

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08566

研究課題名（和文）腎尿細管ナトリウム輸送体が及ぼす糖尿病と高血圧の相互増悪機序の解明

研究課題名（英文）Sodium-bicarbonate cotransporter NBCe1 affects hypertension and diabetes via sodium reabsorption.

研究代表者

山崎 修 (Yamazaki, Osamu)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：80757229

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：腎臓のナトリウム輸送を介した高血圧・糖尿病といった生活習慣病のメカニズムの解析の一環として、腎近位尿細管におけるナトリウム重炭酸共輸送体(NBCe1)の意義について検索を行った。その結果、NBCe1のR881S変異体は蛋白発現量が著しく低下する変異体のみならず、翻訳後修飾である糖鎖修飾を起こさない変異体であること、更にはドミナントネガティブ作用が欠失していることが確認された。更には、機能解析法で野生型に比して日活性型であることが確認された。このメカニズムの解明により、NBCe1に焦点を当てた腎臓のナトリウム輸送の理解と、治療応用への端緒が築かれた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎臓のナトリウム輸送の破綻は高血圧や高血圧に伴う臓器障害（脳卒中・心筋梗塞）といった重篤な疾患を引き起こすため、制圧が喫緊の課題である。腎臓の不適切なナトリウム再吸収を行う主要な輸送体であるNBCe1の機能部位を特定し、同部位に作用する薬剤を創薬することによって、高血圧に関わる疾病の制圧に寄与できると考える。またNBCe1は腎臓以外にも多様な臓器に発現し、機能低下変異体の患者は片頭痛・成長障害・角膜変性などの多彩な症状を呈する。原因につながる普遍的な機能部位R881Sを同定することで、腎臓にとどまらない各疾病の解明にもつながると考える。

研究成果の概要（英文）：We identified the missense mutation R881S in NBCe1 variant A from the database. Immunofluorescence analysis with confocal microscopy revealed that the R881S variant was present only in the cytoplasm in both HEK293 cells and MDCK cells. Biotinylated western blotting in HEK293 cells confirmed that the cell-surface expression was completely abolished in R881S mutant. In total cell lysates, R881S-NBCe1 showed a lower molecular weight compared with wild-type, and deglycosylation study confirmed that R881S substitution impaired N-glycosylation. Electrophysiological study revealed that R881S-NBCe1 function was completely abolished. R881S mutation inactivates the NBCe1 function without lack of dominant-negative effect. These data illustrate the diverse physiological consequences of distinct SNVs and underscore the importance of functional characterization in membrane transport proteins.

研究分野：腎臓内科

キーワード：生理学 高血圧 ナトリウム輸送

1. 研究開始当初の背景

高血圧は日本国民のうち 2,000 万人が罹患するといわれる国民病で、国を挙げて対応しなければならない喫緊の課題である¹⁾。高血圧の成立機序は、心拍出量と末梢血管抵抗の積と言われているが、双方に関わる因子は、先天的・後天的・また環境因子など多岐にわたる。一方で、食塩摂取に伴い高血圧が惹起されるという事実と、海に囲まれた日本では食塩摂取量が高いことから、日本では食塩摂取過剰に伴う高血圧を発症する頻度が高い。更には特に食塩摂取が高血圧を著明に誘導する高血圧を「食塩感受性高血圧」と呼ばれている。この分子基盤として、腎臓の尿管に発現している種々の Na 輸送体群が関与していることが知られている²⁾。すなわち、尿管の Na 輸送体の機能不全は血圧調節機構の破綻をきたす主要な要因であるものの、そのメカニズムは十分に解明されていない。

