

助成番号 9948

上皮性ナトリウムチャンネル(ENaC)の細胞内フィードバック調節機構

助成研究者：石川 透(北海道大学 大学院獣医学研究科)

共同研究者：Daniela Rotin(トロント小児病院研究所 細胞生物学部門)

α 、 β 、 γ の3つのサブユニットからなる上皮性ナトリウムチャンネル(ENaC)は腎臓、肺、大腸などの上皮細胞管腔側膜に存在し、体内の電解質バランスや血圧などの調節に重要な役割を果たしている。ENaC活性はアルドステロンやバゾプレッシンなどのホルモンだけでなく、細胞内 Na^+ を含む様々な細胞内因子により調節されることが知られている。特にこれらの細胞内因子のなかで細胞内 Na^+ によるENaC機能調節は、ENaCを介する細胞内への過剰な Na^+ の負荷を防ぐ重要なフィードバック調節機構であると考えられているが、その分子機構の詳細については未だわかっていない。本研究では特に細胞内 Na^+ によるENaCフィードバック調節における γ サブユニットC端の役割を調べることを目的とした。クローン化ラット ENaC(rENaC)の γ サブユニットのR575以降のアミノ酸を欠如させた変異体を野性型 α および β サブユニットとともにMDCK細胞($\alpha\beta\gamma$ Liddle-MDCK)に安定型強制発現させ、それらにパッチクランプ法を適用し実験を行った。 $\alpha\beta\gamma$ Liddle-MDCK細胞にホールセルパッチクランプ法を適用することにより、細胞膜にアミロライド感受性 Na^+ コンダクタンスが機能発現し、そのイオン選択性は $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ \gg \text{K}^+ = \text{N-methyl-D-glucamine}^+ (\text{NMDG}^+)$ であることが示された。さらにInside-out patchを用いた単一チャンネル電流測定実験により、 Li^+ が透過イオンであるときの単一チャンネルコンダクタンスは約9pSであることが示された。これら $\alpha\beta\gamma$ Liddle-rENaCの電気生理学的性質は $\alpha\beta\gamma$ -rENaCの性質と同じであった。次にInside-out patchを用いて細胞内 Na^+ 濃度によるチャンネル活性調節が $\alpha\beta\gamma$ -rENaCおよび $\alpha\beta\gamma$ Liddle-rENaCで違いがあるか否かを調べた。その結果、細胞内 Na^+ 濃度を0mMから25mM以上に増加させると $\alpha\beta\gamma$ -rENaCのチャンネル活性は抑制されるが、 $\alpha\beta\gamma$ Liddle-rENaCのチャンネル活性は細胞内 Na^+ 濃度を0mMから150mMに増加させても変化しないことが示された。これらの結果は細胞内 Na^+ 濃度によるENaCのフィードバック調節機構に γ サブユニットC端が重要な役割を果たしている可能性を強く示唆する。

助成番号 9948

上皮性ナトリウムチャンネル(ENaC)の細胞内フィードバック調節機構

助成研究者：石川 透 (北海道大学大学院獣医学研究科)

共同研究者：Daniela Rotin (トロント小児病院研究所 細胞生物学部門)

1. 研究目的

上皮性ナトリウムチャンネル (ENaC) は腎臓、大腸、肺および唾液腺などの上皮細胞管腔側膜に存在するイオンチャンネル蛋白で、その活性は上皮細胞管腔側から血管側への一方向性ナトリウムイオン輸送機構の律速段階として働いており、生体内における電解質バランスの調節に重要な役割を果たしている。ENaC活性はアルドステロンなどのホルモンにより調節されているだけでなく、ENaCを介する細胞内へのナトリウムイオン(Na^+)流入またはそれによって2次的に引き起こされる細胞内因子の変化により調節されることが知られている。この後者の機構はENaC活性のネガティブフィードバック調節と考えられ、特に細胞内への過剰な Na^+ 負荷を防ぐという意味で非常に生理学および病態生理学的に重要な細胞内調節機構である。このENaCフィードバック調節に役割を果たしている細胞内因子として細胞内 Na^+ 濃度、 Ca^{2+} 濃度、pH膜電位などが考えられているが、その詳細な分子機構はいまだ解明されていない (Garty, H. and L.G. Palmer, 1997)。

1994年にはじめてENaCがラット大腸からクローニングされて以来、ヒトを含他の生物種におけるENaC分子の一次構造が明らかになり、分子生物学的手法を用いたENaCの構造と機能に関する研究が可能になった (Canessa, C.M et al., 1994)。ENaC分子はアミノ酸配列の相同性が高い α 、 β 、 γ 3つのサブユニットから構成され、各サブユニットは長い細胞外領域とN端、C端に存在する短い細胞内領域からなる二回膜貫通型蛋白であることが知られており、このENaC細胞内領域部位が様々な細胞内調節機構に関与していることは明らかである。また、ENaC分子の細胞内領域をコードする遺伝子変異がヒトで見られる高血症などの様々な疾病 (Liddle氏症候群や仮性低アルドステロン症など) に関与しているという発見によりさらにENaC細胞内領域を介するチャンネル蛋白調節機構解明の重要性が明らかになってきている (Schimkets, R.A et al, 1994)。

