

助成番号 0837

## プロテアーゼによる ENaC 寿命決定メカニズム

丸中 良典, 新里 直美, 宮崎 裕明, 中島 謙一, 山田 敏樹

京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学

**概要** 腎皮質集合管上皮細胞における  $\text{Na}^+$  再吸収は、体液量の調節を通じて、血圧制御に重要な働きを担っている。この上皮細胞における  $\text{Na}^+$  再吸収は、管腔側膜上に存在する上皮型ナトリウムチャネル (epithelial  $\text{Na}^+$  channel; ENaC) を介する  $\text{Na}^+$  の流入過程と血管側膜上に存在する  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase を介する  $\text{Na}^+$  の排出過程から構成されている。従って、我々の体液量、血圧の重要な調節因子として、腎皮質集合管における ENaC および  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase の活性制御因子が研究の対象となってきた。その中でも、 $\text{Na}^+$  再吸収の律速段階を担うと考えられている ENaC 活性の制御因子および制御機構の研究は近年盛んに行われている。しかしながら、体液浸透圧変化、特に体液浸透圧低下 (低浸透圧) 時における ENaC 制御に関しては、未だ不明な点が多い。この観点から、我々は、腎皮質集合管上皮細胞での低浸透圧刺激によるナトリウム輸送制御機構を明らかにすべく研究を行って来た。その結果以下のことが明らかとなって来ている。低浸透圧刺激は、まずチロシンリン酸化依存的に ENaC の細胞内局在変化を通じて、管腔側膜上 ENaC 数を増大させて  $\text{Na}^+$  再吸収を亢進し、その後 ENaC の遺伝子発現増大を介して、 $\text{Na}^+$  再吸収を亢進することが明らかとなった。チロシンリン酸化増大機構において、低浸透圧刺激誘因性細胞容積増大が重要な役割を担っており、さらに、細胞容積変化だけでなく細胞内イオン環境変化も細胞内情報伝達系の活性制御に深く関わる可能性が考えられている。我々は、低浸透圧刺激時に細胞容積変化に伴って細胞内クロライドイオン濃度 ( $[\text{Cl}]_i$ ) が変化すること、とくに低浸透圧刺激により惹起される調節性容積減少 (Regulatory Volume Decrease: RVD) が、 $[\text{Cl}]_i$  を減少させるという生理的意義を有していることを明らかにした。しかしながら、アルドステロンおよび低浸透圧刺激が、ENaC タンパクの細胞内局在や管腔側膜上におけるイオンチャネル寿命を如何に調節しているかに関しては不明である。アルドステロンおよび低浸透圧刺激により腎皮質集合管上皮モデル細胞 (A6 細胞) における ENaC の細胞内局在および管腔側膜上におけるイオンチャネルとしての寿命が如何に制御されているかを明らかにすること、およびこれらの制御がプロテアーゼにより如何に修飾されるかを解明するために本研究を遂行した。その結果、腎集合管上皮モデル A6 細胞を用いて、ベンザミル (ENaC の特異的阻害剤) 感受性短絡電流を測定し、細胞内 ENaC のトラフフィッキングの数学的モデルを用いたシミュレーションを適応することにより、アルドステロンの ENaC の細胞内トラフフィッキングへの影響を検証した。その結果、アルドステロンが管腔側膜上に存在する ENaC の細胞内取り込み速度を減少させること、および粗面小胞体における ENaC 貯蔵量を増大させることが明らかとなった。

### 1. 研究目的

#### 1.1 研究の背景

腎皮質集合管上皮細胞における  $\text{Na}^+$  再吸収は、体液量の調節を通じて、血圧制御に重要な働きを担っている。この上皮細胞における  $\text{Na}^+$  再吸収は、管腔側膜上に存在する上皮型ナトリウムチャネル (epithelial  $\text{Na}^+$  channel; ENaC) を介する  $\text{Na}^+$  の流入過程と血管側膜上に存在す

る  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase を介する  $\text{Na}^+$  の排出過程から構成されている。従って、我々の体液量、血圧の重要な調節因子として、腎皮質集合管における ENaC および  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase の活性制御因子が研究の対象となってきた。その中でも、 $\text{Na}^+$  再吸収の律速段階を担うと考えられている ENaC 活性の制御因子および制御機構の研究は近年盛んに行われている。しかしながら、体液浸透圧変化、特に体液浸透

圧低下(低浸透圧)時における ENaC 制御に関しては、未だ不明な点が多い。この観点から、我々は、腎皮質集合管上皮細胞での低浸透圧刺激による  $\text{Na}^+$  輸送制御機構を明らかにすべく研究を行って来た。その結果、以下のことが明らかとなって来ている。低浸透圧刺激は、まずチロシンリン酸化依存的に ENaC の細胞内局在変化を通じて、管腔側膜上 ENaC 数を増大させて  $\text{Na}^+$  再吸収を亢進し<sup>1,2)</sup>、その後 ENaC の遺伝子発現増大を介して、 $\text{Na}^+$  再吸収を亢進することが明らかとなった<sup>3,4)</sup>。チロシンリン酸化増大機構において、低浸透圧刺激誘因性初期細胞容積増大が重要な役割を担っており、さらに、細胞容積変化だけでなく細胞内イオン環境変化も細胞内情報伝達系の活性制御に深く関わる可能性が考えられている<sup>5)</sup>。我々は、低浸透圧刺激時に細胞容積変化に伴って細胞内クロライドイオン濃度 ( $[\text{Cl}^-]$ ) が変化すること、とくに低浸透圧刺激により惹起される調節性容積減少 (Regulatory Volume Decrease: RVD) が、 $[\text{Cl}^-]$  を減少させるという生理的意義を有していることを明らかにした<sup>6)</sup>。しかしながら、アルドステロンおよび低浸透圧刺激が、ENaC タンパクの細胞内局在や管腔側膜上におけるイオンチャネル寿命を如何に調節しているかに関しては不明である。

## 1. 2 研究目的

アルドステロンおよび低浸透圧刺激により腎皮質集合管上皮モデル細胞 (A6 細胞) における ENaC の細胞内局在および管腔側膜上におけるイオンチャネルとしての寿命が如何に制御されているかを明らかにすること、およびこれらの制御がプロテアーゼにより如何に修飾されるかを解明することが本研究の目的である。

## 1. 3 研究の意義

プロテアーゼのアルドステロンおよび低浸透圧刺激による ENaC 制御機構に対する効果は全く不明であり、全く新しい概念からの ENaC 制御機構を明らかにするものであり、体液制御機構に新たな概念を付け加えるものである。

## 2. 研究方法

### 2. 1 細胞培養

*Xenopus laevis* 腎臓由来の皮質集合管モデル細胞である A6 細胞は、American Type Culture Collection (Rockville, MD, U.S.A.) より入手した。NCTC-109

medium (GIBCO, Grand Island, NY, U.S.A.) を両生類細胞の培養に適するように浸透圧を 20% 低下させて、A6 細胞の培養に用いた。この培養液には、抗生物質 (ストレプトマイシン、ペニシリン)、10% (v/v) ウシ胎児血清を添加した。培養は、27°C、1.0%  $\text{CO}_2$  の環境で行った。 $\text{Na}^+$  輸送測定には、プラスチックで維持した細胞を、0.4  $\mu\text{m}$  のポアサイズの透過性のある膜上 (NUNC filter/NUNC) で 11 日から 14 日間培養し、上皮細胞としての極性を獲得した細胞を用いた。

### 2. 2 $\text{Na}^+$ 再吸収の電気生理学的測定

上皮細胞を経由する  $\text{Na}^+$  再吸収は、Transwell costar 上で 11 日から 14 日間培養した細胞を短絡電流測定用の Ussing chamber にセットして、イオン輸送を測定した。 $\text{Na}^+$  再吸収量は、ENaC 特異的阻害剤である benzamil に感受性の短絡電流として測定し、管腔側の ENaC 活性は benzamil 感受性コンダクタンス変化として測定した。

## 3. 研究結果

### 3. 1 低浸透圧刺激惹起性 $\text{Na}^+$ 輸送におよぼすアルドステロンの影響

図 1 に示されている通り、低浸透圧刺激により惹起される  $\text{Na}^+$  輸送は低浸透圧刺激を負荷してから 4-5 時間後にピークを示し、その後輸送量は低下した。アルドステロン処理 (1  $\mu\text{M}$ , 24 h) は、低浸透圧刺激惹起性  $\text{Na}^+$  輸送の時間経過を引き延ばしたことが明らかとなった。図 1 に示した時間経過は、最大輸送量を 1 とした時の標準化したデー

