

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09286

研究課題名(和文) 直接的アクアポリン2阻害剤の開発

研究課題名(英文) Identification of molecular mechanisms for AQP2 activation to develop its inhibitor

研究代表者

油井 直史 (YUI, Naofumi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：00633976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：リン酸化AQP2単離法を確立し、バソプレシンによるAQP2の3カ所のリン酸化部位の制御が複合的連続的に起きることを証明した。S256-S261リン酸化AQP2がvasopressinまたはforskolin刺激によりS269のリン酸化を受け、S256-S261-S269リン酸化AQP2となり、その後S261脱リン酸化を受けてS256-S269リン酸化AQP2と変化していく様態を明確にした。尿崩症発症AQP2変異体の解析も加え、AQP2の管腔側膜移行にS269のリン酸化に加えて、S261の脱リン酸化が必要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a phospho-specific AQP2 immuno-isolation technique, and identified that vasopressin-mediated AQP2 Ser-261 phospho-regulation is processing in combination with Ser-256 and Ser-269 phosphorylation. pS256-pS261-AQP2 is phosphorylated at Ser-269 to be pS256-pS261-pS269 triply phospho-form, and then dephosphorylated at Ser-261 to be transformed into pS256-pS269-AQP2. We further revealed that the subsequent Ser-261 dephosphorylation was required to be accumulated in apical plasma membrane in concert with prior Ser-256 and Ser-269 phosphorylation.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：水チャネル リン酸化 脱リン酸化 細胞内輸送 集合管 バソプレシン

1. 研究開始当初の背景

アクアポリン2 (AQP2) は腎臓集合管主細胞に存在する水チャネルであり、水再吸収に決定的に重要な分子である。AQP2 の活性化機序を明らかにすることは、尿崩症、或いは心不全、抗利尿ホルモン不適合分泌症候群 (SIADH) といった水代謝異常を来す疾患の新規治療を開発する上で不可避の課題であり、世界で多くの研究グループが精力的に研究を進めてきた。

バソプレシン (VP) が主細胞基底膜の V2 受容体に結合すると、細胞内 cAMP が増加し PKA が活性化し AQP2 は主細胞管腔側へ集積して水を再吸収する。AQP2 の C 末端領域には複数の VP 感受性リン酸化部位がある。セリン 256 (S256), S261, S269 である。これらのリン酸化部位が AQP2 の細胞内輸送において、それぞれどのような分子的意義があるのかが研究対象となり、まずはリン酸化模倣体 (D) 或いは脱リン酸化模倣体 (A) による研究が進んだ。

S256A (S256 の脱リン酸化模倣体) は VP 或いはアデニル酸シクラーゼ活性化剤であるフォルスコリン (FK) 刺激を受けても細胞内部に留まっており、S256D (S256 のリン酸化模倣体) は管腔側で観察されたことから、S256 は必須のリン酸化部位であると理解された。S269D は常に管腔側膜で観察され、このことは S269 リン酸化の重要性を示すものとして重視されたが、S269A は FK 刺激により管腔側へ移行し得ており、矛盾を内包する結果であった。S261A, S261D は共に非刺激下では細胞内にあるが FK 刺激により管腔側へ移行することから AQP2 の細胞内局在には意義がない部位との解釈が広まったが反対する意見も散見された。結果的にはこのような模倣的変異体の検討からは AQP2 細胞内輸送機構の包括的理解に至らなかった。またこのような検討法は自動的にそれぞれリン酸化部位を別個の独立事象と見做してしまう傾向に陥りがちである。実際には連動して複合的に動いている可能性もある。

AQP2 の複数のリン酸化部位が、1) それぞれ独立して制御を受け、それぞれ別個の分子的意義があるのか、2) 複合的連続的に制御を受けて協調的に分子的意義を発するのか、この基本的な様態の理解すら得られておらず、当然複合的である場合にどのように複合的にリン酸化制御を受け、それによりどのように細胞内局在を変えるのか全く未解明と言える状況であった。

2. 研究の目的

AQP2 の複数のリン酸化部位の制御の基本的な様態を解明し、それがどのように AQP2 の細胞内変化をもたらすのか詳細にする。すなわち、どここの部位のリン酸化が増えた、あるいは減ったといった個別の観察を超えて、どの部位の制御が独立制御系であり、或いはどこどこが複合的連続的であるといったように詳細な制御様式を解明する。また AQP2

