

助成番号 0727

腎マクラデンサ細胞 Na⁺輸送関連蛋白の同定と体液量調節機構

河原 克雅, 安岡 有紀子, 福田 英一

北里大学医学部生理学

概要 腎臓は、細胞外液量 (ECF)・浸透圧・pHならびに電解質組成を調節している唯一の器官である。Renin-Angiotensin-Aldosterone (R-A-A)系などの調節系の異常は、ECF量の増加を招き、高血圧・動脈硬化・腎硬化・心肥大等の心・腎・血管系の障害を引き起こす。ECF量を適切に保つため、R-A-A系とは別個に、糸球体濾過量 (GFR)を調節する尿細管糸球体フィードバック (TGF)機構の働きは重要である。TGF機構の中心的 (センサー的)役割を果たす macula densa (MD)において、膜輸送体相互関係や細胞内・外シグナル伝達機構に関して未解明の点が多く残されている。われわれが2005年に樹立したNE-MD細胞にフロセミド (Na/K/2Cl輸送体 (NKCC2)阻害薬)を投与すると、nNOS蛋白 (65 kDa)発現が増加した。本研究で、NO産生機構の鍵となるnNOS蛋白分子の構造を解析し、TGF機構におけるMD細胞の役割を明らかにする。

研究結果 我々は、NE-MD細胞株の培養液に furosemide (12 μM)を添加し、5時間後、発現量が増加するスポット (6個)を選んだ (アガロースゲル二次元電気泳動法)。MALDI-TOF MS法で各スポットのペプチド断片 (配列)を解析した (MS Fit)。その結果、酸化ドメインに位置するヘム結合部位 (HEME)、PDZ結合部位 (PDZ)は存在していたが、還元ドメインに属するFMN結合部位 (FMN)、FAD結合部位 (FAD)、NADPH結合部位 (NADPH)の主要配列が存在しなかった。しかし、MD細胞のnNOS蛋白は、還元ドメインの大欠失にもかかわらず、L-Argを基質としてCa²⁺濃度依存性にNO産生量を増加させる機能を保持していた。これらの実験結果から、マウス腎nNOS蛋白 (MD細胞)は、カルモジュリン結合部位 (酸化ドメインの一部)が残存していると推測される。

1. 背景・研究目的

腎臓は、細胞外液量 (ECF)・浸透圧・pHならびに電解質組成を調節している唯一の器官である。過剰な食塩摂取の他、上皮型Na⁺チャネル (ENaC)などの輸送体発現異常 (Liddle症候群)やRenin-Angiotensin-Aldosterone (R-A-A)系などの調節系の異常は、ECF量の増加を招き、高血圧・動脈硬化・腎硬化・心肥大等の心・腎・血管系の障害を引き起こす。ECF量を適切に保つため、R-A-A系とは別個に、糸球体濾過量 (GFR)を調節する尿細管糸球体フィードバック (TGF)機構の働きは重要である^{1,2)}。TGF機構の中心的 (センサー的)役割を果たす macula densa (MD)において、膜輸送体相互関係や細胞内・外シグナル伝達機構に関して未解明の点が多く残されている。MD

細胞は、糸球体濾液 (遠位部尿細管-管腔内液)の塩濃度 ([NaCl])変化を感知し、同一ネフロンへの輸入細動脈、メサングウム細胞を含む傍糸球体装置 (JGA)にシグナルを送り、GFR量調節を行う^{1,2)}。調節の第一ステップは、MD細胞の管腔側に位置するNa-K-2Cl共輸送体 (NKCC2)によるNaCl流入量の増減の感知と考えられる。例えば、NaCl流入量の減少を感知すると、神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS: neuronal nitric oxide synthase)³⁾やシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2: cyclooxygenase-2)⁴⁾の発現量の増加や活性亢進が起こる。

NOSには三種類のアイソフォームがあり、体内組織の局在や発現調節機序により、神経型 (nNOS; NOS1)、誘導型 (iNOS; NOS2)、血管内皮型 (eNOS; NOS3)に分類

されている。腎臓には三種類のNOS がすべて発現している。MD細胞には、nNOSが高発現している。GFRの増減が、遠位部尿細管濾液の[Cl⁻]変化(増減)として感知され、nNOS発現量が変化する。さらに、低塩食飼育や利尿薬(フロセミド)投与の場合、MD細胞のnNOS発現量が増加する。しかし、nNOSの発現誘導機構・活性調節には不明の点が多い。

われわれは、SV40マウス由来不死化腎遠位尿細管細胞(DT)株からMD細胞株(NE-MD)を樹立した⁵⁾。NE-MD細胞にフロセミド(Na/K/2Cl輸送体(NKCC2)阻害薬)を投与すると、nNOS蛋白(65 kDa)発現が増加した。本研究で、NO産生機構の鍵となるnNOS蛋白分子の構造を解析し、TGF機構におけるMD細胞の役割を明らかにする。

2. 研究計画・方法

プロテオーム解析: 遺伝的に均質なMD細胞(NE-MD細胞)を使用する事により、MD細胞に発現する機能蛋白(膜輸送体、調節因子)の網羅的解析を、限定的に効率よく行う。nNOS発現を誘導するフロセミド刺激で発現量が増加する関連蛋白群(nNOSを含む)を明らかにする。

nNOS機能発現に必要な蛋白の特定(免疫沈降法): MD細胞(NE-MD)に発現するnNOSの発現様式は、constitutive(発現量がほぼ一定)ではなく、inducibleであった⁵⁾。この結果は、「低塩食・フロセミド投与・アルカローシスで、MD細胞(in vivo)のnNOSが誘導されること」と合致する⁶⁾。我々は、nNOS蛋白機能発現(NO産生)に必要なnNOS還元ドメイン類似構造を持つ蛋白質を同定する。

3. 研究結果

1) MD細胞の神経型NO合成酵素(nNOS)発現量は、濾液の塩濃度[NaCl]低下で増加し、L-Arginine(L-Arg)の濃度依存性にNOを産生した。新規に株化した培養マウスMD細胞(NE-MD)に高発現するnNOS(65 kD)は、furosemide(ループ利尿薬)や低[NaCl]溶液で発現が増加した(誘導型)。このため、脳・心筋(constitutive)や髄質内層集合管(depressive)のnNOS蛋白(140 - 160 kD)とは、発現調節が異なると考えられる。

2) 市販されている抗nNOS抗体(四種類)を使った免疫

組織化学実験の結果は、一種類(Cayman社)のみ、マウス腎MD細胞(凍結標本)でpositiveであった。

3) 我々は、NE-MD細胞株の培養液にfurosemide(12 μM)を添加し、5時間後、発現量が増加するスポット(6個)を選んだ(アガロースゲル二次元電気泳動法)。ついで、切り出したゲルを酵素処理し、MALDI-TOF MS法で各スポットのペプチド断片(配列)を解析した(MS Fit)。Furosemide-induced nNOS蛋白(断片)を同定し、その分子構造を明らかにした。その結果、酸化ドメインに位置するヘム結合部位(HEME)、PDZ結合部位(PDZ)は存在していたが、還元ドメインに属するFMN結合部位(FMN)、FAD結合部位(FAD)、NADPH結合部位(NADPH)の主要配列が存在しなかった。

4) 二次元電気泳動のゲルをPVDF膜に転写し、抗nNOS抗体によるウェスタンブロット実験を行ったところ、1,124~1,140アミノ酸残基、1,515~1,526アミノ酸残基を認識する抗体によって認識された。しかし、還元ドメイン類似構造を持つ蛋白質を同定することはできなかった。NOS蛋白還元ドメインの欠如は、NO産生における電子伝達機能に大きな影響を与える事から、nNOS蛋白活性に少なからず影響している事が考えられる。

5) MD細胞のnNOS蛋白は、還元ドメインの大欠失にもかかわらず、L-Argを基質としてCa²⁺濃度依存性にNO産生量を増加させる機能を保持していた。これらの実験結果から、マウス腎nNOS蛋白(MD細胞)は、カルモジュリン結合部位が残存していると推測される。

4. 考察

NE-MD細胞株におけるnNOS蛋白発現・活性は、細胞内へのNaCl流入量低下(+furosemide)で誘導され、酸性pH感受性であった。さらに、L-Arg誘導NO産生(L-Arg-NO産生曲線)は、Ca²⁺依存性で非線形であった(H18年度報告書)。本年の研究成果により、MD細胞のnNOS蛋白の分子構造は、脳や心臓型に比べ小さく(Western blotting)、特に還元ドメインが欠失していた(MALDI-TOF MS)。MD細胞のnNOS蛋白が特異的に小さいのか、NO産生という機能発現のために未知の蛋白分子が必要なのか、現時点では不明である。

5. 今後の展望

MD細胞に発現するnNOS蛋白分子(65 kD)は、脳や心筋タイプ(140 - 160 kD)にくらべ、分子量は半分以下であった。しかし、nNOS蛋白機能活性は、フルサイズのnNOS蛋白同様、Ca²⁺、pH依存性を保持していた。PCR法と質量分析器を組み合わせることでMD細胞nNOS遺伝子ならびに機能蛋白分子の全長構造を解明したい。nNOS蛋白欠失ドメインまたは新規の機能補償蛋白を同定するために、免疫沈降法や酵母 two-hybrid 法を応用し、MD細胞nNOS蛋白の特殊性([Cl⁻]依存性発現)を明らかにしたい。

文献

- Schnermann J, Levine DZ. Paracrine factors in tubuloglomerular feedback: adenosine, ATP, and nitric oxide. *Annu Rev Physiol*, 2003; 65: 501-529
- Komlosi P, Fintha A, Bell PD. Current mechanisms of macula densa cell signalling. *Acta Physiol Scand*, 2004; 181: 463-469.
- Kovacs G, Komlosi P, Fuson A, Peti-Peterdi J, Rosivall L, Bell PD. Neuronal nitric oxide synthase: its role and regulation in macula densa cells. *J Am Soc Nephrol*, 2003; 14: 2475-2483.
- Krämer BK, Kammerl MC, Kömhoff M. Renal cyclooxygenase-2 (COX-2): Physiological, pathophysiological, and clinical implications. *Kidney Blood Press Res*, 2004; 27: 43-62
- Yasuoka Y, Kawada H, Suzuki Y, Sato M, Endou H, Obinata M, Kawahara K. Establishment of a mouse macula densa cell line with an nNOS promoter driving EGFP expression. *Jpn J Physiol*. 2005; 55: 365-372.
- Tojo A, Onozato ML, Fukuda S, Asaba K, Kimura K, Fujita T. Nitric oxide generated by nNOS in the macula densa regulates the afferent arteriolar diameter in rat kidney. *Med Electron Microsc*, 2004 ; 37: 236-41.

