

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893202

研究課題名(和文)腎集合尿管間在細胞における酸塩基平衡関連遺伝子発現の調節機序の解明

研究課題名(英文)Regulation mechanism of the expression of acid-base related genes in the intercalated cells of the collecting duct in the kidney

研究代表者

泉 裕一郎 (Izumi, Yuichiro)

熊本大学・医学部附属病院・その他

研究者番号：20736243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：食事や細胞代謝により産生された酸が生体に蓄積すると代謝性アシドーシスを生じる。酸はアルドステロンの働きで腎臓集合尿管の間在細胞より尿中へ排泄される。アシドーシスが間在細胞とその酸排泄機構にどのような影響を及ぼすか明らかではない。私たちは間在細胞由来株を酸負荷(低pH)環境で培養後、発現変動する遺伝子群をtranscriptional start site-sequencing法で同定し、網羅的に解析した。その結果酸負荷によりubiquitin-proteasome系が活性化することが明らかになった。アシドーシスが間在細胞内の遺伝子発現を変化させ、酸排泄機序を調節する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Accumulation of nonvolatile acid that taken from food causes metabolic acidosis. Acid is excreted into urine by the intercalated cells of the collecting duct of the kidney. Adrenocortical hormone, aldosterone, is a key molecule that regulates acid excretion in the intercalated cells. The effect of acidosis (low pH) on the intercalated cells is unclear. We applied transcriptional start site-sequencing to characterize low pH stimulated-genes in the IN-IC cells, a rat intercalated cell line. We found the increases of genes that involve in ubiquitin-proteasome-pathway. We confirmed by Western blot that ubiquitination of proteins is enhanced by low pH. Metabolic acidosis might regulate acid secretion in the intercalated cells by activating ubiquitin-proteasome-pathway.

研究分野：腎臓生理学

キーワード：腎集合尿管 酸塩基平衡 ユビキチン-プロテアソーム系

1. 研究開始当初の背景

体内では、食事、細胞代謝により産生される不揮発性酸(硫酸、硝酸、リン酸)により常に酸(H⁺)が負荷される。これら H⁺は、腎集合尿管管内の間在細胞より排泄される。

集合尿管管での H⁺分泌促進因子としてはアルドステロンが知られる。アルドステロンは血中 pH の低下に反応して副腎皮質から分泌され、間在細胞内の酸塩基平衡トランスポーター群を刺激し H⁺排泄を促す。間在細胞における酸塩基平衡遺伝子の発現、調節経路については間在細胞の細胞株がなかったためほとんど検討されてこなかった。

申請者は、尿管管間在細胞での H⁺排泄は血液 pH の低下(血液の酸性化)自体も、酸塩基平衡関連遺伝子群の発現を増加させ、H⁺排泄を促すと考えている。しかしこれまでの *in vivo* の実験系では、酸負荷を行うとアルドステロンの分泌も生じるため、間在細胞からの H⁺分泌がアルドステロンでのみ刺激されるのか、あるいは酸負荷自体で刺激されるのかを明らかにする手法は確立していなかった。申請者は近年集合尿管管間在細胞由来の細胞株(IN-IC 細胞)の樹立に成功し(*J Am Soc Nephrol.* 2011)、この細胞がアルドステロンに反応して転写因子ミネラルコルチコイド受容体を調節することを明らかにした(*Am J Physiol Renal Physiol.*2012)。

2. 研究の目的

本研究では、間在細胞において、酸またはアルドステロン刺激特異的に酸塩基平衡能を調節する新たな経路を同定することを目的とした。また、酸塩基平衡関連遺伝子群を刺激特異的に調節する転写因子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 間在細胞由来細胞株を用いて酸刺激、アルドステロン刺激が誘導する遺伝子群を網羅的に解析した。

IN-IC 細胞を pH7.4 の血清非添加溶液で 24 時間培養後、pH7.0 のまたは pH7.4 に 10⁻⁶ M のアルドステロンを添加した血清非添加溶液へ交換し、24 時間培養後に細胞を回収し、total RNA を抽出した。その後 CAGE 法を用いた Transcriptional Start Site Sequencing (TSS-Seq)を行った。

TSS-Seq の解析により酸またはアルドステロン刺激により発現変動する遺伝子群を同定し、Gene Ontology (GO)解析を行った。また同定した転写開始点の周辺のモチーフ解析により、刺激特異的に転写を活性化する転写因子を同定した。

- (2) 解析により、刺激特異的な活性化を示唆された signaling をウェスタンブロット法にて検証した。また刺激特異的発現に関わる候補転写因子の発現を real-time PCR 法にて検証した。

4. 研究成果

- (1) 間在細胞由来細胞株において酸刺激、アルドステロン刺激により誘導される遺伝子群の網羅的に解析。

TSS-Seq の解析：pH7.4 環境に比し、pH7.0 環境下ゲノム上の 651 か所で転写活性の上昇、128 か所で活性の低下を有意に認めた。そのうち Log₂ ≥ 1.0 または ≤ -1.0 の変化をそれぞれ 425 か所と 38 か所に認めた。有意な変化を示した転写開始点の周辺の遺伝子群を検索したところ、200 個の発現増加と 35 個の発現減少を示す遺伝子群を同定した。これらの遺伝子群に酸排泄を行う既知のトランスポーターは含まれておらず、酸刺激が直接的に酸排泄トランスポーターの遺伝子発現を調節することを裏付ける結果は示されなかった。同様の解析をアルドステロン刺激においても行ったところ、アルドステロン特異的誘導遺伝子である serum and glucocorticoid-regulated kinase1 (Sgk1)を含む 32 個の発現増加遺伝子群と、15 個の発現低下遺伝子群を同定した。Sgk1 を含むとはいえ、検出された有意な発現変化を示す遺伝子群は少なかったことは、血清非添加溶液内での培養により、アルドステロンへの反応に乏しかった可能性を考えた。

GO 解析：比較的多数の遺伝子の発現増加を示した、酸刺激誘導性遺伝子群について GO 解析を行ったところ、phosphate metabolic process や apoptosis、protein catabolic process に関わる遺伝子群の増加を見出した。特に ubiquitin-proteasome pathway (UPS) の亢進に寄与する複数の E2、E3 enzyme の有意な発現増加を認めた(表 1)。モチーフ解析については、グアニン(G)、シトシン(C)が豊富な配列の有意な増加を認めた。そのうち既知の転写因子のモチーフとして EGR1 や SP1 が候補として挙げられた。

- (2) 刺激依存的候補 signaling の検証。
酸刺激による UPS の活性化を、ウェスタンブロット法にて検証した。Proteasome 阻害薬である MG132 存在かに細胞を pH7.0 環境下に培養したところ、ユビキ

チン化蛋白の増加が認められ、酸刺激による UPS の活性化が示唆された (図 1)。また pH7.0 環境下での EGR1 mRNA の発現の増加を確認した。EGR1 mRNA は刺激後数時間で発現のピークに至った。EGR1 が酸刺激により活性されることが示唆された (図 2)。

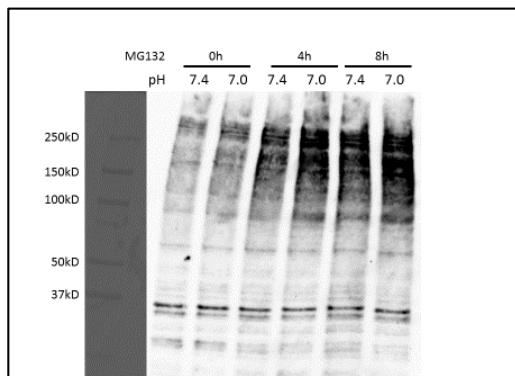


図 1 : コピキチン化蛋白の検出。全細胞蛋白を SDS-PAGE にて分離後、抗コピキチン抗体を用いてウェスタンブロットを行った。MG132 処理後時間依存的に高分子量のコピキチン化蛋白の増加を認め、その増加は pH7.0 環境で増強した。

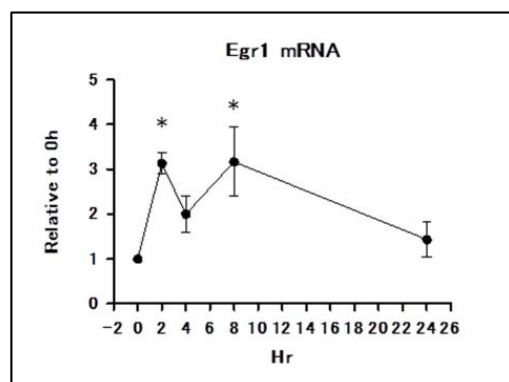


図 2 : EGR1 mRNA の発現。EGR1 mRNA は pH7.4 から pH7.0 へ培地を変更後 2 時間で有意な増加を示した。

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 5 件)

Izumi Y, Nakayama Y, Onoue T, Inoue H, and Mukoyama M. Renal tubular acidosis complicated with hyponatremia due to cortisol insufficiency. *Oxf Med Case Reports*. 2015(11):360-3, 2015. 査読有 DOI: 10.1093/omcr/omv063

Izumi Y, Yang W, Zhu J, Burg MB, and Ferraris JD. RNA-Seq analysis of high NaCl-induced gene expression. *Physiol Genomics*. 47(10):500-13, 2015. 査読有

DOI:

10.1152/physiologicalgenomics.00057.2015.

Itoh K, Izumi Y, Inoue T, Inoue H, Nakayama Y, Uematsu T, Fukuyama T, Yamazaki T, Yasuoka Y, Makino T, Nagaba Y, Tomita K, Kobayashi N, Kawahara K, Mukoyama M, Nonoguchi H. Expression of three isoforms of Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2) in the kidney and regulation by dehydration. *Biochem Biophys Res Commun*. 453(3):356-61, 2014. 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.09089.

Wang R, Ferraris JD, Izumi Y, Dmitrieva N, Ramkissoon K, Wang G, Gucek M, and Burg MB. Global discovery of high NaCl-induced changes of protein phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 307(5):C442-54, 2014. 査読有 DOI: 10.1152/ajpcell.00379.2013.

