

腎電解質・水再吸収における細胞膜-細胞骨格リンカータンパク質 Moesin の生理的な役割についての解析

波多野 亮, 川口 高德, 浅野 真司

立命館大学薬学部分子生理学

概要 本研究において、研究代表者らは細胞膜-細胞骨格クロスリンカーとしての機能を有する Moesin の腎臓での電解質・水再吸収調節における生理的な役割の解明について遺伝子改変マウスを用いて個体レベルで実施した。これまでに *in vitro* での研究により Moesin が腎尿細管ヘンレ上行脚に発現する NKCC2 (Na-K-Cl cotransporter) や腎集合管に発現する Aquaporin 2 (AQP2) の細胞膜における発現制御に関わっている可能性が報告されていた。Moesin は ERM (Ezrin-Radixin-Moesin) タンパク質ファミリーに属する細胞膜タンパク質やアクチン細胞骨格への結合能を有するタンパク質の一つであるが、生体内における生理的な役割は十分に解明されていない。そこで本研究において、改めて腎臓における Moesin の生理的役割を検討した。

Moesin 欠損マウスは従来の報告と同様に見かけ上明らかな異常は見られなかったが、代謝ケージを用いた尿代謝解析により尿中への電解質 (Na⁺, K⁺, Cl⁻) 喪失が見られる事を新たに見出した。加えて、軽度の低血圧と糸球体濾過量の低下を示す事も明らかとなった。血漿 Na⁺, K⁺ 濃度には有為な変化は見られなかったが、血漿 Cl⁻ 濃度は軽度上昇を示した。前述の尿中への塩分喪失は体液量喪失を伴う可能性があり、血圧の低下や糸球体濾過の減少を生じている可能性が考えられた事から、水分負荷を行ったところ約半数の Moesin 欠損マウスが低ナトリウム血症を呈する事が明らかとなった。従って、*in vitro* での研究に示唆されているようにヘンレ上行脚における NKCC2 (Na-K-2Cl-cotransporter 2) の細胞膜発現異常が生じている可能性が想定された。更に、ヘンレ上行脚において Moesin が NKCC2 と共局在していることを確認し、Moesin の欠損によって NKCC2 のアピカル膜における局在の低下が見られる事を新たに確認した。

本研究成果は、Moesin が腎臓での塩分再吸収において最も重要な役割を担う NKCC2 の機能制御において重要な役割を果たす可能性を示唆しており、より詳細な制御機構の解明が腎尿細管ヘンレ上行脚での塩分再吸収の全体像の理解において重要になるものと考えられる。又、Moesin の欠損は軽度の Bartter 症候群様症状を呈するものとも考えられ、ヒトにおいて既知の原因遺伝子との関連性のない患者において新たな原因となっている可能性も考えられる。

1. 研究目的

Moesin は ERM ファミリータンパク質の一つであり、細胞膜とアクチン細胞骨格を繋ぐクロスリンカーとしての機能を有したタンパク質である。N 末端側には細胞膜タンパク質やフォスファチジルイノシトール-4,5-ニリン酸 (PIP₂) と結合能を有する FERM (Band4.1(F), Ezrin(E), Radixin(R), Moesin(M)) ドメインを持ち、C 末端側にはアクチン結合ドメインを有している (Figure 1)。¹⁾ 更に、ERM タンパク質は細胞内において、不活性型 (dormant form) と活性型

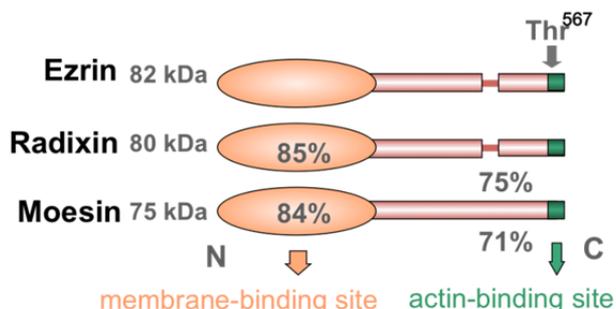


Figure 1. Domain structures of ERM (Ezrin-Radixin-Moesin) proteins.

(active form)の大きく2つのコンフォメーションをとっており、C末端側の Threonine のリン酸化によって活性調節が為されている¹⁾。ERM タンパク質は非常に高いアミノ酸配列相同性を有しており、多くの培養細胞を用いた研究では互いに相補的な役割を果たしている事が示唆されているが²⁾、生体内においてはこれらのタンパク質は必ずしも同一の組織や細胞には発現しておらず、それぞれ異なった役割を持っている事が想定される³⁾。近年の遺伝子改変動物を用いたいくつかの研究からも、これらのタンパク質の生物学的な重要性はそれぞれ大きく異なっている事も明らかとなっており、個々のタンパク質に関するより詳細な生理的役割の解明が必要である。Ezrin の null ノックアウトマウスは離乳期前に死にいたるが、Radixin や Moesin の欠損マウスではそのような重篤な異常は見られない⁴⁾⁶⁾。Ezrin の欠損マウスでは腸管の microvilli 形成の異常を伴う事⁴⁾や、胃における胃酸分泌小胞の膜融合の異常⁷⁾、腎臓におけるリン酸再吸収に異常が見られる事などが報告されている⁸⁾。一方、Radixin は肝臓の毛細胆管において高い発現を示す事から肝臓での研究が進められており、Radixin の欠損マウスは成体期にはDubin Johnson症候群に類似した高ビリルビン血症を伴う肝機能障害を発症する事が報告されている⁵⁾。これらに対して、Moesin に関しては遺伝子欠損マウス作製時には構造上も生理機能上もこれといった異常は見受けられなかった⁹⁾。近年の研究では、平常時には顕著な異常は見受けられないものの、肺や肝臓において病態発症時に Moesin の欠損による影響が見受けられる事が報告されている⁹⁾¹⁰⁾。このような点からも、生体機能の恒常性維持において Moesin がどの程度必要不可欠なものであるかどうかは十分に解明されておらず、その他の臓器での機能などの解析も含めた更なる検討が必要であるものと考えられる。

腎臓における ERM タンパク質の機能については *in vitro*, *in vivo* の実験を通じて様々な研究が行われているがその多くが Ezrin に関する研究であり、Radixin や Moesin に関する研究はほとんど行われていなかった。近年、CarmosinoらのグループによってNKCC2や集合管の水再吸収を担うAquaporin2の機能調節分子としてのMoesinの役割についての研究が行われており¹¹⁾¹²⁾、Moesinが腎機能制御において何らかの役割を果たす事が示唆されている。しかし、前述のようにこれまで Moesin

欠損マウスにおいてもNKCC2やAQP2の機能調節異常を伴うような症状は報告されておらず、実際に *in vivo* において Moesin がそのような生理的役割を果たしているかどうかは検討の必要がある。そこで本研究においては、Moesin の腎電解質・水分再吸収における *in vivo* での役割を明らかにし、Moesin を介した新たな電解質・水再吸収調節機構の存在を解明する目的で研究を実施した。

2. 研究方法

2.1 Moesin 欠損マウスの腎生理機能の解析

成体の野生型及び Moesin 欠損マウスを用いて、代謝ケージを利用した腎生理機能の解析を実施した。自由飲水で正常食を与えた際の1日当りの水分摂取量、尿量を測定した。また、採取した尿を用いて尿中電解質濃度(Na⁺, K⁺, Cl⁻)、クレアチニン濃度を測定し、1日当りの総電解質排泄量及び、尿中の電解質/クレアチニン比を算出した。5~10日間の経過観察後、マウスの血液及び尿を採取して血漿中及び尿中の電解質・クレアチニン濃度を測定し、電解質の尿中分画排泄率(Fractional Excretion)を算出した。

2.2 マウスの血圧測定

マウスの血圧測定はTail cuffを用いた非観血的血圧測定法によって実施した。平常時の収縮期血圧(SBP)、拡張期血圧(DBP)、心拍数(HR)を計測した。

2.3 腎糸球体濾過量の測定

マウスの腎糸球体濾過量をFITC-inulin bolus injection法を用いて測定した。FITC 標識したイヌリンを尾静脈より静脈内投与し、経時的な採血を行った。血中のFITC-inulinの残存量を蛍光測定し、血中消失時間をモニタリングした。血液から組織への分布相と腎臓からの尿中消失相の2-コンパートメントモデルを用いて糸球体濾過量を算出した。

2.4 免疫組織染色によるNKCC2の局在解析

抗NKCC2抗体、抗Moesin抗体等を用いて免疫蛍光染色によりこれらのタンパク質のTALHにおける細胞内局在を検討した。

2.5 Western blotによる腎髄質NKCC2の発現量の変動に関する解析

マウス腎髄質組織を採取し、粗膜画分を調製してWestern blotを行った。

3. 研究結果

3.1 Moesin 欠損による血液及び尿の生化学値への影響

Moesin 欠損マウスでは血漿中 Cl⁻濃度にわずかな違いが見られたが、血漿中 Na⁺濃度、K⁺濃度には大きな異常は認められなかった (Table 1)。血漿中クレアチニン濃度に関しても違いは見られず、腎不全などのような明らかな腎障害は生じていない事が示唆された (Table 1)。また、一日当りの尿量は Moesin 欠損マウスでわずかに少ない

傾向が見られた。尿中の Na⁺、K⁺、Cl⁻の濃度及び総排泄量は野生型と Moesin 欠損マウス間では有意な差は認められず、同様に尿浸透圧についても差は見られなかった (Table 1)。しかし、血漿中及び尿中クレアチニン濃度を元に Na⁺、K⁺、Cl⁻の分画排泄率を算出したところ、それぞれ有意に上昇している事が明らかとなった (Figure 2)。このことから、糸球体濾過された電解質物質の何らかの再吸収障害が腎尿細管で生じている事が示唆された。

Table 1. Biochemical parameters in plasma and urine from WT (wild-type) and Moesin knockout (Msn KO) mice.

	WT	Msn KO
N	12	13
Plasma		
Na ⁺ , mmol/L	150.6 ± 0.7	151.9 ± 0.5
K ⁺ , mmol/L	6.7 ± 0.5	6.5 ± 0.4
Cl ⁻ , mmol/L	112.4 ± 0.7	115.5 ± 1.0
Creatinine, mg/dL	0.22 ± 0.03	0.25 ± 0.03
Urine		
Volume, mL/day	1.37 ± 0.15	1.12 ± 0.12
Osmolality, mOsm/kg/H ₂ O	3481 ± 560	3471 ± 330
Na ⁺ , mmol/L	111.3 ± 17.1	128.1 ± 11.9
K ⁺ , mmol/L	114.2 ± 19.3	160.4 ± 24.4
Cl ⁻ , mmol/L	84.0 ± 11.5	86.7 ± 5.5

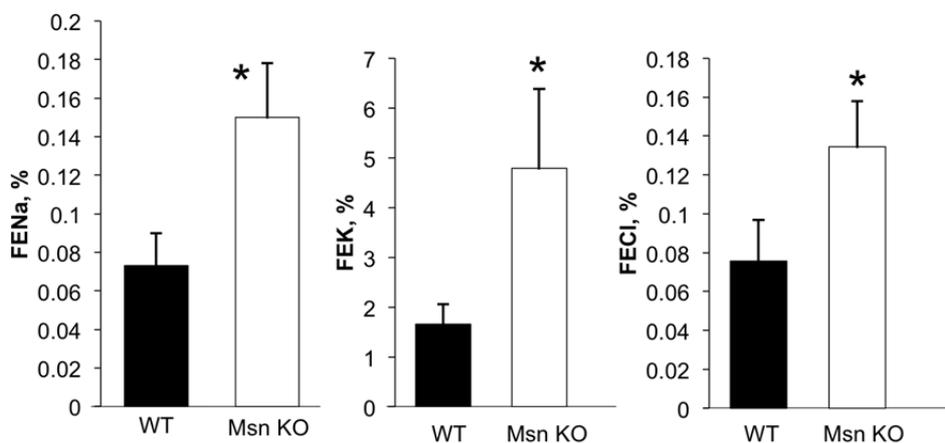


Figure 2. Fractional excretion rate of electrolytes (Na⁺, K⁺, and Cl⁻) into urine.

3. 2 Moesin 欠損による血圧調節に与える影響

Moesin の欠損に伴って、尿中への電解質の漏出傾向が生じる事が明らかだったため全身の体液量調節に与える影響を評価する目的で tail cuff法により血圧測定を行った。心拍数に関しては野生型マウスと Moesin 欠損マウス間で有意な差は認められなかった (Figure 3)。一方で、収縮期血圧、拡張期血圧共に野生型マウスに比べて Moesin 欠損マウスで有意に低下している事が明らかとなった (Figure 3)。心拍数には変化が見られない事から、心臓の機能異常によるものではなく腎臓での体液調節機能の異常と関連している可能性が考えられる。

3. 3 Moesin 欠損による糸球体濾過量に与える影響

尿量や尿中の電解質総排泄量には明らかな違いが見られない事から、Moesin 欠損マウスでは糸球体濾過量が低下している可能性が予想された。そこで、FITC-inulin を用いた覚醒時の腎糸球体濾過量測定法により野生型及び Moesin 欠損マウスの糸球体濾過量を算出し、比較した。

その結果、Moesin 欠損マウスにおいて有意な糸球体濾過量の低下を認めた (Figure 4)。このことは前項の血圧低下などとも密接に関係しており、腎尿細管での電解質再吸収の低下によって引き起こされる体液喪失を防ぐ為の代償機構の一つとして生じている可能性が想定される。

3. 4 水負荷による Moesin 欠損マウスの体内電解質動態への影響

Moesin 欠損マウスでは尿中への電解質喪失傾向を防ぐ為に代償的に血圧の低下や糸球体濾過量の低下を引き起こしている可能性が考えられ、慢性的に脱水傾向にある事が想定された。そこで水分を十分に与えた時に、電解質バランスに影響が見られるかどうかについて検討を行った。3% sucrose 含有水を与えることで十分な水分摂取条件にした後、血液を採取して血中電解質濃度測定を行ったところ、個体間でばらつきがあるものの Moesin 欠損マウスのうち約 44%の頻度で 145 mEq/L 以下の低 Na 血症が見られる事が明らかとなった。

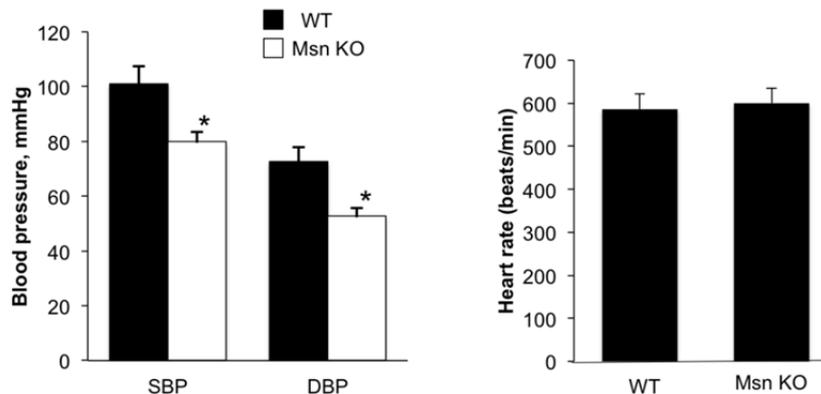


Figure 3. Heart rate, systolic and diastolic blood pressure (SBP and DBP) in WT and Msn KO mice at basal condition.

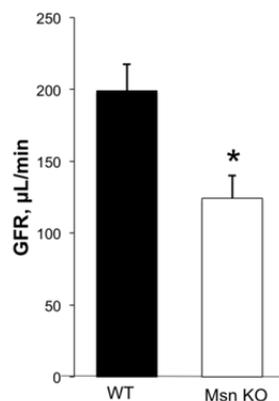


Figure 4. Glomerular filtration rate in WT and Msn KO mice.

3. 5 Moesin 欠損による TALH 細胞での NKCC2 発現に与える影響

Carmosinoらの報告からもNKCC2のアピカル膜表面へのトラフィックングにおいてMoesinが関与している可能性が示唆されており¹¹⁾、これまでの個体レベルでのMoesin欠損マウスの表現型からもMoesinがNKCC2の膜局在に影響を与えている可能性が考えられる。一方で同グループのTammaらはMoesinが腎集合管においてAQP2のトラフィックングに関わっている可能性も指摘しており¹²⁾、AQP2の局在に異常が見られる場合は腎性尿崩症様の症状を呈する事が予想され、Moesin欠損マウスの表現型と

は異なっている。このような点から、免疫蛍光染色により改めて腎尿細管におけるMoesinの局在を調べたところ、Moesinは腎髄質においては主にNKCC2を発現するTALHに存在していた(**Figure 5**)。更に、TALHにおいて野生型とMoesin欠損マウス間でのNKCC2の局在を調べたところ、野生型に比してMoesin欠損マウスでApical膜上におけるNKCC2発現の低下傾向と、細胞内における小胞状の染色像の増加を認めた(**Figure 6**)。これらの結果はMoesinがNKCC2のTALH細胞における細胞内局在制御に重要な役割を果たしている事を示唆している。