申請者はこれまでにクローン化ラットENaC(rENaC)を哺乳類腎由来上皮細胞であるMDCK細胞に遺伝子挿入法を用いて作製したrENaC分子発現細胞を用いて、世界に駆けその電気生理学的性質および膜電位、細胞内 Na^+ および Ca^{2+} 濃度変化によるrENaCフィードバック調節について直接証拠を報告してきている (Ishikawa et al., J.Gen.Physiol.1998)。現在までクローン化ENaC分子構造とその機能に関する研究結果がアフリカツメガエル卵母細胞発現系などの非上皮細胞系で得られたものであることを考えると、MDCK細胞での研究成果は生理学的に重要な意味をもつだけでなく、ENaCの膜電位、細胞内 Na^+ および Ca^{2+} 濃度変化によるフィードバック調節の詳細な分子機構解明に大きな役割を果たす可能性がある。

そこで本研究は前記のLiddle氏症候群患者に見られるENaC蛋白構造変異とENaC機能亢

進という関係にヒントを得て、特に細胞内Na⁺濃度によるENaCのフィードバック調節機構解明を主目的とした。Liddle氏症候群患者に見られる遺伝子変異はβまたはγサブユニットのC端に限局し、そのC端にあるプロリン-チロシンモチーフ (PYモチーフ) の構造の変化をもたらす。この構造変化は細胞膜上のチャネル数およびチャネル開閉率の増加によるチャネル機能亢進を引き起こし、ENaCを介する上皮細胞へのNa流入を増大させると考えられている。しかし、野性型ENaCが細胞内Na⁺濃度上昇や膜の脱分極によって抑制される事を考慮すると、このようなチャネル活性亢進の維持はフィードバック抑制がある限り非常に難しいと考えざるおえない。それにもかかわらずLiddle氏症候群表現型では持続的なENaC機能亢進が認められることから、申請者はLiddle症候群患者に見られるβまたはγサブユニットの構造変異領域が細胞内Na⁺濃度によるフィードバック調節機構に重要な役割を果たしているという作業仮説をもっている。そこで本研究は細胞内Na⁺濃度によるフィードバック調節機構に関する上記作業仮説を検証した。本研究結果はENaCのγサブユニットC端が細胞内ナトリウムによるフィードバック調節機構に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

2. 研究方法

rENaC発現細胞

野性型MDCK細胞にラットENaCのαβγサブユニットを遺伝子挿入法を用いて安定型発現させた細胞(αβγrENaC-MDCK)を対照実験に用いた。αサブユニットは糖質コルチコイド誘発性プロモーターを含む発現ベクターに、βおよびγサブユニットはcytomegalo virusプロモーターをもつ発現ベクターにサブクローニングした。Liddle症候群の一つの表現型を模倣する(γサブユニットC端(R576以降)を欠落させた変異体)γサブユニット変異体をコードするcDNAを作製し、それをαおよびβrENaCを安定発現するMDCK細胞に安定型発現させて作製した細胞(αβγLiddle-rENaC-MDCK)を実験に用いた。これらの細胞におけるrENaC蛋白発現は免疫沈降法およびウエスタンブロットニングにより確認した。これらのrENaC発現細胞はDMEM培地にFBS(10%), Penicillin(100U/ml), Streptomycin(100μg/ml), G418(300μg/ml), amiloride(10μM)を加え、37C、5%CO₂で培養した。αβγLiddle-rENaC-MDCK培養液にはpuromycin(7μg/ml)を加えた。

パッチクランプ実験のために、上記細胞をカバーガラス上に培養し、2-4日後に実験に使用した。実験の前日に培養液中にDexamethasone(1μM)およびNa-butyrate(2mM)を加え、チャネル蛋白発現を促進させた。

パッチクランプ法による機能解析

カバーガラス上に培養した細胞を標準細胞外液でリンスしたあと倒立顕微鏡にセットした灌流チャンバーに装着した。上記MDCK細胞からの膜電流測定にはHamillらのパッチクランプ法(1981)により測定した。パッチピペットはガラス管(Dagan, MN)から作製し、電極抵抗はピペット内液に標準Cs-glutamate溶液を充填した場合には約2メガオームであった。ホールセル電流および単一チャネル電流測定にはAxopatch-1Dパッチクランプアンプ(Axon Instruments, CA)により測定した。pClamp6ソフトウェアおよびDigidata1200

