

助成番号 9950

腎ネフロンセグメント発現遺伝子データベース情報を応用した腎臓における
塩排泄・再吸収の分子機構の検討

助成研究者：竹中 優 (大阪大学大学院医学系研究科 病態情報内科学)

共同研究者：今井 圓裕 (大阪大学大学院医学系研究科 病態情報内科学)

大久保 公策(大阪大学 細胞生体工学センター)

マウス腎ネフロンセグメント(近位尿細管および髓質集合管)を実体顕微鏡下マイクロダイセクション法により回収しcDNAを構築後、DNA配列を数千クローンにつき決定し発現遺伝子情報データベースを構築している。髓質集合管(IMCD)において最も発現量の多い遺伝子は α B-crystallinであることが明らかとなっている。本遺伝子産物はsmall stress proteinのファミリー蛋白であり脊椎動物では眼球レンズの主な構成蛋白として知られている。我々は3日間脱水マウスにおいて同遺伝子のmRNA発現が有為に増加する事、また同mRNA発現誘導はNaCl負荷では認めないことを見だし報告した。さらにIMCDにおけるデータ解析から多数の遺伝子を少量ずつ発現している事が明らかとなった。これは、他臓器における同様のデータと比しても髓質集合管に特徴的であり、生理的に高浸透圧環境にさらされる同部位における遺伝子発現の。また、これらの遺伝子発現情報を他臓器の同様のデータと比較することによりコンピューター上でサブトラクションが可能である。本操作により見いだされたIMCD特異的な遺伝子群の解析から腎臓特異的なglutathione-S-transferase class thetaファミリーに属する新規遺伝子を同定した。また、近位尿細管腔および腎皮質においてはangiotensinogen、angiotensin(Ang) IおよびIIの濃度が血清中より10~1000倍高値である事が知られているが、その由来は十分に明らかではない。我々は近位尿細管特異的かつ発現量の多いGS4001遺伝子がaspartic proteinaseファミリーであることを報告している。本遺伝子はリーダー配列をコードする蛋白質のN末端に持っており、分泌蛋白と想定された。そこで、近位尿細管腔および腎皮質における本遺伝子の機能の少なくとも1つはangiotensinogenの切断(renin様活性)である事を作業仮説として検討した。tagを付けたGS4001cDNAを培養細胞に導入し、上清培養液中にGS4001蛋白を証明し分泌されうる事を*in vitro*において確認した。GS4001遺伝子導入後、3日目の培養上清中にangiotensinogenをangiotensin Iに転換するrenin様の活性を同定し、本遺伝子が近位尿細管上皮細胞から分泌されangiotensinogenを切断する活性を有する可能性を示した。

本遺伝子情報を応用してネフロン・セグメント特異的に発現する遺伝子群を解析することにより新しい機能を見だし得る事が明らかとなった。

助成番号 9950

腎ネフロンセグメント発現遺伝子データベース情報を応用した腎臓における
塩排泄・再吸収の分子機構の検討

助成研究者：竹中 優 (大阪大学大学院医学系研究科 病態情報内科学)

共同研究者：今井 圓裕 (大阪大学大学院医学系研究科 病態情報内科学)

大久保 公策 (大阪大学 細胞生体工学センター)

1. 研究目的

腎臓は生体内の内部環境を維持するのに重要な働きをしている。様々な生理的条件下に反応してNaClをはじめ多くの溶質と水を排泄あるいは吸収する。人の腎臓は約100万のネフロンより構成されている。各ネフロンは機能の違いにより、いくつかのセグメントに分けられ、それぞれのネフロンセグメントは各々、特異的な機能を有しながら腎臓全体として適切に働いている。このような腎臓のユニークな機能は各ネフロンセグメントに発現する遺伝子群の発現・調節により、もたらされていると考えられる。本研究において我々は1) 腎臓の各ネフロンセグメントに発現している遺伝子群のデータベースを構築すること、2) 他の組織において構築された同様の遺伝子データベース情報と比較することにより、各ネフロンセグメント特異的な遺伝子を同定・解析すること、3) 組織標本よりレーザーを用い腎微細構造を単離し、mRNA発現量を追跡・検討することにより腎臓におけるNaClをはじめとする溶質の排泄あるいは吸収の機構を明らかにすることを目的としている。

