

コレクトリンは SNARE 複合体との相互作用を介して 管腔側膜蛋白の膜輸送を促進し食塩感受性高血圧の発症 に関与している

安原章浩*, 和田 淳, 江口 潤, 中司敦子, 村上和敏, 神崎資子,
勅使川原早苗, 横野博史

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学

キーワード：食塩感受性高血圧, コレクトリン, 集合管, SNARE 複合体, ナトリウム再吸収

Collectrin Is Involved in the Development of Salt-Sensitive Hypertension by Facilitating the Membrane Trafficking of Apical Membrane Proteins via Interaction with Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein Receptor Complex

Akihiro Yasuhara*, Jun Wada, Jun Eguchi, Atsuko Nakatsuka, Kazutoshi Murakami, Motoko Kanzaki, Sanae Teshigawara, Hirofumi Makino

Department of Medicine and Clinical Science, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

緒 言

コレクトリンはアンジオテンシン変換酵素2 (ACE 2) と相同性を有する1型膜蛋白である。我々は、コレクトリンが腎集合管細胞の細胞質と管腔側細胞膜に局在することを報告した¹⁾。コレクトリンはACEやACE2に存在する酵素活性部位を持たないが、ACE2と遺伝子座が近接している。ACE2はACEの酵素活性部位とコレクトリンの膜貫通部位を有しており、ACE2はACEとコレクトリンのキメラ蛋白かもしれ

ない。コレクトリンは膵β細胞^{2,3)}や近位尿細管細胞^{4,5)}においてHepatocyte nuclear factor (HNF)-1αの転写制御を受けている。我々は、コレクトリンがHepatocyte nuclear factor (HNF)-1βの転写制御を受け、集合管細胞の管腔側膜上と絨毛に発現することを報告した⁶⁾。HNF-1αノックアウトマウスは糖尿病とともに、尿糖、リン酸尿、カルシウム尿、アミノ酸尿を伴うファンconi症候群を発症する⁷⁾。一方で、腎特異的にHNF-1βを阻害すると多発性嚢胞腎 polycystic kidney disease (PKD) を発症し、嚢胞形成にはコレクトリンやPKD関連遺伝子 (Umod, Pkhd 1, Pkd 2, Tg737/Polaris) の欠失が関与している。また、常染色体優性のMaturity-onset diabetes mellitus of the young, type 5 (MODY 5) ではHNF-1β遺伝子の変異を認め、2型糖尿病や単純嚢胞、多発性嚢胞腎、嚢胞性低

平成22年1月受理

*〒553-0003 大阪市福島区福島4-2-78

電話：06-6441-5451 FAX：06-6445-8900

E-mail：akihiroyasuhara@okn.gr.jp

プロフィール



安原 章浩

昭和50年1月12日生

平成12年3月 島根医科大学医学部卒業

平成21年3月 岡山大学大学院医歯薬学部総合研究科修了

平成18年10月 岡山大学医学部・歯学部附属病院腎臓・糖尿病・内分泌内科医員

平成19年10月 岡山大学医学部・歯学部附属病院総合診療内科医員

平成12年10月 | 社団法人 日本海員救済会 神戸救済会病院に勤務

平成14年9月 | 財団法人 津山慈風会 津山中央病院内科に勤務

平成20年4月 大阪厚生年金病院内科に勤務

平成21年7月 現在に至る

形成, 糸球体性嚢胞性疾患などの腎奇形を呈する。我々は, コレクトリンが一次繊毛関連膜蛋白の一つであり, 繊毛形成, 腎嚢胞形成に関与していると報告した。コレクトリンは一次繊毛基部周囲の小胞体にも存在し, γ -actin-myosin II-A や SNARE, Polycystin-2-polaris 複合体と結合し, 小胞体や膜蛋白の細胞内や繊毛への輸送に関与していた⁶⁾。

最近, コレクトリンノックアウトマウスは腎での重度のアミノ酸再吸収不全を呈すると報告され, コレクトリンの欠損は多種のアミノ酸輸送体の膜上への発現低下に関与していた^{4,5)}。コレクトリンノックアウトマウスは糖尿病, 高血圧, 腎嚢胞を呈さなかったが, ACE 2 等の遺伝子がコレクトリンの作用を代償しようと考えられ, コレクトリンは膵 β 細胞や集合管細胞において何らかの役割を担っていると推察している。

我々は, コレクトリンが SNAP-25 (synaptosomal-associated protein of 25kDa) binding protein の Snapin と相互作用し, SNARE 複合体を形成し^{2,6)}, 膵 β 細胞において SNARE 複合体形成を制御しインスリンの開口分泌を促進すると報告した²⁾。ノックアウトマウスにおける近位尿細管細胞刷子縁でのアミノ酸トランスポートの減少もコレクトリンと SNARE 複体の相互作用から証明できるかもしれない。

これらを踏まえて我々は, コレクトリンが SNARE 複合体との相互作用を介して様々な管腔側膜蛋白の膜輸送に関与し, ナトリウム, 水の調節を行ない, 高血圧の発症に関与していると仮説を立て, Wister-Kyoto (WKY) ラットと自然発症高血圧ラット (SHR) に高食塩食を負荷し, コレクトリンの食塩感受性高血圧における役割を検討した⁸⁾。

材料と方法

1. PCR と Stable cell line の作成

マウス集合管細胞 (mIMCD3 細胞) を培養し, total RNA を精製した。cDNA を合成し, PCR にて mRNA の発現を確認した。コレクトリンの Stable cell line を作成し, さらに siRNA で処理し, 二重染色と免疫沈降を行なった⁶⁾。

2. 動物実験

7 週齢のオス SHR (28匹) と WKY ラット (28匹) を 9 週齢から 17 週齢まで 1% 食塩食と 8% 食塩食に分けて飼育した^{8,9,10,11)}。17 週齢で血圧, 尿中アルブミン排泄量, ナトリウム排泄量などの代謝データを測定し

た。

3. ノーザンブロットとウエスタンブロット

17 週齢の SHR と WKY ラットの腎臓を皮質と髄質に分け, mRNA, 蛋白を抽出した。mRNA をノーザンブロットに使用した。また, 超遠心法を用いて蛋白を膜蛋白分画 (PM), 小胞体蛋白分画 (VM) に分離し, ウエスタンブロットを施行した¹²⁾。

4. プロモーターアッセイ

コレクトリン遺伝子 5' 側のの上流 2 K のプロモーター領域を pGL4 ホタルルシフェラーゼベクター (pGL4) に ligation し, トランスフェクションした。効率補正のために pGL4.73 ウミシイタケルシフェラーゼベクターを同時にトランスフェクションした。ホタルルシフェラーゼ活性をウミシイタケルシフェラーゼ活性で除して補正した。

5. 定量 PCR

mIMCD3 細胞をアルドステロン 1 μ M, Flow1Hz, 塩化ナトリウム (175mM, 200mM, 225mM, 275mM) で 8 時間培養し, 定量 PCR にて mRNA の発現を検討した。

6. ユビキチン化蛋白濃縮とウエスタンブロット

mIMCD3 細胞と腎組織から RIPA バッファーでホモジェネートを作成した。ポリユビキチンアフィニティレジンを加えインキュベーションした。レジンをスピニングカラムに吸着後, ポリユビキチン化蛋白をサンプルバッファーで溶出した。最終産物をコレクトリン抗体とユビキチン抗体でウエスタンブロットした。

結 果

1. コレクトリンは SNARE 関連蛋白と集合管細胞内で相互作用する。

mIMCD3 細胞でのコレクトリン, SNARE 関連蛋白の mRNA 発現を PCR にて確認した。コレクトリンの Stable cell line を用い, 免疫沈降にてコレクトリン, Snapin, SNAP-23, Syntaxin-4, VAMP-2 が SNARE 複合体を形成することを証明した (図略)。

2. コレクトリンは SNAP-23 や管腔側膜蛋白と局在が一致している。

mIMCD3 細胞や Stable cell line にて管腔側と基底外側細胞膜でのコレクトリンの発現を確認した (図 1 A, 1 B)。コレクトリンと SNAP-23 の局在は部分的に一致した (図 1 A, 1 B)。アクアポリン-2, α -ENaC, H^+ -ATPase, (図 1 D, 1 E), Na^+/K^+ ATPase α -1 (図 1 G, 1 H) などの膜蛋白とコレクトリンは

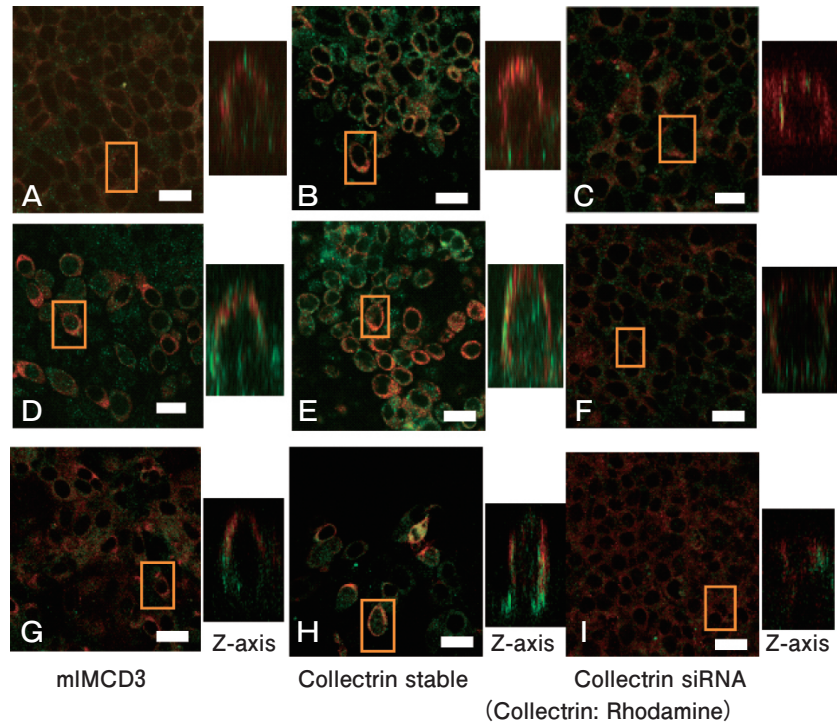


図1 Double immunostaining of mIMCD3 cell line over-expressing collectrin. Immunostaining of SNAP-23 (A-C), aquaporin-2, H^+ -ATPase and α -ENaC (epithelial sodium channel) (D-F), Na^+/K^+ ATPase $\alpha 1$ (G-I), using FITC-conjugated secondary antinodies (green). Double immunostaining of collectrin was performed with rhodamine-conjugated secondary antibody (red). mIMCD3 cells (mIMCD3; left panels), stably collectrin-expressing mIMCD3 cells (Collectrin stable; center panels), and mIMCD3 cells treated with collectrin siRNA (Collectrin siRNA; right panels) are shown. Apical and basolateral membranes visualized with vertical axis view constructed from individual cells (squares) and are indicated. Collectrin siRNA treatment results in the reduction of membrane proteins. Scale bars: $20\mu m$.

完全には一致しなかった。siRNA 処理にて，SNAP-23，各種膜蛋白の発現が減弱し（図1 C，1 F，1 I），コレクトリンは膜蛋白の膜輸送に関与していると考えられた。

3. WKY ラットの腎臓におけるコレクトリンの発現

コレクトリン，Snapin，SNAP-23，Syntaxin-4，VAMP-2 は集合管細胞質と管腔側膜上に発現していた。皮質，外側髄質，内側髄質に分け，超遠心法を用いてさらに形質膜分画（PM）と小胞体分画（VM）に分離したが，いずれの蛋白も皮質，髄質のPM，VM分画に広く分布していた（図省略）。

4. WKY ラット，SHR における高食塩食の効果

正常食塩食（1%塩化ナトリウム）では，収縮期，平均血圧はSHRで高値であった。高食塩食（8%塩化ナトリウム）ではWKYラット，SHRともに，収縮期血圧の有意な上昇を認めた（図2 A，2 B）。高食塩食にて一日飲水量と一日尿量が増加したが，SHRの方が顕著であった（図2 C，2 D）。ナトリウム摂取量とナトリウム排泄量も高食塩食で増加したが，SHRのナト

リウム排泄量の増加が顕著であった（図2 E，2 F）。尿中アルドステロン排泄量は高食塩食にて両ラットとも著明に抑制された（図2 G）。

5. SHR におけるコレクトリンとイオン，水チャネルの発現

皮質集合管の蛍光染色にて，コレクトリンの発現は，高食塩食群のWKYラットで著明であった。SHRの高食塩食群でも，コレクトリンの発現亢進を認めたが，その反応は軽度であった（図3 A）。ノーザンブロットにおいても，両ラットの高食塩食群においてコレクトリンの発現亢進を認めた（図3 B）。蛋白レベルでは，高食塩食にて，WKYラットの皮質でコレクトリン，アクアポリン-2， α -ENaC， H^+ -ATPase， Na^+/K^+ ATPase $\alpha -1$ いずれも著明な発現亢進を認めたが，髄質ではコレクトリン，アクアポリン-2のみであった（図3 C）。SHRでは，高食塩食によるコレクトリンの発現亢進を認めたが，他の膜蛋白は変化しなかった（図3 C）。コレクトリンはWKYラット，SHRいずれの群も小胞体分画に比べ，形質膜分画に多く発現し

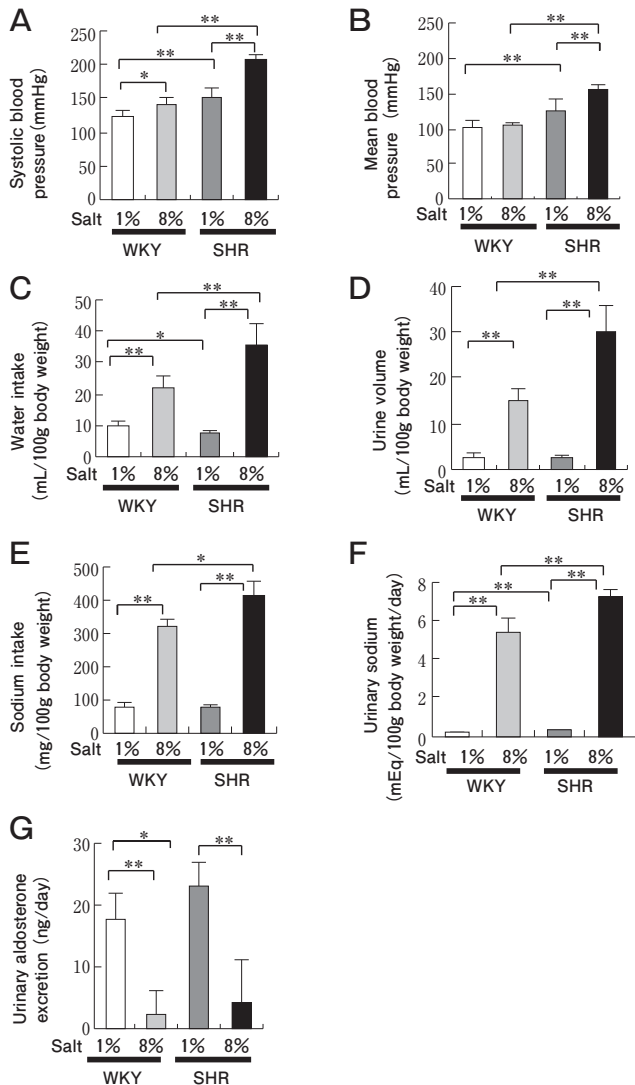


図2 Blood pressure and sodium and water balance in WKY rats and spontaneously hypertensive rats (SHR) treated with high-salt diet. At 9 weeks of age, SHR and WKY rats were fed with MF chow containing 1% sodium chloride or 8% sodium chloride. At 17 weeks of age, the rats were placed in metabolic cages to obtain 24-hour urine collections, and their daily albumin and sodium excretion levels were measured.

ていた。アクアポリン-2, α -ENaC, H^+ -ATPaseなどの管腔側膜蛋白も同様に小胞体より形質膜に多く発現していた(図3D)。一方, Na^+/K^+ ATPase α -1を主とする基底外側膜蛋白の発現は, WKYラット, SHR, 小胞体分画, 形質膜分画いずれもほとんど変化はなかった(図3D)。

6. mIMCD3細胞におけるコレクトリンの発現調節

125mM塩化ナトリウム濃度のコントロールメディアに50mM, 75mMの塩化ナトリウムを添加すると, コレク

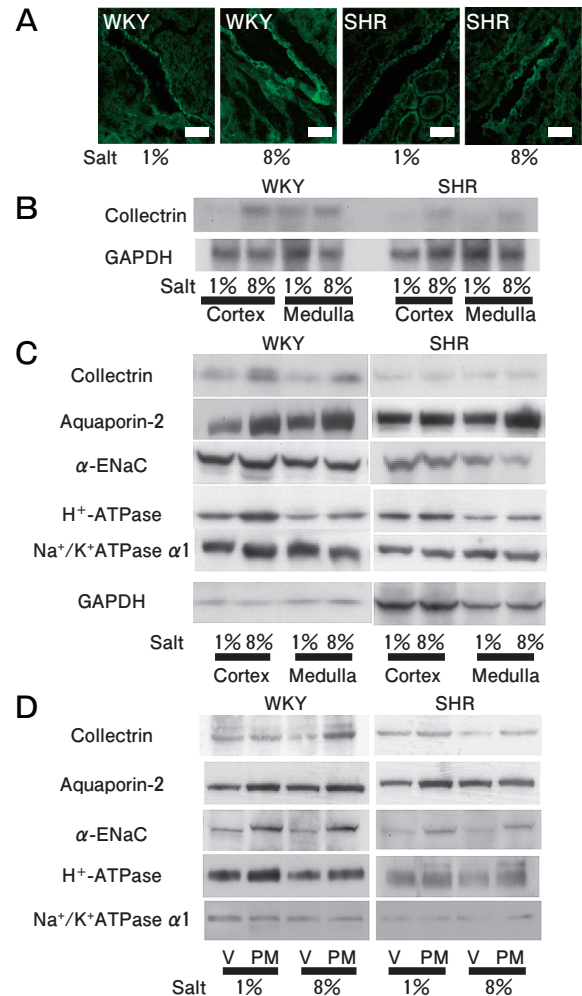


図3 Expression of collectrin and apical and basolateral membrane proteins in renal tissues in WKY rats and spontaneously hypertensive rats (SHR) treated with high-salt diet. (A) Immunofluorescence staining of collectrin in renal tissues of WKY rats and SHR treated with 1% sodium chloride chow or 8% sodium chloride chow. Scale bar: 50 μ m. (B) Northern blot analysis of collectrin in renal tissues of WKY rats and SHR. mRNA expression of collectrin increases by the treatment of high-salt diet both in WKY rats and in SHR. (C) Western blot analysis of collectrin, Sgk1 and various membrane proteins. High-salt chow prominently up-regulated the protein expression of collectrin, aquaporin-2, α -ENaC, H^+ -ATPase, and Na^+/K^+ ATPase α 1 in renal cortex, while collectrin and aquaporin-2 were up-regulated in renal medulla of WKY rats. In SHR, treatment of high-salt chow up-regulates collectrin and Sgk1 expression, while expression of other membrane proteins including aquaporin-2, α -ENaC, H^+ -ATPase, and Na^+/K^+ ATPase α 1 are not altered in renal cortex and medulla. (D) Western blot analysis of vesicular (V) and plasma membrane (PM) fractions. Under high-salt chow, the distribution of apical membrane proteins, aquaporin-2, α -ENaC, H^+ -ATPase, is maintained in PM fractions and higher than V fractions both in WKY rats and SHR.

トリン遺伝子のプロモーター活性が約5倍に上昇した。高塩化ナトリウム濃度（225mM, 275mM）では濃度依存的に活性低下を示した（図4A）。アルドステロンやFlowの刺激ではプロモーター活性に変化はなかった。175mM塩化ナトリウム濃度においてmRNA発現は約2倍増加したが、その他の塩化ナトリウム濃度では有意差を認めなかった（図4B）。

7. コレクトリンはユビキチン化によって発現調節を受けている。

mIMCD3細胞において、175mM, 200mM, 225mM塩化ナトリウム濃度でコレクトリン蛋白の発現が亢進した。アルドステロン, Flow刺激, 275mM塩化ナトリウム濃度では変化がなかった（図5A）。コレクトリンのユビキチン化は175mM, 200mM, 225mM塩化ナトリウム濃度にて減少した。WKYラットでは、高食塩食にてコレクトリンのユビキチン化は減少したが、SHRではユビキチン化は減少しなかった（図5B, 5C）。塩化ナトリウム負荷によるコレクトリンの発現亢進は、コレクトリン蛋白のユビキチン化の減少が関与していた。

考 察

我々は、コレクトリンがSnapinと相互作用し、集合管細胞でSnapin, SNAP-23, Syntaxin-4, VAMP-2とSNARE複合体を形成すると報告した。アクアポリン-2, H^+ -ATPase, α -ENaC等の管腔側膜蛋白はSNARE複合体によって誘導される^{12,13}。Stable cell lineやsiRNAの結果から、アクアポリン-2, α -ENaC, H^+ -ATPase, Na^+/K^+ ATPase α -1の形質膜への選択的な膜輸送はコレクトリンによって誘導されると考えた。コレクトリンは集合管細胞の管腔側で、SNARE複合体を介して、様々な管腔側膜蛋白の輸送に関与しており、コレクトリンが高血圧においてナトリウム、水を制御していることが示唆された。

今回我々は、ラットの腎組織でコレクトリンmRNAと蛋白の発現が高食塩食にて亢進することを示した。WKYラットでは、高食塩食にて尿中アルドステロンレベルは著明に抑制されるが、コレクトリン, アクアポリン-2, α -ENaC, H^+ -ATPaseは形質膜上に保持されている。SHRでは、食塩摂取量が有意に増加し、コレクトリンの発現上昇がWKYラットに比べて軽度であるにもかかわらず、管腔側膜蛋白は形質膜上に維持されていた。

ENaCの発現はMineralocorticoid receptor (MR)

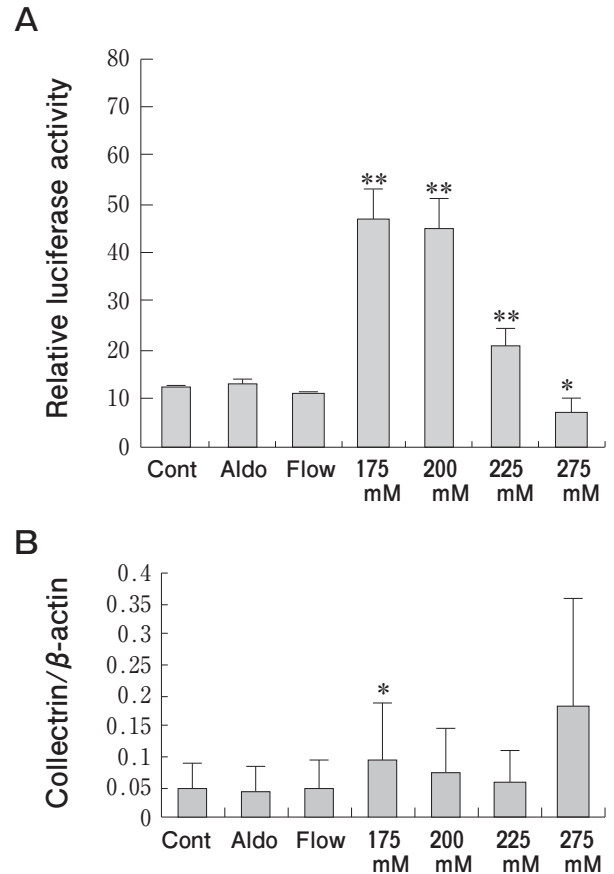


図4 Dual luciferase assay of the mouse collectrin promoter in mIMCD3 cells and mRNA expression of collectrin, α -ENaC and Sgk1. (A) pGL4 carrying 5'-flanking collectrin promoter lesion expanding from -2323 to -1 bp (pGL4-2K) and pGL4.73 [*hRluc*/SV40] was co-transfected. Relative luciferase activity. Luciferase activities are up-regulated in 175mM, 200mM, 225mM sodium chloride, while they are not altered in aldosterone (1 μ M) or fluid flow on an orbital shaker at ~1 Hz. (B) mRNA expression is up-regulated by the treatment of 175mM sodium chloride.

やSgk1の活性化によって一部は維持されているかもしれないが¹⁴、形質膜でのENaCの保持にはSNARE複合体を介したコレクトリンの発現亢進が関与していると結論づけた。

次に、高食塩状態でのコレクトリンの発現亢進メカニズムについて検討した。コレクトリンの転写活性はアルドステロンやFlowで変化がなく、175mMから225mMの塩化ナトリウム濃度によって上昇を認めた。しかし、mRNAの発現亢進は著明ではなく、我々はコレクトリンのユビキチン化について検討を行なった。mIMCD3細胞にて、175mMから225mMの塩化ナトリウム濃度でコレクトリン蛋白のユビキチン化が減少し

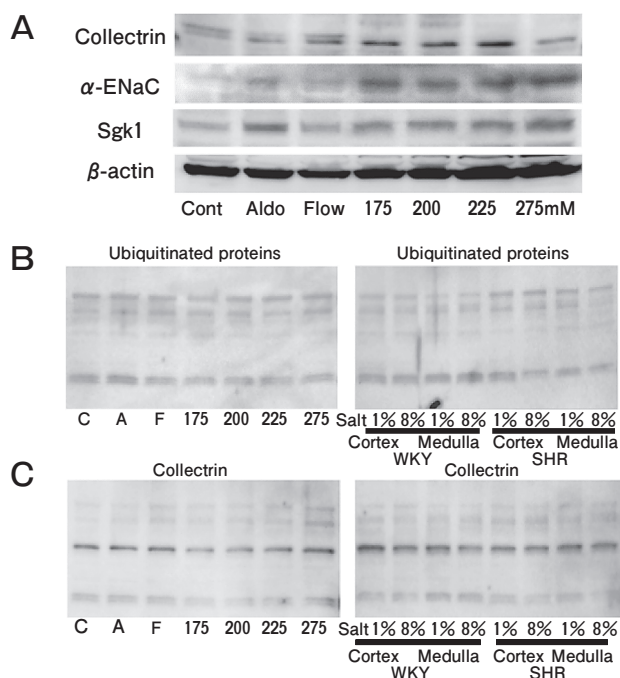


図5 Western blot analyses of collectrin, α -ENaC, and Sgk1 in mIMCD3 cells and ubiquitination of collectrin. (A) In mIMCD3 cells, Collectrin is up-regulated by high sodium chloride conditions (175–225mM), while α -ENaC and Sgk1 are increased by the treatment of aldosterone (1 μ M) and high sodium chloride conditions (175–275mM). (B) and (C) mIMCD3 cell and kidney tissues were lysed in RIPA buffer and polyubiquitinated proteins were eluted and blotted with rabbit mouse anti-mono- and polyubiquitinated conjugates antibody (B) and anti-collectrin antibody (C). The equal amounts of ubiquitinated proteins are isolated (B). In mIMCD3 cells, high sodium chloride conditions (175–225mM) reduced ubiquitinated collectrin and, in WKY rats and SHR, high-salt chow decreased ubiquitinated collectrin (C).

た。同様に、高食塩食を負荷したラットの腎皮質と髄質においてもユビキチン化が減少した。

以上の結果より、食塩感受性高血圧におけるナトリウムと水の再吸収の一部は、コレクトリンの発現亢進によって調節されている。コレクトリンの発現亢進は、高食塩状態による転写活性の上昇と、ユビキチン化の減少によって説明可能である。高食塩食にてアルドステロンは著明に抑制されるが、管腔側膜上でENaCは増加する。このことは、腎局所でのパラドキシカルなSgk1とMRの発現亢進で部分的には説明可能である。しかし、コレクトリンが高食塩状態で発現亢進し、SNARE複合体を介してENaCをはじめとする管腔側膜蛋白の膜輸送を促進しており、食塩感受性高血圧のナトリウムと水の再吸収にはコレクトリンが関与して

いる。我々は、腎でイオンと水の制御を行なうコレクトリンをRAS系の新たなACE遺伝子の一員として加えたい。

結 論

高食塩状態でのコレクトリンの発現亢進は、アルドステロンとは独立して、SNARE複合体を介して管腔側膜蛋白の膜輸送を促進しており、コレクトリンが食塩感受性高血圧のナトリウムの再吸収に関与している。

謝 辞

本研究におきまして、ご指導ご鞭撻を賜りました横野博史教授、和田淳講師、そして研究グループの各先生方にこの場をお借りして深謝致します。

文 献

- 1) Zhang H, Wada J, Hida K, Tsuchiyama Y, Hiragushi K, Shikata K, Wang H, Lin S, Kanwar YS, Makino H: Collectrin, a collecting duct-specific transmembrane glycoprotein, is a novel homolog of ACE2 and is developmentally regulated in embryonic kidneys. *J Biol Chem.* (2001) 276, 17132–17139.
- 2) Fukui K, Yang Q, Cao Y, Takahashi N, Hatakeyama H, Wang H, Wada J, Zhang Y, Shimomura I, Miyagawa J, Wollheim CB, Yamagata K, et al.: The HNF-1 target collectrin controls insulin exocytosis by SNARE complex formation. *Cell Metab.* (2005) 2, 373–384.
- 3) Akpinar P, Kuwajima S, Krutzfeldt J, Stoffel M: Tmem27: a cleaved and shed plasma membrane protein that stimulates pancreatic beta cell proliferation. *Cell Metab.* (2005) 2, 385–397.
- 4) Malakauskas SM, Quan H, Fields TA, McCall SJ, Yu MJ, Kourany WM, Frey CW, Le TH: Aminoaciduria and altered renal expression of luminal amino acid transporters in mice lacking novel gene collectrin. *Am J Physiol Renal Physiol.* (2007) 292, F533–F544.
- 5) Danilczyk U, Sarao R, Remy C, Benabbas C, Stange G, Richter A, Camargo SM, Makrides V, Ramadan T, Verrey F, Wagner CA, Penninger JM, et al.: Essential role for collectrin in renal amino acid transport. *Nature.* (2006) 444, 1088–1091.
- 6) Zhang Y, Wada J, Yasuhara A, Iseda I, Eguchi J, Yamagata K, Hiesberger T, Igarashi P, Zhang H, Akagi S, Kanwar YS, Makino H, et al.: The role for HNF-1beta-targeted collectrin in maintenance of primary cilia and cell polarity in collecting duct cells. *PLoS ONE.* (2007) 2, e414.
- 7) Pontoglio M, Barra J, Hadchouel M, Doyen A, Kress C, Bach JP, Babinet C, Yaniv M: Hepatocyte nuclear factor

- l inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell*. (1996) 84, 575-585.
- 8) Yu HC, Burrell LM, Black MJ, Wu LL, Dilley RJ, Cooper ME, Johnston CI : Salt induces myocardial and renal fibrosis in normotensive and hypertensive rats. *Circulation*. (1998) 98, 2621-2628.
- 9) McBride SM, Culver B, Flynn FW : Prenatal and early postnatal dietary sodium restriction sensitizes the adult rat to amphetamines. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. (2006) 291, R1192-R1199.
- 10) Pittman DW, Contreras RJ : Dietary NaCl influences the organization of chorda tympani neurons projecting to the nucleus of the solitary tract in rats. *Chem Senses*. (2002) 27, 4, 333-341.
- 11) Griffin KA, Churchill PC, Picken M, Webb RC, Kurtz TW, Bidani AK : Differential salt-sensitivity in the pathogenesis of renal damage in SHR and stroke prone SHR. *Am J Hypertens*. (2001) 14, 311-320.
- 12) Mandon B, Chou CL, Nielsen S, Knepper MA : Syntaxin-4 is localized to the apical plasma membrane of rat renal collecting duct cells : possible role in aquaporin-2 trafficking. *J Clin Invest*. (1996) 98, 906-913.
- 13) Banerjee A, Li G, Alexander EA, Schwartz JH : Role of SNAP-23 in trafficking of H⁺-ATPase in cultured inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. (2001) 280, C775-C781.
- 14) Nagase M, Matsui H, Shibata S, Gotoda T, Fujita T : Salt-induced nephropathy in obese spontaneously hypertensive rats via paradoxical activation of the mineralocorticoid receptor : role of oxidative stress. *Hypertension*. (2007) 50, 877-883.