を用いてパルスプロトコールを制御し、その応答電流データをコンピュータのハードディスクに取り込んだ。単一チャンネル電流はinside-out patch法により行なった。ホールセルパッチクランプ実験に用いたピペット内液には以下の組成のものを用いた。ピペット内液 (pH7.4) (mM) : Cs-glutamate (120), CsCl (10), MgCl₂ (1), HEPES (10), EGTA (10)。細胞外液はNaCl (140), KCl (4.3), MgCl₂ (1), HEPES (10) (pH7.4) の組成をもち、ホールセルモードになった時点で以下の組成の細胞外液に置換した。Na-またはLi-glutamate (145), MgCl₂ (1), HEPES (10) (pH 7.4)。Inside-out patch法による実験のピペット内液には以下の組成のものを使用した。Li-glutamate (145), CsCl (10), MgCl₂ (1), HEPES (10), EGTA (0 or 10mM) (pH 7.4)。Inside-out patch法における細胞内液に相等するバス灌流液はNMDG-glutamate (145), MgCl₂ (1), HEPES (10), EGTA (1)を用い、種々のNa⁺濃度をもつ溶液は等モルのNMDG⁺で置換して作製した。全ての実験は室温 (約20°C) で行なった。

3. 研究結果

MDCK細胞に安定型強制発現させたLiddle氏症候群を模倣するENaC分子の電気生理学的性質

野性型MDCK細胞の細胞膜には種々のKおよびClチャンネルが存在している (Lang *et al.*, 1990)。そこで遺伝子挿入法により発現させた上皮性Na⁺チャンネル ($\alpha\beta\gamma$ rENaC)および変異体 $\alpha\beta\gamma$ liddle-rENaC機能による膜電流をできるだけ純粋に抽出するために、ピペット内液にCs-glutamateを基本とした溶液を、細胞外液には陰イオンとしてglutamateを基本とした溶液を用いることにより、K⁺およびCl⁻電流を最小限に抑えた。図1は細胞外液にNa-glutamateを基本とした溶液を細胞液に用いた時の $\alpha\beta\gamma$ liddle-rENaC-MDCK細胞におけるホールセル電流測定実験の一例を示している。保持電位は40mVとして400ms間-140mVから90mVまで膜電位を10mVずつ変化させたときのホールセル電流を示している。膜電位固定はランププロトコール (-100mVから+40mV) を用いた。図1Aから明らかのようにこのランプ刺激に応答して観察された内向き電流は10 μ Mamilorideを細胞外に投与することにより抑制され、amilorideを細胞外液から除くと内向き電流がもとのレベルに完全に戻った。さらに同一細胞を用いて、細胞外液中のNa⁺をLi⁺に置換すると、内向きホールセル電流は増加した。さらにLi⁺置換後の内向き電流は10 μ Mamilorideを投与により可逆的に抑制された (図1B)。

次にK⁺およびNMDG⁺などのイオン選択性を調べるために、細胞外液にK-glutamateおよびNMDG-glutamateを基本とした溶液を用いて同様に実験を行なった。図2に図1で用いた同一の $\alpha\beta\gamma$ Liddle-rENaC-MDCK細胞から得られた結果を示す。保持電位は+40mV、400ms間 -140mVから+90mVまで膜電位を10mVずつ変化させた。内向き電流のコンダクタンスからイオン透過性順位はLi⁺ > Na⁺ >> K⁺= NMDG⁺であった。これらの結果より、MDCK細胞に発現させた $\alpha\beta\gamma$ Liddle-rENaC蛋白はアミロライド感受性およびイオン選択性ともに野性型チャンネルと同様な性質をもつことが示された。しかし、 $\alpha\beta\gamma$ -rENaCで観察される膜過分極パルスに応答する電流の活性(Ishikawa *et al.*, J.Gen.Physiol.

1998)は $\alpha\beta\gamma$ Liddle-rENaCでは認められなかった。

次に単一チャネル測定法を用いて $\alpha\beta\gamma$ Liddle-rENaC蛋白の単一チャネルコンダクタンスを野性型rENaC蛋白のものと比較した。図3にその例を示す。ピペット内液にLi-glutamateに富む溶液、細胞内液に相当するバス溶液にはNMDG-glutamateに富む溶液を用いてinside-patch法を用いて実験を行なった。図に示すように $\alpha\beta\gamma$ Liddle-rENaCは非常にゆっくりしたキネテイクスの開閉パターンを示し、その開口確立は1に近いものであった。またLi⁺を透過イオンとしたときの単一チャネルコンダクタンスは9pSであり $\alpha\beta\gamma$ -rENaCのものと変化がみられなかった。

細胞内Na⁺濃度上昇によるENaCのフィードバック調節

これまでにクローン化ラットENaC(rENaC)をMDCK細胞に遺伝子挿入法により作製したrENaC分子発現細胞を用いて、細胞内Na⁺濃度変化によるrENaCフィードバック調節について直接証拠を報告してきている(Ishikawa *et al.*, J.Gen.Physiol.1998)。図4Aに野性型rENaCを発現する $\alpha\beta\gamma$ -rENaC-MDCK細胞からinside-patchを作製後、細胞内ナトリウム濃度を0から25mMに上昇させた時のチャネル活性の変化を示す。この図で明らかのように細胞内ナトリウム上昇に応答し、そのチャネル活性は可逆的に抑制されることがわかる。一方、 $\alpha\beta\gamma$ Liddle-rENaCを発現するMDCKからinside-patchを作製し同様の実験を行なったが、図4に示すように細胞内ナトリウム濃度を0から50mMに増加させても全く影響が見られなかった。図5にチャネル活性に対する異なる細胞内ナトリウム濃度の効果をまとめた。図から明らかなように、 $\alpha\beta\gamma$ Liddle-rENaCは細胞内ナトリウム濃度を150mMに増加させてもチャネル活性に対する影響は認められなかった。

4.考察

本研究結果から $\alpha\beta\gamma$ Liddle-rENaCをMDCK細胞に発現させたとき、イオン選択性、アミロライド感受性、単一チャネルなどの電気生理学的性質は野性型 $\alpha\beta\gamma$ -rENaCをMDCK細胞を発現させた時に観察されるものと比べ変化は認められなかった。しかし、 $\alpha\beta\gamma$ Liddle-rENaCでは $\alpha\beta\gamma$ -rENaCで認められる細胞ナトリウム濃度変化によるチャネル活性調節が認められなかったことから、 γ サブユニットC端 (R576以降)が細胞内Na⁺によるチャネル活性のフィードバック調節に重要な役割を担っている可能性が示唆された。しかし、今回の実験では γ サブユニットC端のどの領域が細胞内Na⁺によるENaC機能調節機構に重要な役割を果たしているかはわからない。現在までの研究で γ サブユニットのC端には細胞内蛋白Nedd4の結合に重要なPYモチーフが存在しており、Nedd4とENaCの結合が細胞内Na⁺による調節機構に重要であるか否かについては今回の実験ではわからない (Staub.O.*et al.*, 1996)。

5.今後の課題

本研究結果により、少なくとも γ サブユニットC端が細胞内Na⁺濃度上昇によるrENaC活性のフィードバック抑制に重要な役割を果たす可能性が示唆された。今後さらに γ サブユニットC端の細胞内Na⁺濃度感受部位を特定するために、さらなる変異体をコードするcDNAを作製し、本実験と同様な解析を行なう必要がある。今回の研究により通常用い

られているアフリカツメガエル卵母細胞発現系や非上皮細胞発現系とは全く異なる哺乳類上皮細胞を用いたENaC発現システムの確立を行なった。今後さらにENaCの構造機能協関のみならず上皮細胞管腔側膜へのターゲティングなどENaCの細胞生物学的研究が期待できる。

6. 文献

- Canessa, C.M., L. Schild, G. Buell, B. Thorens, I. Gautxhi, J.-D. Horisberger, and B.C. Rossier. 1994. Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature*. 367:463-467.
- Garty, H. and L.G. Palmer. 1997. Epithelial sodium channel channels: function, structure, and regulation. *Physiol. Rev.* 77:359-396
- Hamill, O.P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F.S. Sigworth. 1981. Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391:85-100.
- Schimkets, R.A., D.G. Warnock, C.M. Bositis, C. Nelson-Williams, J.H. Hansson, M. Schambelan, J.R. Gill, S. Ulick, R.V. Milora, J.W. Findling, et al. 1994. Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell*. 79:407-414.
- Staub.O., S. Dho, P.C. Henry, J. Correa, T. Ishikawa, J. McGlade, and D. Rotin. 1996. WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome. *EMBO. J.* 16:6325-6336.

