

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月2日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591053

研究課題名（和文） 水チャネル輸送機序を標的にした腎性尿崩症の治療法開発

研究課題名（英文） Molecular-targeted therapy for nephrogenic diabetes insipidus based on the trafficking mechanism of water channel

研究代表者

野田 裕美（NODA YUMI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教員

研究者番号：30372436

研究成果の概要（和文）：水チャネル AQP2 は腎臓の集合管で水の再吸収に関わっており、その細胞内輸送は体内水分量の調節を担っている。AQP2 の輸送異常で体内が重篤な脱水となる腎性尿崩症を来す。我々は TM5b が AQP2 輸送の最終局面で直接輸送を阻害することを明らかにした。腎性尿崩症の特異的な治療法を開発を行うために、TM5b の発現のみを最大限抑制する方法を開発し、変異 AQP2 の輸送障害を正常レベルまで回復させることに成功した。また AQP2 の水チャネルとしての機能もリン酸化により制御されていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Water channel aquaporin-2 (AQP2) regulates the water reabsorption in the kidney collecting ducts, which is the key event for maintenance of body water balance. Its impairments result in various water balance disorders including diabetes insipidus, which is a disease characterized by a massive loss of water through the kidney, leading to severe dehydration in the body. We discovered AQP2 movement is directly and negatively regulated by tropomyosin-5b (TM5b). This indicates TM5b is an appropriate therapeutic target for nephrogenic diabetes insipidus. We succeeded in the specific inhibition of TM5b that rescues the trafficking defect of AQP2 mutants. Moreover, we discovered the water transport activity of individual AQP2 protein is regulated by PKA phosphorylation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：アクアポリン、尿崩症、腎臓集合管、尿濃縮、細胞内輸送、アクチン、ミオシン、トロポミオシン

1. 研究開始当初の背景

ヒトの体内でおこるあらゆる生命現象において水の移動は必要不可欠である。代表的なものは尿の生成、排出であり、体液恒常性の維持を担っている。アクアポリン2 (AQP2) は水分子のみを通し、他にはイオンなどを含めあらゆる物質を一切通すことはないという特徴をもつ水チャネルである。体内が脱水になると腎臓集合管に発現している AQP2 は細胞内から細胞表面に移動し、原尿から水のみを再吸収し、体内水分量調節の根幹を担っている。AQP2 の遺伝子異常では尿濃縮能が障害され体内が重篤な脱水となる腎性尿崩症をきたす。一方、心不全、肝硬変、神経疾患など多くの疾患で水利尿不全（浮腫、肺水腫、腹水など）が生命予後を左右する大きな問題になることが多いが、この水利尿不全も AQP2 の機能異常が原因である。しかし、AQP2 が動く分子機序の実体については全く不明であった。

申請者は AQP2 が “**モーターコンプレックス**” を形成していることを発見した (Noda, et al. BBRC 2005; Noda, et al. FEBS Lett. 2004; Noda, et al. BBRC 2004)。さらにプロテオリポソーム再構成系での表面プラズモン共鳴 (SPR) や生細胞での蛍光相関分光法および蛍光相互相関分光法 (FCS, FCCS) などの 1 分子レベルでの動態測定により AQP2、アクチン、トロポミオシン 5b (TM5b) の分子機序の空間的時系列を解明し、AQP2 自身が局所での細胞骨格をコントロールして自らの輸送経路を切り開いていることを発見した (Noda, et al. J. Cell Biol. 2008)。しかしながら、AQP2 複合体にはモーター分子なども含まれており、積極的な駆動力の存在も推測される。このためモーター分子などその他の AQP2 複合体構成因子にも注目して AQP2 制御機序の解明を試みる。さらに AQP2 輸送機序をターゲットにした特異的な腎性尿崩症の治療法の開発を試みるために TM5b を標的とする方法を検討する。腎性尿崩症には純粋に AQP2 の遺伝子異常によるものだけでなく、薬剤性などによってアクアポリンの輸送障害がおきて尿崩症になっているものもある。AQP2 輸

送の最終局面で直接輸送に関わる TM5b をターゲットにすれば尿崩症全般に有効であると考えられる。

2. 研究の目的

AQP2、アクチン、TM5b のみならずモーター分子など他の AQP2 複合体構成因子にも注目して AQP2 を動かす分子機序の解明を試みる。さらに、AQP2 輸送の最終局面で直接輸送を制御する TM5b を標的とすることで腎性尿崩症の特異的な治療法開発を試みる。