細胞内輸送がどのようにリン酸化制御により段階的に進んで行くかを解明し、AQP2 調節法を探ることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

培養細胞およびマウス腎臓を用いリン酸化特異的抗体を用い各々のリン酸化陽性 AQP2 を単離し、他のリン酸化部位の変化を検討するとい2段階解析を世界で初めて試みた。例えば S256 陽性 AQP2 を単離し、VP 刺激で S269 と S261 がどのように変化しているかを検討した。そして AQP2 の細胞内リン酸化シグナルが刺激超急性期において時系列でどのように変化するかを confocal microscopy で検討し、複合的リン酸化シグナルがどのように細胞内輸送を調節するか検討した。さらに尿崩症を発症する AQP2 変異体を作成し同様に解析した。

4. 研究成果

まず AQP2 安定発現 MDCK 細胞を時系列で FK 刺激し、S256, S261, S269 リン酸化がそれぞれ刺激超急性期に時系列でどのように変化してゆくかを調べた。

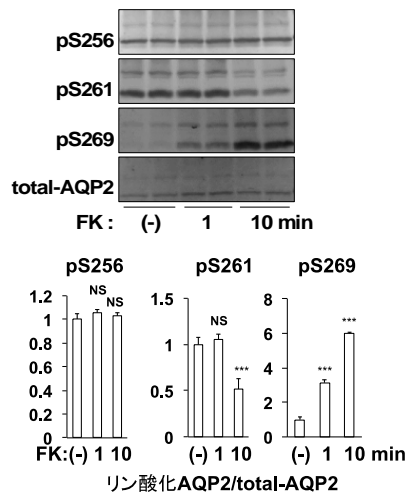
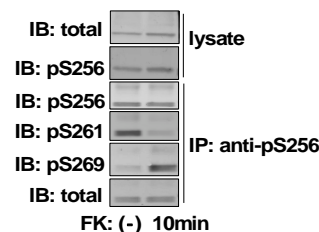


図1: FK刺激超急性期におけるAQP2の各リン酸化部位の変化

図1に示すように、S256 のリン酸化は刺激の有無によらず安定していた。S269 は刺激開始1分後より鋭敏に増加を示した。対照的に S261 のリン酸化は1分では変化がなく、10分後には有意に減少していた。S269 のリン酸化は時系列的に S261 の脱リン酸化に先行することが分かった。次に FK 刺激により S256 リン酸化陽性分画において S261 と S269 がどのように変化しているかを検討するため S256 リン酸化 AQP2 を pS256 抗体を用いて単離し WB 解析を行った。



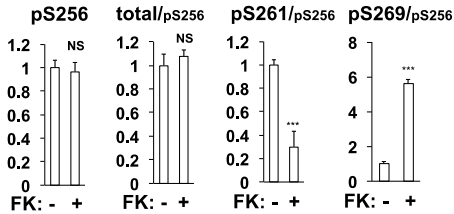


図2: FK刺激超急性期におけるS256リン酸化陽性AQP2の制御

S256 陽性 AQP2 上で S269 のリン酸化が増加し S261 リン酸化が減少しているのが分かる。これにより S269 リン酸化と S261 脱リン酸化は S256 リン酸化に連続して起こる制御であることが分かった。さらに S269 のリン酸化と S261 の脱リン酸化に連続性があるのか否かを検討した。S269 が増加し始める FK 開始 1 分 (図 1) と、S261 が減少し始める 10 分時点 (図 1) で S269 リン酸化陽性 AQP2 を pS269 抗体を用い単離し WB 解析した (図 3)。

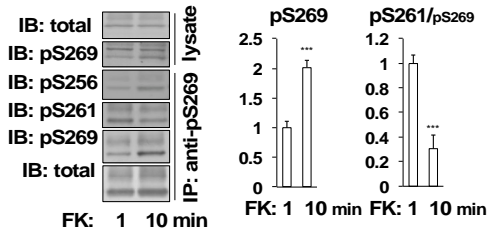


図3: FK刺激超急性期におけるS269リン酸化陽性AQP2の制御

FK 刺激開始 1 分時点での S269 リン酸化陽性 AQP2 は比較的強く S261 のリン酸化を伴っているのが分かる。一方で FK 刺激 10 分時点での S269 リン酸化陽性 AQP2 では S261 は脱リン酸化を受けているのが分かる (図 3)。つまり、S269 のリン酸化と S261 の脱リン酸化も同一 AQP2 分子上で複合的連続的に起こることが分かった。

