

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005～2009
 課題番号：17081009
 研究課題名（和文） 疾患起因性変異蛋白の解析による腎臓の水・電解質トランスポートソームの解明
 研究課題名（英文） Identification of renal transportsomes by analyzing disease-causing mutants of transporters and their regulators.
 研究代表者
 内田 信一（UCHIDA SHINICHI）
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授
 研究者番号：50262184

研究成果の概要（和文）：本研究は、腎臓のトランスポートソーム解明に向けて、高血圧症を含めた腎臓の体液恒常性維持機構破綻の病態を引き起こす輸送体蛋白およびその制御因子の遺伝子異常に注目し、生体内でそれぞれの疾患起因性変異蛋白がもたらしている病態をまず理解し、変異蛋白と正常蛋白の機能・動態を比較することで、その分子を中心とした他の蛋白とのネットワークやそれらが働く局所の環境を明らかにすることを目的としている。この研究により、腎性尿崩症を引き起こす水チャネル AQP2 の細胞内輸送機構や、腎臓での新たな NaCl 出納調節系を明らかにする事ができた。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to identify functionally important protein complexes regulating AQP water channels, CLC chloride channels and Na-Cl cotransporter (NCC), by focusing on the naturally occurring mutations of these genes. We found that the binding of tropomyosin 5b to phosphorylated AQP2 was necessary for AQP2's apical sorting by vasopressin. We also found a novel phosphorylation cascade (WNK-OSR1/SPAK-NCC) in the kidney that is important for blood pressure regulation.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|------|------------|
| 2005 年度 | 7,100,000 | 0 | 7,100,000 |
| 2006 年度 | 17,800,000 | 0 | 17,800,000 |
| 2007 年度 | 17,800,000 | 0 | 17,800,000 |
| 2008 年度 | 15,100,000 | 0 | 15,100,000 |
| 2009 年度 | 13,300,000 | 0 | 13,300,000 |
| 総計 | 71,100,000 | 0 | 71,100,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物科学

キーワード：水チャネル・クロライドチャネル・WNK キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

輸送体分子の研究は、分子クローニング後、輸送体自体の研究から、その周辺で輸送体分子を制御する因子の解析へと研究は発展し、輸送体分子が単独ではなく複合体やそのおかれている細胞内の場と相互作用して機能

し、この事こそが生体内で各輸送体分子が外界の状況に応じて緻密に制御され機能する上で非常に重要であることが明らかになってきた。よって、輸送体に結合する蛋白を手がかりとして、輸送体を取り巻く分子複合体“トランスポートソーム”の解

明に取り組むこととなった。

2. 研究の目的

以前より我々が研究してきた AQP, CLC チャネルや、最近遺伝性の高血圧性疾患である偽性低アルドステロン症 II 型 (PHAII) の原因遺伝子として同定された WNK キナーゼに注目して、これらの遺伝子の変異がもたらす病態に注目し、その病態生理を明らかにすることで、これら輸送体やその制御因子の形成するトランスポートソームを明らかにする。

3. 研究の方法

腎臓で発現する輸送体は、高度に分化した生体内の腎臓でしか発現せず、培養細胞系では真に生理的な機能は再現されない。よって、種々の遺伝子改変マウス、特にヒトで発見された変異と同じ変異を持つノックインマウスを作成し、生体内での病態解析から、輸送体の制御機構を明らかにした。

