

平成 22 年 6 月 4 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19790169

研究課題名（和文） 腎マクラデンサ細胞におけるシグナル伝達の分子機構解明

研究課題名（英文） Molecular Machineries of Signaling in Kidney Macula Densa.

研究代表者

安岡有紀子 (YASUOKA YUKIKO)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：50348504

研究成果の概要（和文）：

腎マクラデンサ (MD) は糸球体濾液中の塩濃度変化を感知し、糸球体濾過量を調節する液性シグナルを、傍糸球体装置間質に放出する。MD 管腔内液[Cl⁻]変化を感知するのは、MD 細胞管腔膜に発現する Na⁺-K⁺-2Cl⁻輸送体 (NKCC2) を介する NaCl 流入量変化と考えられている。マウス不死化 MD 細胞株 (NE-MD) は、NKCC2 阻害薬であるフロセミド添加により、時間・Ca²⁺依存的に nNOS 蛋白の発現量および NO 産生量を増加させた。しかし、フロセミド投与により発現誘導された蛋白 (約 60 kDa) は、脳や骨格筋の nNOS 蛋白 (約 160 kDa) と比べて小さかった。この nNOS 蛋白 (候補) の同定と分子構造を調べるために二次元電気泳動を行い、発現増加した nNOS 蛋白 (候補) を質量分析 (MALDI-TOF-MS) し、ペプチド断片の MS 解析から nNOS 蛋白と同定し、還元ドメインの欠失を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Changes in the luminal NaCl concentration ([NaCl]) at the kidney macula densa (MD) modulate the tubuloglomerular feedback (TGF) responses via affecting the release of nitric oxide (NO). In a newly established mouse macula densa cell line (NE-MD), we demonstrated that furosemide, an inhibitor of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter, and low [Cl⁻] similarly induced increases in both the nNOS protein expression and the L-Arg-induced NO generation. We also found that the nNOS-like protein (60kD) determined in the NE-MD cells was smaller in size than the usual nNOS proteins (160kD) obtained from brain and skeletal muscle. Molecular structure of the NE-MD nNOS protein was carefully analyzed by the two-dimensional electrophoresis and the mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). Based on the observation of the MS analysis of the peptide piece, we conclude that a main part of the nNOS reduction domain has been deleted in the furosemide-induced nNOS protein of NE-MD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	800,000	0	800,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	690,000	3,790,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：マクラデンサ、NKCC2、nNOS

1. 研究開始当初の背景

腎臓は、細胞外液量 (ECF) および電解質組成を維持・調節している唯一の器官である。過剰な食塩摂取、renin-angiotensin-aldosterone 系の異常、上皮型 Na⁺チャネルの異常 (Liddle 症候群) は、体液量増加を招き高血圧・動脈硬化・腎硬化・心肥大等の心・腎・血管系の障害を引き起こす。糸球体濾過量 (GFR) を腎内制御する (尿細管糸球体フィードバック機構=TGF) 機構には不明の点が多いが、TGF 機構の中心的役割を果たすのが、腎 macula densa (MD) 細胞である。MD 細胞は、糸球体で濾過された濾液中の塩 [NaCl]濃度を感知し、同一ネフロン の GFR 量調節を行う。その調節の 1st ステップは、MD 細胞の管腔側に位置する Na-K-2Cl 共輸送体 (NKCC2) による NaCl 流入の増減の感知である。NaCl 量の減少を感知すると、nNOS や COX-2 等の発現量の増加が起こるが、NKCC2 を介したこれら分子群の活性化に関わるシグナル伝達経路についての分子機構解明は、上記疾患への対策を講じる上で医学的に非常に重要である。しかし、現在までに genetic に純粋な MD 細胞株が単離されずにいたため、まったく進展していない状態

であった。

これまで MD 細胞株として報告されたものは、特定の lectin で標識された腎細胞をセルソーターで回収して得られた MMDD1 細胞 (Yang T, et al. J Biol Chem. 2000) があるが、他のセグメント細胞の混入が認められる所見があり (He H, et al. Am J Physiol Renal Physiol 2003)、この細胞を用いて生理学的、分子生物学的解析を行うことには疑問がある。申請者は、Yang らとは全く異なる方法 (遺伝子工学的手法) を用いて MD 細胞の単離を実現した。腎遠位部尿細管領域において MD 細胞にのみ高発現している一酸化窒素合成酵素 nNOS の promoter を利用し、MD 細胞を EGFP により標識し株化することにし、成功した (NE-MD 細胞株 ; Yasuoka Y, et al. Jpn J Physiol, 2005)。MD 細胞内のシグナル伝達に関わる分子群を調べるには、純化した MD 細胞が大量に必要であり、樹立した NE-MD 細胞株を用いることにより解析が可能になった。この細胞株を用いれば、上記の NKCC2 を介したシグナル伝達に関わる分子機構を解明することが出来ると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、MD 細胞における NKCC2 を介したシグナル伝達経路解明を目的とし、二つの分子の挙動に注目した。