3. 研究の方法

AQP2 複合体構成因子を安定発現する腎尿細管由来培養細胞を作成し、顕微鏡観察、免疫沈降、管腔側細胞膜表面標識等で分子動態を調べる。また、TM5b の発現のみを最大限抑制し、他のトロポミオシンアイソフォームを抑制しない最適な RNAi 配列の検討を行い、さらにその siRNA でノックダウンすることにより変異 AQP2 の輸送障害を回復させることができるかを検討する。

4. 研究成果

体内が脱水になると下垂体後葉から分泌されたバソプレシンが腎集合管主細胞基底膜にある受容体に結合し、cAMP やカルシウムカルモジュリン依存性情報伝達系を介して AQP2 の輸送が起こる。このとき PKA によって AQP2 がリン酸化される。このリン酸化が AQP2 を動かす分子機序の実体を我々がはじめて明らかにした。すなわち AQP2 は、通常の状態では細胞内の移動経路上で G アクチンと結合しており、TM5b が結合して安定化されたアクチン細胞骨格により移動が妨げられた状態にある。体内が脱水になると、バソプレシン刺激を受けて cAMP 情報伝達系を介して AQP2 はリン酸化される。このリン酸化により AQP2 は G アクチンから離れ、アクチン細胞骨格から TM5b を奪って結合する。このとき TM5b を失ったアクチン細胞骨格は AQP2 分子に近いごく狭い範囲で脱重合して崩壊し、その結果として移動の妨害が解除され AQP2 が細胞表面へ動くようになることを

発見した。しかしそれだけではなく、ミオシン II と調節軽鎖が AQP2 に結合することを明らかにした。さらに、AQP2 輸送が起こる時、ミオシン調節軽鎖がリン酸化された。ミオシン調節軽鎖キナーゼはカルシウムカルモジュリン依存性であり、ミオシンの AQP2 輸送への関与が推測された。また、ミオシンを含む複数の AQP2 結合分子によるプロテオリポソーム再構成系を作成することに成功した。これにより、AQP2 のモーター分子制御能について適切に評価することが可能となった。また、腎尿細管由来 MDCK 細胞において TM5b の発現のみを最大限抑制し、他のアイソフォームを抑制しない最適な RNAi 配列の検討を行い、TM5b アイソフォームのみに極めて選択的なノックダウンを行うことができた。さらにその方法により腎性尿崩症における変異 AQP2 の輸送障害を正常レベルまで回復させることに成功した。また AQP2 の細胞内輸送だけでなく、個々のタンパク質の水チャネルとしての機能自体もリン酸化により制御されていることをリコンビナントタンパク質のプロテオリポソーム再構成系を作成することにより明らかにすることができた。つまり、AQP2 はその細胞内移動と水透過性の両方を変化させることで、体内水分量の变化に数分のオーダーで速やかに反応し大量の水再吸収量の変化を厳密にコントロールすることを可能にしていると考えられた。

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 20 件)

*corresponding author

1. Ohta E* Akazawa M, Noda Y, Mandai S, Naito S, Ohta A, Sohara E, Okado T, Rai T, Uchida S, Sasaki S. Severe hyperparathyroidism in a pre-dialysis chronic kidney disease patient treated with a very low protein diet. *J. Bone Miner. Metab.* 2011. DOI: 10.1007/s00774-011-0320-6.
2. 野田裕美*. 水輸送制御を担う細胞内分子複合体ダイナミクスに迫る. 腎と透析 72 巻

2 号 pp.202-208, 2012.

