

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：32620  
研究種目：若手研究  
研究期間：2018～2019  
課題番号：18K15051  
研究課題名（和文）重炭酸イオン受容体の生体内における機能の解明

研究課題名（英文）identification of bicarbonate receptor

## 研究代表者

城 愛理（渡辺愛理）（Jo-watanabe, airi）

順天堂大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：40726197

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：マウス受容体の一部の配列ペプチドをウサギに免疫してポリクローナル抗体を作製した。この抗体は、培養細胞に過剰発現した受容体を免疫染色およびウェスタンブロットティングによって検出できたが、内在性の受容体を検出することはできなかった。そこで、in situ hybridizationにより各臓器における受容体発現細胞を同定した。また、受容体を蛍光タンパク質で置き換えたノックインマウスを作製し、各組織における蛍光タンパク質を顕微鏡で観察することにより、さらに細胞特異的マーカータンパク質との共染色により、受容体の発現細胞を同定し、in situ hybridizationの結果と比較した。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の意義は、酸塩基平衡が関わる病態における重炭酸イオンシグナルの役割を明らかにすることである。酸塩基平衡の破綻は、様々な疾患の病態形成に関与している。本研究によって、酸塩基平衡が関わる未解決の病態の解明や治療への応用も見込まれる。更に今後の発展として、受容体アゴニストを用いた重炭酸イオン受容体の活性化という治療戦略も想定され、新たな創薬ターゲットとなることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：The goal of this research is to establish the tools for analyzing the bicarbonate receptor in vivo, and to identify the novel function of bicarbonate, which has been recognized as an indicative of acid-base balance and pH.

In this research, I established rabbit polyclonal antibody against the bicarbonate receptor and knock-in mice that express fluorescent proteins in the same cell that express the receptor.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：重炭酸イオン 細胞内シグナル伝達 受容体 細胞内カルシウム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

呼吸不全や腎不全等に伴って起こるアシドーシスという状態では、酸塩基平衡の破綻から様々な病態が引き起こされる。生体内において酸塩基平衡を担う最も重要な緩衝系は、炭酸-重炭酸緩衝系である。重炭酸イオンはこの炭酸-重炭酸緩衝系を構成する pH 調節因子である。一方、近年、重炭酸イオンの低下自体が慢性腎臓病の増悪因子であることが報告されている。従って、血中の重炭酸イオンが作用する「重炭酸イオン受容体」が生体内に存在する可能性がある。申請者は、生体内における「重炭酸イオン受容体」の局在と生理機能を明らかにしたいと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、血中の重炭酸イオンそのものが作用する「重炭酸イオン受容体」の生体内機能を明らかにするためのツール作りを行う。

現時点では、内在性の受容体を認識する市販抗体がないため、本研究ではまず、重炭酸イオン受容体の抗体を作成する。また、内在性の受容体を認識する抗体の作成が不成功だった場合、タグが付加された受容体を発現するノックインマウス、あるいは受容体を蛍光タンパク質で置き換えたノックインマウスを作成する。これらの抗体あるいはノックインマウスを用いて、受容体の生体内での発現部位を明らかにする。また、受容体の遺伝子欠損マウスを作製し、その表現型を解析することで、重炭酸イオン受容体の生体内での機能を明らかにする。

### 3. 研究の方法

まず、*in vivo* 解析のためのツール作成として、抗体作製を行う。申請者はこれまで、野生型マウスにおける重炭酸イオン受容体の発現を定量 PCR で解析してきた。今後、更に生体内機能の解析を進めるにあたり、細胞内局在についての情報は必須である。現時点では内在性に発現する受容体を検出できる市販抗体がないため、受容体の全長タンパク質あるいは一部の配列ペプチドをウサギに免疫することでポリクローナル抗体を作製する。また、高親和性モノクローナル抗体を作成するため、ハイブリドーマを作成しスクリーニングを行う。内在性の受容体を検出する有用な抗体の作成ができなかった場合、受容体の翻訳領域をタグまたは蛍光タンパクで置き換えたノックインマウスを作製し、タグの免疫染色あるいは蛍光タンパク質の検出により受容体の発現臓器および発現細胞を明らかにする。また、受容体の mRNA 発現を、定量的に、かつ発現細胞の組織内分布まで明らかにするために、*in situ hybridization* を行う。