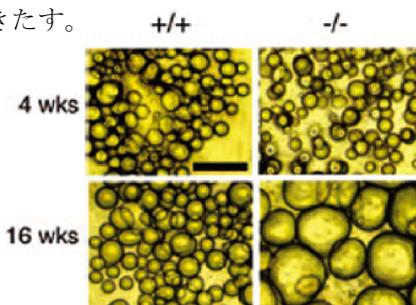
4. 研究成果

(1) AQP に関して。

① AQP7 ノックアウトマウスの作成と解析

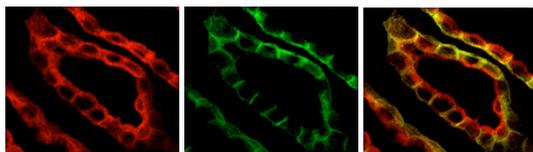
a) AQP7 ノックアウトマウスでは glycerol 尿症を呈する。このことより正常マウスにおいて尿中グリセロール排泄は尿細管障害のバイオマーカーと成り得る事を明らかにした

b) AQP7 ノックアウトマウスでは脂肪細胞の肥大をきたす。



② 尿崩症 AQP2 ノックインマウスの作成と解析

ノックインマウスの正常 AQP2 は変異型 AQP2 の basolateral 側局在に引き寄せられ、脱水時も apical 側への集積が減少。このマウスを用いて本疾患の治療法を明らかにした。

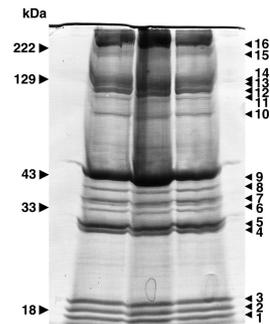


③ スーパーアクアポリンノックアウトマウスの作成と解析

AQP11 ノックアウトの引き起こす嚢胞腎の病態解析により、他の嚢胞腎と共通の分子メ

カニズムが存在する可能性を明らかにした。膵臓特異的 AQP12 ノックアウトマウスは、膵炎惹起モデルにおいて野生型に比して重症の膵炎を引き起こすことが明らかとなり、膵腺房細胞で発達している小胞体膜状に存在することも明らかにした。AQP11 も腎臓尿細管細胞の小胞体上にあることが判明しており、小胞体にある AQP の生理的役割の解明を今後目指す事となった。

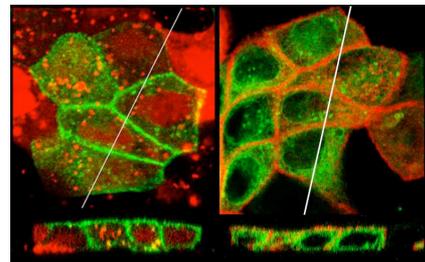
④ AQP2 結合蛋白の網羅的同定の試み。



ラット腎髄質からの AQP2 抗体カラムによる AQP2 結合蛋白の単離同定。4: トロポミオシン 5b, 5: AQP2, 9: actin.

⑤ AQP2 細胞内輸送機序の解明。

同定された蛋白のうち、アクチンとトロポミオシンについては、AQP2 がリン酸化されると高親和性にトロポミオシンが結合し、トロポミオシンと結合していた F-actin が脱重合することが明らかになった。



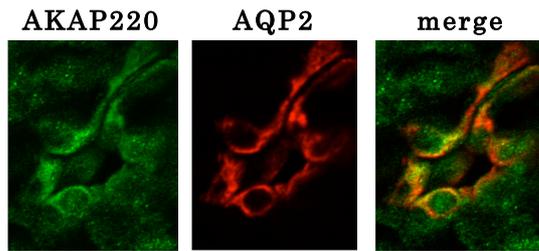
図の説明。緑: AQP2 (左では膜への移動が促進、右では阻害されている)、赤左: トロポミオシン KD siRNA、赤右: 過剰発現したトロポミオシン。(JCB 2008)。

この機序は、輸送体分子がその細胞内移動において、自ら周囲の細胞内骨格分子に働きかけて、自らの進む道を切り開くという、全く新しい概念の細胞内分子輸送機構であり、JCB 誌でも featured article として取り上げられ、国内新聞等でも報道され注目された。

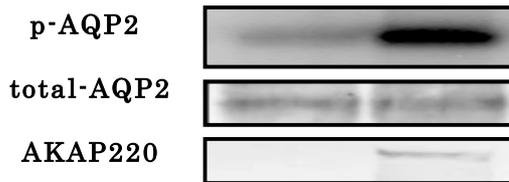
⑥ その他の AQP2 機能制御機構の解明。

a) AQP2 に結合し PKA によるリン酸化効率を促進する A-kinase anchoring protein

(AKAP220)の同定(Kidney Int 2008)。

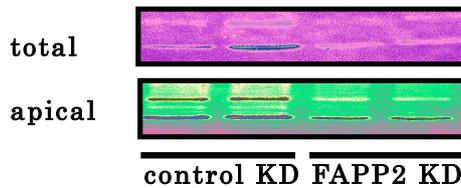


ラット腎集合管でのAQP2とAKAP220の共存。



AKAP220はAQP2と結合し、PKA依存性のリン酸化を増強する。

b) FAPP2はtrans-GolgiでAQP2のリン酸化依存性のapical膜輸送への選別に関わる(AJP Cell 2008)。



Forskolin (-) (+) (-) (+)
MDCK細胞において、内因性のFAPP2をノックダウンすると、フォorskolinによるAQP2のapical膜への移動が完全に阻害された。

(2) ClC-K チャンネルに関して

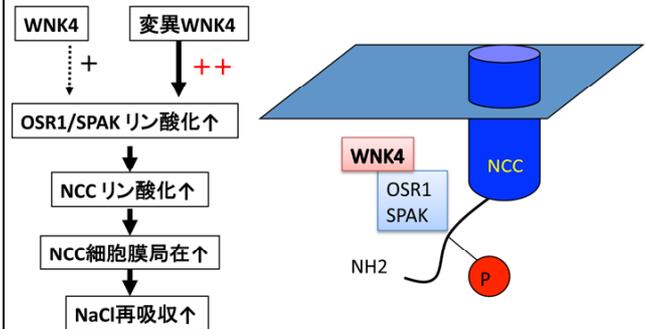
ClC-K チャンネルのβサブユニットであるバーチンについて、そのR8Lミスセンス変異がバーター症候群を引き起こすことが報告された。その生体内での分子機序と治療法開発のため、R8Lミスセンス変異をもつノックインマウスを作成解析し、結果を投稿準備中である。病態の本質は、R8L変異によりバーチンが細胞内にとどまり細胞膜へ輸送されず、機能サブユニットであるClC-Kチャンネルがバーチン依存性に細胞膜へ輸送されることから、結果として細胞膜へのClC-K発現が減少する事が腎臓でのCl再吸収を低下させていた。一方、クルクミンや17-AAGといった薬剤がR8Lバーチンの細胞膜への発現を増加させ、この変異マウスにおいても治療効果が確認された。

(3) WNK キナーゼに関して。

① PHAIIモデルマウス作成によるPHAIIの病態生理の解明と新たな腎臓でのNaCl出納調節系の発見。

機能未知のキナーゼWNK4のミスセンス変

異がPHAIIを引き起こす事が報告され、ヒトと同じ変異を持つWNK4ノックインマウスを作成し解析した。その結果、WNKキナーゼの下流にOSR1とSPAKというキナーゼが存在し、さらにこれらのキナーゼによりNCCがリン酸化を受けることで正に制御されている事が判明した(Cell Metab 2007)。



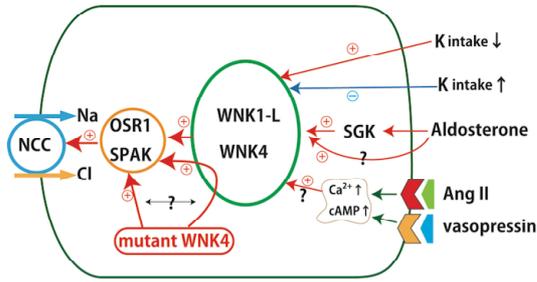
PHAIIの病態としては、変異がWNK4に入ることによって、WNKキナーゼ活性が上昇し、OSR1/SPAKを活性化、活性化されたこれらのキナーゼがNCCをさらにリン酸化し、NCCはリン酸化により細胞膜に集積し、NaCl再吸収が増大、塩分感受性高血圧症になることが判明した。今までNCCの制御機構は不明な点が多かったが、本研究はNCCを取り巻く新たな“トランスポートソーム”を明らかにすることができた。一方、この系は塩分摂取量に応じてアルドステロンを介して調節を受けている事が判明し(Kidney Int 2008)、生理的にも新たなNaCl出納調節機構として働いていることが明らかとなった。

