

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 24 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20390060

研究課題名（和文） プロテアーゼによる ENaC 細胞内局在制御メカニズムの解明

研究課題名（英文） Regulation of intracellular localization of ENaC by protease

研究代表者

丸中 良典（MARUNAKA YOSHINORI）

京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00127036

研究成果の概要（和文）：

アルドステロンが、管腔側膜結合型プロテアーゼ発現・活性を亢進させることにより、ENaCの管腔側膜上滞在時間を増大させることを明らかにした。

- 1) アルドステロンの投与の有無により管腔側膜結合型プロテアーゼ (channel activating protease: CAP) の発現が促進されることをウエスタンブロッティング法を用いて確認した。この結果、アルドステロン投与により、CAPの発現および活性とも、増大することが明らかにした。
- 2) 上記の結果、アルドステロン投与により ENaC のクリベッジが促進され、リサイクル効率を増大させることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We tried to clarify the regulation of intracellular localization of ENaC by protease. We have found that: 1) aldosterone increases expression of protease, and 2) aldosterone elevates the recycling efficiency of ENaC in the intracellular space by cleavage of ENaC mediated through protease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：ENaC、アルドステロン、皮質集合管、プロテアーゼ阻害剤、浸透圧、
トラフィックキング、高血圧、ナトリウム輸送

1. 研究開始当初の背景

体液ナトリウム量は、我々の血圧調節に必要な働きを担っている。体液ナトリウム量の

制御は、主に腎遠位部尿細管（遠位尿細管および皮質集合管）における上皮型ナトリウムチャネル (Epithelial Na⁺ Channel: ENaC)

を介するナトリウム再吸収調節によって行われている。腎遠位部尿細管上皮細胞には、(1) 管腔側膜結合型プロテアーゼ、および(2) ゴルジ装置膜結合型プロテアーゼの2種類が存在し、これらのプロテアーゼが ENaC 機能(活性)制御に関与することは知られている。しかし、これらのプロテアーゼの ENaC の細胞内局在制御/ENaC タンパク寿命に対して果たす役割は不明である。

本研究の目的は、血圧調節に係わる体液ナトリウム量制御機構を明らかにすることである。

2. 研究の目的

腎遠位部尿細管でのナトリウム輸送制御機構を解明することを目的とし、以下の仮説を証明する。

1) 管腔側膜結合型プロテアーゼ、および(2) ゴルジ装置膜結合型プロテアーゼの2種類のプロテアーゼが、腎遠位部尿細管(皮質集合管も含む)上皮細胞に存在する ENaC に対して異なる構造修飾を引き起こすことにより、ENaC の細胞内局在を制御し、ENaC タンパクの寿命を調節している。

3. 研究の方法

本研究には、腎皮質集合管上皮細胞 A6 細胞を用いた。また、生化学的・分子生物学的・電気生理学的手法を用いて、本研究目的を明らかにした。

4. 研究成果

アルドステロンが、管腔側膜結合型プロテアーゼ発現・活性を亢進させることにより、ENaC の管腔側膜上滞在時間を増大させることを明らかにした。

1) アルドステロンの投与の有無により管腔側膜結合型プロテアーゼ(channel

activating protease: CAP) の発現が促進されることをウエスタンブロッティング法を用いて確認した。この結果、アルドステロン投与により、CAP の発現および活性とも、増大することが明らかにした。

2) 上記の結果、アルドステロン投与により ENaC のクリベッジが促進され、リサイクル効率を増大させることを明らかにした。

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 32 件)

① Niisato N, Ohta M, Eaton DC, Marunaka Y. Hypotonic stress upregulates beta- and gamma-ENaC expression through suppression of ERK by inducing MKP-1. Am J Physiol. 査読有、2012、印刷中。

② Niisato N, Marunaka Y. Sensing mechanism of stretch activated ion channels Mechanically Gated Channels and mechanisms of their regulation / Mechanosensitivity in Cells and Tissues. Springer. 査読有、2012、印刷中。

③ Komatani-Tamiva N, Daikoku E, Takemura Y, Shimamoto C, Nakano T, Iwasaki Y, Matsumura H, Marunaka Y, Nakahari T. Procaferol-stimulated increases in ciliary bend amplitude and ciliary beat frequency in mouse bronchioles. Cell Physiol Biochem. 査読有、2012、印刷中。

④ MARUNAKA Y, Niisato N, Taruno A, Ohta M, Miyazaki H, Hosogi S, Nakajima K, Kusuzaki K, Ashihara E, Nishio K, Iwasaki Y,

Nakahari T, Kubota T. Regulation of epithelial sodium transport via epithelial Na⁺ channel (ENaC). J Biomed Biotechnol. 査読有、2011:978196, 2011.