研究者は、尿管の Na 輸送体を介した高血圧の発症メカニズムに着目し、一貫して研究を進めてきた。特に近位尿管に発現するナトリウム重炭酸共輸送体 NBCe1(Na-bicarbonate cotransporter electrogenic type1: NBCe1)が近位尿管の主たる Na 再吸収能を持つこと、更には同輸送体機能が破綻することで生じる家系群にいち早く着目した。かつて所属していた研究室では、現在報告されている exon 領域に属する 15 家系中、実に 10 家系を報告し、世界をリードしてきた。研究者も同研究に参画し、独自に NBCe1 の一塩基多型(single nucleotide variant:SNV)に着目し、現在までに機能変化を起こす SNV を 2 か所同定している³⁻⁴⁾。更に留学中に NBCe1 の機能変化を来す蛋白結合部位・リン酸化部位を新たに同定してきた⁵⁻⁶⁾。

更に、申請者らはこれまでの一連の研究で、糖尿病モデルラットにおいて尿管近位尿管での Na 輸送体 NBCe1 を介した高血圧の発症機序を明らかにし⁷⁾、さらにこの輸送体の機能を調節する複数の蛋白を同定した⁶⁾。このような背景から、尿管ナトリウム輸送の破綻には糖尿病も濃密に関与することが想定される。

そのため、高血圧・糖尿病といった生活習慣病の集積が、尿管を介したさらなる生活習慣病のコントロールの悪化を惹起するという負のスパイラルが生まれることが想定される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、高血圧や糖尿病といった生活習慣病が尿管に局在する Na 輸送体と如何にして相互作用し Na 再吸収増加を惹起するかを証明することである。

3. 研究の方法

NBCe1 の患者報告例はその多くが膜貫通領域に集中しており、同部位が機能活性変化を来すると想定される。そのため、膜貫通領域に存在する NBCe1 の膜貫通領域に属する SNV を NCBI database から網羅的に抽出する。更に、SNV のうち、ミスセンス変異に焦点を当て、ミスセンス変異に伴うアミノ酸変異が、実際に機能変化を生じるかどうかを Polyphen-2 予測ツールを用いることで、より効率的に機能変化を起こしうる SNV 検索を行う。得られた SNV の情報を基に、mutagenesis lightning kit (Agilent 社)を用いて NBCe1 プラスミドに変異を導入する。NBCe1 SNV の発現量検索として、HEK293 細胞を用いた lipofection 法による強制発現法を用い、Western Blotting 法により解析を行う。NBCe1 SNV の細胞内局在については、共焦点顕微鏡 LSM 800 with airyscan, Carl-Zeiss Co. Ltd.)を用いて確認を行う。更に機能解析法として、two-electrode voltage clamp 法を用いて機能解析を行う。具体的には、mMessage mMachin T7 kit (Ambion 社)を用いて mRNA を作成し、アフリカツメル卵母細胞に注入する。十分な膜蛋白発現が得られたのちに、two-electrode voltage clamp 法を用いて、電流の多寡を以て機能解析を行う。

4. 研究成果

NBCe1 の SNV を抽出し検討した所、膜貫通部位 transmembrane 12 の部位に、新規に R881S を同定した。この R881S 変異体は、HEK 細胞強制発現系実験で Western Blotting 法を用いて確認した所、野生型のおよそ 10%程度の蛋白発現にとどまっていた。更に興味深いことに、蛋白質量の低下も伴っていた (Fig.1)。NBCe1 が翻訳後にグリコシル鎖による糖鎖修飾を経て成熟することが知られているため、N-glycosylase F による脱グリコシル化実験を行った。野生型に比し、R881S は脱グリコシル化実験で著明な質量低下を生じなかったことから (Fig.2)、R881S 蛋白は糖鎖修飾を受けない変異体であることが想定された。

更にビオチン化 Western blotting 法を用いて膜発現量を確認した所、R881S 変異体は膜発現が完全に欠損していた (Fig.1)。共焦点顕微鏡による確認でも、R881S は HEK 細胞・MDCK 細胞いずれの系においても細胞内局在が著明で、かつ膜発現が欠損しており、ビオチン化 western blotting 法と一致する結果であった (Fig.3)。