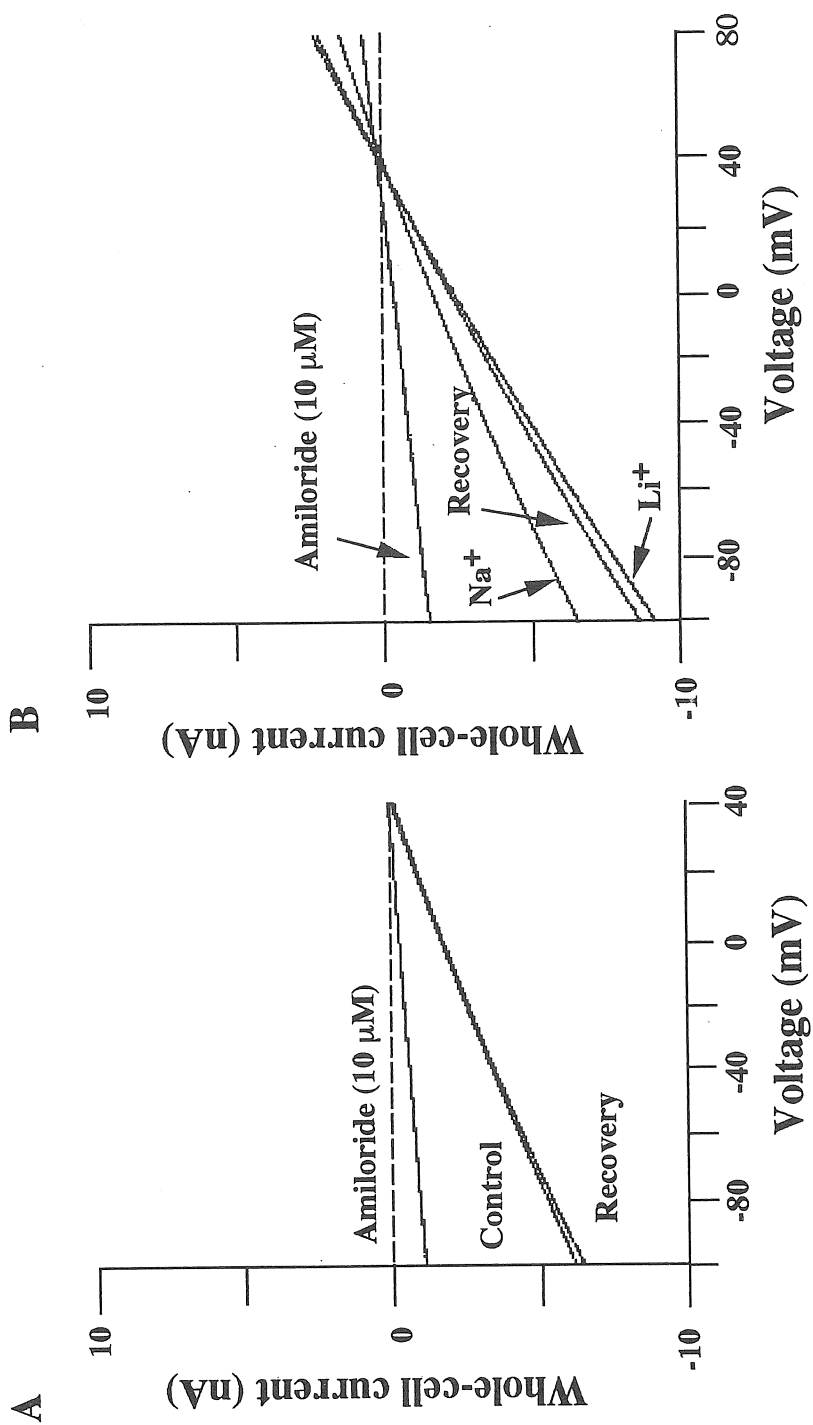


Figure 1. (A). Amiloride-sensitive whole-cell current in $\alpha\beta\gamma$ Liddle MDCK cells. Ramp command voltages were applied from -90 mV to +40mV. (B) Effect of replacement of 150 mM Na⁺ with an equimolar Li⁺ in the bathing solution. Ramp command voltages were applied from -90 mV to +80mV. Data were obtained from the same cell shown in (A).

