

令和 4 年 2 月 18 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650114

研究課題名(和文) ホウ酸ホメオスタシスのヒト・マウス細胞および個体における生理学的意義の探索

研究課題名(英文) Studies for cellular and whole-body boric-acid homeostasis in human and mouse

研究代表者

加藤 明 (KATO, Akira)

東京工業大学・生命理工学研究科・助教

研究者番号：40311336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ホウ酸は微量栄養素として必須であるが、過剰に摂取すると毒性を示す。哺乳動物や魚類のホウ酸ホメオスタシスを担う分子機構は明らかでない。我々は魚類が海水に含まれるホウ酸の過剰摂取から身を守るためホウ酸を尿中に排出することを見出し、 $B(OH)_4$ -チャネル(Slc4a11)及び $B(OH)_3$ チャネル(AQP3, 7, 8, 9a, 9b)を同定した。さらにヒトAQP3, 7, 8, 9, 10も $B(OH)_3$ チャネルとして機能することを見出したが、ヒトSlc4a11から $B(OH)_4$ -チャネル活性を検出できなかった。哺乳動物のホウ酸ホメオスタシスは主にAQPファミリーが担う事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホウ素は植物の細胞壁を構成する元素の1つとして知られ、その重要性や代謝について植物を用いた研究が進んでいる。一方、動物でもホウ素は微量栄養素とされているが、その機能や代謝を担う分子メカニズムは明らかでない。本研究により、哺乳動物や魚類の細胞の細胞膜に存在するホウ酸輸送体を特定した。その結果、腸でホウ酸を吸収する経路や腎臓でホウ酸を排出する経路についてさらに詳細に解析することが可能になり、哺乳動物がホウ酸を代謝する経路の理解に大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In vertebrates, boric acid is a vital micronutrient that is required for embryogenesis and cell growth. High [boric acid] is toxic to animals, however, little is known about the whole-body boric acid homeostasis. We found that marine teleosts, e.g., Takifugu obscurus and Takifugu rubripes, excrete and concentrate boric acid in the urine to eliminate excess boric acid, and identified channels for borate (Slc4a11) and boric acid (AQP3, 7, 8, 9a, 9b) in pufferfish. To clarify the presence of similar systems in mammals, the functions of mammalian Slc4a11 and AQPs were analyzed using ion-selective microelectrodes. Human AQP3, 7, 8, 9, 10 showed boric acid and water channel activities. However, human and mouse Slc4a11 showed no significant borate-transport activity. These results indicate that mammalian boric acid homeostasis is mainly maintained by AQP family whereas that of marine teleosts is regulated by Slc4a11 and AQPs.

研究分野：分子生理

キーワード：ホウ酸 ホメオスタシス Slc4a11 アクアポリン イオン輸送体

1. 研究開始当初の背景

ホウ素は植物の必須栄養素であり、細胞壁の構成元素の一つとして成長に不可欠である。シロイヌナズナ高ホウ素要求株の遺伝学的な解析からホウ素(ホウ酸)輸送体が見出され、BOR ファミリーと NIP ファミリーの2種類のホウ素輸送体が同定された(Nature 420:337-40, 2002; Plant Cell 18:1498-509, 2006)。興味深いことに BOR ファミリーは動物の重炭酸輸送体やアニオン交換輸送体から構成される Solute carrier 4 (Slc4) ファミリーと相同性を有し、また NIP ファミリーは動物の水チャネルである aquaporin ファミリーと相同性がある。動物では微量のホウ酸が初期発生に必需なこと、MAP キナーゼ経路(MEK, ERK)を活性化することなどが報告されるが(Mol Cell 16:331-41, 2004)、その作用機序は明らかでない。

我々は魚類の海水適応機構を解析する過程で、シロイヌナズナ BOR1 とホモロジーを有するフグ遺伝子 *Slc4a11* の発現が腎臓において海水移行時に優位に上昇することを見出した。ヒト *SLC4A11* は角膜内皮ジストロフィーの原因遺伝子として報告されていたが(Nat Genet 38:755-7, 2006)その機能は謎に包まれていた。海水はホウ酸を含み、ホウ酸の過剰摂取は魚類にも毒性を示す。また海水産真骨魚類はエラ(NaCl)と腎臓(MgSO₄など)から過剰に摂取した塩分を排出することが知られる。そこで我々は海水魚が腎臓の *Slc4a11* を介してホウ酸を尿中に排出するという作業仮説を立て、検証を行った。

