

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19493

研究課題名(和文)腎集合尿管酸排泄機構におけるユビキチン-プロテアソーム系の役割の解明

研究課題名(英文)Role of the ubiquitin-proteasome system in acid excretion of the renal collecting ducts.

研究代表者

泉 裕一郎(Izumi, Yuichiro)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：20736243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：食事により体内に産生された酸が、尿中へ排泄される際に必要なアンモニアのトランスポーターで、集合尿管間細胞に発現するRhesus Blood Group, C Glycoprotein (Rhcg) の、アルドステロンによる発現調節機序について検討した。また、慢性腎臓病に合併する代謝性アシドーシスにより活性化されるユビキチン-プロテアソーム系(UPS)の、Rhcg蛋白に対する影響を検討した。その結果、アルドステロンはRhcg蛋白の間細胞の膜上への発現を直接的に促進することが明らかとなった。また低pHは蛋白のユビキチン化を促進し、Rhcg蛋白もまたユビキチン化を受けることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Nonvolatile acid is generated from diet and cell metabolism, and then excreted to urine through the intercalated cells in renal collecting ducts by aldosterone. We investigated the role of aldosterone in the regulation of Rhesus Blood Group, C Glycoprotein (Rhcg) protein. In vivo study, we found that aldosterone induced the accumulation of Rhcg. Consistent with that, aldosterone directly induced the expression of Rhcg protein in membrane fraction of the intercalated cell line. We further investigated the role of the ubiquitin-proteasome system (UPS), which is activated by metabolic acidosis, in the regulation of Rhcg protein. We found that low pH induced ubiquitination of proteins in the intercalated cell line. Using immunoprecipitation method, we found Rhcg was ubiquitinated. The results suggest that aldosterone and UPS regulate the expression of Rhcg protein through interaction of the two.

研究分野：腎臓生理学、腎臓病学

キーワード：代謝性アシドーシス 慢性腎臓病 ユビキチン プロテアソーム系

1. 研究開始当初の背景

腎集合尿管は主細胞と間在細胞からなり、主細胞は水、ナトリウム(Na)再吸収を、間在細胞は酸(H⁺)排泄を役割とし、その機能は副腎皮質ホルモンであるアルドステロンにより調節されている。生理的条件下では、アルドステロンは食物摂取による酸負荷に反応して副腎皮質より血中へ分泌され、間在細胞を刺激し尿中へH⁺排泄を促す。アルドステロンによる酸排泄の詳細な分子機序については十分に検討されていない。申請者は、予備実験で、間在細胞に発現するアンモニア(NH₃)排泄トランスポーターである Rhesus Blood Group, C Glycoprotein (Rhcg) 蛋白の細胞膜上の発現がアルドステロンにより増加することを *in vivo* で確認している。NH₃はH⁺がNH₄⁺を形成して尿中へ排泄されるために重要である。

一方腎障害の存在下では、糸球体濾過率の低下と間在細胞の障害により、尿中H⁺排泄が低下するために体内にH⁺が貯留し、代謝性アシドーシスが生じる。腎障害においてどのような機序でH⁺排泄が低下するかは明らかではない。代謝性アシドーシスが慢性化すると、骨格筋の蛋白異化亢進が進み筋萎縮を生じるが、これはアシドーシスを刺激とした筋細胞のコピキチン-プロテアソーム系(UPS)の亢進が原因であることが指摘されている。尿管細胞におけるUPSの役割として、主細胞における上皮型Naチャンネル(ENaC)の発現調節が知られる。間在細胞におけるUPSの役割については明らかではない。最近申請者らは、IN-1C細胞に酸ストレスを与えると、UPS関連遺伝子群の発現を刺激することを見出した。

代謝性アシドーシス下には、アルドステロンの分泌亢進と共に、腎組織においてはUPSが亢進し、尿中酸排泄はアルドステロンとUPSの相互作用を受けており、Rhcgの発現調節が関与するとの仮説を立て、申請者は本研究を進めた。