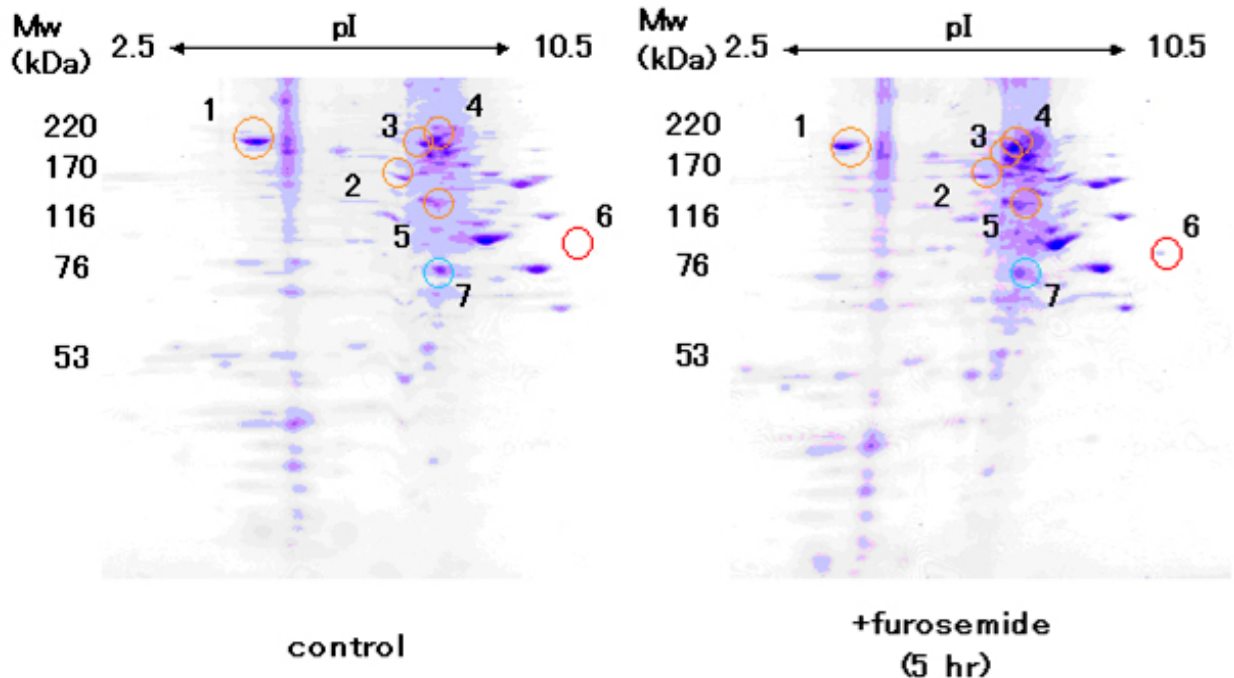


Figure 1. Furosemide-induced proteomes of NE-MD cells by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). A total of 46 selected protein spots, corresponding to 18 unique proteins, have been identified. They were mainly distributed in the area of mass 20-170 kDa and pI 4-10. Although 6 protein spots were increased by 1.5 times in NE-MD cells treated with furosemide (12 μ M), only one unique protein spot increased by more than 5 times.

