

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 1日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590209

研究課題名（和文）極性を持つ上皮細胞における頂部および基底側部細胞膜の膜微小ドメインの解析

研究課題名（英文）Analysis of microdomain of the apical and basolateral membrane in epithelial cells with polarity

研究代表者

青木 武生 (AOKI TAKEO)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：70150919

研究成果の概要（和文）：我々はヒトアクアポリン2（AQP2）を安定的に発現している MDCK 細胞では、刺激前に細胞内に存在するアクアポリン-2 のプールが、刺激に対して、何らかの理由で頂部細胞膜の特定の部位に移動し、細胞内エンドソームに移動する。この研究で、頂部細胞膜にこの蛋白を係留する役割を果たすのはコレステロールの関係する膜微小ドメインのようなカベオリン関連ドメイン成分や糖脂質、特にシアル酸などの成分が関係していることが判明した。

研究成果の概要（英文）：In MDCK cells stably expressing human AQP2 (MDCK-hAQP2), AQP2 is trafficked to the apical special membrane by forskolin and then internalized to the intracellular compartment by some mechanisms. The results of experiments in caveolin-1 knockdown cells by RNA interference or ceramide glucosyltransferase inhibitor treated cells, sialidase treated cells suggest that AQP2 expression and its retention in the apical membrane, its destination is closely related with the completeness of membrane microdomain components.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：膜微小ドメインの細胞微細形態学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：(1) 膜微小ドメイン (2) アクアポリン-2 (3) リサイクリングシステム

(4) MDCK 細胞 (5) カベオラ (6) シンタキシン-6 (7) 初期エンドソーム (8) 糖脂質合成阻害剤

1. 研究開始当初の背景

頂部細胞膜にはスフィンゴ糖脂質、コレステロールが濃縮する膜ドメイン「ラフト」が存在するといわれる。このドメインの唯一の形態的指標である 50-80nm の Ω 状の陥凹構造はカベオラと呼ばれている。本構造の主要な

構成タンパク質はカベオリン-1 であるが、フロティリンもその構成要素のひとつである。カベオリン-1 は細胞腫によって発現はさまざまであり、脂肪細胞、内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞には多いが、神経細胞、リンパ球には存在しない。フロティリン-1、-2 は

この意味では、どの細胞の「ラフト」にも普遍的に存在しているが、カベオラほど明瞭な構造を形成しない。このドメインの構成成分がエンドサイトーシスされるのかに関しては情報があまりないことから、われわれは、コレステロールプローブやアクアポリン（水チャネル蛋白、特にアクアポリン-2: AQP2）を指標にして、ラフトに集まる蛋白質や糖脂質のエンドサイトーシスへの関与の機序に貢献できる条件があると判断した (Aoki et al 2007)。我々の教室では以前よりAQP2の膜トラフィッキングを研究対象にしている。ヒトAQP2を導入したMDCK細胞（イヌ腎臓上皮由来）ではフォルスコリンの刺激（MDCK細胞では腎尿細管上皮に存在するバソプレシン受容体が存在しないので、cAMPを増加させるためにこの薬品を用いる）では、AQP2は細胞内プールから頂部細胞膜に移動するが、刺激がなくなると、頂部細胞膜のチャネルは何らかの機構でエンドサイトーシスされ、初期エンドソーム、リサイクリングエンドソーム（デフォルトの細胞内プール）へと輸送されるが、いわゆるクラスリン依存性エンドサイトーシスが関与するのか、それともその他の経路なのか、何をもって頂部膜に係留されるのかなどは不明である (Tajika et al., Endocrinology 2004, Histochem. Cell Biol. 2005)。