Nagai T, Yasuoka Y, Izumi Y, Horikawa K, Kimura M, Nakayama Y, Uematsu T, Fukuyama T, Yamazaki T, Kohda Y, Hasuie Y, Nanami M, Kuragano T, Kobayashi N, Obinata M, Tomita K, Tanoue A, Nakanishi T, Kawahara K, and Nonoguchi H. Reevaluation of erythropoietin production by the nephron. *Biochem Biophys Res Commun*. 449(2): 222-8, 2014. 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.05.014.

[学会発表] (計 14 件)

Nishiguchi Y, Inoue H, Onoue T, Kakizoe Y, Izumi Y, Kuwabara T, Miyoshi T, Adachi M, Nakayama Y, Mukoyama M. A case of proliferative glomerulonephritis with monoclonal IgG deposits exhibiting marked nephrotic syndrome who responded well to the renin-angiotensin system blockade alone. アメリカ腎臓学会 2015 年 11 月 5 日 サンディエゴ

Nakagawa T, Kakizoe Y, Miyasato Y, Mizumoto T, Hayata M, Izumi Y, Kuwabara T, Miyoshi T, Adachi M, Kitamura K, and Mukoyama M. The protective role of doxycycline for cisplatin-induced AKI by its anti-inflammatory and anti-oxidative effects. アメリカ腎臓学会 2015 年 11 月 7 日 サンディエゴ
Eguchi K, Izumi Y, Nakagawa T, Nakayama Y, Inoue H, Kakizoe Y, Kuwabara T, Mukoyama M. Regulation of Rhcg by aldosterone in intercalated cells of the collecting ducts. アメリカ腎臓学会 2015 年 11 月 7 日 サンディエゴ

Izumi Y, Yasuoka Y, Nakayama Y, Inoue H, Mukoyama M, Kawahara K, and Nonoguchi H.

HIF1a and HIF2-induced erythropoietin production along the nephron. アメリカ腎臓学会 2015年11月7日 サンディエゴ

Izumi Y, Eguchi K, Nakagawa T, Nakayama Y, Inoue H, Kakizoe Y, Kuwabara T, Nonoguchi H, and Mukoyama M. TSS-Seq analysis of low pH-induced gene transcripts in the intercalated cells of the collecting ducts. アメリカ腎臓学会 2015年11月7日 サンディエゴ
泉裕一郎、小野真、松永愛子、山口春奈、井上秀樹、中山裕史、向山政志 ガリウムシンチグラフィがニューモシスチス肺炎の診断と治療効果判定に有用であった血液透析患者の一例 第60回日本透析医学会学術集会・総会 2015年6月28日 横浜

泉裕一郎、黒木菜見人、中山裕史、井上秀樹、尾上友朗、中川輝政、水本輝彦、早田学、柿添豊、栗原孝成、向山政志 間在細胞における酸塩基平衡関連遺伝子群の発現に対するアルドステロンとpH変化の効果 第58回日本腎臓学会学術総会 2015年6月6日 名古屋

泉裕一郎、安岡有紀子、中山裕史、井上秀樹、向山政志、河原克雅、野々口博史 「腎尿細管における hypoxia-inducible factor 2 の発現の検討 第58回日本腎臓学会学術総会 2015年6月5日 名古屋

泉裕一郎、中山裕史、尾上友朗、井上秀樹、栗原孝成、野々口博史、北村健一郎、向山政志 「低コルチゾール血症により SIADH様の低Na血症を呈し腎尿細管性アシドーシスを合併した一例 第88回日本内分泌学会総会 2015年4月25日 東京

泉裕一郎、安岡有紀子、永井孝憲、中山裕史、井上秀樹、中西健、向山政志、河原克雅、野々口博史 腎尿細管におけるエリスロポエチン産生 第18回心血管内分泌代謝学会学術総会 2014年11月21日 横浜

Izumi Y, Yasuoka Y, Nagai T, Nakayama Y, Inoue H, Nakanishi T, Mukoyama M, Kawahara K, and Nonoguchi H. Erythropoietin production by the nephron. アメリカ腎臓学会 2014年11月15日 フィラデルフィア

Izumi Y, Burg MB, and Ferraris JD. Acute and chronic regulation of the osmoprotective transcription factor NFAT5. アメリカ腎臓学会 2014年11月15日 フィラデルフィア

Izumi Y, Nakayama Y, Inoue H, Onoue T, Nonoguchi H, and Mukoyama M. Computational analysis of the effect of aldosterone and low pH on gene expression and cell function. アメリカ腎臓学会 2014年11月15日 フィラデルフィア

泉裕一郎、安岡有紀子、永井孝憲、堀川加穂理、中山裕史、名波正義、中西健、田上昭人、向山政志、富田公夫、河原克雅、野々口博史 腎尿細管におけるエリスロポエチン産生とアルドステロンによる制御機構 第57回日本腎臓学会学術総会 2014年7月6日 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泉 裕一郎 (IZUMI, Yuichiro)

熊本大学医学部附属病院・腎臓内科・医員
研究者番号：20736243