

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659413

研究課題名(和文)小胞体水チャネルの病態生理学的役割の解明

研究課題名(英文)Role of aquaporins in endoplasmic reticulum

研究代表者

佐々木 成 (SASAKI, SEI)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：60170677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：細胞形質膜に存在し水/イオン/小分子を経上皮的に輸送する輸送体蛋白に比べ、小胞体などの細胞内膜系に存在する輸送体は、研究手法が限られてきたことからその研究は遅れている。しかしながらヒトの病態と深く関わる事も推定され、その研究の進展は急務である。今回、細胞内膜系に存在すると推定されているAQP11のノックアウトマウスが嚢胞腎を発症する分子病態を明らかにした。AQP11は、腎臓では近位尿細管の小胞体に存在し、その欠損が嚢胞腎原因遺伝子PKD1のコードする蛋白PC-1の糖化に障害を与え、PC-1の細胞膜発現低下を通して嚢胞腎が発症することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of our study was to clarify pathophysiological roles of aquaporins in endoplasmic reticulum (ER). AQP11 knockout mice (AQP11-KO) showed polycystic kidney. However, molecular mechanism(s) of the cyst formation remained to be determined. To clarify this, we generated HA-tagged AQP11 BAC transgenic mice (AQP11-TG), and also analyzed AQP11-KO focusing on PKD1 (PC-1) and PKD2 (PC-2). AQP11 was found to be localized in endoplasmic reticulum in the proximal tubules, and impaired glycosylation processing and aberrant membrane trafficking of PC-1 was observed in AQP11 KO mice, suggesting the involvement of AQP11 in proper glycosylation of PC-1 in ER.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：水・電解質代謝学 水チャネル 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

本研究者は、1990年代はじめから腎臓の膜輸送体遺伝子の同定を行い、AQP水チャネル(*Nature 1993, PNAS 1994, JBC 1997*など)、CLCクロライドチャネル(*JBC 1993/1994/1996, Neuron 1994*など)など数多くのチャネル分子をクローニングし、ヒトでのこれら輸送体病の発見(*Am J Hum Genet 2001*)や遺伝子改変マウス作成(*Nature Genet 1999, AJP 2005, JBC 2005, PNAS 2005*)による生体内で役割の解明を行ってきた。また最近では輸送体分子の制御機構の解析へと研究は発展してきた(*J Cell Biol 2008, Cell Metab 2007, Hum Mol Genet 2009, J Cell Sci 2011, PLoS ONE 2011*)。一方、これらの進展をみた膜輸送体研究は主として、細胞形質膜上に存在するチャネルやトランスポーターであり、経上皮の水電解質・小分子の輸送に関わる分子であった。この理由は、細胞形質膜上に存在する輸送体については、種々の機能評価系が存在するが、細胞内膜系に存在するチャネルや輸送体の機能評価の系が古典的なリポソーム再構成系など限られていた事による。

本研究では我々がクローニングした水チャネルAQP11を対象とする。AQP11ノックアウトマウス(AQP11-KO)が多発性嚢胞腎を引き起こす事はすでに明らかにしたが(*Mol Cell Biol 2005*)、AQP11の詳細な細胞内局在を含めて、なぜこのような病態が引き起こされるのか全く解明されていない。よって遺伝子改変マウスを主として使用した病態解明を通して、水チャネルがなぜ小胞体に存在しなくてはならないのか?について答えを出すことが求められていた。

2. 研究の目的

本研究は、AQP11-KOにおける嚢状腎形成の分子メカニズム解明を通して、小胞体になぜAQP水チャネルが必要なのか、という細胞生物学的疑問に答えることを目的とする。

3. 研究の方法

3xHAタグ付きAQP11BACトランスジェニックマウス(AQP11-TG)の作製と解析をおこなう。タグ付きAQP11を作製する理由は、今までにnativeのAQP11に対して良好な抗体が得られなかったためである。BACトランスジェニックマウスであるので、遺伝子全長を導入して

おり、その発現臓器は生理的な発現臓器と同じであると考えられるが、機能的にもこの3xHA-AQP11が生体内で機能しているかを検証するため、すでに我々が作成したAQP11ノックアウトマウスと交配し、その異常(嚢胞腎を発症)を相補できるかを検証し、その確認が取れた段階で、AQP11の細胞内局在を抗HA抗体を用いて詳細に検討する。種々の細胞内器官マーカーとの共染色によりその存在部位を同定する。また、嚢胞腎の発症に関わる他の遺伝子(PKD1, PKD2など)産物(PC-1, PC-2)の蛋白レベルでの詳細な検討をAQP11-KOにて行い、AQP11-KOの嚢胞腎発生機序を探る。