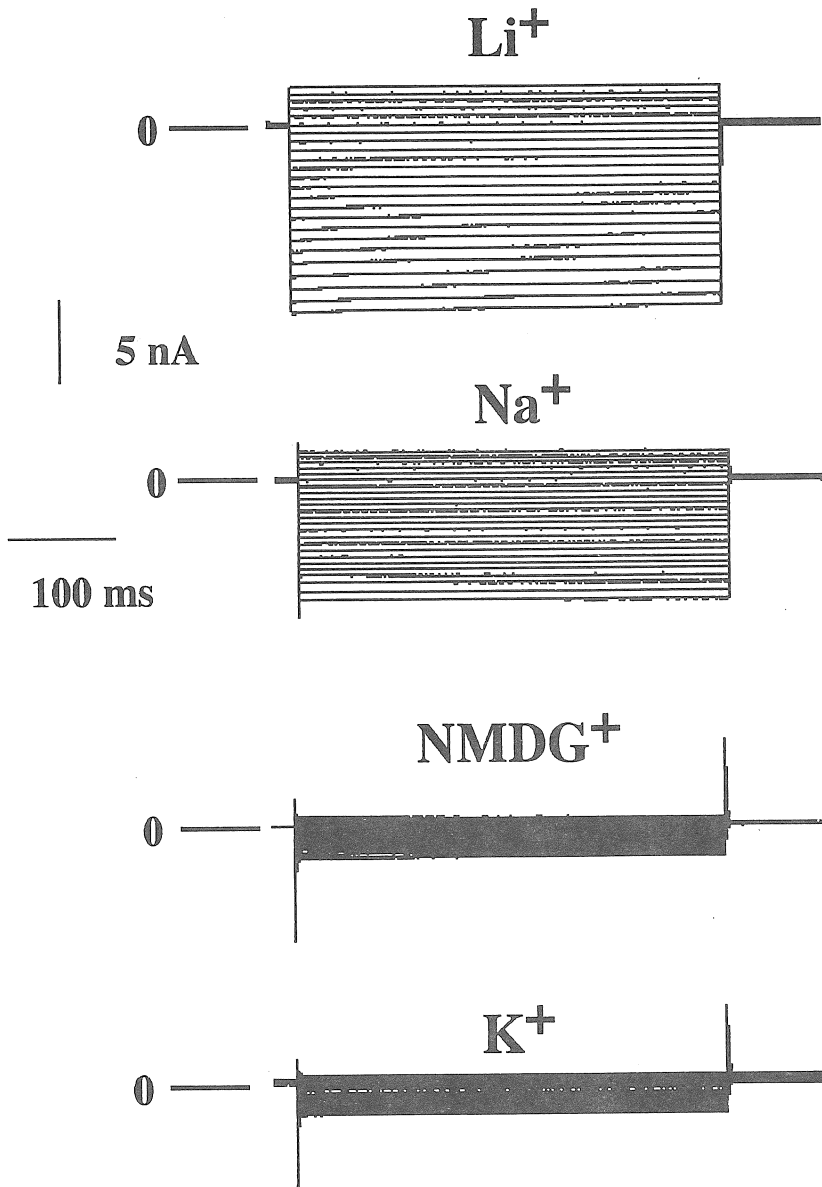


Figure 2. Representative tracings of whole-cell currents recorded from $\alpha\beta\gamma$ Liddle rENaC-expressing MDCKs in the presence of Li^+ , Na^+ , NMDG^+ or K^+ in the bathing solution.

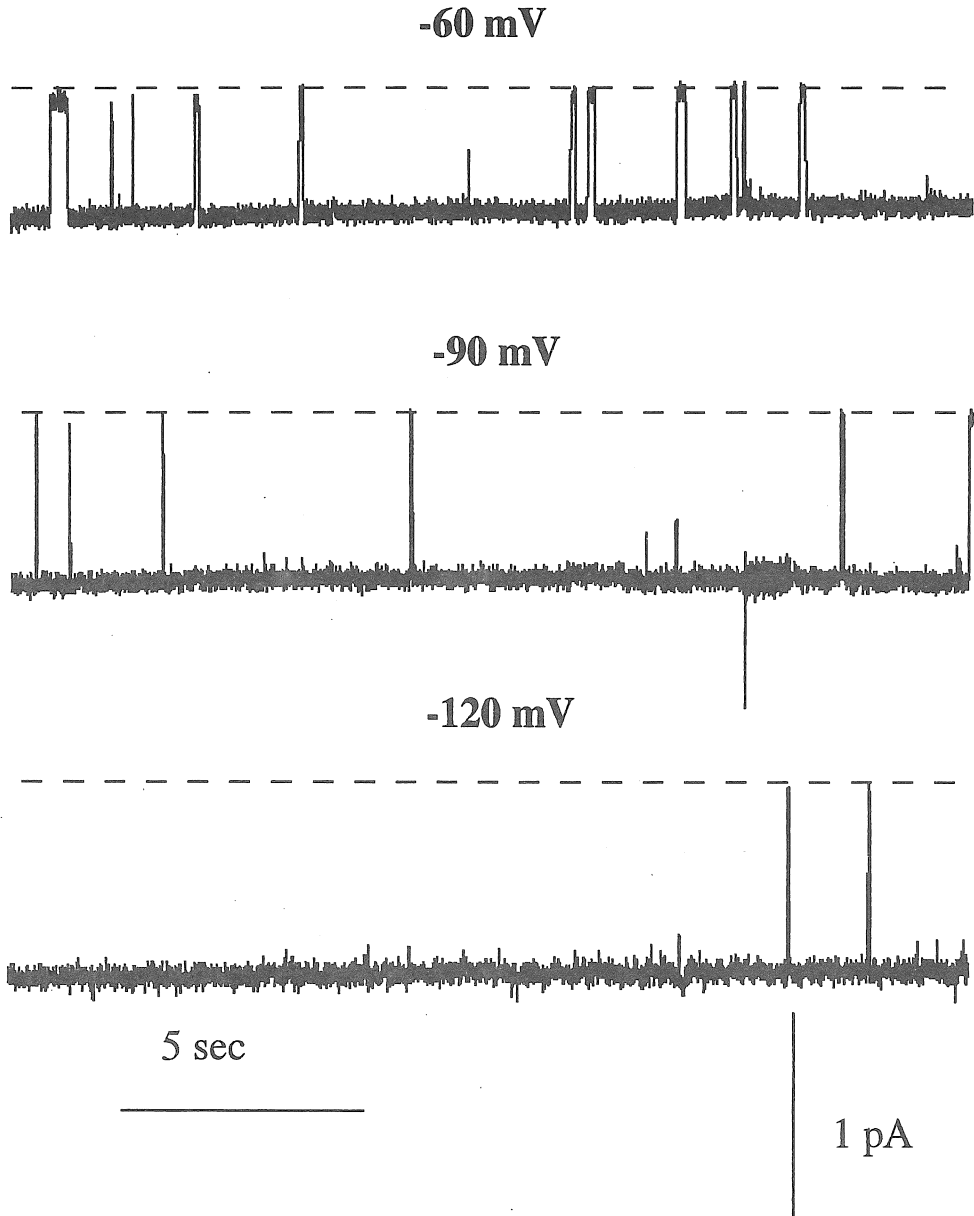


Figure 3. Single channel activity in an inside-out patch obtained from $\alpha\beta$ liddle MDCK cells. Representative tracings of a single channel inward current at various membrane potentials. The pipette was filled with a Li-glutamate-rich solution, and the bath contained a NMDG-glutamate-rich solution.