天然海水には約 0.45 mM のホウ酸が含まれる。トラフグ近縁種で淡水と海水で棲息できるメフグを解析した結果、海水で飼育したメフグ血液には海水の約 1/24 程度の僅かなホウ酸が存在する一方、膀胱尿には海水の約 40 倍ものホウ酸が含まれる事が明らかとなった。アフリカツメガエル卵母細胞を用いた活性解析の結果、メフグ *Slc4a11* やメフグ・トラフグ aquaporin (AQP) family がホウ酸輸送体(チャネル)として機能することを確認した(それぞれ投稿中、投稿準備中)。これらの結果は海水魚の腎臓がホウ酸を尿中に積極的に排出・濃縮するシステムを進化させてきたことを示している。

2. 研究の目的

メフグの解析では *Slc4a11* や AQP family がホウ酸輸送体として機能し、ホウ酸の腎排出を担う可能性が示された。哺乳動物においても *Slc4a11* や AQP family がホウ酸ホメオスタシスを維持している可能性が考えられる。そこで本研究では *Slc4a11* や AQP family の活性解析を行い、哺乳動物のホウ酸ホメオスタシスを担う分子機構の解明を試みた。ヒト *SLC4A11* は Na⁺-B(OH)₄⁻ 共輸送体として機能するという報告があるが(Mol Cell 16:331-41, 2004)その後、他のグループから再現性を示す論文は報告されていない

め、その追試も同時に試みた。

3. 研究の方法

ヒト、マウスの *SLC4A11*、AQP ファミリーの翻訳領域全長をアフリカツメガエル卵母細胞の発現ベクターに組み込んで cRNA を合成し、卵母細胞に注入して発現させた。ヒト *SLC4A11* とメフグ *Slc4a11* のキメラタンパク質の発現ベクターを構築し、同様に卵母細胞に発現させた。比較のためメフグ *Slc4a11*、メフグ AQP、アフリカツメガエル *Slc4a11* を発現させた卵母細胞も調製した。*Slc4a11* が重炭酸輸送体ファミリーに属すること、また近年ヒト *SLC4A11* の Na⁺/H⁺交換輸送活性を報告する論文があったことから、他の重炭酸輸送体(*Slc4*, *Slc26* ファミリー)や Na⁺/H⁺交換輸送体(*Slc9* ファミリー)の解析も平行して行った。

発現させたタンパク質のホウ酸輸送活性は細胞内 pH (pH_i) や膜電流・膜電位の変化として H⁺選択性微小電極及び KCl 電極により間接的に解析した。ホウ酸を含む培地で卵母細胞をインキュベートしたとき、ホウ酸イオン(B(OH)₄⁻)を透過する輸送体を発現する卵母細胞の pH_i は上昇し、同時に過分極もしくは外向き膜電流を検出する。一方、非イオン型ホウ酸(B(OH)₃)を透過する輸送体を発現する卵母細胞では培地中のホウ酸にตอบสนองして pH_i が下降するが、膜電位・膜電流の優位な変化は観察されない(図1)。

AQP の水透過性は、浸透圧を 1/2 に減じた培地中での体積の増加率として評価した。AQP のホウ酸、尿素、グリセロールの透過性は、それら基質を含む等張な培地中での体積の増加率として評価した。

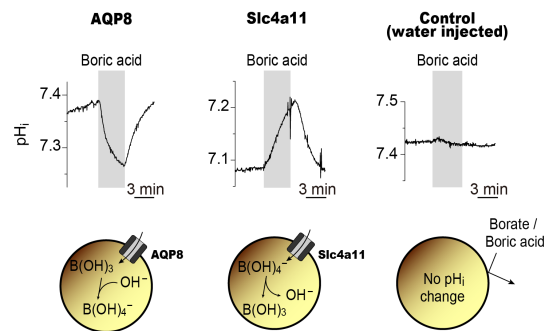


図1 *Xenopus* oocyte を用いた非イオン型ホウ酸 B(OH)₃ 及びホウ酸イオン B(OH)₄⁻ 輸送活性の検出。B(OH)₃ もしくは B(OH)₄⁻ の輸送はホウ酸培地にตอบสนองした細胞内 pH の変化として間接的に観察することができる。同時に膜電位や膜電流の変化も観察する。実際にホウ酸が輸送されていることは ICP-MS で確認する。Control 卵母細胞(右)の細胞膜はほとんどホウ酸を透過しない。

