

アルドステロンによる上皮型ナトリウムチャネル (ENaC) タンパク寿命延長の 分子機構解明

丸中 良典, 横山 紀子, 新里 直美, 宮崎 弘明, 細木 誠之,
羽柴 光起, 山田 崇央, 橋本 保

京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学

概要 上皮型ナトリウムチャネル (Epithelial Na⁺ Channel: ENaC) タンパクを含む膜タンパクの寿命決定は、細胞内へのエンドサイトーシスの速度に依存していると考えられている。我々は、すでに ENaC の管腔側膜上からのエンドサイトーシスの速度測定法を確立し、アルドステロンが ENaC エンドサイトーシスの速度を低下させることを報告した。しかし、アルドステロンの ENaC エンドサイトーシス速度低下作用と細胞膜 (管腔側膜) 存在部位との関わり分子機構に関しては未だ不明である。

我々は、ENaC の細胞膜上の局在を検討し、コレステロールとスフィンゴ脂質に富んだ膜ドメインであるラフト部位に ENaC が局在することを見出した。その局在はアルドステロンにより変動し、ENaC の細胞質内から形質膜への移動部がラフト膜であることが示唆された。細胞外ループが切断された ENaC は、アルドステロン刺激により脂質膜ラフトドメイン以外の形質膜での局在が増えることが判明し、ENaC の活性修飾がラフト膜上で行なわれる可能性を見出した。

1. 研究目的

1.1 研究の背景

ENaC の活性調節は、主に endocytosis、degradation、recycling の速度依存的な調節を受けており、形質膜上の ENaC 発現量が Na⁺ 輸送量に大きく反映される^{1), 2)}。ENaC を含む膜タンパクの膜上の滞在時間は主に細胞内へのエンドサイトーシスの速度に依存していると考えられており、現在アルドステロンの ENaC エンドサイトーシス速度低下作用機構^{1), 2)}と細胞膜 (管腔側膜) 存在部位との関わり分子機構に関しては未だ解明されていない。形質膜には脂質ラフト部位と非ラフト部位がある。脂質ラフトとは直径 10-200 nm の不均一で非常にコレステロールとスフィンゴ脂質に富んだ膜ドメインであり秩序液体 (liquid order) であり、この部位に種々のタンパク質が集結しコンプレックスを形成することによりシグナル伝達をすることが示唆されている³⁾。ENaC はこの脂質ラフト分画に存在することが知られているが⁴⁾、その意義についての詳細に関しては未だ不明である。また、ENaC は、アルドステロン刺

激により新規合成されることが知られており、合成された ENaC は腎皮質集合管管腔側膜上に発現するが、その管腔側膜のラフト膜か非ラフト膜かの何れに埋め込まれるかは不明である。

我々は、体液量・血圧制御に重要な働きを担っている ENaC の腎集合管・管腔側膜埋め込み部位が、膜特性 (ラフト膜あるいは非ラフト膜) に依存して、ENaC の活性が調節されているという仮説を立て (図 1 参照)、本仮説を証明すべく研究を進めた。

1.2 研究目的

ENaC の活性の分子機構において脂質ラフト部位がどのように関与しているかを明確にする。

1.3 研究の意義

ENaC の詳細な分子機構解明することにより、体液量・血圧制御に重要な働きを担っている ENaC の果たす役割について明確にする。

2. 研究方法

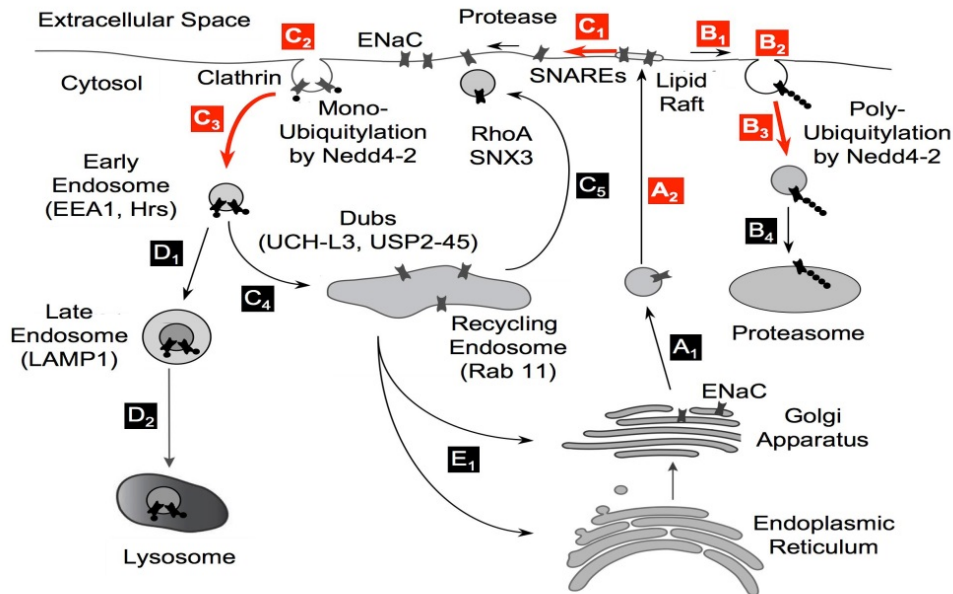


図 1. 腎集合管上皮細胞における ENaC タンパク質の細胞内トラフィックの仮説

2. 1 実験材料

ENaC を内在性に発現している集合管モデル細胞 A6 細胞を用いる。A6 細胞は、permeable support 上に培養することにより、管腔側と血管側に極性を有する(分化した)細胞とし、27°C、5% CO₂ 存在下で細胞培養した。

2. 2 ラフト分画の分離

A6 細胞を両性界面活性剤の TritonX-100 で処理し TritonX-100 不可溶化 (detergent-resistant membrane; DRM)・可溶化分画 (non-DRM) に分離する。各分画における ENaC の局在をアルドステロン刺激時/非刺激時で解析する。

2. 3 形質膜の分離

A6 細胞を遠心分離法で形質膜と細胞質に分離し、それぞれの分画における ENaC の局在をアルドステロン刺激時/非刺激時で 定量的に解析する。

2. 4 SDS-PAGE と Western blotting

Cell lysate のタンパク質は SDS-PAGE で分離した後 PVDF 膜に転写し、ENaC の各サブユニットに対する抗体を用い、ENaC のタンパク質の発現レベルを定量する。

2. 5 プロテアーゼ処理

A6 細胞をプロテアーゼ阻害剤存在下で培養し、その条件下でのラフト分画及び形質膜分画における ENaC の局在を、アルドステロン処理・未処理時で解析する。また、形質膜分画についても検討した。

2. 6 管腔形質膜からのコレステロール除去

A6 細胞の管腔側を Methyl β-cyclodextrin で処理することにより管腔側膜コレステロール含有量を低下させる。その後、細胞を採取し、TritonX-100 不可溶化・可溶化分画に分画し、ENaC の局在をアルドステロン刺激時/非刺激時で定量的に解析する。また、形質膜分画についても同様に検討した。

3. 研究結果

3. 1 各分画方法の確立

A6 細胞をラフト (DRM)、非ラフト分画 (soluble) に分離し、その分画の純度をラフト分画のマーカー蛋白質である Caveolin-1 の抗体で免疫染色した (図 2 A)。Caveolin-1 は DRM 分画のみで検出された (図 2 A)。また、細胞を形質膜 (PM) と細胞質 (CY) に分けて形質膜のマーカー酵素である Na⁺-K⁺-ATPase と細胞質のマーカータンパク質である GAPDH の抗体で染色した (図 2 B)。Na⁺-K⁺-ATPase は形質膜に、GAPDH は細胞質分画にそれぞれの存在が確認された (図 2 B)。これらの結果は分画方法が確立されたことを示している。

3. 2 アルドステロン非刺激/刺激時における ENaC の管腔膜上存在部位の検討 (図 1 A₂ 及び C₁ の過程)

細胞をアルドステロン非刺激/刺激した後、ラフト分画/非ラフト分画及び形質膜/細胞質に分離し、SDS

-PAGE と western blotting で ENaC を分離しその局在を検討した(図 3)。Full-length と管腔内プロテアーゼで切断され ENaC (70 kDa) のバンドをスキャンしそれぞれの分画における量と比率を算出した(図 4)。比率は蛋白質分布率と容量により補正した。

ENaC は、アルドステロン非刺激時においても、脂質ラフト分画におおよそ 20%局在し、その比率はアルドステロン刺激で 5-10%程増加した(図4)。しかしながら、プロテア