次に、受容体の生体内機能を解析するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて全身性遺伝子欠損マウスを作製する。まず、定常状態においてこのマウスの体重、血液・尿データ、形態評価を行い、定常状態において異常が見られるか否かを明らかにする。更に、見られた表現型における受容体の機能解析を行う。

### 4. 研究成果

#### 1. 抗体作成

*in vivo* 解析のためのツールとして抗体作成を試みた。

まず、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系により作成したマウスおよびヒトの全長タンパクを抗原としてウサギに免疫することでポリクローナル抗体を作製した。この抗体は、過剰発現させた受容体の一部を検出することができたが、非常に感度が低かった。

次に、腸骨リンパ節法によりモノクローナル抗体の作成を試みた。同様にコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系により作成した全長タンパクを抗原としてラットに免疫し、ハイブリドーマを得た。これらのハイブリドーマの上清について、受容体を安定発現させた培養細胞の免疫染色によって以下のようにスクリーニングを行った。1 次スクリーニング：受容体安定発現細胞を 96 ウェルプレートで染色し、In Cell analyzer 1000 (GE Healthcare) で解析し、陽性サンプルを抽出した (768 ウェル → 90 ウェル)。2 次スクリーニング：受容体安定発現細胞とコントロール細胞を 1 次スクリーニングで抽出した 90 ウェル分の培養上清で染色した。In Cell analyzer で解析し、90 ウェル中 8 ウェルを抽出した。3 次スクリーニング：2 次スクリーニングで抽出した培養上清 8 ウェルを用いて受容体安定発現細胞とコントロール細胞を染色し、共焦点顕微鏡で解析した。その結果、陽性となる培養上清は得られなかった。

最後に、マウス受容体の C 末端の配列ペプチドをウサギに免疫することでポリクローナル抗体を作製した。この抗体は、培養細胞に過剰発現した受容体を免疫染色およびウェスタンブロットティングによって検出できたが、内在性の受容体を検出することはできなかった。

#### 2. mRNA レベルでの受容体発現細胞の同定

抗体による内在性受容体の同定が困難であったため、高感度の *in situ hybridization* シス

テムである RNAscope により mRNA レベルでの発現を明らかにすることとした。2019 年度は、心臓、肺、肝臓、腎臓、骨格筋、腸管、脳などの全身の臓器で in situ hybridization を行い、mRNA レベルでの発現を解析した。また、その結果、腎臓、胃、脳については、RNAscope と細胞特異的マーカーの免疫染色との共染色により、各臓器における受容体発現細胞を同定した。

### 3. ノックインマウスの作成

抗体による内在性受容体の同定が困難であったため、受容体を発現する細胞を同定・分取する目的で、受容体を蛍光タンパク質で置き換えたノックインマウスを作製した。このマウスの各臓器における蛍光タンパク質を顕微鏡で観察したところ、in situ hybridization による発現部位と一致して、蛍光タンパク質が観察された。さらに、受容体発現細胞の同定のため、ノックインマウスの凍結組織切片において細胞特異的マーカータンパク質の免疫染色を行ったところ、in situ hybridization によって同定した受容体発現細胞と同種の細胞で蛍光タンパク質の発現が確認された。

### 4. ノックアウトマウスの樹立

受容体の生体内機能を解析するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて全身性遺伝子欠損マウスを樹立した。得られたノックアウトマウスは明らかな体表の異常はなく、各臓器の HE 染色で明らかな形態の異常は認められなかった。また、野生型と比較して血液・尿所見に明らかな違いは見られなかった。今後は、負荷を加えてノックアウトマウスの表現型解析を行う予定である。

### 5. 論文発表

英文総説（筆頭・責任著者） 1 件

- 1) **Airi Jo-Watanabe**, Toshiaki Okuno, Takehiko Yokomizo. The Role of Leukotrienes as Potential Therapeutic Targets in Allergic Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(14): 3580.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Jo-Watanabe Airi, Okuno Toshiaki, Yokomizo Takehiko	4. 巻 20
2. 論文標題 The Role of Leukotrienes as Potential Therapeutic Targets in Allergic Disorders	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3580 ~ 3580
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20143580	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----