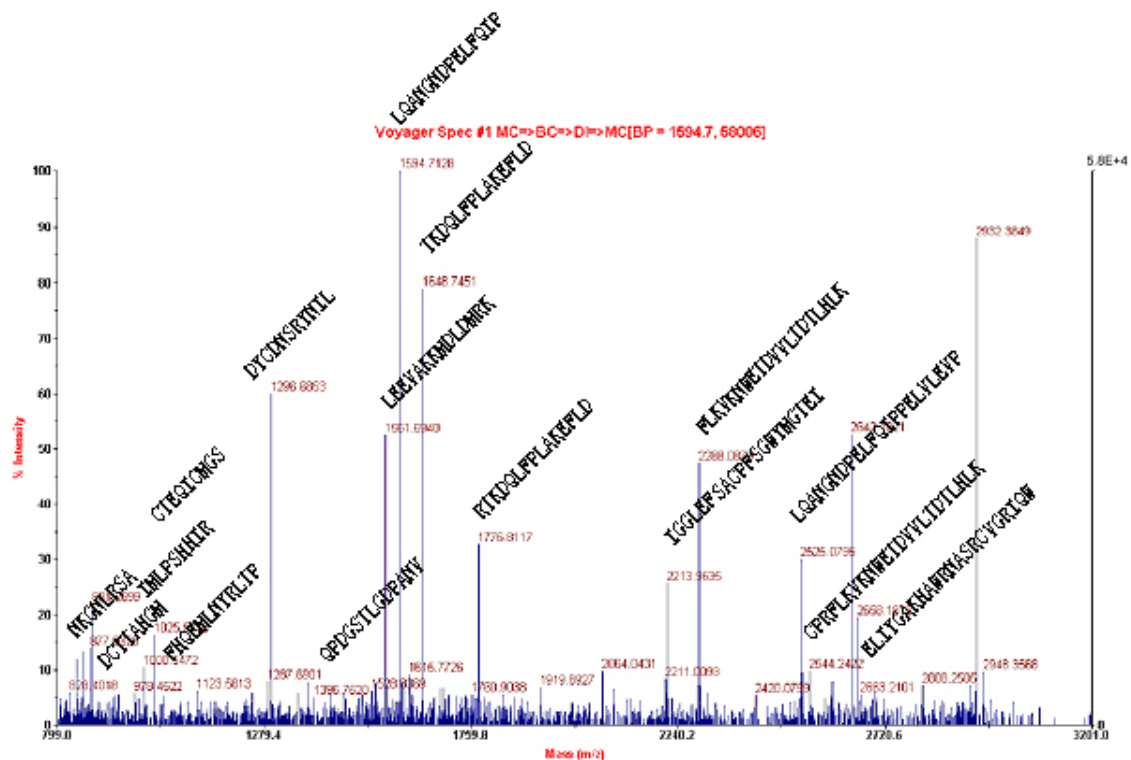


Figure 2. Protein analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-time of flight mass spectrometry (TOF-MS). Peptide fragments shown were determined by a computer program (MS-FIT). One unique protein spot, No.6 (red circle) in Fig. 1, was determined as nNOS.

```

MEEHTFGVQR I QPNVI SVRLFKRKVGGLGFLVKE R VSK PPV I I S D L I R G G A A E Q S G L I Q A G D I I L A V N D R
PLVDLSYDSALEVLRGIASETHVYLILRGPEGFTTHLET T FTG D G T P K T I R V T Q P L G T P T K A V D L S R Q P S
ASK D Q P L A V D R V P G P S N G P Q H A Q G R G Q G A G S V S Q A N G V A I D P T M K N T R A N L Q D S G E Q D E L L K E I E P V L S I
LTGGGKAVNRGGPAKAEMKDTGI QVDRDLGK L K H K A P P L G G E N D R V F N D L W G R G N V P V Y L N P Y S E N E Q S
P A S G K Q S P T K N G S P S R C P R F L K V K N W E T D V V L T D T L H L K S T L E T G C T E Q I C M G S I M L P S H H I R K S E D V R T
K D Q L F P L A K E F L D Q Y Y S S I K R F G S K A H M D R L E E V N K E I E S T S T Y Q L K D T E L I Y G A K H A W R N A S R C V G R I Q
W S K L Q V F D A R D C T T A H G M F N Y I C N H V K Y A T N K G N L R S A I T I F P Q R T D G K H D F R V W N S Q L I R Y A G Y K Q P D G
S T L G D P A N V E F T E I C I Q Q G W K P P R G R F D V L P L L L Q A N G N D P E L F Q I P P E L V L E V P I R H P K F D W F K D L G L K
W Y G L P A V S N M I G G L E F S A C P F S G W Y M G T E I G V R D Y C D N S R Y N I L E E V A K K M D L D M R K T S S L W K D Q A L V E I
NI AVL Y S F Q S D K V T I V D H S A T E S F I K H M E N E Y R C R G G C P A D W V W I V P P M S G S I T P V F H Q E M L N Y R L T P S
FEYQ P D P W N T H V W K G T N G T P T K R R A I G F K K L A E A V K F S A K L M G Q A M A K R V K A T I L Y A T E T G K S Q A Y A K T L
C E I F K H A F D A K A M S M E E Y D I V H L E H E A L V L V Y T S T F G N G D P P E N G E K F G C A L M E M R H P N S V Q E E R K S Y K V
R F N S V S S Y S D S R K S S G D P D L R D N F E S T G P L A N V R F S V F G L G S R A Y P H F C A F G H A V D T L L E E L G G E R I L K
M R E G D E L C G Q E E A F R T W A K K V F K A A C D V F C V G D D V N I E K A N N S L I S N D R S W K R N K F R L T Y V A E A P E L T Q G
L S N V H K K R V S A A R L L S R Q N L Q S P K S S R S T I F V R L H T N G N Q E L Q Y Q P G D H L G V F P G N H E D L V N A L I E R L E D
A P P A N H V Y K V E M L E E R N T A L G V I S N W K D E S R L P P C T I F Q A F K Y Y L D I T T P P T P L Q L Q Q F A S L A T N E K E K Q
R L L V L S K G L Q E Y E E W K W G K N P T M V E V L E E F P S I Q M P A T L L L T Q L S L L Q P R Y Y S I S S S P D M Y P D E V H L T V A
I V S Y H T R D G E G P V H H G V C S S W L N R I Q A D D V Y P C F Y R G A P S F H L P R N P Q V P C I L V G P G T G I A P F R S F W Q R R
Q F D I Q H K G M N P C P M V L V F G C R Q S K I D H I Y R E E T L Q A K N K G V F R E L Y T A Y S R E P D R P K Y Y Q D V L Q E Q L A E
S Y Y R A L K E Q G G H I Y V C G D V T M A A D V L K A I Q R I M T Q R G K L S E E D A G V F I S R L R D D N R Y H E D I F G V T L R T Y E
V T N R L R S E S I A F I E E S K K D T D E V F S S
    
```

Figure 3. Amino-acid sequences of brain type neuronal nitric oxide synthase (nNOS). Full length of brain type nNOS (Black letters) and peptide fragments from spot No.6 (Yellow stained) determined as nNOS by MALDI-TOF-MS were over-written.