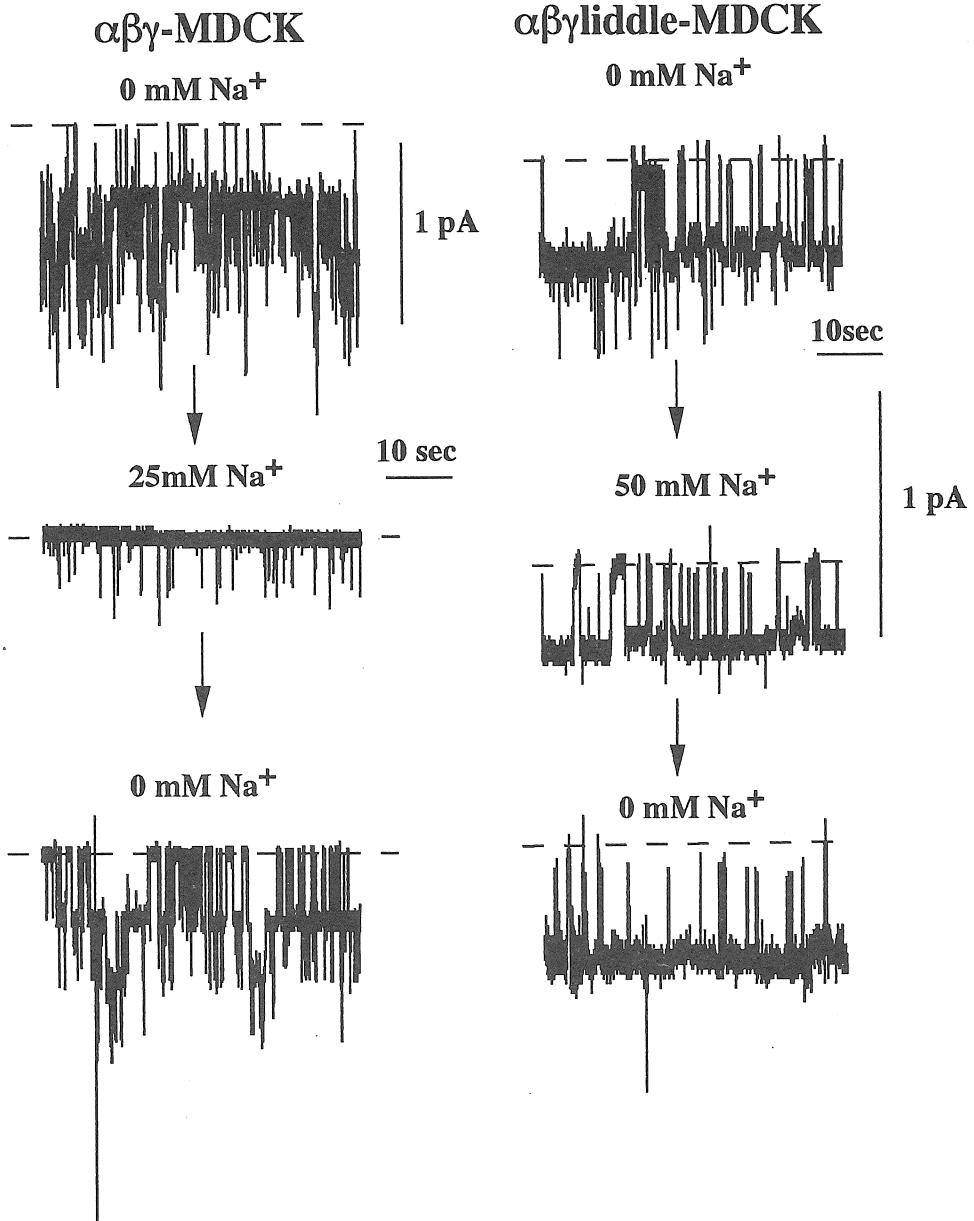


Figure 4. Effect of cytosolic Na^+ concentration on single channel activity. Representative tracings in an excised inside-out patch obtained from $\alpha\beta\gamma$ - (Left) or $\alpha\beta\gamma$ Liddle (Right)-MDCK cells. Holding potential was -30 mV. The pipette was filled with a Li-glutamate-rich solution.

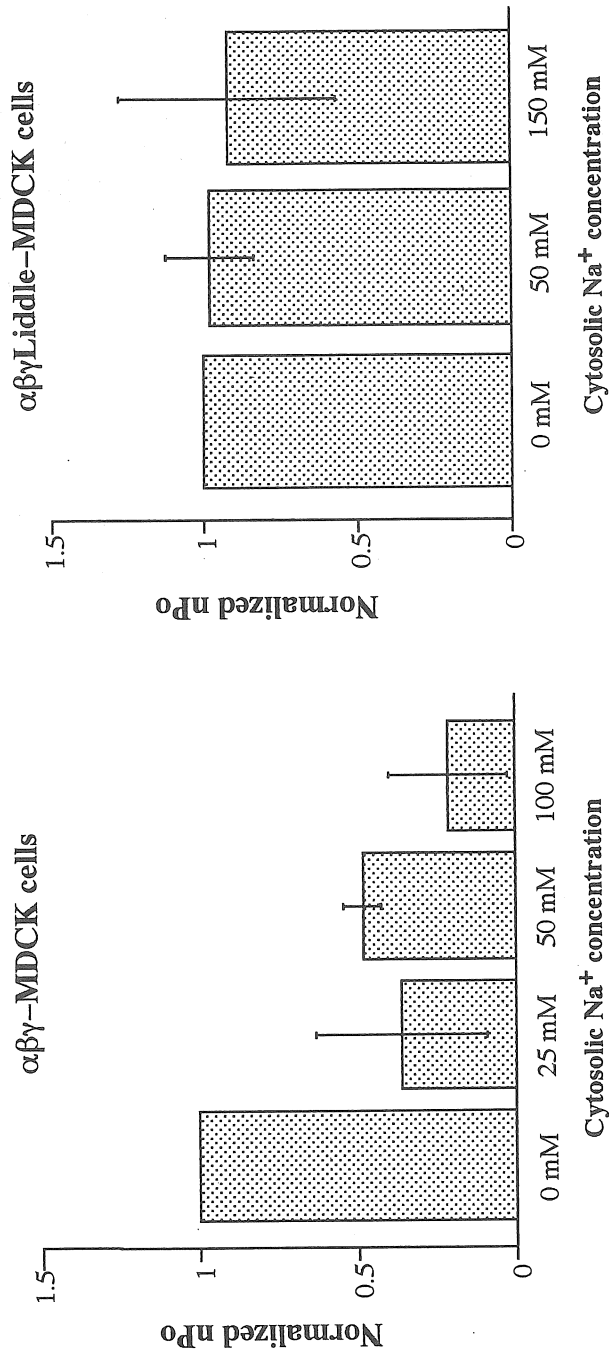


Figure 5. Summary of the effect of cytosolic Na⁺ concentration on single channel activity. The nPo value was normalized to 1 with 0 mM Na⁺. Data are the mean \pm SEM of three to nine experiments.

Feedback Regulation of Epithelial Na⁺ Channel (ENaC)

Toru Ishikawa and Daniela Rotin

Department of Biomedical Sciences, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan and Program of Cell Biology, Research Institute, The Hospital for Sick Children, Toronto, Canada

Summary

The epithelial Na⁺ channel (ENaC), composed of three subunits (α , β , and γ), is expressed in several epithelia and plays a critical role in salt and water balance and in the regulation of blood pressure. The activity of ENaC is tightly regulated not only by various hormones such as aldosterone and vasopressin, but also by intracellular factors such as Na⁺. A mechanism by which the activity of ENaC is regulated in native Na⁺ transport epithelia is called the ‘feedback inhibition’, which is defined as channel downregulation due to the transport of Na⁺ across the apical membrane and its accumulation intracellularly. However, molecular mechanisms of the feedback inhibition are not yet fully understood. The aim of the present study was to assess the role of C-terminus of γ subunit of rat ENaC (rENaC) in the “feedback inhibition” of ENaC activity by cytosolic Na⁺ concentration. Using the patch-clamp techniques, we have now examined the effect of deletion of amino acid residues at C-terminus of γ subunit (R576stop: γ Liddle) on the feedback inhibition. Under conventional whole-cell patch clamp configuration, $\alpha\beta\gamma$ Liddle rENaC-expressing MDCK cells exhibited Na⁺ conductance reversibly inhibited by 10 μ M amiloride applied extracellularly. Ion selectivity sequence of the Na⁺ conductance was Li⁺ > Na⁺ >> K⁺ = N-methyl-D-glucamine⁺ (NMDG⁺). Using excised inside-out patches, single channel conductance, likely responsible for the macroscopic Na⁺ channel current, was found to be 9 pS when Li⁺ was used as a charge carrier. Therefore, these biophysical properties of both macroscopic and microscopic currents of $\alpha\beta\gamma$ Liddle rENaC was similar to those of $\alpha\beta\gamma$ ENaC expressed in MDCK cells. In inside-out patches obtained from MDCK cells expressing $\alpha\beta\gamma$ ENaC, the channel activity (nPo), defined as a product of the number of active channel (n) and open probability (Po), was decreased when cytosolic Na⁺ concentration was increased from 0 to 25 mM. In $\alpha\beta\gamma$ Liddle rENaC-expressing MDCK cells, however, nPo was not affected even when cytosolic Na⁺ concentration was increased from 0 to 150 mM in inside-out patches. These results provide evidence for the role of C-terminus of γ subunit of rENaC in the “feedback inhibition” by cytosolic Na⁺.