昇しており、心拍数に有意な差は見られなかった。24 時間あたりのマウスの食餌量、飲水量、尿量に有意な差は見られなかった。BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスにおける 24 時間あたりの尿中 Na⁺、K⁺、クレアチニン排泄量に有意な差は見られなかった。LPS 投与によるエンドトキシンショック実験では、BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスは生存率 100%と WT マウスの生存率 66.6%と比べて有意に回復しており、LPS 投与による血圧下降についても有意に低下が抑制されていた。

【考察】

我々の作出した BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスは WT に比べて血漿総 Kng 量が半分以下に減少していたため、Kng、BK の機能解析に有用なマウスであると考えられた。また、BK^{del}K1 マウスにおいてのみ H-Kng が消失し、H-Kng の生理機能の指標である APTT が延長していたため、マウス血漿に含まれる H-Kng はほとんどが Kng1 遺伝子由来であることが分かった。BK^{del}K2 マウスにおいて血漿中に H-Kng は発現しており、そのため BK^{del}K2 マウスにおける血漿総 Kng 量の減少は L-Kng の減少によるものであろう。したがって、BK^{del}K1 マウスおよび BK^{del}K2 マウスにおいて見られた血圧の上昇は、炎症、組織損傷を伴わない、正常な生理条件下で Kng が血圧調節に関与していることを示している。また、BK^{del}K2 マウスにおける血圧上昇は、従来ほとんど研究されてこなかった L-Kng の減少によるものであり、L-Kng が正常血圧調節に関与していることが示唆された。従来、血漿中の L-Kng は腎臓において Na の再吸収を抑制することで血圧を調節することが知られていたが、今回我々が作出した BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスにおいては、Na⁺や K⁺の排泄量に変化がなく、血漿量にも変化がなかったことから、L-Kng の分解により血管内で生じた BK が恒常的に血圧を調節していると考えられた。また LPS 投与後の血圧低下が BK^{del}K1 マウス、BK^{del}K2 マウスにおいて有意に抑制されていたこと、投与後の生存率が両系統のマウスにおいて上昇していたことから、L-Kng がエンドトキシンショックにおける血圧調節において重要な役割を担っており、エンドトキシンショックにおいて死に至るプロセスに関与していることが示された。

文 献

- 1 Yang, R., Smolders, I. & Dupont, A. G. Blood pressure and renal hemodynamic effects of angiotensin fragments. *Hypertens Res* **34**, 674-683, doi:10.1038/hr.2011.24 (2011).
- 2 Bonner, G., Preis, S., Schunk, U., Toussaint, C. & Kaufmann, W. Hemodynamic effects of bradykinin on systemic and pulmonary circulation in healthy and hypertensive humans. *J Cardiovasc Pharmacol* **15 Suppl 6**, S46-56 (1990).
- 3 Nakanishi, S. Substance P precursor and kininogen: their structures, gene organizations, and regulation. *Physiol Rev* **67**, 1117-1142, doi:10.1152/physrev.1987.67.4.1117 (1987).
- 4 Mashiko, H. & Takahashi, H. Canine plasma kininogen: evidence for the presence of two kininogens and purification of high molecular weight kininogen and characterization as multi-functional molecule. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **117**, 535-543, doi:10.1016/s0305-0491(97)00008-4 (1997).
- 5 Yano, M., Nagasawa, S. & Suzuki, T. Partial purification and some properties of high molecular weight kininogen, bovine kininogen-I. *J Biochem* **69**, 471-481 (1971).
- 6 Webster, M. E. & Pierce, J. V. Action of the kallikreins on synthetic ester substrates. *Proc Soc Exp Biol Med* **107**, 186-191, doi:10.3181/00379727-107-26575 (1961).