4. 研究成果

1) AQP11-TGの作成と解析

AQP11の細胞内や組織での存在部位はよい抗体がないために未同定であった。そこでAQP11-TGを作成し、その際にAQP11に3XHAのタグを付与して、HA抗体での観察を可能にした。このAQP11-TGはAQP11ノックアウトマウスと交配すると嚢胞腎の形質が相補されたことから、生体内でも正しく機能している事が示された。HA-AQP11は腎臓以外の臓器にも発現していたが、腎臓では近位尿細管に局在していた。近位尿細管の細胞内では、各オルガネラマーカーとの2重染色によって、小胞体にAQP11は存在することが確定された。

2) AQP11-KOの解析

AQP11の小胞体への局在が確定されたため、小胞体におけるAQP11の役割を、AQP11-KOの嚢胞腎という形質という観点から追求した。小胞体は蛋白がmRNAから翻訳後、種々の修飾を受ける部位であり、その修飾が蛋白の正常な機能発現には必須である。そこで嚢胞腎の原因遺伝子であるPKD1とPKD2の遺伝子産物PC-1とPC-2について特に蛋白修飾についてAQP11-KOで異常が無いか調べた。その結果PC-1のglycosylationに異常があり、また細胞膜上のPC-1発現量が低下していることが明らかとなった。この発現低下が嚢胞形成に寄与しているかどうかを調べるために、PKD1ノックアウトマウスとAQP11-KOを交配したところ、PKD1^{+/-}バックグラウンドのAQP11-KOは通常のバックグラウンドのAQP11-KOより重篤な嚢胞腎を呈したことから、AQP11-KOでのPKD1の関与が確定となっ

た (J. Am. Soc.Nephrol 2014 in press)。小胞体に存在する AQP がなぜ特定の PKD1 という蛋白のみにその糖化を障害するのかという疑問は残ったが、小胞体機能に小胞体に存在する AQP が寄与しているという初めて病態を明らかにすることができた。今後は、この小胞体における AQP11 の機能に水チャネルとしての役割が寄与しているのかどうかについて検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 40 件)

1. Inoue R, Sohara E, Rai T, Satoh T, Yokozeki H, Sasaki S, Uchida S. Immunolocalization and translocation of aquaporin-5 water channel in sweat glands. *J Dermatol Sci.* 70: 26-33, 2013. 査読有
2. Isobe K, Mori T, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Kumagai N, Kamada F, Morimoto T, Hayashi M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for urinary thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter (NCC) measurement. *Am J Physiol Renal Physiol.* 305: F1374-81, 2013. 査読有
3. Mori T, Kikuchi E, Watanabe Y, Fujii S, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Chemical library screening for WNK signalling inhibitors using fluorescence correlation spectroscopy. *Biochem J.* 455: 339-45, 2013. 査読有
4. Mori Y, Wakabayashi M, Mori T, Araki Y, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Decrease of WNK4 ubiquitination by disease-causing mutations of KLHL3 through different molecular mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun.* 439: 30-4, 2013. 査読有
5. Nomura N, Kamiya K, Ikeda K, Yui N, Chiga M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Treatment with 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin ameliorated symptoms of Bartter syndrome type caused by mutated *Bsnd* in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 441: 544-49, 2013. 査読有
6. Sasaki S, Chiga M, Kikuchi E, Rai T, Uchida S. Hereditary nephrogenic diabetes insipidus in Japanese patients: analysis of 78 families and report of 22 new mutations in AVPR2 and AQP2. *Clin Exp Nephrol.* 17: 338-344, 2013. 査読有
7. Takahashi D, Mori T, Wakabayashi M, Mori Y, Susa K, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. KLHL2 interacts with and ubiquitinates WNK kinases. *Biochem Biophys Res Commun.* 437: 457-62, 2013. 査読有
8. Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, Sohara E, Susa K, Araki Y, Chiga M, Kikuchi E, Nomura N, Mori Y, Matsuo H, Murata T, Nomura S, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 causes human hypertension. *Cell Rep.* 3: 858-68, 2013. 査読有
9. Zeniya M, Sohara E, Kita S, Iwamoto T, Susa K, Mori T, Oi K, Chiga M, Takahashi D, Yang SS, Lin SH, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Dietary salt intake regulates WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade in mouse aorta through angiotensin II. *Hypertension.* 62: 872-878, 2013. 査読有
10. Hossain Khan MZ, Sohara E, Ohta A, Chiga M, Inoue Y, Isobe K, Wakabayashi M, Oi K, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Phosphorylation of Na-Cl cotransporter by OSR1 and SPAK kinases regulates its ubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425:456-61, 2012. 査読有
11. Nishida H, Sohara E, Nomura N, Chiga M, Alessi DR, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway activates the WNK-OSR1/SPAK-NCC phosphorylation cascade in hyperinsulinemic db/db mice. *Hypertension.* 60:981-90, 2012. 査読有
12. Oi K, Sohara E, Rai T, Misawa M, Chiga M, Alessi DR, Sasaki S, Uchida S. A minor role of WNK3 in regulating phosphorylation of renal NKCC2 and NCC co-transporters in vivo. *Biol.Open.* 1:120-7, 2012. 査読有
13. Susa K, Kita S, Iwamoto T, Yang SS, Lin SH, Ohta A, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Alessi DR, Uchida S. Effect of heterozygous deletion of WNK1 on the WNK-OSR1/ SPAK-NCC/NKCC1/NKCC2 signal cascade in the kidney and blood vessels. *Clin. Exp. Nephrol.* 16:530-8, 2012. 査読有
14. Susa K, Sohara E, Isobe K, Chiga M, Rai T, Sasaki S, Uchida S. WNK-OSR1/SPAK-NCC