2. 研究方法

大阪大学細胞生体工学センターの大久保らが、各組織・細胞からcDNAを合成後、直接プラスミドベクターにクローニングシランダムにピックアップした1000もしくは2000クローンのDNA配列を同定、当該組織における遺伝子発現をデータベース化する方法を開発した。我々はマウス及び人の種々の臓器、細胞における発現遺伝子の種類及び発現頻度の情報データベースを構築しつつあり、既に一万を超える発現遺伝子情報を保持している。これらのデータベース情報を用い、各ネフロン・セグメントより得られたcDNA配列を、コンピューター上で他の臓器と比較することにより簡便にサブトラクションを行い組織特異的に発現している遺伝子群を同定することが可能である。我々はマイクロダイセクション法により実体顕微鏡下でマウス腎近位尿細管(PT)および髓質集合管(IMCD)をそれぞれ約18cmと約20cm集め、本法により既にPTおよびIMCD発現遺伝子データベースを構築した。それぞれPTでは646種類、IMCDでは1600種類以上の遺伝子発現を確認している。他臓器の同様のデータベースと比較しコンピューターサブトラクションを行いそれぞれのネフロ

ンセグメントに多く発現している遺伝子群を複数見出した。現在までに近位尿細管特異的なレニン類似のプロテアーゼや未知の遺伝子を同定し、更に腸管で主に発現しcGMPを介して腎でのNaClの排泄を調節していると考えられているウログアニリンが腎近位尿細管で発現し脱水により遺伝子の誘導が認められることを確認した。また、低分子量ストレス蛋白質ファミリーの一員である α BクリスタリンがIMCDにおいて最も発現量の多い遺伝子であることを見出している。種々の生理的な条件の変化に際して我々の同定した遺伝子群の発現変化・その活性を検討・解析する。

3. 研究結果

3.1 マウス正常腎髄質集合管発現遺伝子データベースの構築と解析

マウス正常腎髄質集合管発現遺伝子データベースを構築し、2000クローンの解析から1613種類の遺伝子発現を確認した。最も発現量の多い遺伝子は α B-crystallinであった。本遺伝子産物はsmall stress proteinのファミリー蛋白であり脊椎動物では眼球レンズの主な構成蛋白として知られている。ポリクローナル抗体を用いた検討ではヘンレループと集合管での発現が報告されている。我々は3日間脱水マウスにおいて同遺伝子のmRNA発現が有為に増加する事、また同mRNA発現誘導はNaCl負荷では認めないことを見だし報告した (Fig. 1および2)。また、コンピューターサブトラクションによりマウス正常腎髄質集合管発現遺伝子データベース上、優位に発現するクローンGS5219を認めた。ノーザン解析の結果をFig.3に示すが主に腎臓に発現を認める(1)。

3.1.1 GS5219のクローニングと解析

GS5219cDNAの全長クローニングを行いDNA配列を同定した。GS5219は分子量約27.4kdと推定される241アミノ酸をコードする蛋白であった。相同性解析の結果、本遺伝子産物はglutathione-S-transferase class thetaファミリーに属する腎臓にpredominantに発現している新規遺伝子であることが明らかとなった (Fig. 4および5) (1)。

3.2 近位尿細管特異的遺伝子GS4001の解析

本遺伝子は前年度の今井らに対する本助成による検討から近位尿細管特異的なレニン類似のaspartic proteinase 遺伝子ファミリーであることが明らかとなっている(2)。近位尿細管腔および腎皮質においてはangiotensinogen、angiotensin (Ang) IとIIの濃度が血清中より10～1000倍高値である事が知られているが(3)、その由来は十分に明らかではない。GS4001遺伝子の全長をクローニングした結果、リーダー配列をもち分泌される蛋白であると考えられた。そこで、我々は本遺伝子産物が腎臓内におけるAng生成に関わっている可能性を作業仮説として検討した。同遺伝子にtagを付け、COS7細胞にtransient

transfectionを行い培養上清中にGS4001蛋白の分泌をウエスタンブロッティングにより確認した。培養3日目の本遺伝子導入細胞培養液上清中にアンジオテンシノーゲンをアンジオテンシンIに分解するレニン様活性を認められた(Fig.6)。同活性はpH依存性であり、pH6で最大活性を示した。これらの結果は、本遺伝子産物が近位尿細管より分泌され尿細管腔あるいは腎皮質におけるAngII生成に関わっている可能性を強く示唆する。