カベオラには、細胞内カルシウム調節蛋白をはじめ数多くのシグナル伝達分子が存在すること、SV40 ウイルスやヒトコロナウイルス (Nomura et al., J Virol, 2004) がカベオラから進入することから、その機能が注目されていた (特に内皮細胞、Aoki et al 1999)。カベオリンにはアイソフォームが3つあり、それぞれカベオリン-1、カベオリン-2、カベオリン-3 と呼ばれている。このうち普遍性が高いのがカベオリン-1 であり、カベオリン-3 は筋細胞にのみ発現しているが、この遺伝子の変異体を導入するとその細胞のカベオラが消失し、カベオリン-1 の機能にも影響が出る事から、3 つのカベオリンは影響し合っていることが分かっている。カベオリン-2 もカベオリン-1 と挙動を共にしている事実がある。しかし、フロティリン-2-GFP を同様の細胞に発現させると、頂部細胞膜にのみ発現していた。フロティリンには小胞を形成し、内在化に関する独自の経路が存在するという説もあるが、これらのプローブの相互関係については定説が無い。

2. 研究の目的

頂部細胞膜における膜微小ドメインを構成する要素であるカベオリン-1 やフロティリン-2、糖脂質およびその構成成分であるシアル酸を改変することで、頂部細胞膜に係留される蛋白質であるアクアポリン-2 (AQP2)

のリサイクリングにどのような影響がでるのかを検証する。

3. 研究の方法

1. 膜微小ドメインの中でカベオリン-1 やフロティリン-2 のような成分を除いたり、改変したりすることによる効果を検証する。

①MDCK 細胞にカベオリン-1 発現を抑制するために RNAi を用いたノックダウン。

②カベオリン-1 の発現を抑制することが知られているシンタキシン-6のC末部分を強制発現させることによる効果。

③カベオリン-3DGV 変異体を導入することによる効果。

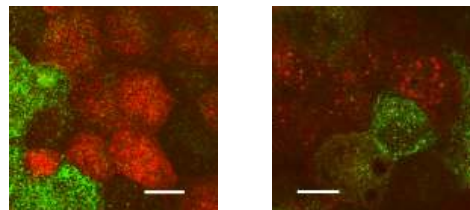
2. 膜微小ドメインに存在するとされる糖脂質の成分の発現を、その合成阻害剤であるフモニシン B1、D-PDMP、NB-DGJ を投与することによる効果をコレステロールプローブとAQP2 のリサイクリングに対する効果で検証する。

3. 頂部膜に発現する蛋白質に直接効果があるとされているタンニン酸を用いた発現ブロックングを行い、その効果を検証する。

4. 糖脂質に結合している糖鎖の改変によってカベオラの効果があることが知られているので、2 種類のシアリダーゼを用いてカベオリン-1 や AQP2 の発現に効果があるのかを検証する。

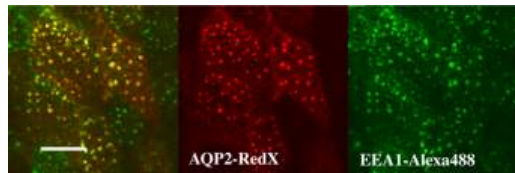
4. 研究成果

ヒトアクアポリン 2 (AQP2) を安定的に発現している MDCK 細胞では、刺激前に細胞内に存在するアクアポリン-2 のプールが、刺激に対して、何らかの理由で頂部細胞膜の特定の部位に移動し、刺激除去後、細胞内エンドソームに移動することが知られている。本研究で、頂部細胞膜にこの蛋白に係留する役割を果たすのはコレステロールの関係する膜微小ドメインのようなカベオリン関連ドメイン成分が十全でなければならないことが判明した。すなわち、成分のいくつかが欠如すると、アクアポリン 2 は頂部細胞膜にはほとんど係留されずに初期エンドソームへの自発的に移動することが判明した。



caveolin-1 RNAi (359) forskolin
10min 左 30min 右
AQP2-RedX, Cav1-Alexa48

①カベオリン-1 を、RNAi を用いてノックダウンするとアクアポリン-2 は細胞が刺激されると、頂部細胞膜にとどまることができず、そのまま初期エンドソームに移動してしまうことが分かった。



自動的に頂部細胞膜から EEA1 陽性初期エンドソームに移動した AQP2

②MDCK 細胞にシンタキシン-6 の変異体を導入すると PEG コレステロールのプロープを用いることで示されるコレステロールが頂部細胞膜から消失すること、頂部細胞膜からカベオリン-1 の発現が抑制されてしまうことが分かった。この時、AQP2 はと頂部には移動できるが、細胞内にエンドサイトーシスできなくなることも分かった。

