

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06643

研究課題名(和文) アクチン結合タンパク質モエシンの腎尿細管生理機能における検討

研究課題名(英文) Functional Role of Actin-binding Protein Moesin in Renal Tubules.

研究代表者

浅野 真司 (Asano, Shinji)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：90167891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓の尿細管のヘンレループの太い上行脚に特異的に発現するNKCC2トランスポーターは、Na⁺とK⁺、Cl⁻を細胞内へと共輸送して、これら電解質の再吸収を行う。NKCC2は細胞膜表面で単体として存在するのではなく、アクチン結合タンパク質であるモエシンと結合して、細胞骨格と結合し、他の機能関連タンパク質と存在部位を共にし、協調的に働くことを見出した。モエシンは、細胞膜上のNKCC2と結合して、これのエンドサイトーシスを促進させることを発見した。その結果、モエシン欠損マウスでは電解質の再吸収が亢進して、尿量の減少、血液中のクロライド濃度の上昇が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの腎臓では1日に180リットルもの血液の濾過を行うが、濾過後に腎尿細管での水や溶質の再吸収や分泌の過程を経て、最終的に約2リットルの尿が排出される。NKCC2と呼ばれるタンパク質は、腎臓の尿細管の中央部に位置する「ヘンレループの太い上行脚」と呼ばれる部分で働き、ミネラルを細胞内へと輸送して、体内に再吸収するという重要な働きをする。NKCC2はさまざまな形で機能調節を受けるが、その全貌は明らかでなかった。この研究では、NKCC2がモエシンというタンパク質を介して細胞の骨格と結合すること、モエシンの働きを得て、細胞膜から細胞内に取り込まれて働きを停止するという新しい機能調節機構を発見した。

研究成果の概要(英文)：The NKCC2 transporter specifically expressed at the thick ascending limb of Henle transports Na⁺, K⁺, Cl⁻ simultaneously. Here, we found that NKCC2 is not located alone or unassembled on the cell surface, but associated with actin cytoskeleton and other related proteins through moesin to work together and function harmoniously. We also found that moesin binds to NKCC2 and promotes its endocytosis. Consequently, hyperchloremia (high Cl⁻ concentration in plasma) and decrease of urine volume were observed in the moesin knockout mice, which is due to increased solute reabsorption through NKCC2.

研究分野：生化学 分子生理学

キーワード：モエシン 細胞骨格 トランスポーター 細胞内トラフィッキング エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

腎臓はその糸球体において1日に180リットルもの血液の濾過を行い、尿細管での再吸収や分泌の過程を経て、約2リットルの尿が排出される。腎尿細管のなかで、ヘンレループの太い上行脚 (TALH) における電解質の再吸収は、ヒトの体液調節や血圧調節において極めて重要である。ここでは、図1に示すように、2型の Na^+ 、 K^+ 、 2Cl^- トランスポーター (NKCC2) が、ROMK (Renal Outer Medullary K^+ channel) K^+ チャネルとともにラフトに集積、協働して NaCl の再吸収にあたる。