さらに同様の手法でマウス腎臓を解析した。C57BL/6 マウスを VP 投与群と非投与群に分けて、S256 リン酸化 AQP2、S269 リン酸化 AQP2 を単離し WB 解析を行った。細胞実験同様に S256 リン酸化陽性 AQP2 上で S269 のリン酸化と S261 の脱リン酸化が起きており、また S269 リン酸化陽性 AQP2 上で S261 の脱リン酸化を認めた。これらの結果から AQP2 の VP、或いは FK によるリン酸化制御の基本的様態は pS256-pS261 AQP2 が S269 のリン酸化を受けて pS256-pS261-pS269 AQP2 となり、その後さらに S261 の脱リン酸化を受けて pS256-pS269 AQP2 となることが示された。

次にここまでで示した複合的連続的 AQP2 のリン酸化制御がどのように AQP2 の管腔側への輸送を調節するかを細胞生物学的に検討した。

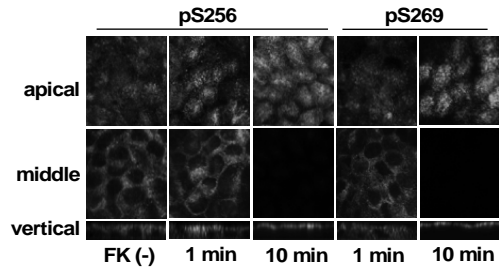


図4: リン酸化AQP2の細胞内局在の変化

FK 刺激開始 1 分時点では S256、および S269 シグナルは細胞内で観察された (図 4)。刺激開始 10 分後にはそれぞれ管腔側で観察された (図 4)。この結果は S256 と S269 のリン酸化だけでは管腔側膜輸送は完成しないことを示唆しており、S261 の脱リン酸化の重要性を提起しさらに実験を進めた。FK 刺激前後で管腔側膜における各々のリン酸化シグナル強度の変化を調べた。予想通り S256、S269 シグナルは増加していたが、興味深いことに S261 シグナルは管腔側膜上で減少していた。AQP2 の管腔側膜への輸送は、最初の変化である S269 のリン酸化では完成せず、次の一手である S261 の脱リン酸化をもって完成するという説を持つに至った。

このことをさらに深く調べるために、S261 のリン酸化制御に変化をもたらす可能性のある尿崩症発症変異である P262L-AQP2 安定発現 MDCK 細胞を樹立し検討した。まずこの変異体の FK 刺激によるリン酸化の変化を調べたところ S256 リン酸化が刺激によらず安定しており、S269 のリン酸化が亢進するところまでは野生型と同様であったが、S261 のリン酸化も亢進しており野生型と正反対であった。さらにこれらのリン酸化制御の複合的連続性について調べるために S256 リン酸化陽性 AQP2 を単離して WB 解析を行った。

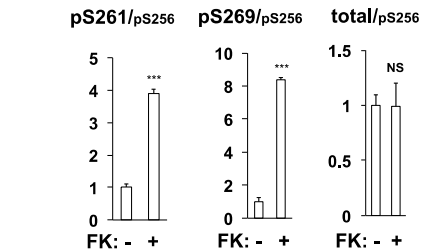
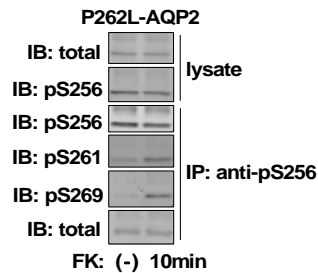