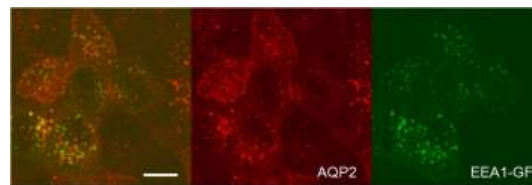
③カベオリン-1 の発現を抑制するカベオリン-3 の DGV 変異体を導入しても、同様な変化が起きてしまうことが分かった。

④クラスリン依存性エンドサイトーシスと関係する蛋白 AP2 μ 2 をノックダウンする方法を用いて、アクアポリン-2 のエンドサイトーシスは一般的なクラスリン関連エンドサイトーシスでは無いことを証明することができた。

⑤各種の糖脂質の合成経路阻害剤の中で特にフモニシン B1 の場合、その濃度の低い場合 13.8 \cdot M には、刺激に対する反応としてアクアポリン-2 は頂部膜では無く、側基底部に移動していた。20 \cdot M の濃度で作用させた場合には、カベオリン-1 の明らかな抑制と、フォルスコリンの刺激で初期エンドソームへの移動が明瞭に観察された。

⑥D-PDMP と NB-DGJ については再現性が高く、さらに D-PDMP は 10 \cdot M という非常に低い濃度で効果があった。この薬品を 2 日間処理した細胞では、フォルスコリン刺激によって移動したアクアポリン 2 蛋白は、カベオリン 1 と共に短い時間で細胞内に取り込まれ、その一部は EEA1 陽性の初期エンドソームに移動していた。また残りの蛋白はカテプシン-D、

Rab7 陽性リソソームに移動していることが判明した。D-PDMP を作用させた細胞では、本来頂部細胞膜に存在するフロティリン 2-GFP もフォルスコリン刺激で細胞内に移動した。

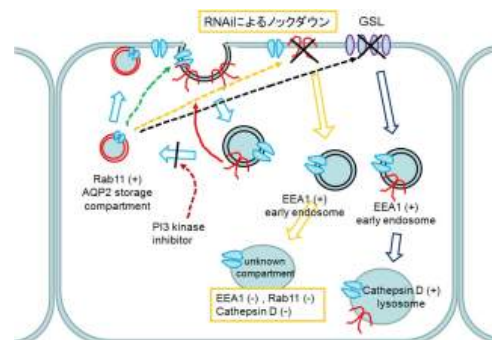


⑦コレステロール合成阻害剤である U18666A を細胞に添加して、アクアポリン 2 とカベオリン 1 の局在について検討した結果、両者ともに頂部膜を経由しないでカテプシン D、Rab7 陽性のリソソームに直接移動していることが判明した。この経路はカベオリン 1 のノックダウン時のフォルスコリン刺激後のアクアポリン 2 とカベオリン 1 の経路（初期エンドソーム後にはカテプシン D 陰性、Rab11 陰性の不明のエンドソーム）とは異なった経路をたどっている可能性が示唆された。

⑧頂部からタンニン酸を作用させることで、頂部細胞膜ドメインを混乱させたところ、フロティリン-2-GFP やカベオリン-1 の頂部膜における発現が抑制された。特にフロティリン-2-GFP は頂部膜のかわりに、側部膜に蛋白質が移動していた。カベオリン-1 は膜に移動することができず、細胞内にとどまっているように見えた。

⑧糖脂質の特徴であるシアル酸を切断除去する酵素シアリダーゼで細胞をフォルスコリン存在下で処理すると、頂部細胞膜からカベオリン-1 とアクアポリン-2 の発現がほとんど抑制されてしまった。この時には、コレステロールも頂部細胞膜には取り込まれなかった。

想定される経路



研究成果の位置付けとインパクト

この結果は MDCK 細胞の頂部膜からのエンドサイトーシスには最も一般的なエンドサイトーシスの方法であるクラスリン依存性エンドサイトーシスではなく、むしろカベオリン依存性エンドサイトーシスが働いていること、その必要条件として、頂部膜微小ドメインの構成成分が正常であることが必要であることが分かった。したがってその成分が欠損したり、異常があると AQP2 によって本来一定時間係留されるようなものも次々とエンドサイトーシスが促進され、本来と異なったりサイクリングがおこり、あるものは初期エンドソームから、カテプシン D や Rab11 とは無縁な不明のサイトに移動したり、初期エンドソームから Rab7、カテプシン D 陽性のリソソームに配達されて分解される系に運ばれてしまうことが分かった。このような系の存在は全く新しい所見と思わる。

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 7 件)

- ① Aoki T, Suzuki T, Hagiwara H, Kuwahara M, Sasaki S, Takata K, Matsuzaki T. Close association of aquaporin-2 internalization with caveolin-1. *Acta Histochem Cytochem*, in press.
- ② Matsuura T, A. Faiz and K. Kiryu; Blind Source Separation of Mixed Images Using 2-D Complex Wavelet Transform, *Journal of the Japan Society of Applied Electro- magnetics and Mechanics*, Vol.19, 234-239, 2011.
- ③ Thatcher SE, Fultz ME, Tanaka H, Hagiwara H, Zhang HL, Zhang Y, Hayakawa K, Yoshiyama S, Nakamura A, Wang HH, Katayama T, Watanabe M, Lin Y, Wright GL, Kohama K: Myosin light chain kinase/actin interaction in phorbol dibutyrate-stimulated smooth muscle cells. *J Pharmacol Sci*. 116:116-127, 2011.
- ④ Kobayashi D, Iijima N, Hagiwara H, Kamura K, Takeda H and Yokoyama T: Characterization of the medaka

(*Oryzias latipes*) primary ciliary dyskinesia mutant, *jaodori*: redundant and distinct roles of *dynein axonemal intermediate gene 2 (dnai2)* in motile cilia. *Developmental Biology* 347:62-70, 2010.

- ⑤ Hagiwara H, Aoki T, Suzuki T, Takata K: Pre-embedding immunoelectron microscopy of chemically fixed mammalian tissue culture cells. Schwartzbach SD, Osafune T, eds, *Immunoelectron microscopy, methods and protocols*, New York: Human Press, 2010:145-154.
- ⑥ Hagiwara H, Aoki T, Suzuki T, Takata K: Double-label immunoelectron microscopy for studying the colocalization of proteins in culture cells. Schwartzbach SD, Osafune T, eds, *Immunoelectron microscopy, methods and protocols*, New York: Human Press, 2010:249-257.
- ⑦ Shiba D, Yamaoka Y, Hagiwara H, Takamatsu T, Hamada H, Yokoyama T: Localization of Inv in a distinctive intraciliary compartment requires the C-terminal ninein-homolog-containing region. *J. Cell Sci*. 122:44-54, 2009.

[学会発表] (計 15 件)

- ① Tanaka H, Hagiwara H, Mitui S: Morphological analysis of effects with arachidonic acid in smooth muscle cells. 第 117 回日本解剖学会、2012 年 3 月 27 日～29 日、山梨大学甲府キャンパス (山梨県)
- ② 青木武生、松崎利行、高田邦昭 MDCK 細胞頂部における AQP2 保持能力に関する膜微小ドメイン構成成分に関する検討、第 52 回日本組織細胞化学会総会・学術集会講演会、2011 年 9 月 24 日～25 日、金沢大学宝町キャンパス (石川県)
- ③ 高橋哲史、廣村桂樹、浜谷博子、加藤麻衣、坂入徹、櫻井則之、池内秀和、前嶋明人、黒岩卓、青木武生、大西浩史、的

- 崎尚、野島美久 SIRP α シグナル経路の遮断は糖尿病性腎症を増悪させる、第 54 回日本腎臓学会学術総会、(2011 年 6 月 15 日～17 日)、パシフィコ横浜会議センター (神奈川県)
- ④ 田中秀幸、萩原治夫、平滑筋細胞におけるスフィンゴ脂質による細胞内微細形態変化、第 116 回日本解剖学会、2011 年 3 月 28 日～30 日、パシフィコ横浜会議センター (神奈川県)
- ⑤ Aoki T, Hagiwar H, Takata K, Matsuzaki T, AQP2 retention in the apical membrane is closely related with membrane micro-domain component. 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2011 年 3 月 28 日～30 日、パシフィコ横浜会議センター (神奈川県)
- ⑥ Takahashi T, Hiromura K, Hamatani H, Tomioka M, Maeshima A, Kuroiwa T, Ohnishi H, Matozaki T, Aoki T, Nojima Y The role of SIRP α (SHPS-1) in experimental diabetic nephropathy. American Society of Nephrology, 43rd Annual Meeting & Scientific Exposition, 2010 年 11 月 16～21 日, Colorado Convention Center, Denver, USA,
- ⑦ 田中秀幸、萩原治夫、筋形質膜におけるデンスプラーク領域とカベオラ密集領域、第 42 回日本臨床分子形態学会、2010.9.24、東レ総合研修センター (静岡県)
- ⑧ 富岡麻衣、廣村桂樹、高橋哲史、前嶋明人、黒岩卓、青木武生、高田邦昭、大西浩史、的崎尚、野島美久、SIRP- α は糸球体上皮細胞の形態と蛋白尿制御に関与する、第 53 回日本腎臓学会学術総会 (2010 年 6 月 16 日～18 日) 神戸国際会議場、神戸ポートピアホテル、神戸国際展示場 (兵庫県)
- ⑨ Tomioka M, Hiromura K, Takahashi T, Maeshima A, Kuroiwa T, Kaneko Y, Ohnishi H, Matozaki T, Aoki T, Takata K, Nojima Y, The Role of SIRP α in Podocyte Structure and Function. 国際腎臓学会 NEXUS 京都シンポジウム 2010 年 4 月 15 日～18 日、国立京都国際会館 (京都府)
- ⑩ 青木武生、萩原治夫、鈴木健史、松崎利行、高田邦昭 頂部膜剥離法によって作製した試料による AQP2 動態の観察、第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2010 年 3 月 28 日～30 日、岩手県民会館 (岩手県)
- ⑪ 芝大、萩原治夫、横山尚彦、一次繊毛内分子領域 (inv compartment) への Nphp3-Nek8 集積機構解析、第 115 回日本解剖学会、2010 年 3 月 28 日～30 日、岩手県民会館 (岩手県)
- ⑫ 富岡麻衣、廣村桂樹、高橋哲史、前嶋明人、黒岩卓、青木武生、高田邦昭、大西浩史、的崎尚、野島美久、SIRP- α は糸球体上皮細胞の形態と蛋白尿制御に関与する、第 10 回腎不全病態治療研究会 2009 年 12 月 12 日、全社協 灘尾ホール (東京都)
- ⑬ Tomioka M, Hiromura K, Takahashi T, Maeshima A, Kuroiwa T, Kaneko Y, Ohnishi H, Matozaki T, Aoki T, Takata K, Nojima Y SIRP α (SHPS-1) signaling pathway is involved in podocyte structure and function、American Society of Nephrology, 42nd Annual Meeting & Scientific Exposition, 2009 年 10 月 27 日～11 月 1 日, San Diego Convention Center, San Diego, USA.
- ⑭ 青木武生、萩原治夫、鈴木健史、高田邦昭 MDCK 細胞における頂部細胞膜カベオラと水チャネルアクアポリン 2 との関係、日本組織細胞化学会第 50 回学術集会 2009 年 9 月 26 日～27 日、ピアザ淡海 滋賀県立県民交流センター (滋賀県)
- ⑮ 萩原治夫、卵管の形態、The 10th Annual Symposium Japanese Society for the Advancement of Women's Imaging、2009 年 9 月 4 日、淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県)

[その他]

ホームページ等

<http://anatchb.dept.med.gunma-u.ac.jp/~anatlhis/pub.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 武生 (AOKI TAKEO)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：70150919

(2) 研究分担者

萩原 治夫 (HAGIWARA HARUO)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：80189464

(3) 連携研究者

松浦 勉 (MATSUURA TSUTOMU)

群馬大学・大学院工学系研究科・准教授

研究者番号：8018692