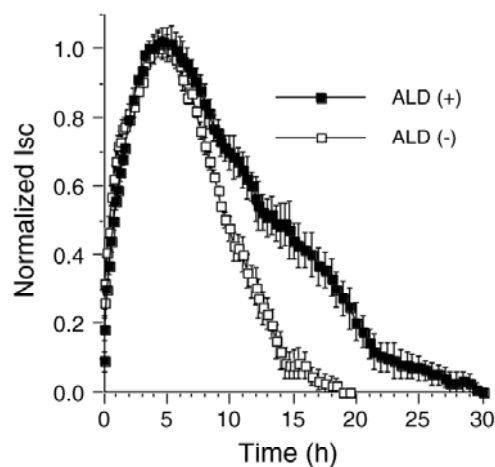


Figure 1. Effects of hypotonicity on transepithelial  $\text{Na}^+$  transport in A6 cells

ターである。なお、アルドステロン処理を行った細胞においては、Na<sup>+</sup> 輸送量のピーク値は、約3-5倍高かった。

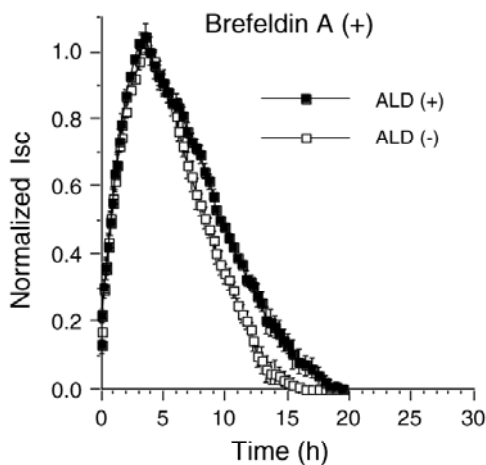
また、図2示すように、アルドステロンの低浸透圧刺激惹起性 Na<sup>+</sup> 輸送経過時間延長効果は、粗面小胞体からゴルジ装置へのタンパク質輸送を阻害する brefeldin A により、消失した。このことから、アルドステロンの効果の一つは、粗面小胞体からゴルジ装置への ENaC のトランスロケーション過程にかかわるものであることが示唆された。

このアルドステロンによる Na<sup>+</sup> 輸送の時間経過延長を下記のモデルを用いて、シミュレーションした(図3)。図3に示すモデルを基に、ENaC の細胞内貯蔵部位から管腔側膜上への移動速度を  $\alpha$  とし、管腔側膜上から細胞内への移動速度を  $\beta$  とし、細胞内貯蔵 ENaC 量を  $A$  (A<sub>0</sub>: ENaC 細胞内貯蔵初期量)とした時、 $\alpha$  および  $\beta$  は表1のようになった。即ち、アルドステロンは、ENaC の細胞内貯蔵部位から管腔側膜上への移動速度に対しては影響

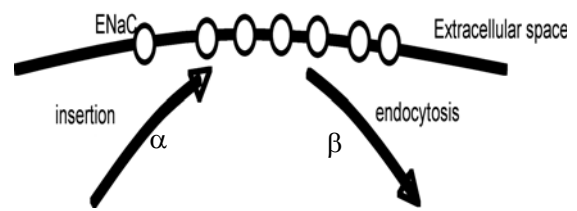
を与えずに、管腔側膜上から細胞内への移動速度を減少させることにより、管腔側膜上での ENaC の滞在時間を長くすることにより、Na<sup>+</sup> 輸送量を増大させることが明らかとなった(表1)。

図2、図3 および 表1 に示す結果より、アルドステロンが以下の効果を有することが明らかとなった(図4)。

- 1)粗面小胞体からゴルジ装置へ供給するENaC 量を増大させ。
- 2)ゴルジ装置から管腔側膜上への ENaC 移動速度には影響を与えない。
- 3)管腔側膜上に存在する ENaC の細胞内への取り込み速度を減少させる。
- 4)上記の3)の効果は、アルドステロンにより粗面小胞体からゴルジ装置への移動促進される因子により発現されている。



**Figure 2.** Effects of brefeldin A on the hypotonicity-induced transepithelial Na<sup>+</sup> transport in A6 cells



$$d[ENaC]/dt = \alpha[A] - \beta[ENaC]$$

$$d[A]/dt = -\alpha[A]$$

$$[A] = [A_0] \exp(-\alpha t)$$

$$d[ENaC]/dt = \alpha[A_0] \exp(-\alpha t) - \beta[ENaC]$$

**Figure 3.** A model of intracellular ENaC trafficking

**Table 1.** The rates of insertion and endocytosis of ENaC into and from the apical membrane

h <sup>-1</sup>	Insertion rate ( $\alpha$ )	Endocytosis rate ( $\beta$ )
Aldosterone (-)	0.314 ± 0.016	0.219 ± 0.015
Aldosterone (+)	0.325 ± 0.020 <sup>N.S.</sup>	0.131 ± 0.016 <sup>#</sup>

N.S., not significantly different between aldosterone (-) and (+), n = 5.