3. 野田裕美*. Liddle 症候群. 日本腎臓学会誌 53:160-162, 2011.
4. 野田裕美*. 尿濃縮を担うアクアポリン複合体. 日本薬理学雑誌 139:66-69, 2011.
5. 野田裕美*. 2 型糖尿病の末期腎不全患者において血清コペプチン濃度は心血管イベントと相関する. *Fluid Management Renaissance* 1:75-77, 2011.
6. 野田裕美*, 佐々木成. エビデンスに基づく CKD 診療ガイドライン. 腎疾患・透析最新の治療 2011-2013. pp.6-10 榎野博史、秋澤忠男編集, 2011.
7. 野田裕美*. 水とナトリウム代謝. 小児腎臓病学. pp.51-56, 日本小児腎臓病学会編, 2011.
8. 野田裕美*, 江渡加代子, 堀川三郎, 佐々木成. アクアポリン複合体制御のダイナミクス. 遺伝子医学 MOOK トランスポートソーム: 生体膜輸送機構の全体像に迫る - 基礎・臨床・創薬応用研究の最新成果. pp.238-243, 金井好克編集, 2011.
9. 野田裕美*. 利尿薬の歴史と作用機序. *Fluid Management Renaissance* 1:20-24, 2011.
10. 野田裕美*, 江渡加代子, 堀川三郎, 佐々木成. アクアポリン 2 の細胞内ダイナミクス. パソプレシン受容体拮抗 その基礎と臨床 . pp.61-70, 折田義正監修, 和泉徹, 石川三衛編集, 2011.
11. Eto K, Noda Y*, Horikawa S, Uchida S, Sasaki S. Phosphorylation of aquaporin-2 regulates its water permeability. *J. Biol. Chem.* 285: 40777-40784, 2010.
12. Noda Y, Sohara E, Ohta E, Sasaki S*. Aquaporins in kidney pathophysiology. *Nat. Rev. Nephrol.* 6: 168-178, 2010.
13. Satoh F, Okado T* Iwamoto M, Akita W, Wakabayashi M, Ohta A, Sohara E, Noda Y, Rai T, Uchida S, Sasaki S. Calcium-alkali syndrome-like symptoms manifested by daily alphacalcidol and thiazide. *Intern. Med.* 49: 837-840, 2010.
14. 野田裕美*. アクアポリン 2 の輸送制御ダイナミクス. Annual Review 腎臓 2010 年版. pp.1-8, 2010.
15. 野田裕美*. 3 章 1. 尿検査、2. 血液検査、

3. 腎機能検査「腎臓内科学」pp.54-69. 佐々木成編, 2010.
16. 野田裕美*, 佐々木成. アクアポリン 2. 日本臨床 4 : 648-650, 2010.
17. Li YH, Eto K, Horikawa S, Uchida S, Sasaki S, Li XJ*, Noda Y*. Aquaporin-2 regulates cell volume recovery via tropomyosin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41: 2466-2476, 2009.
18. 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: C1389-1396, 2009.
19. 野田裕美*, 江渡加代子, 堀川三郎, 佐々木成. 尿細管での水輸送. 腎と透析, 67: 333-338, 2009.
20. 野田裕美*, 佐々木成. 酸塩基平衡の調節はどのように行われているか. レジデントノート輸液療法パーフェクト. pp. 34-37 飯野靖彦編, 2009.

[学会発表](計 8 件)

招待講演のみ記載

1. Noda Y. Invited lecture: Water Handling and Urinary Concentration: Regulation of AQP2 Water Channel Trafficking. The World Congress of Nephrology (WCN), Vancouver, April 11, 2011.
2. 野田裕美. 特別講演: 水チャネルアクアポリン複合体のダイナミクス. 第 21 回バゾプレシン研究会特別講演, 東京, 2011 年 1 月 8 日.
3. 野田裕美. シンポジウム: 腎尿細管トランスポートソーム. 第 84 回日本薬理学会年会, 横浜, 2011 年 3 月 23 日.
4. 野田裕美. シンポジウム: 腎疾患の治療法開発を目指して. 第 54 回日本腎臓学会学術総会, 横浜, 2011 年 6 月 15 日.
5. 野田裕美. 講演: 水輸送制御を担う細胞内分子複合体ダイナミクスに迫る. 第 33 回腎臓セミナー, 東京, 2011 年 8 月 27 日.
6. 野田裕美. 講演: 尿濃縮を担うアクアポリン複合体ダイナミクス. 第 14 回横浜リサーチカンファランス, 横浜, 2011 年 9 月 27 日.
7. 野田裕美. 大島賞受賞講演: 腎における

水輸送制御メカニズムの解明と水代謝疾患に対する新規治療法開発. 第 53 回日本腎臓学会学術総会, 神戸, 2010 年 6 月 16 日.

8. Noda Y. Invited lecture: Moving mechanisms of aquaporin-2 water channel. The 8th World Congress on Neurohypophysial Hormones (WCNH). Kitakyushu. September 6, 2009.

[図書](計 件)

[産業財産権]
出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者 ()

研究者番号:

(2)研究分担者 ()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()

研究者番号: