

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31日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390096

研究課題名（和文）水・電解質代謝を制御する分子機能の解明

研究課題名（英文）Molecular Mechanisms to Regulate The Metabolism of Water and Electrolytes

研究代表者

本家 孝一（HONKE KOICHI）

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：80190263

研究成果の概要（和文）：腎遠位尿細管および集合管における水・電解質再吸収調節に関わる分子調節メカニズムの解明を目指し、ヒト副腎皮質細胞におけるアンジオテンシンⅡ刺激によるアルドステロン産生分泌シグナル伝達経路におけるカルシニューリンの関与を明らかにし、マスキュリン遺伝子欠損により抗利尿ホルモン（バソプレシン）の分泌が低下することを見出した。また、硫酸化糖脂質欠損マウスに高塩濃度水を飲ませると尿量と飲水量が増加したが、アクアポリンと Na^+ , K^+ -ATPaseの発現量と膜での局在は正常であった。

研究成果の概要（英文）：Aiming at elucidation of molecular regulatory mechanisms underlying the reabsorption of water and electrolytes on the distal tubules and collecting ducts of the nephron, we demonstrated calcineurin is involved in the signaling pathway dictating the angiotensin II-dependent aldosterone secretion. Further, we found that deficiency of the mascurin gene causes depletion of the antidiuretic hormone (vasopressin). Finally, amounts of urine and water intake were increased when a high salt concentration of water was given to the sulfated glycolipid-deficient mice. However expression levels and membrane localizations of aquaporin and Na^+ , K^+ -ATPase were not deteriorated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：代謝異常学、水・電解質代謝

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の体液調節は腎臓で行われ、ホルモンや液性因子によって制御される。集合管主細胞では、視床下部で産生され脳下垂体を通して血中に分泌される抗利尿ホルモン

（ADH、別名バソプレシン）が、 V_2 受容体に結合してアデニレートシクラーゼを活性化しcAMP濃度を上昇させる。このcAMP濃度の上昇がアクアポリン水チャネル（AQP2）を管腔膜へと運び、水の再吸収を促す。一方、尿路

腔のNa⁺イオンは、管腔膜に局在する上皮Na⁺チャンネル(ENaC)で吸収されるが、この流入は基底膜に局在するNa⁺,K⁺-ATPaseによって形成される電気化学勾配によって駆動される。さらに、ENaCの発現と管腔膜への局在はアルドステロン-ミネラルコルチコイド受容体(MR)複合体で制御される。Na⁺イオンの流入によって膜内外にNa⁺イオン濃度差が生じるが、この濃度差が形成する経上皮電位差は、K⁺イオン分泌とH⁺イオン分泌(A型介在細胞)の駆動力となる。

アルドステロンは、ヒトの重要なミネラルコルチコイドで、副腎皮質球状層細胞で産生される。アンジオテンシンIIは、AT₁受容体を介して、アルドステロンの産生分泌を促す。この過程でアルドステロン合成酵素遺伝子(*CYP11B2*)の転写が促進される。我々は、アンジオテンシンII刺激から*CYP11B2*遺伝子転写促進にいたる細胞内シグナル伝達経路に、Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインホスファターゼのカルシニューリンが介在することを発見したが、詳細なメカニズムは不明であった。カルシニューリン阻害剤は、免疫抑制剤として移植後の拒絶反応の抑制や自己免疫疾患の治療に使用されているが、最も問題となる副作用は高血圧症である。カルシニューリン阻害剤が投与されると、血中のレニンとアンジオテンシンIIは増加するがアルドステロンは増加しない。このため、アンジオテンシンIIによるアルドステロン産生分泌促進の過程にカルシニューリンの関与が予想されるが、これまで指摘されていなかった。

一方、我々はラット脳視床下部においてテストステロンによって発現誘導される分子としてマスキュリンを発見し、その生理機能を検証するためマスキュリン遺伝子破壊マウスを作製した。マスキュリンKOマウスは、健常マウスの2.7倍の尿量増加と比重低下を伴う尿崩症を発症することを見出した。この原因が脳視床下部における抗利尿ホルモン(ADH)バソプレシンの産生・分泌に異常がある(中枢性)のか、腎尿細管におけるADHに対する応答に異常がある{末梢性}のか不明であった。尿崩症の遺伝性原因として、これまでADH、バソプレシン受容体(V2受容体)、アクアポリン(AQP2)の遺伝子変異が知られているが、マスキュリン遺伝子の変異は報告がない。

腎尿細管には硫酸化糖脂質のスルファチドが豊富に存在するので何らかの生理機能を有すると予想されてきた。スルファチド合成酵素(CST)のノックアウトマウスを作製したところ、ミエリンの接合異常による神経症状が現れ、精子形成が中断した(Honke et al. (2002) Proc Natl Acad Sci USA

99:4227-4232)が、通常の飼育条件では腎機能の異常はみられなかった。最近、このCST-KOマウスに1%食塩水を飲水させ塩分負荷をかけたところ、尿がアルカリ性になり、尿中Na⁺/K⁺比が野生型マウスと比して有意に上昇することを見出した。ニジマス海水馴化時にスルファチドが鰓上皮のNa⁺,K⁺-ATPaseの活性を調節するという報告(Lingwood et al. (2005) J Biol Chem 280:36545-36550)があることから、CST-KOマウスでは、集合管でのNa⁺,K⁺-ATPaseの活性が低下しているため、十分な経上皮電位差を作ることができず、Na⁺の吸収、K⁺とH⁺の分泌が抑制されている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、腎集合管における水・電解質排出調節に関わる分子調節メカニズムの解明を目指し、(1)ヒト副腎皮質細胞におけるアンジオテンシンII刺激によるアルドステロン産生分泌シグナル伝達経路におけるカルシニューリンの関与、(2)マスキュリン遺伝子欠損による尿崩症発症の機序、(3)電解質および水素イオン分泌に関するスルファチドの役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) カルシニューリンが介在するアンジオテンシンII刺激によるアルドステロン産生分泌シグナル

ヒト副腎皮質球状層由来細胞株NIH-H295Rは、アンジオテンシンIIによるアルドステロン産生誘導能を保持している。我々は、リアルタイムPCRを用いて*CYP11B2*のmRNA量を定量する系を確立した。さらに、*CYP11B2*遺伝子の5'-上流域プロモーター部分をルシフェラーゼ遺伝子に繋いだレポーター遺伝子を作製した。この両者を基盤アッセイ系として、カルシニューリンの特異的阻害薬であるサイクロスポリンAとタクロリムス(FK506)が、アンジオテンシンIIで誘導される*CYP11B2* mRNA量増加とルシフェラーゼ活性の上昇を阻害することを見出した。

H295R細胞にアンジオテンシンIIを添加した後、細胞内におけるカルシニューリンの活性変化を、NFAT分子を用いたFRETセンサー(Newman et al. (2008) Mol. BioSyst. 4, 496-501)の変化で調べた。

活性型カルシニューリン(C末端側の自己阻害ドメインを欠いている)遺伝子を組み込んだアデノウイルスをH295R細胞に感染させたときの*CYP11B2*のmRNA量の変化を調べた。さらに、アデノウイルス感染と同時にカルシニューリン阻害薬のタクロリムスおよびサイクロスポリンAを添加したときの*CYP11B2*mRNA量の変化を調べた。

siRNAを用いてカルシニューリンの発現を抑制したときの、アンジオテンシンII誘導性 *CYP11B2* mRNA量増加への影響を調べた。

活性型カルシニューリン遺伝子を組み込んだアデノウイルスを感染させ、レポーター遺伝子 (*CYP11B2*上流域をルシフェラーゼ遺伝子と繋いだもの) の発現をルシフェラーゼ活性で調べた。同時にタクロリムスおよびサイクロスポリンAを添加したときのルシフェラーゼ活性を調べた。

*CYP11B2*遺伝子のプロモーター部位には2箇所の制御領域Ad5とAd1が存在する。この部位に変異を導入したレポーター遺伝子を作成し、ルシフェラーゼアッセイによりカルシニューリンがどの制御領域に影響するかを調べた。

Chipアッセイにより、*CYP11B2*遺伝子のプロモーターに結合している転写制御因子を調べた。さらに、転写制御因子の結合へのCN阻害剤サイクロスポリンA (CysA) の影響を調べた。

(2) マスキュリンによる抗利尿ホルモン作用調節機構

マスキュリン-KO マウスと野生型マウスについて、尿量、飲水量、尿中ならびに血中のNa⁺およびK⁺濃度、尿浸透圧、尿比重、血圧 (tail-cuff 法) を測定した。

マスキュリン-KO マウスと野生型マウスに、ADH 注射 (デスマプレシン 250 ng/mouse)、食塩水負荷試験 (1%食塩水を飲水に用いる) を行った場合の尿量、飲水量、尿中ならびに血中のNa⁺およびK⁺濃度、尿浸透圧、尿比重を比較検討した。

(3) スルファチドによる電解質/水素イオン分泌調節機構

CST-KO マウスと野生型マウスに食塩水負荷をかけて、尿中および血中のNa⁺濃度、K⁺濃度、pHの生化学検査を行い比較検討した。血中のクレアチニンとBUNをチェックし急性腎不全を伴うかどうかを調べた。

