

## 自己評価報告書

平成23年5月13日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：平成20年度～平成23年度

課題番号：20390060

研究課題名(和文)プロテアーゼによるENaC細胞内局在制御メカニズムの

研究課題名(英文)Regulation of intracellular localization of ENaC by proteas

研究代表者

丸中良典(MARUNAKA YOSHINORI)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00127036

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：ENaC、アルデステン、皮質集合管、プロテアーゼ阻害剤、浸透圧、  
トラフフィッキング、高血圧、ナトリウム輸送

## 1. 研究計画の概要

体液ナトリウム量は、我々の血圧調節に重要な働きを担っている。体液ナトリウム量の制御は、主に腎遠位部尿細管における上皮型ナトリウムチャンネル(Epithelial Na<sup>+</sup> Channel: ENaC)を介するナトリウム再吸収調節によって行われている。腎遠位部尿細管上皮細胞に存在するプロテアーゼがENaC機能(活性)制御を制御することは知られている。しかし、これらのプロテアーゼのENaCの細胞内局在制御/ENaCタンパク寿命に対して果たす役割は不明である。

A) 管腔側膜結合型プロテアーゼは、ENaCの構造修飾を介して、ENaCのエンドサイトーシスを抑制し、ENaCの管腔側上滞在時間を増大させる。

B) 管腔側膜結合型プロテアーゼにより修飾を受けたENaCは、細胞内へエンドサイトーシスされた時にでも、管腔側膜上へリサイクルされる率が高い。

C) アルドステロンは、管腔側膜結合型プロテアーゼ発現・活性を亢進させることにより、上記(A)および(B)の作用を介して、ENaCの管腔側膜上滞在時間を増大させる。

D) ゴルジ装置膜結合型プロテアーゼにより修飾を受けたENaCは、管腔側膜への移動(トラフフィッキング)効率が増大する。

## 2. 研究の進捗状況

1) 低浸透圧刺激により、上皮型ナトリウムチャンネル(ENaC)が細胞内貯蔵部位である粗面小胞体およびゴルジ装置から管腔側膜上への移動が促進されることは我々の研究により明らかにされている。プロテアーゼ阻害剤により細胞を処理することにより、この低浸透圧刺激により移動促進されたENaCの移動速度が変化することを明らかにした。管腔側膜上に存在するENaCはプロテアーゼ阻害剤により、本来ならチャンネル分子の一部の切断されるべき箇所が切断されず、この分子構造の維持により、細胞内取り

込み速度の上昇をきたした。さらに、管腔側膜上に存在するENaCのみではなく、細胞内に貯蔵されているENaCの細胞内移動速度をプロテアーゼ阻害剤は減少させることも明らかとなり、この現象は、プロテアーゼ阻害剤がENaC分子以外にも影響を与えることが示唆された。

2) プロテアーゼ構造修飾とリサイクル効率：HA-ENaC発現細胞(野生型)とmyc-ENaC発現細胞(変異導入型)においてプロテアーゼ処理(実験系2)およびプロテアーゼ遺伝子を共発現(実験系1)させた後、エンドサイトーシス/リサイクルが可能な条件(37°C)で標識(1次)抗体によりENaCを特異的にラベルして一定時間後に氷冷して反応を止め、細胞膜表面に存在するENaCだけから標識抗体をはずした。このあと、細胞を37°Cに戻し、一定時間後に細胞膜表面を標識(1次)抗体に結合する2次抗体を反応させ、リサイクルされてきたENaCを2次抗体標識マーカーにより定量化した。この結果から、プロテアーゼによる構造修飾がリサイクル効率を上昇させることが示唆された。

3) ユビキチン化とリサイクル効率：

A. ユビキチン化とリサイクル効率の関連性について明らかにするために、HA-ENaC(野生型)とmyc-ENaC(変異導入型)遺伝子それぞれにNedd4-2との結合に重要なPY motifに変異導入してNedd4-2と結合できない安定発現系を構築した。

B. 上記で構築したHA-ENaC(野生型)とmyc-ENaC(変異導入型)のそれぞれでPY motifに変異導入した系としない系を用いて、プロテアーゼ構造修飾とリサイクル効率と同じ方法で細胞内のendosomeなどに取り込まれたENaCのみを標識抗体でラベルして、その後のリサイクル効率を2次抗体を反応させることで定量化して、PY motifへの変異導入がリサイクルにどのような影響を及ぼしたかを検証した。この実験結果より、ユビキチン化によりリサイクル効率が低下