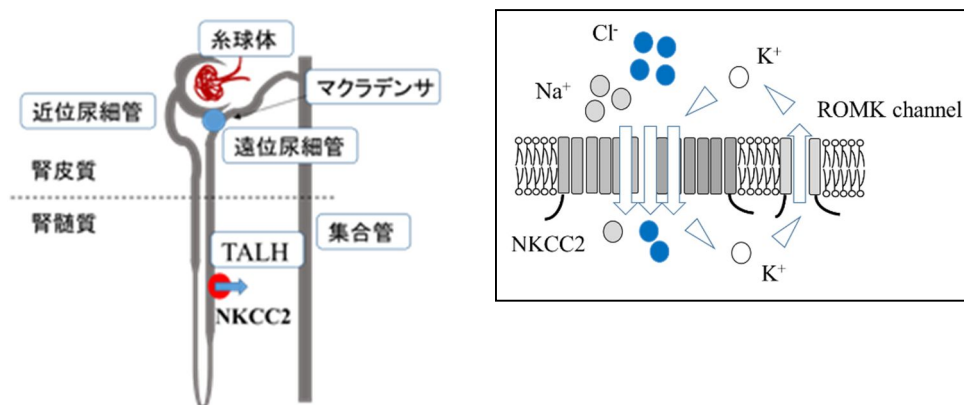


図1 NKCC2は腎臓のTALH (ヘンレループの太い上行脚) に発現しROMKチャネル協働して溶質の吸収にあたる

NKCC2は利尿薬の第一選択薬で、心不全や高血圧の治療薬としても使用されるフロセミドなどのループ利尿薬の標的分子である。また、ヒトのNKCC2やROMKの遺伝子変異は、低カリウム血症、代謝性アルカローシス、高レニン・高アルドステロンをともなう稀少疾患であるパーター症候群 (I型、II型) を引き起こすことが知られている。NKCC2は抗利尿作用を示すホルモンであるバソプレシン刺激によって細胞内での局在を大きく変えて機能調節を受けるが、その分子メカニズムの全体像は明らかではなかった。また、これとは別に、膜タンパク質とアクチン細胞骨格とを連結させて、機能調節にあたるアダプタータンパク質であるモエシンがNKCC2と会合することが示唆されていたが、その生理的な役割についても明らかではなかった。また、モエシンがNKCC2のほかROMKなどを含むタンパク質機能複合体を作り、これが膜ドメインであるラフトに集積することが想定されたが、この点についても明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究では、上記の事実を踏まえて、マウス由来の腎髄質部分の尿細管におけるNKCC2やROMKの発現部位や、細胞内トラフィッキングやラフトドメインへの集積の検討を行い、アダプタータンパク質であるモエシンによるNKCC2やROMKの発現調節、機能調節を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではモエシンを欠損した変異マウスと野生型のマウスとの間で血漿や尿成分の比較・測定を行い、変異にともなう腎機能の変化を観察した。また、マウスの腎髄質から調製した細胞

懸濁液を用いて、標的タンパク質の発現や細胞機能の比較検討を行った。さらに、免疫共沈殿法や酵母ツーハイブリッド法などを用いて、モエシンと相互作用する分子の探索を行い、モエシンと、NKCC2 や ROMK との会合の可能性について検討した。

(1) マウスの血漿、尿成分の解析：マウスを 10 日間、代謝ケージで飼育してこの間、血漿、尿を持続的に採取し、 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- やクレアチニン濃度を、DRI-CHEM 装置を用いて測定し、糸球体濾過量 (GFR) 値を求め、おもに腎機能を検討した。

(2) マウス腎髄質内帯細胞懸濁液の調製：マウス腎髄質内帯部分を摘出し、コラゲナーゼ処理やフィルター濾過によって、ヘンレループ上行脚を含む細胞懸濁液を調製した。

(3) 腎髄質由来細胞の NKCC2 による輸送活性の測定：細胞懸濁液にタリウム (カリウムイオンと同じ挙動を示す代替イオン) 感受性の蛍光色素である FluxOR を取り込ませたのちに、細胞をタリウムイオン溶液と反応させて、細胞内に取り込まれたタリウムイオンを蛍光検出した。NKCC2 の活性は、NKCC2 阻害剤であるフロセミドによって阻害される蛍光量で判断した。

(4) 細胞表面のタンパク質のビオチン化標識実験：腎髄質由来細胞の細胞表面のタンパク質を、膜不透過性のビオチン化試薬である Sulfo-NHS-SS-Biotin と反応させた。細胞を溶解したのち、ビオチン化したタンパク質を、ストレプトアビジンビーズを用いて単離した。単離したタンパク質を可溶化して SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけて分離したのち、ウェスタンブロットを行い、目的タンパク質を検出した。細胞膜タンパク質のエンドサイトーシス機能を計測する際には、ビオチン化試薬でパルス標識して、細胞外のビオチンを除去したのち、細胞を溶解させて、ウェスタンブロットを行い、細胞内に取り込まれた目的タンパク質を検出した。

(5) 細胞分画とラフトの調製：腎髄質由来細胞をホモジナイズして、分別的に遠心分離を行ってミクロソーム画分を調製した。さらに、ミクロソーム画分を OptiPrep による連続密度勾配遠心分離にかけて、ミクロソーム画分を (前期、後期エンドソームなどに) 細分画した。ウェスタンブロットによって、目的タンパク質の細胞内局在を確認した。

(6) 免疫共沈殿法によるモエシンや NKCC2 と相互作用するタンパク質の探索：腎髄質由来細胞をホモジナイズ・可溶化して、抗体と反応させ、その後抗体に回収されたタンパク質をウェスタンブロットで検出した。

(7) モエシンと相互作用するタンパク質の探索：酵素ツーハイブリッド法を用いてモエシンのアミノ末端ドメインに反応するタンパク質の網羅的な解析を行った。

4. 研究成果

私たちは本研究を通じて、以下の諸点を明らかにした。(1) モエシン欠損マウスの腎系球体や尿細管には、大きな構造的な変化や欠損は認められなかったが、モエシン欠損マウスでは野生型マウスと比較して、尿量の減少、GFR の低下、血漿中のクロライドイオン濃度の有意な上昇が見出された。これらの結果は、モエシンが尿細管における溶質吸収にかかわることを示すものである。

また、腎髄質由来細胞を用いた実験では、(2) モエシン欠損マウスでは細胞内への Rb^+ (K^+ の代替イオンとして測定されたもの) 輸送能が上昇すること、この輸送活性は NKCC2 の特異的な阻害剤であるフロセミドによって阻害されることを見出した。これらの結果は、モエシン欠損にともなって NKCC2 の輸送活性が上昇したことを示唆するものである。次に、(3) 腎髄質由来細胞のホモジネートを用いた免疫共沈殿実験から、モエシンが足場タンパク質を介することなく NKCC2 と直接結合することを見出した。また、(4) NKCC2 は蛍光抗体染色やビオチン化修飾実験の結果から、少なくとも一定量は恒常的に細胞表面に発現することが明らかとなった。(5) そ

して、モエシン欠損マウスでは、NKCC2のエンドサイトーシス能力が低下して、結果として細胞表面での発現量が上昇することを見出した。こうした事実から、モエシンは腎髄質尿細管においてNKCC2と会合して、NKCC2の調節性のエンドサイトーシスを促進することが考えられた。これらの結果は、モエシン欠損マウスに見られる尿量の減少、血漿中のクロライドイオン濃度上昇を説明することができた。これらの結果を図2で模式的に表した。