⑤Nakajima K, Niisato N, MARUNAKA Y. Quercetin stimulates NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells via activation of Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter. Cell Physiol Biochem. 査読有、28:147-156, 2011.

⑥Taruno A, Marunaka Y. Analysis of blocker-labeled channels reveals the dependence of recycling rates of ENaC on the total amount of recycled channels. Cell Physiol Biochem. 査読有、26 卷、925-934、2010.

⑦Sawabe Y, Shimamoto C, Sakai A, Kuwabara H, Saad AH, Nakano T, Takitani K, Tamai H, Mori H, MARUNAKA Y, Nakahari T. PPAR- α modulation of Ca²⁺-regulated exocytosis via arachidonic acid in guinea pig antral mucous cells. Exp Physiol. 査読有、95:858-868, 2010.

⑧Tokuda S, Miyazaki H, Nakajima K, Yamada T, MARUNAKA Y. NaCl flux between apical and basolateral side recruits claudin-1 to tight junction strands and regulate paracellular transport. Biochem Biophys Res Commun. 査読有、393:390-396, 2010.

⑨Tokuda S, Miyazaki H, Nakajima K, Yamada T, MARUNAKA Y. Hydrostatic pressure regulates tight junctions, actin cytoskeleton and transcellular ion transport. Biochem Biophys Res Commun. 査

読有、390:1315-1321, 2009.

⑩Tokuda S, Niisato N, Nagai T, Taruno A, Nakajima K, Miyazaki H, Yamada T, Hosogi S, Ohta M, Nishio K, Iwasaki Y, MARUNAKA Y. Regulation of paracellular Na⁺ and Cl⁻ conductances by hydrostatic pressure. Cell Biol Int. 査読有、33:949-956, 2009.

⑪Yamada T, Niisato N, MARUNAKA Y. Effects of extracellular chloride ion on epithelial sodium channel (ENaC) in arginine vasotocin (AVT)-stimulated renal epithelial cells. Biomed Res. 査読有、30:193-198, 2009.

⑫Tokuda S, Niisato N, Nakajima K, MARUNAKA Y. Regulation of the paracellular Na⁺ and Cl⁻ conductances by the NaCl-generated osmotic gradient in a manner dependent on the direction of osmotic gradients. Biochem Biophys Res Commun. 査読有、366:464-470, 2008.

⑬Miyazaki H, Shiozaki A, Niisato N, Ohsawa R, Itoi H, Ueda Y, Otsuji E, Yamagishi H, Iwasaki Y, Nakano T, Nakahari T, MARUNAKA Y. Chloride ions control the G1/S cell-cycle checkpoint by regulating the expression of p21 through a p53-independent pathway in human gastric cancer cells. Biochem Biophys Res Commun. 査読有、366:506-512, 2008.

⑭Taruno A, Niisato N, MARUNAKA Y. Intracellular calcium plays a role as the second messenger of hypotonic stress in gene regulation of SGK1 and ENaC in renal

epithelial A6 cells. Am J Physiol Renal Physiol. 査読有、 294:F177-186, 2008.

⑮ Niisato N, MARUNAKA Y.

Osmortransduction through volume-sensitive Cl⁻ channels. Mechanosensitive ion channels / Mechanosensitivity in Cells and Tissues. Springer. 査読有、 Vol. 1, 179- 202, 2008.

[学会発表] (計 112 件)

① Marunaka Y, Taruno A. Recycling rates of ENaC depend on the total amount of recycled channels. The 89th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2012. 3. 29-31; Matsumoto.

② Marunaka Y, Niisato N, Ohta M.

Hypotonicity-induced upregulation of beta- and gamma-ENaC expression through suppression of ERK by inducing MKP-1. The 7th International Symposium on Aldosterone and the ENaC/Degenerin Family of Ion Channels: Molecular Mechanisms and Pathophysiology. September 18-22, 2011; Pacific Grove, California, USA.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://kpum-molecular-cell-physiology.info/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸中 良典 (MARUNAKA YOSHINORI)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：00127036

(2) 研究分担者

新里 直美 (NIISATO NAOMI)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号：00237645
中島 謙一 (NAKAJIMA KEN-ICHI)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：40398392
楠崎 克之 (KUSUZAKI KATSUYUKI)
平安女学院・文化創造センター・客員教授
研究者番号：30177993
芦原 英司 (ASHIHARA EISHI)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：70275197
細木 誠之 (HOSOGI SHIGEKUNI)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：30405261