ーゼで切断された ENaC (70 kDa) のラフト上局在変動はみられなかった(図 4)が、形質膜上では著明に増加していた(図 5)。また、ENaC 発現量は、アルドステロン刺激により full-length、70 kDa 共に増加がみられたが、full-length と 70 kDa の形質膜への増加量は顕著ではなく、一方プロテアーゼで切断された ENaC (70 kDa) の形質膜での増加は約 1.8 倍と大きかった(図 5)。これらのことは、プロテアーゼで切断された ENaC は形質膜の非ラフト分画に trafficking されることを示唆している。

これら ENaC のアルドステロン刺激に伴う量的及び局在の変動を総合して解析した結果を図 6 に示す。形質膜 (DRM + non-DRM) 分画でのアルドステロン刺激による full-length の ENaC の増加比率は小さいが、アルドステロン刺激で増加した full-length の ENaC は増加分の主な局在はラフト分画であった (blue で表示, 図 6)。一方、プロテアーゼで切断を受けた ENaC は逆にラフト分画での増加率は 1.2 倍と非常に小さく、形質膜 (DRM + non-DRM) での増加部位としては主に非ラフトであることが示唆された(図 6: pink で示された部分; 約 2 倍)。これらのことを総合的に解析すると、full-length の ENaC は形質膜ラフト分画に取り込まれ、プロテアーゼで切断された後に ENaC はラフト分画から形質膜上の非ラフト分画へ移動すると考えられる。