② 野生型WNK4の役割。

変異型WNK4はNCCを活性化することが明らかとなったが、野生型のWNK4の生理的役割は不明であった。そこで、WNK4低形成マウスを作成し解析した。その結果、WNK4低形成マウスは、低血圧、Na喪失性を呈し、野生型WNK4も下流に向かって正のシグナルを送っていることが判明し、WNKキナーゼ阻害薬が新たな降圧剤として働く可能性が示唆された(Hum Mol Genet 2009)。

③ WNK-OSR/SPAK-NCC系のその他の制御因子の解明。

アルドステロン以外にも、アンジオテンシンII、食事のK摂取量、バゾプレシン、インスリン、などが、生体内でこの系を制御することが明らかとなったが(次ページ図参照)、その詳しい細胞内シグナル伝達系は今後の研究課題となった。



(4) まとめ

AQP2 に関しては、細胞内骨格系蛋白との相互作用が AQP2 のリン酸によって制御され、AQP2 が進むべき道を自ら切り開くという新しいコンセプトの細胞内蛋白輸送機構を明らかにした。NCC 輸送体については、新たな腎臓での NaCl 出納調節系である WNK-OSR/SPAK-NCC というシグナル伝達系を明らかにした。両者とも腎臓でのトランスポートゾームの存在意義の実証となった。

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 7 8 件)

- ① Ohta A, Rai T, Yui N, Chiga M, Yang SS, Lin SH, Sohara E, Sasaki S, Uchida S. Targeted disruption of the Wnk4 gene decreases phosphorylation of Na-Cl cotransporter, increases Na excretion and lowers blood pressure. *Hum. Mol. Genet.* 18:3978-86, 2009.
- ② Ohta E, Itoh T, Nemoto T, Kumagai J, Ko SB, Ishibashi K, Ohno M, Uchida K, Ohta A, Sohara E, Uchida S, Sasaki S, Rai T. Pancreas-specific aquaporin 12 null mice showed increased susceptibility to caerulein-induced acute pancreatitis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 297:1368-78, 2009.
- ③ Yui N, Okutsu R, Sohara E, Rai T, Ohta A, Noda Y, Sasaki S, Uchida S. FAPP2 is required for aquaporin-2 apical sorting at trans-Golgi network in polarized MDCK cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 297:1389-1396, 2009.
- ④ Chiga M, Rai T, Yang S-S, Ohta A, Takizawa T, Sasaki S, Uchida S. Dietary salt regulates the phosphorylation of OSR1/SPAK kinases and the sodium chloride cotransporter through aldosterone. *Kidney Int.* 74:1403-1409, 2008.
- ⑤ Noda Y, Horikawa S, Kanda E, Yamashita M, Meng H, Eto E, Li Y, Kuwahara M, Hirai K, Pack C, Kinjo M, Okabe S, Sasaki S. Reciprocal interaction with G-actin and tropomyosin is essential for aquaporin-2 trafficking. *J. Cell Biol.* 182:587-601, 2008.
- ⑥ Yang SS, Morimoto T, Rai T, Chiga M, Sohara E, Ohno M, Uchida K, Lin S-H, Moriguchi T, Shibuya H, Kondo Y, Sasaki S, Uchida S. Molecular pathogenesis of

pseudohypoaldosteronism type II: generation and analysis of a Wnk4 D561A/+ knock-in mouse model. *Cell Metab* 5: 331-344, 2007.

- ⑦ Rai T, Sasaki S, Uchida S. The polarized trafficking of the aquaporin-3 water channel is mediated by an N-Terminal Sorting Signal. *Am J Physiol Cell Physiol.* 290(1): C298-304, 2006.
- ⑧ Sohara E, Rai T, Yang SS, Uchida K, Nitta K, Horita S, Ohno M, Harada A, Sasaki S, Uchida S. Pathogenesis and treatment of autosomal-dominant nephrogenic diabetes insipidus caused by an aquaporin 2 mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103: 14217-14222, 2006.
- ⑨ Hara-Chikuma M, Sohara E, Rai T, Ikawa M, Okabe M, Sasaki S, Uchida S, Verkman AS. Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7 deficient mice: Adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation. *J Biol Chem.* 280(16):15493-15496, 2005.
- ⑩ Morishita Y, Matsuzaki T, Hara-Chikuma M, Ando A, Shimono M, Matsuki A, Kobayashi K, Ikeda M, Yamamoto T, Verkman A, Kusano E, Ookawara S, Takata K, Sasaki S, Ishibashi K. Disruption of aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule. *Mol Cell Biol.* 25: 7770-7779, 2005.
- ⑪ Noda Y, Horikawa S, Katayama Y, Sasaki S. Identification of a multiprotein "motor" complex binding to water channel aquaporin-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 330: 1041-1047, 2005.
- ⑫ Sohara E, Rai T, Miyazaki J, Verkman AS, Sasaki S, Uchida S. Defective water and glycerol transport in the proximal tubules of AQP7 knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 289(6):F1195-1200, 2005.

[学会発表] (計 2 6 5 件)

- ① Uchida S. Symposium. Epithelial transport: bridges between molecules and function. WNK kinases and cation-chloride cotransporters, novel transportsomes regulating blood pressure. The 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), Kyoto, July, 2009.
- ② Uchida S, Nomura N, Sugawara N, Morimoto T, Kondo Y, Naito S, Yui N, Oi K, Talat G, KMZ Hossain, Wakabayashi M, Nishida H, Ohta E, Ohta A, Sohara E, Rai T, Sasaki S. Molecular pathogenesis of Bartter syndrome caused by R8L barttin mutation. 40th NIPS International Symposium & Physiology of anion transport and cell volume regulation (PAT-CVR 2009), Okazaki, August, 2009.
- ③ Uchida S. Basic and Clinical Science Symposium, "Transport regulation by phosphorylation" Phosphorylation-dependent regulation of NCC by WNKs. The 41st Annual meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, November, 2008.

- ④ Yang S, Morimoto T, Rai T, Chiga M, Sohara E, Ohno M, Uchida K, Lin S, Moriguchi T, Shibuya H, Kondo Y, Sasaki S, Uchida S. Generation and analysis of Wnk4D561A/+ knock-in mice. ISN- Nature Genetics Forefronts Symposium on Nephrogenetics: from Development to Physiology, Danvers, USA, March, 2007.
- ⑤ Araki Y, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Identification of protein complex isolated with a mutant AQP2 that causes autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus. The 39th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, November, 2006.
- ⑥ Sohara E, Rai T, Verkman AS, Sasaki S, Uchida S. Defective water and glycerol transport in the proximal tubules of AQP7 knockout mice. 4th International Conference on Aquaporins, Brussels, September, 2005.

〔図書〕 (計 15 件)

- ① 佐々木成 編。水とアクアポリンの生物学、中山書店、2008.
- ② 佐々木成、石橋賢一 編。からだと水の事典。朝倉書店、2008.
- ③ 佐々木成。みずみずしい体のしくみ。クパプロ、2005.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/grad/kid/aquaporin/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 信一 (UCHIDA SHINICHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：50262184

(2) 研究分担者

佐々木 成 (SASAKI SEI)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・准教授

(3) 連携研究者 なし。