細胞膜のホウ酸透過性のより直接的な評価方法として誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)を用い、それぞれの輸送体を発現する卵母細胞に取り込まれたホウ素を定量

し、 pH_i 変化が主にホウ酸の移動によるものであることを確認した。

輸送体の HCO_3^- 輸送活性は、 HCO_3^-/CO_2 の存在下で培地中の Na^+ や Cl^- を除去したときに生じる pH_i , $[Na^+]_i$, $[Cl^-]_i$, 膜電位, 膜電流の変化として評価した。 Na^+/H^+ 交換輸送体活性は、通常培地から Na^+ を除去した時に生じる pH_i , $[Na^+]_i$ の変化として評価した。

4. 研究成果

(1) メフグ Slc4a11 の $B(OH)_4^-$ チャネル活性。メフグ Slc4a11 を発現させた卵母細胞ではホウ酸培地に応答して pH_i が上昇し、同時に正の外向き膜電流を生じた。この活性は培地の Na^+ を choline, K^+ , Li^+ などと置換しても変わらなかった。ICP-MS による細胞内ホウ素と膜電流を定量比較した結果、メフグ Slc4a11 は Na^+ に非依存的な $B(OH)_4^-$ チャネル(ユニポーター)であることが明らかとなった(投稿中)。

(2) トラフグ AQP family の $B(OH)_3$ チャネル活性。トラフグ AQP family を発現させた卵母細胞を解析したところ、AQP3, 7, 8, 9a, 9b を発現させた細胞ではホウ酸培地に応答して pH_i が下降した。膜電位の変化は観察されなかった。以上の結果からトラフグ AQP3, 7, 8, 9a, 9b は水の他に $B(OH)_3$ も輸送するチャネルとして働くことが明らかとなった(投稿準備中)。

(3) ヒト SLC4A11 の活性解析。ヒト SLC4A11 の 3 種類の splicing isoform をそれぞれ発現させた卵母細胞からはホウ酸輸送活性を示す結果は得られなかった。ヒト-メフグ Slc4a11 のキメラ体を用いた解析においても、ホウ酸輸送活性を示す結果は得られなかった。 HCO_3^- 輸送活性や Na^+/H^+ 交換輸送活性も検出できなかった。マウス及び *Xenopus* の Slc4a11 を発現させた卵母細胞からもホウ酸輸送活性を検出することはできなかった。これらの結果だけから結論を導き出すことはできないが、ヒト SLC4A11 のホウ酸輸送活性を否定す他の 4 グループによる近年の報告 (Am J Physiol 305:C716-27, 2013; Am J Physiol 308:C176-88, 2015 他) を併せて考えると、ヒト SLC4A11 は $B(OH)_4^-$ や $B(OH)_3$ を輸送しないと結論付けられた。

(4) ヒト $B(OH)_3$ チャネルの同定。トラフグ AQP family と同様の手法により、ヒト AQP family の $B(OH)_3$ チャネル活性を評価した。ヒト AQP3, 7, 8, 9, 10 が水の他に $B(OH)_3$ を輸送することを明らかにした (Physiol Rep. 10:e15164, 2022)。ヒト・マウス Slc4a11 がホウ酸輸送体として機能しない上記の結果と併せて考えると、哺乳動物のホウ酸ホメオスタシスを担う主役は AQP family であることが示唆された(図2)。

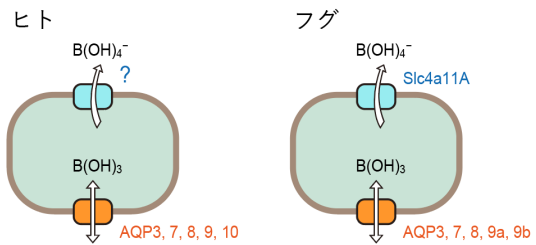


図2 ホウ酸ホメオスタシスを担う $B(OH)_4^- \cdot B(OH)_3$ チャネルの比較。フグの Slc4a11 は負の膜電位を駆動力にした $B(OH)_4^-$ 排出を可能にするため、海水中でのホウ酸排出に有利に働く。AQP family は濃度勾配に依存した $B(OH)_3$ の受動輸送を促進する。哺乳動物の排出型 $B(OH)_4^-$ チャネルは同定されていない。