CST-KO マウスと野生型マウスに食塩水負荷をかけた際の尿細管の損傷部位を調べるため、病理組織学的検査を行った。

集合管主細胞におけるスルファチドの作用部位を調べるため、スルファチドがapical membraneとbasolateral membraneのどちら側に局在するかを免疫組織化学で調べた。

CST-KOマウスと野生型マウスに食塩水負荷をかけた後、集合管主細胞におけるNa⁺, K⁺-ATPaseの発現量と局在を免疫染色で調べた。

4. 研究成果

(1) カルシニューリンが介在するアンジオテンシンII刺激によるアルドステロン産生分泌シグナル

副腎皮質球状帯におけるアルドステロンの生合成は、アルドステロン合成酵素 *CYP11B2* によって触媒される。*CYP11B2* 遺伝子の発現は、アンジオテンシンII (Ang II) 刺激による細胞内Ca²⁺濃度の上昇で促進される。カルシニューリン (CN) は、Ca²⁺で活性化される重要なメディエーターの一つであるので、ヒト副腎皮質細胞 H295R においてCNがAng IIによる*CYP11B2* 遺伝子発現に関与するかを調べた。その結果、(1) CN阻害剤のサイクロスポリンA (CysA) とタクロリムス (FK506) は、Ang IIによる*CYP11B2* mRNAの増加を抑制した。(2) 活性型CNを強制発現させると、*CYP11B2* mRNAが増加した。

(3) siRNAによってCNをノックダウンさせると、Ang IIによる*CYP11B2* mRNAの増加を抑制した。(4) *hCYP11B2* 遺伝子の5'-上流領域 (-134 to +43 bp) にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポーター遺伝子を用いた解析により、CysAとFK506の両者がAng IIによるルシフェラーゼ活性の上昇を阻害した。

(5) 生きているH295R細胞において、Ang II刺激に伴うCNの活性化を、NFATの構造変換に伴う蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer: FRET) で確認した。以上の結果を総合して、CNはAng IIによる*CYP11B2* 遺伝子発現に関与すると結論した。このメカニズムは、CysA使用時にみられる高血圧症では、血中レニン濃度が高いにもかかわらずアルドステロン濃度は低いことを説明する。

次に、CNの下流にどのようなシグナル分子や転写因子が存在するかを調べた。*CYP11B2* 遺伝子のプロモーター部位には2箇所の制御領域Ad5とAd1が存在することがRaineyらにより指摘されているが、制御領域に変異を導入したレポーター遺伝子を用いたルシフェラーゼアッセイによりCNシグナルは両方の制御領域に関与することがわかった。

Ad1へはp-CREBが結合することが想定されているが、Ang II刺激後5時間におけるChipアッセイにより、CREBとCBPが*CYP11B2* 遺伝子のプロモーターに結合していることが確認され、この結合はCN阻害剤のCysAでキャンセルされた。一方、Ad5へはNR4Aファミリーの転写因子が結合することが想定されているが、Ang II刺激後1時間の初期にはNur77が結合し、5時間後にはNOR1に置き換わることが示唆された。このNOR1の結合もCysAによりキャンセルされた。以上から、CNが*CYP11B2* 遺伝子プロモーターへの転写因子の結合を正に制御していることがわかった。

さらに、Ang II刺激によるCREBとコアクチベーターの翻訳後修飾への影響を継時的に調べた。その結果、CREBおよびコアクチベーターがリン酸化以外の翻訳後修飾を受け、そ

の修飾状態が Ang II の刺激を受けてから 1 時間後に変化すること、この変化が CN 阻害剤 CysA によりキャンセルされることを見出した。CN は脱リン酸化酵素なのでリン酸化とこの翻訳後修飾との関係、CREB の翻訳後修飾による転写活性への影響を追究中である。

(2) マスキュリンによる抗利尿ホルモン作用調節機構

マスキュリン-KO マウスは野生型マウスと比べて尿量が 2.7 倍多く、飲水量も多い。食塩水負荷 (1%食塩水を飲水に用いる) を行うと一層飲水量が増加した。このため、塩負荷 KO マウスでは体内に水分が貯留した。

マスキュリン-KO マウスと野生型マウスに、ADH (デスマプレシン 250 ng/mouse) を注射すると、尿量が減少したことから、KO マウスは ADH 分泌不全による中枢性尿崩症と考えられた。

興味深いことに、マスキュリン-KO マウスにアルドステロンを投与すると飲水量が抑制され正常レベルに戻った。

(3) スルファチドによる電解質/水素イオン分泌調節機構

免疫組織化学では、アクアポリン (AQP2) は集合管主細胞の頂 apical membrane に局在していたが、スルファチドは腎髄質の細胞に広く、apical membrane と basolateral membrane の両側に局在していた。CST-KO マウスも AQP2 の局在は保たれていた。

CST-KO マウスと野生型マウスに食塩水負荷をかけた後、腎髄質における Na^+ , K^+ -ATPase の発現量と局在に変化はみられなかった。 Na^+ , K^+ -ATPase は basolateral membrane に発現していた。集合管主細胞に発現しているとされる ENaC は、適切な抗体が得られず明確に観察できなかった。

イヌ由来の集合管主細胞モデル細胞の MDCK 細胞に CST の siRNA を導入して CST をノックダウンした細胞を作製し、フルーサイトメトリーでスルファチドの発現が抑制されていることを確認した。親細胞と CST ノックダウン細胞における *in vivo* の Na^+ , K^+ -ATPase 活性を比較するための実験系を構築中である。

スルファチド欠損マウスは、野生型マウスと比べて飲水量が多く尿量も多いが、高塩濃度水 (1%NaCl または 1%KCl) 負荷をかけると一層飲水量と尿量が増加した。糖尿病と尿崩症が疑われたが、血糖値に異常はなく糖尿病は否定された。血中のクレアチニン濃度は正常なので、糸球体ろ過機能は保たれていると考えられた。

飲水を制限すると尿量が劇的に減ること、塩水負荷により腎髄質にアクアポリン AQP2 の発現が正常に誘導されることから尿崩症

も否定的である。以上より、口渇中枢に何らかの過剰刺激が入力されている可能性が考えられた。

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)

- ① Jiang S, Kotani N, Ohnishi T, Miyagawa-Yamaguchi A, Tsuda M, Yamashita R, Ishiura Y, Honke K: A proteomics approach to the cell-surface interactome using the enzyme-mediated activation of radical sources reaction. *Proteomics* 12:54-62 (2012) 査読有 doi: 10.1002/pmic.201100551
- ② Honke K, Kotani N: The enzyme-mediated activation of radical source reaction: a new approach to identify partners of a given molecule in membrane microdomains. *J. Neurochem.* 116:690-695 (2011) 査読有 doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07027.x.
- ③ Yamashita R, Kotani N, Ishiura Y, Higashiyama S, Honke K: Spatiotemporally-regulated interaction between β 1 integrin and ErbB4 that is involved in fibronectin-dependent cell migration. *J. Biochem.* 149: 347-355 (2011) 査読有 doi: 10.1093/jb/mvq148
- ④ Taniuchi K, Cerny RL, Tanouchi A, Kohno K, Kotani N, Honke K, Saibara T, Hollingsworth MA: Overexpression of GalNAc-transferase GalNAc-T3 promotes pancreatic cancer cell growth. *Oncogene* 30: 4843-4854 (2011) 査読有 doi: 10.1038/onc.2011.194.
- ⑤ Yamashiro T, Kuge H, Zhang J, Honke K: Calcineurin mediates the angiotensin II-induced aldosterone synthesis in the adrenal glands by upregulation of transcription of the *CYP11B2* gene. *J. Biochem.* 148:115-123 (2010) 査読有 doi: 10.1093/jb/mvq037
- ⑥ Ishiura Y, Kotani N, Yamashita R, Yamamoto H, Kozutsumi Y, Honke K: Anomalous expression of Thyl (CD90) in B-cell lymphoma cells and proliferation inhibition by anti-Thyl

antibody treatment.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 396:
329-334 (2010) 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.092>

〔学会発表〕 (計3件)

- ① Honke K, Miyagawa-Yamaguchi A, Kotani N: Analysis of molecular clustering on the living cell membrane. Glycobiology Japan-Netherland Joint Seminar 2011, 2011年10月11日, 名古屋大学
- ② 本家孝一: 硫酸化糖鎖の生理機能. 遺伝子・デリバリー研究会第11回夏期セミナー, 2011年8月9日, 高知三翠園
- ③ Honke K, Yamashita T: Functions of glycoconjugates in the membrane microdomains in development. The 28th Naito Conference on “Glycan expression and regulation [I]”, July 27-30, 2010, Shonan, Kanagawa, Japan

〔図書〕 (計2件)

- ① 本家孝一: 脂質. In “カラーイラストで学ぶ集中講義生化学 (鈴木敬一郎、本家孝一、大河原知水、藤原範子共編著)” , メジカルビュー社, pp242-331, 2011
- ② Honke K, Taniguchi N: Animal models to delineate glycan functionality. In “The Sugar Code. Fundamentals of Glycosciences (ed. by Gabius H. -J.)” , Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp385-401, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本家 孝一 (HONKE KOICHI)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号: 80190263