2. 研究の目的

本研究では、酸負荷により生体に生じる、腎組織内UPSの活性化とアルドステロン作用の増強が、間在細胞におけるRhcgの発現をどのように調節するかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

in vivo において、アシドーシスとアルドステロン刺激による尿管細胞のUPS活性とRhcgの細胞膜上の発現の変化を検討した。

in vitro において、酸ストレスとアルドステロン刺激による、UPSを介したRhcgの細胞膜上の発現の変化を検討した。

4. 研究成果

初めにC57BL/6Jマウスにアルドステロ

ンを持続皮下投与したところ、尿中アンモニア排泄は有意に増加し、腎組織細胞膜分画内のRhcg蛋白の増加をウェスタンブロット法に確認した(図1)。蛍光免疫染色法によって、Rhcg蛋白は、アルドステロン刺激により特に腎臓髄質外層の間在細胞において尿管腔側への明らかな局在化を認めた。

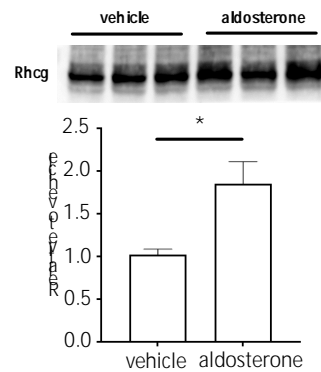


図1. アルドステロン投与の腎組織細胞膜分画内Rhcg蛋白発現への効果。

次にマウスに両側副腎摘出術(ADX)を施したところ、尿中アンモニア排泄量は減少し、持続皮下投与によるアルドステロンの補充を行ったところ、尿中アンモニア排泄の低下は回復した。蛍光免疫染色法においても、同様にADXマウスでは間在細胞の尿管腔側膜へのRhcgの局在が阻害され、アルドステロンの補充により局在が回復した。

さらに、ADXを施した上でNH₄Cl飲水による酸負荷を行ったところ、sham群に比べADX群では尿中アンモニア排泄が阻害され、アルドステロン持続皮下投与により尿中アンモニア排泄はsham群と同等に回復した。腎組織細胞膜分画内のRhcg蛋白の発現は、尿中アンモニア排泄と同様の変化を示し、ADXにより発現が減少し、アルドステロン補充により発現が回復した(図2)。

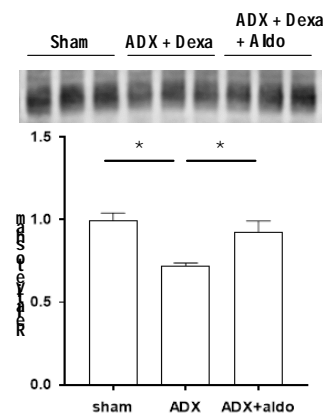


図2. 代謝性アシドーシス下における腎組織細胞膜分画内Rhcg蛋白発現に対する両側副腎摘出と、アルドステロン補充の効果。

初めに、IN-IC 細胞における酸負荷の UPS に対する効果を検討するため、IN-IC 細胞を pH7.4 (対照) と pH7.0 (酸負荷) 環境で 16 時間培養後、プロテアソーム阻害薬である MG132 存在下にさらに 8 時間培養し、ユビキチン蛋白の発現量を検討したところ、pH7.0 でユビキチン蛋白の有意な発現増加を認めた。酸負荷は蛋白のユビキチン化を促進し、UPS を活性化することが示唆された。

次に、Rhcg 蛋白の UPS を介した翻訳後調節を検討するために Flag 標識したマウス Rhcg 蛋白 (Flag-Rhcg) を IN-IC 細胞に安定発現させた細胞集団を作製した。これらの細胞を MG132 存在下に培養したところ Flag-Rhcg 蛋白は有意に増加したことより、Rhcg 蛋白は UPS による発現調節を受ける可能性が示唆された。そこで、抗 Flag 抗体を用いて Flag-Rhcg 蛋白を免疫沈降したところ、ユビキチン蛋白の結合が認められた (図