研究者の既報告では、細胞内局在を示す変異体群のうち、ドミナントネガティブ作用を持つ変異体があることが知られていた。そのため、R881S 変異体がドミナントネガティブ作用を持つかどうかを共免疫沈降法で確認した。結果として、R881S 変異体は、野生型のような 2 量体を形成することができず、そのためドミナントネガティブ作用も持たないことが示された (Fig.4)。これらの特徴は、過去の患者報告および SNV 報告とは全く異なる形式であり、新たな NBCe1 の機能低下機序であることが想定された。

実際に、アフリカツメカエル卵母細胞発現系を用いた two-electrode voltage clamp 法による機能解析法を行ったところ、R881S 変異体は機能活性を完全に欠失していることが証明された (Fig.5)。

過去の患者報告例の機能活性測定では、おおよそ 50~60%未満で疾患が発症する傾向にある。患者報告例は血中重炭酸濃度の低下に起因する重篤なアシドーシスや血圧変化といった腎 Na 輸送機能由来の症状のみならず、腎外症状として、脳・消化管・骨・精神発達遅滞などの幅広い症状を呈することが特徴である。R881S 変異体の発見により、腎尿管 Na 輸送体の血圧に及ぼす影響を知り、更には多様な臓器の障害メカニズムの解明につながる事が示された。

現時点で、R881S 変異体の頻度は未だ報告されていない。しかしながら、申請者がかつて報告した NBCe1 の機能変化型 SNV (K558R) は、最大 1.4% の保有率となる。常染色体潜性 (劣性) 遺伝形式であることを考えると、おおよそ 1 万人に 2 人の患者が理論上存在することとなる。³⁾ この頻度は、腎臓領域の最大の遺伝病である多発性嚢胞腎 (おおよそ 1~4 万人に 1 人の発症確率) 更には欧米では出生前遺伝スクリーニングを行う事で知られている嚢胞性線維症 (欧米ではおおよそ 3000 人に 1 人の発症確率) にも迫る疾患発現頻度である。

すなわち、SNV の持つ遺伝要素は生活習慣病の増悪に寄与する危険性を秘めており、遺伝素因を調査することで、今後の病態の発症・進展リスクを予測することが重要である。実際に bioinformatics の進展により、病態の発症・進展リスクを予測することが可能となってきた。その際に、今回のような Na 輸送体群の SNV の遺伝素因の調査を行い報告することで、各種生活習慣病を筆頭とした病態リスクの層別化や先行予測が可能になる、と考えている。

< 引用文献 >

1. NIPPON DATA 80/90/2010/2020 平成 30 年度総括・分担研究報告書
2. Int J Mol Sci. 2020;21(15):5358.
3. Pflugers Arch. 2011;461(2):249-59.
4. Pflugers Arch. 2013;465(9):1281-91.
5. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(3):E329-37.
6. Sci Signal. 2018;11(554):eaat5018.
7. Kidney Int 2015; 87: 535-542.

Fig.1

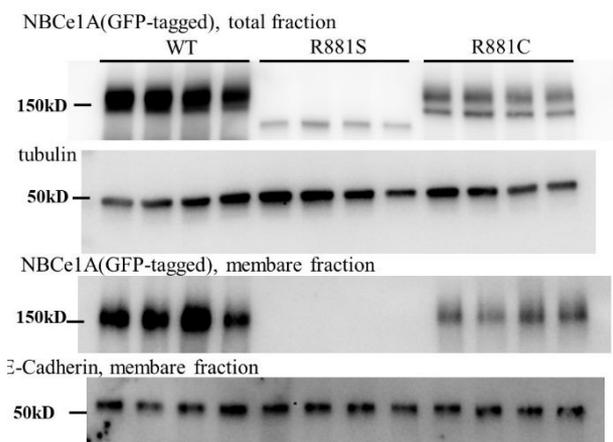


Fig.2

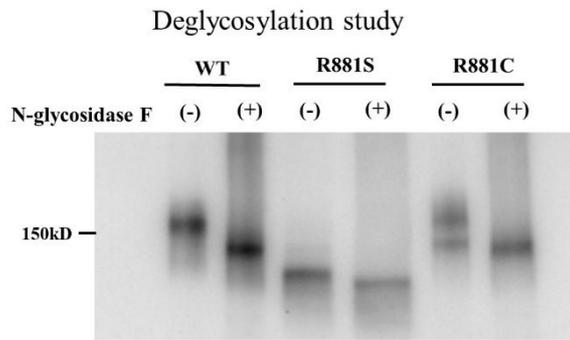


Fig.3

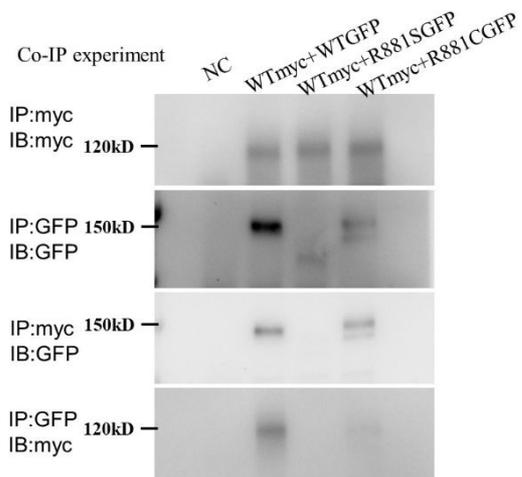


Fig.4

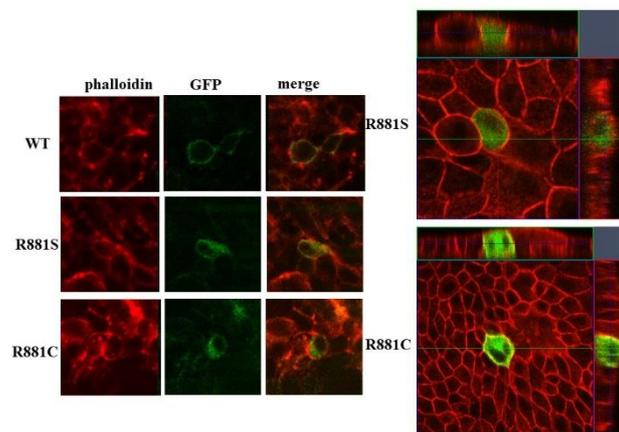
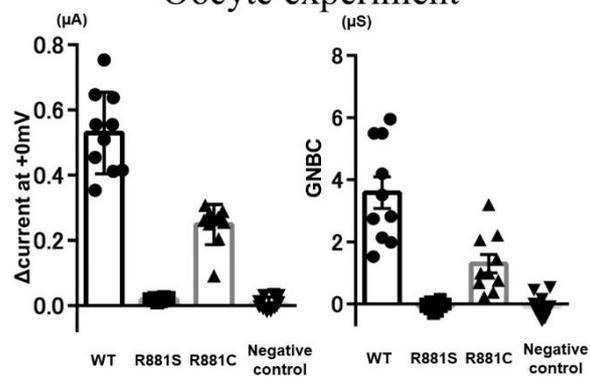


Fig.5

Oocyte experiment



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamazaki Osamu, Yamashita Maho, Li Jinping, Ochiai-Homma Fumika, Yoshida Tadashi, Hirahashi Junichi, Furukawa Taiji, Kozuma Ken, Fujigaki Yoshihide, Seki George, Hayashi Matsuhiko, Shibata Shigeru	4. 巻 321
2. 論文標題 A novel 1551F variant of the Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ cotransporter NBCe1-A shows reduced cell surface expression, resulting in diminished transport activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F771 ~ F784
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00584.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤 陽菜、山崎 修、藤井 航、古川 泰司、上妻 謙、藤垣 嘉秀、柴田 茂
2. 発表標題 近位尿細管ナトリウム輸送体NBCe1の新規変異体R881Sの機能的解析
3. 学会等名 第66回日本腎臓学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	柴田 茂 (Shibata Shigeru) (60508068)	帝京大学・医学部・教授 (32643)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------