4. 考察

マウス正常腎近位尿細管および髄質集合管における遺伝子発現情報データベースを用い他臓器における同様の遺伝子発現情報データベースと比較することによりそれぞれのネフロン・セグメントに優位に発現する遺伝子群を同定し得ることが示された(1, 2, 4, 5)。髄質集合管は尿濃縮のため生理的条件下で高浸透圧にさらされる。我々は当初、このような特殊な環境に適応するため同部位は少数の遺伝子を比較的大量に発現していると推定していたが、結果は逆であり多数の遺伝子を少量ずつ発現していた。これは、他臓器における同様のデータと比しても髄質集合管に特徴的であった。同ネフロンセグメントでは α B-crystallinが最も発現量が多く、同遺伝子発現が脱水により腎において誘導されるがNaCl負荷では変化しない事が示された。MDCK細胞を用いたin vitroの実験でもNaClによる高浸透圧刺激ではmRNA発現誘導が起こらないことが確認されている (data not shown)。また、同遺伝子発現情報データベースから腎臓で有意に発現を認める glutathione-S-transferase class thetaファミリーに属する新規遺伝子を同定した。

近位尿細管において高発現を認めるGS4001はそのアミノ酸配列からaspartic proteinaseファミリーに属し、reninあるいはcathepsinDと類似の蛋白であることが明らかとなっていた。近位尿細管腔ならびに腎皮質においては血清中に比べると高いAng濃度であることが知られている。近位尿細管細胞ではangiotensinogenの産生と尿細管腔への分泌が確認されているが、Angの由来は十分に明らかにされていない。angiotensinogenからAngIの産生がどの様に行われるか、我々は近位尿細管に高発現する本遺伝子産物が本活性に関わる可能性を作業仮説として検討した。現時点では、cDNA全長をtransfectした培養細胞を用いて本蛋白が分泌される事また、培養上清中にrenin様活性が存在することが確認された。今後、同遺伝子のクローニングとノックアウトマウスの作成を試み、本仮説をin vivoにおいて確認する予定である。

本遺伝子情報を応用して今後もネフロン・セグメント特異的に発現する遺伝子群を解析することにより新しい機能を見いだし得る事が明らかとなった。

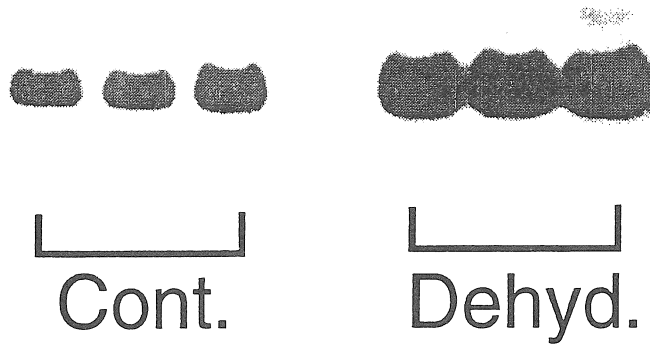
5. 今後の課題

正常マウス腎尿細管における遺伝子発現情報をデータベース化し新規遺伝子並びにネフロンセグメント特異的に発現する遺伝子群を同定した。上述の遺伝子群の機能解析をすすめる事また、NaClをはじめ細胞外液の恒常性維持に働く腎臓に発現する遺伝子群と腎疾患の病態との関わりを検討する必要があると考えられた。

6. 文献

1. Takenaka, M., E. Imai, Y. Nagasawa, Y. Matsuoka, T. Moriyama, T. Kaneko, M. Hori, S. Kawamoto, and K. Okubo. 2000. Gene expression profiles of the collecting duct in the mouse renal inner medulla. *Kidney Int.* 57:19-24.
2. Takenaka, M., E. Imai, T. Kaneko, T. Ito, T. Moriyama, A. Yamauchi, M. Hori, S. Kawamoto, and K. Okubo. 1998. Isolation of genes identified in mouse renal proximal tubule by comparing different gene expression profiles. *Kidney Int.* 53:562-572.
3. Navar, L., L. Harrison-Bernard, C.-. Wang, T, L. Cervenka, and K. Mitchell. 1999. Concentrations and actions of intraluminar angiotensin II. *J Am Soc Nephrol.* 10:S189-S195.
4. Takenaka, M., and E. Imai. 2000. Functional Genomics in nephrology. *Nephrol. Dial. Transplant.*:in press.
5. Takenaka, M., E. Imai, M. Fukunaga, N. Kawada, H. Kitamura, T. Kaneko, Y. Nagasawa, T. Moriyama, A. Yamauchi, M. Horio, M. Hori, S. Kawamoto, and K. Okubo. 1999. Mouse uroguanylin is localized in the kidney outer medulla and regulated by dehydration. *Clin. Exp. Nephrol.* 3:244-249.

A



B

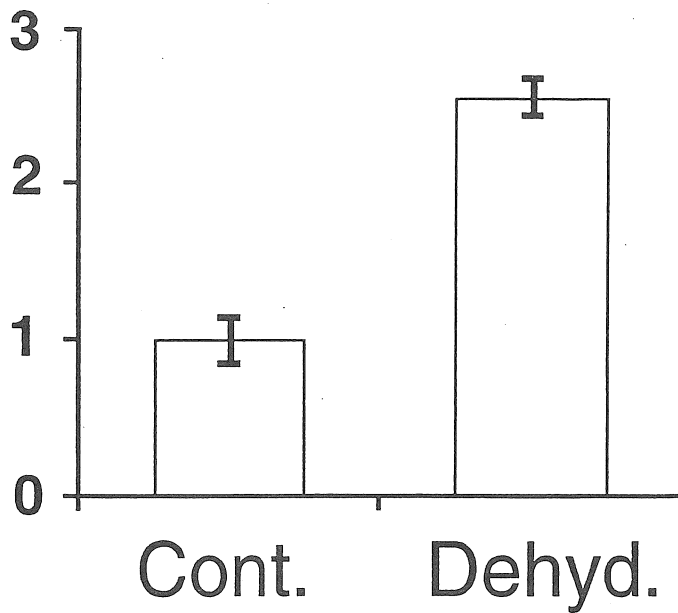


Fig. 1. The effect of dehydration on α B-crystallin mRNA in the kidney. Northern analysis was performed four times with reproducible outcomes. Cont., control group (mice allowed free access to water containing 3% sucrose); Dehyd., dehydration group (mice with no access to liquid for 72 hr).

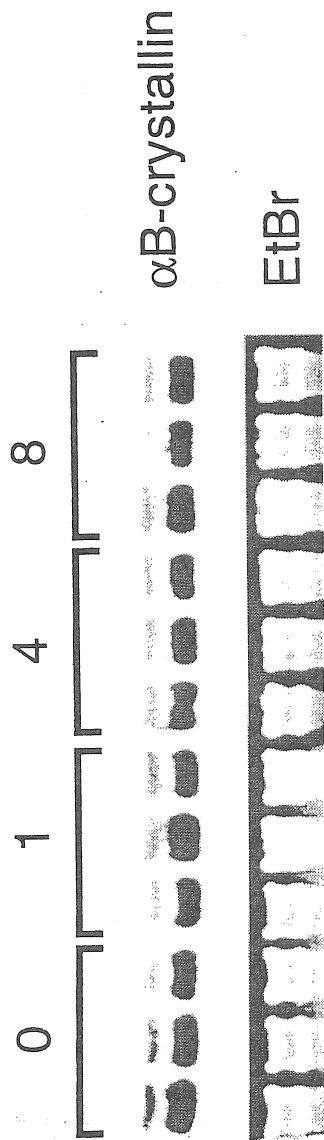


Fig. 2. Renal α B-crystallin mRNA expression after intraperitoneal NaCl administration in C57BL/6 mice. Total RNA from kidney (10mg) was used for Northern analysis. Mice were killed at time zero or at 1, 4, or 8 hr after intraperitoneal administration of 2 M NaCl solution. Numbers at the top of the Figure indicate time points. No significant differences in expression were detected. EtBr, ethidium bromide staining.

1 2 3 4 5 6 7

Fig. 3. Northern analysis for GS5219. Total RNA (10mg) from various mouse tissues was applied to each lane: lung (lane 1), brain (lane 2), liver (lane 3), intestine (lane 4), spleen (lane 5), muscle (lane 6), and kidney (lane 7). Filters were hybridized with ^{32}P -labeled probes for GS5219 approximately 1.8 kb in size. Equal loading was confirmed by ethidium bromide staining (not shown).

1 MGLELYLDLMSQPCRAVYIFAKKNGIPIFQL
31 RTIELLKGGQYTDSEFAQVNP L RKVPALKDG
61 DFVLAESVAI LLYLSRKYKAPDHWYPQDLQ
91 TRARVDEYLA WQH T A L R S C C T R A M W Q K M M F
121 PVFLGQPVPPEMLASTLAELDGCLQVLEDK
151 FLRNQAF LTGSHI SVADLV A I T E L M H P V S A
181 GCKIFESRPKLA AWRQRVEAEVGESL F QEA
211 HEVVLKAKDMP PLMDPALKEK L K L S V Q C L L
241 H

Fig. 4. Deduced amino acid sequence of GS5219.
GS5219 encoded a putative protein of 241 amino acids as shown in single-letter code.