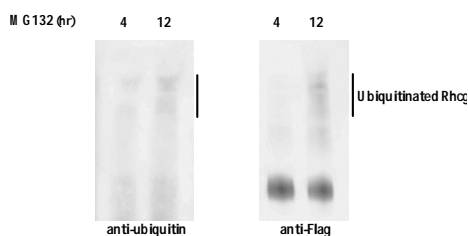


図 3 . Flag-Rhcg 蛋白とユビキチン蛋白の共免疫沈降。

3)

一方で、IN-IC 細胞を 10^{-6} M アルドステロンによって刺激したところ、Flag-Rhcg の膜分画における有意な増加を認めた。

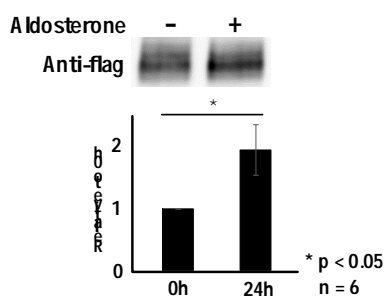


図 4 . Flag-Rhcg 蛋白の IN-IC 細胞膜分画内発現に対するアルドステロンの効果

以上の結果より、アルドステロンは間在細胞に発現する Rhcg 蛋白に直接作用して、細胞膜上への発現を促進することが示唆された。一方酸負荷は UPS を活性化し、Rhcg 蛋白の turn over を促進することが示唆される。すなわち、正常腎機能において、食事摂取などによる酸負荷はアルドステロンの分泌を促進して、間在細胞に発現する Rhcg 蛋白の管腔側膜

への局在を促進し、 NH_3 排泄を促すことにより H^+ 排泄を促進すると考えられる。

一方 UPS は、腎機能の低下にしたがい腎組織に貯留する H^+ が刺激となり活性化され、Rhcg 蛋白の分解を促進するために、尿中アンモニア排泄の低下に拍車がかかる可能性が考えられる。

現在尿蛋白抑制作用と抗線維化作用を目的に用いられる RAS 阻害薬は腎障害の進行抑制に必須の治療薬である。しかし、アルドステロン作用を阻害することにより尿中酸排泄は阻害され、腎障害の進行とともに代謝性アシドーシスの増悪とそれによる高カリウム血症の増悪が、RAS 阻害薬の使用の制限となっている。慢性腎臓病における UPS の阻害を標的とした治療は、Rhcg 蛋白の発現と尿中アンモニア排泄と維持することが期待される。今後、慢性腎臓病モデルの酸排泄低下に対する UPS 阻害薬の効果を検討していく予定である。

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 6 件)

1. Izumi Y, Inoue H, Nakayama Y, Eguchi K, Yasuoka Y, Matsuo N, Nonoguchi H, Kakizoe Y, Kuwabara T, Mukoyama M. TSS-Seq analysis of low pH-induced gene expression in intercalated cells in the renal collecting duct. PLoS One. 12(8): e0184185, 2017. 査読有
2. DuMond JF, Zhang X, Izumi Y, Ramkissoon K, Wang G, Gucek M, Wang X, Burg MB, Ferraris JD. Peptide affinity analysis of proteins that bind to an unstructured region containing the transactivating domain of the osmoprotective transcription factor NFAT5. Physiol Genomics. 48(11): 835-849, 2016. 査読有
3. Iwashita Y, Kuwabara T, Hayata M, Kakizoe Y, Izumi Y, Iiyama J, Kitamura K, and Mukoyama M. Mild systemic thermal therapy ameliorates renal dysfunction in a rodent model of chronic kidney disease. Am J Physiol Renal Physiol. 310(11):F1206-15, 2016. 査読有
4. DuMond JF, Ramkissoon K, Zhang X, Izumi Y, Wang X, Eguchi K, Gao S, Mukoyama M, Burg M, and Ferraris J. Peptide affinity analysis of proteins that bind to an unstructured n-terminal region of the osmoprotective transcription factor NFAT5. Physiol Genomics. 48(4):290-305, 2016. 査読有
5. 泉裕一郎, 向山政志. CKD における体液管理. 腎と高血圧の最新治療 6 (1):

18-23, 2017. 査読無

6. 泉裕一郎, 向山政志. 肥満関連腎臓病を合併した糖尿病患者の腎機能障害の特徴. 内分泌・糖尿病・代謝内科 44(3): 190-194, 2017. 査読無

〔学会発表〕(計 31 件)

1. Izumi Y, Eguchi K, Nakayama Y, Inoue H, Kakizoe Y, Kuwabara T, Mukoyama M. TSS-Seq analysis of low pH-induced gene expression in intercalated cells of the renal collecting duct. 54th ERA-EDTA Congress, MP006, Madrid, Spain (June 2017)
2. Izumi Y, Eguchi K, Matsuo N, Nakayama Y, Inoue H, Nonoguchi H, Kakizoe Y, Kuwabara T, Mukoyama M. Urinary acid excretion in overweight patients with chronic kidney disease. The American Society of Nephrology Kidney Week 2017, TH-PO1119, New Orleans, LA, USA (October 2017)
3. Iwata Y, Kakizoe Y, Nakagawa T, Izumi Y, Kuwabara T, Adachi M, Kitamura K, Mukoyama M. The effect of serine protease inhibition on glomerular injuries in salt-sensitive hypertension. The American Society of Nephrology Kidney Week 2017, SA-PO1086, New Orleans, LA, USA (October 2017)
4. Umemoto S, Kuwabara T, Fujimoto D, Kanki T, Mizumoto T, Kakizoe Y, Izumi Y, Mori K, Mukoyama M. Local inflammatory mechanism aggravated by intraglomerular crosstalk in diabetic kidney. The American Society of Nephrology Kidney Week 2017, TH-PO389, New Orleans, LA, USA (October 2017)
5. Sugimoto M, Mukoyama M, inoue H, Fukagawa M, Yamasaki T, Kakizoe Y, Izumi Y, Kuwabara T, Adachi M, Nakayama Y. Renal Heavy/Light-chain amyloidosis diagnosed by immunostaining and liquid chromatography-tandem mass spectrometry in a patient with non-ischemic cardiomyopathy. The American Society of Nephrology Kidney Week 2017, TH-PO641, New Orleans, LA, USA (October 2017)
6. Nonoguchi H, Sato Y, Kawahara K, Yasuoka Y, Izumi Y, Nakayama Y, Inoue H, Nagai T, Nanami M, Nakanishi T, Mukoyama M. Fludrocortisone time-dependently up-regulates erythropoietin (Epo) mRNA expression via HIF2 α pathway in rat kidney. The American Society of Nephrology Kidney Week 2017, SA-PO399, New Orleans, LA, USA (October 2017)
7. 泉裕一郎, 江口剛人, 松尾尚美, 中山裕史, 井上秀樹, 柿添豊, 栗原孝成, 野々口博史, 向山政志「NFAT5 と EGR1 を介した浸透圧変化と pH 変化の相互作用の検討」『第 60 回日本腎臓学会学術総会』O-331, 仙台 (2017 年 5 月)
8. 江口剛人, 泉裕一郎, 中山裕史, 井上秀樹, 中川輝政, 松尾尚美, 柿添豊, 栗原孝成, 向山政志「腎集合尿管間細胞におけるアルドステロンとユビキチンプロテアソーム系を介した Rhcg 調節機序についての検討」『第 60 回日本腎臓学会学術総会』P-473, 仙台 (2017 年 5 月)
9. 泉裕一郎, 中山裕史, 江口剛人, 井上秀樹, 松尾尚美, 原晶子, 柿添豊, 栗原孝成, 向山政志「肥満が慢性腎臓病患者の尿中酸排泄能に与える影響の検討」『第 40 回日本高血圧学会』OC01-5, 愛媛 (2017 年 10 月)
10. 泉裕一郎, 中山裕史, 江口剛人, 松尾尚美, 井上秀樹, 柿添豊, 栗原孝成, 野々口博史, 向山政志「早期 CKD 肥満患者の酸排泄能ならびに酸負荷が尿管に及ぼす影響の検討」『第 114 回日本内科学会総会・講演会』268, 東京 (2017 年 4 月)
11. 泉裕一郎, 中山裕史, 江口剛人, 松尾尚美, 井上秀樹, 柿添豊, 栗原孝成, 野々口博史, 向山政志「尿管細胞におけるアルドステロンによる遺伝子発現の網羅的解析」『第 90 回日本内分泌学会学術総会』P1-28-5, 京都 (2017 年 4 月)
12. 泉裕一郎, 江口剛人, 丸目高大, 中山裕史, 井上秀樹, 松尾尚美, 原晶子, 柿添豊, 栗原孝成, 向山政志「肥満が慢性腎臓病における尿中酸排泄能に及ぼす影響についての検討」『第 53 回高血圧関連疾患モデル学会学術集会』P3-1, 福岡 (2017 年 11 月)
13. 江口剛人, 泉裕一郎, 中山裕史, 井上秀樹, 松尾尚美, 柿添豊, 栗原孝成, 中川輝政, 向山政志「ミネラルコルチコイドとグルココルチコイド作用による腎集合尿管アンモニアトランスポーター Rhcg の発現調節についての検討」『第 21 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会』CVEM-P- (2017 年 12 月)
14. Izumi Y, Eguchi K, Nakayama Y, Inoue H, Nonoguchi H, Kakizoe Y, Kuwabara T, Mukoyama M. Computational analysis of the effects of aldosterone and metabolic acidosis on gene expressions in renal tubules. The 26th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, PP-2251, Seoul, Korea (September 2016)
15. Eguchi K, Izumi Y, Nakagawa T, Nakayama Y, Inoue H, Kakizoe Y, Kuwabara T, Mukoyama M. Aldosterone modulates expression of an acid-secreting ammonia transporter Rhcg in intercalated cells of the collecting ducts. The 26th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Seoul, Korea (September

- 2016)
16. Izumi Y, Eguchi K, Matsuo N, Nakayama Y, Inoue H, Nonoguchi H, Kakizoe Y, Kuwabara T, Mukoyama M. In silico and in vitro characterization of low pH-induced genes in intercalated cells of the collecting ducts. The American Society of Nephrology Kidney Week 2016, SA-PO089, Chicago, IL, USA (November 2016)
 17. Eguchi K, Izumi Y, Nakayama Y, Inoue H, Kakizoe Y, Kuwabara T, Matsuo N, Nakagawa T, Mukoyama M. Involvement of aldosterone and the ubiquitin-proteasome system in the regulation of expression of an ammonia transporter, rhesus blood group C glycoprotein, in the intercalated cells. The American Society of Nephrology Kidney Week 2016, SA-PO091, Chicago, IL, USA (November 2016)
 18. Nakayama Y, Adachi M, Inoue H, Kuwabara T, Izumi Y, Kakizoe Y, Mukoyama M. The impact of the Kumamoto earthquake on renal parameters in CKD patients. The American Society of Nephrology Kidney Week 2016, FR-PO757, Chicago, IL, USA (November 2016)
 19. Nonoguchi H, Izumi Y, Yasuoka Y, Nakayama Y, Nagai T, Nanami M, Nakanishi T, Mukoyama M, Kawahara K. Aldosterone and vasopressin are erythropoietic hormones. The American Society of Nephrology Kidney Week 2016, FR-PO367, Chicago, IL, USA (November 2016)
 20. Kakizoe Y, Nakagawa T, Miyasato Y, Izumi Y, Kuwabara T, Adachi M, Kitamura K, Mukoyama M. A serine protease inhibitor increases osmotic free water excretion together with inhibition of urinary AQP2 excretion. The American Society of Nephrology Kidney Week 2016, FR-PO344, Chicago, IL, USA (November 2016)
 21. Umemoto S, Kuwabara T, Hayata M, Fujimoto D, Kanki T, Izumi Y, Kakizoe Y, Mukoyama M. Intraglomerular crosstalk between mesangial cells and macrophages in glomerular injury. The American Society of Nephrology Kidney Week 2016, TH-PO145, Chicago, IL, USA (November 2016)
 22. Miyasato Y, Yoshizawa T, Nakagawa T, Kakizoe Y, Izumi Y, Kuwabara T, Adachi M, Boder E, Mukoyama M, Yamagata K. Deletion of Sirtuin 7 ameliorates cisplatin-induced acute kidney injury through regulation of inflammatory response. The American Society of Nephrology Kidney Week 2016, SA-PO156, Chicago, IL, USA (November 2016)
 23. Nakagawa T, Kakizoe Y, Suenaga N, Narita Y, Miyasato Y, Mizumoto T, Hayata M, Izumi Y, Kuwabara T, Adachi M, Jono H, Saito H, Kitamura K, Mukoyama M. Doxycycline ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice through directly acting on proximal tubular cells and promoting cell viability. The American Society of Nephrology Kidney Week 2016, SA-PO162, Chicago, IL, USA (November 2016)
 24. Fujimoto D, Adachi M, Nakayama Y, Inoue H, Kakizoe Y, Kuwabara T, Izumi Y, Mizumoto T, Mukoyama M. Efficacy of continuous erythropoietin receptor activator (CERA) on end-stage renal disease patients with renal anemia before and after peritoneal dialysis (PD) initiation. The American Society of Nephrology Kidney Week 2016, SA-PO1004, Chicago, IL, USA (November 2016)
 25. 泉裕一郎、江口剛人、中山裕史、井上秀樹、柿添豊、栗原孝成、野々口博史、向山政志 「低 pH 刺激による間在細胞内遺伝子発現変動の TSS-Seq を用いた網羅的解析」『第 59 回日本腎臓学会学術総会』 O-072、横浜 (2016 年 6 月)
 26. 江口剛人、泉裕一郎、中川輝政、中山裕史、井上秀樹、柿添豊、栗原孝成、向山政志 「アルドステロンによる腎集合尿管間在細胞における Rhcg の調節機序の検討」『第 39 回日本高血圧学会総会』 OB8-2、仙台 (2016 年 9 月)
 27. 江口剛人、泉裕一郎、中川輝政、中山裕史、井上秀樹、柿添豊、栗原孝成、向山政志 「集合尿管間在細胞におけるアルドステロンを介した Rhcg 調節機序についての検討」『第 59 回日本腎臓学会学術総会』 P-331、横浜 (2016 年 6 月)
 28. 江口剛人、泉裕一郎、中山裕史、井上秀樹、松尾尚美、柿添豊、栗原孝成、中川輝政、向山政志 「腎集合尿管間在細胞におけるアルドステロンとユビキチン-プロテアソーム系を介した Rhcg 調節機序についての検討」『第 20 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会』 CVEM-P-29、東京 (2016 年 12 月)
 29. 江口剛人、泉裕一郎、中川輝政、中山裕史、井上秀樹、柿添豊、栗原孝成、向山政志 「集合尿管間在細胞におけるアルドステロンを介した Rhcg 調節機序についての検討」『第 59 回日本腎臓学会学術総会』 P-331、横浜 (2016 年 6 月)
 30. 江口剛人、泉裕一郎、中山裕史、井上秀樹、松尾尚美、柿添豊、栗原孝成、中川輝政、向山政志 「腎集合尿管間在細胞におけるアルドステロンとユビキチン-プロテアソーム系を介した Rhcg 調節機序についての検討」『第 20 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会』 CVEM-P-29、東京 (2016 年 12 月)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

泉 裕一郎 (IZUMI, Yuichiro)

熊本大学大学院生命科学研究部・腎臓内科学分野・助教

研究者番号：20736243