A Raft preparation



B Plasma membrane preparation

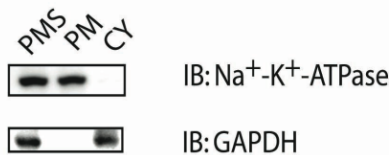


図 2. 各分画方法の確立

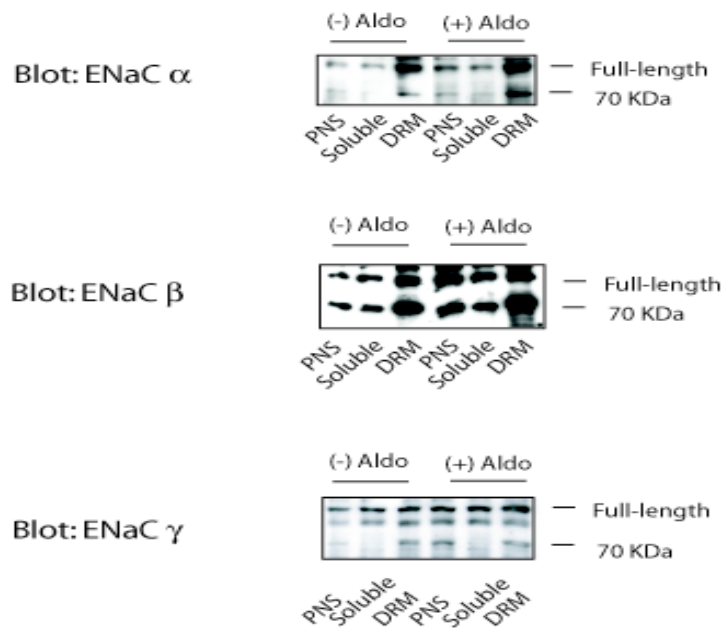


図 3. ラフト分画における ENaC の検出

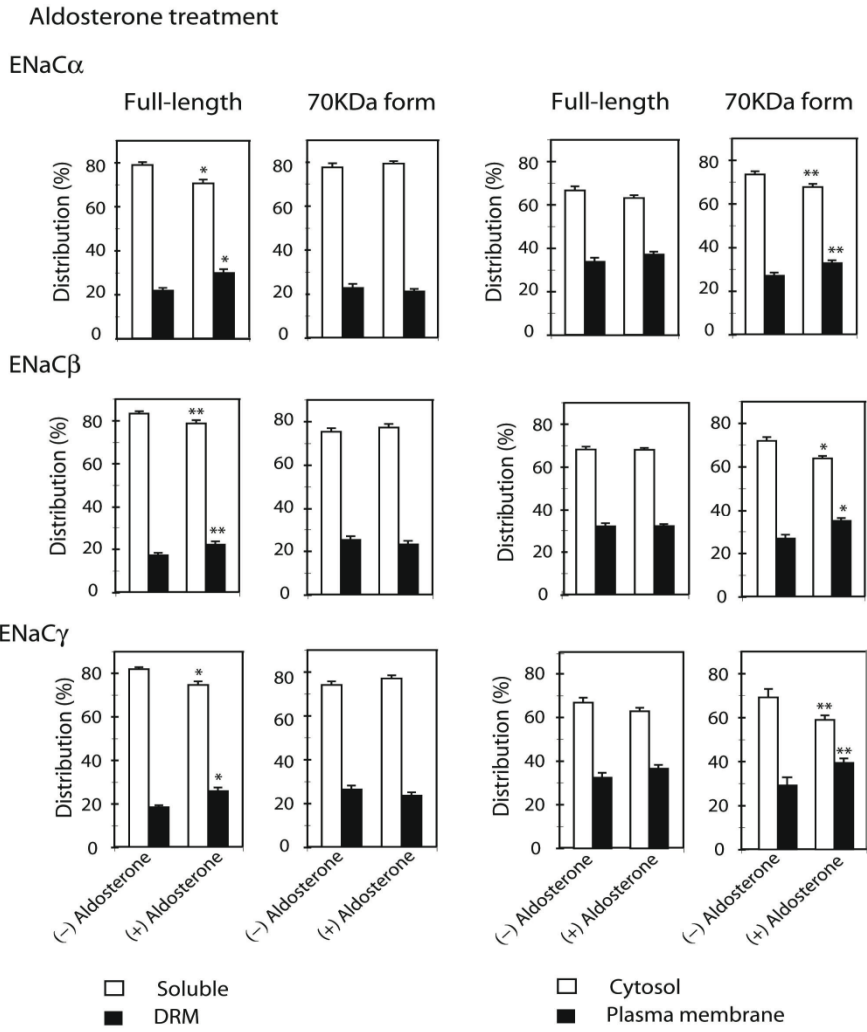


図 4. ENaC のアルドステロン刺激/非刺激時における細胞内での局在

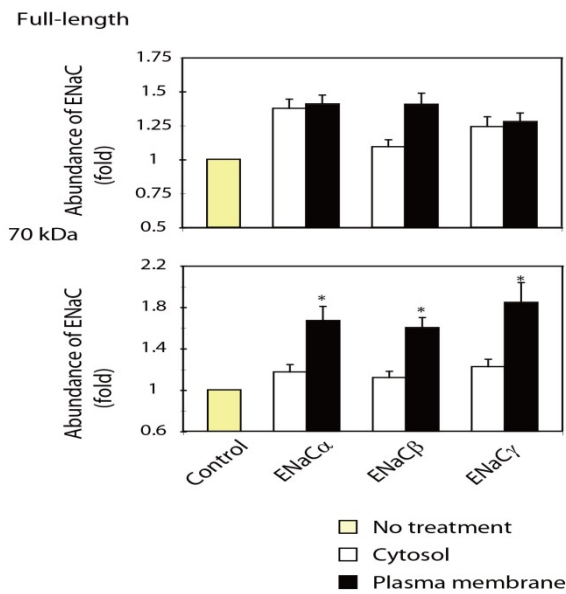


図 5. 形質膜/細胞質分画におけるアルドステロン刺激による ENaC の変動

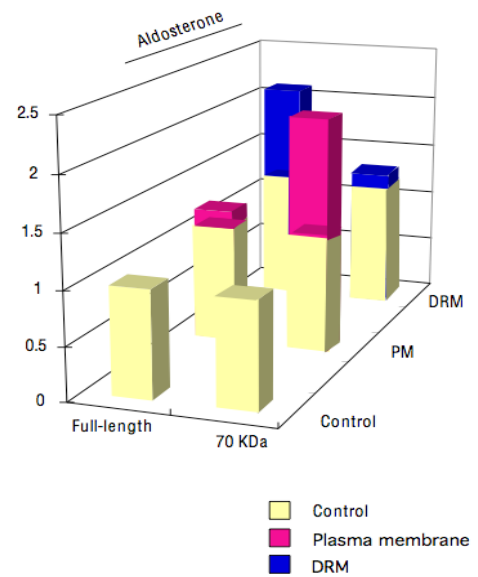


図 6. ENaC 活性化分子機構

3.3 プロテアーゼ阻害剤の ENaC の局在への影響

細胞を管腔内プロテアーゼ阻害剤 (aprotinin, 50 $\mu\text{g/ml}$) で処理し、ENaC の局在を検討した (図 1 C₁ の過程)。

またプロテアーゼ阻害剤存在下でアルドステロンにより刺激し、アルドステロンの ENaC 活性化に対する阻害剤の影響を検討した。細胞内の Full-length 及び 70 kDa の ENaC は、aprotinin 処理により増加しその割合は各サブユニットで異なっていた。プロテアーゼで切断されていない full-length の ENaC はラフト分画での局在が増加した (図 7)。

3.4 形質膜コレステロールの ENaC の分子機構に対する影響

管腔側膜脂質ラフト膜構成成分であるコレステロール量変化により ENaC の局在が如何に影響を受けるかを検証した。A6 細胞をアルドステロンで刺激/非刺激後、20 mM methyl β -cyclodextrin で処理し形質膜ラフトからラフト構造維持に必須であるコレステロールを除き、形質膜ラフト/非ラフト分画を調製し ENaC の分布を分析した (図 8)。同時に形質膜/細胞質も分画し、それぞれの ENaC の分布を分析した (図 9)。

形質膜脂質ラフト分画の ENaC の局在は、コレステロールを形質膜から除くことにより、著明に阻害を受けた (図 8)。プロテアーゼで切断された ENaC 70 kDa の局在にも

同様の効果がみられた。このようにコレステロールを形質膜から除外すると、アルドステロン刺激による脂質ラフト分画での full-length の ENaC の増加が抑制され、また形質膜上のプロテアーゼで切断された ENaC (70 kDa) のアルドステロン刺激による増加も抑制を受けた (図 8, 9)。Methyl β -cyclodextrin 処理により、アルドステロン刺激による 70 kDa の形質膜上の ENaC 量は約 1.6-1.8 倍から 1.2 倍にまで減少した (図 10)。

これらのことは、コレステロール除去がアルドステロン刺激による ENaC の活性化過程 (ラフト分画への full-length ENaC の及び形質膜非ラフト分画へのプロテアーゼで切断された ENaC の trafficking) を阻害することを示唆しており、ラフト分画が ENaC 活性調節に重要な役割を担っていることを示している。このことは我々が立てた仮説「刺激時 (アルドステロン) の管腔側膜上 ENaC の移動過程 - ENaC は、形質膜脂質ラフトに埋め込まれた後、アルドステロンにより分泌刺激を受けた管腔内プロテアーゼにより細胞外ループの一部がクリベッジ (切断/開裂) され、ラフトより非ラフトへと移動する (C₁)」が正しいことを示唆している。

3.5 ラフト分画での ENaC タンパクの修飾

形質膜上ラフト分画での ENaC 活性調節の機構を解明するために、ENaC の修飾蛋白質であるユビキチン化酵

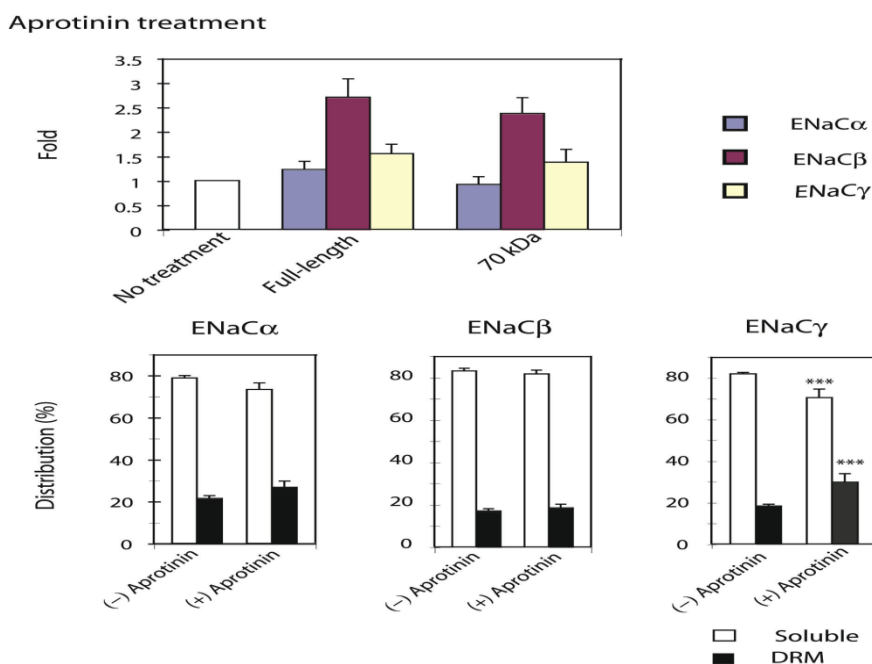


図 7. プロテアーゼ阻害剤の ENaC への影響

Methy β -cyclodextrin treatment

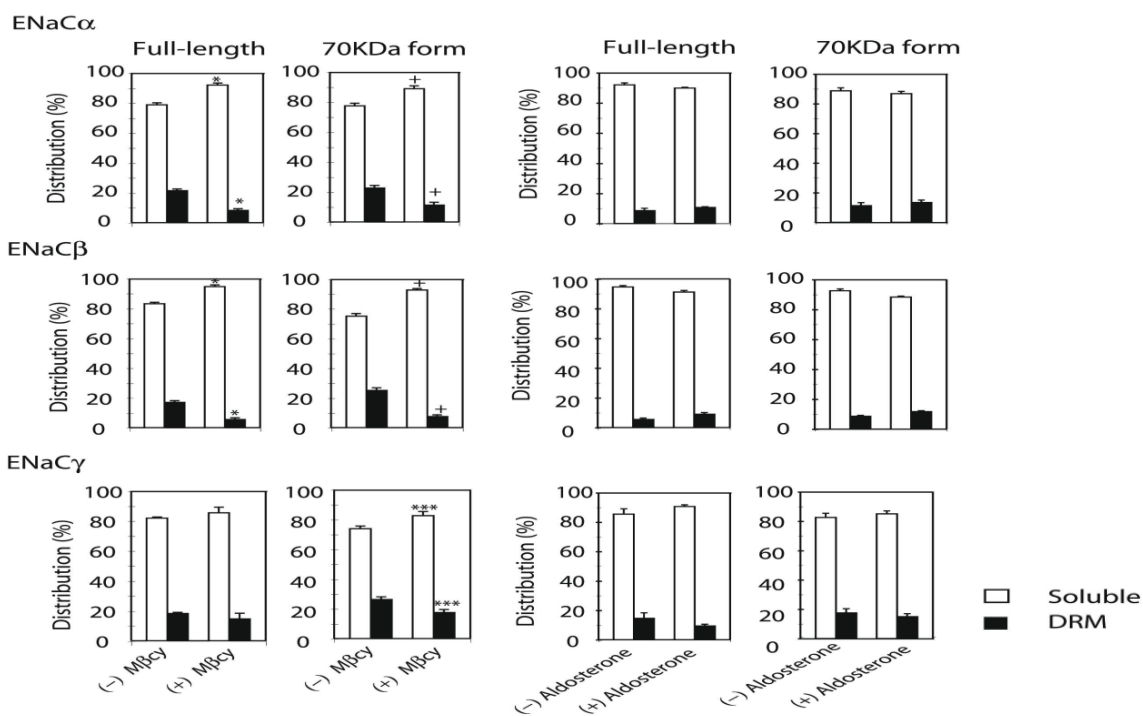


図 8. コレステロール除去の ENaC 局在に対する影響

Methy β -cyclodextrin treatment

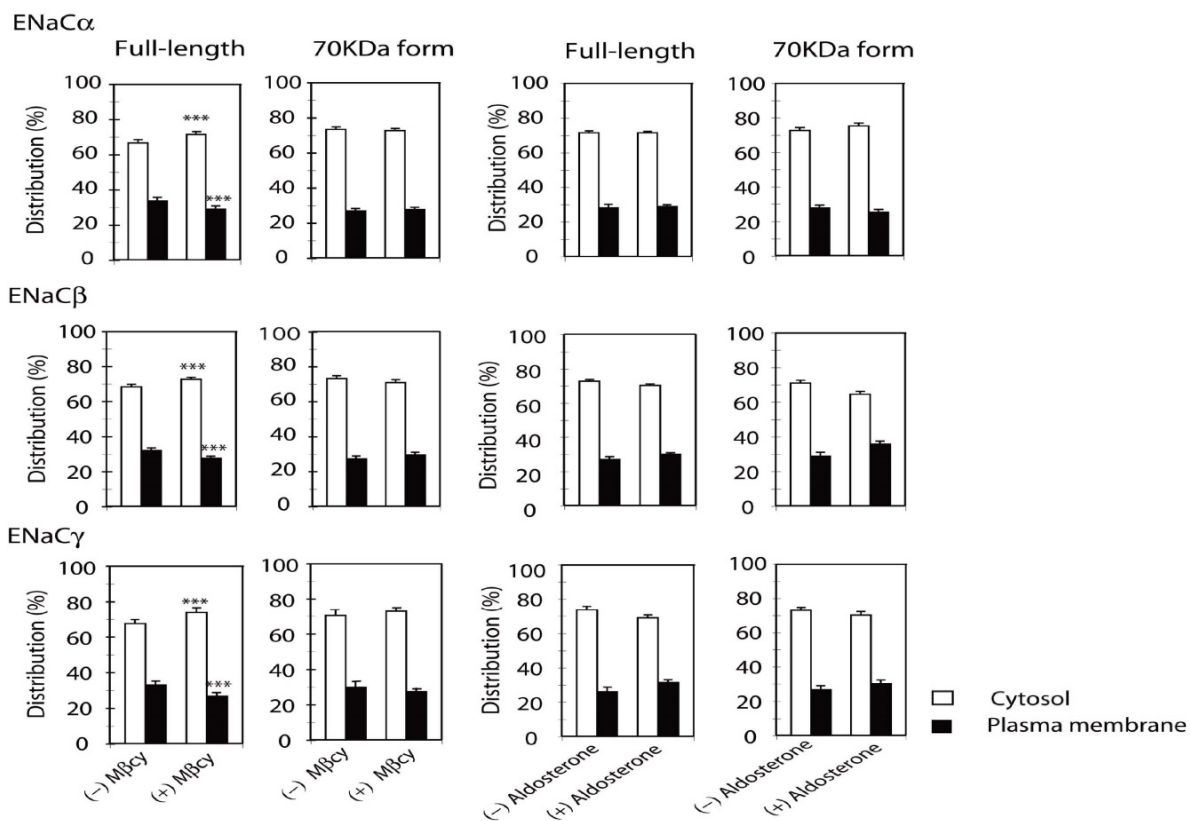


図 9. コレステロール除去の形質膜／細胞質分画における ENaC 局在に対する影響

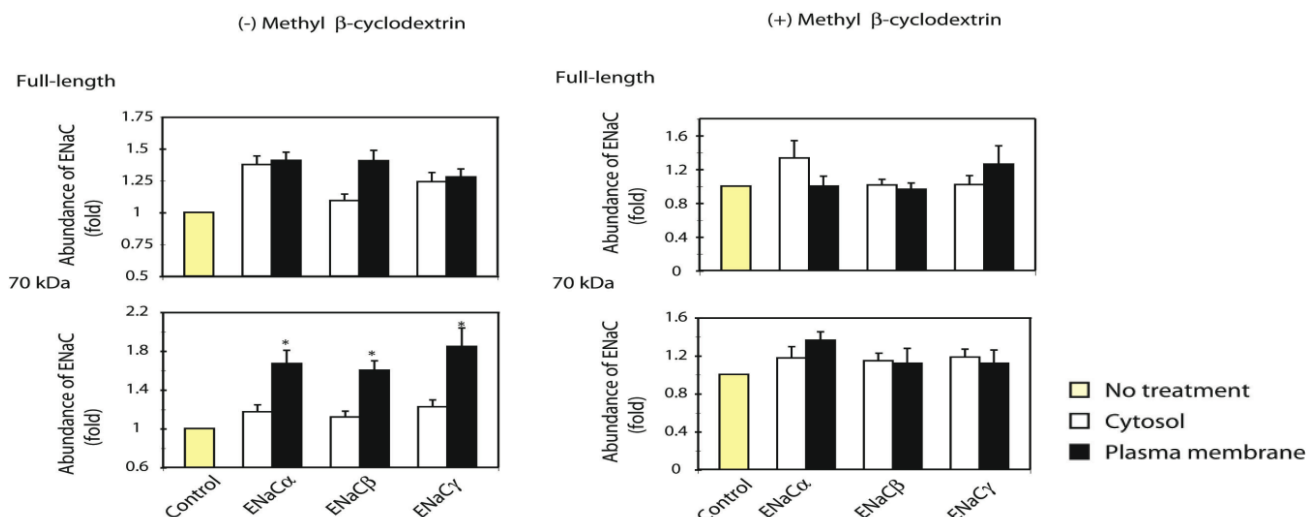


図 10. コレステロール除去が形質膜 ENaC 量に対する影響

素である Nedd4-2 と Nedd4-2 のユビキチン化能力を不活性化する酵素である SGK1 の影響と ENaC 局在との関連性について検討した。

ラフト分画における Nedd4-2 はアルドステロン処理により著明に増加し(図 11)、しかもユビキチン化能力低下の指標である Nedd4-2 のリン酸化レベルは上昇している(図 11)ことから、ラフト分画において増加した Nedd4-2 は非活性化型の Nedd4-2 であることが判明した。このことは、形質膜ラフト分画における ENaC のユビキチン化は、アルドステロン刺激で抑制されることを示している。すなわち、アルドステロンによる ENaC のエンドサイトーシス低下による寿命延長の分子メカニズムとして、ラフト膜における NEDD4-2 の不活性化が関与していることを示唆したものである。さらに、Nedd4-2 をリン酸化することにより Nedd4-2 の不活性化を引き起こす酵素である SGK1、特にその活性化型であるリン酸化 SGK1 のラフト分画への局在が、アルドステロンにより Nedd4-2 と同様に著明に増大することも明らかとなった(図 11)。これらのことは、ENaC 寿命に大きな影響を有する Nedd4-2、更には Nedd4-2 の活性を調節する SGK1 が、アルドステロンによりラフト膜への局在増大が引き起こされることから、形質膜ラフトは ENaC 寿命決定制御の場として重要であることを強く示唆され、ラフト分画が ENaC 分子機構において重要な役割を果たすと言う新しい知見が得られた。

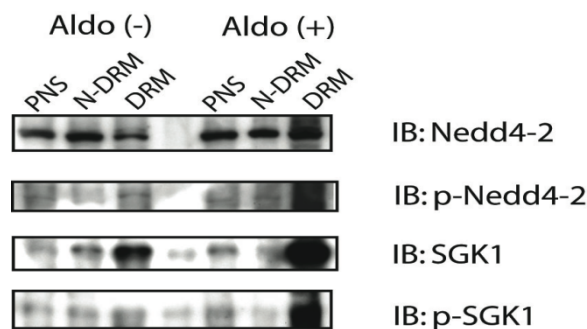


図 11. ラフト分画における ENaC の修飾

文献

- 1) Taruno A, Marunaka Y (2010) Analysis of blocker-labeled channels reveals the dependence of recycling rates of ENaC on the total amount of recycled channels. *Cell Physiol Biochem* 26: 925-934.
- 2) Niisato N, Taruno A, Marunaka Y (2007) Aldosterone-induced modification of osmoregulated ENaC trafficking. *Biochem Biophys Res Commun* 361: 162-168
- 3) Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol Cell Biol* 1, 31-39.
- 4) Hill WG, An B, Johnson JP (2002) Endogenously expressed epithelial sodium channel is present in lipid rafts in A6 cells. *J Biol Chem* 277: 33541-33544.

Molecular Mechanism of Aldosterone Action on Epithelial Sodium Channel (ENaC)

Yoshinori Marunaka, Noriko Yokoyama, Naomi Niisato, Hiroaki Miyazaki, Shegekuni Hosogi,
Mitsuoki Hashiba, Takahiro Yamada, Tamotsu Hashimoto

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

Summary

It has been considered that the activity of ENaC mainly depends on the number of ENaC at the plasma membrane. Previously we have reported that stimulation with aldosterone decreases the rate of ENaC endocytosis. In this study we have quantified the abundance and localization of ENaC in raft domain as well as plasma membrane with/without aldosterone stimulation. Aldosterone stimulates increases in full-length ENaC and cleaved of ENaC in cells. Localization of full-length ENaC in raft domain increases following stimulation with aldosterone, although aldosterone has no effect on the localization of the cleaved form of ENaC. On the other hand the increase in cleaved form of ENaC at the plasma membrane is obvious in response to aldosterone stimulation. Furthermore the localization of full-length ENaC at the plasma membrane is not altered by stimulation with aldosterone. Depletion of cholesterol from the raft domain diminishes the aldosterone action, suggesting important roles of the raft domain in the regulation of ENaC activity. We have also demonstrated that the modification of ENaC such as ubiquitination and phosphorylation occurs in raft domain. Together, these data demonstrate the important roles of the lipid raft domain on the regulation of ENaC trafficking/activity.