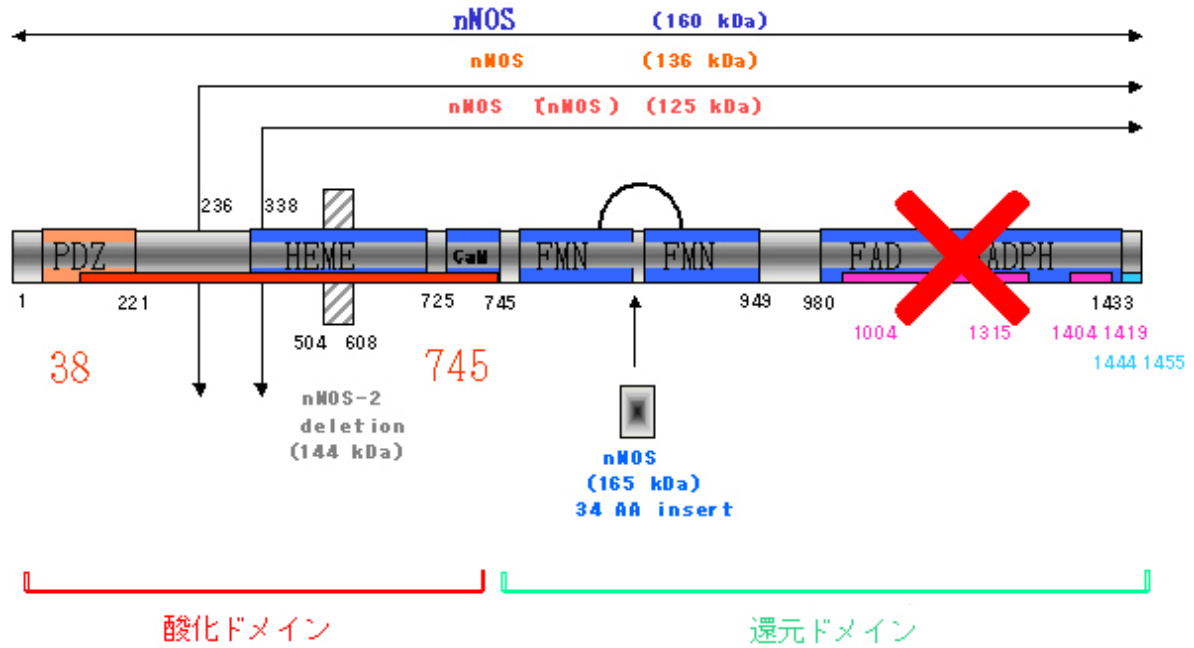


Figure 4. An illustration of molecular structure of putative nNOS protein from macula densa. Although a N-terminal heme binding domain, a main part of oxidative domain, was conserved, a C-terminal reductase domain, such as the flavin mononucleotide (FMN), flavin adenine dinucleotide (FAD), and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) binding regions, was missing (cross).

No. 0727

Regulation of Body Fluid: Identification of Molecular Machineries for Cellular Na⁺ Transport in Kidney Macula Densa

Katsumasa Kawahara, Yukiko Yasuoka, Hidekazu Fukuda

Department of Physiology, Kitasato University School of Medicine

Summary

A newly established mouse macula densa cell line (NE-MD) shows up-regulation of the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) protein and generates L-arginine (Arg)-induced NO when NE-MD cells were incubated with either low [NaCl] solution or furosemide (12 μM), an inhibitor of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ transporter (Yasuoka *et al*, 2005; Kawada *et al*, 2006). Molecular weight of furosemide-induced nNOS protein (65 kD) by Western blotting was smaller than brain and cardiac types of nNOSs (160 kD), suggesting that the nNOS protein of NE-MD cells may be largely truncated. To further investigate a molecular structure of the nNOS protein, we have examined the furosemide-induced proteomes of NE-MD by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) combined with mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). A total of 46 selected protein spots, corresponding to 18 unique proteins, have been identified by 2-DE method. Although 6 protein spots, including nucleolin, pyruvate kinase, and nNOS, were increased by 1.5 times in NE-MD cells treated with furosemide (5 hrs), only one unique protein spot, later determined as nNOS, increased by more than 5 times. Although an N-terminal heme-binding domain was conserved, a C-terminal reductase domain, being essential for transfer of electrons to the catalytic heme center, was surprisingly missing. In conclusion, nNOS protein identified from NE-MD cells may function without the C-terminal or require an undetermined protein for a functional complex. C-terminal truncated nNOS of mouse NE-MD cells may explain unique regulation of gene expression and activity in the macula densa.