1) nNOS 分子

nNOS には、脳に多く発現する nNOS α 、脳にわずかに発現する nNOS β 、nNOS γ 、骨格筋に発現する nNOS μ 、抑制性に働く nNOS-2 など幾つかの sub-type がある。これらは constitutive nNOS として知られているが、腎 nNOS は inducible nNOS である(in vivo [Singh et al., Am J Physiol Renal Physiol, 1996], in vitro [Yasuoka et al, 2005])。NE-MD 細胞株を用いた誘導実験では、マウス腎 nNOS 蛋白の大きさは nNOS α 、nNOS μ などとは異なり、新規 nNOS の存在が見出された。この nNOS 蛋白は、前述した MMDD1 細胞においても同様の結果が得られている (Yang T, et al. J Biol Chem , 2000)。このことから、新規 inducible nNOS が、NKCC2 を介したシグナル伝達経路にどのように係わるか、その構造解析と機能解析が必要であり、独創性が高いと思われた。

2) NKCC2 分子

NKCC2 は、現在 isoforms A, B, F の 3 種の存在が確認されており、MD 細胞には isoform B が高発現し、TGF 機能に重要と考えられている。しかし、NKCC2B KO マウスの表現型は、野生型と比べ、大差はなかった(Oppermann et al., J Am Soc Nephrol, 2006)。Oppermann らは、MD 細胞に僅かに発現する NKCC2A が代替的に機能していると考えているが、我々は A,B,F のどれにも当てはまらない新規 NKCC2 isoform の存在を示唆する実験結果を得た。この新規 NKCC2 isoform の構造解析、機能解析により、MD 細胞の新しいシグナル伝達経路が得られる可能性があり、その意味では、やはり独創性が高いと

思われた。

以上の分子の解析により、これまで明解でなかった MD 細胞の機能が明らかになることが期待された。例えば、構造が明らかになることによりの確なノックダウンも可能になり、疾患モデルが出現する可能性がある。また、NKCC2 に関しては、新規 isoform が発見できれば、新規の利尿薬開発への糸口となる可能性もある。いずれにしても、疾患への対応に向けた基盤が作られるという点で意義深いと思われた。

3. 研究の方法

(1) MD 細胞における新規 nNOS mRNA の解析

- ① NE-MD 細胞株から RNA を精製し、GENBANK に登録されている nNOS α の exon 情報をもとに、RT-PCR 用 primer を設計した。
- ② 脳 nNOS RNA を positive control として、NE-MD 細胞の RNA に対して RT-PCR を行い、得られたバンドを比較した。また、そのバンドのシーケンスを行うことにより腎 nNOS mRNA の塩基配列を解析した。

(2) MD 細胞における新規 nNOS 蛋白の構造解析

- ① NE-MD 細胞に furosemide(12 μ M)を添加し、nNOS の発現を誘導した。
- ② NE-MD 細胞株から蛋白を精製し、二次元電気泳動により、furosemide 添加群とコントロール群(furosemide 無添加)群における発現蛋白の比較を行った。
- ③ furosemide 添加により発現増加した蛋白を切り出し、TOF-MAS 解析を行い、構造解析を行った。

(3) MD 細胞における新規 NKCC2 mRNA の構造解析

- ① NKCC2 全長を含むように primer を設計

し、RT-PCR を行った。

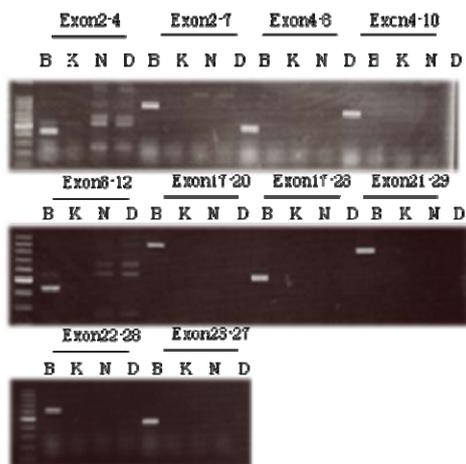
- ② 得られたバンドを精製して、DNA 断片を得、TA cloning ベクターへ導入した。
- ③ TA cloning ベクター内の insert に対し、シーケンスを行った。

4. 研究成果

(1) NE-MD 細胞における nNOS mRNA の解析

NE-MD 細胞の nNOS mRNA 配列を解析するため、positive control として total brain mRNA, total kidney mRNA および遠位尿管細胞 mRNA を精製し、NE-MD mRNA と共に RT-PCR 解析を行った。Primer は、すべての exon が含まれるように 10 通り設計した。その結果、positive control である brain mRNA (B) はすべての primer でバンドが得られたが、total kidney (K)、NE-MD (N)、遠位尿管細胞 (D) においてはバンドが得られなかった(図1)。腎臓の nNOS mRNA はやはり非常に量が少いため、RT-PCR では解析が非常に困難であると考えられた。

図1

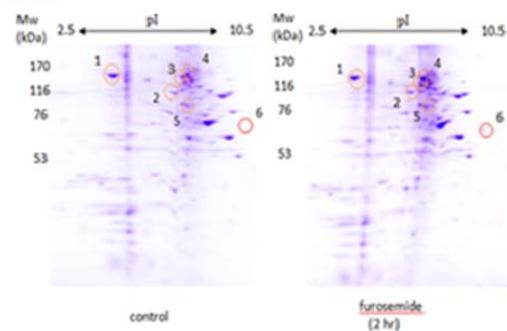


(2) NE-MD 細胞における nNOS 蛋白の解析

NE-MD 細胞の nNOS 蛋白は、furosemide (ループ利尿薬) や低 [NaCl] 溶液下で発現量が増加した。このことを利用し、NE-MD 細

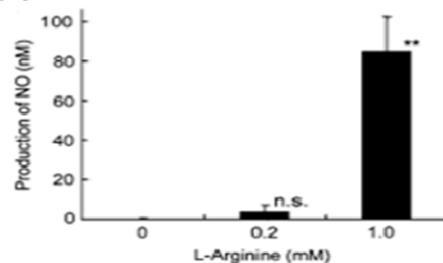
胞の実験液に furosemide (12 μM) を添加し、2 時間後蛋白精製し、二次元電気泳動を行った。発現量が増加するスポット (6 個) を選んだ(図2)。切り出したゲルを酵素処理し、MALDI-TOF MS 法で各スポットのペプチド断片 (配列) を解析した。Furosemide-induced nNOS 蛋白 (ペプチド断片) を同定し、その分子構造を明らかにした。その結果、酸化ドメインに位置するヘム結合部位、PDZ 結合部位は存在していたが、還元ドメインに属する FMN 結合部位、FAD 結合部位、NADPH 結合部位の主要配列が存在しなかった。また、

図2



還元ドメインの欠如は、NO 産生における電子伝達機能に大きな影響を与えることから、nNOS 蛋白活性に少なからず影響していることが考えられた。しかし、MD 細胞の nNOS 蛋白は、還元ドメインの第欠失にもかかわらず、L-Arg を基質として Ca²⁺ 濃度依存性に NO 産生を増加させる機能を保持していた(図3)。このことから、マウス腎 MD 細胞の nNOS 蛋白は、カルモジュリン結合部位が残存していると推測された。

図3



(3) NE-MD 細胞における NKCC2 mRNA の解析

NKCC2 は腎臓 TAL において、3 種類 (A,B,F) の isoforms を発現している。NE-MD 細胞には A, B, F どの isoform が発現しているか明らかにするため、個々の isoform を識別可能な primer を設計し RT-PCR 法により調べた。Isoforms A, B, F のバンドは、得られなかった。一方、NKCC2 isoforms の 3 種を認識する primer を設計し RT-PCR 解析を行ったところ、バンドが得られたため、NE-MD 細胞特異的新規 NKCC2 isoform の存在が示唆された。

本実験により、NE-MD 細胞および total kidney に発現していた NKCC2 の全長を TA cloning し、シーケンス解析を行った。Total kidney の解析により得られた配列には A, B, F が含まれていたが、NE-MD 細胞には A, B, F と新規のものは存在していなかった。さらに、total kidney で得られたマウス NKCC2 mRNA 配列を GENBANK のデータと相同解析してみたところ、GENBANK の配列と一致せず、GENBANK の配列データが間違っていることが判明した。GENBANK に登録してあるマウスとヒト、ラットの NKCC2 配列はほぼ一致していたが、我々が得た NEMD 細胞 NKCC2 配列および Total kidney NKCC2 配列と、GENBANK マウス NKCC2 配列 (NKCC2-A ACCESSION No. U20973, NKCC2-B ACCESSION No. U20974, NKCC2-F ACCESSION No. U20975) は一致せず、マウス NKCC2 はラット、ヒト NKCC2 配列と比較すると 519-530 の塩基が欠けていることがわかった。初めに NKCC2 isoforms A, B, F それぞれを認識するよう設計した primer は、この欠けた部分に設計していたが、改めて primer を設計し直しても NE-MD 細胞に NKCC2