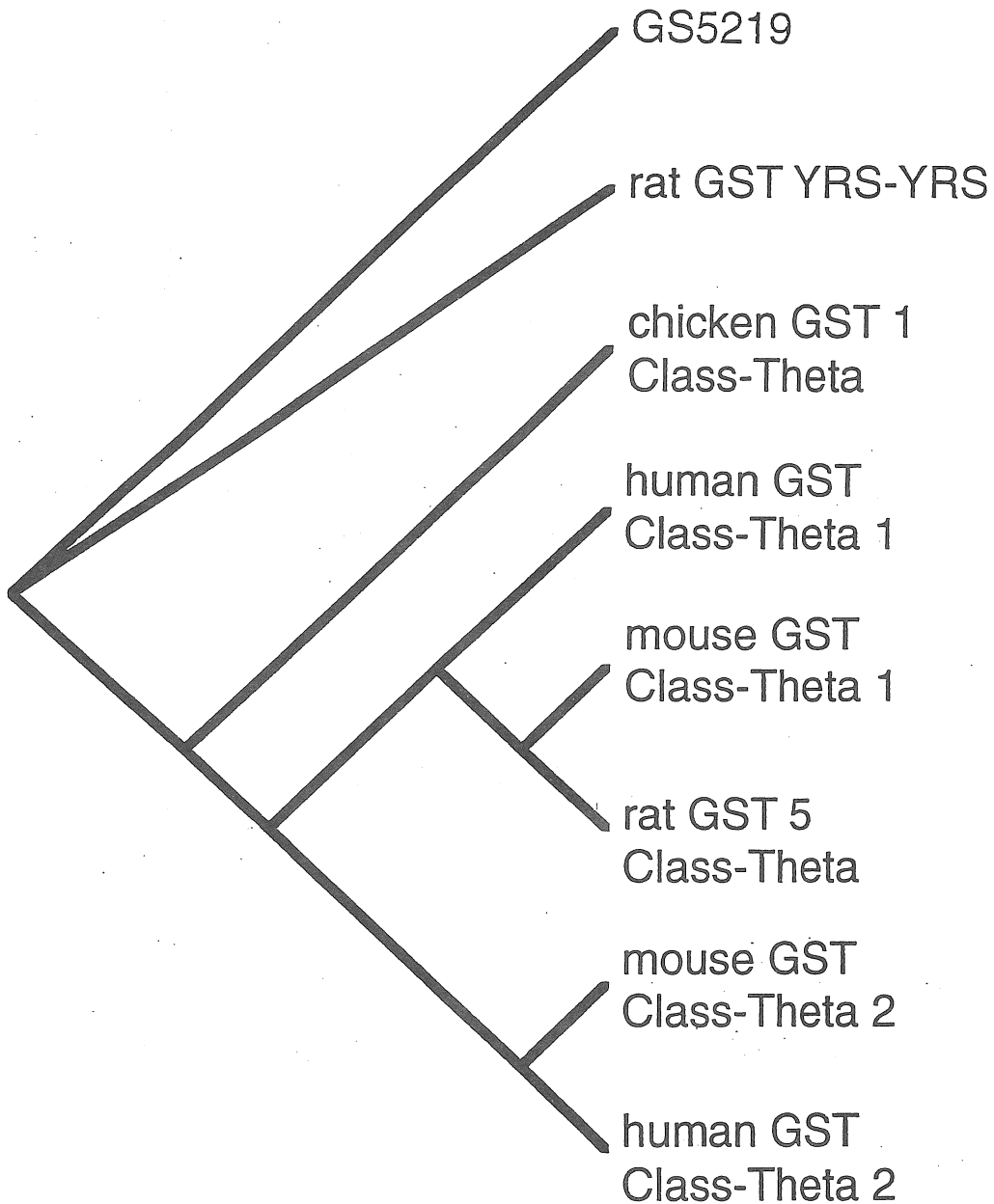


Fig. 5. Phylogenetic tree (mouse, rat, human, and chicken) of GS5219 and glutathione-S-transferase class theta cDNA sequences. Accession numbers are as follows: rat GST YRS-YRS, P30713; chicken GST 1 class theta, P20135; human GST class theta 1, P30711; mouse GST class-theta 1, Q64471; rat GST 5 class theta, Q01579; mouse GST class theta 2, Q61133; human GST class theta 2, P30712.