(5) Na^+/NH_4^+ 交換輸送体および H^+-Cl^- 共輸送体の同定。様々な動物種に由来する Slc4, Slc9, Slc26 ファミリーの活性解析を行い、既知の HCO_3^- 輸送体や Na^+/H^+ 交換輸送体が $B(OH)_4^-$ 輸送体として機能する可能性を検証した。様々な輸送体について検討したが、いずれの実験も結果はネガティブであった。現時点でメフグ Slc4a11 以外のタンパク質から $B(OH)_4^-$ 輸送活性を検出できた例は無い。

これらの解析の過程でゼブラフィッシュ Nhe3b (Slc9a3b) が Na^+/NH_4^+ 交換輸送体として機能することを初めて見出した(図3) (Am J Physiol 306:R315-27, 2014)。またショウジョウバエの Slc9b1 が H^+-Cl^- 共輸送体として機能することを初めて見出した(図3) (PNAS 112:11720-11725, 2015)。Slc9 ファミリーによる Cl^- 輸送活性の報告例は他に無い。哺乳動物の Slc9 ファミリーにも H^+-Cl^- 共輸送活性を有するメンバーが存在する可能性が考えられる。



図3 Slc9 ファミリーの新たな活性。ゼブラフィッシュ Slc9a3b の Na^+/NH_4^+ 交換輸送活性およびショウジョウバエ Slc9b1 の H^+-Cl^- 共輸送活性。

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)

Ito Y, Kato A, Hirata T, Hirose S, Romero MF. Na^+/H^+ and Na^+/NH_4^+ activities of zebrafish NHE3b expressed in *Xenopus*

oocytes. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 査読有 Vol. 306, No. 5, 2014, pp. R315-R327.

DOI: 10.1152/ajpregu.00363.2013

Chintapalli VR, Kato A, Henderson L, Hirata T, Woods, DJ, Overend G, Davies SA, Romero MF, and Dow JAT. Transport proteins NHA1 and NHA2 are essential for survival, but have distinct transport modalities. Proc Natl Acad Sci U S A 査読有 Vol. 112, No. 37, pp. 11720-11725.

DOI: 10.1073/pnas.1508031112.

Ushio K, Watanabe E, Kamiya T, Nagashima A, Furuta T, Imaizumi G, Fujiwara T, Romero MF, Kato A. Boric acid transport activity of human aquaporins expressed in *Xenopus* oocytes. Physiol Rep. 査読有 Vol. 10, No. 1, pp. e15164.

DOI: 10.14814/phy2.15164.

〔学会発表〕(計 5 件)

加藤 明, 平田 拓, 伊藤 雄介, 広瀬 茂久, アフリカツメガエル卵母細胞を用いた $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ 交換輸送体の活性測定, 第 9 回 トランスポーター研究会年会, 2014 年 6 月 14 日~2014 年 6 月 15 日, 名古屋市立大学大学院薬学研究科(愛知県名古屋市)

加藤 明, 木村 友梨, 栗田 志広, Min-Hwang Chang, 笠井 光治, 藤原 徹, 平田 拓, 土井 啓行, Michael F. Romero, 広瀬 茂久, 排出型ホウ酸イオンチャネルの同定, 第 17 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会, 2013 年 11 月 22 日~2013 年 11 月 23 日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)

Kato A, Kimura Y, Hayashi N, Kurita Y, Chang MH, Kasai K, Fujiwara T, Hirata T, Islam Z, Doi H, Romero MF, Hirose S. Transporters maintaining the delicate balance between necessity and toxicity of boric acid/borate. Biomedical Transporters 2013. 2013 年 8 月 12 日, St. Moritz, Switzerland (招待公演)

加藤 明, メフグの淡水・海水適応を担うイオン輸送体の解析, 東京大学大気海洋研究所共同利用研究集会, 2013 年 6 月 21 日, 東京大学大気海洋研究所(千葉県柏市)(招待公演)

Kato A, Kimura Y, Kurita Y, Chang MH, Kasai K, Fujiwara T, Hirata T, Doi H, Hirose S, Romero MF. Pufferfish Slc4a11 functions as a borate channel for borate secretion. Experimental Biology 2013. 2013 年 4 月 22 日, Boston, USA

〔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〕

ホームページ等

<http://kato.bio.titech.ac.jp/>

<http://researchmap.jp/read0069354/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

加藤 明 (KATO, Akira)

東京工業大学・生命理工学研究科・助教

研究者番号: 40311336

(2)連携研究者

藤原 徹 (FUJIWARA, Toru)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号: 80242163