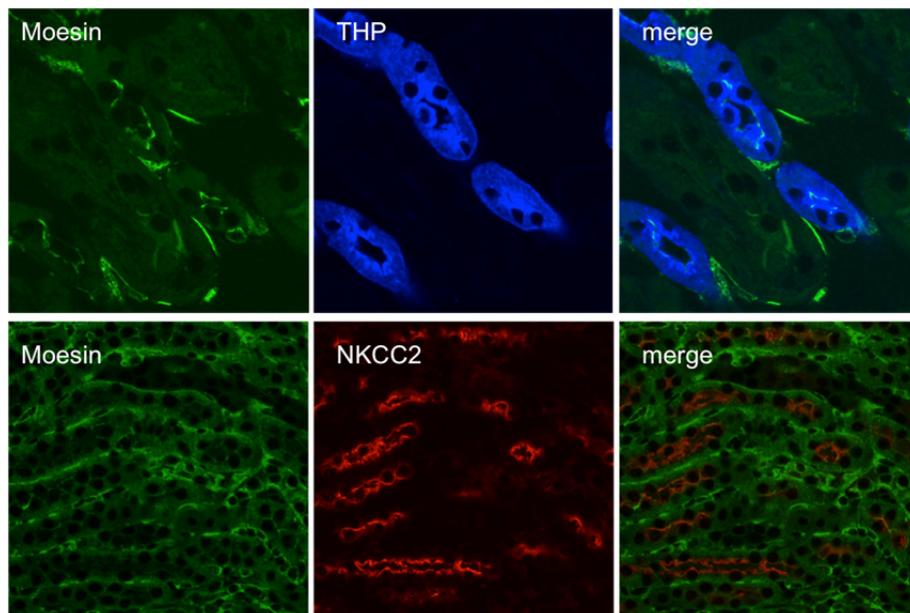


Figure 5. Immunofluorescent stainings for Moesin, NKCC2, and THP (Tamm-Horsfall Protein) in mouse kidney.

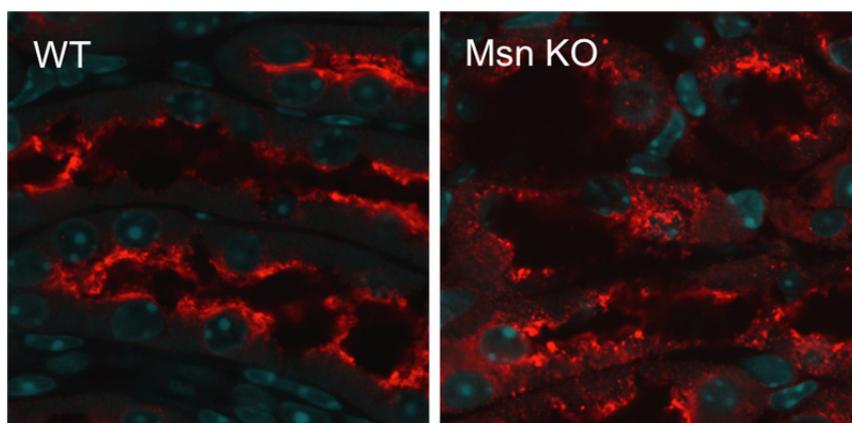


Figure 6. Apical membrane localization of NKCC2 was disturbed in Msn KO mice.

4. 考察と今後の課題

本研究において、研究代表者らは Moesin 欠損マウスにおいて尿中の電解質喪失を伴う体液量調節異常が生じている事を見出した。Moesin 欠損マウスにおいて見られるような塩分喪失性の症状は Bartter 症候群に代表される塩分喪失性尿細管機能異常症と大きな関わりがある可能性が考えられるが、NKCC2 の遺伝性変異によって生じる I 型の Bartter 症候群に比べると重症度が低いものであった¹³⁾。NKCC2 欠損マウスでは、生後間もなく腎不全を生じて死に至ることが報告されている。一方で、II 型の Bartter 症候群の原因遺伝子として K⁺チャネルである ROMK (Renal Outer Medullary K⁺ channel) の欠損マウスでは生存の頻度が NKCC2 欠損マウスに比べるとやや高く、血圧の低下や糸球体濾過量の低下を認めるなど Moesin 欠損マウスと類似した症状を呈する事が報告されている¹⁴⁾。本研究において Moesin 欠損マウスでは見かけ上は NKCC2 の欠損マウスに見られるような重度の塩分喪失性尿細管機能異常は見られなかったが、代謝ケージを用いた解析から尿中への電解質の喪失が生じている事を明らかにした。慢性的な尿中への電解質の喪失は重篤な腎障害を引き起こす恐れがあるが、Moesin 欠損マウスでは比較的軽度であり糸球体濾過を低下させる事で尿中への過度な漏出を防いでいる可能性が予想される。尿細管管腔中の電解質濃度の変化は腎皮質に存在するマクラデンサ細胞で NKCC2 を介して感知しており、尿細管-糸球体フィードバックと呼ばれ遠位尿細管での電解質の状態を反映して糸球体濾過量のフィードバック調節を行う機構である。ここでの NKCC2 の発現も腎髄質同様に Moesin の欠損によって同様の影響を受けている可能性も考えられ、今後の検討課題の一つである。