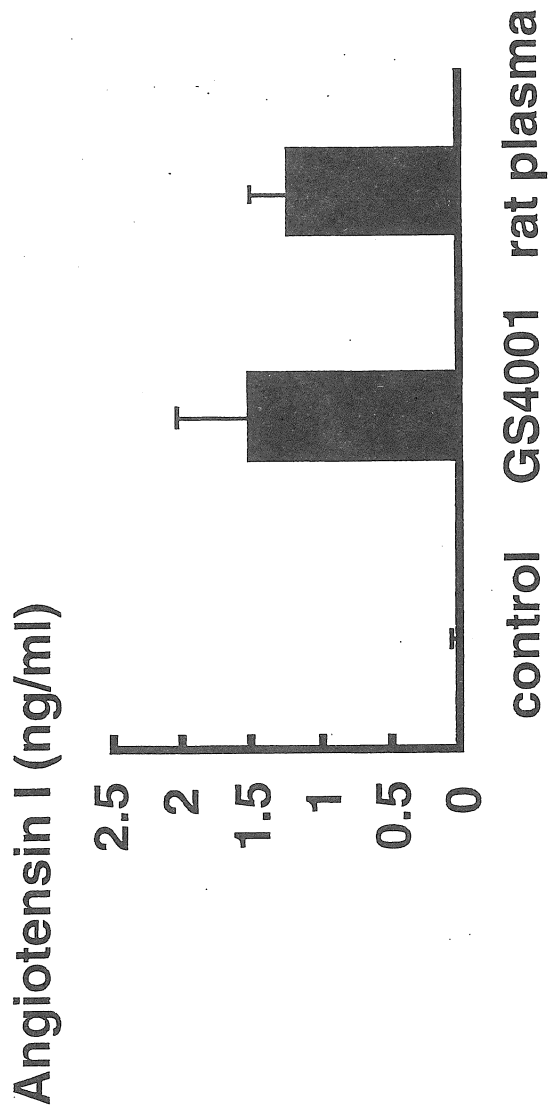


Fig. 6 Renin-like activity of supernatant of GS4001 transfected cells

Application of gene expression profiles of mouse nephron-segments to analyze renal functions including NaCl handling

Masaru Takenaka and Enyu Imai
Department of Internal Medicine and Therapeutics
Graduate School of Medicine, Osaka University

Kousaku Okubo
Institute for Molecular and Cellular Biology, Osaka University

Summary

We had constructed expressed genes data bases termed expression profiles of mouse proximal tubules and inner medullary collecting ducts. The information of the expression profiles were applied to identify and characterize nephron segment specific or predominantly expressed genes. In inner medullary collecting ducts, α B-crystallin was the most abundantly expressed gene. This is a family member of small stress proteins and has been known as a major protein in vertebra lens. α B-crystallin mRNA expression was upregulated significantly in the kidney by dehydration for three days, while there were no induction by NaCl loading. Among two thousands clones which we analyzed, over one thousand six hundreds genes were identified. The variation of expressed genes in inner medullary collecting ducts was larger than those of any other tissues or cells, but in relatively small amounts. From the subtraction procedures using a computer, GS (gene signature) 5219 appeared to be specific to this nephron segment. The full length cloning of GS5219 revealed that this gene was a new member of glutathione-S-transferase class theta.

In kidney cortex and the lumen of proximal tubules, it has been shown that the concentration of angiotensinogen, angiotensin (Ang) I and II were ten to thousands times higher than those in serum. They are much greater than can be explained by the glomerular filtration. It has demonstrated that there are angiotensinogen and its mRNA in epithelial cells of proximal tubules, suggesting that they are secreted and converted in the vicinity of the proximal tubules or in themselves. The precise mechanisms, however, remains to be unclear. One of the proximal tubules specific gene, GS4001, has been cloned. The sequence revealed that this transcript encoded a protein of the family member of aspartic proteinases including renin and cathepsin D. There was a leader sequence at the N terminal site, suggesting that this protein could be secreted. We hypothesized that GS4001 protein might be involved in the mechanisms of high concentration of Ang in the kidney cortex and proximal tubular lumen. The full length of GS4001 cDNA with tag was transfected into the culture cells and the secretion of GS4001 protein was confirmed in the culture medium. The medium of cultured cells transfected GS4001 were harvested. The production of AngI from angiotensinogen was identified in the medium collected from transfected cells, suggesting that GS4001 had renin-like activity.

The expression profiles of renal nephron-segments would be feasible to analyze and characterize new genes and their functions.