signal cascade has circadian rhythm dependent on aldosterone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 427:743-7, 2012. 査読有

15. Uchida S, Chiga M, Sohara E, Rai T, Sasaki S. Does a 2-adrenergic receptor-WNK4-Na-Cl co-transporter signal cascade exist in the in vivo kidney? *Nat. Med.* 18:1324-5, 2012. 査読有

〔学会発表〕(計 36 件)

1. Inoue Y, Sohara E, Kobayashi K, Rai T, Ishibashi K, Horie S, Su X, Zhou J, Sasaki S, Uchida S. Aberrant Glycosylation and Localization of Polycystin-1 Cause Polycystic Kidney in AQP11-Knockout Mice. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November 7, 2013.

2. Isobe K, Mori T, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Clinical Significance of Urinary Thiazide-Sensitive Na-Cl Cotransporter (NCC) Measurement by Newly Development Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. The 46th Annual meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November 7, 2013.

3. Mori T, Eriko K, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Chemical library screening for WNK signaling inhibitors by using fluorescent correlation spectroscopy. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November 7, 2013.

4. Mori Y, Wakabayashi M, Mori T, Araki Y, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Analyses of KLHL3 mutants that cause Pseudohypoaldosteronism type II. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November 9, 2013.

5. Susa K, Sohara E, Zeniya M, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Low salt intake decreased transcription and protein level of KLHL3 in mouse kidney. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November 7, 2013.

6. Takahashi D, Mori T, Wakabayashi M, Mori Y, Susa K, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. KLHL2 interacts with and ubiquitinates WNK kinases. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November 9, 2013.

7. Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, Sohara E, Susa K, Araki Y, Chiga M, Kikuchi E, Nomura N, Mori Y, Rai T, Sasaki S, Uchida

S. Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 activates OSR1 and SPAK kinases-NaCl cotransporter (NCC) signaling and causes hypertension. The 46st Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November 9, 2013.

8. Yui N, Uchida S, Sasaki S. Ser-261 phosphorylation is an endocytic signal of aquaporin-2 water channel. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, USA, November 7, 2013.

9. Zeniya M, Sohara E, Kita S, Iwamoto T, Susa K, Mori T, Oi K, Chiga M, Takahashi D, Yang SS, Lin SH, Rai T, Sasaki S, Uchida S. WNK3 Regulates Blood Pressure Through the Regulation of Vascular OSR1/SPAK-NKCC1 Phosphorylation Cascade. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November 9, 2013.

10. Kikuchi E, Mori T, Isobe K, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Chemical library screening for direct SPAK inhibitors by a newly developed ELISA system. The 45th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego (USA), November 1, 2012.

11. Mori T, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Generation and analysis of WT-WNK4 transgenic mice revealed the physiological role of WNK4. The 45th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego (USA), November 1, 2012.

12. Sasaki S, Chiga M, Kikuchi E, Uchida S. Hereditary nephrogenic diabetes insipidus (NDI) in Japanese patients: Analysis of 73 families. The 45th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego (USA), November 2, 2012.

13. Susa K, Sohara E, Isobe K, Chiga M, Rai T, Sasaki S, Uchida S. WNK4-OSR1/SPAK-NCC signal cascade has circadian rhythm dependent on aldosterone. The 45th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego (USA), November 2, 2012.

〔その他〕

東京医科歯科大学腎臓内科学ホームページ
<http://www.tmd.ac.jp/grad/kid/kid-J.htm>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 成 (SASAKI SEI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究

科・教授

研究者番号：60170677