isoforms A, B,F のバンドは得られなかった。また、3 種すべてを認識するように設計した primer による RT-PCR のバンドは、シーケンスにより NKCC2 ではない配列であることもわかった。しかし、NE-MD 細胞は furosemide 添加による nNOS 蛋白発現誘導、NO 放出の機能を保持しているため、新規 NKCC2 または furosemide 感受性蛋白が存在すると考えられた。

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 3 件)

- ① Kawada H, Yasuoka Y, Fukuda H, Kawahara K. Low [NaCl]-induced neuronal nitric oxide synthase (nNOS) expression and NO generation are regulated by intracellular pH in a mouse macula densa cell line (NE-MD). *J Physiol Sci.* 59(3):165-73, 2009 (査読有)
- ② Aoyagi T, Izumi Y, Hiroyama M, Matsuzaki T, Yasuoka Y, Sanbe A, Miyazaki H, Fujiwara Y, Nakayama Y, Kohda Y, Yamauchi J, Inoue T, Kawahara K, Saito H, Tomita K, Nonoguchi H, Tanoue A. Vasopressin regulates the renin-angiotensin-aldosterone system via V1a receptors in macula densa cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 295:F100-7, 2008 (査読有)
- ③ Akiba L, Fukuda H, Yasuoka Y, Kawahara K. Regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in cultured mouse macula densa cells. *Kitasato Med J.* 37:16-21, 2007 (査読有)

有)

[学会発表] (計 9 件)

- ① 安岡有紀子、小林瑞佳、佐藤雄一、河原克雅、Upregulation of V1a receptor mRNA by acidosis in TAL and intercalated cells of OMCD in mouse kidney. 第 32 回日本分子生物学会、2009.12.8、横浜
- ② Yasuoka Y, Kobayashi M, Sato Y, Okamoto H, Kawahara K. Acidosis—Induced expression of V1a receptor mRNA in mouse kidney distal nephron. アメリカ腎臓学会、2009.10.30、サンディエゴ
- ③ 安岡有紀子、小林 瑞佳、佐藤 雄一、河原 克雅、Localization and expression of V1aR along the mouse nephron during metabolic acidosis.、第 36 回国際生理学会、2009.7.30、京都
- ④ 安岡有紀子、小林 瑞佳、佐藤 雄一、河原 克雅、V1a受容体 (V1aR)のマウス腎ネフロン内局在とアシドーシスにおける発現誘導、第 52 回日本腎臓学会、2009.6.15、横浜
- ⑤ 安岡有紀子、小林瑞佳、川田英明、河原克雅、マウス腎Na⁺/H⁺交換輸送体のネフロン内局在とアシドーシスの影響、第 50 回日本腎臓学会、2008.6.1、福岡
- ⑥ 安岡有紀子、尿細管糸球体フィードバック機構におけるマクラデンサの役割、第 50 回日本腎臓学会、2008.5.30、福岡
- ⑦ Yasuoka Y, Kawada H, Sato Y, Kawahara K. Acidosis increased expression of NHE3 mRNA at the thick ascending limb of Henles loop but NOT at the proximal convoluted tubule in mouse kidney. 第 84 回日本生理学会、2008.3.25、新宿

⑧ 河原克雅、安岡有紀子、川田英明、福田英一、マクラデンサと尿糸球体フィードバック機構、第 50 回日本腎臓学会、2007.5.26、浜松

⑨ 安岡有紀子、川田英明、河原克雅、NEMD細胞におけるNa⁺輸送関連分子の発現解析、第 50 回日本腎臓学会、2007.5.26、浜松

[図書] (計 3 件)

- ① 河原克雅、安岡有紀子、小林瑞佳、特集：尿からさぐる病態と疾患、尿量、比重、浸透圧 腎と透析 67 (6) 729-731, 2009、東京医学社
- ② 河原克雅、安岡有紀子、川田英明、増刊 レジデントノート、輸液療法 パーフェクト、第 3 章輸液治療の考え方 1.体液の分布、組成、その評価法、Vol.11, p43-46, 2009、羊土社
- ③ 河原克雅、安岡有紀子、マクラデンサ細胞とTGF機構、Annual Review 腎臓、p219-226, 2008、中外医学社

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安岡 有紀子 (YASUOKA YUKIKO)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：50348504