Bartter 症候群の原因に関わる主たる分子は NKCC2 であるがその活性調節に関わる様々な分子の異常も Bartter 症候群の原因となっており、その遺伝子異常は I 型から V 型まで分けられている。これらの調節因子の機能異常は NKCC2 の直接的な異常に比べて重症度が低い傾向にある。Moesin は免疫染色からも分かるようにアピカル膜における NKCC2 の局在制御に関わるが、100%欠損しても全ての NKCC2 がアピカル膜に局在出来なくなる訳ではないことから、部分的な調節因子の一つであると考えられる。NKCC2 のこのようなアピカル膜発現に関わる分子として、

これまでに SCAMP2 (Secretory Carrier Membrane Protein 2) や Anxin A2、MAL (Myelin and Lymphocyte-associated protein)/VIP17 (Vesicle integral Protein of 17kDa)、Aldolase B、SPAK-OSR1 などのような様々な分子が同定されている¹⁵⁾。同時に、ショウジョウバエでは Moesin は小胞輸送に関わる低分子量 GTPase の一つである Rab11 と相互作用をすることなども報告されており¹⁶⁾、このようなタンパク質との相互作用を通じて、最終的なアピカル膜における NKCC2 の細胞膜局在を制御している可能性が想定される。

Moesin がどのようなメカニズムで NKCC2 の TALH 細胞内の局在を制御しているかを明らかにする必要がある。TALH 細胞において Moesin が他のどのような分子と機能的に共役して NKCC2 の発現を制御するのかとすることに焦点を当てたより詳細な研究が必要であると考えられる。

文献等

1. Tsukita S, Yonemura S. Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J Biol Chem.* 274(49): 34507-34510, 1999.
2. Fehon RG, McClatchey AI, Bretscher A. Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(4): 276-287, 2010.
3. Sato N, Funayama N, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites. *J Cell Sci.* 103:131-143, 1992.
4. Saotome I, Curto M, McClatchey AI. Ezrin is essential for epithelial organization and villus morphogenesis in the developing intestine. *Dev Cell.* 6(6): 855-864, 2004.
5. Kikuchi S, Hata M, Fukumoto K, Yamane Y, Matsui T, Tamura A, Yonemura S, Yamagishi H, Keppler D, Tsukita S, Tsukita S. Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes. *Nat Genet.* 31(3): 320-325, 2002.
6. Doi Y, Itoh M, Yonemura S, Ishihara S, Takano H, Noda T, Tsukita S. Normal development of mice and unimpaired cell adhesion/cell motility/actin-based

- cytoskeleton without compensatory up-regulation of ezrin or radixin in moesin gene knockout. *J Biol Chem.* 274(4): 2315-2321, 1999.
7. Tamura A, Kikuchi S, Hata M, Katsuno T, Matsui T, Hayashi H, Suzuki Y, Noda T, Tsukita S, Tsukita S. Achlorhydria by ezrin knockdown: defects in the formation/expansion of apical canaliculi in gastric parietal cells. *J Cell Biol.* 169(1): 21-8, 2005.
 8. Hatano R, Fujii E, Segawa H, Mukaisho K, Matsubara M, Miyamoto K, Hattori T, Sugihara H, Asano S. Ezrin, a membrane cytoskeletal cross-linker, is essential for the regulation of phosphate and calcium homeostasis. *Kidney Int.* 83(1): 41-49, 2013.
 9. Okayama T, Kikuchi S, Ochiai T, Ikoma H, Kubota T, Ichikawa D, Fujiwara H, Okamoto K, Sakakura C, Sonoyama T, Kokuba Y, Doi Y, Tsukita S, Bissell DM, Otsuji E. Attenuated response to liver injury in moesin-deficient mice: impaired stellate cell migration and decreased fibrosis. *Biochim Biophys Acta.* 1782(9): 542-548, 2008.
 10. Hashimoto S, Amaya F, Matsuyama H, Ueno H, Kikuchi S, Tanaka M, Watanabe Y, Ebina M, Ishizaka A, Tsukita S, Hashimoto S. Dysregulation of lung injury and repair in moesin-deficient mice treated with intratracheal bleomycin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 295(4): L566-L574, 2008.
 11. Carmosino M, Rizzo F, Procino G, Zolla L, Timperio AM, Basco D, Barbieri C, Torretta S, Svelto M. Identification of moesin as NKCC2-interacting protein and analysis of its functional role in the NKCC2 apical trafficking. *Biol Cell.* 104(11): 658-676, 2012.
 12. Tamma G, Procino G, Svelto M, Valenti G. Hypotonicity causes actin reorganization and recruitment of the actin-binding ERM protein moesin in membrane protrusions in collecting duct principal cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292(4): C1476-C1484, 2007.
 13. Takahashi N, Chernavvsky DR, Gomez RA, Igarashi P, Gitelman HJ, Smithies O. Uncompensated polyuria in a mouse model of Bartter's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(10): 5434-5439, 2000.
 14. Cantone A, Yang X, Yan Q, Giebisch G, Hebert SC, Wang T. Mouse model of type II Bartter's syndrome. I. Upregulation of thiazide-sensitive Na-Cl cotransport activity. *Am J Physiol Renal Physiol.* 294(6): F1366-F1372, 2008.
 15. Carmosino M, Procino G, Svelto M. Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter type 2 trafficking and activity: the role of interacting proteins. *Biol Cell.* 104(4): 201-212, 2012
 16. Ramel D, Wang X, Laflamme C, Montell DJ, Emery G. Rab11 regulates cell-cell communication during collective cell movements. *Nat Cell Biol.* 15(3): 317-324, 2013.

Physiological Roles of Moesin, a Membrane Cytoskeletal Cross-Linker in the Renal Salt and Water Reabsorption

Ryo Hatano, Kotoku Kawaguchi, Shinji Asano

Department of Molecular Physiology, College of Pharmaceutical Sciences,
Ritsumeikan University

Summary

Electrolytes as Na^+ , K^+ , and Cl^- have a vital role in maintaining body fluid homeostasis. Kidney is an essential organ to keep these electrolytes balance in the body and several ion transporters and channels play pivotal roles in keeping electrolytes balance. Although more than 50 % of Na^+ filtered in the glomerulus are reabsorbed in the proximal tubules via Na^+ transporters as Na^+ -dependent glucose cotransporter, Na^+/H^+ antiporter, Na^+ -phosphate cotransporter and so on, this process seems to be required for the reabsorption of nutrients but not the regulation of body fluid balance. In the thick ascending limb of Henle (TALH), 20 to 40 % Na^+ are reabsorbed by NKCC2 (Na-K-Cl cotransporter 2), which plays essential roles in the reabsorption of electrolytes and volume balance regulation. Despite of the physiological importance of NKCC2 in the regulation of NaCl homeostasis, the molecular mechanisms for its membrane trafficking are not elucidated. Recently, Carosino *et al.* reported that Moesin, which is a member of ERM (Ezrin-Radixin-Moesin) family, plays an important role in the apical membrane trafficking of NKCC2 by *in vitro* experiments. Thus, we examined the physiological importance of Moesin in the regulation of renal function by using moesin deficient mice. We found that moesin deficient mice exhibited the significant increase in the fractional urinary excretion of electrolytes (Na^+ , K^+ , and Cl^-), whereas total urinary contents of these electrolytes were not different between Wild type and Moesin deficient mice. Furthermore, Moesin deficient mice showed moderate hypotensive phenotype and significantly reduced glomerular filtration rate, suggesting the possible compensation for the urinary loss of electrolytes. Immunofluorescent analysis also indicated the reduced apical surface expression of NKCC2 in Moesin deficient mice. In summary, our study suggests that Moesin plays an important role in the maintaining the apical surface expression of NKCC2 in TALH and regulation of the electrolyte reabsorption *in vivo*.