#, significantly different between aldosterone (-) at p < 0.005, n = 5.

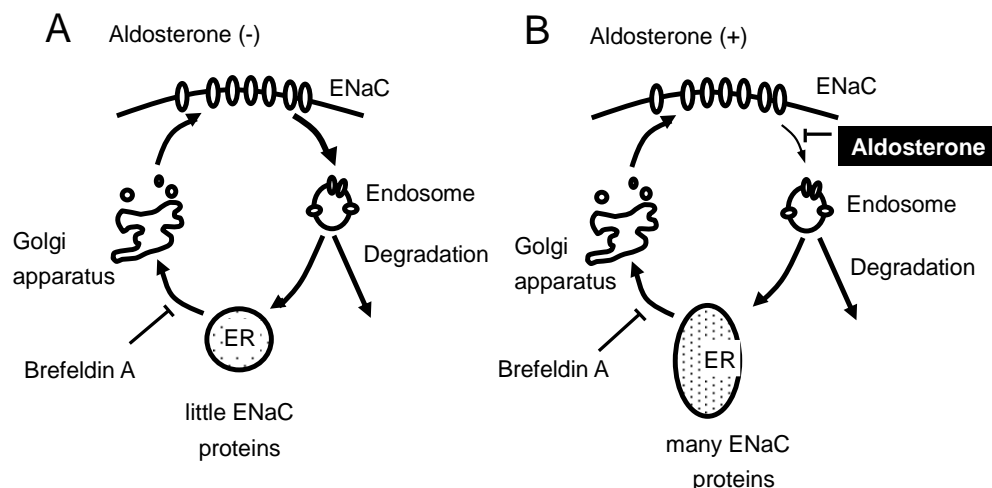


Figure 4. Aldosterone action on intracellular ENaC trafficking

Table 2. Effects of aprotinin (40 μg/ml) on ENaC trafficking

$h^{-1}$	$\alpha$	$\beta$
Control	$0.98 \pm 0.16$	$0.10 \pm 0.01$
Aprotinin	$0.39 \pm 0.03^*$	$0.19 \pm 0.03^*$

\*,  $p < 0.001$ . Control,  $n = 7$ ; aprotinin,  $n = 8$ .

### 3. 2 低浸透圧刺激惹起性 $Na^+$ 輸送に対するプロテアーゼ阻害剤の影響

プロテアーゼ阻害剤であるアプロチニン処理を行った A6 細胞において低浸透圧刺激により惹起される  $Na^+$  輸送に対するプロテアーゼ阻害剤の効果を検証した。プロテアーゼ阻害剤は、ENaC の活性(チャンネル開口確率)を減少させることは知られているが、ENaC の細胞内トラフィックに対する効果は未だ不明である。プロテアーゼ阻害剤であるアプロチニンを、低浸透圧刺激を与える1時間前に投与し、アプロチニンは低浸透圧刺激負荷後もナトリウムイオン輸送測定中も投与した。

図 5 に示すように、アプロチニン処理の細胞においては、ナトリウムイオン輸送の上昇と降下速度に違いが見受けられた。これを図 3 に示したシミュレーションを用いて定量的に評価したところ、表 2 に示す結果を得た。即ち、アプロチニンは、ENaC の細胞内貯蔵部位から管腔側膜上への移動速度を減少させ、一方、管腔側膜上に存在する ENaC の細胞内への取り込み速度は増大したという結果を得た。

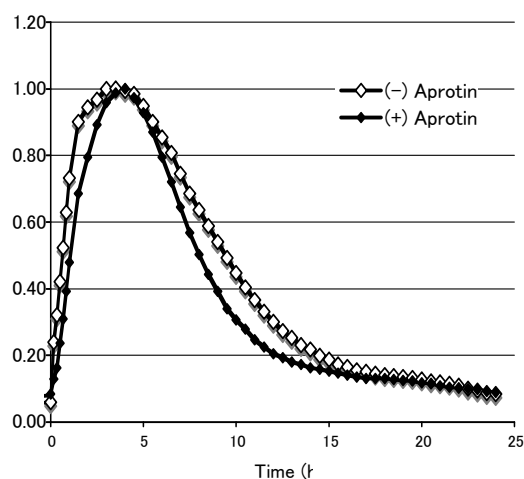


Figure 5. Effects of aprotinin (40 μg/ml) on transepithelial  $Na^+$  transport

### 4. 考察

本研究では、低浸透圧刺激による ENaC の細胞内トラフィックに対するアルドステロンおよびプロテアーゼ阻害剤の影響を解明することを目的とした。その結果、アルドステロンが管腔側膜上に存在する ENaC の細胞内取り

込み速度を低下させるという結果を得た。アルドステロンは、ENaC 産生量を増大させるのみではなく、serum gluco corticoid-indusable 1 (SGK1) の発現も増大させる<sup>6)</sup>。SGK1 は、neural precursor cell-expressed developmentally downregulated (gene 4) protein (Nedd4-2) の機能を阻害する<sup>6)</sup>。Nedd4-2 は ENaC をユビキリン化する酵素であり、Nedd4-2 の機能が阻害されることにより、ENaC は管腔側上に長時間滞在する。アルドステロンは、SGK1 発現を増大させ、Nedd4-2 機能阻害を介して、ENaC の管腔側膜上での滞在時間を延長させることが生化学的実験から示唆されていた。我々が遂行した本研究結果により、ENaC の機能面においても、アルドステロンにより管腔側膜上滞在時間の延長が観察され、しかも管腔側膜から細胞内への取り込み速度を低下させることが時間高分解能定量的測定によっても明らかとなった。

#### 参考文献

- 1) Niisato N, Van Driessche W, Liu M, Marunaka Y. Involvement of protein tyrosine kinase in osmoregulation of Na<sup>+</sup> transport and membrane capacitance in renal A6 cells. *Journal of Membrane Biology* 175: 63 - 77, 2000.
- 2) Taruno A, Niisato N, Marunaka Y. Hypotonicity stimulates renal epithelial sodium transport by activating JNK via receptor tyrosine kinases. *American Journal of Physiology (Renal Physiology)* 293: F128-F138, 2007.
- 3) Niisato N, Eaton DC, Marunaka Y. Involvement of cytosolic Cl<sup>-</sup> in osmoregulation of alpha-ENaC gene expression. *American Journal of Physiology (Renal Physiology)* 287: F932 - 939, 2004.
- 4) Niisato N, Taruno A, Marunaka Y. Involvement of p38 MAPK in hypotonic stress-induced stimulation of β- and γ-ENaC expression in renal epithelium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 358: 819-824, 2007.
- 5) Taruno A, Niisato N, Marunaka Y. Intracellular calcium plays a role as the second messenger of hypotonic stress in gene regulation of SGK1 and ENaC in renal epithelial A6 cells. *American Journal of Physiology (Renal Physiology)* 294: F177-186, 2008
- 5) Miyazaki H, Shiozaki A, Niisato N, Marunaka Y. Physiological significance of hypotonicity-induced regulatory volume decrease: reduction in intracellular Cl<sup>-</sup> concentration acting as an intracellular signaling. *American Journal of Physiology (Renal Physiology)* 292: F1411-1417, 2007.
- 6) Lee IH, Campbell CR, Cook DI, Dinudom A. Regulation of epithelial Na<sup>+</sup> channels by aldosterone: role of Sgk1. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 35: 235-241, 2008.

No. 0837

## Mechanisms of ENaC Life Time Regulated by Protease

Yoshinori Marunaka, Naomi Niisato, Hiroaki Miyazaki, Ken-ichi Nakajima, Toshiki Yamada

Department of Molecular Cell Physiology, Graduate School of Medical Science,  
Kyoto Prefectural University of Medicine

### Summary

Although it is well known that aldosterone and osmotic stress regulate the epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC)-mediated Na<sup>+</sup> transport in renal epithelial cells, no information is available on the interaction of aldosterone and osmotic stress on stimulation of ENaC-mediated Na<sup>+</sup> transport in renal epithelium. In this report, we investigated how aldosterone of 1 μM applied for 1 day modifies the action of hypotonic stress on the ENaC-mediated Na<sup>+</sup> transport in renal A6 epithelial cells by measuring the benzamil (a specific inhibitor for ENaC)-sensitive short-circuit current. Further, we studied the effect of protease inhibitor, aprotinin (40 μg/ml), on the hypotonic stress-induced benzamil-sensitive short-circuit current. This study indicates that: 1) in the cells without aldosterone treatment most ENaCs are translocated to Golgi apparatus, 2) in aldosterone-treated cells major parts of ENaCs are located at the endoplasmic reticulum, 3) the endocytosis rate of ENaCs from the apical membrane is diminished by aldosterone without any significant changes in the insertion rate of ENaCs into the apical membrane, and 4) aprotinin diminishes both the insertion rate of ENaCs into the apical membrane and the endocytosis rate of ENaCs from the apical membrane.