図5: FK刺激におけるS256リン酸化陽性P262L-AQP2の制御

S261 の逆転制御は S256 リン酸化陽性 P262L-AQP2 上で起きていた (図 5)。この知見の意義をさらに詳しく検討した。FK 刺激前後で S256 リン酸化陽性 P262L-AQP2 および S269 リン酸化 P262L-AQP2 の細胞内局在がどのように変化するかを検討した。すると共に局在が基底膜に逆転していたのである。以上より S256 および S269 のリン酸化により促進される AQP2 の管腔側膜への細胞内輸送過程において S261 の脱リン酸化が重要であることが決定的となった。この成果により VP 刺激による AQP2 のリン酸化制御を cascade として明確に意識して研究を行えるようになる。今後の研究の基盤的知見となる重要なものと考えている。おそらく S269 のリン酸化によりまずは AQP2 の interactosome が変化し、S261 脱リン酸化因子を引き込んでくる。さらに S261 が脱リン酸化することで endocytosis 機構との相互作用から脱する。このように段階的に考察できるようになることにより詳細な分子世界の解明に寄与すると考える。この他本研究で確立したリン酸化 AQP2 単離法を応用し AQP2 のリン酸化を増減的な定量を超えて、全 AQP2 の中で比率で定量する方法を開発し、さらに多重リン酸化 AQP2 の比率定量につなげて学会発表を行った。この方法を基本として尿中 AQP2 リン酸化の定量を開発できれば、VP 作用強度を測定できる診断ツールの開発にも繋げることができるのではないかと考えている。また AQP2 制御に calcineurin が関与する研究にも協力し、新しい AQP2 制御法を提唱し報告した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Zeniya M, Mori T, Yui N, Nomura N, Mandai S, Isobe K, Chiga M, Sohara E, Rai T, Uchida S. The proteasome inhibitor bortezomib attenuates renal fibrosis in mice via the suppression of TGF- β 1. *Sci Rep*. 2017, 7(1): 13086, doi: 10.1038/s41598-017-13486-x. 査読有.

Li W, Jin WW, Tsuji K, Chen Y, Nomura N, Su L, Yui N, Author J, Cotecchia J, Paunescu TG, Brown D, Lu HAJ. Ezrin directly interacts with AQP2 and promotes its endocytosis. *J Cell Sci*. 2017, 130(17): 2914-2925, doi: 10.1242/jcs.204842. 査読有.

Yui N, Ando F, Sasaki S, Uchida S. Ser-261 phospho-regulation is involved in pS256 and pS269-mediated aquaporin-2 apical translocation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017, 490(3): 1039-1044, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.06.162. 査読有.

Ando F, Sohara E, Morimoto T, Yui N, Nomura N, Kikuchi E, Takahashi D, Mori T, Vandewalle A, Rai T, Sasaki S, Kondo Y,

Uchida S. Wnt5a induces renal AQP2 expression by activating calcineurin signalling pathway. *Nat Commun*. 2016, 7:13636, doi: 10.1038/ncomms13636. 査読有.

Yui N, Sasaki S, Uchida S. Aquaporin-2 Ser-261 phosphorylation is regulated in combination with Ser-256 and Ser-269 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016, 482(4): 524-529, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.118. 査読有.

Yamaguchi W, Yui N, Nagao T, Oshikawa G, Negi M, Iimori S, Okado T, Rai T, Uchida S. Bence-Jones protein I-type multiple myeloma patient withdrawn from maintenance hemodialysis after long-term bortezomib and dexamethasone therapy. *Intern Med*. 2016, 55(3): 263-268, doi: 10.2169/internalmedicine.55.5310. 査読有.

〔学会発表〕(計 6 件)

Yui N, Uchida S. Quantification of single and multi-site AQP2 phosphorylation. 50th Annual Meeting of American Society of Nephrology, New Orleans. November 04, 2017.

油井直史、佐々木成、内田信一. アクアポリン 2 の細胞内輸送調節における複合的リン酸化制御機構の解明. 第 60 回日本腎臓学会学術総会. 平成 29 年 5 月 26 日. 仙台国際センター(宮城県仙台市).

銭谷慕子、森崇寧、油井直史、野村尚弘、千賀宗子、高橋大栄、蘇原映誠、頼建光、内田信一. 新規腎臓線維化治療薬としての bortezomib の検討. 第 60 回日本腎臓学会学術総会. 平成 29 年 5 月 28 日. 仙台国際センター(宮城県仙台市).

Yui N, Sasaki S, Uchida S. Aquaporin-2 Ser-261 phosphorylation is regulated in combination with Ser-256 and Ser-269 phosphorylation. 49th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Chicago. November 18, 2016.

安藤史顕、蘇原映誠、油井直史、野村尚弘、菊池絵梨子、高橋大栄、森崇寧、頼建光、佐々木成、内田信一. カルシニユーリンは腎性尿崩症治療の標的分子である. 第 59 回日本腎臓学会学術総会. 平成 28 年 6 月 18 日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

Yui N, Sasaki S, Uchida S. Dephosphorylation at Ser-261 is a determinant for the regulated AQP2 apical accumulation. 48th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego. November 07, 2015.

〔その他〕

ホームページ等

www.tmd.ac.jp/grad/kid/

6 . 研究組織

(1)研究代表者

油井 直史 (Yui, Naofumi)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・

非常勤講師

研究者番号 : 00633976