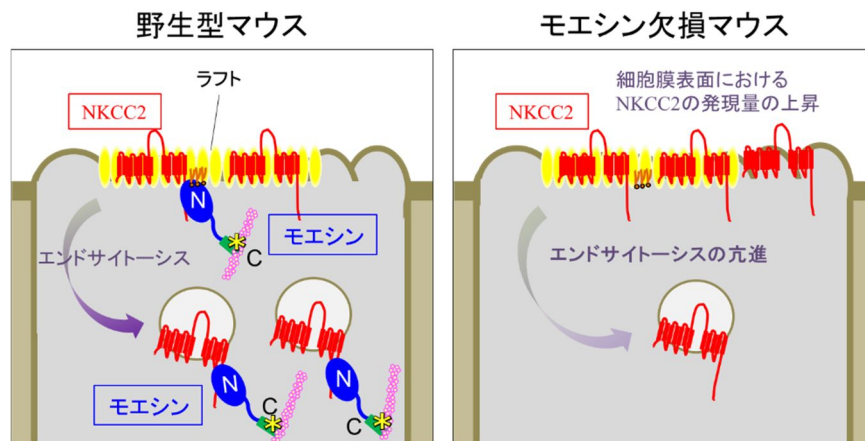


図2 野生型マウスと比較してモエシン欠損マウスの腎髄質尿細管ではNKCC2の細胞膜表面での発現が恒常的に上昇する。

モエシンはアミノ末端に存在するドメインでさまざまな膜タンパク質や、膜リン脂質と結合することが知られていることから、酵母ツーハイブリッド法を用いてモエシンのアミノ末端ドメインと会合するタンパク質の探索を行った。ヒットしたタンパク質の中には、モノカルボン酸輸送体であるMCT5や、解糖系酵素であるaldolase Bなどが含まれた。aldolase Bについては、袋ネズミ腎近位尿細管由来細胞（OK細胞）に強制発現させた場合にNKCC2と会合して、その細胞膜表面での発現を低下させるという報告がなされている（Benziane et al. *J. Biol. Chem.* 282, 33817–33830, 2007.）ことや、GLUT4やH⁺-ATPaseのエキソサイトーシスに関わるという報告がある。これらから、NKCC2、モエシンがさらに大きなタンパク質複合体を作って、代謝調節の影響を受けるといった可能性が考えられた。これらの諸点について、免疫共沈降法などで検討を進めており、結果が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kawaguchi Kotoku, Hatano Ryo, Matsubara Mitsunobu, Asano Shinji	4. 巻 470
2. 論文標題 Internalization of NKCC2 is impaired in thick ascending limb of Henle in moesin knockout mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pflügers Archiv - European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 1055 ~ 1068
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00424-018-2134-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kawaguchi Kotoku, Hatano Ryo, Asano Shinji	4. 巻 43
2. 論文標題 Regulation Mechanism of Endocytosis of NKCC2 by Moesin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 MEMBRANE	6. 最初と最後の頁 199 ~ 205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5360/membrane.43.199	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okazaki Tomonori, Saito Daichi, Inden Masatoshi, Kawaguchi Kotoku, Wakimoto Sayuri, Nakahari Takashi, Asano Shinji	4. 巻 70
2. 論文標題 Moesin is involved in microglial activation accompanying morphological changes and reorganization of the actin cytoskeleton	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12576-020-00779-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Okazaki Tomonori, Kawaguchi Kotoku, Hirao Takuya, Asano Shinji	4. 巻 3
2. 論文標題 Moesin is involved in migration and phagocytosis activities of primary microglia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 185 ~ 189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 川口高德、波多野亮、浅野真司
2. 発表標題 NKCC2の電解質再吸収におけるMoesinの生理的役割の解明
3. 学会等名 第66回 日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口高德、波多野亮、浅野真司
2. 発表標題 NKCC2のエンドサイトーシスと電解質再吸収におけるMoesinの役割の解明
3. 学会等名 生理研研究会「上皮膜・間質の機能連関と病態発現機構解明のためのストラテジー」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口高德、波多野亮、浅野真司
2. 発表標題 NKCC2の電解質再吸収におけるMoesinの生理的役割の解明
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口高德、波多野亮、浅野真司
2. 発表標題 NKCC2のエンドサイトーシスと電解質再吸収におけるMoesinの役割の解明
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口高德、波多野亮、浅野真司
2. 発表標題 NKCC2の電解質再吸収におけるMoesinの生理的役割の解明
3. 学会等名 第41回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口高德、波多野亮、浅野真司
2. 発表標題 NKCC2の電解質再吸収におけるMoesinの生理的役割の解明
3. 学会等名 第112回 近畿生理学談話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawaguchi K, Hatano R, Asano S.
2. 発表標題 The Physiological Roles of Moesin, a Cytoskeletal Protein, in thick ascending limb of loop of Henle via NKCC2.
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川口高德、波多野亮、浅野真司
2. 発表標題 NKCC2の細胞内小胞輸送と電解質再吸収におけるMoesinの役割の解明
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kawaguchi K, Asano S.
2. 発表標題 Endocytosis of NKCC2 is impaired in renal tubule in moesin knockout mice
3. 学会等名 Europhysiology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口高德, 波多野亮, 浅野真司
2. 発表標題 MoesinによるNKCC2のエンドサイトーシスと電解質 再吸収における役割の解明
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口高德, 波多野亮, 浅野真司
2. 発表標題 NKCC2のエンドサイトーシスと電解質再吸収におけるMoesinの生理的役割の解明
3. 学会等名 第40回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 ASANO S.
2. 発表標題 Physiological Regulation of Membrane Transport by Actin-Binding Proteins.
3. 学会等名 The 6th International Conference and the 3rd ASCB Local Meeting on Cellular Dynamics and Chemical Biology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口高德, 波多野亮, 浅野真司
2. 発表標題 NKCC2のエンドサイトーシスと電解質再吸収における Moesinの役割の解明
3. 学会等名 日本生理学会第111回 近畿生理学談話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawaguchi K, Hatano R, Asano S.
2. 発表標題 Endocytosis of NKCC2 is impaired in renal tubule in moesin knockout mice.
3. 学会等名 FAOPS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡崎與徳、斎藤大地、川口高德、中張隆司、浅野真司
2. 発表標題 初代培養ミクログリアにおけるアクチン結合タンパク質モエシンの機能解析
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡崎與徳、川口高德、浅野真司
2. 発表標題 マウス初代培養ミクログリアにおけるアクチン結合タンパク質モエシンの機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

稀少疾患・難治疾患の原因究明と治療法の開発に向けた基盤研究
<https://ritsume-i-rarediseases.net/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------