するということが、示唆された。

4) アルドステロンが、管腔側膜結合型プロテアーゼ発現・活性を亢進させることにより、ENaCの管腔側膜上滞在時間を増大させることを明らかにした。

A. アルドステロンの投与の有無により、管腔側膜結合型プロテアーゼ (channel activating protease: CAP) の発現が影響を受けるか否かをウエスタンブロッティングにより検討した。さらに、アルドステロンの投与の有無により、管腔側膜分画のプロテアーゼ (CAP) 活性が影響を受けるか否かを調べた。その結果、アルドステロン投与により、CAPの発現および活性とも、増大することが明らかとなった。

B. アルドステロン投与の ENaC リサイクル効率に及ぼす影響を、ENaC ユビキチン化レベルについても併せて検討したところ、ENaC リサイクル率は増大し、一方 ENaC ユビキチン化レベルは減少することが明らかとなった。

C. アルドステロン以外に ENaC の膜発現量を増やすと考えられる cAMP 刺激 (細胞内トランプフィッキングを介して) による系では、ENaC の管腔側膜上の発現量は増大したが、ENaC ユビキチン化には影響はなく、ENaC リサイクル効率は増大することが明らかとなった。

### 3. 現在までの達成度

当初の計画通りに進展している。さらに、当初の計画より進んでいる点もある。

(理由) 当初の計画に対する達成度に関しては、上記2に記載した通りであり、計画通りに研究は進捗している。さらに、細胞内 ENaC 量が多い場合、ENaC の管腔側膜への移動側が遅くなるという実験結果も得て、計画以上に進捗している点もある

### 4. 今後の研究の推進方策

現在のところ、計画通りに研究が進捗しているので、この研究成果に基づいて、最終年度 (平成23年度) に計画されている実験を行うことにより、本研究課題を達成させる予定である。

### 5. 代表的な研究成果

(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22件) すべて査読有り

1. Taruno A, Marunaka Y. Analysis of blocker-labeled channels reveals the dependence of recycling rates of ENaC on the total amount of recycled channels. Cell Physiol Biochem 26:925-934, 2010

2. Tokuda S, Miyazaki H, Nakajima K, Yamada T, Marunaka Y. NaCl flux between apical and basolateral side recruits claudin-1 to tight junction strands and regulate paracellular transport. Biochem Biophys Res Commun 393:

390-396, 2010

3. Tokuda S, Miyazaki H, Nakajima K, Yamada T, Marunaka Y. Hydrostatic pressure regulates tight junctions, actin cytoskeleton and transcellular ion transport. Biochem Biophys Res Commun 390:1315-1321, 2009

4. Tokuda S, Niisato N, Nagai T, Taruno A, Nakajima K, Miyazaki H, Yamada T, Hosogi S, Ohta M, Nishio K, Iwasaki Y, MARUNAKA Y. Regulation of paracellular Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> conductances by hydrostatic pressure. Cell Biol Int 33:949-956, 2009.

5. Taruno A, Niisato N, Marunaka Y. Intracellular calcium plays a role as the second messenger of hypotonic stress in gene regulation of SGK1 and ENaC in renal epithelial A6 cells. Am J Physiol Renal Physiol 294:F177-186, 2008

[学会発表] (計48件)

1. 新里直美、丸中良典. 上皮組織における細胞外浸透圧感受機構. 第88回日本生理学会大会、第116回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2011.3.28-30; 横浜. シンポジウム

2. 丸中良典、樽野陽幸. 上皮型ナトリウムチャネル (ENaC) 細胞内輸送速度の ENaC 総数への依存性. 第88回日本生理学会大会、第116回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2011.3.28-30; 横浜. シンポジウム

3. 太田麻利子、新里直美、丸中良典. アルドステロン誘因性管腔側膜上 ENaC 発現増大における p38 の役割. 第88回日本生理学会大会、第116回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2011.3.28-30; 横浜

4. Niisato N, Ohta M, Marunaka Y. ERK dephosphorylation by MKP-1 stimulates Na<sup>+</sup> reabsorption through beta- and gamma-ENaC expression in hypotonic stress. Satellite Symp Intl Union Physiol Sci-2009, Epithelial Ion Transport in Health and Disease. July 23-25, 2009; Kyoto, Japan.

5. Niisato N, Ohta M, Marunaka Y. Dephosphorylation of ERK by MKP-1 stimulates beta-and gamma-ENaC mRNA expression of renal A6 cells in hypotonic stress. 40th NIPS International Symposium - International Joint Symposium: PAT-CVR 2009. August 3-6, 2009; Okazaki, Japan.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし